

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591114

研究課題名（和文）細菌感染症の抗菌化学療法に対する宿主細胞の影響の解析

研究課題名（英文）An analysis of the effects of the host cell on antibacterial chemotherapy

研究代表者

竹村 弘 (HIROMU TAKEMURA)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80301597

研究成果の概要（和文）：

ヒトの肺上皮細胞、単球/マクロファージなどの培養細胞が抗菌薬の活性に及ぼす影響を検討し、細胞を無血清培地で培養した場合、その培養上清がカルバペネム系抗菌薬の抗菌活性を著しく低下させる（失活させる）ことを明らかにした。

また、寒天平板と薬剤ディスクを用いて多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果を簡便に検討できる方法を確認した。Etest 法、チェッカーボード法などの既存の方法と比べて、臨床分離菌に対する評価を行った。

研究成果の概要（英文）：

We observed the influence of the host cells, human alveolar epithelial cells, monocytes and macrophages, on the antimicrobial activities of several antibiotics and we found antimicrobial activities of carbapenems (Cps) were decreased in the supernatant of the cells cultured with fetal calf serum (FCS)-free RPMI 1640 medium. The farther studies revealed human cell culture supernatants to decline the antibacterial activities of Cps.

We developed a useful screening test for the combination of piperacillin and aminoglycosides for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) using the disk diffusion based method. We presented the usefulness of this method compared with the Etest based method and the checkerboard method.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2012 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症治療学、臨床微生物学

## 1. 研究開始当初の背景

1940年代にペニシリンが臨床の場に登場して以来、さまざまな抗菌薬が開発され、感染症に対する治療は飛躍的に進歩した。しかし、現実には多剤耐性菌の増加、高齢者を含むコンプロマイズドホストや AIDS 患者における難治性の日和見感染症、新規に発見された微生物による感染症や再び増加している感染症（いわゆる新興・再興感染症）など未解決の問題も多く残されている。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）や多剤耐性緑膿菌（MDRP）などの薬剤耐性菌による感染症は、様々な疾患の予後に直接的に影響を及ぼす大きな問題であると言える。MDRP の中には従来の薬剤感受性試験で評価する限り、現在わが国で使用可能な殆ど全ての抗菌薬に対して耐性を示す菌株も少なくない。このような難治性感染症への対策を考えるにあたり、感染症の基本である host（宿主）、parasite（病原微生物）、antimicrobial agent（抗菌薬）の三要因を総合的に、現代医学に立脚して再考する必要がある。

このような見地から研究代表者は、抗菌薬の細胞内移行および *Legionella* 属、*Chlamydia* (*Chlamydophila*) 属などの細胞内増殖性細菌に対する増殖抑制効果に関する研究を行っており、国内外の学会および誌上で報告してきた。しかし、細胞内増殖性細菌以外の一般細菌についても、細胞内での増殖やそれを考慮した治療法の評価が、ここ数年特に注目を集めている。例えば、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA) については好中球や肺胞マクロファージでの細胞内への取り込み（貪食）や細胞内での生存・増殖に関する研究が散見される。また緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) については角膜上皮細胞や気管支上皮細胞に侵入・増殖する感染実験モデルが報告されている。また最近、小児・成人の市中肺炎・気管支炎の主要な原因菌であるインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) が、気管支上皮細胞に侵入し細胞障害を来すこと、本菌の薬剤耐性株である BLNAR ( $\beta$  ラクターマーゼ非産生アンピシリン耐性株) が特に侵入率が高いことなどが報告されている。

以上から、本分野の研究は国際的にも注目を集めていると言える。一方、細胞と病原細菌という観点でその病態を反映させた試験

管内感染実験モデルは、まだ適切なものが確立されていない。倫理上、安全上の問題から動物を用いた感染実験や人間の生体における臨床治験が難しいことから、より生体内の環境に近い in vitro の評価系をめざす本研究は、非常に意義深いものであると思われる。

