

学位論文

非結核性抗酸菌の薬剤排出能に関する検討

小崎 弘貴

Evaluation of drug efflux activity in non-tuberculous mycobacteria (NTM)

Hiroataka KOSAKI

## 緒言

近年、非結核性抗酸菌 (non-tuberculous mycobacteria : NTM) による呼吸器疾患が世界的に増加し、非常に大きな問題となっている<sup>1-3)</sup>。日本においても NTM 症の罹患者およびその死亡者数は年々増加し、その数は結核のそれを超えており<sup>4)</sup>、増加傾向にある薬剤耐性結核とともに迅速な対応が望まれる。

「非結核性抗酸菌」とは抗酸菌 (*Mycobacterium* 属細菌) の中で、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) とその類縁菌種からなる結核菌群、および培養不能菌であるらい菌 (*Mycobacterium leprae*) 以外の菌種をいう。これまで 160 種以上が同定されており<sup>5)</sup>、少なくとも 32 種類以上が病原性を有する<sup>6)</sup>。病原性を有する NTM の中には、*Mycobacterium avium* complex (MAC) と呼ばれる *M. avium* と *Mycobacterium intracellulare* の 2 菌種の分離頻度が最も高く<sup>3,7)</sup>、日本においては、次いで *Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium abscessus* の順に分離頻度が高い<sup>8)</sup>。

NTM 症の治療は抗菌化学療法が第一に行われる。しかし NTM は基本的に抗結核薬の多くに耐性を示し、クラリスロマイシン (clarithromycin : CAM)、リファンピシン (rifampicin : RFP)、そしてエタンブトール (ethambutol : EB) などの化学療法薬が治療に用いられ、多剤併用治療を行う<sup>9-11)</sup>。治療困難な症例も存在するが、それらは多剤耐性菌を起因菌とすることが多い<sup>12-14)</sup>。しかし、薬剤感受性試験の結果、感受性を示すと判定された化学療法薬が、臨床の場で奏効しない難治症例も散見される<sup>9,15)</sup>。

抗酸菌の薬剤耐性は、標的となる分子の遺伝子変異による<sup>16)</sup>ことが多いが、結核菌においては薬剤排出能の変化が複数薬剤への耐性に関与していることが報告されている<sup>17-21)</sup>。また、NTM においては薬剤排出関連遺伝子の操作や排出阻害薬を用いることで薬剤感受性が変化することが報告されている<sup>22,23)</sup>。特に NTM は、多剤併用化学療法に耐性を示すことも多く、一つのグループで複数種の薬剤を排出できるとされる排出ポンプの関与が疑われる。そのため、薬剤排出に関わる機能を評価することは NTM に関する理解や治療法の改善に貢献すると考え、その薬剤取込み能と排出能の評価法を確立することを計画した。

ところで、細菌の主要な薬剤排出ポンプとして major facilitator superfamily (MFS)、small multidrug resistance (SMR)、resistance nodulation/cell division (RND)、ATP-binding cassette transporters (ABC)、そして multi drug and toxic compound extrusion (MATE) が知られている<sup>24)</sup>。結核菌においてはこの中の 4 種類について薬剤耐性への関与を示唆する報告<sup>25,26)</sup>があり、*M. avium* においては特定の排出ポンプについて検討した報告<sup>27-29)</sup>はあるものの、取込み能と排出能の全体像を検討した報告は少ない。

一方、細菌の主要な薬剤排出ポンプの機能を阻害する薬剤 (efflux pump inhibitor : EPI) が存在し、ベルベリン (berberine) は MFS と RND を、レセルピン (reserpine) は RND を、ベラパミル (verapamil) とピペリン (piperine) は ABC を、カルボニルシアンイド m-クロロフェニルヒドラゾン (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone :

CCCP) は MFS を阻害することが知られている<sup>26)</sup>。さらに、CCCP とクロルプロマジン (chlorpromazine : CPZ) はそれぞれ酸化リン酸化と電子伝達系に作用し、間接的に複数の排出ポンプを阻害する可能性が示されている<sup>25, 26)</sup>。

細菌の薬剤排出能の評価には、エチジウムブロマイド (ethidium bromide : EtBr) が標識として広く用いられてきた<sup>30-34)</sup>。EtBr は溶液中では弱い蛍光を発するが、DNA にインターカレートすることでその蛍光は数十倍になる<sup>35)</sup>。結核菌を中心として、抗酸菌においても EtBr を用いた報告がなされているが<sup>22, 23, 34)</sup>、MAC およびその臨床分離株を対象とした報告は少ない。

本研究は、NTM 症の中で症例数の最も多い肺 MAC 症患者由来株を対象に、EtBr を用いて、薬剤取込み能と排出能を評価することを主な目的として行った。その中で、EPI 使用による影響を確認することも副次的に行ったが、これは将来的に、機能の高い排出ポンプの推定に役立つと考えられるためであった。

## 材料と方法

### 供試菌株

実験には、対照株を含めて以下の 11 菌株を使用し、対照以外の菌株については、国立病院機構刀根山病院および刀根山結核研究所から恵与いただいた。

#### *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* (MAH) : 10 菌株

MAH104 (NC\_008595.1) — 対照株

OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889

S1、S2、S3、S8

#### *Mycobacterium intracellulare* : 1 菌株

OCU963

なお、MAH104 を除く 10 菌株は、由来患者の病状から進行型患者由来株と安定型患者由来株に分けられた。

#### 進行型患者由来株 : OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889、OCU963

多剤併用化学療法後も塗抹陽性で胸部レントゲン写真 (CXR) にて増悪が認められた患者に由来する。

### 安定型患者由来株 : S1、S2、S3、S8

3年以上の経過観察期間中に CXR 上で病状の進行を認めなかった患者に由来する。

また、MAH104 については、AIDS 患者由来株として分離されて以降、実験室株として使用され、多剤耐性の報告がないこと、全遺伝子配列も公開されていることから対照株として使用した。

