

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09947

研究課題名(和文) ヒト細胞培養由来L-cysteineによる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 L-cysteine derived from human cultured 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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：平成25～27年度交付の文部科学研究費の基盤(C)の研究(課題番号25461525)で、A549などの培養細胞の培養上清はカルバペネム薬を失活し、この効果は上清中の細胞由来のL-Cysがカルバペネム薬を分解するためであることを解明した。

本研究では培養上清中のヒト細胞由来のL-Cysはアミノ酸不含の培養液ではL-Cysは検出されず、L-Cysは培地成分であるL-cystine(LC)を細胞が還元することで新生されること、血清中のタンパク質はIPMの失活効果を減弱することなどを明らかにした。さらにカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が川崎市で2018年に分離数が増加していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)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が、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。本研究ではカルバペネム系抗菌薬をヒトの細胞由来のL-システインが加水分解する機序について解析しており、抗菌薬の評価法、適正な抗菌薬療法の確立に寄与するもので、既存の抗菌薬を有効に利用することに貢献するという点で有意義である。

研究成果の概要(英文)：At the study supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25461525 from 2013 to 2016, we reported that antimicrobial activities of several carbapenems (Cps) decreased in the supernatants of human alveolar epithelial cell line A549. A549 supernatants and the concentration of L-cys. The A549 culture supernatants exhibited IPM-inactivating effects according to their L-cys concentrations.

In this study, we exhibited the IPM-inactivating effects of A549 supernatants were dependent on their L-Cys concentrations produced by the reduction of L-cystine (LC) in the medium, and L-Cys was prepared by the reduction of LC and other amino acids were not required for the preparation of L-Cys. As the mechanism is still unknown, FCS or serum proteins inhibited this sequential reaction, the preparation of L-Cys and IPM-inactivation dose-dependently. Moreover, the incidence of Cps-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in Kawasaki City was relatively higher than the nationwide incidences in 2018.

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：培養細胞 カルバペネム系抗菌薬 不活化 L-cysteine A549

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 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微生物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微生物薬の体内動態を考慮して、その投与量、投与間隔、薬物同士の相互作用などを考慮し、より良い治療効果を得るための治療戦略が注目されるようになった。このような観点から、近年、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)研究「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)」の中で、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞を用いた *Staphylococcus aureus* 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微生物薬の効果を評価した。この評価系で各種抗微生物薬に対する細胞を伴った *S. aureus* に対する MIC (CAMIC) を検討し、カルバペネム薬では MIC に比べ CAMIC が極端に高い値を示すことを見いだした。この現象は、必ずしも培養細胞と抗微生物薬の直接的な相互作用というわけではなく、様々な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 (IPM) 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。さらに平成 25~27 年度交付の文部科学研究費の基盤(C)の研究「ヒト培養細胞のカルバペネム系抗菌薬失活効果の解析 (課題番号 25461525)」では、この細胞培養上清のカルバペネム薬失活効果は、上清中に細胞から遊離する L-Cys によってカルバペネム薬が分解されるためであるということを解明した。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞由来の L-Cys の挙動、カルバペネム薬をはじめとする各種抗微生物薬に対する L-Cys の効果を検討し、炎症局所における抗微生物薬、宿主、病原微生物の相互の関係を明らかにすることで、より有効な抗微生物薬療法の確立を目的とする。具体的には、細胞培養上清中での L-Cys 新生は、RPMI 中に含まれる L-cystine・2HCl (以後 LC) に依存していることを明らかにする。さらにカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の新たな検出法として知られている Carbapenemase Inactivation Method (CIM) test を応用して、細胞培養上清等の L-Cys を含む溶液のカルバペネム失活活性の半定量法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞由来 L-Cys によるカルバペネム薬失活活性のメカニズムの解析 (図.1)

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 穴のマイ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(1) RPMI の成分からアミノ酸を除いた培地 [以後 AA(-)] または(2) RPMI の成分から LC を除いた培地 [以後 LC(-)] に置換し、様々な濃度で LC、FCS を添加し、5%CO₂、37°C で 3 または 6 時間培養し回収する (前

