

家畜由来細菌のフルオロキノロン耐性機構

小澤真名緒

農林水産省動物医薬品検査所 (〒 185-8511 東京都国分寺市戸倉 1-15-1)

1. はじめに

フルオロキノロンは人医療と同様に獣医療上も極めて重要な抗菌薬であり、1991年に国内で食用動物への使用が承認されてから20年近くが経過しているが、この間、家畜由来各種細菌でフルオロキノロン耐性菌が報告されている。フルオロキノロンの耐性機構の研究は人臨床分離株において多くの研究者によって進められてきており、DNAの複製、転写、組換え、修復などに重要な役割を果たしている標的酵素 (DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV) の変異、薬剤取り込み低下や薬剤排出促進が知られている。また、プラスミドやインテグロンによるキノロン耐性因子の伝達という新たな耐性機構も近年発見されているが、家畜由来細菌での報告は少ない。本稿ではフルオロキノロンの耐性機構を伝達性因子による耐性を含めて概説し、その後家畜由来各種細菌における耐性機構を実際の例に基づいて紹介する。

2. キノロンに対する耐性機構

(1) 標的酵素 (DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV) の変異による耐性

トポイソメラーゼ (topoisomerase) とは、DNAの複製、転写などの過程で2本鎖DNAを切断・再結合する酵素の総称である。このうち2本鎖DNAの一方のみを切断するものをI型トポイソメラーゼ、両方を切断するものをII型トポイソメラーゼという。キノロンの標的酵素としては、II型トポイソメラーゼであるDNA ジャイレ

ースとトポイソメラーゼ IV が知られている。DNA ジャイレースは2本鎖DNAを同時に切断・再結合することによりDNAに負のスーパーコイルを導入する。トポイソメラーゼ IV は、2本鎖DNAの切断と再結合の反復によって複製終了後のDNAの分離を行う。DNA ジャイレースは *gyrA* 遺伝子産物であるサブユニット A (GyrA) 2分子と *gyrB* 遺伝子産物であるサブユニット B (GyrB) 2分子からなる。フルオロキノロンは GyrA に作用しDNA ジャイレース活性を阻害することが明らかとなっている。その作用機序としては、キノロンは2本鎖DNAがDNA ジャイレースによって切断された切断面にはまり込み (quinolone pocket), DNA 鎖の再結合を阻害することによって抗菌作用を示すというモデルが提唱されている (図1) [30]。

DNA ジャイレース変異株はキノロンに耐性を示すことが各種細菌で報告されているが、その変異部位は大腸菌では GyrA タンパクの N 末端から 67 ~ 106 番目までの比較的狭い領域に局在しており、この領域はキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region : QRDR) と呼ばれている [36]。QRDR は、DNA ジャイレースの作用により切断された DNA の 5' 末端と共有結合する部位である 122 番目のチロシンの近くに位置しており、この中でも 83 番目のセリンと 87 番目のアスパラギン酸に変異が集中している。このことから、83 番目のセリンと 87 番目のアスパラギン酸の近傍はジャイレース-キノロン-DNA 複合体が相互作用を示す重要な部位であると推定されており、この近辺におけるアミノ酸の変異によって、標的酵素とキノロンの親和性

が低下しキノロンに対して耐性化すると考えられている [4]。大腸菌以外の細菌でも QRDR のアミノ酸配列が調べられているが、菌種間で配列がよく保存されており、変異部位も似ていることが報告されている [38]。トポイソメラーゼ IV もキノロンの標的酵素であり、*parC* 遺伝子産物であるサブユニット 2 分子と *parE* 遺伝子産物であるサブユニット 2 分子からなる。ParC タンパク質は GyrA と、ParE は GyrB と高い相同性を示す。トポイソメラーゼ IV は、大腸菌では 80 番目のアミノ酸のセリンと 84 番目のアミノ酸のグルタミン酸に変異が多い。

