

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461525

研究課題名(和文) ヒト培養細胞のカルバペネム系抗菌薬失活効果の解析

研究課題名(英文) An analysis of carbapenem-inactivating effects of human cells

研究代表者

竹村 弘 (Takemura, Hiromu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80301597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、平成22～24年度の科研費研究(課題番号22591114)で、ヒト肺胞上皮細胞株A549の培養上清が、カルバペネム系抗菌薬(Cps)の抗菌活性を低下させる効果(CIE)を持つことを明らかにした。

本研究で、この培養上清中の代謝産物を質量分析し、L-cysteine (L-cys)が強いCIEを示すことが判った。さらに上清中のL-cysの濃度は経時的に増加し、その濃度に従ったCIEが観られた。この現象は培養液中にアミノ酸が無ければ起こらず、血清を添加すれば減弱する。L-cysによるCPsの不活化が生体内で起きるかは不明であるが、CPsの体内動態を考える上で考慮すべきである。

研究成果の概要(英文)：At the study supported by JSPS KAKENHI Grant Number 22591114 from 2012 to 2014, we reported that antimicrobial activities of several carbapenems (Cps) decreased in the supernatants of human alveolar epithelial cell line A549.

In this study, the metabolomics analysis by mass spectrometry of the culture supernatants revealed that they contained L-cysteine (L-cys). We investigated how L-cys derived from A549 cells causes Cps inactivation by examining the correlation between the IPM-inactivating effects (CIE) of the A549 supernatants and the concentration of L-cys. The A549 culture supernatants exhibited CIE according to their L-cys concentrations and FCS inhibited the production of L-cys and CIE. The amino acids in the medium were necessary for the effects, so it is speculated that L-cys derived from the cells was a major potent contributor to the effects. Further studies were necessary to reveal the same inactivation occurs among the cells in the human body.

研究分野：臨床微生物学、感染症学、感染制御学、特に宿主・微生物・抗菌薬の関係性的な実験的な評価を専門とする。

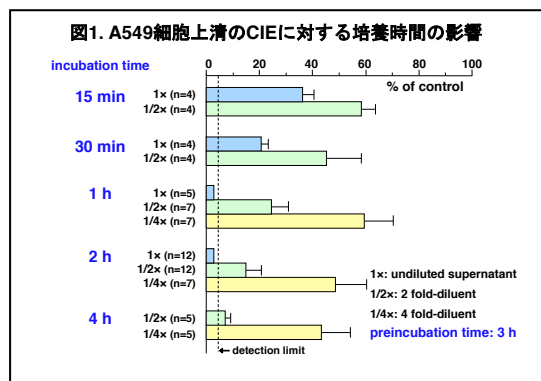
キーワード：細胞 カルバペネム系抗菌薬 不活化 L-cysteine A549

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、多剤耐性アシネトバクター菌 (MDRA) 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。MDRP や MDRA 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すべての抗菌薬に対して耐性を示すスーパー耐性菌とも呼べる菌も少なくない。一方、医療経済的な理由、動物実験や臨床治験の実施の困難性などから、これらのスーパー耐性菌に対する新薬の開発は遅れ、実際に臨床の現場で使用可能になるまでには長い年月と膨大な費用が必要である。その結果、現在臨床の現場で使用可能な抗菌薬の体内動態を考慮して、その投与量や投与間隔を工夫し、より良い治療効果を得ることが注目されるようになった。このような観点から最近、いわゆる PK/PD (Pharmacokinetics/Pharmacodynamics) 理論に基づいた投与方法に関する研究や、好中球、単球/マクロファージ、気道上皮細胞などの様々な培養細胞を用いた試験管内感染実験モデルを用いた研究でより実際の感染巣に近い評価が多く行われるようになった。

