

総 説

薬剤耐性克服のための新しい方法： MRSA に対する β ラクタム剤感受性誘導薬 (ILSMR) の創製をめざして

樋口 富彦

徳島大学薬学部微生物薬品化学

(平成14年5月15日受付)

(平成14年5月23日受理)

はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) はメチシリンが開発された翌年の1961年にすでに出現したが、1990年代になって多剤耐性の MRSA、腸球菌、肺炎球菌、結核菌などによる感染症が急増し、1997年の報告では、全国の病院で MRSA 平均分離率は65.5%にのぼっている^{1,5)}。全ての抗菌剤に耐性となったバンコマイシン耐性腸球菌が1986年に、バンコマイシン耐性 MRSA が1996年に出現し⁶⁾、医療の現場で深刻な問題となるケースが出てきており、新しい感染症治療薬の開発が急務となっている。

現在用いられている抗菌薬は微生物が産生する抗生物質を基本母核としたもので、数種の共通の作用機作に基づいている。他方、この地球上には25~50万種の植物が生存しており、約10万種の第二次代謝産物 (植物の生存に必須でない代謝産物) を産生しており、微生物に対する独自の抗菌物質 (フィトアレキシン (phytoalexin) と呼ばれている) を産生する防衛システムを獲得しているものと考えられる。それらは、微生物が産生する抗生物質とは全く異なった作用機作を有する抗菌物質を産生していることが期待される⁷⁾。

私達は、1992年から、生薬の専門メーカーであるアルプス薬品工業 (株) との共同研究を行い、世界各国から採集した約900種の昆虫及び生薬植物から抽出した各種フラボノイド等のなかに、それ自体は、抗菌活性は弱いが無いが、 β ラクタム剤による MRSA に対する殺菌作用 (感受性) を最高で32,000倍にも高めることを発見した (野性株の感受性菌と同様に低濃度のペニシリン等で死滅)^{8,15)}。この発見は、 β ラクタム剤に対する高度耐性菌がそれらの薬剤の存在下で β ラクタム剤に対して

感受性に変換されたことを示しており、それらの薬剤に対して、“ β ラクタム剤感受性誘導薬 (Inducer of β Lactam drugs-Susceptibility in MRSA (ILSMR))” と命名した^{13,15)}。さらに、生薬から抽出したルチン等をマウスに経口投与することにより、 β ラクタム剤に高度耐性の MRSA を感染させたマウス (感染後1日で100%死亡) を β ラクタム剤との併用により100%治癒させることに成功した。

本稿では、ILSMR 作用の機構を明らかにするため、まず、1. *S. aureus* の細胞壁の形態形成の仕組み、2. ペニシリンによる *S. aureus* の致死効果の仕組み、3. MRSA の β ラクタム剤に対する耐性度を決定する因子、4. β ラクタム剤に対する MRSA 高度耐性化仮説について述べ、ついで、私達の研究室で得られている結果を中心に、5. 生薬から見いだされている抗菌剤、6. MRSA の β ラクタム剤に対する感受性を増強する薬物 (ILSMR) の発見、7. ILSMR の作用機作、8. MRSA 感染マウスに対する ILSMR の治療効果について、概説した。

1. *S. aureus* の細胞壁の形態形成の仕組み

1) *S. aureus* の細胞壁の化学構造^{16,17)}

S. aureus の細胞壁は、約20~40nmの厚さからなる。一層のペプチドグリカンの厚さが約1nmであるので、20~40層のペプチドグリカン層に相当する。大部分の臨床分離株の *S. aureus* の最外層には、現在までに明らかになっている11種之多糖の1つが、カプセル層を形成している¹⁸⁾。この多糖層の下方に細胞壁がある (図1)。細胞壁中のペプチドグリカン層は、これらの多様な多糖とテイコ酸 teichoic acid とよばれるポリオールリン酸よ

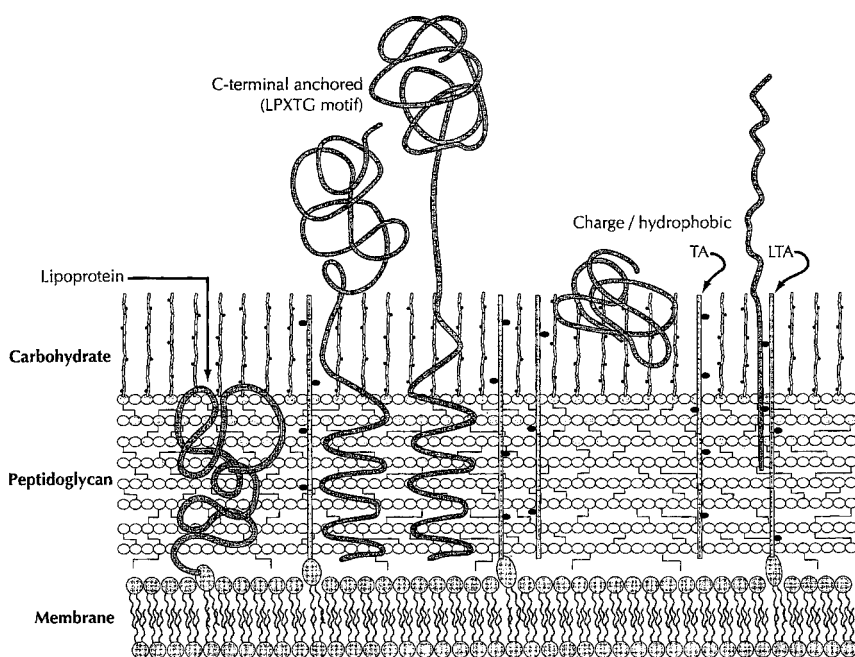


図1 グラム陽性菌の細胞壁の主要な表面構造¹⁷⁾
TA, テイコ酸, LTA, リポテイコ酸

りなる高分子壁物質と共有結合している。テイコ酸は水溶性ポリマーで、ホスホジエステル結合を介してリビトールまたはグリセロールが連結したもので、細胞壁の質量の50%占めている。テイコ酸の大部分は、細胞壁中に存在しているが、一部は細胞膜と会合しており、膜の糖脂質に共有結合している。この物質は、膜テイコ酸 membrane teichoic acid ともりポテイコ酸 lipoteichoic acid とも呼ばれる。テイコ酸は、グラム陽性菌の主な表層抗原であり、またその抗体との反応性からこの物質が、ペプチドグリカン層の外表面にもあることがわかる。ペプチドグリカン層にも多量のテイコ酸がある。テイコ酸の機能は解っていない。テイコ酸は細胞表層に高密度の規則的に配向した電荷を与えているので、外表層をイオンが通過するのに影響を与えていることは確かである。細胞表層の蛋白質は、3つの機構で結合している¹⁶⁾：
1) リポ蛋白質は、N端のシステインを介してリピドと結合。
2) 大部分の表層蛋白質は、C端領域の共通配列 LPXTG モチーフのスレオニンとペプチドグリカンと共有結合。
3) いくつかの蛋白質は、表層中の疎水的な相互作用により結合している。

2) *S. aureus* の細胞壁加水分解酵素¹⁹⁾

S. aureus は、3種以上の細胞壁加水分解酵素 (cell wall hydrolases), *N*-acetylglucosaminidase, *N*-acetylmuramidase, と endopeptidase を持っており、細胞分裂の際に高度に

制御された様式で、細胞壁のある特定の部位で細胞壁を開裂させている²⁰⁾。最近、二つの機能を持つ自己溶菌酵素 (autolytic enzyme) をコードしている *atl* 遺伝子が、クローニングされた²¹⁾。この酵素は、*N*-acetylmuramyl-L-alanine-amidase と *N*-acetylglucosaminidase 活性を持っている。これらの酵素複合体は、細胞壁の円周上に2列(おそらく、隔壁の上部円周上)に局在しており、2つの娘細胞の分離を行う重要な酵素であると考えられる²²⁾。

