



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the antibacterial activity of novel fluoroquinolones against quinolone resistant Salmonella Typhimurium [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小出, 健太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13820号
Issue Date	2019-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76583
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_KOIDE_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名： 小出 健太郎

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the antibacterial activity of novel fluoroquinolones
against quinolone resistant *Salmonella* Typhimurium
(キノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium に対する新規フルオロ
キノロンの抗菌作用に関する研究)

非チフス性サルモネラ属菌は家畜や家禽の腸管に保菌されており、腸内容物によって汚染された食品を介してヒトに感染する。年間の感染者数は約 9,400 万人、死亡者数は約 15.5 万人と推定されており、公衆衛生上非常に大きな問題である。非チフス性サルモネラ属菌は 2,500 種類以上の血清型に細分されており、その中でも *Salmonella* Typhimurium は食中毒の原因菌として世界各国で頻繁に報告されている。これまで治療薬としてアンピシリンやクロラムフェニコールなどが使用されてきたが、これらの抗生物質に対して耐性を示すサルモネラ菌が多く見つかっている。キノロンはこれらの薬剤耐性サルモネラ菌に対しても効果的である為重宝されてきた。しかし、近年ではキノロン耐性サルモネラ菌が世界的に増加傾向にあり対策が急がれている。

キノロンは細菌の増殖に関わる酵素を阻害することで殺菌的な作用を示す抗菌薬である。これまでに開発されたキノロンは共通の構造であるキノロン環を持ち、その側鎖構造を置き換えることで抗菌スペクトラムおよび殺菌効果を発展させてきた。キノロンの標的酵素である DNA ジャイレースは、DNA 複製開始時に DNA の二本鎖が解かれたことによって細菌の環状 DNA に生じた捻れを解消する働きをする為、細菌の DNA 複製に欠かせない酵素の 1 つである。DNA ジャイレースは GyrA および GyrB の 2 種のサブユニット 2 組からなる四量体を形成しており、キノロンはこれらのサブユニットに囲まれた部位に結合することで DNA ジャイレースの酵素活性を阻害する。そのため、キノロンが結合する部位周辺の DNA ジャイレース上にアミノ酸置換が生じることでキノロン耐性がもたらされる。特に GyrA を構成する 83 番目のセリンおよび 87 番目のアスパラギン酸が他のアミノ酸に置換された DNA ジャイレースをもつキノロン耐性サルモネラ菌が多く分離されており、これらのアミノ酸が DNA ジャイレースとキノロンの結合に直接的にかかわると考えられている。アミノ

酸置換を含む DNA ジャイレースに対しても高い酵素活性阻害作用をもつキノロンがキノロン耐性菌の制御に必要とされている。

本研究では新規キノロンである DC-159a ならびに WQ-3810 の *S. Typhimurium* の DNA ジャイレースに対する直接的な阻害活性を明らかにし、キノロン耐性非チフス性サルモネラ属菌による感染症の治療薬としての可能性を評価した。

第一章では、第一三共株式会社によって開発された DC-159a の酵素活性阻害作用および抗菌活性の試験を行った。DC-159a はこれまでに他の菌種に対して既存のキノロンよりも高い抗菌作用が確認されていることからキノロン耐性非チフス性サルモネラ属菌に対しても効果的であることが期待されるものであった。大腸菌を用いた組み換えタンパク質発現系によって *S. Typhimurium* が保有する DNA ジャイレースの GyrA および GyrB を作出した。GyrA はアミノ酸置換を含まない野生型に加えて、83 番目もしくは 87 番目のアミノ酸置換を含む単変異型 GyrA、およびその両方の位置にアミノ酸置換を含む二重変異型 GyrA を作出した。組み換え DNA ジャイレースに対する DC-159a の阻害活性をシプロフロキサシンおよびナリジクス酸と比較した結果、アミノ酸置換を含む変異型 DNA ジャイレースに対して DC-159a は最も高い阻害活性を示した。また、*S. Typhimurium* 標準株に対する最小発育阻止濃度はシプロフロキサシンとほぼ等しい値を示し、変異型 DNA ジャイレースに対する阻害活性の差から DC-159a はシプロフロキサシンよりもキノロン耐性非チフス性サルモネラ属菌に効果的である可能性が明らかになった。

第二章では、湧永製薬株式会社によって開発された WQ-3810 を上述と同様の方法で評価した。WQ-3810 は前述の DC-159a およびその他のキノロンとはキノロン環の 1 位および 7 位の位置の側鎖構造が大きく異なる構造を持つ。組み換え DNA ジャイレースを使用した酵素活性阻害試験によって、WQ-3810 は変異型 DNA ジャイレースに対してシプロフロキサシンおよびナリジクス酸よりも高い阻害活性を示すことが明らかになった。さらに DC-159a との比較によって、GyrA の 87 番目の位置にアミノ酸置換を含む変異型 DNA ジャイレースに対してより高い阻害活性を示すことが確認された。このことから、キノロン耐性菌が持つアミノ酸置換の位置によってより効果的なキノロン系抗菌薬を治療薬として選択できる可能性に加えて、キノロンの構造と阻害活性の相関に寄与する新たな知見を得た。

DC-159a および WQ-3810 はキノロン耐性 *S. Typhimurium* の DNA ジャイレースに対して既存のキノロンよりも高い酵素活性阻害活性を示し、キノロン耐性非チフス性サルモネラ属菌による感染症に対して有効な治療薬となる可能性が高いことが本研究によって明らかとなった。さらに、それらの新規キノロンがもつ側鎖構造と本研究で測定された酵素活性阻害作用から、新たなキノロンの開発ならびにキノロン耐性非チフス性サルモネラ属菌による感染症の効果的な治療法の確立に貢献することが期待された。