

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09251

研究課題名(和文) 補中益気湯によるMRSAの薬剤感受性の回復メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) ashgd

研究代表者

南 正明 (minami, masaaki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：70418739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまで抗菌剤治療の困難なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する補中益気湯の抗感染症効果として、補中益気湯がMRSAの保有する薬剤耐性遺伝子(mecA)の脱落に関与している可能性が示唆されている。そこで今回補中益気湯によるMRSAのmecAの変化を解析した。補中益気湯を添加して長期培養したMRSA臨床分離株では、mecA遺伝子の脱落を認め、ラクタム系抗菌薬の感受性が上昇した。またマウス鼻腔感染実験でも補中益気湯投与により、MRSA菌株定着の低下を認めた。以上より補中益気湯は、従来の抗菌剤が持つ直接的な除菌効果とは異なった薬剤耐性菌感染症に対する新規治療法の選択枝として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、薬剤耐性細菌性疾患に対する補中益気湯の治療効果を明らかにすることを目的としており、科学的根拠に基づいた漢方薬による治療の新展開が見込まれる。また、本研究で補中益気湯の既存の薬剤には無い耐性遺伝子脱落効果という新作用機序が明らかになったことから、MRSA感染症に対して科学的根拠をもつ漢方薬を用いた新規治療法の確立という社会的に波及効果のある新分野を開拓してだけでなく、その有効成分から新規作用機序を持つ薬剤の開発も展望できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As an anti-infective effect of Hochuekkito (HET) on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), which has been difficult to treat with antibacterial agents, HET may be involved in the loss of the drug resistance gene (mecA) possessed by MRSA. Therefore, we analyzed the changes in mecA gene carrying of MRSA by HET. After MRSA clinical isolates were cultured for a long period with the addition of HET, the mecA gene of bacteria was lost and the susceptibility of β -lactam antibiotics against MRSA was increased. Moreover, HET decreased MRSA colonization in the mouse nasal cavity infection experiment. From our experimental results, we suggest that HET may be novel therapeutic candidate drug for drug-resistant bacterial infections, which is different from the direct bactericidal effect of conventional antibacterial agents.

研究分野：細菌学

キーワード：漢方薬 MRSA mecA

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は、皮膚感染症から化膿性関節炎、肺炎、敗血症さらに毒素性ショック症候群等の重症感染症の原因病原細菌である。黄色ブドウ球菌は、様々な菌体外毒素(プロテアーゼ、DNAアーゼ、溶血毒素)を分泌し、高度なバイオフィーム形成能をもつため、院内感染対策上、特に注意が必要な病原細菌でもある。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、メチシリンに代表されるラクタム系抗菌剤に耐性を示す黄色ブドウ球菌である。MRSAは、細菌染色体上のメチシリン耐性遺伝子領域(SCCmec)内にmecA遺伝子(メチシリン耐性に関与するPBP2'の遺伝子)を有することで、メチシリン耐性を獲得する。MRSAに対しては、バンコマイシンが抗菌治療薬として知られているが、生体には薬剤移行性が低く治療効果が不十分なため、新規治療薬の開発が望まれている。

補中益気湯は、10種類の生薬で構成される本邦の代表的な漢方薬の一つであり、虚弱体質の改善や病後の体力増強などに使用される。MRSA感染症は基礎疾患のある患者に発症することが多いため、補中益気湯は適応薬剤の可能性が高い。

これまでの基礎研究からの補中益気湯の免疫系に対する効果としては、好中球の活性酸素生成能亢進、NK細胞の活性改善、貪食細胞の貪食能改善、マクロファージの活性化、T細胞のIFN- γ 産生亢進、細胞性免疫賦活などの作用が報告されている。しかしこれらの補中益気湯の効果は、全て病原体と宿主の関係での宿主側の影響についての作用である。一方、病原体側への作用については、MRSAに対する補中益気湯によりMRSAの定着率が低下する報告があるものの、直接的な細菌に対する影響は確認されていない。

