

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19590

研究課題名(和文) 殺菌作用の増強と毒素産生の抑制を目的とした抗菌薬併用のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of combining antibacterial therapy led to enhancement of bactericidal activity and suppressing toxin production

研究代表者

諸角 美由紀 (Morozumi, Miyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40383559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 侵襲性感染症由来の肺炎球菌と 溶血性レンサ球菌に対し、作用標的が異なる β -ラクタム系薬とアミノ配糖体薬であるゲンタマイシン(GM)とを同時に作用させると、明らかな殺菌効果の増強が認められた。薬剤単独作用時と併用時の菌体内部構造の変化を透過型電子顕微鏡を用いて観察・比較したところ、併用時には明らかな異常像が観察された。また、LC/MS/MSを用いて細胞内のGM濃度を測定したところ、単独時にはGMはほとんど菌体内へ取り込まれなかったが、 β -ラクタム系薬との併用時には細胞内GMの濃度は明らかに高まっていた。

以上の成績から、薬剤の併用によって殺菌性の増強が生じると結論された。

研究成果の概要(英文)： Combinational chemotherapy of β -lactam and aminoglycoside antibiotics, which are having different action targets, synergistically increased bactericidal activity against β -hemolytic streptococci and Streptococcus pneumoniae isolated from patients with invasive infection. Morphologic changes after exposure to the agents were observed by transmission electron microscopy. Obvious abnormal image was observed after exposure to β -lactam and/or aminoglycoside antibiotics. In addition, GM concentration in the cells was measured using LC/MS/MS, resulting GM concentrations in the cells increased when it was combined with β -lactam antibiotics than the alone.

These results suggest that combining β -lactam antibiotics with GM led to enhancement of bactericidal activity.

研究分野：細菌学

キーワード：Streptococcus agalactiae 併用効果 殺菌作用の増強 併用メカニズム

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国においては、超高齢化社会の到来に伴い、市中で発症する重症の呼吸器感染症が増加してきている。それらの原因菌として、肺炎球菌と溶血性レンサ球菌等のグラム陽性レンサ球菌による重症感染症が注目されている。また、発症から数日での死亡例の多いことも特徴である(肺炎球菌: 22%, GAS: 21%, GBSとSDSE: 13%) (文献1)。QOLの低下を来すことなく救命するには、迅速診断法の確立と同時に、投与抗菌薬の優劣が予後を左右する。しかし、わが国ではほとんどの症例に対し、自国で開発された注射用セフェム薬が使われているのが実態である。

(2) また、肺炎球菌や溶血性レンサ球菌による侵襲性感染症では、細菌から多くの病原性因子が菌体外へ産生され、それらがトリガーとなって宿主であるヒトに急速なDICやショック状態が惹起される。これらへの対応には、**殺菌性に優れた抗菌薬の使用のみならず、それによって菌体外へ放出される毒素の産生量をいかに抑えるかも極めて重要**となると考えた。しかし、これらの感染症に対して**併用療法が明確に理論づけられた論文や抗菌薬療法に関するガイドライン**はない。

2. 研究の目的

申請者は、起炎菌として口腔レンサ球菌が多い心内膜炎の治療にβ-ラクタム薬とアミノ配糖体薬の併用が推奨されていることに着目した(文献2)。本来、アミノ配糖体薬はレンサ球菌に感受性を有していないにもかかわらず、併用による治療効果があるとされている点である。

既にパイロット研究として対象菌株を用いた基礎研究を開始したが、極めて優れた併用効果が普遍的に得られることをみいだした。この**併用メカニズムの成因を理論的に明らかにし、臨床応用へ結びつけること**

