

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791651

研究課題名(和文) 薬剤耐性大腸菌 *in vivo* 感染モデルでの PK - PD に基づいた抗菌薬投与法の検証研究課題名(英文) Investigation of antimicrobial administration based on PK-PD using *in vivo* model of urinary tract infection due to drug-resistant *Escherichia coli*

研究代表者

和田 耕一郎 (Wada, Koichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20423337

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)：臨床研究は、岡山大学泌尿器科で分離された大腸菌の薬剤感受性について調査、薬剤耐性大腸菌の選択的培地の開発、急性単純性膀胱炎に対する抗菌薬の投与期間を検証、各種抗菌薬の精巣上体組織への移行性の検証、を遂行した。一連の研究成果として、薬剤耐性大腸菌の分離効率が上昇し、それらの特徴を解析することで、有効な抗菌薬の選択と治療法の検証ができた。

基礎研究は、尿路感染症由来大腸菌の遺伝子解析、マウス尿路感染モデルの作製と抗菌薬の投与法を検証したが、抗バイオフィルム効果を最大限にする抗菌薬の投与法を確認するまでには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In clinical study, characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from urinary tract infection; development of culture medium in which drug-resistant *E. coli* isolates could be selectively cultured; investigation of administration duration of antimicrobials against uncomplicated cystitis; evaluation of penetration of various antimicrobials to human epididymis tissue, were completely performed.

In basic research, analysis of bacterial gene related with drug resistance; construction of mice model of urinary tract infection; evaluation of administration manner of antimicrobials using the model, were performed. However, effective dose and duration of antimicrobial treatment against biofilms in urinary tract could not be clarified.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路感染症 大腸菌 薬剤耐性 ESBL産生菌 抗菌薬 治療法 薬物動態/薬力学 マウス感染モデル

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は尿路性器感染症において最も分離頻度が高く、宿主に対して強い病原性を発揮することから、泌尿器科領域において最も重要な菌種である。我が国におけるフルオロキノロン系抗菌薬に耐性を示す大腸菌(キノロン耐性大腸菌)および基質拡張型-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の分離頻度は、近年増加傾向にあり、2016年現在もその傾向は続いている。また、キノロン耐性大腸菌やESBL産生大腸菌の分離率が低かった欧米でも薬剤耐性大腸菌の分離頻度、分離率は最近急激に上昇しており、泌尿器科領域の薬剤耐性大腸菌に対する感染制御と重症化症例での治療法の確立は喫緊の課題であった。

大腸菌は慢性あるいは反復性に抗菌薬に暴露されることによって薬剤耐性を獲得するため、特にバイオフィームに関連した感染に対しては既存の抗菌薬をより有効に使用することが、今後の重要な治療戦略になる。

そこで、*in vivo*の尿路感染モデルの確立、PK-PD

(Pharmacokinetics-Pharmacodynamics)理論に基づいた抗菌薬の投与方法の検証、さらに多剤の併用療法における相乗的抗菌効果、バイオフィーム形成抑制効果についても評価することが耐性菌対策にもなることが期待された。

2. 研究の目的

現在、新規抗菌薬の開発が停滞しているが、薬剤耐性大腸菌が国内外で増加し、今後感染防御能の低下した患者での重症症例の出現が問題となる可能性が高い。本研究は尿路感染症由来の薬剤耐性大腸菌に関し、免疫不全マウスにおける重症感染症モデルを含む*in vivo*の実験系を用いてキノロン薬を中心とした各種抗菌薬の抗菌効果を検証し、PK-PD理論に基づいた解析を行うことにあった。特に、我々が*in vitro*で検討してきたfosfomicinとキノロン系薬との併用効果に関しては、マウスの尿路バイオフィーム感染症モデルを用いて検討し、臨床現場での投与设计法の確立を目指した。