さらに補中益気湯によるMRSAの除菌効果に関する臨床研究では、脳神経外科領域におけるMRSA保菌者に対して、補中益気湯の投与によりMRSA陰性化が30%から70%に上昇し、また陰性化日数が平均90日から平均45日に短縮したという報告や、喀痰からMRSAが検出された110例に対して補中益気湯または同じ補剤のグループに属する十全大補湯を投与したところ、104例(94.5%)で陰性化していたという報告がある。しかしこれらの著明な除菌効果の改善が補中益気湯による免疫担当細胞の活性化効果だけであるとは考えにくく、別の補中益気湯のMRSA感染症に対する効果が示唆されていた。

2. 研究の目的

薬剤感受性検査においてMRSAが検出されない背景に、MRSAの菌自身が消失したのではなく、あるMRSA菌の薬剤耐性遺伝子であるmecA遺伝子が欠落したことによって、その菌がMRSAとして検出されなくなる可能性がある。よって生体においてMRSAを含む黄色ブドウ球菌を完全に除菌するのは困難であるが、感染したMRSAのmecA遺伝子を薬物によって脱落させることが出来れば、結果的にMRSAを消失させることが可能となり、MRSA感染対策となるという仮説を考えた。そこでこの仮説を検証するために補中益気湯によりMRSAのmecA遺伝子が脱落するかについて検討を行った。

3. 研究の方法

名古屋市立大学医学部細菌学教室に保存してあるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の臨床分離株 100 株を使用する。この臨床分離株の菌から遺伝子染色体を抽出して PCR 法とシークエンス法により *mecA* 遺伝子の塩基配列による *mecA* タイピングを行なった。

漢方薬・補中益気湯は 10 種類の構成生薬（人参、大棗、白朮、柴胡、黄耆、甘草、当帰、生姜、陳皮、升麻）をまとめて、沸騰水中で煎じることで、熱水抽出エキスを調製した。

MRSA 保存臨床分離株を LB 培地により培養した後に、補中益気湯エキスを添加した LB 寒天培地に塗布して、37℃ で培養する。1 週間ごとに培地から菌を一部回収して、菌のオキサシリンに対する薬剤感受性を disk 拡散法で評価した。現在の本邦における MRSA の病原診断方法は、薬剤感受性試験結果に基づく判定が主で、各医療施設において日常的に実施されている同定試験法により、黄色ブドウ球菌と判定され、かつ、NCCLS 仕様の disk 拡散法を用いた場合には、同様の培養条件下でオキサシリンの阻止円の直径が 10mm の場合に MRSA と判定されるので、この方法に準拠して行なった。また、菌から染色体遺伝子を抽出し、*mecA* 遺伝子の保有を PCR 法とダイレクトシークエンス法で確認した。耐性遺伝子の脱落と判断基準は薬剤感受性法によるオキサシリンに対する耐性から感受性への変化、並びに遺伝子検出法による *mecA* 遺伝子検出の陰性化によるものとした。この結果より臨床分離株 100 株中で、補中益気湯エキスによる耐性遺伝子脱落する臨床分離株を樹立した。

そしてこの臨床株を用いて補中益気湯エキス添加前後での菌の変化について、以下のよう
に 2 項目について検討した。

(1) 補中益気湯エキスによる遺伝子脱落 MRSA の脱落前後の菌の薬剤感受性パターンを、disk diffusion 法で測定して、アンピシリン、イミペネム、エリスロマイシン、ミノサイクリン、シプロフロキサシンに対する耐性パターンの変化を確認した。

(2) 細菌の耐性遺伝子の脱落には、細菌染色体切除を触媒する *CcrAB* 遺伝子が関与している可能性があるとの報告があるので、遺伝子脱落前後の遺伝子発現を比較した。遺伝子脱落前後の MRSA の total RNA を抽出して、リアルタイム RT-PCR 法で *CcrAB* 遺伝子の発現を測定することで、遺伝子発現レベルでの補中益気湯エキスが関与を確認した。

