

緑膿菌における抗菌薬抵抗性について

—新規化合物 Autoinducer Analog-1 の効果—

Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*

—The Effect of New Compound, Autoinducer Analog-1—

天羽 崇

(Takashi AMOH)

キーワード：抗菌薬、抗菌薬抵抗性、緑膿菌、抗菌薬耐性

Key Words：Antibiotics, Antibiotic Tolerance, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic Resistance

I. はじめに

感染症の治療においては、感染症患者の検体から原因となる微生物を特定し、その菌種に有効な抗菌薬を選択する必要がある。適切な抗菌薬を選択するためには薬剤感受性検査が必要であり、その方法として微量液体希釈法、およびディスク拡散法がある。日本においては多くの施設で微量液体希釈法が採用され¹⁾、測定した最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) から CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute : 臨床検査標準協会) の判定基準に基づき、感受性 (S : Sensitive)、中等度耐性 (I : Immediate)、耐性 (R : Resistance) を判定する²⁾。医療現場においては抗菌薬耐性菌の蔓延が問題となっており、様々な種類の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性細菌も出現しつつある。主な抗菌薬耐性菌と耐性機序、耐性遺伝子を表 1 にまとめる。耐性菌自体はペニシリンが実用化された1940年代からすでに発見されており、ペニシリン耐性菌に対抗するために1960年代にメチシリンが開発されたが、すぐにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が出現し、新たな抗菌薬が開発されるとともに耐性菌が出現するという悪循環に陥っている。

耐性菌の場合、薬剤感受性試験による MIC は感受性菌に比べ高い値を示す。一方で薬剤感受性試験による MIC に基づき、有効と判定された抗菌薬を使用しても十分な効果が得られないことがある。このような難治性感染症の原因の一つとして「抗菌薬抵抗性 : Antibiotic Tolerance」が注目されているが、抗菌薬抵抗性については未だ不明な点も多い。

本稿ではまず抗菌薬の作用機序と、抗菌薬耐性獲得機序について概略する。次いで様々な環境への適応能力を有し、多剤耐性化や院内感染が問題となっている緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* における抗菌薬抵抗性に着目し、その抗菌薬抵抗性獲得に関与する遺伝子と、抵抗

あもうたかし：目白大学短期大学部歯科衛生学科

性を減少させる化合物について概説する。

表 1 抗菌薬耐性菌とその耐性機序の一例²⁾

名称	耐性機序	耐性遺伝子
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	新規ペニシリン結合タンパク (PBP2') 産生	<i>mecA</i>
Vancomycin-resistant enterococci (VRE) バンコマイシン耐性腸球菌	細胞壁前駆体末端を変化させる耐性遺伝子の獲得	<i>vanA, vanB, vanC</i>
Penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP) ペニシリン耐性肺炎球菌	口腔内レンサ球菌のペニシリン結合タンパク (PBP) 遺伝子との組み換え及び変異	<i>pbp1a, pbp2, pbp2b</i> の組み換えあるいは変異
Multi-drug resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDRP) 多剤耐性緑膿菌	複数の遺伝子変異および耐性遺伝子の獲得	
Multi-drug resistant <i>Acinetobacter</i> spp. (MDRA) 多剤耐性アシネトバクター属菌	複数の遺伝子変異および耐性遺伝子の獲得	
Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌	主にβ-ラクタマーゼによるカルバペネム系抗菌薬の加水分解	<i>bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{OXA-48}</i> など

II. 抗菌薬の作用機序^{3) - 5)}

抗菌薬の種類とその作用機序を表 2 に示す。

表 2 抗菌薬の作用機序と種類

作用機序	名称	一例
細胞壁合成阻害	β-ラクタム系抗菌薬	
	ペニシリン系	アンピシリン水和物
	セフェム系	セフカペンピボキシル塩酸塩
	カルバペネム系	メロペネム
	グリコペプチド系抗菌薬	バンコマイシン塩酸塩
核酸合成阻害	キノロン系抗菌薬	レボフロキサシン水和物
タンパク質合成阻害	アミノグリコシド系抗菌薬	ゲンタマイシン硫酸塩
	マクロライド系抗菌薬	アジスロマイシン水和物
	テトラサイクリン系抗菌薬	テトラサイクリン塩酸塩
	クロラムフェニコール系抗菌薬	クロラムフェニコール