が本研究の目的である。

(1) **併用による殺菌効果増強の解析**: 既に収集されている侵襲性感染症由来の肺炎球菌、A群溶血性レンサ球菌(GAS)、B群溶血性レンサ球菌(GBS)、C、G群溶血性レンサ球菌(SDSE)、非溶血性レンサ球菌について、それぞれに対するβ-ラクタム薬(PCG, ABPC, CTX)の最小発育阻止濃度(MIC)の1, 2, 4倍濃度と、微量濃度のアミノ配糖体薬(GM, AMK, ABK)とを加え、継時的に生菌数を測定、両薬剤単独と併用時の殺菌効果を比較する。特に、臨床的に問題となっている耐性肺炎球菌(PRSP)と耐性GBS(PRGBS)で併用効果の有無を検討する。

(2) **透過型電子顕微鏡による形態観察**: それぞれの薬剤を単独に作用させた被験菌と併用時の被験菌の内部構造の変化を比較する。アミノ配糖体薬によりタンパク合成が阻害されるとリボソーム粒子が崩壊し、独特の変化が生ずるはずである。本来アミノ配糖体薬の取り込みがないとされるグラム陽性レンサ球菌において併用効果がみられれば、先ずβ-ラクタム薬の作用によって標的の細胞質膜が脆弱化し、膜に無数の間隙ができるため、その間隙を通してアミノ配糖体薬が菌体内へ取り込まれ、標的であるリボソームへ結合してタンパク合成が阻害されていると推定される。このことよって、**本来菌体内へ取り込まれないはずのアミノ配糖体薬が微量であっても併用効果を発揮する**という仮説である。

(3) **マイクロアレイによる毒素産生阻害の測定**: 肺炎球菌や溶血性レンサ球菌は多くの毒素を産生し、炎症反応が増強されるが、マイクロアレイを用いてその産生がアミノ配糖体薬の併用により低下することを証明する。

(4) **動物モデルによる併用効果の実証**: マウスを用いた肺炎あるいは大腿部感染モデルを構築し、併用効果のあることを実証す

る。

3. 研究の方法

(1) **併用による殺菌効果増強の解析:** 現在, EDP-II を保持しない, つまりアミノ配糖体薬をエネルギー依存的に菌体内へ取り込むことのできない肺炎球菌, 溶血性レンサ球菌 (GAS, GBS, SDSE) と心内膜炎の起炎菌となる非溶血性レンサ球菌 10 株ずつを対象とする。それぞれ β -ラクタム薬とアミノ配糖体薬の併用時における経時的殺菌効果を詳細に測定する。

(2) **形態変化の観察:** 超薄切片を作成して微量のアミノ配糖体薬添加により, リボソームの崩壊とタンパク合成が阻害されているか否かを観察する。本来アミノ配糖体薬の取り込みが不可能とされるグラム陽性レンサ球菌においてタンパク合成阻害が推定できれば, β -ラクタム薬の標的である細胞質膜が脆弱化し, 膜にできた間隙からアミノ配糖体薬が菌体内へ取り込まれている証左になる。その結果として, アミノ配糖体薬が標的のリボソームへ結合してタンパク合成が阻害されていると推定される。

(3) **液体クロマトグラフィ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) による菌体内 GM 濃度の測定:** β -ラクタム系薬とアミノ配糖体薬を併用した時に, アミノ配糖体薬が菌体内に取り込まれていることを LC/MS/MS を用いてその濃度を測定する。薬剤を作用させて培養した菌を集菌し, 菌体を超音波処理した後, 超遠心によって細胞壁成分等を除去した後, 菌体内に取り込まれた GM の濃度を測定する。

4. 研究成果

(1) **併用による殺菌効果増強の解析:** 侵襲性感染症由来の肺炎球菌と 溶血性レンサ球菌 (GAS, GBS, SDSE) に対し, β -ラクタム系薬 (ABPC, CTX) の最小発育阻止濃度 (MIC) の 2-4 倍濃度と, 微量濃度 (1-2 $\mu\text{g/ml}$) の

アミノ配糖体薬 (GM, ABK) とを作用させ, 2, 4, 6 時間後の継時的生菌数の変化を測定した。 β -ラクタム系薬を単独で作用させた場合と, アミノ配糖体薬を併用した場合, 併用 4 時間後には単独作用時に比べ 10^1 - 10^3 の明らかな殺菌効果の増強が認められた。臨床的に問題となっている PRSP と PRGBS においても明らかな併用効果が認められた (図 1) (文献 3)。