今回、改めて大腸菌に関する基礎的・臨床的・分子疫学的研究を追加遂行し、新たに*in vivo*で大腸菌に対するPK-PD理論に基づいた抗菌薬の使用法を評価・検証した。マウス緑膿菌感染症モデルを大腸菌に適用し、PK-PD解析理論の新しい定量的画像評価法の確立を目指した。具体的には、尿路感染症由来大腸菌による実験モデル系を確立し、IVIS® Imaging System (Lumina)で評価することであった。さらに、fosfomicinとキノロン系薬との相乗効果を評価するためのマウス大腸菌感染症モデルを確立して定量的に解析する研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) . 尿路感染症由来大腸菌に関する基礎的・臨床的検討

岡山大学泌尿器病態学分野には、1983年以降の尿路感染症由来の大腸菌1000株以上が保存されている。薬剤感受性(ESBL産生株およびキノロン耐性株)やバイオフィーム形成能といった細菌側因子と患者背景を含むデータベースを作成しており、研究期間内に分離される大腸菌株について更新した。

尿路感染症由来大腸菌の分子疫学的解析： MLST (multilocus sequence typing) によるタイピング

MLST解析は < <http://mlst.ucc.ie> > の方法に従い、プライマーを注文、PCR増幅産物をシーケンスした。データベースにアクセスし、得られた塩基配列のタイピングを行い、薬剤耐性大腸菌の世界的増加に対する位置づけを行った。

(2) . *in vitro*の実験モデル系における多剤耐性大腸菌のバイオフィーム形成能。

薬剤感受性、特徴的な薬剤耐性遺伝子をもつ菌株を選択し、緑膿菌尿路バイオフィーム感染症モデルとして確立した最新の*in vitro*実験系を用い、多剤耐性大腸菌のバイオフィーム形成過程ならびに形成能を検討した。

(3) . マウス腎盂腎炎モデル

上記1-3の成績に基づいて、特徴的な大腸菌株を選択した。雌マウスの膀胱内に菌液を注入して一定時間クランプし、腎盂腎炎を高率に惹起、持続するが3-4日後まで死亡しないマウス腎盂腎炎モデルの作製を試みた。

(4) . マウス大腿部感染モデル

既に確立している緑膿菌マウス大腿部感染モデルを基に、市販の発光性大腸菌株を用い、新たに大腸菌大腿部膿瘍モデルを作製し、先端画像化システムであるIVIS® Imaging System (Lumina)を使用して、マウスの生存した状態でリアルタイムイメージングによる定量的画像評価法で効果を検証した。

(5) . マウス膀胱異物モデル

上記1-3の成績に基づいて、特徴的な大腸菌株を選択し、Caliper社から購入したプラスチック(pXen13)を導入し、発光性大腸菌株を作製した。膀胱内にプラスチック製のスパイラルチューブを挿入して大腸菌を感染させ、尿道をクランプしてチューブ表面にバイオフィームを形成させるモデルの作製を試みた。

4. 研究成果

本研究に関連して、多くの臨床研究を行うとともに、実験研究においても多くの成果を上げることができた。

臨床研究においては、岡山大学泌尿器科で分離された菌株、特に大腸菌のうちキノロン耐性株の年次的な推移と薬剤感受性の年次推移を調査した。その結果、最近10年

間における複雑性尿路感染症分離菌においては、緑膿菌や MRSA が減少して大腸菌が増加していること、大腸菌の薬剤感受性が低下していることが判明した。これまでに蓄積していたデータと合わせ学会発表、論文化して投稿した。キノロン耐性大腸菌や ESBL 産生大腸菌選択的培地の有効性を多施設共同研究として実施し、同培地の有効性を示すことができた。具体的には 694 例について同培地を使用し、217 例 (31.3%) でキノロン耐性大腸菌が陽性であった。また、ESBL 産生大腸菌は 640 例中 85 例 (13.3%) であった。分離された大腸菌株 396 株について、LVFX に対する MIC (微量液体希釈法) と本培地の結果を比較したところ、耐性 / 感受性の結果が 91.7% 一致し、選択培地の感度と特異度はそれぞれ 96.8%、88.2% であった。前立腺生検の合併症である急性細菌性前立腺炎については、他の報告で約 2% と報告されているのに対し、この選択培地を使用することで 0.8% まで低下させることができ、国際学会で報告した。大腸菌がもっとも原因菌として多い急性単純性膀胱炎の患者を無作為にセフトレン ピボキシル 3 日間または 7 日間投与に割付し、両群間の治癒率を検討、両群間に差がないことを示し、国内の学会で報告した。原因菌として最も多く分離される精巣上体炎を想定し、各種抗菌薬の精巣上体組織への移行性を検証した。抗菌薬はフルオロキノロン系、マクロライド系、経口セフェム、ST 合剤を選択し、フルオロキノロン系抗菌薬の良好な組織移行性が示された。その結果は国際学会で報告した。以上の臨床研究に基づいて、薬剤耐性大腸菌が原因菌の尿路性器感染症患者に対する有効な抗菌薬の選択と治療法の検証ができた。