1. 細胞壁合成阻害

細菌は球状の球菌 (coccus) や棒状の桿菌 (bacillus) といった形態を示すが、その形態維持に必要な構造が細胞壁である。細胞壁の存在により、細胞外圧と細胞内圧が一定に保たれ、その形態が維持される。グラム陽性菌とグラム陰性菌とではおおまかな構造が異なるが、細胞壁の共通構造として、糖鎖にペプチドが結合した高分子の架橋体ペプチドグリカン³⁾を有する。この細胞壁の合成過程に作用し殺菌的に働くのが細胞壁合成阻害薬である。細胞壁合成が阻害されると、その構造が脆弱になり外圧と内圧の差を保護できなくなり、細菌が溶菌し死滅する。共通の化学構造 β -ラクタム環をもつ β -ラクタム系抗菌薬やグリコペプチド系抗菌薬が挙げられる。 β -ラクタム系抗菌薬はさらにペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系などに分けられる。

2. 核酸合成阻害

細菌のDNA、あるいはRNA合成に関与する酵素を阻害することにより抗菌力を発揮する。細菌のRNAポリメラーゼに結合しRNA鎖合成阻害を示すリファンピシンや、細菌DNAの複製・修復・転写・組み換えに関与している酵素DNAジャイレースの働きを阻害し、殺菌的に働くニューキノロン系抗菌薬などがある。

3. タンパク質合成阻害

生物は細胞質内にあるリボソームにおいてタンパク質を合成している。このリボソームに結合し、タンパク質合成を阻害することで静菌的に働く抗菌薬がタンパク質合成阻害薬である。アミノグリコシド系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬、テトラサイクリン系抗菌薬、クロラムフェニコール系抗菌薬などがある。リボソームは細菌などの原核細胞生物とヒトなどの真核細胞生物と共通の構造物であるが、その大きさが異なっており、このことから細菌に対する選択毒性を有している。

