

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08452

研究課題名(和文) 抗菌薬の臨床的ブレイクポイント設定及び検証のためのモデル構築

研究課題名(英文) Construction of the model for setting and verification of the clinical breakpoints of antibiotics

研究代表者

石井 良和 (ISHII, Yoshikazu)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90246695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ブレイクポイントの境界でメロペネムに感性を示すIMP-6型カルバペネマーゼ産生もしくはCTX-M-2型基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生の腸内細菌科細菌に対するメロペネム治療(1回1g、1日3回)の有効性をHollow-fiber infection modelを用いて評価した。いずれの菌株も治療中にメロペネム耐性株が出現した。全ゲノムシーケンスおよびPCR解析の結果、前者ではblaIMP-6搭載プラスミドコピー数の増加に伴うIMP-6産生量増加、後者ではblaCTX-M-2の三重複によるCTX-M-2産生量増加と外膜遺伝子ompCの欠失が、メロペネム耐性化に寄与したことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤感受性試験成績から抗菌薬の治療効果を予測するためにブレイクポイントが設定されている。本邦ではブレイクポイントでメロペネムに感性と判定されるIMP型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌が分離されているが、そのような菌株に対するメロペネム治療の有効性は明らかでなかった。Hollow-fiber infection modelを用いた本研究成果は、メロペネムのブレイクポイントを再設定する必要があることを示している。薬剤耐性菌の増加が問題となっている現代社会において、本モデルはブレイクポイントの設定と検証において有用であり、新薬開発の促進と抗菌薬治療の適正化に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of meropenem treatment (1 g, q8h) for borderline meropenem-susceptible Enterobacteriaceae producing IMP-6 type carbapenemase or CTX-M-2 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase was evaluated using the hollow-fiber infection model. Meropenem-resistant mutants emerged during meropenem treatment for both strains. Full-length whole-genome sequencing and PCR analysis suggested that the resistance mechanisms of meropenem-resistant mutants were increased blaIMP-6 transcripts due to increased plasmid copy numbers in the former strain, and increased blaCTX-M-2 transcripts due to gene triplication and OmpC loss resulting from ompC deletion in the latter strain.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：ブレイクポイント 中空系膜感染モデル メロペネム カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 プラスミド 全ゲノムシーケンス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

薬剤感受性検査で得られる抗菌薬の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) は感染症治療に有効な抗菌薬を選択する上で重要な指標である。この MIC 値から抗菌薬の治療効果を予測するために臨床的ブレイクポイント (BP) が Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) と European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) より設定されている。BP で感性和判定される抗菌薬は、良好な治療効果が期待される。

近年、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) が問題となっており、有効な治療選択肢が限られている状況にある。主な耐性機構としては、分解酵素カルバペネマーゼの産生が知られている。大きく分けて Class A、B、D に分けられ、Class B には本邦でよく分離される IMP 型 (主に IMP-1、IMP-6) がある。興味深いことに、IMP 型カルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌 (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae : CPE) は、耐性遺伝子を保有しているにも関わらずカルバペネム系抗菌薬メロペネム (MEPM) への薬剤感受性が感性和判定される傾向にある。このような菌株に対する MEPM 治療 (1 回 1g、1 日 3 回、30 分注入) の有効性は定かではなく、長期的には耐性菌が出現する恐れがあり、BP を再考する必要性が提起される。

長期的な抗菌薬治療を再現する *in vitro* モデルとして、Hollow-fiber infection model (HFIM) が欧米では用いられている。HFIM は、抗菌薬の体内動態をシミュレートし、その条件下における細菌の消長を長期的に観察することができる *in vitro* PK (Pharmacokinetics) -PD (Pharmacodynamics) 試験モデルである。短期的な PK-PD 試験モデル Chemostat model と異なり、培養槽に中空糸膜モジュールを採用している。中空糸膜と外筒の間、中空糸外空間 (Extra-Capillary Space : ECS) に接種された細菌は、中空糸膜の分画分子量が 20kDa であることから ECS 外に流出することなく抗菌薬に長期的に暴露される。このような設計により、Chemostat model ではできなかった薬剤耐性化も評価することが可能になった。本邦では HFIM が導入されていない状況であったが、2017 年より東邦大学医学部 微生物・感染症学講座で導入に向けた取り組みが開始された。

