

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：37116
 研究種目：基盤研究(C)（一般）
 研究期間：2021～2023
 課題番号：21K09241
 研究課題名（和文）MRSA骨軟部感染症に対する持続局所抗菌薬灌流療法の最適化のための微生物学的検証

研究課題名（英文）Microbiological validation for optimization of sustained local antibiotic perfusion therapy for MRSA bone and soft tissue infections

研究代表者
 善家 雄吉（Zenke, Yukichi）
 産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80615930
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：<目的> MRSA臨床分離株に対するGMのMBECを測定し、AMG系耐性遺伝子やMICとの関連を調べた。

<方法> 当院で分離されたMRSA計104株を使用した。PCR法で1.aac(6')-aph(2"), 2.ant(4'), 3.aph(3')-IIIの有無を調べた。

<結果> MRSA臨床分離株104株の耐性遺伝子の保有率は、1が65.4%、2が14.4%、3が0%であった。68株がGMに耐性を示した。MBECは67株が 512Mmlを示した。MBEC 512Mg/mlであることは1の保有とGM耐性と有意に関連した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRSA臨床分離株のBFの撲滅にはMICより高濃度のGMを要することが確認された。骨軟部組織感染症に対して高濃度GMを用いた持続局所抗菌薬灌流療法が検証されているが、今回有効なGM濃度について基礎的データを取得できた。本結果から病巣から分離されたMRSAの耐性遺伝子やMICを調べることで、BFの薬剤感受性を予測できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：<Objective> Antimicrobial treatment of biofilms (BFs) requires a minimum BF eradication concentration (MBEC) that is higher than the minimum inhibitory concentration (MIC). In this study, we measured MBEC of gentamicin (GM) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and examined its relationship with aminoglycoside resistance genes and MIC.

<Methods> A total of 104 MRSA strains isolated at our hospital in 2020 were used. The presence of aac(6')-aph(2"), ant(4'), and aph(3')-III was determined by PCR.

<Results> Of 104 clinical isolates of MRSA, 65.4% were resistant to aac(6')-aph(2"), 14.4% to ant(4'), and 0% to aph(3')-III. 68 isolates (65.4%) were resistant to GM (aac(6')-aph(2"), ant(4'), and aph(3')-III). MBEC; 512Mml was found in 67 (65.0%) of the isolates. MBEC 512Mg/ml was consistent with the results for aac(6')-aph(2") ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) and GM resistance (MIC; 16Mg/ml) ($p < 2.2 \times 10^{-16}$).

研究分野：整形外科

キーワード：バイオフィルム 耐性菌 MRSA 最小バイオフィルム撲滅濃度 最小発育阻止濃度 アミノグリコシド系耐性遺伝子 骨軟部感染症 持続局所抗菌薬灌流

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。

MRSA 骨軟部感染症に対する持続局所抗菌薬灌流療法の最適化のための微生物学的検証

Microbiological validation for optimization of sustained local antibiotic perfusion therapy for MRSA bone and soft tissue infections

1. 研究開始当初の背景

骨軟部感染症領域において抗菌薬を局所に持続的に注入して灌流させる Continuous Local Antibiotics Perfusion (CLAP) は、開放骨折における感染率の低下、骨接合後の感染やインプラント周囲感染の沈静に非常に良好な臨床成績を報告している。濃度依存性のアミノグリコシド (AMG) 系抗菌薬の一つであるゲンタマイシン (GM) を病巣局所に高濃度で用いることにより、従来の全身投与と比べて安全性が高く、かつ強力な殺菌効果を期待することができる。起炎菌の中で最も問題となるのはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) であるが、これまでのところ MRSA に対しても臨床現場では感染が制圧できている。しかし MRSA は様々な薬剤耐性機構を併せ持つことがあり、とくに AMG 耐性遺伝子を持つ MRSA に対して、現在の GM の投与量が適正であるかの検証は行われていない。そこで本研究の目的は、臨床で分離された MRSA について、1. AMG 耐性遺伝子を調査すること、2. 増殖やバイオフィルム形成を阻止する GM の最小濃度を調査すること、である。この研究の成果によって、CLAP におけるより有効かつ安全な GM の投与計画に寄与できると思われる。GM の適正使用の結果、全身の副作用や局所の細胞傷害を回避し、耐性菌出現を防止することが期待できる。