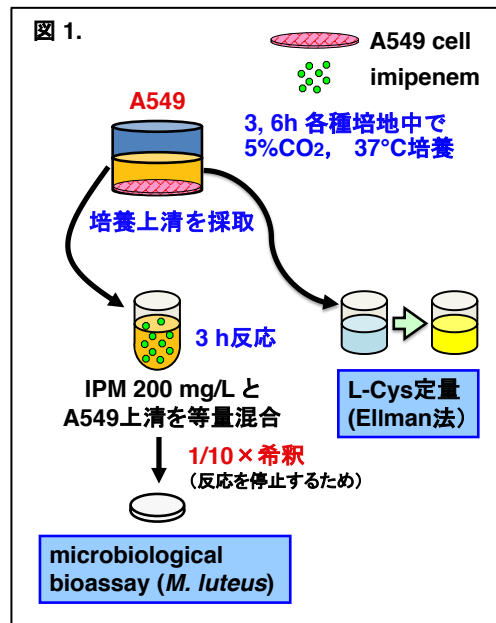
培養)。RPMI は培養上清中の L-Cys を Ellman 法で測定するために、フェノールレッド不含の製品を使用した。

② 培養上清のカルバペネム薬失活活性 (CIE)

①で回収した培養上清に IPM を 200 mg/L で添加し、37°C、5%CO₂、3 時間反応させる。反応を停止させるために、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。

③ 培養上清中の L-Cys の定量

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。Ellman 法 96 穴マイクロプレート上でを行い、判定は OD420nm の自動吸光度測定装置を用いた。



(2) CIM testを応用したL-Cysのカルバペネム薬失活活性の検討

RPMI1640 培地に L-Cys を 50、100、200、400μM 添加し 400μL/tube で 1.5mL の microtube に分注する。カルバペネム薬として IPM、メロペネム (MEPM)、ドリペネム (DRPM)、ピアペネム (BIPM) を用いた。各カルバペネム薬の KB ディスクを 1 枚ずつ tube に入れて 0.5、1、3、6 時間 CO₂ 培養器、37°C で培養。対照抗菌薬としてピペラシリン (PIPC)、セフォタキシム (CTX)、シプロフロキサシン (CPFEX)、ゲンタマイシン (GM) も同様に検査した。培養後のディスクを回収し、RPMI1640 培地で洗浄後ディスクの周りの水分を取って、15 分間トレイの上で乾燥させ実験に用いた。あらかじめ菌量を 0.5-1×10⁸/mL に調整した *Escherichia coli* (ATCC 29522) の菌液を Mueller-Hinton II 寒天平板培地に塗布しておく。この平板培地の上に乾燥させたディスクを置き、18-24 時間後阻止円の直径を計測した。

(3) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離状況のサーベイランス

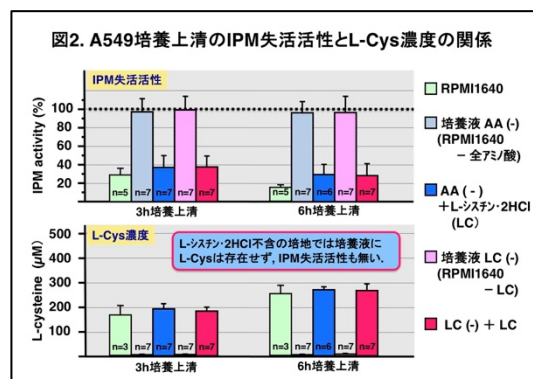
2016年頃から研究代表者所属機関の附属病院を含む川崎市内の病院では、*Klebsiella aerogenes*、*Enterobacter cloacae* complexを中心にイミペネムのMICが2μg/mLと判定される腸内細菌科細菌が増加している。このような菌の多くは、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) ではないが、感染症法の基準でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) にあたることが多い (non-CPE CRE)。特に2018年において研究代表者所属機関の附属病院でCREの分離が急増し、本研究の当初計画には無いが、川崎市内のJANIS参加施設の還元情報を収集して CREの検出状況を調査した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養細胞由来 L-Cys によるカルバペネム薬失活活性のメカニズムの解析

① A549 培養上清の IPM 失活活性と上清中の L-Cys 濃度の関係

RPMI 中で A549 を 3 時間培養した培養上清は 200 mg/L の IPM を失活し、抗菌活性を 30%程度に減少したが、アミノ酸不含の RPMI : AA(-)、LC 不含の RPMI : LC (-)ではこの効果がほぼ消失し