また補中益気湯エキスによるマウス鼻腔内 MRSA 感染実験による保菌の改善効果の評価を行なった。MRSA 株を 10^7 CFU の菌液を 6 週齢の Balb/C マウスの鼻腔に経鼻感染させた。マウスに経鼻感染させる時には、除痛のためにイソフルレンによる麻酔を行なった。補中益気湯エキスは、体重換算でヒトの常用量の 5, 10, 20 倍量を、感染直後からゾンデ法で経口投与し、4 日間飼育した。感染後は、1 日ごとに全身状態を観察し、体重測定を行った。その後マウスを既定の飼育終了後、安楽死させ、マウス鼻腔から黄色ブドウ球菌をマッコンキー寒天培地で分離した。その後分離された黄色ブドウ球菌について、(1)MRSA 選択培地での培養法、(2)菌から染色体を抽出して *mecA* 遺伝子の保有の確認を PCR 法とダイレクトシークエンス法で行い、分離された菌が MRSA かどうかの確認をした。黄色ブドウ

球菌の感染状態のマウスの鼻腔の評価方法は、感染マウスの鼻腔から鼻腔洗浄液を採取して、MRSA 選択培地で培養することでそのコロニー数を測定した。

4 . 研究の成果

保存臨床分離株から補中益気湯により mecA 遺伝子が脱落する菌株 (DD 1 4 7 株) を樹立できた。この菌株は補中益気湯添加 LB 培地で 5 日後にはオキサシリン感受性が上昇しており、mecA 遺伝子が脱落していた。この菌株の mecA タイピングは a だった。DD 1 4 7 株で補中益気湯処理前と処理後で、薬剤感受性の変化を確認したところ、アンピシリン、イミペネム、エリスロマイシン、ミノサイクリン、シプロフロキサシン全てで薬剤感受性が上昇していた。特にアンピシリンとシプロフロキサシンが処理前は耐性であったが、処理後には感受性に变化しており、補中益気湯がラクタム系以外の薬剤の感受性を上昇させることが示唆された。この遺伝子脱落に關与する CcrAB 遺伝子の発現について、リアルタイム RT-PCR 法を行ったところ、補中益気湯処理前と比べて処理後では Ccr 遺伝子の発現が上昇していたことから、MRSA の mecA 遺伝子の脱落には補中益気湯が Ccr 遺伝子の発現の活性化を介して關与していることが示唆された。またマウス MRSA 鼻腔感染モデルでも補中益気湯の抗鼻腔保菌効果を検討した。この動物実験の觀察期間を通して死亡例は認められなかった。補中益気湯を内服させたマウス群では、無処理群と比較して、鼻腔内の MRSA のコロニー数が著明に低下していた。この効果は補中益気湯の投与量に依存していた。動物実験の結果から補中益気湯が MRSA 鼻腔保菌を低下させることが明らかになった。

更なる詳細な研究検討は必要ではあるものの、本研究は既存の薬剤にはない耐性遺伝子脱落効果という新しい作用機序を、漢方薬である補中益気湯が示しているという先鞭をつけることができたので、今後この成果をもとに、MRSA 感染症に対して科学的根拠をもつ漢方薬を用いた新規治療法の確立という社会的に波及効果のある新分野を開拓していくだけでなく、補中益気湯に含まれる有効成分から新規作用機序を持つ薬剤の開発も展望できると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minami M, Konishi T, Makino T.	4. 巻 5(3)
2. 論文標題 Effect of Hochuekkito (Buzhongyiqitang) on Nasal Cavity Colonization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Murine Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicines (Basel).	6. 最初と最後の頁 pii: E83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines5030083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南正明, 牧野利明
2. 発表標題 補中益気湯によるMRSAの薬剤感受性回復と病原毒素抑制効果の検討
3. 学会等名 和漢医薬学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	牧野 利明 (makino toshiaki) (80326561)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	