骨軟部感染症領域とりわけインプラントを留置した状態における感染は難治性である。その理由として、感染した骨は血流が悪く 経静脈的に投与した抗菌薬はなかなか病巣に移行しない点があげられる。さらに骨感染症の病巣には腐骨やインプラントなどの血流の悪い組織が多く バイオフィルム (BF) が形成されやすい。BF とは、細菌が分泌するマトリックスに囲まれたスライム状の集合体で (左上図) その中で増殖した細菌には抗菌薬が届きにくい。遊離した単一の細菌の増殖を阻止するのに必要な濃度は最小発育阻止濃度 (MIC: minimal inhibitory concentration) とされるが、BF を撲滅するには、MIC の 100~1000 倍の濃度 (minimal biofilm eradication concentration (MBEC) が必要とされている。

一般的にはこの濃度の抗菌薬を経静脈的に投与し局所に移行させることは合併症発生の観点より困難であるため、申請者らは局所に高濃度の抗菌薬を持続的に注入し、感染 巣に灌流させる手技 (CLAP) を開発し実践してきた (左上図)。研究分担者 (予定) の圓尾らは以下の 4 点を改善した。1. 流量を減らすことで一日に使用する抗菌薬の量は増やさずに高濃度の抗菌薬を局所に投与できるようにした。2. 使用する抗菌薬として、濃度を



を上げるほど殺菌効果が高まるゲンタマイシン硫酸塩 (GM) を選択した。3. 血中濃度や局所濃度をモニタリングすることで安全性と有効性を確認しながら投与量を調整できた。4. BF の制圧にも有効な高濃度の抗菌薬を局所に移行することで、インプラントを留置したまま感染の制圧ができるようになった。申請者らはこの新規治療法を Continuous Local Antibiotics Perfusion (CLAP) と命名した。本治療は、開放骨折における感染率の低下、骨接合後の感染や人工関節などインプラント周囲感染に対して良好な臨床成績をあげている。

2. 研究の目的

CLAP において GM を標準治療薬とするためには、骨軟部感染症の多くを占めバイオフィーム(BF)を形成しやすい黄色ブドウ球菌の増殖や BF 形成を阻止する GM の最小濃度を知ることが重要となる。黄色ブドウ球菌のうち MRSA は様々な薬剤耐性機構を併せ持つことがある。なかには、GM を含むアミノグリコシド(AMG)を不活化する修飾酵素(AME)の遺伝子を保有する株もあることが知られており、このような MRSA は GM にも耐性を示すため注意が必要である。CLAP によってこれまでのところ MRSA 感染は制圧できているが、現在の GM の投与量が適正であるかの検証は行われていない。これらをふまえ、本研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、1) MRSA のうち AMG 耐性遺伝子を保有する株は臨床現場でどれ位分離されているのか、2) AMG 耐性遺伝子を保有する MRSA の増殖や BF 形成を阻止する GM の最小濃度はどれ位か、という2点である。

臨床で分離された MRSA について 1. AMG 耐性遺伝子を調査する。2. 菌の増殖やバイオフィーム形成を阻止する GM の最小濃度を調査する。これらの研究結果を踏まえて、CLAP における GM の適正使用量を決定する。投与量を減らすことにより全身的な副作用や局所の細胞傷害性を回避できるだけでなく、耐性菌出現を防止することにも貢献する。

3. 研究の方法

バイオフィームの抗菌薬治療には、最小発育阻止濃度(Minimal inhibitory concentration; MIC)より高い濃度の最小バイオフィーム撲滅濃度(Minimal biofilm eradication concentration; MBEC)が必要とされる。今回、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)臨床分離株に対するゲンタマイシン(GM)の MBEC を測定し、アミノグリコシド系耐性遺伝子や MIC との関連を調べた。

