

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591472

研究課題名(和文) バイオフィーム産生の各種多剤耐性菌感染症に対する抗菌化学療法の検討

研究課題名(英文) Antimicrobial chemotherapy for biofilm-related infection caused by multidrug-resistant pathogen

研究代表者

藤村 茂 (Fujimura, Shigeru)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70295393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：整形外科領域の人工関節等のインプラントや心臓血管外科の心臓の人工弁などに付着した細菌がバイオフィームを形成すると抗菌薬が菌体に到達しにくくなり難治化する。本研究では、マクロライド系薬のクラリスマイシンが、黄色ブドウ球菌により形成されたバイオフィームを50%程度除去する作用を示すことを明らかにした。そこで院内感染で問題になるMRSAによるインプラント上でのバイオフィーム形成汚染モデルを作製し、クラリスマイシンとダプトマイシンの併用処理72時間にて殺菌できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：It is known that bacteria which attached to the implants such as the artificial joints of the orthopedics field or the prosthetic valves of the cardiovascular surgery form biofilms. In this case, because an antibacterial agent is hard to arrive at the bacteria in the biofilms, an infectious disease is intractable. In this study, it was found that the clarithromycin of macrolide removed around 50% of biofilms formed by Staphylococcus aureus. Therefore the biofilm formed contamination model on the implant by MRSA which became the problem for nosocomial infection was made. It was confirmed that biofilm formed S. aureus strains were sterilized 72 hours later by combination of clarithromycin and daptomycin treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症治療学

キーワード：バイオフィーム マクロライド クラリスマイシン ダプトマイシン S.aureus

1. 研究開始当初の背景

カテーテル留置による尿路感染症や呼吸器感染症のほか、整形外科領域による人工関節等のインプラント関連感染症の治療の際に、バイオフィーム産生菌による難治化が問題となっている。その原因菌として緑膿菌などグラム陰性桿菌の関与が指摘されているが、近年では、黄色ブドウ球菌や肺炎球菌などのグラム陽性球菌によるバイオフィーム関連感染が注目されている。整形外科領域では、関節形成術や脊椎インストルメンテーションなどの発展によりインプラント装着術の患者数が増加してきており、その重篤な合併症の一つとして黄色ブドウ球菌(MRSAを含む)やコアグラゼ陰性ブドウ球菌による感染症があげられている¹⁾。通常、これらの菌による感染症に対しては抗菌化学療法が十分効果を示すが、抗菌薬の移行性が悪いケースでは発症後2週間以内の早期に病巣搔爬および持続洗浄による処置²⁾などが行われている。しかし、洗浄等による処置で奏効しない症例ではバイオフィーム感染症を疑う必要がある。これは起因菌がインプラント上でバイオフィームを産生した場合、通常の抗菌化学療法では抗菌効果が期待できないためである。このため、多くの症例でバイオフィーム産生菌に汚染されたインプラントを抜去し、抗菌薬を含むセメントペーストやスパーサーの充填³⁾等の処置が行われてきた。今回の検討では、こうしたケースにおいて、抗バイオフィーム活性を有するマクロライド系抗菌薬を用いた化学療法を試みた。14員環マクロライド系薬のクラリスロマイシンは、菌の増殖を抑える静菌作用を示すほか、バイオフィーム産生の緑膿菌感染症に対し、抗バイオフィーム活性を有することが報告されている⁴⁾。

2. 研究の目的

クラリスロマイシンに加えて、これまで検討されていない15員環マクロライド系薬のアジスロマイシンのバイオフィームの除去能

を検討した。整形外科領域に多くみられるバイオフィーム産生 MRSA 感染症に対するクラリスロマイシンと抗 MRSA 薬のダブトマイシンを用いた *in vitro* 併用化学療法の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)マクロライド系薬による各種細菌が形成したバイオフィームの除去能

クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンのバイオフィーム除去能は、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌、緑膿菌、アシネトバクター属の臨床分離株により産生されたバイオフィームを用いて検討した。また最も除去率が高かった黄色ブドウ球菌について、バイオフィームに対する各種マクロライド系薬の最小バイオフィーム除去濃度(MBEC)は、各薬剤の希釈系列(400-0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を作成しメチレンブルーでバイオフィームを染色後、OD = 655nm にてバイオフィーム量を測定し決定した。コントロールとしてバンコマイシンおよびセファゾリンを使用した。