以上の抗菌薬のほか、細胞膜に傷害を与える細胞膜傷害薬、細胞分裂の際に必要な葉酸の合成を阻害する葉酸合成阻害薬などがある。

Ⅲ. 抗菌薬耐性^{3), 6), 7)}

前項にて一般的に使用されている抗菌薬の作用機序をまとめた。次にこれらの抗菌薬に対する耐性獲得の機序を示す (図1)。

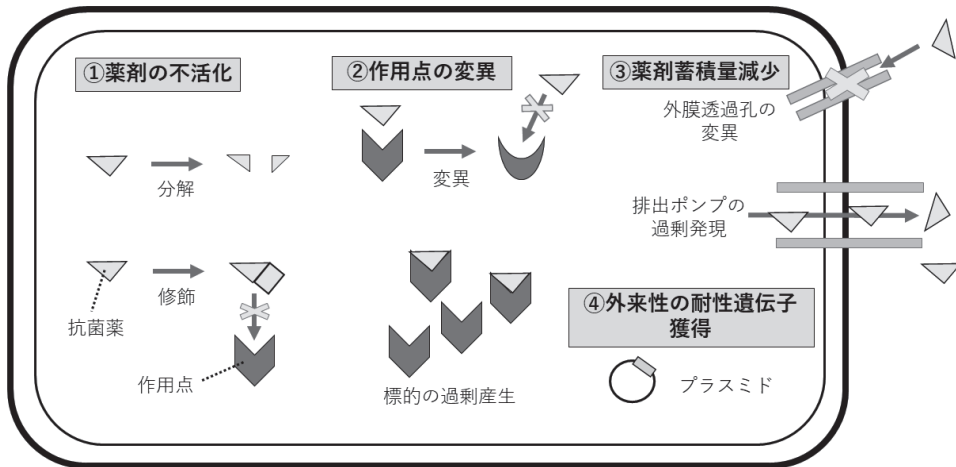


図 1 抗菌薬耐性の獲得機序^{4), 5)}

1. 薬剤の不活化

抗菌薬を分解および修飾する酵素を産生し、その酵素の働きによって抗菌薬を不活化させる。分解に関与する酵素の多くは加水分解酵素であり、代表的なものとして β -ラクタマーゼが挙げられる。この酵素は β -ラクタム系抗菌薬の共通構造である β -ラクタム環を切断することで、作用点との結合性を低下させ抗菌活性をなくす。またアミノグリコシド系抗菌薬は、細菌の産生するアミノグリコシド修飾酵素によってリン酸化やアセチル化などの反応が起き不活化される。

2. 作用点の変異

キノロン系抗菌薬への耐性は、標的となるDNAジャイレースやDNAトポイソメラーゼをコードする遺伝子の特異的な部位（キノロン耐性決定領域）に、アミノ酸置換を伴う変異が生じることで獲得される。

β -ラクタム系抗菌薬は、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン合成に関わるペニシリン結合タンパク質（penicillin-binding protein：PBP）と結合親和性を有し、PBPの酵素反応を阻害することで細胞壁合成阻害作用を示す。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*：MRSA）は、 β -ラクタム系抗菌薬と低結合親和性であるPBP 2'を産生する能力を獲得した細菌である。そのため臨床的に用いられる薬剤濃度では細胞壁合成を阻害することができず、耐性を示す。

3. 薬剤蓄積量の減少

細菌は外部から物質を取り込む機能を持つ透過孔（ポーリン）や、菌体内部から外部へ異物を排出する排出ポンプを有している。ポーリンの減少や欠失による抗菌薬の細胞内への透過性を

低下、排出ポンプの過剰発現による抗菌薬排出能の上昇により細菌細胞内の薬剤蓄積量が減少すると、抗菌薬に対して耐性を示す。

緑膿菌はポーリンや排出ポンプを複数有しており、特にポーリンの1つOprD遺伝子の欠損や、排出ポンプMexEF-OprN遺伝子群の過剰発現がカルバペネム系抗菌薬、およびキノロン系抗菌薬の耐性に関与することが知られている。

4. 外来遺伝子の獲得

プラスミドとは、染色体とは独立した自己複製能を持つ環状DNAであり、細菌間での伝達能を有するものも存在する。このプラスミド上に薬剤耐性遺伝子が組み込まれていると、プラスミドの伝達によって薬剤耐性遺伝子が他の菌に行きわたり、新たな耐性菌を出現させてしまう。MRSAはPBP 2' をコードする遺伝子*mecA*を外部から獲得したことにより生じた耐性菌である。

IV. 抗菌薬抵抗性

項Ⅲで述べた通り、抗菌薬耐性は遺伝子の変異や外来遺伝子の獲得などによって起こる。耐性を獲得した細菌は、MICが高くなり抗菌薬の存在下においても問題なく増殖することができる。抗菌薬耐性獲得は細菌が抗菌薬から生き残るための戦略の一つであり、細菌の「進化」だということができるだろう。

一方で抗菌薬抵抗性については、抗菌薬耐性ほど詳細なメカニズムは明らかになっていない。抗菌薬抵抗性は、MICを超える抗菌薬存在下において増殖しないが、生き残ることができる細菌の能力と定義されている⁸⁾。この状態は細菌が休眠状態になっていると考えられ、*persister cell*とも呼ばれている^{9)・10)}。抗菌薬抵抗性を獲得した細菌は抗菌薬存在下では発育しないが、死滅せず生存するため、抗菌薬活性が失われると活動を再開することができる(図2)。そのため、抗菌薬抵抗性は慢性難治性感染症の主要因の一つである。抗菌薬耐性のように遺伝子の変異や外来遺伝子の獲得によって生じるものではなく、細菌の存在する環境の変化に応じて遺伝子発現が変化し、一時的に生理的变化が起きるものと考えられている。抗菌薬耐性が進化だとすると、抗菌薬抵抗性は細菌が自らに不利な環境に対応する「適応能力」であるといえる。