β -ラクタム系薬とアミノ配糖体薬のいずれかを先に作用させ, 2 時間後にもう一方の薬剤を作用させた場合, あるいは両薬剤を同時に作用させた場合の殺菌作用を比較すると, β -ラクタム系薬を先に作用させた方が強い殺菌性が認められた。アミノ配糖体薬を先に作用させた場合には殺菌効果の増強は認められなかった。

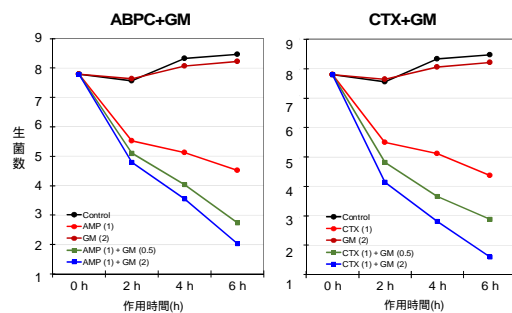


図 1 PRGBS に対する β -ラクタム系薬と GM の併用. 敗血症由来: 莢膜 III 型, 感受性: ABPC (0.25 $\mu\text{g/ml}$), CTX (1.0 $\mu\text{g/ml}$), GM (64 $\mu\text{g/ml}$)

(2) **透過型電子顕微鏡による形態観察:** 薬剤単独作用時と併用時の菌体内部構造の変化を透過型電子顕微鏡によって比較した。併用時の形態変化の観察では, β -ラクタム系薬による菌の伸長化と細胞壁の肥厚とともに, タンパク合成阻害によると考えられる菌体内低密度変化とそれに伴う DNA 合成の明らかな異常と思われる変化が認められた (図 2)。これらの形態変化は, 先ず β -ラクタム系薬の作用によりその作用標的である細胞壁が

脆弱化し，膜に無数の間隙ができるため，その間隙を通してアミノ配糖体薬が菌体内へ取り込まれ，その標的であるリボソームへ結合してタンパク合成が阻害されると推定された。

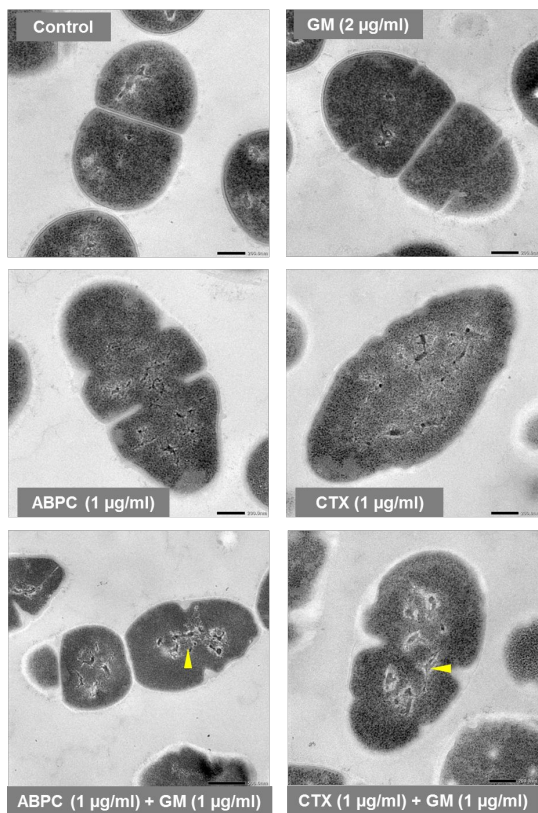


図2 薬剤作用時のGBSの形態変化

(3) **液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) による菌体内GM濃度の測定**：各薬剤を作用させて培養した菌を集菌し，菌体を超音波処理した後，超遠心によって細胞壁成分等を除去した後，菌体内に取り込まれたGM濃度を測定した。単独投与時および併用時の両者を比較したが，GM単独時には薬剤がほとんど菌体内へ取り込まれていなかったが， β -ラクタム系薬との併用時には細胞内のGM濃度は明らかに高まっていた(図3)(文献3)。

