

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461523

研究課題名(和文) NDM-1産生大腸菌敗血症モデルを用いたCa-EDTAの併用効果に関する研究

研究課題名(英文) Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by Escherichia coli with NDM-1 beta-lactamase.

研究代表者

吉住 あゆみ (YOSHIZUMI, AYUMI)

群馬パーズ大学・保健科学部・講師

研究者番号：20602444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNew Delhi metallo-β-lactamase-1 (NDM-1)産生大腸菌および同菌敗血症モデルを用いたCa-EDTAの併用効果を明らかにすることを目的に研究を実施した。薬剤感受性試験については、抗菌薬単剤の場合と比較し、Ca-EDTAと抗菌薬の併用条件下ではMICが大幅に改善した。さらにマウス敗血症モデルでの併用効果を検討した結果、併用群では、有意差を持って抗菌薬単剤投与群に比べて生菌数が10倍減少していた。また予備実験のレベルではあるが、炎症性サイトカインへの併用効果の影響を確認すべく、IL-6を指標に検討を行ったところ併用群でIL-6の低下傾向が確認された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of Ca-EDTA, as an inhibitor for New Delhi Metallo-β-lactamase-1 (NDM-1) in vitro antibiotic susceptibility and in a mouse model of sepsis caused by Escherichia coli. Ca-EDTA drastically reduced the MICs of carbapenems for all NDM-producing bacteria (imipenem 512mg/L, imipenem/Ca-EDTA 2mg/L.) In the neutropenic murine model of sepsis, the bacterial burden was further reduced by combination therapy using imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS) and Ca-EDTA to 2.3×10^3 CFU/liver, compared with 2.9×10^4 CFU/liver for IPM/CS alone. These data demonstrated the possibility of Ca-EDTA for clinical applications. Also, IL-6 serum levels in septic animals were reduced after the combination therapy using imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS) and Ca-EDTA, although further study is needed. In our understanding, this is the first report examining the effect of Ca-EDTA on a mouse sepsis model caused by NDM-1-producing bacteria.

研究分野：感染症内科学

キーワード：NDM-1

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性桿菌のラクタマーゼはラクタム系抗菌薬に対する主要な耐性因子である。それらはAmberらによって、保存されたアミノ酸配列を基にA～Dまでの4クラスに分類されている。ニューデリーメタローラクタマーゼ(NDM-1)はClass Bに属するラクタマーゼで、2007年にインドニューデリーで医療行為を受けて帰国したスウェーデン在住インド人の創部から分離された*Klebsiella pneumoniae*で初めて報告されたメタローラクタマーゼである。NDM-1はカルバペネム系抗菌薬を含む殆どすべてのセフェム系抗菌薬を分解することが知られている。このNDM-1産生菌の問題点はその遺伝子がプラスミド上に存在し、そのプラスミドが大腸菌や肺炎桿菌のみならず、コレラ菌、サルモネラ菌など病原性の強い菌種にも伝播することである。実際インド河川および水道水から、NDM-1を産生するこれらの菌が分離されたことが報告されている(TR Walsh et al. Lancet Infectious Dis.11: 355, 2011)。2016年現在、120以上のNDM-1産生菌が原因による感染症ケースレポートが報告されている。これら多剤耐性NDM-1産生菌感染症の治療にはこれまでにチゲサイクリン、コリスチンが用いられているが、近年、耐性菌としてMCR-1産生コリスチン耐性菌が問題となっており、NDMとMCR-1の両方を産生するコリスチンおよびカルバペネム耐性菌も検出されている。

(Yao et al. Lancet Infectious Dis.11;355, 2011)

従ってこれらの菌による感染症が日本で起きた場合、今後治療が困難になることが予想され、新たな治療法の開発が必要となる。

NDM-1は酵素の活性中心に金属である亜鉛イオンをもち、EDTAなどの金属キレート剤で失活することが知られている。EDTAは細菌の産生する酵素に必須の金属をキレートすることで抗毒素作用を示すことが知られているが(Sadikot, R.T et al.Crit.Care Med.171:1209, 2012)、その毒性が強いためヒトに治療薬として用いられていない。一方、Calcium-EDTA (Ca-EDTA)はEDTAにカルシウムを結合させることで毒性を減らした化合物で、現在鉛中毒の治療薬として用いられている(Bhattacharya A et al. Neurotoxicology 28: 686, 2007)。申請者はこの生体にも使用できるCa-EDTAに着目し、NDM-1産生菌に対するCa-EDTAとカルバペネム系薬剤との併用条件下での作用を感染症学的、免疫学的視点から検証を試みる。

2. 研究の目的

近年、病原細菌の薬剤耐性化が問題となっており、そのなかでもニューデリーメタローラクタマーゼ(NDM-1)産生菌の伝播は深刻である。本菌は既存のセフェム系抗菌薬の殆どを分解する多剤耐性菌であることから、既存の抗菌薬療法とは異なるコンセプトをもとに、治療戦略を執ることが急務となっている。そこで本研究では、抗菌薬の殺菌性にだけ着目するのではなく、多くの抗菌薬を分解するNDM-1自体の活性を阻害することによる新たな治療法を提案すること

を目的とした。

3. 研究の方法

NDM-1の阻害剤であるCa-EDTAとカルバペネム抗菌薬のIn-vitroでの併用効果についての検討(薬剤感受性試験)を行った。NDM-1の阻害剤であるCa-EDTAを共存させることで、NDM-1の活性を阻害し、各種NDM-1産生菌のラクタム系抗菌薬のMICの改善を目的とした。Ca-EDTAと各種濃度のラクタム系抗菌薬を共存させ、微量液体希釈法を用いて薬剤感受性試験を行った。

NDM-1産生菌マウス敗血症モデル系を用いたCa-EDTAとカルバペネム抗菌薬におけるIn-vivoでの併用効果についての検討を行った。シクロフォスファミド投与と白血球減少症モデルマウスを用い、この検討結果をもとに、選出したNDM-1産生大腸菌、マウスを用いて感染および治療実験を行った。感染4日前および1日前にシクロフォスファミド(それぞれ150mg/kg, 100mg/kg)を投与し、白血球減少状態のマウスに 2.7×10^7 colony-forming units (CFU)のNDM-1産生大腸菌を接種した。感染2時間後のマウスを生理食塩水投与群、Ca-EDTA単剤投与群(100mg/kg)、カルバペネム系抗菌薬(imipenem: IPM)単剤投与群(10mg/kg)、Ca-EDTAおよびカルバペネム系抗菌薬(imipenem)併用投与群の4群(それぞれ100mg/kg, 10mg/kg)に分けそれぞれ投与を行い、感染4時間後の肝臓および血中の生菌数への影響を検討した。

各種マウスを用いたCa-EDTAとカルバペネム系抗菌薬併用群の生存率への影響について検討を行った。NDM-1産生大腸菌、BALB/cおよびC57BL/6のメスを用いて感染および治療実験を行った。この検討と同様に感染4日前および1日前にシクロフォスファミドを投与し、白血球減少状態のマウスに一匹当たり 1.1×10^7 colony-forming units (CFU)のNDM-1産生大腸菌を接種した。感染後の各種マウスを生理食塩水投与群、Ca-EDTA単剤投与群(200mg/kg)、カルバペネム系抗菌薬(IPM)単剤投与群(50mg/kg)、Ca-EDTAおよびカルバペネム系抗菌薬(IPM)併用投与群(それぞれ200mg/kg, 50mg/kg)の4群に分けそれぞれ感染後3時間、24時間、48時間後投与を行い、生存率への影響を検討した。

炎症性サイトカインへの併用効果の影響を確認すべく、IL-6を指標に検討を行った。において生存率への併用効果の傾向がみられたメスC57BL/6を用いてと同じ系で各種薬剤投与を行い、血清中および肝臓抽出物中のIL-6濃度を測定した。

4. 研究成果

Ca-EDTAとカルバペネム抗菌薬のIn-vitroでの併用効果についての検討(薬剤感受性試験)の結果、カルバペネム系抗菌薬であるIPMおよびmeropenem (MEPM)単剤の場合と比較し、Ca-EDTAとの併用条件下では大幅な改善が認められた(IPM 512mg/L, IPM / Ca-EDTA 2mg/L)。またアミノグリコシド系抗菌薬の

amikacin (AMK) およびキノロン系抗菌薬 ciprofloxacin (CPFX)では改善が認められなかったことから Ca-EDTA はラクタム剤を分解する NDM - 1 に作用していることが明らかとなった (表1. 参照)。