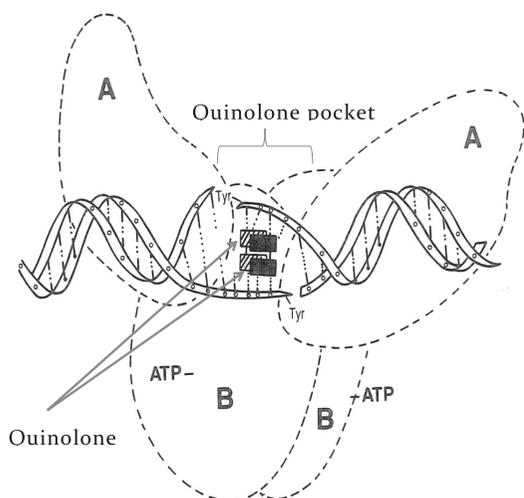


図 1 キノロンの作用モデル (Shen *et al.* [30] を改変)

DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV のキノロンに対する感受性は、菌種によって異なる。一般的に、大腸菌などのグラム陰性菌では *gyrA* が、ブドウ球菌などのグラム陽性菌では *parC* がキノロンのプライマリーターゲットとなる (表 1) [14]。しかし、グラム陽性菌における *parC* については、ストレプトコッカス・ニューモニエやエンテロコッカス・フェカリスのように、キノロンの種類によってプライマリーターゲットが *gyrA* となる場合があることも報告されている [22, 25]。キノロンの作用によりプライマリーターゲットにおいて変異が起こるとキノロンの MIC の上昇が認められるが、その他の部位に変異が起こると耐性度がさらに上昇する。大腸菌においては、*gyrA* に 1 か所変異が入るとオールドキノロンであるナリジクス酸に耐性となる。フルオロキノロンの MIC は野生型と比較して上昇するが、まだ耐性とはならない。*gyrA* または *parC* にもう一か所変異が入ると MIC がさらに上昇し、フルオロキノロンにも耐性となる。さらに変異が入ると MIC が上昇し、*gyrA* に 2 か所、*parC* に 2 か所変異が入った株は高度耐性を示す (表 2) [29, 33]。

(2) 膜透過性の変化による耐性

大腸菌の細胞壁の外膜には、菌体内に物質が通過するための通過孔であるポーリンがある。ポーリンを形成する主要なタンパク質には OmpF と

表 1 各菌種における標的酵素 (Köhler and Pechère [14] を改変)

菌名	プライマリーターゲット	セカンダリーターゲット
グラム陰性菌		
<i>Escherichia coli</i>	GyrA	GyrB, ParC, ParE
<i>Salmonella Typhimurium</i>	GyrA	GyrB
<i>Klebsiella</i>	GyrA	ParC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GyrA	GyrB
<i>Mannheimia haemolytica</i>	GyrA	ParC
グラム陽性菌		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ParC	GyrA, GyrB
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	キノロンの種類によって変わる	
<i>Enterococcus faecalis</i>	キノロンの種類によって変わる	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	ParC	GyrA

表2 大腸菌における標的酵素の変異とシプロフロキサシンに対するMICの関係
(Webber and Piddock [33] を改変)

遺伝子型	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
野生型	0.015
GyrAにおける1か所の変異	2-4
GyrAにおける2か所の変異	4-8
GyrAにおける1か所の変異+ ParCにおける1か所の変異	4-8
GyrAにおける2か所の変異+ ParCにおける1か所の変異	8-32
GyrAにおける2か所の変異+ ParCにおける2か所の変異	64

OmpCがあるが、これらの発現のダウンレギュレーションは、細菌内のキノロンの取り込みを減少させる [20]。フルオロキノロンを含んだ培地で選択した株では、膜透過性に関与する遺伝子の変異が認められ、OmpFの減少によると考えられる感受性の低下が認められた。さらに、これらの株ではLPSにも変化があり、LPSも膜透過性に関与している可能性が指摘されている [12]。

薬剤排出ポンプによる細菌内からの排出も、キノロンに対する感受性に関与する。大腸菌ではRND (Resistance Nodulation Division) 型の排出システムであるAcrA-AcrB-TolCがキノロンの排出に関与している [21]。緑膿菌においては、キノロン耐性変異株ではキノロンの菌体内蓄積が野生株と比較して低下していた。この取り込み量の低下はポンプ阻害剤によって回復するため、菌体内蓄積量の低下は透過性の低下ではなく菌体外への排出によることが確認されている [13]。緑膿菌では大腸菌と同じRND型のMexA-MexB-OprM排出システムがキノロンの排出に関与しているが [10]、これは大腸菌のAcrA-AcrB-TolCとの相関性が高い。