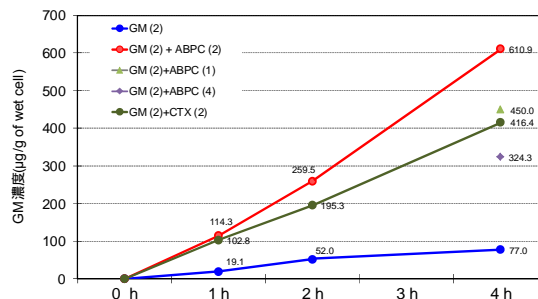


図3 GBS細胞内へのGMの取り込み

以上の成績から， β -ラクタム系薬の作用により作用標的である細胞壁が脆弱化し，膜に無数の間隙ができると，その間隙を通してアミノ配糖体薬が菌体内へ取り込まれ，その標的であるリボソームへ結合してタンパク合成が阻害されると推定された(図4)。

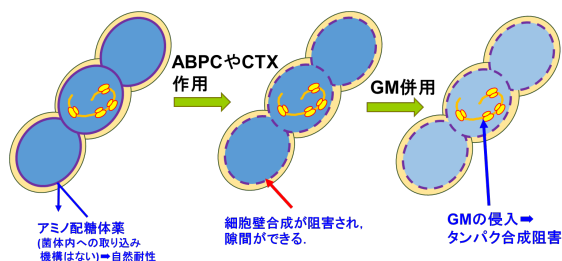


図4 併用効果発現のメカニズム

<引用文献>

厚生労働科学研究費補助金「新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業」
「重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析,その診断・治療に関する研究(H22 新興 一般 013)」. 研究代表 生方 公子. 平成 22-24 年度総合研究報告書. 感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン Guidelines for the Prevention and Treatment of Infective Endocarditis (JCS 2003). Circulation Journal Vol. 67, Suppl. IV, 2003.

Ebara Y, Morozumi M, Sato M, Moritoki N, Toyofuku M, Takata M, Murata M, Ubukata K, Iwata S. Enhancement of bactericidal activity against group B streptococci with reduced penicillin susceptibility by uptake of gentamicin into cells resulting from combination with β -lactam antibiotics. J Infect Chemother. 2017; 23: 312-318.

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 2 件)

Ebara Y, Morozumi M, Sato M, Moritoki N, Toyofuku M, Takata M, Murata M, Ubukata K, Iwata S. Enhancement of bactericidal activity against group B streptococci with reduced penicillin susceptibility by uptake of gentamicin into cells resulting from combination with β -lactam antibiotics. J Infect Chemother. 査読有. 2017; 23: 312-318.

DOI:10.1016/j.jiac.2017.02.010.

Morozumi M, Wajima T, Takata M, Iwata S, Ubukata K. Molecular Characteristics of Group B Streptococci Isolated from Adults with Invasive Infections in Japan. J Clin Microbiol. 査読有. 2016; 4: 2695-2700. DOI:10.1128/JCM.01183-16.

[学会発表](計 11 件)

諸角 美由紀. ベーシックレクチャー8 少子・高齢化社会における GBS 感染症の本質的变化. 第 91 回日本感染症学会総会・第 65 回日本化学療法学会学術集会合同学会. 2017 年 4 月 8 日. 京王プラザ

ホテル(東京都・新宿区).

江原 佳史, 諸角 美由紀, 高田 美佐子, 生方 公子, 岩田 敏. B 群レンサ球菌に対するラクタム薬と GM 併用効果は GM の取り込みによる. 第 48 回日本感染症学会総会・学術集会. 2016 年 11 月 19 日. 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市).