## 2. 研究の目的

ヒト由来の好中球、単球/マクロファージ、気道上皮細胞などの培養細胞を用いて、簡便で再現性が高い試験管内感染実験モデルを作製し、これを用いて現在問題になっている薬剤耐性菌を中心に様々な細菌の増殖性や抗菌薬の効果（抗菌薬耐性）を検討する。特に抗菌薬の細菌活性に対して、宿主細胞の存在がどのような影響を与えるかを明らかにすることをめざす。さらに MDRP などの多剤耐性菌に対する有効な併用療法を、一般の検査室で簡便に評価できる検査法の開発を行う。これらの実験は、より現実の病態に近い状態を再現でき、得られる結果は、臨床の場に直接有益な情報を提供するものになると思われる。

## 3. 研究の方法

### (1) 宿主細胞を用いた感染実験モデルの確立

ヒト単球/マクロファージ様細胞株 THP-1 細胞を用い、細胞内/外での細菌の増殖を、①グラム染色、アクリジンオレンジ(AO) 染色（蛍光顕微鏡）などを用いた顕微鏡的観察、②寒天培地で培養し形成したコロニーの計数を用いて評価する。1×10<sup>6</sup> /mL の THP-1 細胞浮遊液 (RPMI1640+10%FCS : 以後 RPMI1640 は RPMI) 6mL に対し 1×10<sup>5</sup> CFU/mL になるように *S. aureus* の菌液を加える (MOI 0.1)。3500rpm×10 分 遠心し、そのまま 37°C、CO<sub>2</sub> 5% で 2 時間静置培養後、ミキサーで攪拌して、1000rpm×5 分 遠心し上清を吸引する。RPMI+1%FCS6mL+アルベカシン (ABK) 200  $\gamma$  の培養液に再懸濁し、37°C、CO<sub>2</sub> 5% で 3 時間静置培養（抗菌薬で細胞外に浮遊した菌を殺菌し取り除くため）。ミキサーで攪拌して 1000rpm×5 分 遠心し上清を吸引、倍量の無血清 RPMI に再懸濁する過程を 2 回繰り返して洗浄し、最終的に 6mL の無血清 RPMI で *S. aureus* が付着または侵入した細胞の浮遊液を作成する（この時点での生菌数をコロニーカウント法で確認する）。あらかじめ 96 穴

レートに 1/2 希釈列で抗菌薬を入れておき、その上に上述の細胞浮遊液を加え、総量 100 $\mu$ L/well の無血清 RPMI 中で 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 5% で 24 時間静置培養しする。結果の判定は通常の MIC 測定と同様の方法で、目視で発育した菌塊の沈渣の有無を判定することで cell associated MIC (CAMIC) を求めた。さらに各 well から培養液を 5 $\mu$ L ずつ採取して MH 寒天培地に接種、18-24 時間、37 $^{\circ}$ C で培養しコロニーが 10/spot になる濃度を CAMBC として評価した。

## (2) 各種培養細胞のカルバペネム不活化活性 (CIE) の検討

(1) で示した方法で黄色ブドウ球菌に対する各種抗菌薬の抗菌活性を評価していたところ、カルバペネム系抗菌薬では細胞が無い場合に比べ極端に抗菌効果が弱まることが判った (図 2、Exp1)。この培養細胞のカルバペネム不活化活性 (CIE) について、以下に基本的な検討方法を示す。24 穴のマイクロプレートで、37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 5%、RPMI+10%FCS 中で 18 時間培養した培養細胞の培養上清を、RPMI (無血清) に置換する。さらに RPMI 中で 5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C で 0.5~3 時間前培養し、回収した培養上清を希釈し IPM などのカルバペネム薬を 32mg/L 添加する。15 分~4 時間別の試験管中で培養、この培養液中の IPM の抗菌活性を Bioassay 法で測定する。この方法を基にして、以下の実験を行った。

- ① CIE に対する前培養時間 (図 3、Exp2)、培養時間、培養上清の濃度の影響 (図 4、Exp3)
- ② CIE に対する培養液中の血清濃度の影響 (図 5、Exp4)
- ③ 培養液による CIE の違い、特にアミノ酸の影響 (図 6、Exp5)
- ④ メロペネム (MEM)、ピアペネム (BPM) に対する CIE (図 7、Exp6)

