

Fluoroquinolone 系抗菌薬の存在下における *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株の耐性化変異について

三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室¹⁾, 同・細胞遺伝解析部²⁾

東邦大学医療短期大学³⁾

長谷川美幸¹⁾ 小林 寅喆¹⁾ 雑賀 威¹⁾

島津 光伸²⁾ 西田 実¹⁾³⁾

(平成 7 年 10 月 17 日受付)

(平成 7 年 11 月 27 日受理)

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, fluoroquinolone,
multiple-antibiotic-resistant mutant

要 旨

Pseudomonas aeruginosa が抗菌薬に抵抗する要因を検討するため, fluoroquinolone 薬との接触後の耐性化について検討した。

臨床分離 *P. aeruginosa* 162 株を MIC 周辺濃度の norfloxacin と一夜接触させると, 試験菌株のうち 8 株 (4.94%) が norfloxacin に 8 倍またはそれ以上耐性化した。これらの耐性株はいずれも他の fluoroquinolone 薬に交差耐性を示し, さらに 94-74 株は carbenicillin, ceftazidime および chloramphenicol に, TA15 株では imipenem に, 93-183 株では carbenicillin, ceftazidime および gentamicin に耐性化した。

これら菌株の耐性化の原因を検討した。まず TA16 株の耐性株では, norfloxacin の菌体内への取り込みの顕著な減少が認められた。外膜蛋白 (OMP) 構成を調べた結果, TA52 および 93-183 の耐性株を除き, その他の耐性株では 46KD 付近の蛋白の増加が認められた。これに加えて, TA15 および TA16 では 44KD 付近の OMP E と 22KD 付近の OMP G の産生量の減少, 93-183 耐性株では OMP E の減少が認められた。Quinolone 薬の作用点, *gyrA* 遺伝子の耐性変異の有無を検索した。Norfloxacin の接触後, 93-183 耐性株のみが codon 83 の塩基配列が ACC から ATC に変化し, アミノ酸は threonine から isoleucine に変化した。しかし一部の親株では, norfloxacin 処理以前に同種または異なるタイプの *gyrA* の変異が存在することが判明した。臨床分離 *P. aeruginosa* の norfloxacin による耐性化は薬剤透過能の変化, *gyrA* 遺伝子の耐性変異のみでは十分な説明は不可能で, その他の耐性化機序の関与が示唆された。

序 文

われわれは検討した多数の臨床分離 *P. aeruginosa* のうち, 一部の菌株は *in vitro* で抗緑膿菌薬との接触により, 表層蛋白が変化するとともに多剤耐性化することを報告した¹⁾。また *P. aeruginosa* 臨床分離株の外層の lipopolysaccharide

(LPS) の構成が菌株間で異なり, 長鎖, 短鎖, 欠損株が存在することが観察され²⁾, その構成が二価カチオン性抗菌物質の感受性に関連することを報告した³⁾。*P. aeruginosa* 臨床分離株のこのような多様な表層性状の変化は, 菌の分離に先だってそれぞれの感染症の治療のために投与された抗緑膿菌薬の影響によるものと推定される。

Fluoroquinolone 系抗菌薬は, その強力な抗菌活性と優れた治療効果のため広く臨床的に応用さ

別刷請求先: (〒174) 板橋区志村 3-30-1

三菱化学ビーシーエル, 化学療法研究室

長谷川美幸

平成 8 年 2 月 20 日

れている。しかし近年、臨床分離 *P. aeruginosa* の fluoroquinolone 耐性株が増加する傾向があり注目されている⁴⁾。*P. aeruginosa* の quinolone の耐性機作として、*gyrA* 遺伝子の変異 (*nalA*, *nfxA*, *cfxA*) と膜透過に関与する遺伝子の変異 [*nfxB*, *nfxC* および *nalB* (*cfxB*)] が主として PAO 株を用いた実験によって証明されている⁵⁾。

Zhanel らは、wild-type の *P. aeruginosa* を fluoroquinolone 薬に継続的に接触させ、*gyrA* 遺伝子の変異と膜透過性の変異の両方が出現することを報告している⁶⁾。また Diver らは、cystic fibrosis 患者における *P. aeruginosa* 感染症に対する、fluoroquinolone 系抗菌薬による治療の後に感染菌が消失せずに持続する機序を検討し、菌側の問題として DNA gyrase の変異と外膜蛋白および LPS の変化による耐性化を観察している⁷⁾。わが国でも Fukuda らは臨床分離の一菌株、P1481株の norfloxacin 耐性機序を検討し、*gyrA* の変異以外に *nfxC* 型の膜透過性の変異による耐性であると報告している⁸⁾。