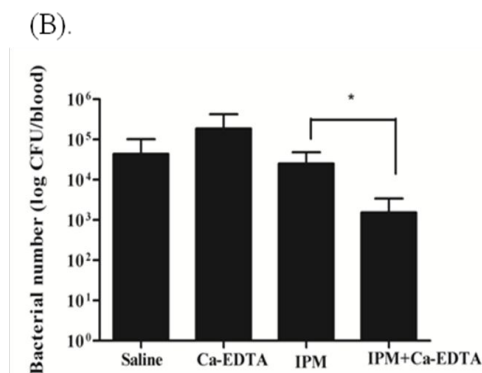
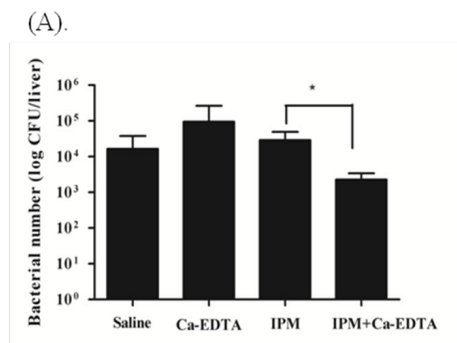
表1. Ca - EDTA (32 μg/ml) 存在下での各種抗菌薬 (IPM, MEPM, AMK, CPFX) に対する薬剤感受性への影響

Strain	Bacteria	MIC (μg/ml)							
		IPM	IPM +Ca-EDTA	MEPM	MEPM +Ca-EDTA	AMK	AMK +Ca-EDTA	CPFX	CPFX +Ca-EDTA
NC13443	<i>K.pneumoniae</i>	64	1	256	4	>64	>64	>64	>64
TUM10700	<i>K.pneumoniae</i>	64	2	256	4	>64	>64	32	16
TUM10701	<i>E.coli</i>	64	1	256	1	>64	>64	64	32
TUM10702	<i>E.coli</i>	512	2	256	2	>64	>64	16	8

NDM-1産生菌によるマウス敗血症モデル系を用いてCa-EDTAとカルバペネム系抗菌薬の併用効果を血中、肝臓内生菌数を指標に検討した。その結果、IPM単剤投与群と比較して併用群では肝臓および血中両者とも有意差を持って生菌数に1 log減少した(図1参照)。この結果からCa-EDTAと抗菌薬の併用投与による治療効果が期待できると考えられた。

図1. IPM と Ca-EDTA の併用療法における肝臓内(A)、および血中(B) のNDM-1産生大腸菌数への効果

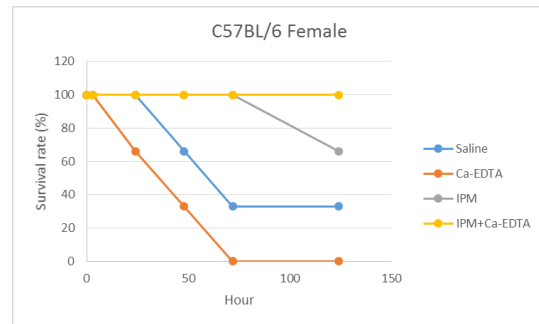
(*P < 0.05 compared with IPM monotherapy)



各種マウスを用いてCa-EDTAとカルバペネム系抗菌薬併用群の生存率への影響について検討を行った。その結果、メスのC57BL/6で単剤群

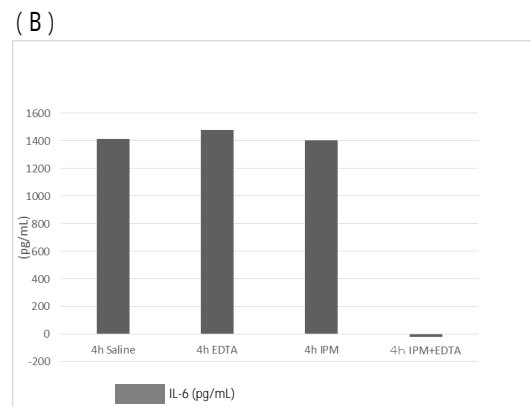
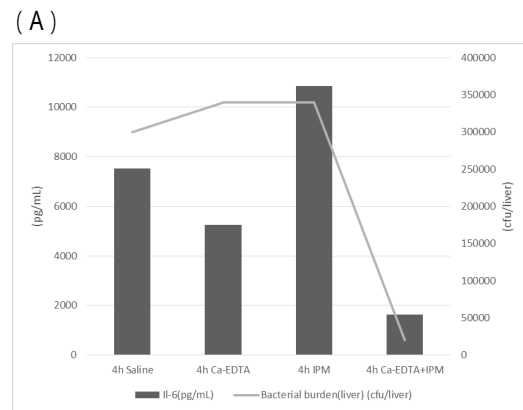
に比して30%程度の併用効果の傾向が認められた。現在予備実験の段階であるため、今後母集団を増やし検討を進めていく予定である。