基礎研究においては、尿路感染症由来大腸菌の MLST 解析と耐性遺伝子タイピング、*in vitro*、*in vivo* 感染モデルの作製を行った。

平成 20 年から平成 27 年までに尿から分離された ESBL 産生大腸菌 69 株の MLST 解析と耐性遺伝子タイピングを行った。その結果、42 株 (60.9%) が国際的な流行株である ST131、5 株 (7.2%) が ST648、4 株 (5.8%) が ST38 であった。耐性遺伝子は 30 株 (43.5%) が CTX-M-27、23 株が CTX-M-14 保有株であることが判明した。*in vitro*での尿路感染モデルは、緑膿菌尿路バイオフィーム感染症モデルとして確立したものを応用し、大腸菌のバイオフィーム形成能を評価した。発光性大腸菌株を用い、マウス大腿部膿瘍モデルを作製した。すでにモデルとして確立していた緑膿菌モデルと比較して急速な経過をたどることから抗菌薬の効果を判定するためのモデルには不向きであった。マウス腎盂腎炎モデルは、免疫機能に関する調製が難しく、薬効評価はできなかった。マウスの膀胱異物モデルは、バイオフィームが形成されるまでに死亡するマウスが緑膿菌よりも多いことが難点であった。膀胱内挿入したプラスチ

ック製のスパイラルチューブを摘出して走査型電子顕微鏡で確認したところ、バイオフィームが形成されていることが確認された。BIPM、フルオロキノロン系抗菌薬、FOM による抗バイオフィーム効果を確認するには至らなかった。

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 5 件)

1. Koichiro Wada, et al.: Clinical analysis of bacterial strain profiles isolated from urinary tract infections: A 30-year study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2016. (in press) (査読有り)
2. 和田耕一郎: 抗菌薬の選択と上手な使い方! - 私の処方箋 4. 重症尿路感染症 - . *臨床泌尿器科*; 69: 636-643, 2015. (査読なし)
3. 和田耕一郎, 公文裕巳: 各種感染症における抗菌薬の使い方のコツ 尿路感染症. *月刊臨床と研究*; 92: 173-178, 2015. (査読なし)
4. 和田耕一郎, 公文裕巳: 尿路感染治療の実際. *医薬ジャーナル*; 49: 1717-1722, 2013. (査読なし)
5. 和田耕一郎, 渡辺豊彦: 尿路感染症 I 専門医の立場から. *治療*; 95: 1628-1633, 2013. (査読なし)

[学会発表](計 20 件)

1. Takuya Sadahira, Koichiro Wada, et al.: Pharmacokinetics of fluoroquinolones into human epididymis. (31st European Association of Urology, 2016 年 3 月 12 日, ミュンヘン)
2. 和田耕一郎ほか: 薬剤耐性大腸菌の選択培地を用いた前立腺生検前の直腸内スクリーニングに関する多施設共同研究. (第 67 回西日本泌尿器科学会総会, 2015 年 11 月 7 日, 福岡)
3. 定平卓也, 和田耕一郎ほか: 成人急性単純性膀胱炎におけるセフトレン ピボキシルの臨床効果と投与日数に関する検討. (第 63 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2015 年 10 月 16 日, 奈良)
4. 和田耕一郎ほか: 岡山大学病院泌尿器科における ESBL 産生大腸菌の分離状況と薬剤感受性. (第 34 回岡山インフェクションコントロール研究会, 2015 年 9 月 26 日, 岡山)
5. Koichiro Wada, Epidemiology of fluoroquinolone-insusceptible/Extended-spectrum-beta lactamase-producing *Escherichia coli* colonizing in Japanese male rectum. (ICAAC/ICC 2015 meeting, 2015 年 9 月 20 日, サンディエゴ)
6. 和田耕一郎ほか: 選択培地を用いた前立腺生検前の薬剤耐性大腸菌に関する直腸内スクリーニング. (第 32 回中国地区インフェクションフォーラム, 2015 年 8 月 1 日, 岡山)