## (3) MDRP に対する抗菌薬併用効果の簡便な評価系の開発

MDRP は、菌によっては現在我が国で使用可能な抗菌薬の殆ど全てについて耐性を示すことがあり、その感染症例の治療では何らかの併用療法が必要な場合が多い。ピペラシリン (PIPC) やタゾバクタム/ピペラシリン (TAZ/PIPC) は、MBL 産生菌を含む MDRP に対して耐性であっても、他の  $\beta$ ラクタム薬と比

べて低めの MIC を示す。また緑膿菌に対してアミノグリコシド薬 (AGs) と協調作用を示すことが知られている。本研究では MDRP に対して PIPC と 3 種の AGs との協調作用を簡便に検討できる評価系を考案し、従来の方法と比較した。使用菌株は臨床分離された MDRP で PIPC の MIC が >128 mg/L の株 (MBL 産生菌: 16 株、MBL 非産生菌: 1 株) を用いた。AGs はアミカシン (AMK)、ゲンタマイシン (GM)、トブラマイシン (TOB) を用いた。各薬剤の MIC の測定は CLSI の微量液体希釈法を用いた。PIPC と 3 種の AGs との協調作用の簡便な評価法としては、以下の様な手順で行った。すなわち PIPC を 32 mg/L または 64 mg/L の濃度で添加した MH 寒天培地を用いて、通常と同様の方法で Etest 法またはディスク法による薬剤感受性検査を行った。Etest 法ではストリップと阻止帯が交差する点の目盛りを読んで MIC を計測し、ディスク法では阻止円の直径を計測し、S (感性)、I (中間)、R (耐性) の判定を行った。対照として、PIPC と AGs の相互作用を従来のチェッカーボード法で検査し、①FIC index と②PIPC を 32 mg/L または 64 mg/L 添加時の AGs の MIC を算出し、上述の方法による検査結果と比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 宿主細胞を用いた感染実験モデルの確立

様々な細菌と細胞の感染率、培養条件、培地組成を繰り返し検討し、試行錯誤した結果、① *S. aureus* は RPMI の中で MH などの細菌培養用の培地と同程度に発育する、②  $1 \times 10^5$ /well の THP-1 を実験系に加えても MIC の判定に影響するほどの大きさの沈渣はできないことなどが判り、研究方法で示した方法で 96 穴プレートを用いて細胞を伴った細菌に対する抗菌活性を、CAMIC、CAMBC として評価することができた (図 1)。

この結果、全般に CAMIC/CAMBC は無細胞の MIC/MBC に比べ、高い値を示し、特に PIPC、IPM で顕著であることが判った (他系の抗菌薬の 2~8 倍程度であるのに対し PIPC、IPM では数百倍高い)。この現象の原因を究明する目的で、THP-1 細胞を RPMI 中で培養した培養上清を回収し、この無細胞の培養上清にそれぞれの抗菌薬を添加して活性の変化を経時的に検討したところ、IPM では著しく活性が低下した (PIPC では活性の低下は観られなかった)。

以後本研究では、この現象を解明することを主題の一つとして実験を行うこととした。

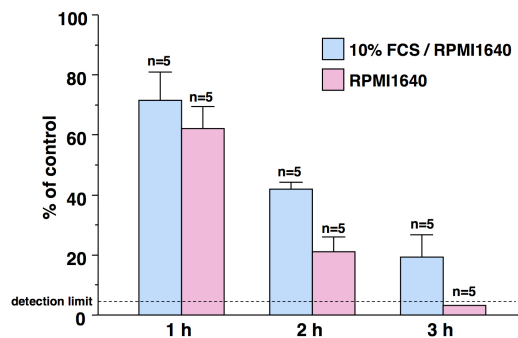
図1. THP-1/S. aureus共培養モデルによる抗菌薬のCAMIC/CAMBC

| 抗菌薬  | 無細胞RPMI |      | THP-1共培養モデル |       |
|------|---------|------|-------------|-------|
|      | MIC     | MBC  | CAMIC       | CAMBC |
| PIPC | 2       | 2    | 256         | >256  |
| VCM  | 0.5     | 1    | 4           | 16    |
| GM   | 0.25    | 0.25 | 0.5         | 0.5   |
| MINO | 0.063   | 0.5  | 0.5         | 1     |
| EM   | 0.032   | 0.25 | 0.5         | 1     |
| CPFX | 0.125   | 0.25 | 0.25        | 16    |
| CAZ  | 4       | 8    | 8           | 64    |
| IPM  | 0.5     | 2    | >256        | >256  |

(2) 各種培養細胞のカルバペネム不活化活性 (CIE) の検討

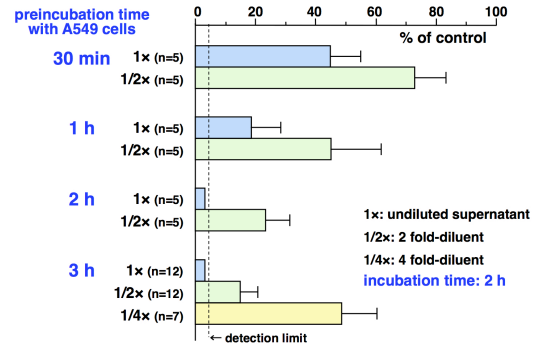
(1)で示したように、カルバペネム系抗菌薬である IPM では、細胞存在下では極端に抗菌効果が弱まることが判った。その後様々なヒト培養細胞においても同様の現象が起こることが判ったが、ヒト肺胞上皮細胞である A549 細胞で特に強く見られることが判り、さらにこの活性は細胞培養時間に依存して強くなり、無血清の RPMI で培養すると特に強いことが判った (図 2、Exp1)。

図2. A549細胞培養上清中におけるIPMの抗菌活性の低下 (Exp. 1)



この現象の原因をさらに追及し、細胞の培養上清を回収した後、別の試験管中でカルバペネム薬を添加しても同様の現象が起こることを見いだした(図 3、Exp2)。そこで主に A549 を用いて、代表的なカルバペネム薬である IPM を中心に、宿主細胞のカルバペネム薬不活化活性 (carbapenems inactivating effect: CIE) について検討した。RPMI + 10%FCS で 18 時間培養した A549 細胞の培養上清を新しい RPMI に置換し、経時的に培養上清を採取し、IPM と 2 時間反応させた場合の CIE を検討した(図 3、Exp2)。30 分培養した A549 の培養上清は IPM の活性をおよそ半減させ、2 時間培養後の上清は検出限界 (0.5 mg/L) 以下まで活性を低下させた。

図3. A549細胞上清のCIEに対する前培養時間の影響 (Exp. 2)



希釈した培養上清でも濃度依存的に同様の結果を認め、3 時間培養後の上清の 1/2 希釈液は 15.0 ± 5.8 % (n=12) まで IPM の活性を低下させた(図 3、Exp2)。以後主に培養細胞と 3 時間培養した上清を用いて実験することにしたが、この A549 細胞上清は、濃度依存的、時間依存的に IPM を失活させること (図 4、Exp3)、血清を添加すると血清の濃度依存的に活性が弱まること (図 5、Exp4)、培地中にアミノ酸が無いと上清の CIE は完全に消失すること (図 6、Exp5) などが判った。さらに IPM 以外のカルバペネム薬である MEM、BPM についても A549 細胞上清の CIE を検討したところ、IPM と同様に時間、濃度依存的に活性が低下した。MEM は IPM より明らかに分解されにくく、逆に BPM は分解されやすかった。

図4. A549細胞上清のCIEに対する培養時間の影響 (Exp. 3)

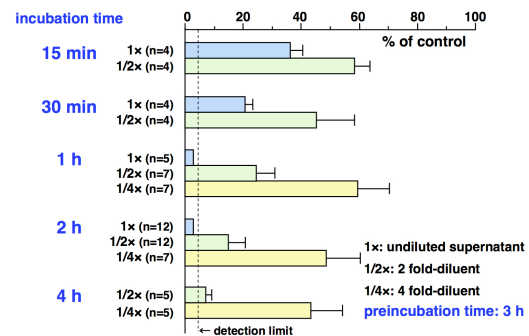


図5. A549細胞上清のCIEに対するFCS添加の影響 (Exp. 4)