本報は、*P. aeruginosa* に関するわれわれの研究の一環として、臨床分離 *P. aeruginosa* 162菌株を種々の濃度の norfloxacin と一夜接触後に出現した耐性菌株の検出頻度および耐性機序を解明するために検討した成績である。

材料と方法

使用菌株

国内の複数の医療機関において、1993年7月～1994年7月の間に各科領域の感染症より分離された *P. aeruginosa* 162株を使用した。菌の分離と同定法は既報のとおりである¹⁾。

使用薬剤

Norfloxacin (杏林製薬)

Ofloxacin (第一製薬)

Ciprofloxacin (バイエル薬品)

Carbenicillin (ファイザー製薬)

Ceftazidime (日本グラクソ)

Imipenem (萬有製薬)

Gentamicin (日本シェリング)

Chloramphenicol (三共)

Polymyxin B (ファイザー製薬)

以上の力価の明らかな 9 薬剤を用いた。

薬剤感受性の測定

日本化学療法学会標準法に準じ、寒天平板希釈法により測定した⁹⁾。

P. aeruginosa の norfloxacin との接触

1/4, 1/2, 1, 2 および 4MIC の norfloxacin を含有する Mueller Hinton broth (Difco) に、Trypticase Soy agar (BBL) で一夜培養した試験菌を 10^5 CFU/ml となるよう接種した。35°C 18時間培養後、各培養液を CLED medium (Oxoid) に塗抹し、35°C、48時間培養した。増殖した菌のうち、色調および形態の異なるコロニーを釣菌し、同培地で純培養した。このようにして得られた試験菌を用い、各薬剤の MIC を測定した。Norfloxacin の MIC が処理前と比較して 8 倍以上に変化した菌株を選択した。

菌体内への norfloxacin の取り込み

Hirai らの方法により測定した¹⁰⁾。Trypticase Soy agar で増菌した試験菌を Antibiotic medium 3 (Difco) の 10ml に約 10^8 CFU/ml となるよう懸濁し、同培地 200ml に接種し、6 時間振盪培養した。試験菌液の 50ml を遠心チューブにとり、 $10\mu\text{g/ml}$ の norfloxacin を添加し、35°C で 0, 5, 10 および 20 分間、*P. aeruginosa* に接触させた後、氷冷した。冷却遠心 (4°C, 3,000rpm, 20分) 後、集菌し、氷冷した生理食塩水 50ml で 1 回洗浄した。洗浄した菌体を 1ml の生理食塩水に懸濁し、7 分間、煮沸した。さらに冷却遠心 (4°C, 14,000 rpm, 10分) 後、上清を検液とした。

Norfloxacin の濃度測定

大森らの方法に従い¹¹⁾ Agar well 法により、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 を検定菌として用いた bioassay 法にて norfloxacin 濃度を測定した。

SDS-PAGE 法による OMP の分析

既報の方法により実施した¹⁾。

SSCP 法による *gyrA* 遺伝子変化のスクリーニングと塩基配列の決定

試験菌株より常法に従い DNA を抽出した¹²⁾。*P. aeruginosa* PAO1 *gyrA* 遺伝子配列 (GenBank Accession No. L29417) を基に設計した primer 5'-CGCCGTGTGCTTTATGCCAT (Nt.

400~419), 5'-AGCTTGGCCATGCGCACTTC (Nt. 634~653) を用いて, 次の反応液組成と反応条件で PCR を行った.

1.0 μ l Template DNA (100ng/ μ l), 0.5 μ l each dNTP (10mM), 1.0 μ l [α -³²P] dCTP (110TBq/mmol), 2.5 μ l 10 $\times$ Taq polymerase buffer (100 mM tris Cl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1%gelatin), 0.25 μ l each primer (25pmol/ μ l), 0.2 μ l Taq DNA polymerase (5U/ μ l), 30cycles (94°C 0.5min, 55°C 0.5min, 72°C 1min).

得られた PCR 産物を Orita らの方法¹³⁾に従って, 5%polyacrylamide (monomer: bis=99:1), 5% [v/v] glycerol ゲルを用い SSCP 法により変異点の検索を行った.

塩基配列の決定は前述の PCR 産物を Model 373A オートシーケンサー (ABI 社) を用いて行った¹⁴⁾.

成 績

1. Norfloxacin の存在下における臨床分離 *P. aeruginosa* 162株からの耐性株の出現

Table 1 のとおり, 試験菌株162株のうち, 8 株 (4.94%) では薬剤処理前の菌株の MIC と比較して, norfloxacin 耐性菌が認められた. そのうち親株の MIC と比較して処理後の耐性菌株の MIC が8倍に上昇したものは2株 (1.23%), 16倍またはそれ以上のものは6株 (3.70%) であった.

2. 耐性菌の抗菌薬感受性

試験菌株を norfloxacin と接触後, MIC 値が処

Table 1 Norfloxacin-resistant mutants from 162 clinical isolates of *P. aeruginosa* after exposure to norfloxacin *in vitro*

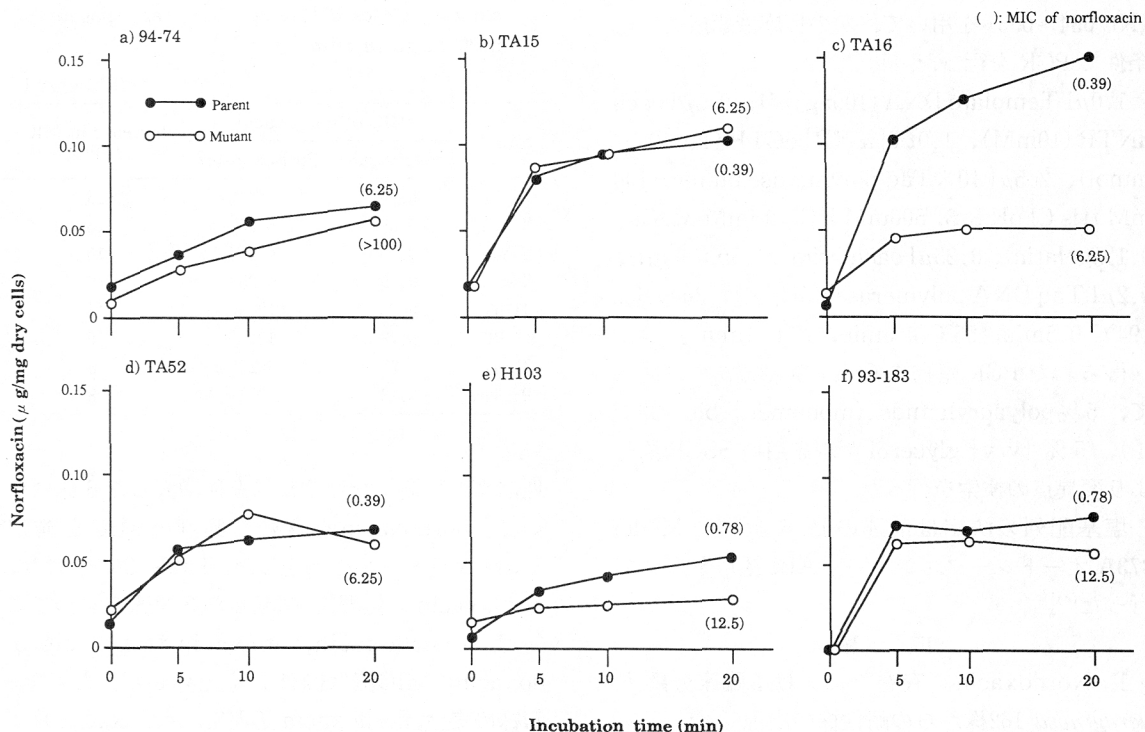
Strain	*MIC of norfloxacin		Increase in MIC (fold)
	Pre-exposure	Post-exposure	
94-74	6.25	>100	>16
TA15	0.39	6.25	16
TA16	0.39	6.25	16
TA52	0.39	6.25	16
H103	0.78	12.5	16
93-183	0.78	12.5	16
TA41	0.78	6.25	8
94-48	3.13	25	8

