

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	イトウ リョウタ 伊藤 亮太（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 21 号
学位授与の日付	令和 5 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	ESBL 産生株を含む <i>Escherichia coli</i> における cefmetazole 耐性獲得とその抑制に関する研究
論文審査委員	主査 教授 大河原 雄一
	副査 教授 内田 龍児
	副査 教授 藤村 茂

ESBL 産生株を含む *Escherichia coli* における
cefmetazole 耐性獲得とその抑制に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

臨床感染症学教室 伊藤 亮太

薬剤耐性 (Antimicrobial resistance : AMR) 菌による感染症は世界中で蔓延しており、年々増加している。特に、腸内細菌目細菌における基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase : ESBL) 産生株は、1980 年代に初めて欧州で報告されて以降、世界的に検出されるようになり、その多くを *Escherichia coli* が占めている。わが国では 2000 年頃より検出され始め、2015 年では臨床分離された *E. coli* の 24.3% が ESBL 産生を示している。この ESBL をコードする遺伝子はプラスミド上に存在するため、他の菌株や菌種を超えて伝播することが可能である。したがって、院内のみならず市中においても拡散しやすく、その急速な感染拡大が大きな問題となっている。

ESBL 産生 *E. coli* は主に尿路、腹腔内あるいは菌血症の原因菌として高頻度に分離される。このうち菌血症では ESBL 非産生株による場合に比して、死亡リスクが 2.9 倍上昇することが報告されている。こうした、ESBL 産生 *E. coli* による感染症に対する治療薬は極めて少なく、重症例ではカルバペネム系薬が推奨される。しかしながら、その多用によるカルバペネム耐性化が懸念されている。そのため、わが国では安価かつ抗菌活性を有する cefmetazole (CMZ) が軽～中等症例を中心に選択され、その使用量は近年増加傾向にある。一方、CMZ に偏っ

た治療薬選択による耐性化が危惧されるが、ESBL 産生株に対する CMZ の耐性獲得に関する検討はほとんどされていない。したがって、本研究では ESBL 産生株を含む *E. coli* における CMZ 耐性獲得機序の解明とともに、その耐性獲得阻止に焦点をあて、以下の検討を行った。

第一章では宮城県内における ESBL 産生株の検出状況の把握を目的とし、臨床分離された *E. coli* 62 株を対象に ESBL 産生株のスクリーニングを行い、関連遺伝子の解析を実施した。2016 年の北陸地方におけるサーベイランスにおいて、*E. coli* における ESBL 産生株の割合は 15.7%と報告された。また、関西地方のサーベイランスでは 20.6%であり、尿路検体由来の株がその半数を占めていた。本検討では、*E. coli* 62 株のうち 14 株 (22.6%) が ESBL 産生株であり、わが国において検出率が増加しているものと思われた。今回検出された ESBL 産生株の遺伝子解析において、TEM 型と CTX-M 型を併せ持つ菌株が 14 株中 5 株 (35.7%) 検出された。欧米では複数の耐性遺伝子を保有する株は重症例において検出されているが、わが国ではほとんど検出されておらず、今回の調査において東北地方では初めて確認された。ESBL 産生株の拡大に伴って、今回のような複数の遺伝子型を示す株の検出が今後増加する可能性があるため、継続的なサーベイランスが必要である。

第二章では、*in vitro* CMZ 曝露モデルを作成し *E. coli* に対する CMZ 耐性獲得機序について検討を行った。CMZ 10 日間の曝露によって 26 株中 15 株 (57.7%) が耐性を示した。これらの耐性獲得株は抗菌薬フリー培地で 14 日間継代培養することにより 15 株中 11 株 (73.3%) が感受性を回復したが、CMZ 再曝露 2 日目からこれら 11 株すべてが高度耐性を示した。このことから ESBL

産生 *E. coli* に対する CMZ は 10 日程度で、約半数が耐性を獲得し、休薬によって感受性を一端回復するものの、再投与により直ちに高度耐性を示すと考えられ、その後の治療継続は困難になることが示唆された。なお、第一章で確認された TEM 型及び CTX-M 型の保有株と各々単一の遺伝子を保有する株において、CMZ 曝露による耐性獲得や耐性化までの日数に差は認められなかった。これは CMZ が各 ESBL に分解されず安定であることから、複数の ESBL 遺伝子型の保有は CMZ に対する耐性獲得に影響しないと考えられた。さらに、我々は CMZ に対する耐性獲得機序の解明のため、耐性獲得株におけるポーリン、AmpC 型 β ラクタマーゼおよび薬剤排出ポンプをコードする遺伝子の各 mRNA 発現量を確認した。耐性獲得株では Wild Type (親株) に比して、ポーリン遺伝子をコードする *ompF* と *ompC* の発現が有意に低下した ($P<0.05$)。一方、AmpC 型 β ラクタマーゼおよび薬剤排出ポンプをコードする遺伝子の mRNA 発現量は曝露前後において変化がみられず、耐性獲得への関与は低いと考えられた。したがって、菌体内への抗菌薬流入経路であるポーリンをコードする遺伝子 (*ompF* と *ompC*) の発現低下が、CMZ 耐性獲得に関係していると示唆された。

近年では AMR を考慮した抗菌化学療法として、耐性メカニズムを阻害する薬剤との配合剤を用いることが主流になってきており、新薬開発が望めない現状においては、既存薬の併用による新規治療法の検討が必要である。そのため、第三章では第二章で明らかとなったポーリン発現低下による耐性獲得を阻止し、CMZ 耐性化を抑制する薬剤を探索した。今回、その候補としてポーリンへ作用する安息香酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウムおよび新規 β ラクタマ

一ゼ阻害剤である Relebactam (REL) を選択し、CMZ 曝露モデルへの添加による MIC の変化およびポーリンの mRNA 発現量を解析した。CMZ 単剤曝露により耐性を獲得した株は REL 16 µg/mL を添加した場合のみ、すべての株で耐性が抑制された。特に *ompF* の mRNA 発現量が REL 添加により高発現 (2.1-4.3 倍) していたことから、REL の *ompF* に対する作用が本検討によって初めて示された。

臨床において、さらなる耐性菌の出現を抑止するため、カルバペネム系薬に代表される広域抗菌薬の不必要な投与が減少している。そのため、ESBL 産生 *E. coli* 感染症に対しては、比較的狭域スペクトルである CMZ の使用機会が増加しているが、*E. coli* に対する CMZ は、早ければ曝露 4 日目から耐性株が出現することを本研究で明らかにした。耐性を獲得しにくい新薬の早期開発が望まれるが、今回我々は *E. coli* に対する CMZ 耐性化抑制を考慮した配合剤の候補として REL の可能性を見出し、これが CMZ の耐性化を抑止できる配合剤になると信じている。今後は、REL の類似構造を有する化合物の検討が必要であり、新たなポーリン発現亢進作用を有する薬剤開発が望まれる。

< 参考論文 > 主論文 (原著論文)

1. Ryota Ito, Masato Kawamura, Takumi Sato, Shigeru Fujimura. Cefmetazole Resistance Mechanism for *Escherichia coli* Including ESBL-Producing Strains. *Infection and Drug Resistance*. **15**: 5867-5878. (2022)