抗菌薬抵抗性を生じさせる要因はいくつかあり、ストレス応答¹¹⁾、飢餓状態¹²⁾、定常期への移行¹³⁾やバイオフィーム形成^{14)・15)}などが挙げられる。バイオフィームにおいては、元々抗菌薬が効きづらく、その理由として細菌の産生した菌体外多糖によるバリアー効果によるものと言われていたが、近年ではそれに加えて、バイオフィーム内部の低栄養や低酸素分圧によって*persister cell*が増加することによるものと考えられている¹⁵⁾。また、バイオフィームを形成する前段階である固層への付着によっても、すでに抗菌薬抵抗性を獲得していることが報告されている^{16)・17)}。

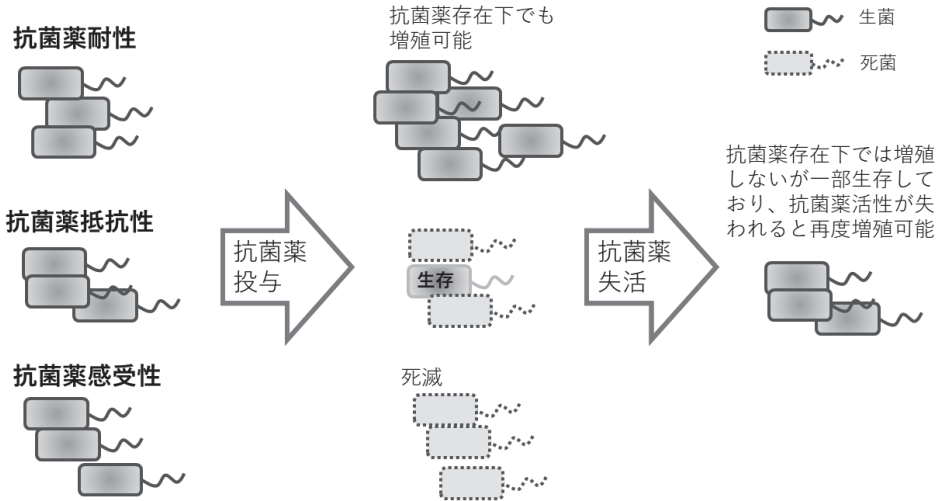


図 2 抗菌薬耐性、抗菌薬抵抗性、抗菌薬感受性のイメージ図

V. 抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子

緑膿菌において、抗菌薬抵抗性への関連が示唆されている遺伝子をいくつかまとめる。細菌は栄養枯渇にさらされた時、細胞内にグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) およびグアノシン 5 リン酸 (pppGpp) を蓄積させ、緊縮応答を行う¹⁸⁾。この応答により、細胞増殖速度の低下など生理的変化を生じさせることで生存する。このppGppの合成や分解にかかわる遺伝子が、*relA* 遺伝子および*spoT*遺伝子である。これらの遺伝子変異株において、キノロン系抗菌薬の抵抗性に関与することが報告されている¹²⁾。また、緑膿菌において病原因子の産生やバイオフィーム形成にはクオラムセンシング機構が関与している。クオラムセンシング機構は細菌細胞同士の情報伝達機構であり、ホルモン様物質オートインデューサー (autoinducer: AI) の濃度を感知することで、病原因子などの遺伝子発現を調節している。緑膿菌にはLas系、Rhl系、PQS系が存在し、それぞれ異なるAIを利用している。これらのクオラムセンシング機構はさらに、ストレス応答に関与する σ 因子*rpoS*遺伝子や、窒素代謝に関与する σ 因子*rpoN*遺伝子、転写調節因子*vqsR*遺伝子などが複雑に作用し、調節している。これらの遺伝子が、さらに抗菌薬抵抗性にも関与していることが報告されている^{19) - 24)}。