理前より16倍またはそれ以上に増大した6株について, norfloxacin を含む9薬剤の MIC を測定し, 耐性パターンを判定した. Table 2 のとおり, norfloxacin の処理後, 試験した6菌株のすべてに対する norfloxacin, ofloxacin および ciprofloxacin の MIC 値は例外なく上昇した. ただ94-74株の場合, norfloxacin 処理後, norfloxacin および ofloxacin には高度耐性 (MIC; >100 μ g/ml) となったが, ciprofloxacin の MIC は6.25 μ g/ml にとどまり交差耐性は認められなかった. また94-74株および93-183株は carbenicillin と ceftazidime に耐性化し, 前者はさらに chloramphenicol に, 後者はさらに gentamicin に耐性化した. 次に TA15, TA52 および H103 株の3株は, 他の薬剤に対する耐性パターンが異なり, TA15

Table 2 Drug-susceptibilities of parents and norfloxacin-induced resistant mutants of *P. aeruginosa* isolates

	MIC (μ g/ml) for test strains (pre-and post-exposure)											
	94-74		TA15		TA16		TA52		H103		93-183	
	pre*1	post*2	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
Norfloxacin	6.25	>100	0.39	6.25	0.39	6.25	0.39	6.25	0.78	12.5	0.78	12.5
Ofloxacin	12.5	>100	1.56	12.5	1.56	12.5	3.13	25	6.25	25	1.56	25
Ciprofloxacin	1.56	6.25	0.20	1.56	0.39	3.13	0.39	3.13	0.78	6.25	0.78	12.5
Carbenicillin	200	>400	50	25	50	50	12.5	6.25	>400	>400	25	>400
Ceftazidime	6.25	25	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	25	6.25	1.56	6.25
Imipenem	3.13	3.13	3.13	12.5	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13
Gentamicin	1.56	3.13	6.25	3.13	3.13	3.13	12.5	3.13	400	50	12.5	>400
Chloramphenicol	100	400	200	400	200	400	200	200	100	100	200	100
Polymyxin B	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	0.78	3.13	3.13

*1: pre-exposure to norfloxacin *2: post-exposure to norfloxacin

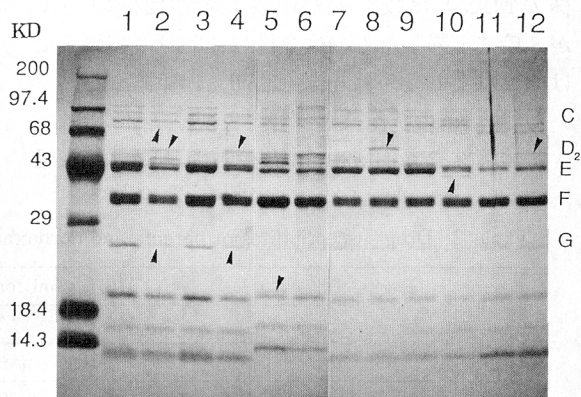
Fig. 1 Uptake of norfloxacin by 6 norfloxacin-resistant mutants of *P. aeruginosa* isolates

株は imipenem に耐性化, TA52株では gentamicin に感性化, さらに H103株では ceftazidime, gentamicin と polymyxin B に感性化した.

3. Norfloxacin の菌体内への取り込み

上記の 6 耐性菌株の norfloxacin 耐性が, 菌剤の菌体内への取り込み量の低下に起因するものかどうかを, 明らかにするため, 6 菌株の norfloxacin の取り込み能を検討した.

Fig. 1 に norfloxacin の添加後, 5, 10 および 20 分の各時間における乾燥菌体 1mg あたりの norfloxacin の取り込み量 (μg) を示した. すなわち TA16 株では親株と耐性株の間で, 各時間における norfloxacin の取り込み量には大きな相違があり, 耐性株における明らかな取り込み量の低下が観察された. さらに H103 株でも耐性株では, 親株と比較して norfloxacin の取り込み量の低下が軽度ではあるが認められた. その他の菌株では, 親株と耐性株の間で norfloxacin の取り込み量には差異はみられなかった.