研究代表者は、HFIM が BP の設定と検証に有用なモデルとなるのではと考えた。講座では多数の耐性遺伝子保有臨床分離株を収集しており、これらの菌株と HFIM を組み合わせれば、より臨床に適した BP を提案することが可能ではないかと考えた。本研究では、MEPM に感性和示す CPE と Non-CPE (カルバペネマーゼ非産生、CTX-M-2 型基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生) を HFIM に接種し、MEPM の BP 検証試験を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究は、BP の境界で MEPM に感性和示す CPE および Non-CPE に対する MEPM 治療 (1 回 1g、1 日 3 回、30 分注入) の有効性を評価することを目的として実施した。評価モデルの HFIM 内に MEPM の薬物動態を 5 日間シミュレートし、CPE および Non-CPE の消長を経時的に観察した。さらに、出現した MEPM 感受性低下菌の耐性機構を明らかにする目的で、全ゲノムシーケンス (WGS) と PCR 解析 (デジタル PCR : dPCR、定量的逆転写 PCR : RT-qPCR) を実施した。

## 3. 研究の方法

CPE として IncN プラスミド上に *bla*<sub>IMP-6</sub> と *bla*<sub>CTX-M-2</sub> をもつ *Escherichia coli* (以降、CPE\_Ec) を、Non-CPE として染色体上に *bla*<sub>CTX-M-2</sub> をもつ *Citrobacter koseri* (以降、Non-CPE\_Ck) を使用した。両株に対する MEPM の MIC は 1mg/L (CLSI の BP で感性和) であった。

HFIM 試験においては、中空糸膜モジュールとしてポリスルホン製透析膜の FCS-C2011 (FiberCell Systems 社) が、培養培地として Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) が用いられた。MEPM 治療 (1 回 1g、1 日 3 回、30 分注入) をシミュレートするために、シリジポンプ (Legato 210P ; KD Scientific 社) とペリスタポンプ (MasterFlex 07522-30 ; Cole-Parmer 社) が用いられた。中空糸内空間 (Intra-Capillary Space : ICS) の循環ポンプとしてデュエットポンプ (FCS-P3202 ; FiberCell Systems 社) が、ECS の循環ポンプとしてスムーズフローポンプ (QI-100-6TA ; Tacmina 社) が用いられた。1-コンパートメントモデルに基づいた MEPM の PK パラメータを Phoenix WinNonlin ソフトウェア (version 8.1.0 ; Cetera 社) で算出し、PK パラメータから MEPM 治療をシミュレートするポンプ流量を算出した。CPE\_Ec もしくは Non-CPE\_Ck を FCS-C2011 の ECS に接種し、35°C で 3 時間培養した後、MEPM 治療が 5 日間実施された。経時的に ECS から培養液を採取し、生理食塩水で希釈した後、総菌数の算出のために Mueller-Hinton Agar (MHA) に、MEPM 感受性低下菌数の算出のために 3mg/L (MIC の 3 倍) の MEPM を含む MHA に希釈液を塗布した。培養後、コロニー数をカウントし CFU/mL を算出した。出現した MEPM 感受性低下菌は分離し、-80°C で保存した。

保存した MEPM 感受性低下菌に対する MEPM の MIC を CLSI ガイドライン M07 に従った微量液体希釈法で測定した。栄研化学より提供されたフローズプレートが用いられた。精度管理株として、*E. coli* ATCC 25922 と *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 が用いられた。MIC 値の解釈は CLSI ガイドライン M100-32<sup>nd</sup> edition に従った。

保存した MEPM 感受性低下菌の WGS を実施した。magLEAD と MagDEA Dx SV (Precision System Science 社) を用いて DNA を抽出し、MiSeq (Illumina 社) と MinION (Oxford Nanopore

Technologies 社)を用いたシーケンスを実施した。得られた配列をアSEMBルした後、遺伝子のアノテーション、耐性因子の検索、Single nucleotide polymorphism (SNPs) の検出を実施した。