### 培地と培養条件

供試菌株は、アルブミン・デキストロース（和光純薬工業株式会社、大阪）・カタラーゼ（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）および 0.05% Tween80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、大阪）で前培養を行った。前培養後、室温で 500 rpm、5 分間遠心することにより凝集した菌を除去した。菌液を波長 590 nm における吸光度（optical density : OD）が 0.2~0.3 となるように調整したのち、さらに 37°C で 48 時間培養した。培養後菌液を上記の条件で再度遠心し、OD<sub>590</sub>=1.0 に調整したものをその後の実験に使用した。

### 試薬

verapamil、CCCP、CPZ、そして EtBr は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。reserpine は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。今回の実験系は、試薬の濃度を統一して、複数の菌株のデータを取得するように計画した。そのため、EPI の使用濃度は、既報<sup>23, 36)</sup>および我々が実施した MAH104 の感受性試験結果をふまえて決定した（表 1）。この感受性試験は、臨床・検査標準協会（CLSI : 2005 年に米国臨床検査標準委員会（NCCLS）から改称）によって示された微量液体希釈法<sup>37, 38)</sup>に基づき、判定の際にレサズリン（resazurin）色素（和光純薬工業株式会社、大阪）を用いる手法<sup>39)</sup>で行った。reserpine と verapamil はともに 50 µg/mL の、CCCP は 12.5 µg/mL の、CPZ は 6.25 µg/mL の終濃度となるように滅菌水で調整し、各実験に用いた。EtBr については、5 µg/mL の終濃度で使用した。EtBr は感受性試験結果において、3.125 µg/mL で MAH104 の増殖を阻害したが、既報のデータ<sup>23)</sup>もふまえて、蛍光の差を検出しやすくするために同濃度で使用した。なお、今回の実験に使用した菌数は感受性試験の概ね 100 倍に当たり、この条件において、終濃度 5 µg/mL の EtBr 使用で菌が不活化されないことは確認した。また、今回設定した濃度において、EtBr 単独および EtBr と EPI の 4 時間の併用によって増殖に影響が出ないことも確認できたため、試薬については上記の濃度で使用した。

## 化学療法薬の最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration : MIC）の測定

供試菌株の MIC の測定は、ブロスミック NTM<sup>®</sup>（極東製薬工業株式会社、東京）を用い、添付書類に記載の方法にしたがって、各株 1 回ずつ行った。なお、本キットを用いた感受性試験は CLSI によって示された微量液体希釈法<sup>37, 38)</sup>に準拠している。

## 薬剤取込み実験と排出実験

薬剤取込み実験は、Rodrigues らの報告<sup>23)</sup>を基にして、対象菌株の培地を置換後に EtBr を加えて蛍光測定をする手法をとった。我々の方法では、96 穴プレート上で蛍光測定する手法をとり、それに伴って、検出を容易にするため使用菌数を増やして実施した。

薬剤排出実験は、Rodrigues らの報告<sup>23)</sup>を基にして、対象菌株を EtBr 存在下で培養し、その後、培地を置換して蛍光測定する手法をとった。なお、我々は、96 穴プレート上で蛍光測定する手法をとったが、それに伴って、検出を容易にするために使用菌数を増やした。

また、両実験共に、菌が拡散しやすい液体培地の段階で菌数を調整し、操作による菌のロスを可及的に減らすために菌体洗浄は行わなかった。また、すべての菌株に対して 4 回の実験を行い、それぞれ 3 サンプルの蛍光測定を行った。各検体について、得られた 12 のデータに対して後述の方法で統計学的検定を行った。

### 薬剤取込み実験

OD<sub>590</sub>=1.0 に調整した菌液を遠心分離（17,800×g、10 分間）し、培地を除去した後、0.8% glucose 溶液を用いて OD<sub>590</sub>=1.0 になるように懸濁した。この菌液を 96 穴プレートの各穴へ 100 μL ずつ播種し、さらに前述の終濃度となるように各穴に各種 EPI 50 μL、EtBr 20 μL、および滅菌水 30 μL を加え、25°C で 4 時間培養した。対照サンプルには EPI の代わりに同量の滅菌水を加えた。蛍光の測定には Gemini XPS マイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Sunnyvale, California, U.S.A.）を使用し、励起波長 510 nm、検出波長 590 nm で 5 分毎に測定した。得られたデータは relative fluorescence units (RFU) として表した。

### 薬剤排出実験

OD<sub>590</sub>=1.0 に調整した菌液に EtBr（終濃度 5 μg/mL）を加え、25°C で 4 時間培養した。その後、遠心分離（17,800×g、10 分間）し、培地を除去した後、0.8% glucose 溶液を用いて OD<sub>590</sub>=1.0 になるように懸濁した。得られた溶液を 96 穴プレートの各穴へ 100 μL ずつ播種し、前述の終濃度となるように各穴へ各種 EPI 50 μL と滅菌水 50 μL を加えた。対照サンプルには EPI の代わりに同量の滅菌水を加えた。蛍光強度は取込み実験と同様の条件で測定を行った。得られたデータは 0 時間時点の RFU に対する各時点の RFU の比率（ratio of RFU）として表した。

## 統計処理

薬剤取込み実験における4時間時点のRFUについて50%ボックスプロットを作成し、統計ソフト「R」(ver. 3.4.0)を用いてSteel法によるノンパラメトリック多重検定を行った。有意水準5%をもって有意差ありとした。

薬剤排出実験の結果は0時間時点を基準としてratio of RFU ( $RFU_{x \text{ min}} / RFU_{0 \text{ min}}$ )を算出した。そして2時間時点のratio of RFUについて50%ボックスプロットを作成し、統計ソフト「R」(ver. 3.4.0)を用いてSteel法によるノンパラメトリック多重検定を行った。有意水準5%をもって有意差ありとした。

進行型患者由来株と安定型患者由来株の比較検討には、Wilcoxonの順位和検定を行った。有意水準5%をもって有意差ありとした。

## 結果

### 薬剤取込み実験

いずれの株も時間の経過とともに蛍光強度が増強した(図1-(A)、(B))。MAH104に比較し、OCU873、OCU881、そしてOCU889の3株は取込み開始4時間後のRFUが有意に低かった(図2)。なお、進行型患者由来株と安定型患者由来株の間に有意差はなかった(図2)。