研究代表者は、平成 22~24 年度交付の文部科学研究費の基盤(C)の研究である「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 (課題番号 22591114)」で、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞を用いた *Staphylococcus aureus* (SA) 感染実験モデルを用いて、細胞に感染あるいは付着した菌に対する抗菌薬の効果を評価した。この評価系で様々な SA 菌株の各種抗菌薬に対する細胞を伴った SA に対する MIC (CAMIC) を検討していたところ、カルバペネム薬では MIC に比べ CAMIC が極端に高く、細胞が無い場合よりも数 100 倍にも及ぶ値を示すことが判った。この現象は、必ずしも培養細胞と抗菌薬の直接的な相互作用というわけではなく、細胞を無血清の細胞培養用培地中で培養した後に上清を回収し、この上清 (無細胞) にカルバペネム薬を添加しても起こることが判った。すなわちヒト肺胞上皮細胞 A549 の培養系における培養上清が、カルバペネム薬であるイミペネムの抗菌活性を 60 分で 10% 以下に低下させることを明らかにした (図 1)。この成果を抗微生物化学療法の分野で最も権威がある

国際学会である 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2012 Sep., USA San Francisco CA) で発表した。



2. 研究の目的

本研究は、上述の成果をさらに発展させて、この培養細胞のカルバペネム不活化活性 (CIE) について、より安定した活性の評価法を確立し、細胞種や薬剤による CIE の違い、カルバペネム系以外の抗菌薬が細胞から受ける影響、細胞の CIE に影響を与える因子、不活化のメカニズム、などを明らかにすることを目的とし、引いては細胞による不活化を受けにくい条件や投与方法の究明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた基本的な実験

本研究における様々な実験で用いた共通の手順を以下に記載する。

① 培養細胞上清検体の採取

濃度を 5×10^5 /well に調整した細胞を、24 穴のマクロプレートを用いて、RPMI1640 培地 (以後 RPMI) +10%FCS 中で、37°C、5% CO₂、18 時間培養後、培養上清を無血清の RPMI に置換して、5%CO₂、37°C で 0.5~12 時間程度 (多くの実験では 3 時間) 培養し回収する (前培養)。

② カルバペネム薬失活活性 (CIE) の

①で回収した培養上清を RPMI で $\times 1/2$ 、 $\times 1/4$ 倍に希釈後別のマイクロチューブに移し、そこに IPM などのカルバペネム薬等を添加し、37°C、5%CO₂、2-3 時間反応させる。反応を停止させるために、再び RPMI で 10 倍に希釈した反応液を -80°C で凍結保存する。後日反応液中の抗菌薬の抗菌活性、*Micrococcus luteus* (ATCC9341) を用いた microbiological bioassay 法で測定する。

(2) 様々な培養細胞の培養上清の CIE の比較検討

研究の方法(1)で示した実験系で、5種類の異なった由来の培養細胞の上清の CIE を比較検討した。前培養時間は3時間で、抗菌薬は代表的なカルバペネム薬であるイミペネム (IPM) を使用し、IPM との反応時間は2時間。細胞は、ヒト肺胞上皮細胞 A549、ヒト単球細胞 THP-1、ヒト喉頭上皮細胞 HEp-2、ヒト子宮頸部上皮細胞 HeLa229、マウス繊維芽細胞 L929 を使用した。THP-1 については浮遊細胞と 16 nM の phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) で刺激してマクロファージ様に分化させ、24 穴のプラスチック製マイクロプレートに付着させた細胞を用い、両者の上清の CIE の違いについて検討した。