産業医科大学病院で 2020 年 1 月～12 月に分離された MRSA 計 104 株を使用した。PCR 法で aac(6')-aph(2'')、ant(4')、aph(3')-III の有無を調べた。MIC は微量液体希釈法で決定した。バイオフィームは peg lid を用いて作成し、段階希釈した GM に 24 時間暴露後、生菌が認められない最小濃度を MBEC とした。各変数の関連について、Fisher's exact test で検定した。

4. 研究成果

MRSA 臨床分離株 104 株の耐性遺伝子の保有率は、aac(6')-aph(2'')が 65.4%(68/104 株)、ant(4')が 14.4%(15/104 株)、aph(3')-III が 0%(0/104 株)であった。68 株(65.4%)が GM に耐性(MIC 16 µg/ml)を示した。MBEC は 67 株(65.0%)が 512 µg/ml を示した。MBEC 512 µg/ml であることは aac(6')-aph(2'')の保有($p < 2.2 \times 10^{-16}$)、ゲンタマイシン耐性(MIC 16 µg/ml) ($p < 2.2 \times 10^{-16}$)と有意に関連した。

MRSA 臨床分離株のバイオフィームの撲滅には MIC より高濃度の GM を要することが確認された。骨軟部組織感染症に対して高濃度 GM を用いた持続局所抗菌薬灌流療法が検証されているが、今回有効な GM 濃度について基礎的データを取得できた。本結果から、病巣から分離された MRSA の耐性遺伝子や MIC を調べることで、バイオフィームの薬剤感受性を予測できることが示唆された。単施設で 1 年間に分離された MRSA に対する GM の MBEC の分布を明らかにした。検討した株において MBEC 512 µg/ml であることは、aac(6')-aph(2'')の保有、MIC 16 µg/ml と有意な関連を示した。

< 本研究の学術的意義 >

本研究と同様の手法を用いた骨軟部組織感染症治療の報告例は国内・国外ともに存在しないため、世界初の非常に画期的な方法であると言える。臨床経験から得られた経験やデータをもとに、本研究で得られた知見をもとに、より安全かつ有効な薬剤投与計画を策定することが可能となる。この研究成果をふまえたうえで持続局所抗菌薬灌流療法を実践することは、2015年11月に厚生労働省が設置した「薬剤耐性（AMR）タスクフォース」による対策アクションプランの指針にも準拠している適正かつ安全な抗菌薬の投与計画に寄与することができると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤恒平 善家雄吉 宮原敏
2. 発表標題 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床分離株に対するゲンタマイシンの最小バイオフィルム撲滅濃度と耐性遺伝子との関連
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Ando, Yukichi Zenke, Satoshi Miyahara, Mitsumasa Saito
2. 発表標題 Effective Biofilm Eradication in MRSA Strains with Gentamicin Resistance Genes Using High-Concentration and Prolonged Gentamicin Treatment
3. 学会等名 44th Annual meeting of the European Bone and Joint Infection Society
4. 発表年 2023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	安藤 恒平 (Ando Kohei) (80899518)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	
研究分担者	宮原 敏 (Miyahara Satoshi) (50878329)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	

6. 研究組織（つづき）

	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	齋藤 光正 (Saito Mitsumasa) (00315087)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	
研究分担者	濱田 大志 (Hamada Daishi) (20899306)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	
研究分担者	石川 成人 (Ishikawa Shigeto) (50848314)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	2022年削除
研究分担者	佐藤 直人 (Sato Naohiro) (20912968)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	2022年追加
研究分担者	眞田 彩華 (Sanada Ayaka) (10887045)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	2022年削除
研究分担者	酒井 昭典 (Sakai Akinori) (90248576)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	
研究分担者	真弓 俊彦 (Mayumi Toshihiko) (90281071)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	2022年削除

6. 研究組織（つづき）

	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	圓尾 明弘 (Maruo Akihiro)		

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