村上らはバイオフィームの形成段階に着目し、固層へ付着した段階、バイオフィームを形成した段階での抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子についてトランスポゾン変異株を用いて検討し、付着時の抵抗性、バイオフィーム形成時の抵抗性、およびその両段階において関与する遺伝子を報告している^{25)・26)}。中でも付着・バイオフィーム形成段階両方に関与しているPA2384遺伝子は、詳細な機能は未だ不明であるが、バイオフィーム形成によって発現が誘導され、バイオフィーム形成菌での抗菌薬抵抗性に重要な役割を果たすことが示唆されている²⁷⁾。

表 3 抵抗性に関連する遺伝子

遺伝子	機能	文献
<i>relA</i> (PA0934)	ppGpp 合成	12
<i>lasR</i> (PA1430)	Las クオラムセンシング (QS) 調節因子	19
<i>lasI</i> (PA1431)	3-oxo-C12-HSL 合成酵素 (LasQS)	19
<i>psl BCD</i> (PA2232-PA2234)	菌体外多糖生合成オペロン バイオフィーム形成	25
PA2384	不明	26, 27
<i>vqsR</i> (PA2591)	転写制御因子	24
<i>rpoS</i> (PA3622)	定常期 σ 因子	19, 20
<i>rpoN</i> (PA4462)	窒素代謝 σ 因子	21, 22, 23
<i>spoT</i> (PA5388)	ppGpp 合成・分解	12

VI. 抗菌薬抵抗性に対する試み

以上のように抗菌薬抵抗性については、多くの遺伝子が関与していると考えられるが、抗菌薬耐性のようにその詳細な機序については明らかになっておらず、不明な点が多い。

著者はこれまでに緑膿菌の抗菌薬抵抗性を減少させ、既存の抗菌薬と併用することでその効果を高める新規化合物について研究を行ってきた。その研究成果について、一例をご紹介します。著者が研究対象とした新規化合物 Autoinducer Analog-1 (以下 AIA-1 と略す) は、緑膿菌の病原因子発現やバイオフィーム形成に関与するクオラムセンシング機構の 1 つである Las 系のオートインデューサーのアナログであり、水溶性の物質である²⁸⁾。

以下に緑膿菌野生株 PAO 1 株を対象に、カルバペネム系抗菌薬であるメロペネム (以下 MEPM) と AIA-1 を用いた実験結果を示す。まず PAO 1 株に対し、MEPM と AIA-1 の薬剤感受性試験を微量液体希釈法により行った。結果を表 4 に示す。PAO 1 株は MEPM の MIC が $0.5 \mu\text{g/mL}$ と感受性を示し、また AIA-1 自体の MIC は $128 \mu\text{g/mL}$ と、PAO 1 株に対しあまり抗菌活性を示さなかった。また、AIA-1 併用による感受性試験の結果、MEPM の MIC は変化しなかったことから、AIA-1 は抗菌薬の感受性に影響しないことが示唆された。