(3) 培養上清中の CIE の原因物質の探索

培養上清の CIE のメカニズムを究明するために、手始めに培養上清中の代謝産物をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS)、液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析計 (LC-TOFMS) で分析した。これらの検査は外注で、(1)-①で示した方法に準じ無血清の RPMI 中で6時間培養した A549 細胞上清を 20-40mL 集め、凍結乾燥することで 10 倍程度に濃縮した検体をヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社へ送付した。対象と比較して、CIE を有した細胞上清検体中に有意に多く存在する物質を絞り込み、その中でも 17 種類の候補物質を選択して、その中で CIE を持った化合物をスクリーニングするための検査を行った。このスクリーニング検査は、検体にカルバペネム薬 (IPM) を添加して 96 穴のマイクロプレート上で *M. luteus* の発育の有無を観て IPM の失活を確認する実験系で、今回新たに確立した方法である。すなわち各々の検体の 1/2 希釈系列に対して、MIC の 2 倍濃度の IPM を添加し、その後に *M. luteus* を接種、24 時間培養後に菌の発育を目視で判定する。菌の発育があるウェルの検体は、IPM を不活化した可能性があるかと判断する。

(4) L-cysteine の定量

研究の方法(3)で示した実験により A549 細胞培養上清の CIE の原因物質の 1 つが L-cysteine (L-cys) であることが明らかにな

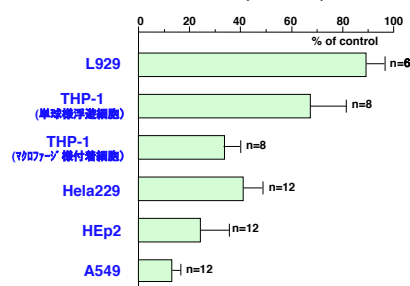
った。そこで研究の方法(1)-①で示した実験系における培養上清中の L-cys を、Ellman 試薬: 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を用いた比色定量法 (Ellman 法) で定量した。RPMI はフェノールレッド不含の製品 (SIGMA R7509) を使用した。Ellman 法 96 穴マイクロプレート上で行い、判定は OD420nm の自動吸光度測定装置を用いた。

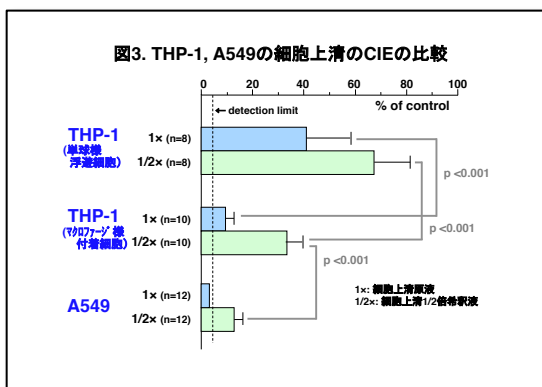
4. 研究成果

(1) 様々な培養細胞の培養上清の CIE の比較検討

研究の方法 (1) -①で示した方法で、抗菌薬としては IPM (32 mg/L) を使用し、5種類の細胞の培養上清を回収後 1/2 倍に希釈した検体の CIE を比較した。それぞれの細胞の細胞上清は異なった程度の CIE を示し、ヒト肺胞上皮細胞である A549 細胞が最も強い CIE ($12.8 \pm 3.7\%$, $n=12$) を示した。それぞれの CIE は Student の t 検定で $p < 0.05$ で有意差があり、マウス由来の細胞である L929 が最も弱い CIE ($88.5 \pm 7.4\%$, $n=6$) を示した (図 2)。L929 の CIE は他のヒト由来の細胞よりも明らかに CIE 活性が弱く、上清の原液で実験しても $70.5 \pm 10.0\%$ ($n=6$) という結果であった。この違いが動物種によるものなのかは判らないが、興味深い知見である。またヒト単球細胞である THP-1 では、PMA 処理をしてマクロファージ様の付着細胞に分化した細胞の方が強い CIE を示した (図 3)。この現象は炎症に起因した様々な刺激によって、細胞由来の CIE が影響を受ける可能性を示唆していると思われた。また浮遊細胞と付着細胞による CIE という可能性もあり、いずれにしろ今後の研究の進展に寄与する興味深い知見であると思われた。