### 薬剤排出実験

薬剤排出実験では測定開始後蛍光強度が減弱する傾向を示したが、蛍光強度が一度減弱した後に上昇する株が存在した(図3-(A)、(B))。薬剤排出実験では測定開始2時間後において、OCU855とOCU963の2株はMAH104に比べて蛍光強度が有意に低い値を示した(図4)。一方OCU873、OCU881、さらにS2の3株はMAH104に比べて蛍光強度が有意に高い値を示した。なお、進行型患者由来株と安定型患者由来株の間に有意差はなかった(図4)。

### MIC

ブロスミック NTM®を用いて各臨床分離株のストレプトマイシン(SM)、エタンブトール(EB)、カナマイシン(KM)、リファンピシン(RFP)、リファブチン(RBT)、レボフロキサシン(LVFX)、クラリスロマイシン(CAM)、エチオナミド(TH)、そしてアミカシン(AMK)のMICを測定した(表2)。なお、MACを含む遅発型NTMに対する抗菌薬のブレイクポイントは、CAMでのみ治療効果との相関性が確認されており、感受性試験においては、32 µg/mLより大きい場合に耐性と判定される<sup>9)</sup>。OCU867とOCU881はCAMのMICが32 µg/mLより高濃度であり、耐性と判定した。さらに、今回使用した

ブロスミック NTM の添付文書には、RBT 以外の参照ブレイクポイントも示されているが、安定型患者由来でも多剤耐性と判定される株や、進行型患者由来でも単剤にしか耐性をもたない株があり、疾患重症度と感受性試験結果に一定の傾向は見出せなかった。

### 薬剤取込みと排出に対する EPI の影響

EtBr の取込み能と排出能に対する各 EPI の影響を調べた。薬剤取込み実験（表 3）において、CCCP の添加により S3 を除く 9 株は蛍光強度が有意に増強した。しかし、OCU867、OCU963、S1、そして S2 では CPZ の添加により蛍光強度が有意に低下した。さらに、S2 では verapamil によっても蛍光強度は低下した。

薬剤排出実験（表 4）においては、OCU867 を除く 9 株で CCCP の添加により蛍光強度の低下が顕著に抑制された。さらに、OCU855 では verapamil と CPZ によっても、OCU963 では reserpine によっても蛍光強度の低下が抑制された。しかし、OCU881、S1、そして S2 では CPZ によって蛍光強度の低下が促進された。

### 考察

NTM 症の中で MAC 症の罹患率は最も高く、その中でも肺 MAC 症の症例は最も多い<sup>8)</sup>。MAC は抗結核剤の多くに耐性を示し、また、MAC 症の治療に使用される化学療法薬に抵抗する症例も少なくない<sup>12-14)</sup>。しかし、それらに抵抗する耐性機構には不明な点が多い。本研究では EtBr を指標として、MAC 臨床分離株の薬物の取込みおよび排出動態を検出することを試みた。測定された蛍光強度は、薬剤取込み実験においては、菌体外から取込んだ EtBr の量から、取込んだのちに菌体外に排出した EtBr の量を引いた EtBr の量を反映していると考えられる。一方、薬剤排出実験においては、菌体から排出されずに菌体内に残存した EtBr の量と、菌体外に排出されたのちに菌体内に再度取込まれた EtBr の量の和を反映していると考えられる。しかしながら、インターカレーションによって EtBr の蛍光強度は数十倍となるため<sup>35)</sup>、時間がたつと 0 時間時点の数値を超える場合もある。

各株における EtBr の取込みおよび排出動態は株ごとに異なっていたが、進行型患者由来株と安定型患者由来株の間に有意な差はなかった（図 2、図 4）。しかし、中には特徴的な動態を示す株が存在した（図 1、図 3）。OCU873 と OCU881 の蛍光強度は薬剤取込み実験では低い値を示し、薬剤排出実験では高い値を示した。このことはこれらの株の薬剤排出能は低いが、薬剤取込み能も低く、もともと菌体内外を移動し、蓄積される薬剤の量が少ないことを示唆するものと考えた（表 5）。OCU855 と OCU963 の薬剤取込み実験における蛍光強度は対照株に使用した MAH104 と変わらないが、薬剤排出実験では蛍光強度は有意に低かった。このことから、これらの株は、薬剤の取込み能は MAH104 と変わらないが、顕著に高い排出能をもつことが示唆された（表 5）。OCU889 は薬剤排出実験

における蛍光強度は MAH104 と変わらないが、薬剤取込み実験における蛍光強度は顕著に低かった。このことから、この株は薬剤取込み能が低いとともに取込まれた薬剤の蓄積も低いことが推測された（表 5）。S2 は逆に薬剤取込み実験における蛍光強度は MAH104 と変わらないが、薬剤排出実験における蛍光強度の低下は少なく、取込まれた薬剤が菌体内に蓄積される傾向にあることが推測された。以上のことから、OCU855、OCU873、OCU881、OCU889、そして OCU963 はそれらの取込みおよび排出動態は異なるものの、菌体内に蓄積される薬剤の量を低く抑える能力を有する可能性が示唆された。これらの株がいずれも進行型患者由来株であったことは興味深い結果であった。しかしながら、このような動態と MIC との間に明らかな関連性はなかった（図 2、図 4、表 2）。前述した感受性試験と治療効果の乖離とは異なり、この二つの結果がともに *in vitro* で得られたことを考慮すると、両者は互いに反映されがたい要素であると考えられた。ただし、感受性試験が、単一薬剤使用時の目視可能な最終的な菌数で判断されるのに対し、蛍光実験は一定の負荷をかけた環境下での活動を評価するものであるため、因果関係について結論付けるためには、さらなる検討が必要と考えられた。

本研究で用いた EPI の中で CCCP は、それぞれ 1 株を除き、供試菌株に対して薬剤取込み実験における蛍光強度の有意な上昇（表 3）と、薬剤排出実験における蛍光強度の低下に対する有意な抑制（表 4）を引き起こした。このことは CCCP が薬剤排出ポンプの機能を阻害し、EtBr が排出されずに菌体内に蓄積されたことを反映したものと考えられる。CPZ は、薬剤取込み実験においては、OCU867、OCU963、S1、そして S2 の 4 株の蛍光強度上昇を有意に抑えた。一方で、薬剤排出実験においても 4 株に対して有意に影響を与えたが、OCU855 に排出阻害効果をもたらしたものの、OCU881、S1、そして S2 の 3 株の排出を亢進する結果となった。CPZ は CCCP と同様に菌体内外の H<sup>+</sup>および電位勾配に変化を与え、間接的に複数の排出ポンプを阻害することが期待されたが<sup>26)</sup>、逆の結果を示すものが多かった。この効果の差は CPZ と CCCP の作用機序の違いによるものと考えられる。

