

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16439

研究課題名（和文）菌血症患者の血液中物質を用いた抗菌薬の薬剤選択法及び早期効果判定法確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for selecting antimicrobial agents and determining their early efficacy using blood substances from patients with bacteremia.

研究代表者

八島 秀明 (Yashima, Hideaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60773512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、緑膿菌に抗菌薬を曝露した際に変化するタンパク質を複数検出した。特に抗菌薬の感受性の違いによって発現量の変化率が10倍以上もしくは1/10以下と大きく異なるタンパク質は16種類検出され、これらのタンパク質は有力な効果判定のマーカー候補と考えられた。今後はこれらのマーカー候補タンパク質が、別の緑膿菌株における薬剤感受性との相関関係および血液中での検出感度を検討することで、緑膿菌に対する抗菌薬の効果判定を可能とするマーカーの確立が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では緑膿菌の抗菌薬に対する効果判定を可能とするマーカー候補を検出することができたが、このマーカーが患者の血液検体から検出可能なマーカーとして使用できるようになった場合、病院内で高頻度かつ耐性化が問題となっている緑膿菌による感染症の抗菌薬治療の迅速な効果判定が可能となると考えられる。それにより感染初期に多剤耐性菌を発見でき、適切な薬剤選択が可能となることから治療成績の向上が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I detected several proteins altered when *Pseudomonas aeruginosa* was exposed to antimicrobial agents. In particular, 16 proteins whose expression rates differed significantly by more than 10-fold or less than 1/10 depending on the antimicrobial susceptibility were considered to be promising marker candidates for determining efficacy. In the future, I will examine the correlation of these candidate marker proteins with drug susceptibility in different *P. aeruginosa* strains and their detection sensitivity in the blood, and I expect to establish markers that will enable us to determine the efficacy of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*.

研究分野：医療薬学

キーワード：抗菌薬 緑膿菌 迅速検査 効果判定 プロテオーム解析 メロペネム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性化が進むことで2050年には世界で1000万人の死亡が想定されたとした報告がある。これまでに薬剤耐性が拡大している原因の1つとして、抗菌薬の不適切な使用が挙げられているが、それは現在の感染症治療における薬剤投与開始後の臨床効果の評価の難しさに起因していると考えられる。細菌感染症の治療では原因菌が特定されていない状況において、抗菌薬の投与が遅れると患者の生存率が下がるため、臨床効果を得る可能性を高めるため、多くの菌種に対して抗菌力を有する広域スペクトルの抗菌薬を用いたエンピリック治療が行われる。臨床現場では治療ガイドラインで推奨されているエビデンスレベルの高いエンピリック治療を行うことが重要視されており、その結果として治療を成功させる確率は高くなり、多くの患者の命が救われている。一方で、エンピリック治療に用いられた薬剤の耐性菌が起因菌である場合、エンピリック治療として用いられる広域スペクトラムの抗菌薬に対しても耐性を示し、治療不良となる症例が増加してきている。さらに、抗菌スペクトルが広いため、カルバペネム系やニューキノロン系の薬剤がエンピリック治療に用いられることが多いが、これらを高い頻度で使用することが緑膿菌などの薬剤耐性化につながるというジレンマも存在する。感染症の原因である菌の耐性が日々悪化し、施設間にも差がある現状では、従来の戦略では不適切な抗菌薬治療が行われる患者が一定数は存在することが感染症治療の根幹に存在している。そこで私は患者個々が罹患している感染症ひとつひとつに対して適切な治療設計を行うことが、患者への治療の有効性向上および耐性菌対策につながると考えている。また、臨床現場ではエンピリック治療を開始した後は臨床効果の評価を行い、より患者に適切な薬剤の選択が行われている。多くの施設では感染症患者の血液などを細菌培養し、菌種の同定および感受性試験の結果を用いるが、検査結果が得られるまでには通常2~3日を要し、増殖しにくい菌種の場合はさらに長期間を要することが知られている。その他にも患者の血液中の白血球数やCRP、プロカルシトニンなどの炎症マーカーの変動を数日間観察し、間接的に臨床効果を判定することも並行して行われるが培養法と同じく数日を要し、一刻を争うような重症感染症においても抗菌薬選択に一定の時間がかかってしまうことが臨床上問題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は抗菌薬投与後早期に臨床効果に予測・評価可能なマーカーの探索、およびそれらのマーカーを組み合わせた臨床効果判定法の確立である。