図2. 培養細胞種による細胞上清 (1/2×希釈) のCIEの比較





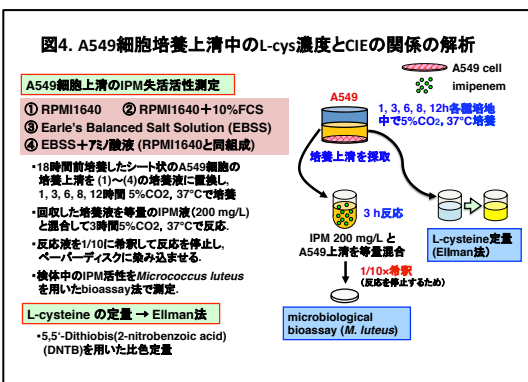
(2) 培養上清中の CIE の原因物質の探索

CIE のメカニズムを究明するために、手始めに培養上清中の代謝産物を CE-TOFMS、LC-TOFMS で分析し、コントロールの RPMI 培地と比較して含有量が明らかに増加した化合物をリストアップした。その中で試薬として入手可能な化合物を 17 種類選別し、研究の方法(3)で記載した方法で、カルバペネムを失活させる物質をスクリーニングしたところ、L-cys を 12.5 μ g/mL (71 μ M) 以上含むウェルで *M. luteus* の発育を認め、A549 細胞培養上清が示す CIE の原因の一つが、L-cys であることが示唆された。L-cys は非必須アミノ酸であるが、食品や医薬品に含まれており、生体内にも普通に存在しているが、RPMI 中には含まれていない。その後 Ellman 法で A549 細胞の培養上清中の L-cys を経時的に計測したところ、培養開始後 1 時間以内に上清中に L-cys が検出され、L-cys を含んだ上清は CIE を示すことが判った。さらに L-cys とカルバペネムについて文献検索したところ、L-cys が IPM を加水分解することを示した論文 (Yoshida M et al. Prediction of the stability of Imipenem in intravenous mixtures. Chem. Pharm. Bull. 61(1) 1-7, 2013) が見つかった。また市販試薬の L-cys を RPMI に溶解し、本実験系に適用すると培養上清と同様に CIE を示すことも確認した。

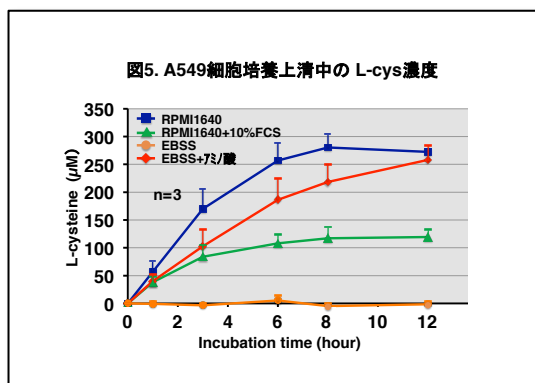
(3) A549 細胞培養上清中の L-cys 濃度と CIE の関係の解析

研究の成果(2)の結果より細胞によって新生される L-cys がカルバペネム薬を失活しているという仮説を立て、それを証明するために以下のような実験を行った。すなわち研究の方法 (1) -①で示した方法に準じて、A549 細胞の培養上清中の L-cys の濃度を経時的に

Ellman 法で計測するとともに、その上清の CIE を測定した。抗菌薬としては IPM (100 mg/L) を使用し、採取後の反応の影響を少なくするために上清検体を採取直後に 1/10 倍に希釈した (図 4)。L-cys 新生に対するアミノ酸や血清の影響を観る目的で、培養液として①RPMI、②10%FCS 添加 RPMI、③Earle 緩衝液 (EBSS)、④アミノ酸添加 EBSS を用い、各々の L-cys 濃度、CIE を比較検討した。