保存した CPE\_Ec 由来 MEPM 感受性低下菌における *bla<sub>IMP-6</sub>* 搭載 IncN プラスミドのコピー数と *bla<sub>IMP-6</sub>* の転写量を解析する目的で、TaqMan プローブ法に基づいた dPCR と RT-qPCR を実施した。*dxs* 遺伝子が内部標準として用いられた。フェノールクロロホルム法で DNA と RNA を抽出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics 社) で精製した。精製した核酸について、QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v2 および QuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて dPCR を、TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix および QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて RT-qPCR を実施した。RT-qPCR の実施に際しては、核酸を DNaseI で処理した。*bla<sub>IMP-6</sub>* の転写産物は  $\Delta \Delta Ct$  法で比較定量された。

#### 4. 研究成果

##### (1) MEPM 感性 CPE\_Ec および Non-CPE\_Ck 由来 MEPM 耐性菌の出現

CPE\_Ec においては、治療開始 2 時間後で  $1.1 \times 10^6$  CFU/mL から  $2.8 \times 10^1$  CFU/mL まで総菌数が減少したが、24 時間後で  $5.5 \times 10^5$  CFU/mL まで再増加した (図 1A)。120 時間後には総菌数が  $8.1 \times 10^8$  CFU/mL まで増加した。MEPM 感受性低下菌数は 72 時間で  $2.7 \times 10^2$  CFU/mL、120 時間で  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL であった。120 時間で出現した MEPM 感受性低下菌に対する MEPM の MIC は 4mg/L (CLSI の BP で耐性) と測定され、MEPM 治療 (1 回 1g、1 日 3 回、30 分注入) で MEPM 感性 CPE\_Ec が MEPM に耐性化することが明らかとなった。

Non-CPE\_Ck においては、治療開始 2 時間後で  $6.3 \times 10^5$  CFU/mL から  $5.7 \times 10^3$  CFU/mL まで総菌数が減少したが、24 時間後で  $6.0 \times 10^6$  CFU/mL まで再増加した (図 1B)。124 時間後には総菌数が  $3.1 \times 10^9$  CFU/mL まで増加した。MEPM 感受性低下菌数は 24 時間で  $1.4 \times 10^2$  CFU/mL、72 時間で  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL、124 時間で  $2.3 \times 10^9$  CFU/mL であった。124 時間で出現した MEPM 感受性低下菌に対する MEPM の MIC は 16mg/L (CLSI の BP で耐性) と測定され、MEPM 治療 (1 回 1g、1 日 3 回、30 分注入) で MEPM 感性 Non-CPE\_Ck が MEPM に耐性化することが明らかとなった。未治療群から MEPM 感受性低下菌が検出されたが、MEPM の MIC は 2mg/L と測定され、親株からの有意な変化は認められなかった。

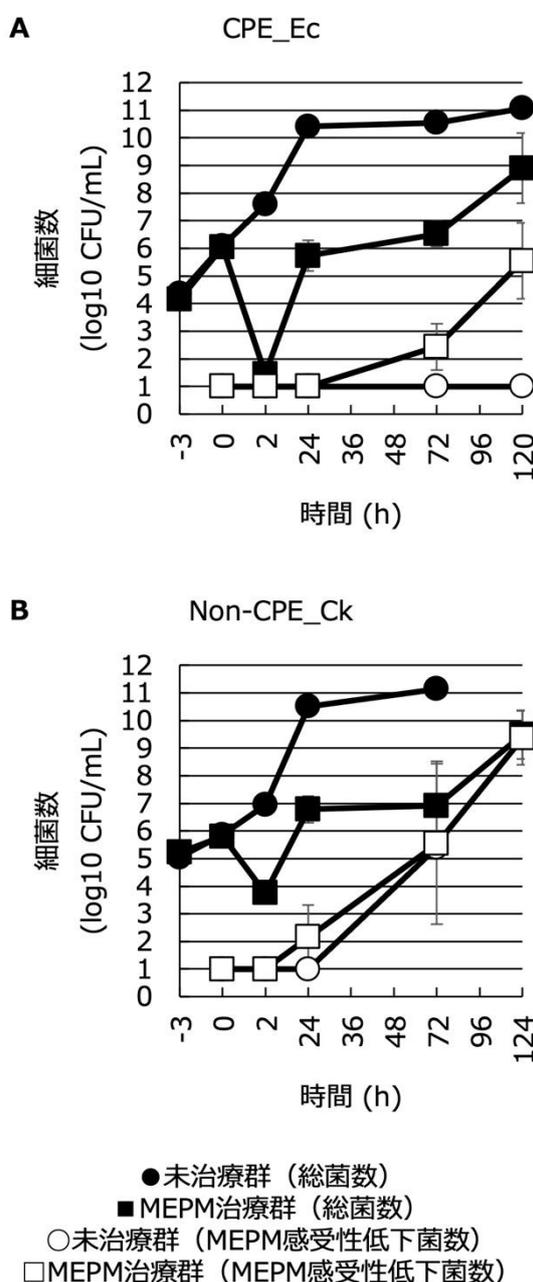
##### (2) MEPM 感性 CPE\_Ec 由来 MEPM 耐性菌の耐性機構