(3) 伝達性因子による耐性

長い間キノロン耐性には伝達性のものはないと考えられていたが、近年何種類か伝達性のキノロン耐性因子が報告されている。Qnr (後にQnrAとなる) は初めて報告された伝達性のキノロン耐性因子であり、1998年に米国で人臨床由来のク

レブシエラ・ニューモニエで発見された [18]。その後現在までにQnrB, QnrC, QnrD, QnrSが報告されており、さらに、QnrAには6種類、QnrBには19種類、QnrSには3種類の変異型が報告されている [5, 6]。Qnrの作用機序としては、DNAジャイレースとトポイソメラーゼIVに直接結合することによって、これらの酵素がキノロンの作用を受けにくくなり、感受性が低下すると考えられている [32]。大腸菌の野生株にQnrを導入すると、ナリジクス酸に対するMICが2-8倍、シプロフロキサシンに対するMICが4-128倍上昇した [5]。また、Qnrを導入した株は、野生株と比較して100倍以上の頻度でキノロン耐性株を選択した [18]。一方、Qnrを導入した株をキノロンで選択しても、トポイソメラーゼが変異した株を選択する頻度は野生株より低いという報告もあり [8]、Qnrがキノロン耐性株の選択に与える影響は明らかではない。しかし、QnrはMPC (Mutant Prevention Concentration) を10倍以上上昇させ、*in vivo*でキノロンに対する高度耐性株の選択を促進する可能性がある [28]。現在までに、人臨床由来株では世界中で、大腸菌、サルモネラ、エンテロバクター、クレブシエラなどでQnrの存在が確認されている [5]。家畜では、中国の豚、家禽由来株で [15, 17, 37]、エジプトの子牛由来株で [3]、イタリアの家禽由来株で [7]、Qnrの存在が報告されている。日本においても、牛と鶏由来のサルモネラでQnrS1の存在が最近報告された [1]。

違うタイプの伝達性キノロン耐性因子である*aac(6)-Ib-cr*が2006年に人臨床分離株の大腸菌で報告された [27]。*aac(6)-Ib* 遺伝子は、アミノグリコシド系抗菌性物質耐性に関与するアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼの一種であるが、AAC(6)-Ib-crはその変異型である。作用機序としては、キノロンをアセチル化して活性を低下させることにより耐性化すると考えられている。*aac(6)-Ib-cr*を導入した株では、シプロフロキサシンとノルフロキサシンでMICが2-4倍上昇した [27]。また、MPCも10倍以上上昇するため、*in vivo*でキノロンに対する高度耐性株の選択を促進する可能性がある [27]。AAC(6)-Ib-crにつ

いても、人臨床分離株では多数の報告があるが、家畜では中国の豚、鶏由来株とエジプトの子牛由来株での報告がある。日本では家畜由来株での報告はないが、動物園の飼育動物から分離されている [2]。

QepA は最近発見された伝達性のキノロン耐性因子であり、2007 年に日本とベルギーにおいて大腸菌の人臨床分離株で報告された [26, 34]。qepA 遺伝子は、14 回膜貫通型の薬剤排出ポンプと類似したタンパク質をコードしており、作用機序としては能動的な薬剤排出によりキノロンに対する感受性が低下する。qepA を導入した株は、野生型と比べて親水性のキノロン（ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、エンロフロキサシン）に対する MIC が 8 から 32 倍上昇した [26]。qepA は他の伝達性キノロン耐性因子と比較して、人臨床分離株での保有率が低く (0.3%) [34]、家畜での報告も中国の豚由来株のみである [15, 17]。

3. 家畜由来細菌におけるフルオロキノロン耐性

現在、国内では家畜由来の大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、アクチノバチルス・ブルロニューモニエ、マンヘミア・ヘモリティカ、豚丹毒菌でフルオロキノロン耐性株が報告されている。これらの菌種におけるキノロン耐性機構について、標的酵素の変異に関する調査はほとんどの菌種で行われている。しかし、それ以外の耐性機構、特に伝達性因子についての調査はほとんど行われていない。ここでは、いくつかの菌種につい