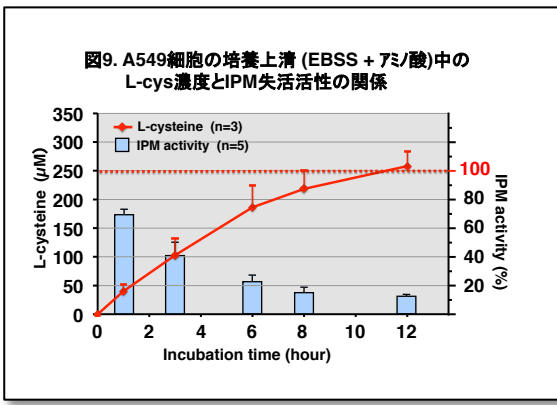
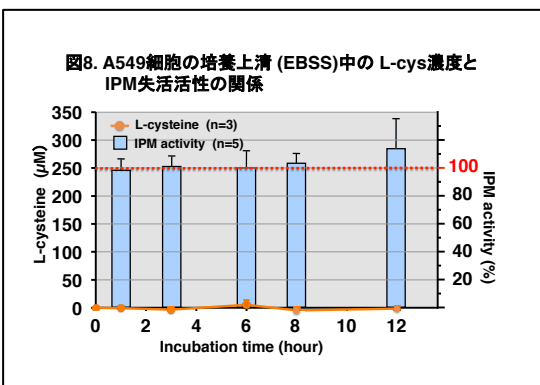
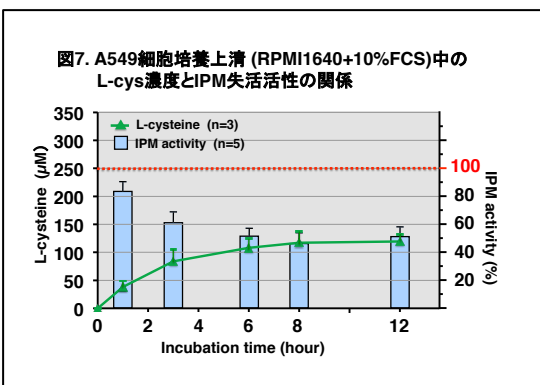
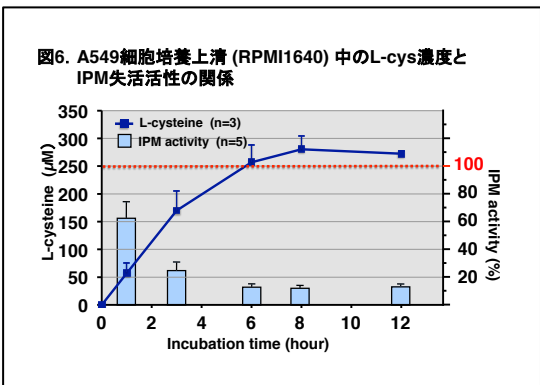


A549 細胞を①-④の培養液中で 1, 3, 6, 8, 12 時間培養し上清を回収し、L-cys の濃度を計測したところ、RPMI (①) 中で最も顕著な L-cys の濃度上昇が観られ、1-8 時間で経時的に濃度が上がったが、12 時間では 8 時間と同程度であった (図 5)。一方アミノ酸を含まない EBSS (③) では 12 時間培養後も、まったく L-cys は検出されず、RPMI と同成分のアミノ酸を添加した EBSS (④) では立ち上がりは少し遅いものの、12 時間後には RPMI と同程度 L-cys が検出された。また 10% FCS を添加した RPMI (②) では各時間で L-cys の濃度が低く、3 時間以降は RPMI (①) の約 50%程度の濃度であった (図 5)。