3) ムロソームと隔壁形成における役割¹⁹⁾

直径30~40nmの小胞構造が、細胞分裂の際に完成した隔壁 (septum, cross wall) の上部の周辺の細胞壁中に2個ずつ観察される(図2eおよび図3)。この細胞壁のオルガネラは、細胞壁中で、細胞壁の種々の分解活性を保持しており、隔壁形成と二つの娘細胞が分離するときに主要な役割をするもので、ムロソーム (murosomes) と名付けられている。ムロソームは隔壁の両端の細胞壁に各々1列ずつ小さな孔をパンチして行き、丁度紙の切取線のミシン目のように、娘細胞の剥離を助ける。

4) 隔壁形成¹⁹⁾

隔壁形成の開始は、細胞壁のただ一つの開始点から非対称に行われる(図2c)。他の原核細胞と同様に、staphylococcus の隔壁形成は、中心に向かって同心円上

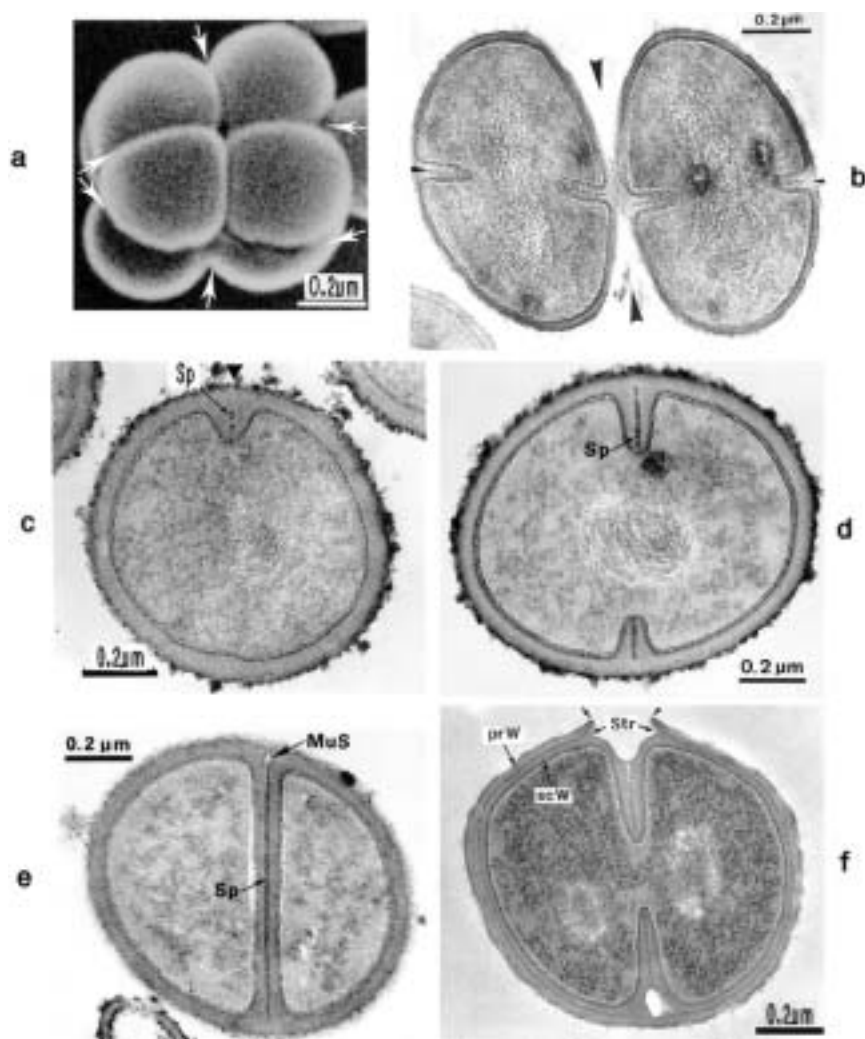


図2 Staphylococcus の走査型電子顕微鏡像 (a) と超薄切片像 (b ~ f)¹⁹⁾ Sp, 剥離装置 (splitting system); MuS, ムロソーム (murosomes) (f) は抗生物質 batumin (1 µg/ml) で2時間作用させた。説明は本文。

に進行し (図 2 d), 最終的に完全に閉じた隔壁となる (図 2 e)。閉じた隔壁は、一見コンパクトで均一に見えるが、抗生物質で作用させると、細胞壁と隔壁は、二層からなっていることが解る (図 2 f): (1) 外層 “一次細胞壁 (prW, primary wall, parent wall)” と (2) 内層 “二次細胞壁 (scW, secondary wall, daughter wall)”。一次と二次の細胞壁に挟まれている部分は、“剥離装置 (Str, stripping system)” と呼ばれるもので、出来たての2つの娘細胞を互いに剥離する役割を持っている。隔壁形成装置を模式的に示したのが、図 3 である。

2. ペニシリンによる *S. aureus* の致死効果の仕組み¹⁹⁾

Alexander Fleming が1929年にペニシリンを発見

し、1941年にはじめて臨床応用されて以来、多くの研究者がこの抗生物質による細菌死の機構を説明することを試みた。しかし、その謎を解くために50年以上もかかるとは誰も予測していなかった。

ペニシリンの最初のターゲット分子は細胞膜の外側表面に露出している蛋白質で、PBPs (penicillin binding proteins) と呼ばれている。 β ラクタム剤と PBPs との相互作用は、ペプチドグリカンの架橋 (cross-linking) を通常の85%から60%に低下させることが知られている。ペニシリンはバクテリアのプロトプラストの外側で PBPs と反応する。

4種の PBPs が *S. aureus* で同定され、PBP 1 ~ 4 と名付けられている。

ここで、*S. aureus* の PBP 1 ~ 4 の生理的な役割を簡単にまとめた。

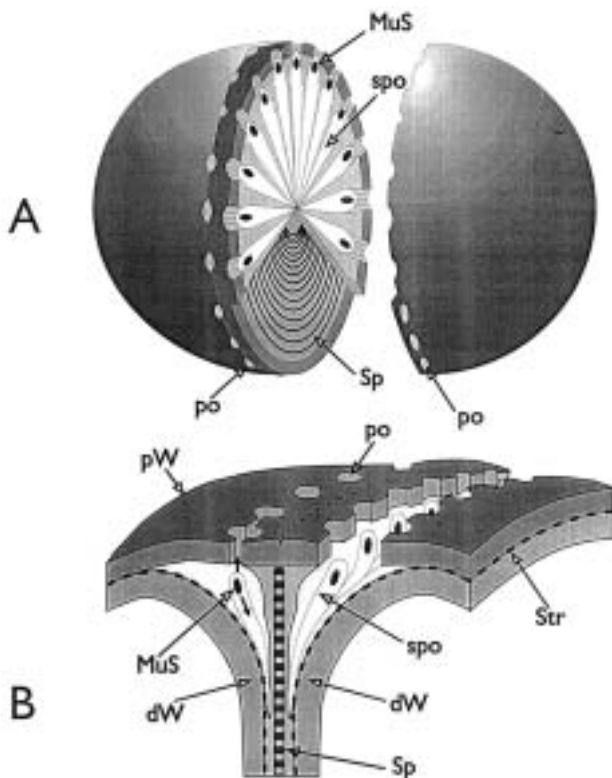


図3 Staphylococcus の隔壁の構成成分の模式図¹⁹⁾

- (A) 細胞分裂の開始状態を示す
2個の娘細胞を分離する前の新しく形成された隔壁を保持している分裂状態の staphylococcus を示している。図では、内部が見えるようにするため、右側の娘細胞は通常的位置から右にずらして描写されている。細胞分裂は、ムロソーム (MuS) が細胞壁の周辺部に二列の穴 (po) をパンチするとともに、中心に向かって溶解を行い、スポーク状の管 (spo) を形成することによって、開始される。
- (B) 細胞分裂の開始後の状態を示す。
dW, 娘細胞の細胞壁; pW, 親細胞の細胞壁; Str, 剥離装置

PBP 1 (87kDa): ペプチドグリカンの transpeptidase 活性を有する。増殖には必須で、大腸菌の PBP 1 機能の類推から細胞伸長 (elongation) に関わっていると推測される²³⁾。

PBP 2 (80kDa): ペプチドグリカンの transpeptidase 活性を有する。cefotaxime と選択的に結合し²⁴⁾、細胞質の放出と溶菌を起こす²⁴⁾。

PBP 3 (75kDa): ペプチドグリカンの transpeptidase 活性を有する。cephalexin (その同族体, cephadrine, cefaclor) と選択的に結合し²⁴⁾、細胞の巨大化と隔壁形成の停止を起こす²⁴⁾。従って、隔壁形成に関わっていると考えられる。

PBP 4 (41kDa): 欠損変異株では、細胞壁の架橋が低密度であった。逆に、高発現株では、それは高密度

となり、 β ラクタム剤に対する耐性度が増加した²⁵⁾。Transpeptidase 活性と carboxypeptidase 活性を有する。

後述する MRSA では、外来性の遺伝子 *mec* カセットがゲノム遺伝子に組み込まれており²⁶⁾、上記の4種のPBPに加えて、 β ラクタム剤に対する親和性が低下した PBP 2' (欧米では PBP 2A と呼ばれている) が発現している^{27, 28)}。

さて、低濃度のペニシリン (0.01 μ g/ml) で処理すると、staphylococci の細胞壁の架橋の程度が減少し、剥離装置の形成が阻止され、コンパクトな隔壁のかわりに緩くなった繊維質の隔壁が形成される (図4a)¹⁹⁾。そのような緩くなった細胞壁でも内部圧により破裂することはない。この点は、以前から推測されている“ペニシリンは細菌を破裂させる”という考えとは異なるもので、細胞の増殖と分離は、未処理の staphylococci と同様に事実上進行する (図4a~c)。さらに、細胞壁の繊維質は、内部圧に抗することができるタフで相互に連結したネットワークからなっている。

低濃度のペニシリン処理によるもう一つの特徴は、PBP s が局在していると考えられる隔壁中の剥離装置が消失していることである。この消失は、PBP 1 を含む4種のPBP sのうち2つにペニシリンが結合している結果である。しかし、staphylococci はこの剥離装置が無い状態でも増殖と細胞分離を行うことができる。

ペニシリンは、成長し細胞分裂を行っている感受性菌のみを死滅させることができ、休止細胞には何ら作用しない。さらに、ペニシリンが作用するポイントは、成長している細菌の細胞壁の全ての部分ではなく成長しつつある細胞壁の一部のみである。したがって、ペニシリンの作用部位は、次の2カ所である:(1) 桿菌の周辺細胞壁が縦方向に成長している局所、と(2) 全ての細菌の細胞壁合成の中心である成長過程にある隔壁上で、他の細胞壁合成の“休止部位”とプロトプラストそれ自体は、ペニシリンによって影響は受けない。

ペニシリンによる細菌の死は、同調培養の実験から、細胞周期のどの時期に薬剤を添加するかに依存していることが明らかになっている。これらの研究から、薬剤の添加後、2回目の細胞周期の開始時に、ペニシリンによる細胞死が起こる。ペニシリンが添加される細胞周期の時期に無関係に、staphylococci は抗生物質を添加後1周期のみは生存できるが、次の細胞周期の最後、すなわち娘細胞の分離を行う際に溶菌が起こり菌は死滅する。

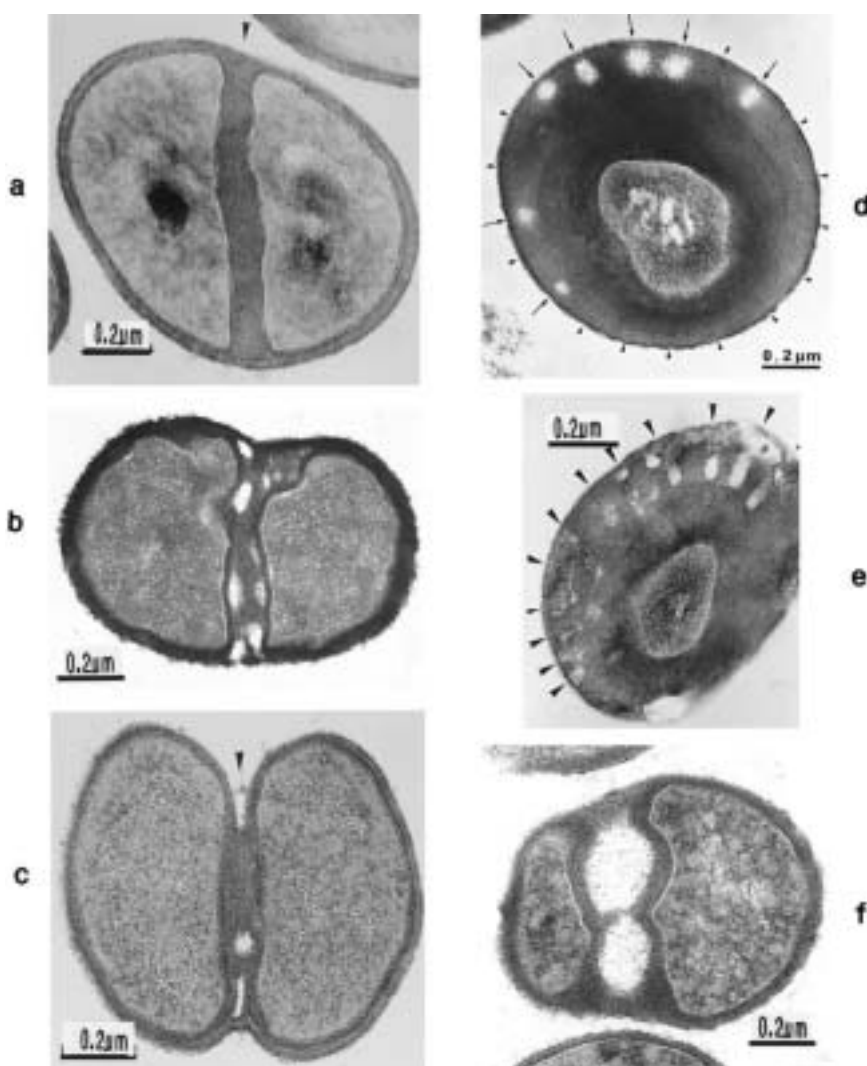


図4 ペニシリン処理した staphylococcus の超薄切片像¹⁹⁾
 (a) 低濃度のペニシリン (0.01μg/ml) 存在下では、剥離装置の形成が、阻害されており、繊維質の細胞壁の素材が、通常のコンパクトな隔壁のかわりに合成されている。
 (b) 1対の溶解部位が、娘細胞の分離の際における隔壁の分解にかかわっている。(c) 0.01μg/mlのペニシリンの存在下で、隔壁の中心部分(矢じり)が剥離装置の関与なしに溶解されている。
 (d)と(e) 0.1μg/mlのペニシリンで処理した隔壁の切片像。菌の周辺に数個のムロソームによる融解部位が観察される(矢印)(d)、溶解部位が、菌の中心に向かって伸長している(矢じり)(e)。(f) 0.1μg/mlのペニシリンと細胞分離の阻害剤 liquoid (2mg/ml)の共存下では、細胞分離を起こすことなく、隔壁が分解しているのが観察される。

そこで、staphylococci に対するペニシリンの致死効果を解析するためには、薬剤の添加後最初の3回の細胞周期、90分(1細胞周期、30分)にフォーカスをあてなければならない。これらを図にまとめたのが、図5である¹⁹⁾。

3. MRSA の β ラクタム剤に対する耐性を決定する因子

先に述べたように、MRSA は、通常の4種のPBPに加えて新たにPBP2'を発現している。PBP2'は、架橋活性を持っているが、βラクタム剤に低親和性のため、βラクタム剤に対して耐性を獲得しているといわれている。ところが、PBP2'の発現量とは無関係に、βラクタム剤に対する耐性の程度は、MRSA 臨床分離株で、MIC(最少発育阻止濃度)4~1600μg/mlと様々

である²⁹⁾。この耐性の違いは何に起因するのであろうか。単純に考えると、十分量のPBP2'が発現していると、いずれの菌もβラクタム剤に対して高度に耐性になっているはずである。この原因を考えるため、次にトランスポゾンによるMRSA変異実験について調べてみる。

トランスポゾン Tn551(あるいはTn918)をゲノム遺伝子に導入することにより個々の遺伝子を破壊させ、MRSAのβラクタム剤に対する耐性を低下させた変異遺伝子が明らかにされた(表1)³⁰⁾。予想に反して、これらの耐性が低下した変異株は、極端に耐性が低下しているにもかかわらず、いずれも無傷のmecA遺伝子を保持しており、その産物であるPBP2'の量にも変化がなかった²⁹⁾³⁸⁾。耐性を低下させたトランスポゾン挿入遺伝子は、いずれもペプチドグリカンの生合成に関

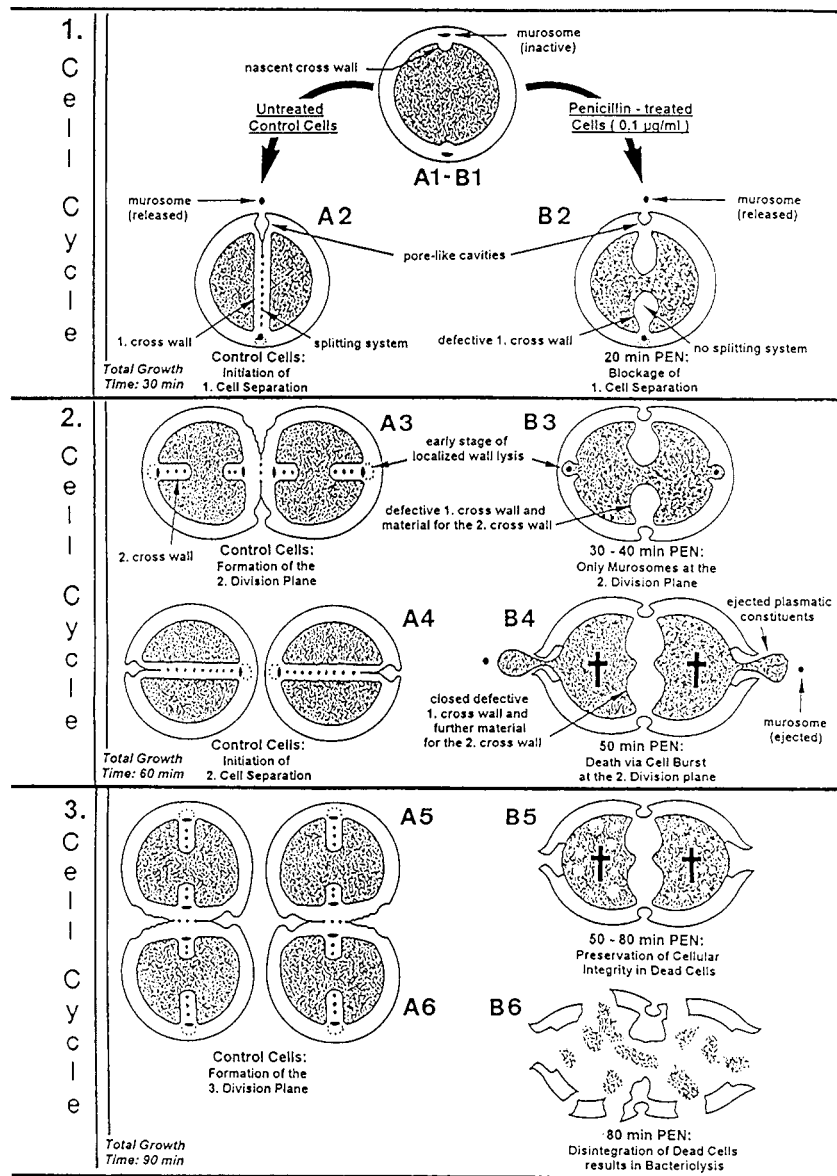


図5 ペニシリンによる *staphylococcus* の細胞死と溶菌の時間経過の模式図。¹⁹⁾

増殖している対照の菌 (A) と $0.1\mu\text{g/ml}$ のペニシリン添加後の菌 (B) の3細胞周期 (90分) のイベントが、模式的に示されている。1細胞周期は30分。

第1細胞周期:(A1からA2まで): 未処理の菌では、コンパクトで高度に組織化された完全な隔壁が第1分裂面に形成される。そしてその隔壁中には、剥離装置 (splitting system) が見られる。この隔壁が完成した後、ムロソームが第1分裂面の細胞壁の円周上に無数の連続した小孔を開け、細胞の分離を開始する。つづいて、これらの小孔の部位を破り、2つの娘細胞を剥離させる。(B1からB2まで): *staphylococci* は、致死濃度のペニシリンの添加後、ほとんど同時に剥離装置を形成する能力を失う。さらに、細胞は、もはや正常なコンパクトな隔壁を作ることができないが、むしろ厚くて変型した不完全な欠陥隔壁中に配置された繊維質のネットワークを合成する。それにもかかわらず、*staphylococci* はムロソームによる周辺細胞壁に穿孔を開け、あたかも最初の隔壁がインタクトで完全であるかのごとく細胞分離を開始する。しかしながら、細胞分離は起こらなくて、むしろ、大きなムロソームによってできた空洞が、第1回目の分裂面の細胞壁の周辺部に現れる。

第2細胞周期:(A3) 未処理の娘細胞の分離の際に、第2分裂面に新しい隔壁の形成が、前回のものに対して 90° の角度で開始される。(B3) ペニシリンの存在下において、第2分裂面の形成が(A3)と同様に開始されるが、隔壁の構築はここでは起こらない。第2分裂面に結合した隔壁の素材は第1分裂面に沈積するため、変形した不完全な第1隔壁は厚くさえる。

(A4) 隔壁の完成の後のみ、次の細胞分離がムロソームによる第2分裂面の細胞壁の周辺部の穿孔を経て開始される。(B4) 正常な *staphylococci* の場合と同様に、第2分裂面における細胞分離が、ムロソームによる細胞壁の周辺部における小孔のパンチングによって開始される。しかし、ペニシリン存在下では、隔壁素材がこの部位に無いにもかかわらず細胞分離が起こるため、高い内部圧によって細胞ははじけて、ムロソームや限定量の細胞質の構成成分を放出する(動脈瘤の原理)。このムロソームによる形態的な死は、ペニシリンを添加後約50分で起こる。

第3細胞周期:(A5, A6):(A3)と同様に第3分裂面に隔壁ができる。(B5, B6): 細胞壁の分解と溶菌が、ペニシリンによる死後約30分で開始する。その結果、破裂した細胞壁の大きな断片、細胞質の残骸が散乱する。

表1 トランスポゾン導入により MRSA (COL 株) の methicillin に対する耐性を低下させた遺伝子³⁹⁾。
MRSA (COL 株) の methicillin に対する MIC = 1600 μ g/ml。説明は本文。

Gene	Relevant function	Site of Tn551 (or Tn918) insertion	Reduction in methicillin resistance from MIC = 1600 μ g/ml
<i>glmM</i>	Synthesis of GlucNac-1-PO ₄	In open reading frame	1.5
<i>murE</i>	Addition of lysine to muropeptide	3 nucleotides from end carboxy terminus	25.0
<i>femA</i> and <i>femB</i>	Synthesis of pentaglycine cross-links	At carboxy terminus	1.5
<i>femC</i>	Regulation of glutamine synthetase	In promoter	3.6
Sigma B	Stress response	In open reading frame	25.0
PBP2	Major wall synthetic enzyme	150-nucleotide deletion at carboxy terminus	12.0
<i>fnt</i>	PBP-like protein	At carboxy terminus	64.0
<i>llm</i>	Lipid-linked wall precursor?	33 amino acid residues to C terminus	12.5

わる遺伝子であった(表1)。これらの遺伝子は、*mecA* 以外の MRSA の β ラクタム剤に対する耐性に関わる新たな遺伝子と考えられている。しかし、そのような遺伝子が、どのような機構で β ラクタム剤に対する耐性度に関わっているかに関する明確な説明はなされていない。

これらの実験結果に基づき、次に β ラクタム剤に対する MRSA の高度耐性化の作業仮説を提出した。

4. β ラクタム剤に対する MRSA の高度耐性化仮説

前述したように、 β ラクタム剤に対する耐性を低下させたトランスポゾン挿入遺伝子は、いずれもペプチドグリカンの生合成に関わる遺伝子であった。

さて、PBP2' は、ペプチドグリカン生合成の最終反応である μ レインペンタペプチド (*N*-acetyl-muramyl-pentapeptide) の D-Ala(1)-D-Ala(2) を結合して、隣の μ レイン鎖のリジン残基の ϵ アミノ基に結合しているペンタグリシンの末端と D-Ala(1) とをペプチド結合させ、D-Ala(2) を遊離させる酵素である。PBP1~4 のいずれもこの酵素活性を有するが、 β ラクタム剤があるとその β ラクタム環の構造が D-Ala(1)-D-Ala(2) の構造と類似しているため、PBP1~4 は、間違っても β ラクタム剤を結合してしまい、架橋反応を行うことができない。しかし、PBP2' は β ラクタム剤との親和性が極端に低いため、 β ラクタム剤により阻害されないため耐性になっていると説明されている。もしこの説明が正しいなら、PBP2' を発現している staphylococcus 株は、全て高度耐性となっているはずである。ところが、前述したように、PBP2' の発現量とは無関係に、 β ラクタム剤に対する耐性度の程度は、MRSA 臨床分離株で MIC 4~1600 μ g/ml と様々である。

この矛盾点を説明するため、筆者らは次の作業仮説をたてた。すなわち、PBP2' の β ラクタム剤に対する親和性の低下は、本来の基質である μ レインペンタペプチドの D-Ala(1)-D-Ala(2) に対する親和性も低下しているはずである。なぜならば、酵素は、D-Ala(1)-D-Ala(2) の構造に類似した β ラクタム剤の β ラクタム環の共通構造を認識しているため、 β ラクタム剤に対する親和性が低下している場合、D-Ala(1)-D-Ala(2) に対しても親和性を低下させていると考えられる。そこで MRSA が β ラクタム剤に対して高度に耐性化するためには、成長過程の隔壁中における μ レインペンタペプチドの濃度を高める変異が起こっており PBP2' との反応性を高め、高度耐性になったと仮定した。この仮説は、ペプチドグリカンの成分を解析した実験結果とよく一致している^{61,62)}。

この作業仮説によれば、上述のトランスポゾンの挿入による耐性度の低下は、 μ レインペンタペプチドの生合成に何らかの形で関わる遺伝子の変異で、隔壁中における μ レインペンタペプチドの濃度が低下したためもはや PBP2' が架橋に関わることができないことから、基質に対して親和性の高い本来の PBP が主として架橋に関わることになり、低濃度の β ラクタム剤により菌を死滅させたと説明される。

5. 生薬から見いだされている抗菌剤

生薬由来の抗菌物質として、現在までに、図6に示す化合物が見いだされている。^{39,42)}

私達は、世界各国から採集した約900種の昆虫及び生薬植物から成分を3種の溶媒で抽出した2700画分(エーテル抽出画分, n-ブタノール抽出画分, 水抽出画分)

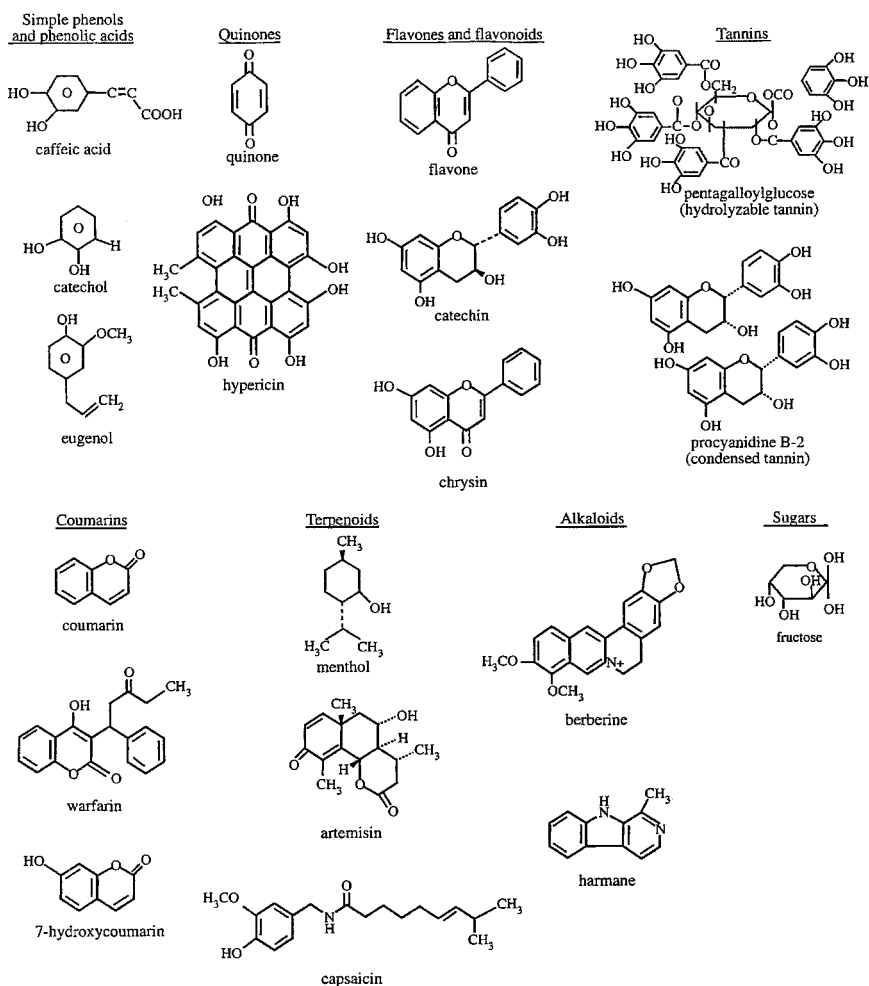


図6 植物から見いだされた抗菌物質の化学構造²⁹⁾

について、ヒト株化細胞に対する細胞毒性と MRSA (MRSA 感染患者から単離した24株) に対する抗菌活性のスクリーニングを行っており、現在までのところ、槐花 (*Sophora japonica*) 等18種の生薬成分中に、ヒト細胞に対しては毒性が無いが、MRSA に対して選択的に強力な抗菌力を発揮する抗菌物質が含有されていることを明らかにしている。これらの生薬抽出画分から有効成分を単離精製し構造決定を行い、訶子から gallic acid と ethyl gallate⁸⁾、蒼耳葉から xanthatin⁹⁾、半枝蓮から apigenin と luteolin¹⁰⁾等を明らかにしている。

6. MRSA の βラクタム剤に対する感受性を増強する薬物 (ILSMR) の発見

私達は MRSA に対する apigenin の作用機作を明らかにするため、各種抗生物質との併用効果を調べている過程で、次に述べる興味深い現象を見出した。“MIC 未満

の濃度の apigenin を培地に加えたとき、MRSA における methicillin に対する感受性を大幅に増強する。”すなわち、多剤耐性 MRSA (methicillin に対する MIC 値、1.024μg/ml) に単独ではほとんど抗菌活性のない 5 μg/ml apigenin を添加することにより、methicillin に対する MIC 値を 8 μg/ml と大幅に感受性を増強した。そこで、各種フラボノイド化合物について、βラクタム剤感受性増強効果を指標としてスクリーニングし、apigenin, luteolin, kaempferol, flavone, 6,7 dihydroxy flavone, 7,8 dihydroxyflavone, 3',4' dihydroxyflavone 等を発見し(表2)、これらの薬剤に対し“βラクタム剤感受性誘導薬 (Inducer of β Lactam drugs-Susceptibility in MRSA (ILSMR))”と名付けた¹³⁻¹⁵⁾。flavone による感受性化は、最高で32,000倍に達した(表3)。

表2に示されるように、flavone は、MRSA No.1 ~ 9株(高度耐性ホモ株)に対する methicillin の感受性を増強しているが、No.12と COL 株に対してはそのよ

表2 ILSMR 効果を有する flavone 誘導体と TA242。説明は本文。

Strain No.	None	Methicillin MIC (µg/ml)							Oxacillin MIC(µg/ml)		
		Apigenin 5 µg/ml	Flavone 50µg/ml	Luteolin 40µg/ml	Kaempferol 50µg/ml	6,7 diOH 12 5µg/ml	7 8 diOH 50µg/ml	3 ' 4 ' diOH 50µg/ml	None	TA242 25µg/ml	
MRSA	1	1,024	256	4	4	32	4	8	<2	>256	64
	2	1,024	64	4	2	32	0.25	<2	<2	256	0.5
	3	1,024	128	2	4	8	0.25	<2	<2	256	0.063
	4	1,024	32	4	4	4	4	<2	<2	256	8
	5	1,024	8	4	2	4	0.25	<2	<2	256	0.063
	6	256	2	0.5	2	4	8	<2	<2	>256	1
	8	512	16	0.5	4	32	4	<2	<2	256	0.063
	9	1,024	256	0.5	4	2	-	<2	<2	>256	4
	12	1,024	>1,024	128	8	512	4	1,024	16	>256	4
	16	>1,024	64	4	4	4	8	1,024	<2	>256	4
	18	1,024	32	4	2	4	8	<2	<2	>256	16
	21	32	128	64	4	128	0.25	16	16	128	0.5
	22	8	128	128	<0.063	128	2	32	<2	64	1
	COL	1,024	1,024	1,024	8	1,024	4	-	<2	>256	2
MSSA	1010	2	2	2	2	2	0.25	<2	<2	4	0.25
	1020	1	2	2	2	2	0.25	<2	<2	4	0.25
	1023	2	2	2	2	2	0.25	<2	<2	8	0.25
	1029	2	1	1	1	1	0.25	<2	<2	8	0.5
	1032	1	1	1	1	1	0.25	<2	<2	<0.5	0.25

diOH : dihydroxyflavone

表3 MRSA (No.5) における flavone による各種 β ラクタム剤に対する感受性化の誘導。

Antibiotics	MIC(µg/ml) of antibiotics		Potentiation of susceptibility (fold)
	- Flavone	+ Flavone*	
methicillin	1,024	4	256
oxacillin	512	1	512
cephapirin	128	<0.016	>8,000
panipenem	64	0.002	32,000

* flavone 50µg/ml

うな効果は弱い或無い。No.21と22株(いずれもヘテロ株)に対しては、逆に耐性度を上昇させていることが解る。luteolin, 3,4'-dihydroxyflavone, そして現在開発中の TA242は、いずれの株に対しても methicillin や oxacillin に対する感受性化を増強していることが解る。現在、これらの菌株の遺伝子発現の違いをマイクロチップにより、解析中である。

本研究室で発見した flavone 等の他に、併用効果のある物質として報告されているものは、epigallocatechin gallate^{43,45)}, epicatechin gallate⁴⁶⁾, Triton X 100^{47,51)},

polidocanol⁵²⁾, baicalin⁵³⁾, polyoxotungstates^{54,55)}, tellimagrandin⁵⁶⁾, diterpenes⁵⁷⁾など様々である。

7. ILSMR の作用機作

1) フラボンの菌体内分布

flavone が実際、菌のどの部位に結合あるいは作用して感受性誘導効果を引き起こしているのか [³H]flavone を用いて調べた。

一晚培養し、集菌・洗浄後蛋白量を測定し、0.1mg of protein/ml となるように調製した菌液を使用した。flavone は250µM (=55.6µg/ml) となるように作用させた。作用後、3回洗浄した菌液に浸透圧を高く保った外液中で lysostaphin を作用させ、細胞壁のみを取り除いた protoplast (グラム陽性菌の細胞壁のみが取り除かれた状態であり、細胞膜と細胞質のみから成る) を作成した。その場合、細胞壁が分解されていくので、一定のレベルまでは濁度が下がっていくが、それ以上には下がらない。低張液中 (Tris-HCl) で lysostaphin を作用させると、30~40分程度で溶菌し、濁度は下がりきってしまう。等張下で lysostaphin 処理した菌液を6,000×g, 15

分遠心を行い, intact cell などを取り除いた上清の総 flavone 濃度は 3.2 nmol/ml であった。これを 48, 200 × g, 15 分間遠心し, protoplast を集めた。この時の上清の flavone 濃度は 3.02 nmol/ml であり, これは全体の 94% 以上をしめた。さらに protoplast を低張液である Tris-HCl 中で lysostaphin 処理し, 遠心して膜画分を沈殿させた。上清側に最初の約 3.3% の flavone が存在しており, 細胞膜には 2.7% であった。細胞膜への flavone の結合量は約 4.3 nmol/mg of protein であった (滝雪歩ら未発表)。

以上の結果より, flavone の多くは細胞壁あるいは細胞壁と細胞膜の間に存在していることが示された。また, 細胞膜への結合や細胞質への分布も認められた。

2) *mecA* の転写および PBP 2' の発現に及ぼすフラボンの影響¹⁵⁾

flavone の併用効果の作用機作として, MSSA が MRSA になるために重要な役割を果たしている *mecA* の発現を抑制していることが考えられた。そこで, *mecA* 発現量および, *mecA* にコードされている PBP 2' の発現量に及ぼす flavone の影響について検討を行った。臨床分離 MRSA 株 (No. 5) より *bla* 遺伝子を含む plasmid を脱落させた菌株 (No. 5 10) を作製し実験に用いた。

まず, *mecA* 発現量に及ぼす影響について, ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて解析した。Strain No. 5 10 を対数増殖期初期まで増菌培養後, 終濃度 100 μg of flavone/ml となるように添加し, 0, 30, 60, 90 分後に, total RNA の単離・精製を行った。その後常法に従い, *mecA* mRNA の検出を行った。プローブには *mecA* PCR 産物 (310bp) を用いた。いずれの場合も約 2 kb 付近に 1 本のバンドが検出され, ORF の長さも考慮して *mecA* mRNA であると判断した。発現量はコントロールと比較して各時間後とも有意差は認められなかった。

PBP 2' 断片ペプチド (474-498) に対する抗体⁵⁸⁾ を作成して PBP 2' の検出を行った。Strain No. 5 10 の膜画分, 16, 8, 4, 2 μg protein を 12% アクリルアミドゲルで電気泳動後, ウェスタンブロットティングし, ラジオイムノアッセイ法を用いて検出した。それぞれの蛋白量に対して定量性があることを確認後, flavone の影響について検討を行った。

Strain No. 5 10 を対数増殖期初期まで増菌培養後, 終濃度 100 μg of flavone/ml となるように添加し, 0,

30, 60, 90 分作用させた。その後, 膜画分を調製し, 4 μg protein をスロットブロット法とラジオイムノアッセイ法を用いて検出した。コントロールと比較して, 終濃度 100 μg of flavone/ml 添加後の PBP 2' 発現量はそれぞれの作用時間において有意差は認められなかった。

Strain No. 5 10 は β ラクタム剤非存在下 (コントロール) においても *mecA* および PBP 2' を発現している。PCR 法により No. 5 10 には *mecRI* および *mecI* が確認され, 誘導的に *mecA* を発現していると予測されていたが, 構成型に近い形で発現していることが明らかとなった。

mecA mRNA および PBP 2' の発現量に flavone が影響していないことが, ノーザンハイブリダイゼーション法およびウェスタンブロットティング法により確認された。これらの結果は, 前述したトランスポゾン導入による遺伝子破壊により, β ラクタム剤に対する耐性を低下させた実験結果と一致している。