Fig. 2 OMP-profiles of parents and norfloxacin-induced mutants of *P. aeruginosa* isolates

	Parent		Mutant
TA15	1(0.39)	→	2(6.25)
TA16	3(0.39)	→	4(6.25)
TA52	5(0.39)	→	6(6.25)
H103	7(0.78)	→	8(12.5)
93-183	9(0.78)	→	10(12.5)
94-74	11(6.25)	→	12(>100)

(): MIC μg/ml

4. OMP-profile の変化

Norfloxacin の接触によって得られた, 上記の耐性変異株とそれぞれの親株とのペア 6 組の OMPs 構成を分析した. Fig. 2 のとおり, 94-74 株では norfloxacin との接触後, 耐性株 (lane 12) では 46KD 付近の OMP D_2 量の増加が認められた. さらに TA15 株と TA16 株の耐性株 (lane 2 と 4) では, いずれも OMP D_2 の増量と 44KD 付近の E および 22KD 付近の G 量の減少が認められた. 次に TA52 の耐性株 (lane 6) では OMP の変化は

みられなかったが, H103 株の耐性株 (lane 8) では D_2 量の増加, 93-183 の耐性株 (lane 10) では OMP E 量の減少が認められた.

5. *gyrA* 遺伝子の耐性変異についての検討

P. aeruginosa 臨床分離株を norfloxacin との接触によって 16 倍以上同薬に耐性化した 6 株およびその親株について, *gyrA* の遺伝子上の変異を検索した. *E. coli* の *gyrA* 遺伝子の変異による fluoroquinolone 耐性菌で知られている遺伝子に相同性の高い, *P. aeruginosa* PAO1 株の nu-

Fig. 3 Comparison of the nucleotide sequence of norfloxacin-resistant mutant and parent in the *gyrA* gene of *P. aeruginosa* after exposure to norfloxacin *in vitro*

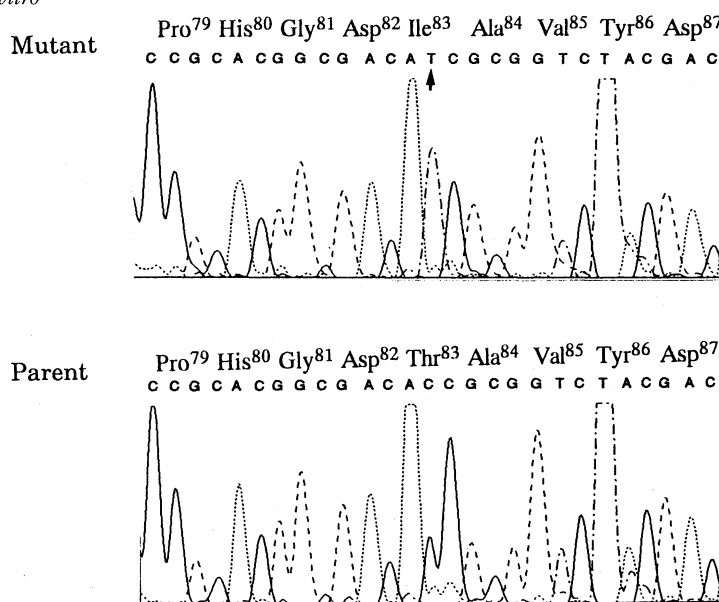


Table 3 The *gyrA* gene of six clinical isolates of *P. aeruginosa* before or after exposure to norfloxacin *in vitro*

Strain	Mutation in <i>gyrA</i> gene			
	Pre-exposure		Post-exposure	
94-74	Thr-83(ACC) to Ile(ATC)	[6.25]	Thr-83(ACC) to Ile(ATC)	[>100]
TA15	(-)	[0.39]	(-)	[6.25]
TA16	(-)	[0.39]	(-)	[6.25]
TA52	(-)	[0.39]	(-)	[6.25]
H103	Asp-87(GAC) to Asn(AAC)	[0.78]	Asp-87(GAC) to Asn(AAC)	[12.5]
93-183	(-)	[0.78]	Thr-83(ACC) to Ile(ATC)	[12.5]

[] : MIC of norfloxacin, $\mu\text{g/ml}$ (-) : Wild type

Thr : threonine, Ile : isoleucine, Asp : aspartic acid, Asn : asparagine

cleotide sequence 400~653領域をPCR法により増幅し、SSCP法によりcodon 53~123の変異の有無を調べた。その結果、親株と耐性株に差が認められたものは93-183株のみであった。

