

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19585

研究課題名(和文) 耐性菌時代における既存抗菌薬のリバイバル使用の検討

研究課題名(英文) Revival use of existing antibiotics for antimicrobial resistant organisms

研究代表者

萩谷 英大 (Hagiya, Hideharu)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30718531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の台頭は世界の公衆衛生に対する脅威である。新規抗菌薬の開発が滞る中、我々は既存抗菌薬のリバイバル使用による新たな薬剤耐性菌治療の可能性を模索した。本研究ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌に注目し、セファマイシン系抗菌薬であるセフメタゾールがカルバペネマーゼに対する阻害剤として機能し、カルバペネム(メロペネム)の有効性を維持できるかどうかという点を検討した。その結果、NDM型のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌について実験系内では併用効果が期待されることが判明した。今後、動物実験、臨床研究等を通して実際に臨床的な有効性が期待できるか検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistance, especially carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), is an ongoing problem that globally undermines medical settings. Considering the high cost of developing new classes of antibiotics, “revival use” of existing antimicrobial agents provides another option to combat the highly resistant microorganisms. In this study, we assessed in vitro efficacy of combination therapy with meropenem and cefmetazole against various carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. We applied standard checkerboard and time-kill assays, and revealed a therapeutic possibility of this new combination therapy. Further research on the pharmacokinetic and pharmacodynamics utility, as well as optimal therapeutic regimen and clinical outcomes, should be warranted.

研究分野：感染症治療

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 セファマイシン セフメタゾール メロペネム 併用療法

1. 研究開始当初の背景

1940 年台にペニシリンが開発・応用されて以来、これまでに多種多様な抗菌薬が臨床現場で使用されるようになった。我々は抗菌薬による多大な恩恵を享受し感染症の脅威は去ったかのように思われてきた。しかし、感染症の制圧が抗菌薬の開発で達成されたとは言い難く、依然として感染症は世界規模で我々にとって脅威であり続ける。

中でも薬剤耐性菌問題は世界が協力して解決すべき喫緊の課題と考えられている。これまで、我々は薬剤耐性菌問題に対して新規抗菌薬を開発することで対応してきたが、新規開発数は漸減し 2008 年から 2012 年の 5 年間ではわずか 2 薬剤が承認されたにすぎない。この現実を受けて、米国では“Bad bugs, Need Drugs 10×2020”として、2020 年までに耐性菌に有効な抗菌薬を 10 薬剤開発することを目標に掲げている。また欧州では製薬会社と欧州製薬団体連合会が共同し、官民での新薬開発に向けた協力体制を構築している。本邦においても平成 26 年 5 月に日本化学療法学会、日本感染症学会、日本臨床微生物学会、日本環境感染学会、日本細菌学会、日本薬学会の 6 学会から新規抗菌薬の開発に向けた提言がなされ、行政・企業・大学などの研究機関が協力して新規抗菌薬開発のための対策を講じる必要性が強調されている。しかし新規抗菌薬の開発には莫大な費用と時間がかかることから、世界的に多くの製薬会社とその開発から撤退しているのが現状である。

2. 研究の目的

こうしたことを背景に、我々は既存抗菌薬の適正使用およびそのリバイバルを模索する段階に来ていると考えている。臨床現場における既存抗菌薬の適正使用はこれまで以上に強調することが重要であるが、現在進行形の耐性菌問題に対しては解決策となりえない。本研究では、臨床的に問題となる多剤耐性菌に対する既存抗菌薬のリバイバルの再検討を主眼とし、主に実験室レベルでの抗菌薬併用効果の検討を行うこととした。

本研究では多種多様な薬剤耐性菌の中でも、最も注目されているカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)を対象とした。その理由は、本耐性菌がこの 10 年間で世界中に急速なスピードで拡散する新興感染症であり、早急な対策が必要とされているためである。

CRE 治療として確立しつつあるダブルカルバペネム療法を参考に、新たな罎薬剤としてセファマイシン系抗菌薬に着目した。セファマイシン系抗菌薬は基質拡張型ラクタマーゼ(ESBL)に非常に安定であり分解を受けない。一方で、カルバペネマーゼには分解されるため、ESBL 存在下でもカルバペネマーゼに対する罎機能を維持できると推測した。セファマイシン系抗菌薬であるセフメタゾール(CMZ)がカルバペネマーゼに対する

罎として機能し、カルバペネム(メロペネム)の有効性を維持できるかどうかという点を検討した。

3. 研究の方法

対象株：CRE の中でも世界的に広く分布し、薬剤耐性度が高い NDM 産生株および KPC 産生株について、臨床由来株および標準株を用いた。対象株については一般に臨床で応用されている薬剤感受性試験用機器 (MicroScan WalkAway 96 Plus [BECKMAN COULTER, Brea, CA], Dryplate [Eiken]) を用いて実施し、他系統の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌であることを確認した。

最小発育阻止濃度(MIC)測定: CLSI (M07-A10) 基準に従い、各 CRE 株のメロペネム(MEPM)およびセフメタゾール(CMZ)の MIC を測定した。