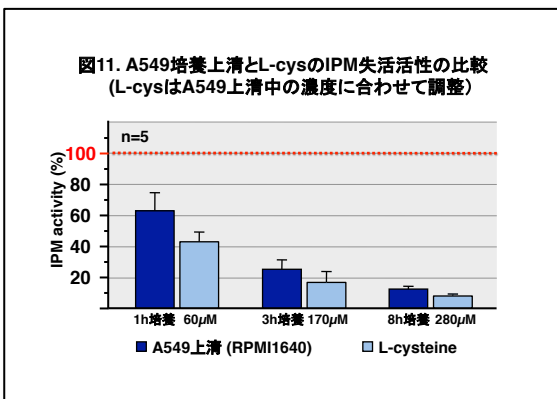
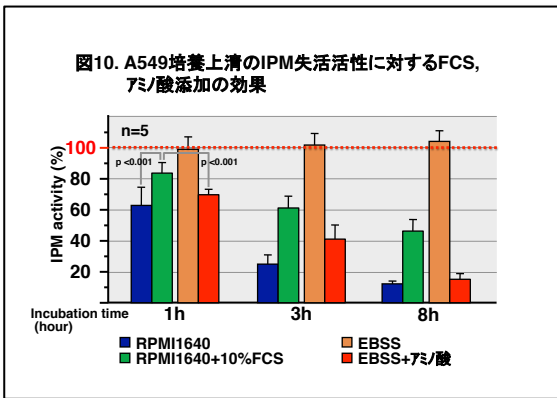
①-④の培養液で培養した上清の CIE を計測したところ、RPMI 培養液 (①) が最も顕著な CIE を示した。CIE は 1 時間後から観ら

れ、3時間、6時間と経時的に強くなり、8時間、12時間では6時間とあまり変化がなかった。このCIEの挙動は培養上清中のL-cysの濃度とほぼ一致しているものと考えられた(図6)。10%FCSを添加したRPMI(②)上清では、前述のようにRPMI(①)と比べてL-cys濃度が低かったが、それに一致してCIEも弱かった。またCIEは、RPMI(①)と同様に1、3、6時間で経時的に増強するものの、8、12時間では増強を認めなかった(図7)。一方アミノ酸を含まないEBSS(③)中では前述のように培養上清中にL-cysは検出されず、CIEも認めなかった(図8)。EBSSにRPMIと同じアミノ酸を加えた培養液(④)では、3時間、6時間のCIEはRPMIと比べて弱かったが、8時間、12時間ではRPMIと同程度のCIEを認めた(図9)。これらの



結果から、すべての培養液で矛盾することなく、CIEとL-cys濃度の挙動が一致していた。

以上をまとめると、1、3、8時間の培養上清のCIEの培養液による違いを比較したところ、すべての時間で有意差をもって10%FCSを添加した培地ではCIEが弱く、アミノ酸非添加の培地ではCIEが観察されないが、アミノ酸を添加するとCIEを示した(図10)。また1、3、8時間の培養上清中のL-cys濃度に合わせて、市販の試薬から調整したL-cys溶液でCIEを測定したところ、同時間の培養上清と比較して若干強いものの同程度のCIEを示した(図11)。



これらの結果より、A549細胞上清によるカルバペネム薬の失活は、上清中に遊離した

細胞由来の L-cys によって起こることが示唆された。L-cys によるカルバペネム薬の不活化が生体内でも起こっているか否かは尚不明ではあるが、細胞由来の L-cys による CIE はカルバペネム薬の体内動態を考える上で考慮すべき興味深い現象であると思われる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

① H. Takemura、他 4 名

Carbapenem-inactivating Effects of L-cysteine Derived from A549 Cells、ASM Microbe2016、2016 年 6 月 19 日、ボストン (米国)

② 竹村 弘、他 3 名、ヒト細胞培養上清の CPs

不活化効果の検討—第 2 報—、第 64 回日本感染症学会東日本地方会総会・第 62 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、2015 年 10 月 23 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

③ 竹村 弘、他 3 名、ヒト細胞培養上清のカルバペネム薬不活化効果の検討、第 88 回

日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、2014 年 6 月 18 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)

④ 竹村 弘、他 6 名、多剤耐性アシネトバク

ターに対する抗菌薬の協調作用の評価法の検討、第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014 年 2 月 1 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 弘 (TAKEMURA, HIROMU)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：80301597