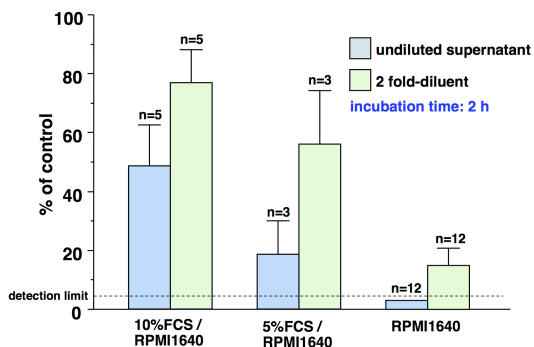
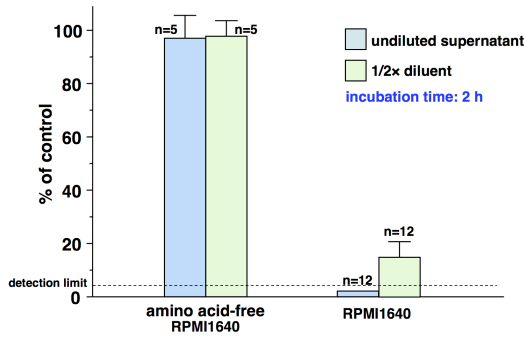
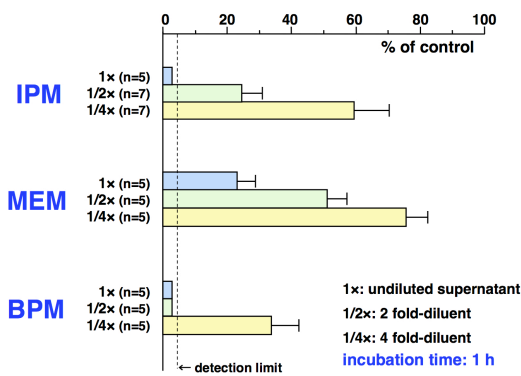


図6. A549細胞上清のCIEに対するアミノ酸添加の影響 (Exp. 5)



特に BPM は、1/2 希釈した培養上清中で 1 時間培養の条件でも、検出限界以下まで活性が低下した (図 7、Exp6)。

図7. A549細胞上清のIPM, MEM, BPMのCIE (Exp. 6)



以上の結果より、①A549 細胞の培養上清は IPM を含むカルバペネム薬を不活化する、②前培養の時間が長いほど不活化活性が強い、③不活化活性は時間依存的で、A549 と 3 時間培養後の上清は、1 時間で IPM の抗菌活性を 5%以下に落とす、④細胞培養用培地に血清を添加した場合、不活化活性が弱まる、⑤アミノ酸不添加の細胞培養用培地で培養した場合不活化活性が消失する、⑥IPM 以外のカルバペネム薬に対しても CIE が見られ、その程度は薬によって異なっていることなどが判った。細胞培養上清のカルバペネム薬不活化活性のメカニズムは、いまだ不明であるが、不活化にアミノ酸が必須であることから、細胞由来の何らかの物質が上清中で新生され、その物質によってカルバペネム薬が不活化されることが示唆された。

### (3) MDRP に対する抗菌薬併用効果の簡便な評価系の開発

MDRP に対する PIP と 3 種の AGs との協調作用を簡便に検討できる評価系として、PIP を 32 mg/L または 64 mg/L の濃度で添加した MH

寒天培地を用いて、ディスク法で AGs に対する薬剤感受性検査を行う方法を考案した。この方法は安価な市販のペーパーディスクと寒天培地と抗菌薬だけで検査が可能なので、一般の医療施設の細菌検査室で簡単に行えるという利点がある。対象として、同様に PIP を添加した寒天培地を用いた Etest 法による AGs の MIC、液体培地に PIP を 32 mg/L または 64 mg/L の濃度で添加して微量液体機積法によって、求めた AGs の MIC の結果と比較検討した。AGs としては AMK (図 8)、GM (図 9)、TOB (図 10) を用いた。ディスク法を用いた新規の検査法の結果は、他の 2 法の結果と概ね一致しており、十分に有用な方法と考えられた。