3) flavone により遺伝子発現が Up, Down 制御された MRSA 遺伝子の同定

MRSA (No. 5 10 株) の染色体 DNA の *EcoRI* 完全消化断片から約 2000 個の genomic library を作製した。flavone (200 μg/ml) 存在下に培養した本菌株から total RNA を抽出し, Differential Hybridization 法により, flavone 投与による遺伝子発現パターンの変化を解析し, 発現差が見られた遺伝子配列の決定とホモロジー検索を行った。その結果, 遺伝子の転写量が flavone によって Up 制御されたゲノム断片を 16 個, 逆に Down 制御されたゲノム断片を 10 個得た。現在, これらの遺伝子断片について詳細に解析中であるが, *S. aureus* の全ゲノム配列のデータベース⁵⁹⁾を用いた解析により, ペプチドグリカンの生合成に関与した遺伝子が含まれていることが明らかになった (荒井勉ら未発表)。

4) MRSA の高度耐性化仮説による ILSMR 効果の説明
先に提案した MRSA の高度耐性化仮説に基づく, ILSMR による MRSA の β ラクタム剤に対する感受性化は, 次のように説明される。

- (1) ILSMR は, 遺伝子の発現レベルあるいは酵素反応レベルで, ペプチドグリカンの生合成を抑制することにより, ペプチドグリカンの生合成部位である細胞膜の外側と隔壁中の *N*-acetyl-muramyl-pentapeptide の濃度を低下させる。

(2) PBP 2'は、*N*-acetyl-muramyl-pentapeptide に対する親和性を低下させているため、*N*-acetyl-muramyl-pentapeptide の濃度が低下すると、基質を結合できないため、隣のムレイン鎖のペンタグリシンとペプチド結合を行うことができない。

このような状況下では *N*-acetyl-muramyl-pentapeptide に対する親和性が高い生来の4種のPBPが主として、架橋反応を行うため、βラクタム剤に感受性となる。

8. MRSA 感染マウスに対する ILSMR の治療効果

in vitro での感受性誘導効果が *in vivo* でも反映されるのか、4週令のマウスを使って、検討を行った。

フラボン又はルチンをマウスに経口投与することにより、βラクタム剤に高度耐性のMRSAを腹腔に注入し感染させたマウス(1群5匹、感染後1日で100%死亡)をβラクタム剤との併用により100%治癒させることに成功した。この治癒効果は、マウスにMRSAを感染させる前にあらかじめルチンを経口投与しても著効を示した(柴田洋文ら、未発表)。

ルチンは酸化防止作用、血管補強作用、毛細血管拡張作用などがあり、マウスに対する毒性もLD₅₀(ip) = 17,000mg/kgと低く、治療薬としてすでに認可されている化合物であることから、MRSA感染治療薬となることが期待されるが、βラクタム剤との併用による毒性試験や投与設計など詳細に検討する必要がある。

展 望

各種生薬から抽出した成分中に、MRSAのβラクタム剤に対する感受性を増強する成分が多数見いだされてきていることから、選択毒性に優れたβラクタム剤が再び、効力を発揮する時が訪れるものと期待される。

また、他の作用機作を有する抗菌剤に対しても感受性を増強する薬物が、薬剤排出ポンプ活性を阻害する成分をスクリーニングすること等により見いだされてくるものと思われる⁶⁰⁾。

謝 辞

本総説の機会を与えていただきました本学医学部の大西克成教授に深謝いたします。本総説において紹介した

研究成果は、次の方々との共同研究により遂行されました。諸氏に感謝いたします。柴田洋文博士、新垣尚捷助教授、佐藤陽一氏(元アルプス薬品化学工業^(株))、中田孝之氏(アルプス薬品化学工業^(株))、園山智宏氏、興村祐介氏、山本英氏、滝雪歩氏、荒井勉氏、白方千香子氏、湯浅修子氏、近藤京子氏、勝山亮氏、川崎裕美氏、木原勝教授、高石喜久教授、村上光太郎博士、川添和義講師、太田敏子教授(筑波大学医療短期大学部)。本総説の作成にご協力いただいた敦見智子氏に感謝いたします。本研究の一部は、アルプス薬品工業株式会社、科学技術振興事業団の独創的研究成果育成事業、文部科学省の基盤研究(B)(07558095, 14390038)によりサポートされた。

文 献

- 1) Levy, S. B. : The Challenge of Antibiotic Resistance. *Sci. Am.*, 278 : 46-53, 1998
- 2) 日本臨床社 : 特集 耐性菌感染症, *日本臨床* 59 : 4, 2001
- 3) 平松啓一(編): 耐性菌感染症の理論と実践. 医薬ジャーナル社, 2002
- 4) 橋本一: 薬はなぜ効かなくなるか. 中公新書, 2000
- 5) 穴戸春美: 化学療法の領域, *13(S 1)* : 1-22, 1997
- 6) Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ito, T., Yabuta, K., *et al.* : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 : 135-136, 1997
- 7) Dixon, R. A. : Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411 : 843-847, 2001
- 8) Sato, Y., Oketani, H., Singyouchi, K., Ohtsubo, T., *et al.* : Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 20 : 401-404, 1997
- 9) Sato, Y., Oketani, H., Yamada, T., Singyouchi, K., *et al.* : A xanthanolide with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49 : 1042-1044, 1997
- 10) Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., *et al.* : Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 72 : 483-488,

2000

- 11) Kawazoe, K., Yutani, A., Tamemoto, K., Yuasa, S. *et al.* : Phenylanthralene compounds from the subterranean part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.*, 64 : 588-591, 2001
- 12) Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Shibata, H., *et al.* : Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia* : antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* 59 : 649-654, 2002
- 13) Higuchi, T., Sato, Y., Murasugi, S. : Use of Flavone Derivatives for Induction of β -Lactam-Sensitivity of MRSA. USA Patent Registered No. 6294526, 2001
- 14) Higuti, T., Shibata, H., Sato, Y., Arai, T., *et al.* : Dramatic induction by flavone and its derivatives of susceptibility to β -lactam antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Polyphenols Communications*, 2002 (in press)
- 15) Sato, Y., Shibata, H., Arai, T., Okimura, Y., *et al.* : Dramatic induction by flavone and its derivatives of susceptibility to β -lactam antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (submitted)
- 16) Beveridge, T. J. : Ultrastructure of Gram-positive cell walls. In : *Gram-Positive Pathogens* (Fischetti, A. V., Novick, P. R., Ferretti, J. J., Portnoy, A. D., *et al.* eds), ASM Press, WA., 2000, pp. 3-10
- 17) Fischetti, V. A. : Surface proteins on Gram-positive bacteria. In : *Gram-Positive Pathogens* (Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., *et al.* eds), ASM Press, WA., 2000, pp. 11-24
- 18) Moreau, M., Richards, J. C., Fournier, J. M., Byrd, R. A., *et al.* : Structure of the type 5 capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr. Res.*, 201 : 285-297, 1990
- 19) Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., Wecke, J. : Staphylococcal cell wall : Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 : 1371-1414, 1998
- 20) Brunskill, E. W., Bayles, K. W. : Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 178 : 611-618, 1996
- 21) Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, M. Y., *et al.* : A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -*N*-acetylglucosaminidase domain : cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 285-289, 1995
- 22) Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., *et al.* : An autolysin ring associated with cell separation of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 178 : 1565-1571, 1996
- 23) Wada, A., Watanabe, H. : Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth. *J. Bacteriol.*, 180 : 2759-2765, 1998
- 24) Georgopapadakou, N. H., Dix, B. A., Mauriz, Y. R. : Possible Physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29 : 333-336, 1986
- 25) Domanski, T. L., de Jonge B. L., Bayles, K. W. : Transcription analysis of the *Staphylococcus aureus* gene encoding penicillin-binding protein 4. *J. Bacteriol.*, 179 : 2651-2657, 1997
- 26) 伊藤輝代, 片山由紀, 平松啓一 : メチシリン耐性の伝播に關与する mobile genetic element (Staphylococcal cassette chromosome *mec*). *日本細菌学雑誌*, 55 : 483-498, 2000
- 27) Song, M. D., Wachi, M., Doi, M., Ishino, F., *et al.* : Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.*, 221 : 167-171, 1987
- 28) Utsui, Y., Yokota, T. : Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28 : 397-403, 1985
- 29) Murakami, K., Tomasz, A. : Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 171 : 874-879, 1989
- 30) Tomasz, A. : The staphylococcal cell wall. In : *Gram-Positive Pathogens* (Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., *et al.* eds), ASM Press, WA., 2000, pp. 351-360
- 31) Jolly, L., Wu, S., van Heijenoort, J., de Lencatre, H., *et al.* : The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin

- resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. J. Bacteriol., 179 : 5321-5325, 1997
- 32) Wu, S., de Lencastre, H., Sali, A., Tomasz, A. : A phosphoglucosaminase-like gene essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* : Molecular cloning and DNA sequencing. Microb. Drug Resist., 2 : 277-286, 1996
- 33) Ludovice, A. M., Wu, S., de Lencastre, H. Molecular cloning and DNA sequencing of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase (*murE*) gene, essential for the optimal expression of methicillin resistance. Microb. Drug Resist., 4 : 85-90, 1998
- 34) Ling, B., Berger-Bachi, B. : Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus femAB* null mutants. Antimicrob. Agents Chemother., 42 : 936-938, 1998
- 35) Gustafson, J., Strassle, A., Hachler, H., Kayser, F. H. *et al.* : The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. J. Bacteriol., 176 : 1460-1467, 1994
- 36) Pinho, M., Ludovice, A. M., Wu, S., de Lencastre, H. : Massive reduction in methicillin resistance by transposon inactivation of the normal PBP2 in a methicillin resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug Resist., 3 : 409-413, 1997
- 37) Komatsuzawa, H., Sugai, M., Ohta, K., Fujiwara, T. *et al.* : Cloning and characterization of the *fnt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X 100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 41 : 2355-2361, 1997
- 38) Maki, H., Yamaguchi, T., Murakami, K. : Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 176 : 4993-5000, 1994
- 39) Cowan, M. M. : Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12 : 564-582, 1999
- 40) Dixon, R. A., Dey, P. M., Lamb, C. J. : Phytoalexins : enzymology and molecular biology. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 55 : 1-136, 1983
- 41) Middleton, E. Jr. : Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Adv. Exp. Med. Biol., 439 : 175-182, 1998
- 42) Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W. : Dietary agents in cancer prevention : flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol. Ther., 90 : 157-177, 2001
- 43) 島村忠勝 : カテキンによる MRSA に対するオキサシリンの抗菌作用出現 . 感染症学雑誌, 69 : 1126-1134, 1995
- 44) Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Okubo, S., Hara, Y., *et al.* : Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 45 : 1737-1742, 2001
- 45) Hu, Z. Q., Zhao, W. H., Asano, N., Yoda, Y. *et al.* : Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 46 : 558-560, 2002
- 46) Shiota, S., Shimizu, M., Mizushima, T., Ito, H., *et al.* : Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). Biol. Pharm. Bull. 22 : 1388-1390, 1999
- 47) Komatsuzawa, H., Suzuki, J., Sugai, M., Miyake, Y., *et al.* : The effect of triton X 100 on the *in-vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. J. Antimicrob. Chemother., 34 : 885-897, 1994
- 48) Komatsuzawa, H., Ohta, K., Sugai, M., Fujiwara, T. *et al.* : Tn551 mediated insertional inactivation of the *fntB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother., 45 : 421-431, 2000
- 49) Komatsuzawa, H., Sugai, M., Ohta, K., Fujiwara, T., *et al.* : Cloning and characterization of the *fnt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X 100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 41 : 2355-2361, 1997
- 50) Suzuki, J., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Ohta, K., *et al.* : Effects of various types of triton X on the susceptibilities of methicillin-resistant staphylococci to oxacillin. FEMS Microbiol. Lett., 153 : 327-331, 1997

- 51) Komatsuzawa, H., Sugai, M., Shirai, C., Suzuki, J., *et al* : Triton X 100 alters the resistance level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. FEMS Microbiol. Lett., 134 : 209 212 ,1995
- 52) Bruns, W., Keppeler, H., Baucks, R. : Suppression of intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus* by polidocanol, a dodecyl polyethyleneoxid ether. Antimicrob. Agents Chemother., 27 : 632 639 ,1985
- 53) Liu, IX., Durham, D. G., Richards, R. M. : Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. J. Pharm. Pharmacol., 52 : 361 366 ,2000
- 54) Yamase, T., Fukuda, N., Tajima, Y. : Synergistic effect of polyoxotungstates in combination with beta-lactam antibiotics on antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biol. Pharm. Bull ,19 : 459 65 , 1996
- 55) Fukuda, N., Yamase, T., Tajima, Y. : Inhibitory effect of polyoxotungstates on the production of penicillin-binding proteins and beta-lactamase against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biol. Pharm. Bull 22 : 463 470 ,1999
- 56) Shiota, S., Shimizu, M., Mizusima, T., Ito, H., *et al*. : Restoration of effectiveness of beta-lactams on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tellimagrandin I from rose red. FEMS Microbiol. Lett., 185 : 135 138 ,2000
- 57) Nicolson, K., Evans, G., O'Toole, P. W. : Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. FEMS Microbiology Letters ,179 : 233 239 ,1999
- 58) Sekiguchi, K., Saito, M., Yajima, R. : Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with antibodies against synthetic peptides derived from penicillin-binding protein 2'. Microbiol. Immunol., 39 : 545 550 ,1995
- 59) Kuroda, M., Takahashi, N. K., Ohta, T., Sawano, T., *et al* : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet ,357 : 1225 1240 , 2001
- 60) Guz, N. R., Stermitz, F. R., Johnson, J. B., Beeson, T. D., *et al*. : Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump : structure-activity relationships. J. Med. Chem., 44 : 261 268 ,2001
- 61) de Jonge, B. L., Chang, Y. S., Gage, D., Tomasz, A. : Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. J. Biol. Chem., 267 : 11248 11254 ,1992
- 62) de Jonge, B. L., Chang, Y. S., Gage, D., Tomasz, A. : Peptidoglycan composition in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *staphylococcus aureus* strain. J. Biol. Chem., 267 : 11255 11259 ,1992

*The new method for the drug tolerance conquest : with the aim of the invention of inducer medicine of β -lactam drugs-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ILSMR)*

Tomihiko Higuti

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

SUMMARY

Here we demonstrated that flavone and its derivatives had no or weak antibacterial effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), but dramatically induced susceptibility to β -lactam antibiotics in most strains of MRSA isolated clinically, even up to a 32,000-fold increase. We named these flavones “inducer of β -lactam drugs-susceptibility in MRSA”, abbreviated as “ILSMR”.

We also proposed the model for the mechanism of high resistance of MRSA to β -lactam drugs in which we assumed as follows: (1) PBP2' (PBP2A) has low affinity not only to the β -lactam ring in β -lactam drugs, but also to D-Ala-(D)-Ala in *N*-acetyl-muramyl-pentapeptide and that (2) PBP 2' can cross-link between *N*-acetyl-muramyl-pentapeptide and penta-glycine only when MRSA has been mutated such as the concentrations of these substrates have been greatly increased in the cross wall of staphylococcal cell. Based on the model, we could explain that ILSMRs increased susceptibility to β -lactam drugs in MRSA by decreasing the concentration of *N*-acetyl-muramyl-pentapeptide and/or penta-glycine in the growing cross wall. In such conditions, only normal PBP1 ~ 4 could work for the cross-link. This could be the reason why ILSMRs increased the susceptibility to β -lactam drugs in MRSA.

We also found that flavone and its derivatives were highly active against systemic infections by MRSA in mice.

Key words : β -lactam drugs-susceptibility, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ILSMR, penicillin binding protein, PBP 2'