MEPM 感性 CPE\_Ec から出現した MEPM 耐性菌の WGS を実施したところ、プラスミドにおける *bla<sub>CTX-M-2</sub>* を含む 27,504bp の欠失が確認された (図 2)。加えて、IMP-6 のリプレッサーをコードする *ardK* 遺伝子が切断され不完全な ORF となっていた。dPCR で *bla<sub>IMP-6</sub>* 搭載 IncN プラスミドのコピー数を解析したところ、親株と比較して MEPM 耐性菌におけるコピー数は 4.18 倍であった。RT-qPCR で *bla<sub>IMP-6</sub>* の転写量を解析したところ、MEPM 耐性菌における転写量は 4.21 倍であった。これらの結果から、*bla<sub>IMP-6</sub>* 搭載プラスミドコピー数の増加に伴った、IMP-6 の過剰産生による MEPM の分解が、MEPM 感性 CPE\_Ec の MEPM 耐性機構であると推察された。

##### (3) MEPM 感性 Non-CPE\_Ck 由来 MEPM 耐性菌の耐性機構

MEPM 感性 Non-CPE\_Ck から出現した MEPM 耐性菌の WGS を実施したところ、染色体における *bla<sub>CTX-M-2</sub>* を含む遺伝子領域の三重複が確認された (図 3)。加えて、透過孔をコードする *ompC* 遺伝子を含む 49,316bp の欠失が確認された。

図 1 : MEPM 感性 CPE\_Ec および Non-CPE\_Ck 由来 MEPM 耐性菌の出現



これらの結果から、CTX-M-2 の過剰産生による MEPM の作用点（ペニシリン結合タンパク質）への競合と *OmpC* の欠失による MEPM の流入量の減少が、MEPM 感性 Non-CPE\_Ck の MEPM 耐性機構であると推察された。

以上、HFIM を用いた MEPM の BP 検証試験と MEPM 耐性株の耐性機構の解析より、MEPM の BP を再考する必要があると考えられた。併用投与を含めた既存抗菌薬の用法用量の最適化と新規抗菌薬開発の推進が求められる。