図8. 液体希釈法, Etest法, ディスク法によるMDRPに対するPIPとAMKの協調作用の比較検討

| Strain #     | PIP <sup>+</sup> | AMK  |       |      | AMK + 32 mg/L of PIP |       |      | AMK + 64 mg/L of PIP |       |      | FIC index |
|--------------|------------------|------|-------|------|----------------------|-------|------|----------------------|-------|------|-----------|
|              |                  | BMD  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk |           |
| 1 SMUM-3820  | 512              | 32   | 16    | I    | 16                   | 12    | S    | 16                   | 12    | S    | 0.500     |
| 2 SMUM-4951  | 256              | 512  | >256  | R    | 128                  | 96    | R    | 32                   | 32    | R    | 0.313     |
| 3 SMUM-5289  | 2048             | 256  | >256  | R    | 128                  | 96    | R    | 64                   | 24    | I    | 0.094     |
| 4 SMUM-5364  | 256              | 128  | 192   | R    | 64                   | 64    | R    | 32                   | 48    | I    | 0.500     |
| 5 SMUM-5365  | 256              | 1024 | >256  | R    | 256                  | >256  | R    | 128                  | 96    | R    | 0.375     |
| 6 SMUM-5370  | 256              | 128  | >256  | R    | 64                   | 64    | R    | 32                   | 16    | I    | 0.375     |
| 7 SMUM-5447  | 1024             | 1024 | >256  | R    | 512                  | >256  | R    | 256                  | >256  | R    | 0.313     |
| 8 SMUM-5448  | 512              | 256  | >256  | R    | 128                  | 128   | R    | 64                   | 48    | R    | 0.281     |
| 9 SMUM-5449  | 1024             | 512  | >256  | R    | 256                  | >256  | R    | 128                  | 48    | R    | 0.156     |
| 10 SMUM-5450 | 1024             | 256  | >256  | R    | 128                  | 48    | R    | 32                   | 12    | R    | 0.266     |
| 11 SMUM-5451 | 1024             | 1024 | >256  | R    | 1024                 | >256  | R    | 512                  | >256  | R    | 0.281     |
| 12 SMUM-5452 | 512              | 256  | >256  | R    | 128                  | 64    | R    | 32                   | 16    | I    | 0.375     |
| 13 SMUM-5453 | 512              | 256  | >256  | R    | 64                   | 64    | R    | 64                   | 8     | S    | 0.531     |
| 14 SMUM-5454 | 1024             | 512  | >256  | R    | 128                  | 128   | R    | 64                   | 32    | R    | 0.156     |
| 15 SMUM-5456 | 1024             | 512  | >256  | R    | 256                  | 96    | R    | 32                   | 32    | R    | 0.188     |
| 16 SMUM-5457 | 512              | 1024 | >256  | R    | 1024                 | >256  | R    | 512                  | 256   | R    | 0.281     |
| 17 SMUM-5483 | 1024             | 256  | >256  | R    | 128                  | 256   | R    | 64                   | 64    | R    | 0.188     |