(2)インプラント関連感染における併用除菌療法

整形外科領域の術後感染における起因菌は、MRSA を含む黄色ブドウ球菌が多数を占める。そのため第一世代セファロスポリン系薬のセファゾリン、あるいは抗 MRSA 薬の中で唯一、骨髄炎と関節炎に適応のあり筋組織への移行性が高いバンコマイシンが選択され易い。これまで我々は、クラリスロマイシンと併用する抗菌薬としてセファゾリン、バンコマイシンおよび抗 MRSA 薬のリネゾリドを用いて検討したが、本検討では、皮膚・軟部組織への移行性が最も高いダブトマイシンを併用した。併用3剤の骨近傍組織への移行性は6mg/kgの投与にて7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。著者らは *in vitro* でクラリスロマイシンとダ

プトマイシンを各々筋組織移行濃度にて併用させ、チタン製デバイス上のバイオフィーム産生黄色ブドウ球菌の除菌について検討した。クラリスロマイシンとダプトマイシンの併用効果は、走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡にて確認した。

4. 研究成果

各種菌株に対する各種マクロライド系薬のバイオフィーム除去能の成績を Fig. 1 に示す。黄色ブドウ球菌以外の菌に対し、各種マクロライド系薬 1mg/L の除去率は 10%程度であったが、黄色ブドウ球菌では 48~52%を示した。形成したバイオフィームに対するクラリスロマイシン、アジスロマイシンの除去率は 400 µg/mL でともに 67-73%であり、0.78 µg/mL においても 38-49%を示した (Fig.2)。各濃度において黄色ブドウ球菌が形成したバイオフィームは完全に除去されなかったことから、両剤の MBEC は決定できなかった。

これまで著者らの検討により、クラリスロマイシンの内服 (1日 400mg 分 2) にて骨近傍筋組織への組織移行性を 10 例で検討し、内服後 2 時間の平均値が 1µg/mg であった⁵⁾。クラリスロマイシンの 200mg 服用による Tmax は 1.93 時間であることから、この検討で得られた骨近傍筋組織のクラリスロマイシン濃度は Cmax であると判断された。走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いたクラリスロマイシンとダプトマイシンの併用効果を Fig.3, 4 に示す。併用 72 時間後にデバイス上のバイオフィーム産生菌の除菌効果が確認された。

文献

- 1) Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med. 351:1645-1654, 2004.
- 2) 竹内宏仁、岩野邦夫、森 俊仁ほか RA における人口関節置換術後の感染 .

日関外誌 . 20: 115-120, 2001.

- 3) 小林正明、永谷祐子、後藤英之ほか 人口関節置換術後感染の治療経験 . 関節外科 . 24: 80-85, 2005.
- 4) Bui KQ, Banevicius MA, Nightingale CH, et al. In vitro and in vivo influence of adjunct clarithromycin on the treatment of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 45: 57-62, 2000.
- 5) Fujimura S, Sato T, Mikami T, et al. Combined efficacy of clarithromycin plus ceftazidime or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. Int J Antimicrob Agents 32: 481-484, 2008

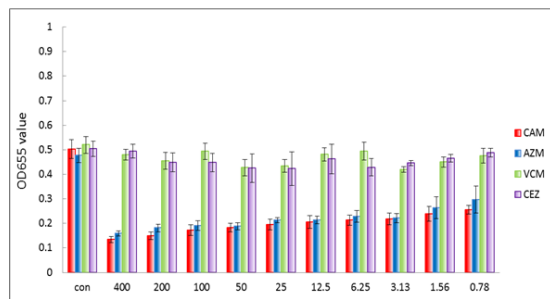
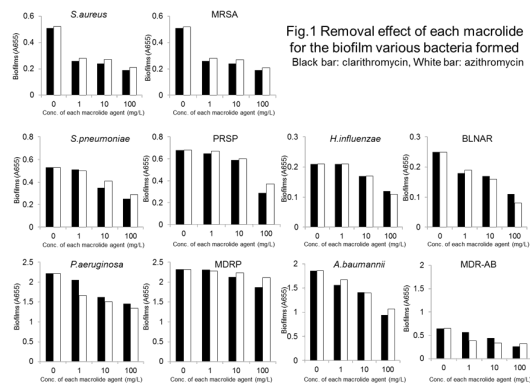