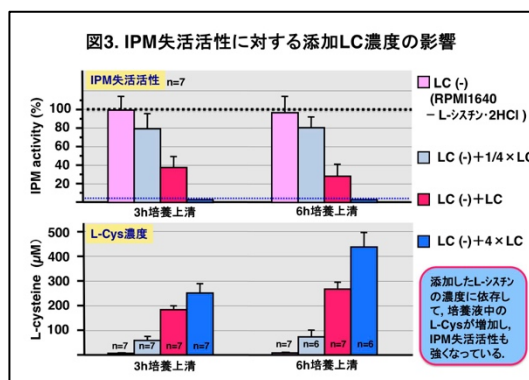


た。同じ実験系で AA(-)、LC(-)に RPMI 培地と同じ濃度で LC (0.2 mM) を添加して培養すると、RPMI で培養した場合の培養上清と同程度の IPM 失活効果が観られた。3 時間培養後の上清中の L-Cys 濃度は RPMI では $170.1 \pm 35.6 \mu\text{M}$ であったのに対して、AA(-)、LC(-)ではほぼ 0 であったが、AA(-)、LC(-)に RPMI 培地と同じ濃度で LC (0.2mM) を添加した培養上清中には RPMI と同程度の L-Cys が検出された (AA(-)+LC : $191.8 \pm 21.3 \mu\text{M}$ 、LC(-)+LC : $182.4 \pm 16.3 \mu\text{M}$)。また 6 時間培養した場合 RPMI では 200 mg/L の IPM の抗菌活性を 15%程度に減少し、上清中の L-Cys 濃度は $257.0 \pm 31.7 \mu\text{M}$ であった。AA(-)、LC(-)に RPMI 培地と等量の LC (0.2mM) を添加した培養上清は、6 時間培養でも RPMI とほぼ同等の挙動を示した。

② IPM 失活活性に対する添加 LC 濃度の影響

LC(-)に RPMI 培地の 1/4 倍 (0.05 mM)、同濃度 (0.2 mM)、4 倍濃度 (0.8 mM) で LC を添加した培地で A549 を培養した場合の培養上清の IPM 失活活性及び上清中の L-Cys 濃度を検討した。培養液に添加する LC 濃度及び培養時間に依存して、培養上清の IPM 失活活性は強くなり、上清中の L-Cys 濃度も高くなった。

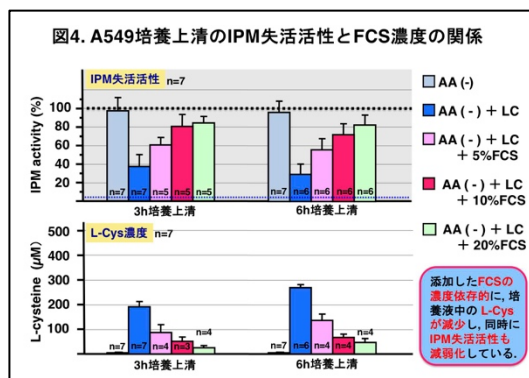
本研究の中で L-Cys の生成に関わるアミノ酸であるメチオニン、セリンや L-Cys の酸化体である LC の有無で L-Cys の産生を調べたところ、①培地中のメチオニンやセリンは L-Cys の産生には影響しないこと、②LC の濃度依存的に培養上清が IPM 失活活性を示すこと、③LC の濃度に依存して上清中の L-Cys の濃度は経時的に増加すること、を明らかにした。また LC 非添加培養液中で培養した細胞上清を回収し、その培養液に LC を後から添加しても、これらの現象は観られず、L-Cys の新生には細胞の存在が必須であることも判った。これらの結果は、アミノ酸を除いた RPMI 中では A549 細胞の培養に伴って L-Cys が培地中に産生されることはなく、この現象は L-Cys の酸化型である LC が存在しないことだけに依存していることを示しており、さらに培養液中の LC が細胞によって還元されて L-Cys が産生され、この LC が IPM を失活することが示唆された。



③ A549 細胞培養上清の IPM 失活活性と FCS 濃度の関係

LC(-)に RPMI 培地と同濃度 (0.2 mM) の LC を添加した培地に 5%、10%、20% FCS を加え、IPM 失活活性に及ぼす FCS の影響を検討した

(図 4) とおり、添加 FCS の濃度に依存して IPM 失活活性が減弱し培養液中の L-Cys 濃度も低下した。この現象をより詳細に検討したところ、FCS20%の培養液中では、FCS 添加直後から L-Cys の効果が減弱し、1 時間培養後には IPM の失活活性の著しい低下が認められた。この現象はアルブミン、グロブリンでも同様にみられ、特にヒトアルブミンでは生体の血清中と同程度の濃度で即座に L-Cys の IPM 失活効果を阻害することが判った。この現象は培養液中の遊離 L-Cys 濃度の減少を伴っており、L-Cys が血清タンパク質、特にアルブミンと結合することで、IPM 失活効果を失うことが確認された。