Fig. 3およびTable 3に示したとおり、norfloxacinのMICが $0.78\mu\text{g/ml}$ から $12.5\mu\text{g/ml}$ と16倍耐性化した*P. aeruginosa* 93-183株は、codon 83の塩基配列、ACCがATCに変化し、アミノ酸はthreonineからisoleucineに変化していることが判明した。しかし、94-74、およびH103の親株に対するnorfloxacinのMICは感受性あるいは軽度に耐性で、norfloxacinの処理以前に既に、94-74株では93-183株と同じアミノ酸の変化が、またH103株では異なるアミノ酸の変化(codon 87のaspartic acidがasparagineに変化)が認められた(Table 3)。

考 察

種々の臨床材料より分離された*P. aeruginosa*の多数の菌株の中には、同一の患者からの分離菌株であるにもかかわらず、生物学的性状、特に疫学的マーカーであるserotypeや化学療法の指標となる薬剤感受性が異なるコロニーが共存することを報告した¹⁵⁾。このような事実が発生した原因として、投与された抗緑膿菌薬、または生体の感染防御因子など菌にとっての環境因子による*P. aeruginosa*の表層構造の変化が一因であると考えられる¹⁶⁾。

一方、われわれは既に*in vitro*で4種類の β -lactam薬、gentamicinおよびnorfloxacinなど合計6種の抗緑膿菌薬を、*P. aeruginosa*の臨床分離50株にそれぞれ接触させ、norfloxacinによる処理は多剤耐性菌の出現率が最も高いことを認めた¹⁷⁾。これは抗菌薬による多剤耐性変異の発生、または極めて低頻度に存在する自然耐性菌の薬剤による選択の結果であると理解している。

Fluoroquinolone系抗菌薬は強い抗菌活性と優れた臨床効果のため広く臨床的に利用されている。しかし近年、慢性感染症における継続投与により耐性菌の出現が報告されている。Diverらはcystic fibrosisの患者における*P. aeruginosa*感染症例において、ciprofloxacinによる治療の過程

で、一般臨床症状は改善されるが、菌の消失がない、いわゆる“persistent resistance”の原因の解明を行った⁷⁾。それらの患者の喀痰中の起因菌はfluoroquinolone薬を含む多剤に耐性化し、外膜蛋白の変化とciprofloxacinの取り込みの低下を確認している。これらのquinoloneによる多剤耐性菌の出現とその機作の解明は、多くの研究者によって試みられ、上述の原因以外にDNA gyraseの変異が報告されているが、多くの場合、*P. aeruginosa* PAO株の典型的phenotype patternとは一致しない。これは臨床分離株としては当然で、遺伝的背景や存在した環境因子の影響により、個々の分離菌の性状が特徴づけられるためであろう。

Fung-Tomcらは、2株の*P. aeruginosa*を*in vitro*でciprofloxacinと接触させて各種の抗緑膿菌薬にlow-levelの耐性菌の出現を報告している¹⁸⁾。上述のDiverらの研究では⁷⁾、cystic fibrosisの*P. aeruginosa*感染症に対しciprofloxacinによる化学療法途中に、治療に抵抗して喀痰から*P. aeruginosa*の多剤耐性の変異株の出現を認めた。この耐性変異株はDNA gyrase Aの変異およびpermeabilityの低下に関する変異であることを証明している。さらに1995年、Hancock一派のZhanelらは、*in vitro*でfluoroquinolone系抗菌薬と連続的に接触した*P. aeruginosa*は二段階の耐性化をたどる事を明らかにした⁶⁾。すなわち薬剤によりMICの3~32倍の上昇では、形態、薬剤の取り込み、lipopolysaccharide、OMPsなどには変化はなく、fluoroquinolone薬にのみ耐性で、この耐性はgyrAの変異によるものであると報告している。さらに薬剤処理を継続すると、上記のすべての変化が生じ、これらの耐性株はいわゆるmultiple-antibiotic-resistant mutantsであると判定している。さらに、このようにfluoroquinolone耐性にともなう多数の抗緑膿菌薬に対する耐性化は遺伝的な機序の関与によるものとされている⁵⁾。

われわれの本研究では、*P. aeruginosa*の臨床分離株、162株のうちnorfloxacinとの接触により、MIC値が親株より16倍以上耐性化した6株の総

Table 4 Summarized results

Strain	MIC of norfloxacin ($\mu\text{g/ml}$)		Decrease in drug-permeability	Alteration in	
	pre*1	post*2		OMP	gyrA
94-74	6.25	>100	—	D ₂ ↑	none
TA15	0.39	6.25	—	D ₂ ↑ E ↓ G ↓	none
TA16	0.39	6.25	##	D ₂ ↑ E ↓ G ↓	none
TA52	0.39	6.25	—	none	none
H103	0.78	12.5	+	D ₂ ↑	none
93-183	0.78	12.5	±	E ↓	83-Thr (ACC) → Ile (ATC)

*1: pre-exposure to norfloxacin *2: post-exposure to norfloxacin

↑: increase ↓: decrease Thr: threonine Ile: isoleucine

括結果は Table 4 のとおりである。6 株のうち 93-183 株のみは norfloxacin の処理により *gyrA* の変異がみられた。一方、他の 5 株のうち 1 株 (94-74 株) は norfloxacin 処理以前の親株において、93-183 株と同一のアミノ酸変化が認められ、他の 1 株 (H103 株) では codon 87 の aspartic acid が asparagine に変化した。しかし、これらの菌株は norfloxacin に感受性または軽度に耐性で、norfloxacin との接触後にこの薬剤に 16 倍以上に耐性化した。おそらく norfloxacin との接触によって生じたと考えられるその他のメカニズムによる変異との相乗的な作用が薬剤耐性化を強めたのではないと思われる¹⁹⁾。また norfloxacin の取り込みの低下が TA16 株および H103 株でみられた。一方、外膜蛋白 E、および G 量の減少が TA15、TA16 株で、外膜蛋白 E の減少が 93-183 株で検出された。これらの結果は Zhanel らの MIC が 3～32 倍の軽度耐性変異菌では、外膜蛋白および薬剤の取り込みの低下はみられないという成績とは一致しない⁹⁾。このような相違の原因は現在不明である。

さらに quinolone 薬に対する *P. aeruginosa* PAO 株の膜透過性の低下を引き起こす耐性遺伝子として *nfxB*, *nfxC*, *nalB* (*cfxB*) が知られている⁹⁾。Fukuda らは、臨床分離の fluoroquinolone 耐性の *P. aeruginosa* P1481 株は透過性に関与する耐性遺伝子 *nfxC* に基づく多剤耐性であることを明らかにしている⁸⁾。われわれの耐性 6 菌株は多剤耐性パターンより耐性型にあえて分類すると 94-74 株の耐性変異株は *nalB*, TA15 株および

TA52 株は *nfxC*, H103 株の耐性変異株は *nfxB*, さらに 93-183 株では *nalB* 型の変異に加えて lipopolysaccharide の欠損した際に生じる薬剤感受性パターンを示した。ただし OMP F も *P. aeruginosa* の透過性による多剤耐性化変異に重要な役割を演じていることが報告されているが²⁰⁾、われわれは現在はこの porin の消長についての検討を完了していない。また各耐性変異株の個々の性状間の相互に整合性の欠ける例があるが、さらに詳細な検討が必要であると考えている。

最後に Nikaido は薬剤耐性に関する総説において¹⁹⁾、薬剤不活性化酵素その他、病原菌の特定の機序による耐性に対しては、現在までに有効な抗菌薬の開発により対抗できたが、将来の問題として permeability barrier や active efflux のような特異性の低い耐性機序による病原菌の耐性化が臨床的には重要な意味をもつことを強調している。われわれは、この研究を含む *P. aeruginosa* についての一連の検討の結果から、この主張に同意したい。

文 献

- 1) 小林寅詔, 長谷川美幸, 西田 実: 臨床分離緑膿菌の抗緑膿菌薬による serotype の変化と生物学的性状, 薬剤感受性および外膜蛋白の関連性について. 感染症誌 1994; 68: 183-189.
- 2) Lam MYC, McGroarty EJ, Kropinski AM et al.: Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1989; 27: 962-967.
- 3) 長谷川美幸, 小林寅詔, 雑賀 威, 西田 実: 臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の lipopolysac-