図2: IPM と Ca-EDTA の併用療法における生存率への効果



炎症性サイトカインへの併用効果の影響を確認すべく、メスC57BL/6を用いてIL - 6を指標に検討を行った。その結果、Ca-EDTAとカルバペネム系抗菌薬併用群において、IL - 6の低下傾向が確認された。この結果から炎症性サイトカインの過剰産生を抑える効果がある可能性が示唆された。現在はまだ予備検討の段階であるので、今後母集団を増やしさらなる検討を行っていく予定である。

図3. IPM と Ca-EDTA の併用療法における肝臓内(A)、および血中(B) のIL - 6に対する効果



5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

(雑誌論文) (計 7 件)

1. Dixon N, Fowler RC, Yoshizumi A, Horiyama T, Ishii Y, Harrison L, Geyer CN, Moland ES, Thomson K, Hanson ND.: IMP-27, a Unique Metallo-β-Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*.: Antimicrob Agents Chemother. 査読有 60:6418-6421. 2016 doi: 10.1128/AAC.02945-15.
2. Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo RA, Yamaguchi K, Tateda K.: Molecular analysis of the integrons of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. 査読有 BMC Microbiol. 15:41 2015 doi: 10.1186/s12866-015-0378-8.
3. Yoshizumi A, Ishii Y, Aoki K, Testa R, Nichols WW, Tateda K.: In vitro susceptibility of characterized β-lactamase-producing Gram-negative bacteria isolated in Japan to ceftazidime-, ceftaroline-, and aztreonam-avibactam combinations.: J Infect Chemother. 査読有 21:148-51. 2015 doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.028.
4. Haque A, Yoshizumi A, Saga T, Ishii Y, Tateda K.: ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in environmental water in Dhaka, Bangladesh. J Infect Chemother. 査読有 20:735-737. 2014 doi: 10.1016/j.jiac.2014.07.003.
5. Yoshizumi A, Ishii Y, Iwata M, Murakami H, Yumoto S, Yasui K, Maehara C, Fukuzawa S, Enokizono K, Tateda K.: Daptomycin susceptibility of 833 strains of Gram-positive cocci from a university hospital in Japan (2009-2011). Diagn Microbiol Infect Dis. 査読有 80:151-153. 2014 doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.011.
6. Aoike N, Saga T, Sakata R, Yoshizumi A, Kimura S, Iwata M, Yoshizawa S, Sugawara Y, Ishii Y, Yamaguchi K, Tateda K.: Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan: relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. J Clin Microbiol. 査読有 51:1692-1698. 2013 doi: 10.1128/JCM.03049-12.

7. Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM, Woodford N, Kimura S, Suga T, Harada S, Yamaguchi K, Tateda K.: Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1 β-lactamase.: J Infect Chemother. 査読有 19:992-995. 2013 doi: 10.1007/s10156-012-0528-y.

(学会発表) (計 5 件)

1. Yoshizumi A, Saga T, Aoki K, Ohno A, Ishii Y, Tateda K.: Characterization of CTX-M-151, a Novel Extended-Spectrum β-lactamase from *Enterobacteriaceae*. ASM Microbe 2016, Boston, United States, 2016. 6.19
2. Aoki K, Yoshizumi A, Sugita K, Hasegawa N, Iwata S, Moriya K, Yoshizawa S, Ishii Y, and Tateda K.: A molecular epidemiological study of metallo-β-lactamase producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Japan. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014 (ICAAC2014), Washington D.C., United States, 2014.9.5-9.
3. Aoike N, Saga T, Yoshizumi A, Yoshizawa S, Ishii Y, Yamaguchi K, Tateda K.: Genotypes and quinolone-resistance of clinical *Escherichia coli* isolates harboring Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) gene in a teaching hospital in Japan. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014 (ICAAC2014), Washington D.C., United States, 2014.9.5-9.
4. Ishii Y, Tsutsumi Y, Yoshizumi A, Tateda K.: OP0595, a Novel Serine-β-Lactamase Inhibitor: Enzymatic Studies of OP0595 against Serine-β-Lactamases. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014 (ICAAC2014), Washington D.C., United States, 2014.9.5-9.
5. Yoshizumi A, Ishii Y, Horiyama T, N.M. Moulds, K.S. Thomson, N.D. Hanson, and Tateda K.: Enzymatic property of a novel IMP (IMP-27) Metallo-β-lactamase (MBL) in *Protein mirabilis*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013 (ICAAC2013) Denver, United States 2013.9.10-13

(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:
出願年月日:
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

吉住 あゆみ(YOSHIZUMI, Ayumi) 群馬パ
ース大学・保健科学部・検査技術学科講師
研究者番号: 20602444

(2)研究協力者

なし