図9. 液体希釈法, Etest法, ディスク法によるMDRPに対するPIPとGMの協調作用の比較検討

| Strain #     | PIP <sup>+</sup> | GEN  |       |      | GEN + 32 mg/L of PIP |       |      | GEN + 64 mg/L of PIP |       |      | FIC index |
|--------------|------------------|------|-------|------|----------------------|-------|------|----------------------|-------|------|-----------|
|              |                  | BMD  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk |           |
| 1 SMUM-3820  | 512              | 1024 | >256  | R    | 256                  | >256  | R    | 256                  | >256  | R    | 0.313     |
| 2 SMUM-4951  | 256              | 32   | 16    | R    | 8                    | 12    | I    | 4                    | 4     | S    | 0.375     |
| 3 SMUM-5289  | 2048             | 16   | 24    | R    | 8                    | 8     | I    | 4                    | 4     | S    | 0.094     |
| 4 SMUM-5364  | 256              | 32   | 32    | R    | 16                   | 16    | R    | 8                    | 12    | I    | 0.500     |
| 5 SMUM-5365  | 256              | 512  | >256  | R    | 64                   | 96    | R    | 32                   | 24    | R    | 0.250     |
| 6 SMUM-5370  | 256              | 16   | 16    | I    | 4                    | 8     | S    | 2                    | 4     | S    | 0.375     |
| 7 SMUM-5447  | 1024             | 64   | 24    | R    | 32                   | 24    | R    | 16                   | 16    | R    | 0.313     |
| 8 SMUM-5448  | 512              | 32   | 24    | R    | 8                    | 12    | R    | 8                    | 6     | S    | 0.313     |
| 9 SMUM-5449  | 1024             | 32   | 32    | R    | 16                   | 12    | R    | 8                    | 6     | I    | 0.250     |
| 10 SMUM-5450 | 1024             | 32   | 16    | R    | 8                    | 8     | S    | 4                    | 2     | S    | 0.250     |
| 11 SMUM-5451 | 1024             | 64   | 48    | R    | 32                   | 32    | R    | 32                   | 24    | R    | 0.313     |
| 12 SMUM-5452 | 512              | 32   | 24    | R    | 16                   | 8     | S    | 2                    | 1.5   | S    | 0.313     |
| 13 SMUM-5453 | 512              | 32   | 16    | R    | 8                    | 8     | S    | 3                    | 3     | S    | 0.625     |
| 14 SMUM-5454 | 1024             | 16   | 32    | R    | 8                    | 12    | I    | 4                    | 6     | S    | 0.188     |
| 15 SMUM-5456 | 1024             | 32   | 32    | R    | 16                   | 16    | I    | 4                    | 3     | S    | 0.313     |
| 16 SMUM-5457 | 512              | 128  | 64    | R    | 64                   | 64    | R    | 32                   | 32    | R    | 0.313     |
| 17 SMUM-5483 | 1024             | 32   | 48    | R    | 16                   | 24    | R    | 8                    | 6     | S    | 0.188     |

図10. 液体希釈法, Etest法, ディスク法によるMDRPに対するPIPとTOBの協調作用の比較検討

| Strain #     | PIP <sup>+</sup> | TOB  |       |      | TOB + 32 mg/L of PIP |       |      | TOB + 64 mg/L of PIP |       |      | FIC index |
|--------------|------------------|------|-------|------|----------------------|-------|------|----------------------|-------|------|-----------|
|              |                  | BMD  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk | BMD                  | Etest | Disk |           |
| 1 SMUM-3820  | 512              | 256  | 96    | R    | 128                  | 64    | R    | 128                  | 64    | R    | 0.750     |
| 2 SMUM-4951  | 256              | 512  | >256  | R    | 64                   | 48    | R    | 64                   | 24    | R    | 0.250     |
| 3 SMUM-5289  | 2048             | 512  | >256  | R    | 128                  | 48    | R    | 32                   | 16    | R    | 0.094     |
| 4 SMUM-5364  | 256              | 32   | 16    | R    | 16                   | 8     | I    | 16                   | 6     | S    | 0.750     |
| 5 SMUM-5365  | 256              | 512  | >256  | R    | 32                   | 24    | R    | 32                   | 8     | S    | 0.188     |
| 6 SMUM-5370  | 256              | 128  | 64    | R    | 16                   | 24    | R    | 8                    | 6     | S    | 0.188     |
| 7 SMUM-5447  | 1024             | 1024 | >256  | R    | 128                  | 192   | R    | 64                   | 48    | R    | 0.188     |
| 8 SMUM-5448  | 512              | 256  | >256  | R    | 64                   | 64    | R    | 32                   | 24    | R    | 0.250     |
| 9 SMUM-5449  | 1024             | 512  | >256  | R    | 64                   | 48    | R    | 32                   | 24    | R    | 0.125     |
| 10 SMUM-5450 | 1024             | 512  | >256  | R    | 64                   | 32    | R    | 32                   | 32    | R    | 0.188     |
| 11 SMUM-5451 | 1024             | 512  | >256  | R    | 256                  | 256   | R    | 64                   | 64    | R    | 0.188     |
| 12 SMUM-5452 | 512              | 256  | >256  | R    | 32                   | 24    | R    | 8                    | 6     | S    | 0.250     |
| 13 SMUM-5453 | 512              | 256  | 128   | R    | 128                  | 24    | R    | 32                   | 12    | S    | 0.375     |
| 14 SMUM-5454 | 1024             | 512  | >256  | R    | 64                   | 64    | R    | 64                   | 16    | R    | 0.156     |
| 15 SMUM-5456 | 1024             | 512  | >256  | R    | 64                   | 64    | R    | 32                   | 16    | I    | 0.188     |
| 16 SMUM-5457 | 512              | 512  | >256  | R    | 128                  | >256  | R    | 64                   | 48    | R    | 0.281     |
| 17 SMUM-5483 | 1024             | 512  | >256  | R    | 256                  | 256   | R    | 64                   | 64    | R    | 0.156     |