- charideのサイズと gentamicin 感受性および生物学的性状. 感染症誌 1995; 69: 811-817.
- 4) Acar JF, Francoual S: The clinical problems of bacterial resistance to the new quinolones. J Antimicrob Chemother 1990; 26 (Suppl B): 207-213.
 - 5) 平井敬二: キノロン耐性について. 化学療法の領域 1991; 7: 39-46.
 - 6) Zhanel G, Karlowsky JA, Saunders MH, Davidson RJ: Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 489-495.
 - 7) Diver JM, Schollaardt T, Rabin HR, Thorson C, Bryan LE: Persistence mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients undergoing ciprofloxacin therapy. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1538-1546.
 - 8) Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S, Gotoh N, Nishino T, Hirai K: *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 790-792.
 - 9) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改定について. Chemother 1981; 29: 76-79.
 - 10) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 582-586.
 - 11) 大森康男, 村山 哲, 阿部泰夫, 入倉 勉: Bioassay による AM-715 の体内濃度測定法に関する研究. Chemother 1981; 29 (S-4): 91-97.
 - 12) Marmur J: A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol 1961; 3: 208-218.
 - 13) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 2766-2770.
 - 14) Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ *et al.*: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 1986; 321: 674-679.
 - 15) Kobayashi I, Hasegawa M, Nishida M, Goto S: Co-existence of colonies with different serotypes and other biological characteristics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Immunol 1992; 36: 1113-1118.
 - 16) 小林寅喆, 長谷川美幸, 西田 実: ヒト血清と好中球による臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の外層部の変化と薬剤感受性. 感染症誌 1994; 68: 500-507.
 - 17) 長谷川美幸, 小林寅喆, 西田 実: Fluoroquinolone 系薬による臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性が変化した variant の生成について. 臨床と微生物 1994; 21: 733-736.
 - 18) Fung-Tomc J, Kolek B, Bonner DP: Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1289-1296.
 - 19) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science 1994; 264: 382-387.
 - 20) Woodruff WA, Hancock REW: Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after *in vitro* and *in vivo* insertion mytagenesis of the cloned gene. J Bacteriol 1988; 170: 2592-2598.

Development of Multi-Drug Resistant Mutants of Clinical Isolates of
Pseudomonas aeruginosa after Exposure to Fluoroquinolone

Miyuki HASEGAWA¹⁾, Intetsu KOBAYASHI¹⁾, Takeshi SAIKA¹⁾,
Mitsunobu SHIMADZU²⁾ & Minoru NISHIDA¹⁾³⁾

¹⁾Chemotherapy Divison, Mitsubishi Kagaku Bio Clinical Laboratories, Inc.

²⁾Department of Genetics, Mitsubishi Kagaku Bio Clinical Laboratories, Inc.

³⁾College of Health Profession, Toho University

Eight multi-drug resistant mutants (4.94%) were found in 162 clinical isolates of *P. aeruginosa* after exposure to norfloxacin at different concentrations (1/4, 1/2, 1, 2 and 4 MICs) and were investigated for the mechanisms of drug resistance.

All the mutants were eight-times more resistant to norfloxacin than the respective parents, and showed the cross-resistance to the other fluoroquinolones. However, these mutants differed in the drug-resistant patterns; the 94-74 mutant was resistant to carbenicillin, ceftazidime and chloramphenicol, TA-15 mutant was resistant to imipenem, and the 93-183 was resistant to carbenicillin, ceftazidime and gentamicin.

TA-16 mutant only showed a marked decrease in the bacterial uptake of norfloxacin. Profiles of the outer membrane proteins of the mutants were analyzed by SDS-PAGE method. The six mutants, except for TA-52 and 93-183 mutants, increased the intensity of bands in the 46 KD region. Three mutants (TA-15, TA-16 and 93-183) decreased the intensity of 44 KD (OMPE) and also the former two decreased the intensity of 22 KD (OMP G). The *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone-resistance were investigated for the eight mutants, and the 93-183 mutant showed to have the *gyrA* mutation caused by the alteration in the amino acid sequence of *gyrA*; Thr-83 (ACC) to Ile (ATC).

The result of the present study indicate that multi-drug resistance of clinical isolates of *P. aeruginosa* develops through different types of mechanisms, and is not easily explained fully by the present results, and suggest that many factors attributed to the development of the resistances in those mutants remains to be clarified.