表 4 緑膿菌野生株 PAO 1 株に対する薬剤感受性試験の結果

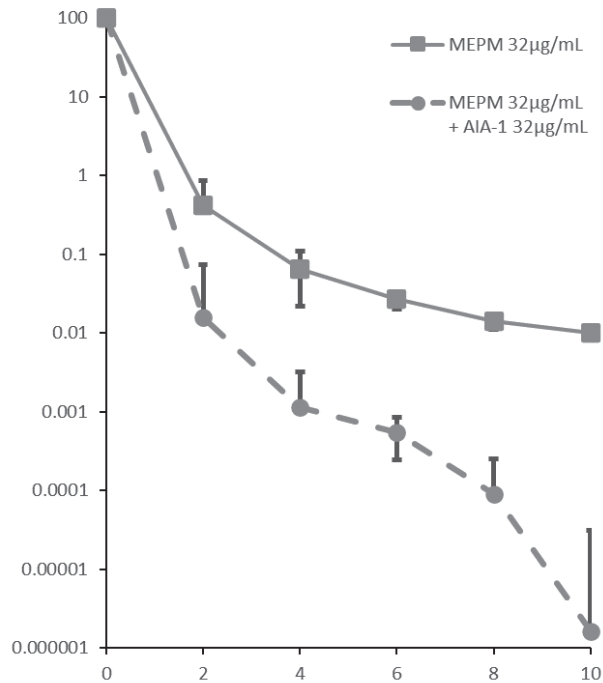
	MEPM	AIA-1	MEPM + AIA-1
PAO1	0.5	128	0.5

数値は最小発育阻止濃度 MIC を示す ($\mu\text{g/mL}$)。

次いで、MEPMとAIA-1を用いた殺菌試験を行った。殺菌試験はPAO1株を24時間前培養後、新たな液体培地に植え継ぎ対数増殖期まで培養した。その後MEPM(32 μ g/mL)単独もしくはMEPMとAIA-1(32 μ g/mL)を同時に作用させながら培養を継続し、経時的に寒天培地に播種してColony Forming Unit(CFU)を計測した。薬剤を作用させる直前(t=0)のCFUを100%とし、各時間の生存率を算出した。結果を表5、および図3に示す。

表5 緑膿菌PAO1株に対するメロペネム(MEPM)を用いた殺菌試験の結果

時間	MEPM					MEPM + AIA-1				
	菌数 (CFU/mL)			平均	生存率 (%)	菌数 (CFU/mL)			平均	生存率 (%)
0	37000000	40800000	44100000	40633333.33	100	33900000	49200000	40600000	41233333.33	100
2	174000	151000	186000	170333.3333	0.419196062	5700	6400	7400	6500	0.015763945
4	27800	23600	28600	26666.66667	0.065627564	340	490	590	473.3333333	0.001147939
6	10200	12300	10300	10933.33333	0.026907301	160	230	290	226.6666667	0.0005497171
8	5930	5560	5470	5653.333333	0.013913043	25	37	49	37	0.0000897332
10	4420	3960	4000	4126.666667	0.010155865	1	1	0	0.666666667	0.0000016168



実線がMEPM単独群、破線がMEPMとAIA-1の併用群を示している。
縦軸：生存率(対数表記, %) 横軸：経過時間(h)

図3 緑膿菌PAO1株に対するメロペネム(MEPM)を用いた殺菌試験の結果

まずは、MEPM単独での殺菌試験結果（表5左側、図3実線）を示す。抗菌薬を作用させてから2時間後には生存率がおよそ100分の1まで減少しているが、その後は緩やかになり、10時間後においても約4000 CFU/mL程度の細菌が生存していた。このようにMIC（0.5 μg/mL）より高濃度（32 μg/mL）の抗菌薬を使用しても、一定数（およそ $10^3 \sim 10^4$ 程度）の細菌は生存していることから、これらの細菌は抗菌薬の存在下という環境変化に適応するために抗菌薬抵抗性を獲得したと考えられる。

次にAIA-1併用群での殺菌試験結果（表5右側、図3破線）を示す。MEPM単独使用群と比較して、2時間後には約1000分の1まで生存率が減少し、その後も生存率は減少し続け、10時間後にはほぼすべての細菌が死滅した。この生存率（CFU）の減少は、PAO1株の抗菌薬抵抗性が減少したため起こったと考えられ、このことから新規化合物AIA-1は緑膿菌の抗菌薬抵抗性獲得機序に作用し、抗菌薬抵抗性を減少させることで抗菌薬の作用を増強することが示唆された（図4）。

