

# 東北医科薬科大学

## 審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	ハヤカ サコ 早川 幸子（福島県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 10 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	多剤耐性グラム陰性桿菌に対する抗菌化学療法と耐性獲得制御に関する研究
論文審査委員	主査 教授 柴田 信之
	副査 教授 久下 周佐
	副査 教授 藤村 茂

## 多剤耐性グラム陰性桿菌に対する抗菌化学療法と耐性獲得制御に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科臨床感染症学教室

薬学専攻博士課程 早川 幸子

新規抗菌薬の開発により、細菌感染症の治療成績が著しく向上した一方で、近年 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*、extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生菌、multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)、multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* などの多剤耐性菌が相次いで出現し、世界的な脅威になっている。この耐性菌に対する対策を講じない場合、耐性菌関連感染症による死亡者数が、2050年までに1000万人/年に増加するとの予測が2014年に公表された。これを受け2015年にWHOにおいてAntimicrobial resistance (AMR) global action planが採択され、2016年には本邦でも、AMR対策アクションプランが公表された。本邦のアクションプランは、global action planの「1.普及啓発・教育」、「2.動向調査・監視」、「3.感染予防・管理」、「4.抗微生物剤の適性使用」、「5.研究開発・創薬」に「6.国際協力」を加えた6つのバンドルからなる。

本研究の第1章では「2.動向調査・監視」として、わが国で臨床分離された多剤耐性菌6種を含む計260株に対し、海外から緊急導入された新規抗菌薬 tigeicycline の抗菌力を調査した。

ESBL産生株を含む *Escherichia coli*、ESBL産生 *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*)、imipenem および ciprofloxacin の2剤耐性株を含む *A. baumannii* に対する tigeicycline の感受性率は100%であった。一方、MDRPを含む *P. aeruginosa* について tigeicycline は全て耐性であり、ESBL産生 *Proteus mirabilis* に対する感

受性率は 15.4%であった。以上の結果より、tigecycline の薬剤感受性は欧米の成績と同等であり、*P. aeruginosa* と *P. mirabilis* を除く、多剤耐性グラム陰性桿菌の感染症治療に有用であると考えられた。

第 2、3 章においては、「5.研究開発・創薬」の一環として、tigecycline の適応外菌種であり、院内感染の代表的な起因菌である *P. aeruginosa* を用い、多剤耐性の獲得を Reactive oxygen species (ROS) が助長するか否か、またそのメカニズムを解明し、抗 ROS 薬が耐性獲得を制御しうる可能性について検討した。

感染症発症時には、その起因菌は Minimum inhibitory concentration (MIC) 以下の濃度の抗菌薬に加え、白血球より放出される ROS にも曝露される。第 2 章では、*P. aeruginosa* PAO-1 (標準株) を用い、その代表的抗緑膿菌薬 (piperacillin、levofloxacin、ceftazidime、meropenem、amikacin) への曝露、および生体内 ROS の要素として hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) を用いて負荷を行い、多剤耐性獲得について検討した。負荷薬剤以外への交差耐性を示し多剤耐性が誘導された株について、キノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子変異、および $\beta$ -ラクタム系薬の耐性遺伝子である *ampC*、*mexA*、*oprD* の mRNA 発現解析を実施した。

sub-MIC piperacillin および  $H_2O_2$  負荷により piperacillin 耐性に加え、levofloxacin への交差耐性が確認された。この交差耐性のメカニズムとして、D2 ポーリンをコードする *oprD* の mRNA の発現量が、親株に比し 30%以下に低下した。今回確認された多剤耐性の獲得は、抗 ROS 薬である  $\alpha$ -リポ酸誘導体「sodium zinc histidine dithiooctanamide (DHL-His-Zn)」の添加により抑制された。以上の成績から sub-MIC の抗菌薬曝露に加え、ROS による酸化ストレスが *P. aeruginosa* における多剤耐性化の重要な因子であることが示唆された。

第 3 章では、臨床分離株においても同様に、抗菌薬以外に ROS がその多剤耐性化に関与し、さらに抗 ROS 薬がその出現抑制に寄与するか検討した。*P.*

*aeruginosa* の臨床分離株 20 株を用い piperacillin および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた *in vitro* 耐性誘導試験を実施した。sub-MIC piperacillin と 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> にて 24 時間負荷した後、生残した株を同濃度の薬剤含有培地に植え継ぐ操作を 5 回繰り返し、piperacillin と levofloxacin の MIC 変化を観察した。交差耐性獲得メカニズムとして、QRDR の遺伝子変異の確認、および薬剤排出ポンプをコードする *mexA*、*mexY*、*mexC* と *oprD* の mRNA の発現量を解析した。Piperacillin および levofloxacin の多剤耐性を獲得した株は、20 株中 4 株 (20%) であった。これら 4 株は、QRDR の遺伝子変異は確認されなかったが、*mexA*、*mexY*、*mexC* の発現亢進が 3 株、*oprD* の発現低下が 1 株に認められた。

本検討では、piperacillin 負荷が levofloxacin の交差耐性を誘導し、他のβ-ラクタム系薬の meropenem と ceftazidime ではこうした傾向は確認されなかった。Ceftazidime を排出する主な薬剤排出ポンプは MexAB-OprM であるが、piperacillin は 3 種類のポンプ (MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexXY-OprM) から排出される。フルオロキノロン系薬はこれら全てのポンプから排出されることが知られている。したがって piperacillin の負荷により 3 種類のポンプ全てが同時に発現亢進したため、フルオロキノロン系薬に交差耐性を獲得したと考えられた。また meropenem の負荷株は、その強力な作用により早急に殺菌されたため耐性が生じなかったと考えられた。

これらの 4 株の遺伝子学的同一性は確認されなかったが、その多剤耐性化は、DHL-His-Zn の添加により抑制された。今回の検討から、ROS が緑膿菌臨床分離株においても多剤耐性化を助長することが明らかになった。

今回示された DHL-His-Zn の多剤耐性獲得抑制作用は、他の抗 ROS 薬として知られている ascorbic acid や glutathione と比較し、最も優れていた。DHL-His-Zn は酸化ストレスを軽減することで癌化学療法後の脱毛を抑制するなど、すでに

外用薬として臨床応用されている。*In vivo* でのラット腎虚血モデルにおいても組織障害を軽減するなど、血流により感染部位へ分布することが可能と考えられる。今後さらなる検討が必要ではあるが、DHL-His-Zn は酸化ストレスを軽減し、多剤耐性を抑制する抗菌化学療法の補助薬として期待された。

<参考文献> 主論文 (原著論文)

1. Sachiko Hayakawa, Masato Kawamura, Takumi Sato, Taizou Hirano, Toshiaki Kikuchi, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura  
An  $\alpha$ -Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.  
Journal of Infection and Chemotherapy, 2019; 25: 28-33
2. Sachiko Hayakawa, Emiko Furukawa, Masato Kawamura, Toshiaki Kikuchi, Taizou Hirano, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura  
Exposure to reactive oxygen species and piperacillin leads to multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.  
Clinical Microbiology, 2016; 5: 1000264
3. 早川幸子、藤村 茂、古川恵美子、河村真人、宇野浩一、佐藤寿夫、渡辺 彰  
東北地方で臨床材料から分離された各種病原細菌に対するチゲサイクリンの抗菌力。  
日本化学療法学会雑誌, 2015; 63 (6): 576-9