一方、従来よく用いられる FIC index を求める方法では、元々の MIC が高すぎるために、対象株のほぼすべてに対して協調作用ありと言う結果になり、MDRP に対しては全く役に立たないことが判った。

これらの結果から 3 薬剤と PIP の協調作用を比較すると、GM と PIP の組み合わせが最も有効で、GM 単独では 17 株中 16 株が R (耐性)、1 株が I (中間) であったのに対し、PIP を 64 mg/L の濃度で添加した場合、10 株が S (感性)、5 株が R (耐性)、2 株が I (中間) という結果であった。

①寒天培地に PIP を 64 mg/L の濃度で添加して求めたディスク法の阻止円径、②Etest 法の AGs による MIC、③液体培地に PIP を 64 mg/L の濃度で添加して求めた微量液体機積法による MIC の相関性を、スピアマンの順位相関係数を求めて評価した。3 薬剤ともに 3 種の検査法の結果が、高い相関性を認めた。

図11. PIP 64mg/L 添加時のMDRPIに対する液体希釈法MIC, Etes法MIC, ディスク法の阻止円径のスピアマンの順位相関係数

|  | r <sub>s</sub>                         |  |  |
|--|--|--|--|
|  | AMK <sup>a</sup><br>(+ 64 mg/L of PIP) | GEN <sup>b</sup><br>(+ 64 mg/L of PIP) | TOB <sup>c</sup><br>(+ 64 mg/L of PIP) |
| inhibitory zone diameter<br>vs broth microdilution MIC | -0.796                                 | -0.843                                 | -0.800                                 |
| inhibitory zone diameter<br>vs Etest MIC               | -0.896                                 | -0.857                                 | -0.908                                 |
| broth microdilution MIC<br>vs Etest MIC                | 0.751                                  | 0.870                                  | 0.834                                  |

<sup>a</sup>AGs: aminoglycosides  
<sup>b</sup>PIP: piperacillin

<sup>a</sup>AMK: amikacin  
<sup>b</sup>GEN: gentamycin

<sup>c</sup>TOB: tobramycin

以上の結果より、今回考案したディスク法を応用した新規検査法は、十分に臨床応用可能な有用な検査方法であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

- ①竹村 弘、他 4 名、A549 細胞の培養上清はカルバペネム薬の抗菌活性を不活化する、第 61 回日本化学療法学会総会、2013 年 6 月 5 日、神奈川県横浜市
- ②H Takemura、他 4 名、A549 Cell Culture Supernatant Inactivates Carbapenem Antibiotics、2012 年 9 月 10 日、サンフランシスコ (米国)
- ③H Takemura、他 6 名、A Simple Screening Test for Synergy of Piperacillin and Aminoglycosides against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using Disk Diffusion Test、2011 年 9 月 18 日、シカゴ (米国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹村 弘 (HIROMU TAKEMURA)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80301597