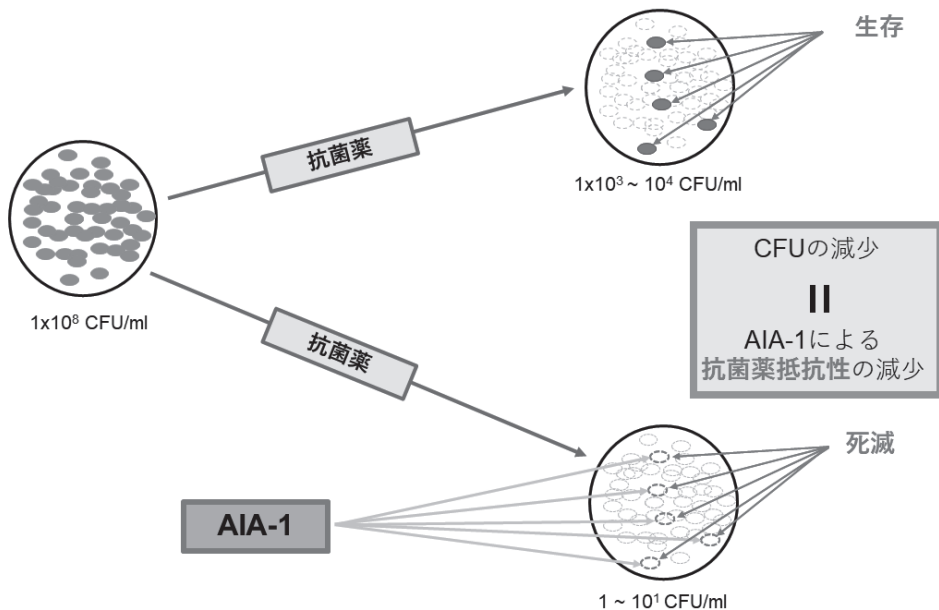


図4 AIA-1は抗菌薬抵抗性を減少させることで抗菌薬の作用を増強する

VII. おわりに

抗菌薬抵抗性は細菌の生き残り戦略の1つであり、慢性難治性感染症に関与することから、医療の現場において問題となっている。抗菌薬抵抗性を経て抗菌薬耐性へ移行するとの報告もあることから^{29), 30)}、感染症治療において抗菌薬抵抗性獲得を阻止する方法は、治療法の確立や抗菌薬耐性菌の出現を防ぐために有効であると考えられる。

新規化合物AIA-1はカルバペネム系抗菌薬以外にも、キノロン系抗菌薬、アミノグリコシ

ド系抗菌薬との併用効果が見られ²⁸⁾、その併用効果はバイオフィーム形成菌や²⁸⁾、耐性菌に対しても有効であることが示唆された³¹⁾。このことからAIA-1は抗菌薬抵抗性に打ち勝つための新たな治療法開発の一助になると考えられる。現時点でのAIA-1の作用機序としては、項Vで述べた遺伝子の一つである*rpoS*遺伝子の発現を大きく抑制することが明らかになっている²⁸⁾、より詳細な機序解明については今後の課題である。