抗菌薬の薬効を規定する因子としては薬力学的因子と薬物動態学的因子の二つが挙げられ、薬力学的因子は抗菌薬のスペクトラムであり、可能な限り狭いスペクトラムでかつ原因菌をカバーしているものを選択することが理想の治療とされている。細菌が殺滅されるとともに存在量が変化する細菌由来のマーカーを見出すことができれば、抗菌薬の薬力学的因子を早期に評価することが可能となると考えている。一方、薬物動態学的因子としては感染臓器への薬剤の移行が重要であり、一部の薬剤については代替指標として血中薬物濃度で評価されている。

近年、質量分析計や新規遺伝子解析技術の開発・発展により細菌培養に依存しない菌由来の分子の解析法が注目されているが、これらの技術を用いて抗菌薬の効果判定を試みる報告が散見されている。しかし、これらの研究は感染症の診断および重症化に関連する因子の探索を行うものがほとんどであり、抗菌薬の臨床評価を評価した報告はない。そこで私は感染症治療に重要な薬力学的因子と薬物動態学的因子を統合的に評価することで抗菌薬の臨床効果を精度高く予測・評価できると考え、本課題を設定した。最終的な目的は血液内で細菌感染が起こっている菌血症患者の血液検体の細菌由来のタンパク質マーカーと、投与された抗菌薬の血中薬物濃度を組み合わせる従来法よりも精度よく臨床効果を評価できる方法の構築である。そのための基礎的検討として抗菌薬の血中濃度測定法の作成および細菌由来のタンパク質マーカーの探索を実施した。

3. 研究の方法

臨床で原因菌として頻度高く分離され、耐性化が問題となっている緑膿菌を対象に、感受性が異なる菌種へ抗菌薬の曝露を行い、曝露前後のサンプル中のタンパク質を高速液体クロマトグラフ タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)にて分析し、プロテオミクス的手法にて探索的に解析を行った。検討には抗菌薬の感受性が良好なPAO-1株および群馬大学にて分離されたMDRPである208株の2菌種を使用した。液体培地にて一晚培養増殖した菌液を10倍希釈し、1時間プレインキュベート後に、ブランクもしくはメロペネムを終濃度16 μ g/mLとなるように加え、2時間インキュベートした。インキュベート後に菌液40mLを1,300 \times g、5分間遠心分離を行った。得られた細菌のペレットから細胞質タンパク質を抽出し、トリプシン消化にてペプチド断片とした後、界面活性剤の除去を行った。プロテオーム解析としては、Eksigent Nano LC 425およびTriple TOF 6600(AB Sciex)で構成されたLC-MS/MSにて分析を行った。すべてのサンプルを等量混合したライブラリーサンプルをDDA(Data Independent Acquisition)法により測定後にSWATH(Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra mass spectrometry)分析を実施した。False discovery rateは1%未満と設定した。