て標的酵素の変異を中心とした耐性機構と関連情報を紹介する。

(1) 鶏大腸菌由来大腸菌のフルオロキノロン耐性

2001 年から 2006 年にかけて分離された鶏大腸菌由来大腸菌の 21.7% がフルオロキノロン耐性であり、フルオロキノロン耐性株の 50% が血清群 O78 に属していた。パルスフィールドゲル電気泳動による解析では、血清群 O78 のフルオロキノロン耐性株 9 株中 8 株が同じクラスターに属していた。標的酵素のタンパク質の変異を調べたところ、中等度の耐性を示すフルオロキノロン耐性株は GyrA に 2 カ所と ParC に 1 カ所の同一の変異が認められた。また、GyrA に 2 カ所、ParC に 2 カ所の変異を持つ株は、MIC が 256-512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という高度耐性を示した (表 3)。以上の結果から、国内でフルオロキノロン耐性を示す O78 株の特定の PFGE 型が広く分布していることが示唆された [24]。

(2) マンヘミア・ヘモリティカのフルオロキノロン耐性

マンヘミア・ヘモリティカについて、2001 年から 2002 年に分離された株ではフルオロキノロン耐性はなかったが [9]、2004 年に分離された株でフルオロキノロン耐性株が認められた。感受性株と耐性株について標的酵素の変異を調べたところ、GyrA に変異が 1 カ所入るとエンロフロキサシンとナリジクス酸に対する MIC が上昇し、ナリジクス酸耐性となった。GyrA に変異が 2 カ所入ると MIC はさらに上昇した。さらに ParC

表 3 鶏大腸菌由来大腸菌における標的酵素の変異と MIC (Ozawa *et al.* [24])

株数	変 異			MIC for enrofloxacin (mg/L)
	GyrA	GyrB	ParC	
16	Ser83-Leu Asp87-Asn	-	Ser80-Ile	8-32
2	Ser83-Leu Asp87-Asn	-	Ser80-Ile Glu84-Gly	256-512

Ser, セリン; Asp, アスパラギン酸; Leu, ロイシン; Asn, アスパラギン;
Ile, イソロイシン; Glu, グルタミン酸; Gly, グリシン

に変異が1カ所入るとエンロフロキサシンに耐性を示した(表4)。このように、標的酵素の変異に応じて様々な耐性度を示す株が認められ、これは野外におけるフルオロキノロンの使用状況を反映している可能性が考えられた。また、マンヘミアにおいてはキノロンのプライマリーターゲットはGyrAであると考えられた[23]。

(3) カンピロバクターのフルオロキノロン耐性

国内における健康家畜由来カンピロバクターの2004年の薬剤感受性調査成績では、キノロン耐性率は牛由来カンピロバクター・ジェジュニで16.2%、ブロイラー由来カンピロバクター・ジェジュニで10.8%、レイヤー由来カンピロバクター・ジェジュニで10.2%、豚由来カンピロバクター・コリで26.4%であった[11]。カンピロバクターにおいても標的酵素の変異によってキノロン耐性となるが、カンピロバクターではトポイソメラーゼIVが存在せず、GyrAの変異のみでキノロン耐性となる[16]。*C.jejuni*でもっとも頻度の高いGyrAの86位のスレオニンからイソロイシンの変異は高度耐性を示すが、同じ86位の変異でもスレオニンからリジンの変異は中度耐性を示す。また、90位のアスパラギンからアスパラギン酸への変異でも中度耐性を示す[16]。カンピロバクターのキノロン耐性においては、多剤耐性に関係するポンプであるCmeABCの関与も知られている。ポンプを不活化した株では、野生株と比較して*in vitro*でキノロン耐性変異株の出現頻度が著しく減少したが、ポンプを過剰発現させた株では、キノロン耐性株の出現頻度は10倍以上になった[35]。さらに、カンピロバクターでは、キノロン

の投与により鶏の生体内で容易に耐性株が選択されるという報告もあるが、これはGyrAの変異のみで耐性化するという事実と、カンピロバクターの変異性の高さによると考えられる[16, 31]。