チェッカーボード法による併用効果の検討: MEPM および CMZ の 2 倍希釈系列をそれぞれ作成し、96 穴プレート内で混合した。カチオン調整した Mueller Hinton Broth を用いて最終接種菌量が 5.0×10^5 CFU/mL となるように調整し、37 °C で 18-20 時間培養した。Fractional inhibitory concentration index (FICI) を算出し、FICI 0.5 以下を相乗効果あり(Synergistic)と定義して、MEPM/CMZ の併用効果を検討した。またカルバペネマーゼ阻害剤の比較対象としてエルタペネム(ERT)を用いた。

殺菌曲線実験:

次に、MEPM/CMZ 併用における殺菌効果を検証した。試験菌は Mueller-Hinton agar 培地で一夜 37 °C にて発育させ、新鮮なカチオン調整 Mueller Hinton Broth で初発菌濃度を 3×10^5 CFU/mL とした。菌液 10 mL を試験管に入れ、MEPM および CMZ についてそれぞれ 0.5 MIC 相当の濃度になるように抗菌薬液を加えた(MEPM 単独・CMZ 単独・MEPM/CMZ 併用)。初発菌数は薬剤を加える直前の菌液を適宜希釈し寒天培地に塗抹し、一夜培養後に生菌数をカウントした。35 °C で継続的に培養し、培養開始後 2-4-8-24 時間の各々のポイントでサンプリングし、同様に寒天希釈法によって生菌数を計測した。接種菌量よりも $3 \log_{10}$ CFU/mL の菌数減少が認められた場合に殺菌効果(bactericidal)とし、殺菌効果が 24 時間持続した場合にシナジー効果(synergistic)と定義した。

4. 研究成果

NDM 産生株に対する MEPM/CMZ 併用効果:

- 1) チェッカーボード法
臨床由来 12 株及び NDM-1 産生標準株 (BAA-2469) に対して、MEPM/ERT 併用では相乗効果は見られなかった。一方で、MEPM/CMZ 併用では 13 株中 12 株 (92.3%)

で併用効果が認められた。

No.	NDM-type	Checkerboard assay	
		MEPM & ERT	MEPM & CMZ
1	NDM-5	Indifferent	Synergistic
2	NDM-5	Indifferent	Indifferent
3	NDM-5	Indifferent	Synergistic
4	NDM-4	Indifferent	Synergistic
5	NDM-7	Indifferent	Synergistic
6	NDM-4	Indifferent	Synergistic
7	NDM-1, 5	Indifferent	Synergistic
8	NDM-4	Indifferent	Synergistic
9	NDM-5	Indifferent	Synergistic
10	NDM-5	Indifferent	Synergistic
11	NDM-4	Indifferent	Synergistic
12	NDM-5	Indifferent	Synergistic
13*	NDM-1	Indifferent	Synergistic

*標準株 (BAA-2469)

2) 殺菌曲線実験

% Bactericidal	4 h	8 h	12 h	24 h
0.5xM IC M EPM	7.7%	7.7%	0	0
0.5xM IC CM Z	0	0	0	0
0.5xM IC M EPM plus	61.5%	38.5%	38.5%	30.8%
0.5xM IC CM Z	(8/13)	(5/13)	(5/13)	(4/13)

本実験により、NDM 産生 CRE に対する CMZ 併用療法の有効性が期待される。CMZ は日本では ESBL 産生腸内細菌科最近の治療に広く応用されており、安全性・経済性の面で acceptable である。

一方で、臨床応用に向けて解決すべき点がある。まずは併用効果を実際に得るために達成すべき血中濃度のシミュレーションが必要である。またカルバペネマーゼ量と基質として働く CMZ 量の兼ね合いで、inoculum effect が問題となる可能性がある。また AmpC beta-lactamase 大量産生株など CMZ を分解する他のラクタマーゼの存在下では併用効果を失う可能性がある。さらに排出ポンプやポーリン欠損などの CMZ の浸透性を減じる他の耐性メカニズムの併存も CMZ 併用療法の効果に影響する可能性がある。

CRE に対する治療戦略の構築は急務である。新規抗菌薬の開発が厳しい現状では、現在使用可能な薬剤を“賢く”使用する必要がある。コリスチン・チゲサイクリン・フォスフォマイシン・ダブルカルバペネム療法などに加え、我々の CMZ 併用療法が CRE 感染症に有効である可能性がある。今後、動物実験、臨床研究等を通して実際に臨床的な有効性が期待できるか検討していく予定である。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Hideharu Hagiya, et al.

“*In vitro* efficacy of Meropenem-Cefmetazole combination therapy against NDM-producing *Escherichia coli*”

The 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (2017 年 4 月 22-25 日)

於ウィーン(オーストリア)

Hideharu Hagiya, et al.

“*In vitro* efficacy of Meropenem-Cefmetazole combination therapy against KPC-2-producing *Enterobacteriaceae*”

The ASM Microbe 2017

(2017 年 6 月 1-5 日)

於ニューオーリンズ(米国)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

萩谷 英大 (HAGIYA, Hideharu)

大阪大学・医学部・助教

研究者番号：30718531