図2：MEPM感性CPE\_Ec由来MEPM耐性菌の耐性機構

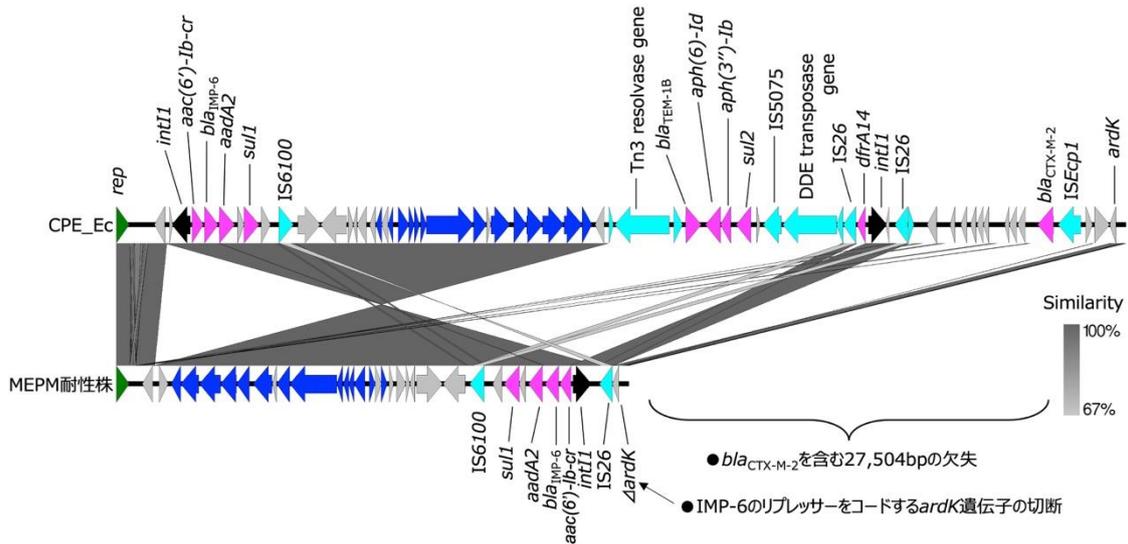
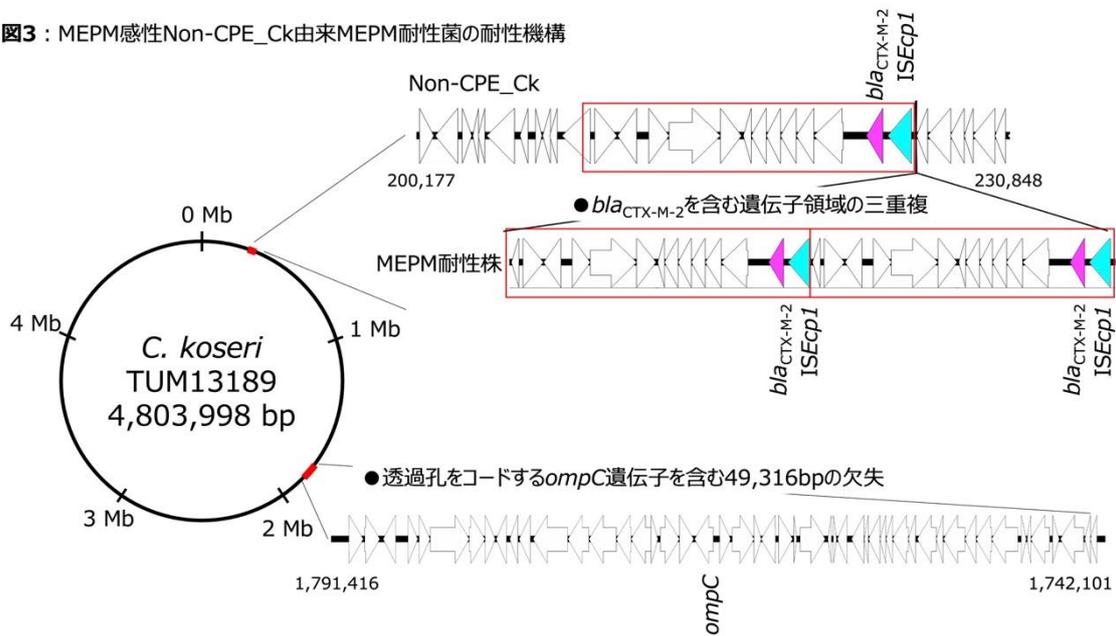


図3：MEPM感性Non-CPE\_Ck由来MEPM耐性菌の耐性機構



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田将風
2. 発表標題 ヒトPKを忠実に再現する東邦大学版HFIMの新薬開発に向けた活用方法
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田 将風、石井 良和、舘田 一博
2. 発表標題 新規抗菌薬の開発を促進するHollow-Fiber Infection Modelの構築と標準化
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田将風
2. 発表標題 フォローファイバーモデル：耐性・バイオフィルム・抗菌薬効果を繋ぐ新技術
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田将風、伊藤健吾、小野寺丈、板橋孝壽、石井良和、舘田一博
2. 発表標題 再現性および汎用性の高いHollow Fiber Infection Modelの構築と標準化に向けた検討
3. 学会等名 第93 回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	舘田 一博  (TATEDA Kazuhiro)  (20236558)	東邦大学・医学部・教授   (32661)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	濱田 将風  (HAMADA Masakaze)  (50758787)	東邦大学・医学部・博士研究員   (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------