(4) 豚丹毒菌のフルオロキノロン耐性

豚丹毒菌においては長い間フルオロキノロン耐性は認められなかったが、2006年にと畜場由来株で初めてフルオロキノロン耐性株が報告された[19]。この耐性株について標的酵素の変異を調べた結果、GyrAとParCにアミノ酸の変異が認められた。*in vitro*でフルオロキノロン耐性株を選択し、標的酵素の変異を調べたところ、軽度に感受性が低下した変異株でParCに変異が生じ、さらに感受性が低下した変異株ではGyrAに変異が認められた。以上の結果から、豚丹毒菌においては他のグラム陽性菌と同様に、プライマリーターゲットはParCであると考えられた[39]。わが国では豚丹毒菌を効能として承認されているフルオロキノロン製剤はなく、この耐性株がどのような機序で発生したかは不明である。

4. おわりに

キノロンの耐性機構としては、以上説明したように標的酵素の変異、膜透過性の変化、伝達性因子が関与しており、これらの相互作用により全体的な耐性度が決定されると考えられるがその詳細は明らかではない。特に、伝達性のキノロン耐性因子については、いずれも単独で高度耐性を示すわけではないが、標的酵素の変異など他の耐性機構と共同して高度耐性化する可能性や、MPCの

表4 マンヘミア・ヘモリティカにおける標的酵素の変異とMIC (Ozawa *et al.* [23])

MIC for enrofloxacin (mg/L)	MIC for nalidixic acid (mg/L)	GyrA 変異		ParC 変異
		83	80	87
≤ 0.03	1-2	Ser	Ser	Asp
0.125	64	Ser	Ser	Asp → Gly
0.25-0.5	64-128	Ser → Phe	Ser	Asp
		Ser → Tyr		Asp
8	128	Ser → Phe	Ser → Ile	Asp → Gly

Ser, セリン; Asp, アスパラギン酸; Gly, グリシン; Phe, フェニルアラニン; Tyr, チロシン; Ile, イソロイシン

上昇により生体内で高度耐性株を選択する可能性が示唆されており、臨床上の重要性については今後検討が必要である。家畜由来細菌のキノロン耐性については、伝達性因子の分布状況の調査、キノロン耐性のリスクファクターの検討等が今後の課題と考えられる。いずれにしても、家畜にキノロンを使用する場合は、キノロンの耐性動向だけでなく、耐性機構も理解した上で慎重に使用することが望まれる。

要約

フルオロキノロンに対する耐性機構としては、DNAの複製・転写・組換え・修復などに重要な役割を果たしている標的酵素（DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV）の変異、薬剤取り込み低下や薬剤排出促進、プラスミドやインテグロンによるキノロン耐性因子の伝達があげられる。主要な耐性機構である標的酵素の変化においては、キノロンに暴露されることによりキノロン耐性決定領域に点変異が起こり、耐性が生じる。大腸菌、サルモネラ、マンヘミアなどのグラム陰性菌については、FQのプライマリーターゲットはDNA ジャイレースであるが、ブドウ球菌や豚丹毒菌などのグラム陽性菌についてはトポイソメラーゼ IVである。カンピロバクターについては、トポイソメラーゼ IVが存在せず、DNA ジャイレースの変異のみで耐性となる。伝達性のキノロン耐性因子であるQnr, AAC(6)-Ibc-cr, QepAについては、それぞれ標的酵素の保護、キノロンのアセチル化による活性の低下、能動的な薬剤排出によりキノロンに対する感受性が低下する。

現在までに国内において、家畜由来の大腸菌、腸球菌、カンピロバクター、サルモネラ、アクチノバチルス・プルロニューモニエ、マンヘミア・ヘモリティカおよび豚丹毒菌で耐性菌が報告されている。国内の家畜由来株を用いた動物医薬品検査所の調査では、鶏大腸菌症由来大腸菌において、血清群 O78 で標的酵素に同じ変異を持つ FQ 耐性株が国内に広く分布していることが示されている。また、マンヘミアでは、耐性株は少ないが、キノロンの耐性度に応じた標的酵素の変異が確認