Fig.2 Residual amounts of mature biofilm treated by antibiotics
CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, VCM: vancomycin, CEZ: ceftazidime

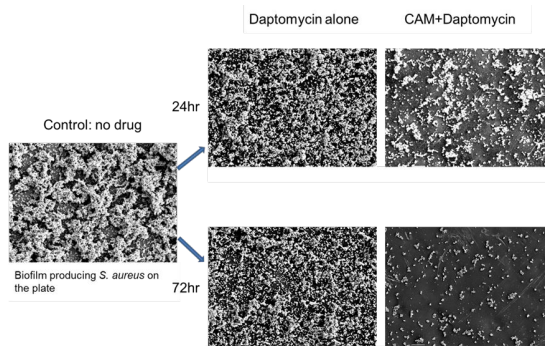


Fig.3 SEM images of eradication effect of Dap alone or Dap+CAM combined treatment 24 hr or 72 hr later Magnification: X1000

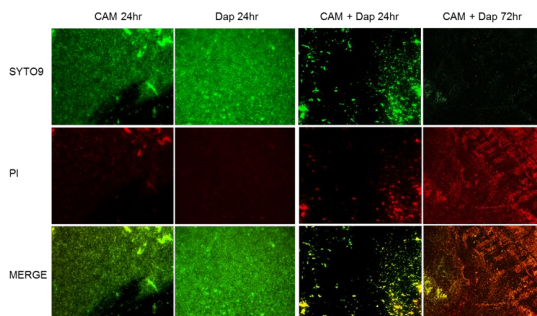


Fig.4 Bactericidal effect of combination treatment with Clarithromycin (CAM) plus Daptomycin (Dap) for 24 hr or 72 hr.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 藤村 茂、佐藤哲朗 整形外科領域の MRSA 感染症 第 34 回日本臨床薬理学会(招待講演) 2013 年 12 月 4-5 日 東京

2. Nakano Y, Fujimura S, Sato T, Yoshino D, Bactericidal Effect of Plasma Discharge against Biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* on Contact Lenses 10th International Conference on Flow Dynamics 25-27 Nov. 2013 Sendai

3. 藤村 茂、中野禎久、伊藤友子、苅谷泰子、渡辺 彰 MRSA に対するダプトマイシンとバンコマイシンの MPC について 第 60 回日本化学療法学会・第 62 回日本感染症学会東日本合同学会 2013 年 10 月 30 日-11 月 1 日 東京

4. Fujimura S, Sato T, Watanabe A. Combined efficacy of clarithromycin plus daptomycin for implant related infection with biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ID WEEK 2013 A Joint Meeting of IDSA, SHEA, HIVMA, and PIDS. 2nd-6th Oct. 2013, San Francisco

5. 藤村 茂 今だから考えたい抗感染症薬の適正使用 抗 MRSA 薬を中心に 第 22 回日本集中治療医学会東北地方会(招待講演) 2013 年 7 月 27 日 秋田市

6. Fujimura S, Sato T, Watanabe A. Evaluation of azithromycin high-dose therapy for implant-related infection with biofilm-formed *Staphylococcus aureus*. Spine across the Sea 2012 30th July-3rd Aug. 2012 Kauai

7. 藤村 茂、佐藤哲朗、菊地利明、渡辺 彰 バイオフィーム産生 MRSA によるデバイス感染に対するマクロライド系薬併用除菌療法の基礎的検討 第 3 回 MRSA フォーラム 2012 年 7 月 14 日 東京

8. 藤村 茂、中野禎久、布施克浩、渡辺 彰 マクロライド系薬による *S. aureus* 産生 biofilm の除去効果について 第 60 回日本化学療法学会総会 2012 年 4 月 25-27 日 長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
藤村 茂 (FUJIMURA Shigeru)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70295393