【参考文献】

- 1) 松本哲哉 編著, 最新臨床検査学講座 臨床微生物学, 医歯薬出版株式会社, 2019年1月10日(第1版第3刷)
- 2) JAID/JSC感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会 編集, JAID/JSC感染症治療ガイド2019, 2019年11月16日(第1版)
- 3) Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 2006; **34**: S3-S10.
- 4) 一般社団法人 全国歯科衛生士教育協議会 監修, 最新歯科衛生士教本 疾病の成り立ち及び回復過程の促進 2 微生物学, 2020年1月20日(第1版第12刷)
- 5) 公益社団法人 日本化学療法学会 抗菌化学療法認定医制度審議委員会 編集, 抗菌薬適正使用生涯教育テキスト 第3版, 2020年10月1日.
- 6) Poole K. *Pseudomonas aeruginosa: resistance to max*. *Front Microbiol* 2011; **2**: Article 65.
- 7) Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann NY Acad Sci* 2015; **1354**: 12-31.
- 8) Handwerger S and Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; **25**: 349-380.
- 9) Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**: 48-56.
- 10) Keren I, Mulcahy LR, Lewis K. Persister Eradication: lessons from the World of Natural Products. *Methods Enzymol* 2012; **517**: 387-406
- 11) Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress response to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3838-3847.
- 12) Viducic D, Ono T, Murakami K, Susilowati H, Kayama S, Hirota K, and Miyake Y. Functional Analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* Genes on Quinolone Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under Nongrowing Condition. *Microbiol Immunol* 2006; **50**(4): 349-357.
- 13) Spoering Al, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; **183**: 6746-6751.
- 14) Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **59**: 256-268.
- 15) Yan J, Bassler BL. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe* 2019; **26**(1): 15-21.
- 16) Miyake Y, Fujiwara S, Usui T and Sugiyama H: Simple method for measuring the antibiotic concentration required to kill adherent bacteria. *Chemotherapy* 1992; **38**: 286-290.
- 17) Taniguchi K, Ono T, Murakami K, Viducic D, Kayama S, Hirota K, Nemoto K and Miyake Y. A novel gene of *Pseudomonas aeruginosa* that suppresses tolerance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2997-3001.

- 18) Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 2016; **354**(6318): aaf4268
- 19) Kayama S, Murakami K, Ono T, Ushimaru M, Yamamoto A, Hirota K and Miyake Y. The role of *rpoS* and quorum-sensing system in ofloxacin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; **298**: 184-192.
- 20) Murakami K, Ono T, Viducic D, Kayama S, Mori M, Hirota K, Nemoto K, Miyake Y. Role of *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **242**: 161-167.
- 21) Viducic D, Ono T, Murakami K, Katakami M, Susilowati H, and Miyake Y. *rpoN* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Alters Its Susceptibility to Quinolones and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(4): 1455-1462.
- 22) Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T, Miyake Y. RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through Pseudomonas quinolones signal and PqsE. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**(10): 5752-5764.
- 23) Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T, Miyake Y. RpoN promotes *Pseudomonas aeruginosa* Survival in the Presence of Tobramycin. *Front Microbiol* 2017; **8**: Article 839.
- 24) Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T, Miyake Y. Interplay between the quorum sensing regulator VqsR and the Pseudomonas quinolone signal in mediating carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 2017; **168**(5): 450-460.
- 25) Murakami K, Ono T, Viducic D, Somiya Y, Kariyama R, Hori K, Amoh T, Hirota K, Kumon H, Parsek MR, Miyake Y. The role of *psl* genes in antibiotic tolerance of adherent *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**(7): e02587-16.
- 26) Murakami K, Ono T, Noma Y, Minase I, Amoh T, Irie Y, Hirota K, Miyake Y. Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 2017; **23**: 271-277.
- 27) 村上圭史, 喜田悠太, 村田梨菜, 廣島佑香, 片岡佳子, 藤猪英樹. 緑膿菌バイオフィーム形成菌の抗菌薬抵抗性に関わる遺伝子について. *Bacterial Adherence & Biofilm* 2019; **33**: 59-60.
- 28) Amoh T, Murakami K, Kariyama R, Hori K, Viducic D, Hirota K, Igarashi J, Suga H, Parsek MR, Kumon H and Miyake Y. Effects of an autoinducer analogue on antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 2230-2240.
- 29) Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoshani N, Balaban NQ. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* 2017; **355**, 826-830.
- 30) Lewis K, Shan Y. Why tolerance invites resistance. *Science* 2017; **355**(6327): 796.
- 31) Amoh T, Murakami K, Kariyama R, Hori K, Irie Y, Viducic D, Hirota K, Igarashi J, Suga H, Kumon H, and Miyake Y. A *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing autoinducer analog enhances the activity of antibiotics against resistant strains. *J Med Invest* 2017; **64**: 101-109.