(2) CIM test を応用した L-Cys のカルバペネム薬失活活性の検討 1.5 mL のチューブに L-Cys を 50、100、200、400 μ M 添加した培地 400 μ L/tube を分注し、その中にカルバペネム薬の KB ディスクを 1 枚ずつに入れて 0.5~6 時間培養し、その後通常のディスク法と同様の方法で残留している抗菌薬の抗菌活性を阻止円直径として評価した (表 1)。代表的な阻止円径の減少を図 5. に示す。L-Cys は 50 μ M では明らかなカルバペネム薬失活活性を示さないが、概ね 100 μ M 以上で濃度依存的な活性を示した。反応時間は 30 分から失活活性を示し、1 時間で増強されたが、3、6 時間では活性に大差は無かった。L-Cys 100 μ M、200 μ M では、MEPM、DRPM は IPM、BIPM と比べて明らかに活性を残していたが、400 μ M では検出限界以下になった。対照として用いた抗菌薬の中で、PIPC は 400 μ M の L-Cys で若干失活されたが (20%程度の阻止円径減少)、CTX、CPFX、GM は全ての濃度で全く失活されなかった。さらにディスクを浸漬する前に、FCS を加えた培地で培養すると、L-Cys の IPM 失活効果が培養時間、FCS の濃度に依存して減弱することが判った。FCS20%の培養液中では、FCS 添加直後から L-Cys の効果が減弱し、1 時間培養後には IPM の失活が全く観察されなかった。このことは前項で述べた、FCS による L-Cys の IPM 失活活性阻害を裏付ける結果と言える。

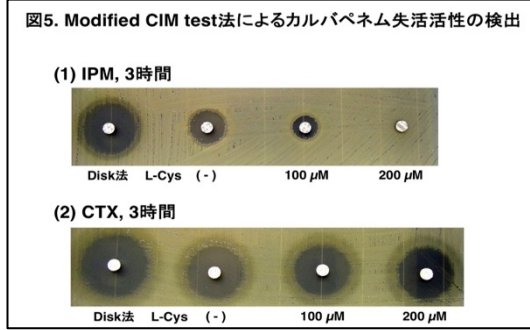
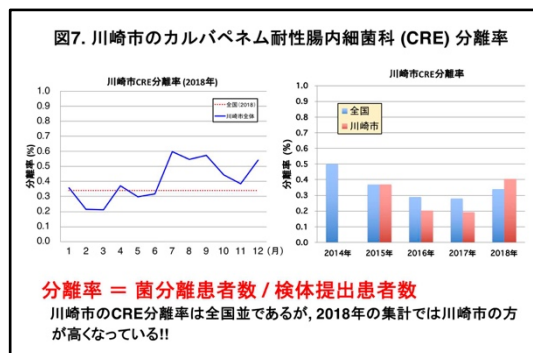
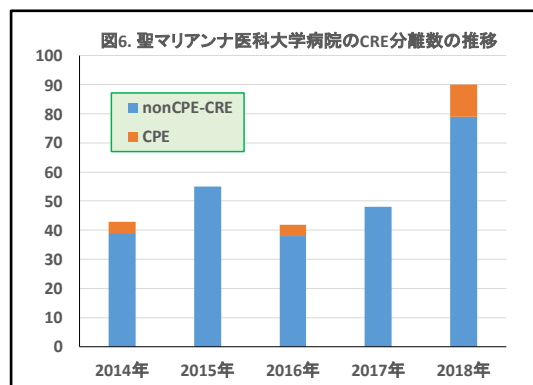