CCCP は脱共役剤として働くが、原核生物においては ATP シンターゼを介さずに菌体内に H<sup>+</sup>を漏入させて ATP 産生を妨げる。一方で CPZ は電子伝達系の NDH-2 および SDH に作用し、H<sup>+</sup>の汲み出しと電子伝達を妨げる<sup>25, 40)</sup>。CCCP と CPZ はそれぞれ酸化的リン酸化と電子伝達系に働きかけ、ATP 産生や H<sup>+</sup>流出を阻害することで H<sup>+</sup>および ATP 駆動の排出ポンプを阻害すると推測される。しかし、両者には、細胞内に潜在する H<sup>+</sup>の動きの抑制と、細胞外に存在する H<sup>+</sup>の流入という作用の違いがある。それ故に、CCCP の方が、細胞外 H<sup>+</sup>濃度の低下と、細胞内 H<sup>+</sup>濃度上昇に伴う H<sup>+</sup>流入制限を強く引き起こし、結果に大きな違いが生じたものと考えられる。なお、今回 CPZ が予測と逆の効果を示した機構については現時点では不明であり、今後の検討が必要である。

CCCP と CPZ の効果に対し、reserpine と verapamil においても統計学的に有意差を示す株が存在したものの、蛍光強度の変化はほとんどみられなかった。reserpine と



verapamil が特定種の薬剤排出ポンプに作用するのに対し、CCCP と CPZ は複数種の薬剤排出ポンプに作用する阻害薬である<sup>26)</sup>。これらのことから MAC においても、EtBr の菌体内外の輸送は複数の機構により行われていることが示された。また、Rodrigues らの実験<sup>23)</sup>は、各対象株に対する効果濃度を測定して試薬を使用していたのに対し、我々は MAH104 に対する効果濃度を参考として他の株に適用する実験系を用いた。したがって、EPI を併用する実験系については、今後分離されてくる多くの株に適用することも考慮しつつ、さらなる改善、検討が必要であると考えられた。

## 結論

EtBr を用いて、MAC 臨床分離株における菌体内外の薬剤移動を評価することができた。その結果、進行型患者由来株と安定型患者由来株の間に統計学的有意差はなかった。しかしながら、進行型患者由来株の過半数は、菌体内における薬剤の蓄積に抵抗することが推測され、疾患予後予測につながる可能性を示した。また、薬剤の蓄積、排出に、EPI が影響するものの、現段階では、細かな差を見出すことは困難であった。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科国際環境科学専攻口腔微生物学分野大原直也教授に深甚なる謝意を表します。

また、菌株を恵与いただきました国立病院機構刀根山病院前倉亮治先生（現 滋慶医療科学大学院大学）、北田清悟先生、本研究における議論、検討に当たって数々のご助言を賜りました大阪市立大学大学院医学研究科刀根山結核研究所西内由紀子先生、国立感染症研究所阿戸学先生に深く感謝申し上げます。

最後に、様々な面にわたりご協力いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科国際環境科学専攻口腔微生物学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Thomson RM.: Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis.*, 16, 1576-1583, 2010.
- 2) Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, et al.: Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med.*, 185, 881-886, 2012.
- 3) Prevots DR, Marras TK.: Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med.*, 36, 13-34, 2015.
- 4) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al.: Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan (1). *Emerg Infect Dis.*, 22, 1116-1117, 2016.
- 5) List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) [bacterio.net](http://www.bacterio.net). Available at : <http://www.bacterio.net>. Accessed November 13, 2017.
- 6) Katoch VM.: Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.*, 120, 290-304, 2004
- 7) Simons S, van Ingen J, Hsueh PR.: Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis.*, 17, 343-349, 2011.
- 8) Morimoto K, Hasegawa N, Izumi K, et al.: A Laboratory-based analysis of nontuberculous mycobacterial lung disease in Japan from 2012 to 2013. *Ann Am Thorac Soc.*, 14, 49-56, 2017.
- 9) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.*, 175, 367-416, 2007.
- 10) van Ingen J, Ferro BE, Hoefsloot W, et al.: Drug treatment of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in HIV-negative patients: the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 11, 1065-1077, 2013.
- 11) Philley JV, Griffith DE.: Treatment of slowly growing mycobacteria. *Clin Chest Med.*, 36, 79-90, 2015.
- 12) Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.*, 43, 3150-3158, 2005.
- 13) Griffith DE.: Therapy of nontuberculous mycobacterial disease. *Curr Opin Infect Dis.*, 20, 198-203, 2007.

- 14) Xu HB, Jiang RH, Li L.: Treatment outcomes for *Mycobacterium avium* complex: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 33, 347-358, 2014.
- 15) Kobashi Y, Yoshida K, Miyashita N, et al.: Relationship between clinical efficacy of treatment of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease and drug-sensitivity testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Infect Chemother.*, 12, 195-202, 2006.
- 16) Meier A, Heifets L, Wallace RJ Jr, et al.: Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. *J Infect Dis.*, 174, 354-360, 1996.
- 17) Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, et al.: Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45, 800-804, 2001.
- 18) Viveiros M, Leandro C, Amaral L, et al.: Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int J Antimicrob Agents*, 22, 274-278, 2003.
- 19) De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G.: Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev.*, 30, 36-52, 2006.
- 20) Amaral L, Martins M, Viveiros M.: Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *J Antimicrob Chemother.*, 59, 1237-1246, 2007.
- 21) Li G, Zhang J, Guo Q, et al.: Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One*, 10, e0119013, 2015.
- 22) Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, et al.: Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother.*, 61, 1076-1082, 2008.
- 23) Rodrigues L, Ramos J, Couto I, et al.: Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC microbiol.*, 11, 35, 2011.
- 24) Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A.: Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta*, 1794, 834-843, 2009.
- 25) Black PA, Warren RM, Louw GE, et al.: Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 58, 2491-2503, 2014.
- 26) Pule CM, Sampson SL, Warren RM, et al.: Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J Antimicrob. Chemother.*, 71, 17-26, 2016.