諸角 美由紀, 高田 美佐子, 江原 佳史, 安藤 万里子, 足立 容子, 生方 公子, 岩田 敏. A 群・G 群溶血性レンサ球菌に対する β -ラクタム系薬とアミノ配糖体薬の併用効果. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2016 年 10 月 28 日. 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市).

Toyofuku M, Morozumi M, Hida M, Gotoh A, Sakata H, Satoh Y, Shiro H, Ubukata K, Iwata S. Multicenter study of the incidence and risk of group B streptococcal colonization in neonates in Japan. European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) 2016 (poster). 2016 年 5 月 12 日. Brighton (England).

豊福 明和, 諸角 美由紀, 佐藤 厚夫, 後藤 安那, 坂田 宏, 佐藤 吉壮, 城 裕之, 生方 公子, 岩田 敏. 母体 B 群溶血性レンサ球菌(GBS)保菌は生後 1 か月における児の GBS 保菌のリスク因子~多施設コホート内症例対照研究より~. 第 90 回日本感染症学会総会. 2016 年 4 月 15 日. 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

三谷 麻里絵, 長田 枝利香, 江原 和美, 本田 堯, 荒木 耕生, 後藤 正之, 榎林 敦, 津村 由紀, 安蔵 慎, 番場 正博, 諸角 美由紀, 生方 公子, 岩田 敏. 遅発型 B 群溶血性レンサ球菌(GBS)による敗血症・髄膜炎に対してアンピシリンとゲンタマイシンの併用が有効であった 1 例. 第

47 回日本小児感染症学会総会・学術集会 .
2015 年 11 月 1 日 .ザ・セレクトン福島 ,
ホテル福島グリーンパレス , コラッセふ
くしま (福島県・福島市).

諸角 美由紀, 豊福 明和, 高田 美佐
子, 後藤 安那, 坂田 宏, 佐藤 吉壮,
城 裕之, 生方 公子, 岩田 敏.

Real-time PCR による新生児 GBS 感染症
予防のための保菌およびその莢膜型の
迅速検索法確立 . 第 64 回日本感染症学
会東日本地方会総会学術集会 . 2015 年
10 月 22 日 . ロイトン札幌 (北海道・札
幌市).

Morozumi M, Ebara Y, Takata M, Chiba
N, Murata M, Ubukata K, Iwata S.
Enhancement of Bactericidal Effect by
Combination of Aminoglycoside
Antibiotics with β -Lactam Agents for
Penicillin-Resistant Group B
Streptococci (PRGBS). 55th
Interscience Conference on
Antimicrobial Agents and
Chemotherapy (ICAAC) (poster), 2015
年 9 月 19 日 . San Diego (USA).

諸角 美由紀, 江原 佳史, 高田 美佐
子, 千葉 菜穂子, 生方 公子, 村田 満,
岩田 敏. 成人侵襲性感染症由来の B 群
溶血性レンサ球菌の莢膜型別, MLST, お
よび耐性遺伝子解析 . 第 89 回日本感染
症学会総会 . 2015 年 4 月 17 日 . 国立京
都国際会館 (京都府・京都市).

諸角 美由紀, 千葉 菜穂子, 江原 佳
史, 高田 美佐子, 生方 公子, 岩田 敏.
高度耐性肺炎球菌を含む PRSP に対する
 β -ラクタム系薬とアミノ配糖体薬の併
用効果 . 第 89 回日本感染症学会総会 (ポ
スター発表). 2015 年 4 月 17 日 . 国立京
都国際会館 (京都府・京都市).

江原 佳史, 諸角 美由紀, 高田 美佐子,
千葉 菜穂子, 生方 公子, 村田 満, 岩

田 敏. ペニシリン軽度耐性 B 群溶血性
レンサ球菌 (PRGBS) に対する抗菌薬併
用効果とその機序に関する検討 . 第 89
回日本感染症学会総会 (ポスター発表).
2015 年 4 月 17 日 . 国立京都国際会館 (京
都府・京都市).

〔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

諸角 美由紀 (MOROZUMI, Miyuki)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号 : 40383559

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()