表1. Modified CIM test法によるカルバペネム失活活性

		Disk法	L-Cysteine			
			(-)	50.0	100.0	200.0
IPM	30分	29.8 \pm 0.3	21.2 \pm 0.3	19.0 \pm 1.0	13.3 \pm 0.6	0
	1時間	29.3 \pm 0.8	20.0 \pm 0.5	16.2 \pm 0.3	0	0
	3時間	28.7 \pm 0.3	19.3 \pm 0.8	18.0 \pm 0.5	13.2 \pm 0.3	0
	6時間	29.2 \pm 0.8	19.3 \pm 0.3	18.2 \pm 0.6	13.8 \pm 0.6	0
MEPM	30分	31.3 \pm 0.3	23.8 \pm 0.6	23.3 \pm 0.3	20.0	16.5 \pm 0.5
	1時間	30.3 \pm 0.6	23.0 \pm 0.5	20.3 \pm 0.6	17.5 \pm 0.5	0
	3時間	30.2 \pm 0.3	22.3 \pm 0.3	22.2 \pm 0.3	19.7 \pm 0.3	13.0 \pm 0.5
	6時間	30.3 \pm 0.3	22.8 \pm 1.0	22.7 \pm 0.6	21.8 \pm 0.8	17.7 \pm 0.3
DRPM	30分	29.8 \pm 0.3	23.3 \pm 0.3	21.7 \pm 0.8	19.5	15.3 \pm 1.3
	1時間	29.0 \pm 0.5	21.7 \pm 0.3	19.5 \pm 1.3	16.2 \pm 1.0	7.5
	3時間	29.3 \pm 0.8	21.2 \pm 0.3	21.0	18.8 \pm 0.3	14.0 \pm 1.0
	6時間	29.8 \pm 0.6	22.0	21.3 \pm 0.6	20.3 \pm 0.3	15.8 \pm 2.1
BIPM	30分	30.5 \pm 1.0	23.3 \pm 0.8	21.3 \pm 0.3	16.8 \pm 1.0	0
	1時間	29.3 \pm 0.8	22.8 \pm 0.6	18.8 \pm 0.8	11.3 \pm 1.9	0
	3時間	29.2 \pm 0.3	22.0	19.8 \pm 0.8	17.5 \pm 0.5	0
	6時間	30.5 \pm 0.9	23.0 \pm 1.3	21.0 \pm 0.5	18.5 \pm 0.9	0
PIPC	3時間	28.3 \pm 0.8	19.0 \pm 0.5	19.0	18.3 \pm 0.3	17.7 \pm 0.3
	6時間	27.8 \pm 1.0	18.0 \pm 0.5	18.2 \pm 0.3	18.3 \pm 0.3	17.2 \pm 0.6
CTX	3時間	35.0 \pm 1.8	28.0 \pm 0.5	27.7 \pm 0.8	27.8 \pm 0.6	27.5 \pm 0.5
	6時間	34.2 \pm 1.0	27.7 \pm 0.6	27.7 \pm 0.6	27.7 \pm 0.6	28.0
CPFX	3時間	29.5 \pm 0.5	24.2 \pm 1.4	23.8 \pm 1.3	23.8 \pm 1.2	24.3 \pm 1.6
	6時間	30.2 \pm 0.8	25.2 \pm 0.8	24.7 \pm 0.8	25.0 \pm 1.3	25.0 \pm 0.5
GM	3時間	21.0 \pm 0.9	12.2 \pm 0.3	12.0	11.8 \pm 0.3	11.7 \pm 0.3
	6時間	21.3 \pm 0.3	11.8 \pm 0.6	12.0 \pm 0.5	11.5 \pm 0.5	12.2 \pm 0.3

(3) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離状況のサーベイランス

CRE の中にカルバペネマーゼではなく L-Cys を介した耐性を獲得する菌がないかを検討することを念頭におき、研究代表者所属機関の附属病院である聖マリアンナ医科大学病院を含む川崎市内の CRE の分離状況を調査した。聖マリアンナ医科大学病院では、2018 年に明らかに CRE 特に non CPE-CRE の分離が増えていたが、これは川崎市内全体の傾向で、JANIS 参加 16 施中 8 施設で前年比が 2 倍以上であった。但し CPE に関しては川崎市全体で 11 件 (12 株) と少なかった。今後も non CPE-CRE を含む CRE の分離率の動向には注意をしておく必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemura H, Mochizuki T	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparison between local and national epidemiology of antimicrobial resistance using the JANIS data.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 868-872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2018.08.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takemura H, Terakubo S, Okamura N, Nakashima H	4. 巻 24
2. 論文標題 The reduction of l-cystine to l-cysteine in the supernatant of A549 cell culture causes imipenem inactivation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 341-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2017.10.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takemura H, Kunishima H, Terakubo S, Okamura N, Nakashima H.
2. 発表標題 Local and national epidemiological surveillance using the JANIS system.
3. 学会等名 6th East Asia Conference on Infection Control and Prevention (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹村 弘, 望月徹
2. 発表標題 川崎市地域連携における多施設でのJANIS臨床分離菌還元情報分析の試み
3. 学会等名 第34回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takemura H, Terakubo S, Okamura N, Shimada J, Nakashima H
2. 発表標題 The Reduction of L-cystine to L-cysteine by A549 Cells Causes Carbapenems Inactivation
3. 学会等名 ASM microb 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹村 弘、岡村二如、寺久保繁美、嶋田甚五郎、中島秀喜
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮細胞A549の培養上清によるカルバペネム薬の不活化について
3. 学会等名 第83回神奈川県感染症医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹村 弘、寺久保繁美、嶋田甚五郎、中島秀喜
2. 発表標題 ヒト細胞培養上清のCPs不活化効果の検討-第3報-
3. 学会等名 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第63回日本化学療法学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 竹村 弘、寺久保繁美、嶋田甚五郎
2. 発表標題 CIM testを応用したL-cysteineのカルバペネム失活活性の検討
3. 学会等名 第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----