- 27) Marsh IB, Whittington RJ.: Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and *in silico* analysis. *Mol Cell Probes*, 19, 371-384, 2005.
- 28) Bay DC, Rommens KL, Turner RJ.: Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1814-1838, 2008.
- 29) Schmalstieg AM, Srivastava S, Belkaya S, et al.: The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 56, 4806-4815, 2012.
- 30) Jernaes MW, Steen HB.: Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 17(4), 302-9, 1994.
- 31) Greulich KO.: Single molecule techniques for biomedicine and pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol.*, 5(3), 243-59, 2004.
- 32) Martins M, Santos B, Martins A, et al.: An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In Vivo*, 20, 657-664, 2006.
- 33) Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, et al.: Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother.*, 59, 1261-1264, 2007.
- 34) Rodrigues L, Sampaio D, Couto I, et al.: The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents*, 34, 529-533, 2009.
- 35) Dutton MD, Varhol RJ, Dixon DG.: Technical considerations for the use of ethidium bromide in the quantitative analysis of nucleic acids. *Anal Biochem.*, 230(2), 353-355, 1995.
- 36) Balganes M, Kuruppath S, Marcel N, et al.: Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother.*, 54, 5167-5172, 2010.
- 37) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Tentative Standard—Second Edition. CLSI document M24-T2., CLSI, Wayne, PA, 2000.
- 38) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI document M24-A., CLSI, Wayne, PA, 2003.

- 39) Zhang Z, Yan J, Xu K, et al.: Tetrandrine reverses drug resistance in isoniazid and ethambutol dual drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Infect Dis.*, 15, 153, 2015.
- 40) Rodwell VW, Weil PA, Botham KM, et al.: Harper's illustrated biochemistry 30th edition. McGraw-Hill Companies, New York, 2015, p119-136.

## 脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔微生物学分野  
(指導 大原直也 教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (2017 年 9 月、長野)

第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2017 年 10 月、広島)

## 図の説明

- 図 1. 薬剤取込み実験における蛍光強度 (relative fluorescence units : RFU) の経時変化  
EtBr を加えた供試菌株の蛍光強度を経時的に測定し、その平均値を示す。(A) 進行型患者由来株、(B) 安定型患者由来株。それぞれ対照株 (MAH104) とともに示す。なお、蛍光データは、各条件について 4 回×3 つずつ収集し、それぞれ得られた 12 のデータを平均し、グラフ化した。
- 図 2. EtBr 取込み開始 4 時間後における蛍光強度 (relative fluorescence units : RFU) の比較  
各菌株 4 時間時点の RFU を 50%ボックスプロットとして示す。なお、蛍光データは、各条件について 4 回×3 つずつ収集し、得られた 12 のデータでボックスプロットを作成した。図中のボックスは、第 1 四分位点から第 3 四分位点までを囲み、中央値で仕切ったものである。また、MAH104 を対照とした株間比較を Steel 法で、進行型患者由来株 (OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889、OCU963) と安定型患者由来株 (S1、S2、S3、S8) の群間比較を Wilcoxon の順位和検定で、それぞれ有意水準 5 %として行った (\* $p<0.05$ )。
- 図 3. 薬剤排出実験における蛍光強度 (ratio of RFU) の経時変化  
EtBr を取り込ませた供試菌株の蛍光強度を経時的に測定し、その平均値を示す。4 時間時点での EtBr 取込み量は各菌株で異なるため、ratio of RFU (任意の時間の RFU / 0 時間時点の RFU) を算出して比較した。(A) 進行型患者由来株、(B) 安定型患者由来株。それぞれ対照株 (MAH104) とともに示す。なお、蛍光データは、各条件について 4 回×3 つずつ収集し、それぞれ得られた 12 のデータを 0 時間時点の数値で除算し、その平均値をグラフ化した。
- 図 4. EtBr 排出開始 2 時間後における蛍光強度 (ratio of RFU) の比較  
EtBr 排出開始 2 時間後の ratio of RFU の 50%ボックスプロットを示す。なお、蛍光データは、各条件について 4 回×3 つずつ収集し、得られた 12 のデータを 0 時間時点の数値で除算し、ボックスプロットを作成した。図中のボックスは、第 1 四分位点から第 3 四分位点までを囲み、中央値で仕切ったものである。また、MAH104 を対照とした株間比較を Steel 法で、進行型患者由来株 (OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889、OCU963) と安定型患者由来株 (S1、S2、S3、S8) の群間比較を Wilcoxon の順位和検定で、それぞれ有意水準 5 %として行った (\* $p<0.05$ )。

## 表および図

表 1. MAH104 を対象とした EPI の感受性試験結果

EPI	reserpine	verapamil	CCCP	CPZ
MED( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	400	400	50	25

感受性試験は、 $0.5 \times 10^5$  個/mL の菌液に各濃度の対象試薬を加え、1 週間後に resazurin を添加して、効果判定を行う手法を用いた。同条件のサンプルを 2 穴に分けて判定し、これを 2 回行った。

基本的には最小効果濃度\* (MED)  $\times$  1/4 濃度を使用濃度とした。ただし、reserpine、verapamil については、溶解度も考慮して、1/8 濃度で使用した。

\* 本報に出てくるプロスミック NTM® のような標準化されたキットを用いていないため、MED と表記する。



表 2. 供試した臨床分離株の最小発育阻止濃度 (MIC)

菌株名	MIC (µg/mL)								
	SM	EB	KM	RFP	RBT	LVFX	CAM	TH	AMK
MAH104	128<	2	0.5	0.03	0.008	0.25	0.03	2	0.5
OCU855	0.25	2	0.5	0.03	0.08	0.5	0.03	8	0.5
OCU867	0.125	4	0.125	0.03	0.008	0.125	32<	8	0.5
OCU873	8	32	16	2	0.25	2	1	2	16
OCU881	1	8	1	0.03	0.08	1	32<	8	2
OCU889	8	8	8	2	0.25	4	1	16<	16
OCU963	8	2	4	0.5	0.25	2	0.25	8	4
S1	0.25	4	0.5	0.03	0.03	0.25	0.03	8	0.5
S2	8	8	8	4	0.25	0.5	2	4	16
S3	4	8	4	0.06	0.03	2	0.5	2	8
S8	4	4	8	0.125	0.03	4	0.5	8	8

ブロスミック NTM®を使用し、添付資料にしたがって各株につき 1 回ずつ行った。

SM : ストレプトマイシン、EB : エタンブトール、KM : カナマイシン、RFP : リファンピシン、RBT : リファブチン、LVFX : レボフロキサシン、CAM : クラリスロマイシン、TH : エチオナミド、AMK : アミカシン

なお、ブレイクポイントは、CAM でのみ確立されており、32 µg/mL よりも高い場合に耐性と判定される。

表 3. 薬剤取込みにおける薬剤排出ポンプ阻害薬 (EPI) の影響

菌株名	control <sup>a</sup>	EPI			
		reserpine	verapamil	CCCP	CPZ
OCU855	273 ± 95	281 ± 95	295 ± 120	△778 ± 264	293 ± 97
OCU867	245 ± 31	232 ± 27	241 ± 26	△301 ± 46	▲202 ± 21
OCU873	105 ± 6	104 ± 11	104 ± 9	△182 ± 53	94.1 ± 14.4
OCU881	141 ± 32	153 ± 38	139 ± 36	△373 ± 105	123 ± 28
OCU889	127 ± 30	131 ± 32	124 ± 30	△327 ± 119	109 ± 23
OCU963	252 ± 68	300 ± 136	249 ± 66	△568 ± 44	▲211 ± 36
S1	192 ± 19	206 ± 22	196 ± 29	△404 ± 51	▲160 ± 24
S2	183 ± 36	170 ± 37	▲146 ± 34	△247 ± 76	▲109 ± 17
S3	240 ± 80	214 ± 86	212 ± 101	417 ± 272	162 ± 92
S8	180 ± 68	171 ± 61	175 ± 66	△364 ± 220	142 ± 55

薬剤取込み実験における 4 時間時点での各サンプルの RFU を示す。全てが正規分布ではないが、本表には、各条件のサンプルについて得られた 12 のデータから算出した平均値と標準偏差を示す。

a : control = EPI 非使用のサンプル

△ : RFU が control に対して有意に高い (p<0.05)

▲ : RFU が control に対して有意に低い (p<0.05)

reserpine は RND に、verapamil は ABC に、CCCP および CPZ は複数のポンプに対しての阻害効果が期待される。

表 4. 薬剤排出に対する薬剤排出ポンプ阻害薬 (EPI) の影響

菌株名	control <sup>a</sup>	EPI			
		reserpine	verapamil	CCCP	CPZ
OCU855	0.622 ± 0.027	0.644 ± 0.059	△0.676 ± 0.056	△1.01 ± 0.06	△0.770 ± 0.074
OCU867	0.860 ± 0.091	0.811 ± 0.073	0.855 ± 0.079	0.927 ± 0.042	0.854 ± 0.094
OCU873	0.910 ± 0.066	0.892 ± 0.058	0.923 ± 0.035	△1.03 ± 0.05	0.859 ± 0.029
OCU881	0.901 ± 0.104	0.838 ± 0.085	0.902 ± 0.130	△1.05 ± 0.12	▲0.700 ± 0.082
OCU889	0.765 ± 0.052	0.746 ± 0.073	0.784 ± 0.069	△0.950 ± 0.085	0.648 ± 0.121
OCU963	0.643 ± 0.086	△0.708 ± 0.072	0.644 ± 0.085	△1.00 ± 0.05	0.624 ± 0.102
S1	0.667 ± 0.071	0.714 ± 0.056	0.700 ± 0.049	△1.01 ± 0.06	▲0.568 ± 0.024
S2	0.890 ± 0.037	0.894 ± 0.034	0.870 ± 0.053	△1.02 ± 0.04	▲0.788 ± 0.059
S3	0.858 ± 0.226	0.871 ± 0.196	0.862 ± 0.108	△1.03 ± 0.09	0.757 ± 0.211
S8	0.776 ± 0.133	0.774 ± 0.122	0.772 ± 0.105	△1.01 ± 0.07	0.723 ± 0.137

薬剤排出実験では ratio of RFU (任意の時間の RFU / 0 時間時点の RFU) を算出して、2 時間時点のデータについて比較を行った。全てが正規分布ではないが、本表には、各条件のサンプルについて得られた 12 のデータから算出した平均値と標準偏差を示す。

a : control = EPI 非使用のサンプル

△ : ratio of RFU が control に対して有意に高い (p<0.05)

▲ : ratio of RFU が control に対して有意に低い (p<0.05)

reserpine は RND に、verapamil は ABC に、CCCP および CPZ は複数のポンプに対しての阻害効果が期待される。

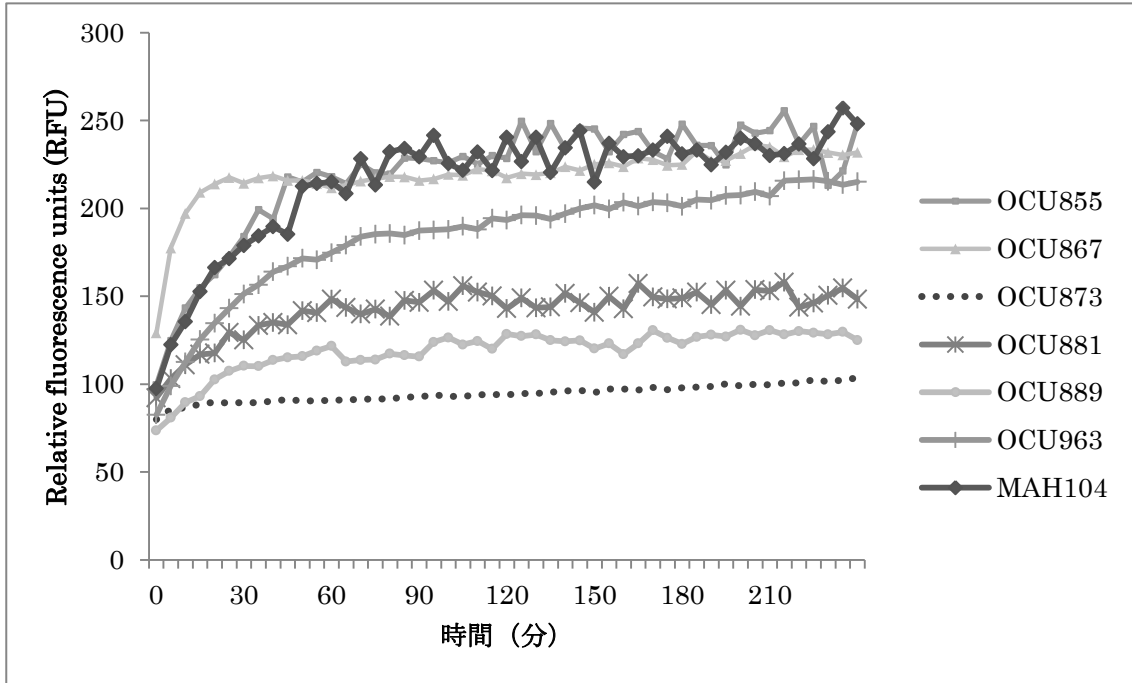
表 5. 薬剤取込み実験および薬剤排出実験結果のまとめ

	薬剤取込み能 (蓄積)	薬剤排出能
MAH104		
OCU855		↑
OCU867		
OCU873	↓	↓
OCU881	↓	↓
OCU889	↓	
OCU963		↑
S1		
S2		↓
S3		
S8		

EtBr を用いた 2 つの蛍光実験結果を基に、RFU の変化を、各株の薬剤取込み（蓄積）および薬剤排出能力として示す。矢印は MAH104 と有意差のある項目であり、『↑』は能力が高いことを、『↓』は能力が低いことを示す。

圖 1

(A)



(B)

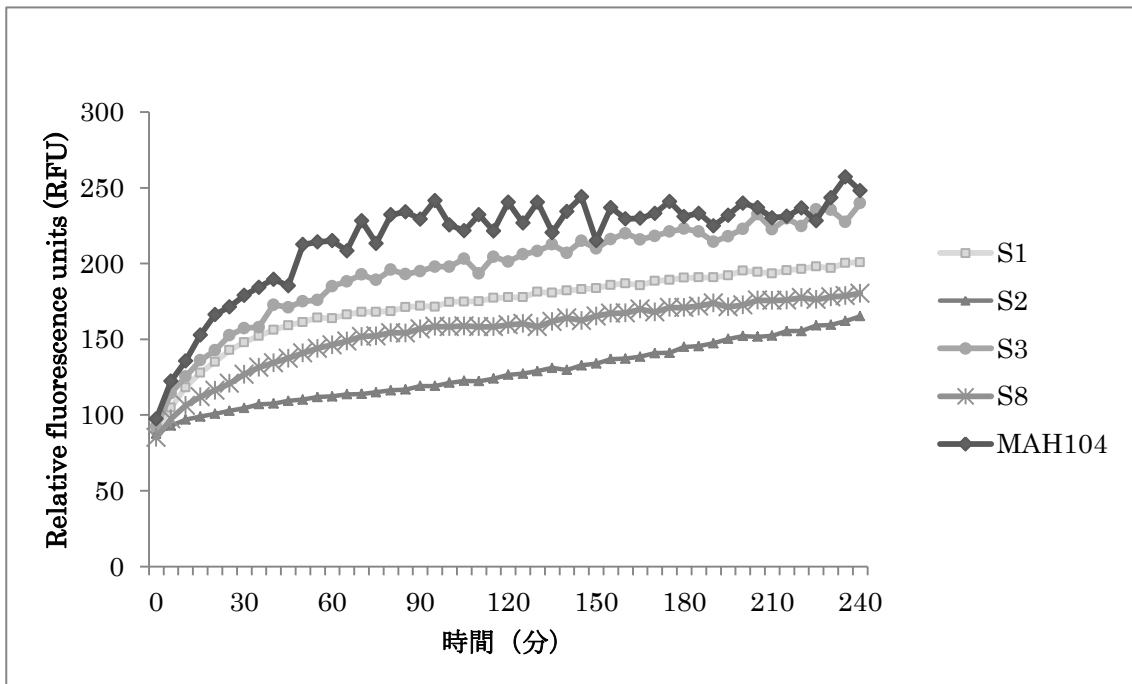
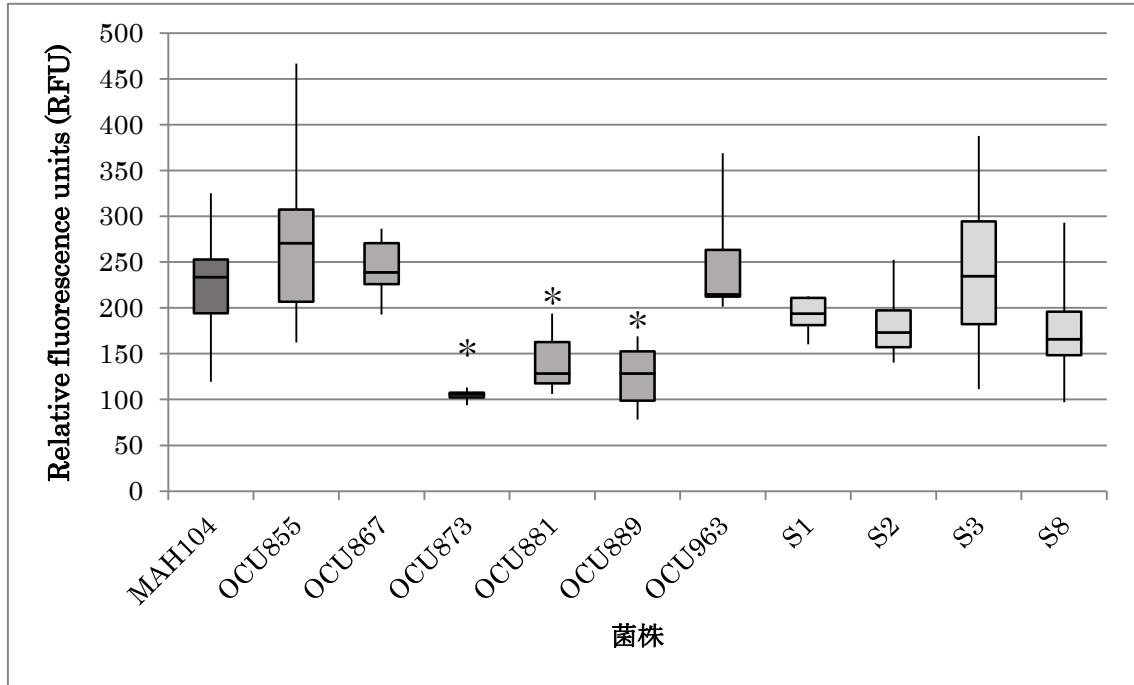
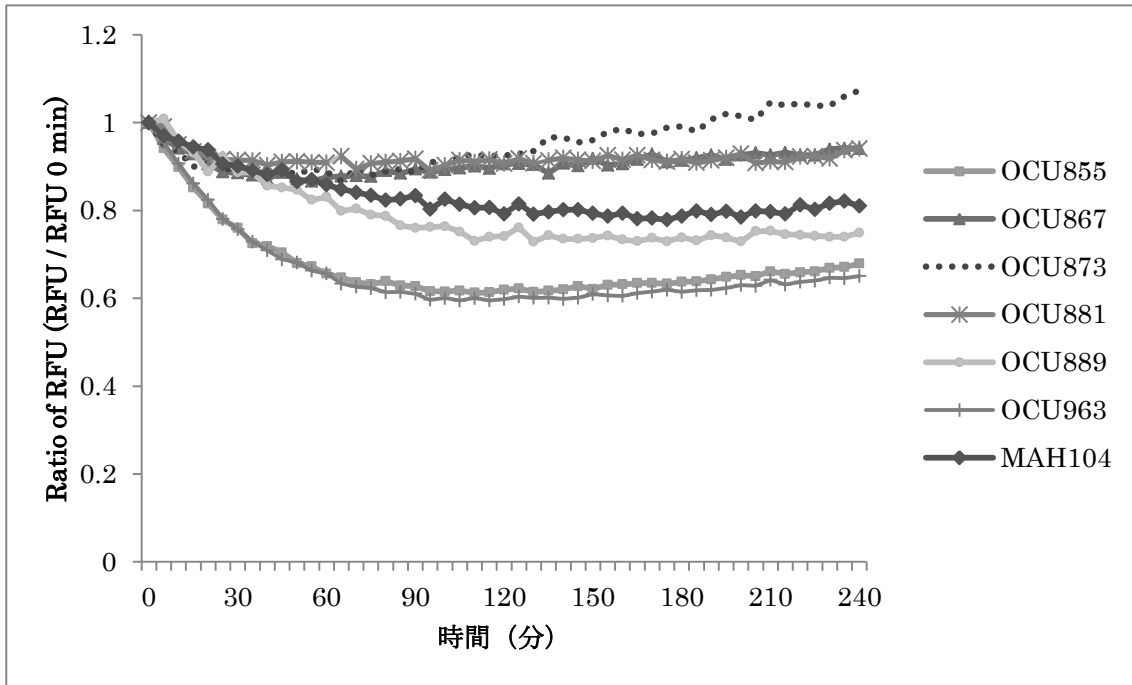


图 2



☒ 3

(A)



(B)

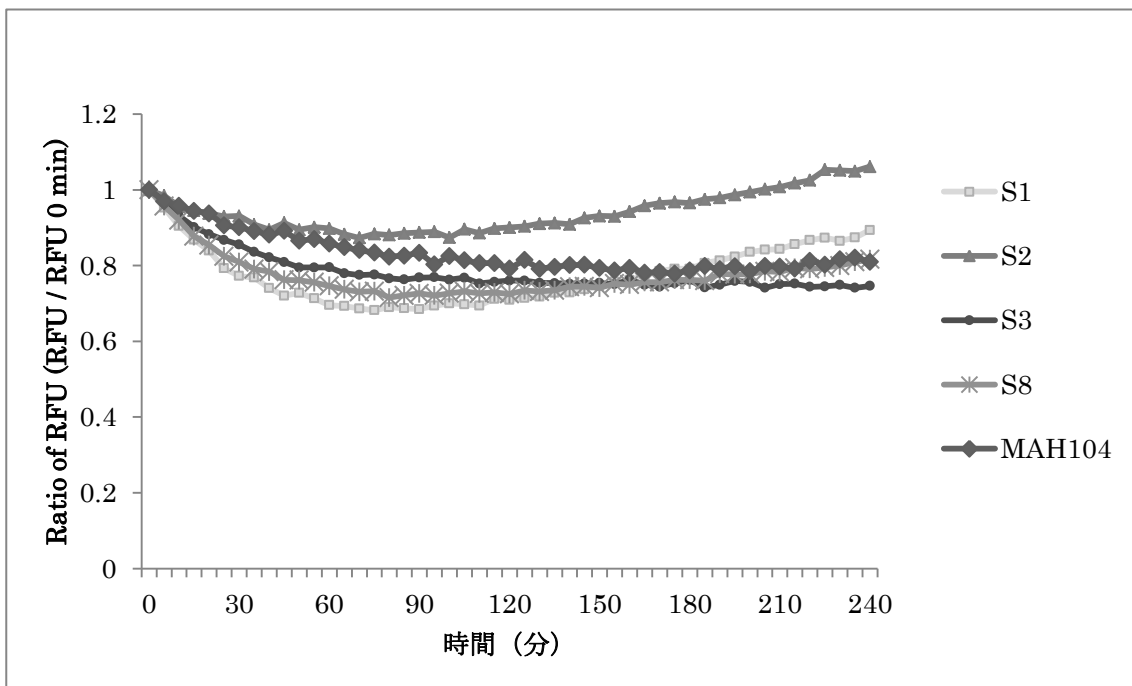


图 4