4. 研究成果

プロテオーム解析の結果、SWATH 解析の結果、19,933 個のペプチドが検出され、2,029 個のタンパク質が同定された。抗菌薬感受性のある PAO-1 株にメロペネム曝露を行うことでタンパク発現量が 10 倍となったタンパク質は Beta-lactamase(P24735)、Large ribosomal subunit protein uL24 (Q9HWE6)、Inner membrane protein CreD(Q9I653)の 3 種類であった (()内は UniProt code)。また、タンパク発現量が 1/10 以下となったタンパク質は Precorrin-3 methylase CobJ(Q9HZU4)、Transcriptional regulator Dnr(G3XCW6)、Cytochrome c domain-containing protein(Q9I101)、Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G(Q9HT10)、DUF1161 domain-containing protein(Q9I793)、D-erythrose 4-phosphate dehydrogenase(Q9I5Y5)、UPF0033 domain-containing protein(Q9HXZ8)、High-affinity zinc uptake system protein ZnuA(Q9HT75)、Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LoID (Q9HZL7)、Probable magnesium chelatase(Q9HZQ5)の 10 種類であった。一方、MDRP 株ではメロペネム曝露を行うことでタンパク発現量が 10 倍となったタンパク質はなく、1/10 以下となったタンパク質は UPF0434 protein PA2980(Q9HZM4)、Iron-sulfur cluster(Q9HXI9)、DUF805 domain-(Q9I5R2)、Sulfur carrier protein TusA(Q9I3F3)、Acyl carrier protein 1(O54439) の 5 種類であった。上記のタンパク質はメロペネムを曝露された条件で発現量が変化したと解釈でき、大幅に増加もしくは減少した上記のタンパク質は検討に用いた菌種において抗菌薬曝露時の効果判定に使用できる可能性が高い。さらに、効果判定の精度を高いものにするために、感受性株と耐性株でのタンパク質発現の差が大きいものが望ましいと考え、それぞれのタンパク質発現の変化率を比較した際に、10 倍もしくは 1/10 となったタンパク質に着目した (表)。緑膿菌の効果判定法に使用するマーカーとしては、感受性株と耐性株において差が大きいほど判定精度を高くできると考えられるため、特に差が大きかったの Precorrin-3 methylase CobJ、UPF0434 protein PA2980、Beta-lactamase (ampC) の 3 つは有力な候補分子と言える。Precorrin-3 methylase CobJ はコバラミンの生合成に関わる分子であり、PAO-1 株ではメロペネム曝露後にタンパク量が 1/50 程度に減少していたが MDRP ではメロペネム曝露後に 2 倍以上に増加していた。UPF0434 protein PA2980 は機能が明らかになっていない分子であり、PAO-1 株ではメロペネム曝露にて変化がなかったが、MDRP 株では発現量が 1/100 に減少していた。Beta-lactamase はベータラクタム系を分解する酵素であり、薬剤耐性の原因となる分子として知られている。本検討では PAO-1 株においてメロペネム曝露により 50 倍程度の量に増加しており、MDRP ではほとんど変化していない。PAO-1 株が作成するベータラクタマーゼではメロペネムは分解しないと考えられるが、防御反応として大量に合成されていたことが推察される。過去の報告ではカルバペネムを分解する特殊なベータラクタマーゼの検出が耐性菌の存在を示すとの報告があるが、感受性株についてもマーカーとして使用できる可能性が示唆された。これらのタンパク質から各タンパク質の緑膿菌株の間での共通性や物質の安定性、既に存在する測定感度などを加味して Precorrin-3 methylase CobJ および Beta-lactamase を中心に検討を続けていき、菌種を増やして精度の確認及び血液中での感度や特異度を検討しマーカーを決定していく。さらに、決定したマーカーおよび薬剤の血中濃度を組み合わせた効果判定法の検討を行い次第論文等で報告する。

表 PAO-1 株および MDRP 株におけるメロペネム曝露によるタンパク質発現量の変化率の比較

UniProt code	Protein Name	Ratio of expression level (no exposure MEPM / exposure MEPM)		Ratio of MDRP/PAO-1
		PAO-1	MDRP (208)	
Q9HZU4	Precorrin-3 methylase CobJ	52.57	0.389	0.007
G3XCW6	Transcriptional regulator Dnr	18.76	1.017	0.054
Q9HU92	N-formylglutamate deformylase	2.189	0.136	0.062
P57714	Homoserine O-succinyltransferase	9.940	0.624	0.063
Q9HT10	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	17.08	1.111	0.065
Q9HZL7	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LoID	10.06	0.896	0.089
Q9I5Y5	D-erythrose 4-phosphate dehydrogenase	10.74	1.009	0.094
Q9I6H1	Calcium-regulated OB-fold protein CarO	6.901	0.669	0.097
Q9I3Y7	YbaK/aminoacyl-tRNA synthetase-associated domain-containing protein	9.604	0.958	0.100
...	...	-	-	-
Q9I653	Inner membrane protein CreD	0.084	0.853	10.17
Q9HXI9	Iron-sulfur cluster	2.132	22.18	10.40
Q9HWE6	Large ribosomal subunit protein uL24	0.074	1.030	13.84
Q9I5R2	DUF805 domain-containing protein	1.059	20.49	19.35
Q9HZM4	UPF0434 protein PA2980	1.793	101.8	56.80
P24735	Beta-lactamase	0.019	1.113	58.99

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------