されている。

キノロンに対する耐性機構としては、いくつかの要因の相互作用により全体的な耐性度が決定されると考えられるがその詳細は明らかではない。特に、伝達性のキノロン耐性因子の臨床上の重要性については今後検討が必要である。家畜由来細菌のキノロン耐性については、伝達性因子の分布状況の調査が今後の課題と考えられる。

引用文献

- 1) Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T: Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *J Appl Microbiol*, 106, 402-409 (2009)
- 2) Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T: Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6686-6690 (2007)
- 3) Ahmed AM, Younis EE, Osman SA, Ishida Y, El-Khodery SA, Shimamoto T: Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *Vet Microbiol*, 136, 397-402 (2009)
- 4) Barnard FM, Maxwell A: Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser(83) and Asp(87). *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 1994-2000 (2001)
- 5) Cattoir V, Nordmann P: Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem*, 16, 1028-1046 (2009)
- 6) Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM: qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 603-608 (2009)
- 7) Cerquetti M, Garcia-Fernandez A, Giufre M, Fortini D, Accogli M, Graziani C, Luzzi I, Caprioli A, Carattoli A: First report of plasmid-mediated

- quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. Antimicrob Agents Chemother, 53, 3112-3114 (2009)
- 8) Cesaro A, Bettoni RR, Lascols C, Merens A, Soussy CJ, Cambau E: Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. J Antimicrob Chemother, 61, 1007-1015 (2008)
 - 9) Esaki H, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Morioka A, Tamura Y, Takahashi T: Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan from 2001 to 2002. J Vet Med Sci, 67, 75-77 (2005)
 - 10) Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. Antimicrob Agents Chemother, 39, 2567-2569 (1995)
 - 11) Harada K, Asai T, Kojima A, Sameshima T, Takahashi T: Characterization of macrolide-resistant *Campylobacter coli* isolates from food-producing animals on farms across Japan during 2004. J Vet Med Sci, 68, 1109-1111 (2006)
 - 12) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob Agents Chemother, 30, 248-253 (1986)
 - 13) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 31, 582-586 (1987)
 - 14) Köhler T, Pechère J-C: Bacterial Resistance to Quinolones: Mechanisms and Clinical Implications. In: The Quinolones. V. Andriole, ed. Academic Press, San Diego, CA. (2000).
 - 15) Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL: Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. Antimicrob Agents Chemother, 52, 2992-2993 (2008)
 - 16) Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang Q: In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. Antimicrob Agents Chemother, 47, 390-394 (2003)
 - 17) Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lu D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M: High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob Agents Chemother, 53, 519-524 (2009)
 - 18) Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA: Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet, 351, 797-799 (1998)
 - 19) Miyao Y, Funakoshi Y, Takagi Y, Kanzaki M, Iida T, Uchiyama M, Takagi M, Imada Y: Characteristics of Erysipelas occurring in slaughter pigs at the Shibaura Meat Inspection Center over the past ten years and serotypes and antimicrobial susceptibility of the isolates. J Jpn Vet Med Assoc, 59, 409-415 (2006)
 - 20) Mortimer PG, Piddock LJ: The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother, 32, 195-213 (1993)
 - 21) Okusu H, Ma D, Nikaido H: AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J Bacteriol, 178, 306-308 (1996)
 - 22) Oyamada Y, Ito H, Inoue M, Yamagishi J: Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. J Med Microbiol, 55, 1395-1401 (2006)
 - 23) Ozawa M, Asai T, Sameshima T: Mutations in GyrA and ParC in fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan. J Vet Med Sci, 71, 493-494 (2009)
 - 24) Ozawa M, Harada K, Kojima A, Asai T, Sameshima T: Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and

- molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. Avian Dis, 52, 392-397 (2008)
- 25) Pan XS, Fisher LM: Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. Antimicrob Agents Chemother, 41, 471-474 (1997)
- 26) Perichon B, Courvalin P, Galimand M: Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 51, 2464-2469 (2007)
- 27) Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med, 12, 83-88 (2006)
- 28) Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Garcia I, Cano ME, Martinez-Martinez L, Pascual A: Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for *Enterobacteriaceae* expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. Antimicrob Agents Chemother, 51, 2236-2239 (2007)
- 29) Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C: Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother, 51, 1001-1005 (2003)
- 30) Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DW, Cooper CS, Rosen T, Pernet AG: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. Biochemistry, 28, 3886-3894 (1989)
- 31) Takahashi T, Ishihara K, Kojima A, Asai T, Harada K, Tamura Y: Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in chickens exposed to enrofloxacin treatment at the inherent dosage licensed in Japan. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 52, 460-464 (2005)
- 32) Tran JH, Jacoby GA: Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 5638-5642 (2002)
- 33) Webber M, Piddock LJ: Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet Res, 32, 275-284 (2001)
- 34) Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y: New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother, 51, 3354-3360 (2007)
- 35) Yan M, Sahin O, Lin J, Zhang Q: Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. J Antimicrob Chemother, 58, 1154-1159 (2006)
- 36) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 34, 1271-1272 (1990)
- 37) Yue L, Jiang HX, Liao XP, Liu JH, Li SJ, Chen XY, Chen CX, Lu DH, Liu YH: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. Vet Microbiol, 132, 414-420 (2008)
- 38) 吉田博明: 細菌におけるキノロン耐性メカニズム. 日本細菌学雑誌, 51, 973-992 (1996)
- 39) 山本欣也, 内山万利子, 新田早人, 守岡綾子, 高木昌美, 高橋敏雄: フルオロキノロン耐性豚丹毒菌における DNA ジャイレース及びトポイソメラーゼ IV 変異の解析. 第 142 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 101 (2006)

Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Bacteria Isolated from Food Producing Animals

Manao OZAWA

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
1-15-1, Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

In Japan, fluoroquinolone was first approved for food producing animals in 1991 and there have been many reports about fluoroquinolone-resistant isolates from food producing animals. The mechanisms of resistance to fluoroquinolones are mutations in the bacterial enzymes (DNA gyrase and DNA topoisomerase IV), decreased outer-membrane permeability, over-expression of efflux systems and plasmid-mediated quinolone resistance (Qnr, AAC(6)-Ib-cr and QepA). Quinolone-resistant isolates from food producing animals have been reported in *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mannheimia haemolytica* and *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. The study using avian pathogenic *E. coli* (APEC) isolates showed that the fluoroquinolone-resistant APEC isolates belonging to serogroup O78 had the same point mutations in *gyrA* and *parC* and most of these isolates were classified into an identical cluster in PFGE analysis. In *M. haemolytica*, the increased number of mutations in *gyrA* and *parC* was correlated to the elevated level of quinolone resistance same as *E. coli*. Since wide-ranging study regarding dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in food producing animals has not yet been carried out, the investigation of these determinants may be needed.

討 論 (座長：田村 豊 酪農大, 高橋敏雄 動薬検)

質問 (田村 豊, 酪農大)

FQ 耐性の増殖性や病原性に対しての影響についてどこまで理解されているか。

答 (小澤真名緒)

一般に耐性菌は感受性菌に比べて増殖性が悪いといわれている。病原性に関しては、耐性菌の方が強いと報告されているが、逆に低下するとの報告もある。

質問 (川崎武志, 人と鳥の健康研究所)

要旨中に「鶏大腸菌症由来大腸菌において、血清群 O78 で標的酵素に同じ変異を持つ FQ 耐性株が国内に広く分布していることが示されている」とあるが、その分布に地域性や薬剤使用歴との関係はあるか。

答 (小澤真名緒)

中部地方から西に分布する傾向にありますが、使用履歴との関係ははっきりしなかった。

質問 (加藤敏英, NOSAI 山形)

FQ 製剤の使用量増加による病原菌の感受性低下

(耐性獲得) は主にどの耐性機構が働いていると考えられるのか。

答 (小澤真名緒)

今回お話しした FQ については、使用することで *gyrA* や *parC* に変異が入って耐性が起こる。

質問 (高橋敏雄, 動薬検)

qnr などによる FQ 耐性の伝達頻度 (*in vitro*) について、公表文献などにに基づき、最新の知見を伺いたい。

答 (小澤真名緒)

伝達頻度についてはまだあまり報告がないと思います。

qnr に関しては、急に耐性にはならないと言うか、それほど MIC は高くないと思いますが、標的酵素の変異と共同して活性化させるという話があって、それについては、そういう作用は無いという報告もあるんですけども、実際どうなのかっていうのはまだ分かっていないということです。