7. 定平卓也, 和田耕一郎ほか: 精巢・精巢上体組織への薬剤移行性の検討 - 各種抗菌薬の比較 - (第 63 回日本化学療法学会総会, 2015 年 6 月 5 日, 東京)

8. 和田耕一郎ほか: キノロン耐性大腸菌の選択培地を用いた前立腺生検前の直腸内スクリーニングに関する検討 (第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014 年 04 月 26 日, 神戸)

9. 山本満寿美, 和田耕一郎ほか: 岡山大学泌尿器科における尿路感染症分離菌および薬剤感受性のどう買う - 30 年間の変遷 - . (第 62 回日本化学療法学会総会, 2014 年 6 月 18 日, 福岡)

10. Koichiro Wada, et al: Epidemiology of fluoroquinolone-insusceptible/Extended-spectrum-beta-Lactamase-producing Escherichia coli colonizing in Japanese male rectum. (Society for Infection and Inflammation in Urology and the American Urological Association, 2014 年 5 月 18 日, オーランド)

11. 和田耕一郎ほか: キノロン耐性大腸菌選択培地を用いた前立腺生検前の直腸内スクリーニング (第 299 回日本泌尿器科学会岡山地方会, 2014 年 5 月 10 日, 倉敷)

12. 和田耕一郎, 公文裕巳: シンポジウム 尿路感染症「尿路留置カテーテルとバイオフィルム対策」.(第 29 回日本環境感染学会, 2014 年 2 月 15 日, 東京)

13. 定平卓也, 和田耕一郎ほか: レボフロキサシン 500mg 単回投与における精巣, 精巢上体組織移行性の検討 . (第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2013 年 11 月 8 日, 大阪)

14. 和田耕一郎, 公文裕巳ほか: 生体腎移植レシピエントにおける周術期感染に関する検討 . (第 24 回尿路感染症研究会, 2013 年 10 月 5 日, 西宮)

15. 和田耕一郎, 公文裕巳: シンポジウム 尿路感染症・性感染症への適切なアプローチを学ぶ「体制単純性腎盂腎炎 ~我々の取り組みと課題~」.(第 61 回日本化学療法学会総会, 2013 年 6 月 6 日, 横浜)

16. 山本満寿美, 和田耕一郎ほか: 岡山大学泌尿器科における尿路感染症分離菌の変遷及び薬剤感受性について - 2007 年から 2011 年 - . (第 61 回日本化学療法学会総会, 2013 年 6 月 6 日, 横浜)

17. Koichiro Wada, et al.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biapenem in patients with bacterial pyelonephritis. (28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013 年 6 月 6 日, 横浜)

18. 栄枝一磨, 和田耕一郎ほか: キノロン耐性大腸菌選択培地の経直腸的前立腺生検への応用 . (第 101 回日本泌尿器科学会総会, 2013 年 4 月 27 日, 札幌)

19. Koichiro Wada, et al.: Antimicrobial susceptibility of

fluoroquinolone-resistant/extended-spectrum-beta-lactamases-producing Escherichia coli isolated from urinary tract infections between 2007 and 2011 in Japan. (AUA/JUA Symposium 2013, 2013 年 2 月 13 日, ラスベガス)

20. 栄枝一磨, 和田耕一郎ほか: 尿から分離された ESBL 産生大腸菌に関する検討 (第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会, 2012 年 11 月 7 日, 福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 和田 耕一郎
(Wada Koichiro)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 20423337

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: