

令和元年6月6日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20950

研究課題名(和文)細菌由来RNAによる抗菌薬の早期効果判定法確立および薬剤選択法の構築

研究課題名(英文)Rapid evaluation of antibacterial effects and drug selection using bacterial RNA

研究代表者

八島 秀明(Hideaki, Yashima)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60773512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：感染症治療における最適な薬剤選択法の構築を目的に、pre-rRNAという細菌の増殖速度によって変動する核酸をマーカーとして利用し、迅速な抗菌薬の効果判定法の検討を行った。緑膿菌PAO-1株の細菌増殖とpre-rRNAの関係について検討をした結果、メロペネム曝露開始3時間後の一細菌あたりのpre-rRNA値を用いることで、細菌に対する感受性判定が可能であることを明らかにした。一方で、シプロフロキサシンを曝露した場合はメロペネムに比較して顕著な低下、トブラマイシンの場合は低下しないという結果が得られた。現在は各薬剤で共通する判定法の検討を行うとともに、細菌由来タンパク質の網羅的探索を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の培養法に基づいた薬剤感受性試験や患者の炎症マーカーを用いた臨床的な抗菌薬の効果判定は数日間の時間を要するが、原因微生物由来のpre-rRNAを用いた本法では、細菌からの核酸抽出、逆転写反応、定量PCRのステップを約6時間程度で測定可能であり、迅速さの点で優れていると言える。抗菌薬ごとに精度よく解析できるモデルを構築できれば細菌の濃度が比較的多い検体(尿や喀痰)を用いて早期に効果判定ができると考えられる。実臨床でこの検査が実装されれば、耐性菌が増えている昨今での感染症治療において適切な治療選択をより早期に行うことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In order to construct the optimal drug selection method for treatment of infectious diseases, the nucleic acid that fluctuates relating the growth rate of bacteria called pre-rRNA was used as a marker, and a rapid method for determining the effect of antibacterial drug was examined.

As a result of examining the relationship between bacterial growth and pre-rRNA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 strain, it is possible to determine sensitivity to bacteria using pre-rRNA value per bacteria 3 hours after meropenem exposure. On the other hand, exposure to ciprofloxacin resulted in the greater reduction in per-bacterial pre-rRNA levels compared to meropenem, and no significant change was seen in tobramycin. We found that the profile of pre-rRNA has features of each drug of mechanism of action. Although we have been examining the determination method common to each drug, we have not yet built a model, and are conducting a comprehensive search of bacteria-derived proteins.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：感染症 抗菌薬 RNA 効果判定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の治療では原因菌が特定されていない場合においても、抗菌薬の投与が遅れると患者の生存率が下がるため、多くの菌種に対して抗菌力を有する広域スペクトルの抗菌薬を用いたエンピリック治療が行われる。原因菌が判明した場合、治療が見込め、かつ狭域なスペクトラムの抗菌薬へ変更する。しかし、医療施設に入院後 48 時間以降に発症する院内感染症では、多剤耐性緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、多剤耐性アシネトバクター属などの薬剤耐性菌が以前に比較して高い頻度で原因菌として同定されており、今後も増え続けると考えられている。これらの薬剤耐性菌が起因菌である場合、エンピリック治療として用いられる広域スペクトラムの抗生剤に対しても耐性を示し、治療不良となる症例が存在している。

臨床では感染症患者の血液などの検体を細菌培養し、原因菌が検出された場合は菌種の同定を行う。さらに同一の菌種でも薬剤感受性が異なる場合があるため、感受性の判別には菌種の同定とは別に薬剤感受性試験を行い、原因菌に効果がある抗生物質を判定している。この検査結果が得られるまでには通常 2~3 日を要し、さらに長期間を要する菌種も存在する。また、発熱性好中球減少症などの一部の感染症では、疫学的に原因菌が検出されにくいことが知られており、原因菌の感受性が不明な場合は抗菌薬の効果を臨床的に評価することが行われる。臨床的な抗菌薬の薬効評価は白血球数や CRP、プロカルシトニンなどの患者由来の炎症マーカーの継時的な変動を数日間観察し判断するため、効果を判定するには培養法と同じく長期間を要する。近年、MALDI TOF MS や新規遺伝子解析技術の開発・発展により細菌培養に依存しない菌由来の分子の解析法が注目されているが、これらの技術を用いて菌由来の蛋白質や DNA を測定した場合、生菌と死菌との区別が難しいため、効果判定マーカーとしての直接的な使用は難しい。そこで私は増殖活性を有する微生物の存在量を迅速に評価できる物質として ribosomal RNA precursor (pre-rRNA) に着目した。pre-rRNA は rRNA の前駆体であり、細胞増殖が活発な微生物で多く検出される RNA である。In vitro 研究では pre-rRNA は生きた微生物の増幅速度を示すマーカーとして報告されていることから、理論的には「抗菌薬により細胞機能が障害された細菌が死滅し、減少すること」を pre-rRNA の推移から推定できると考えられる。pre-rRNA は一般的な RNA と同様に PCR 法により迅速に解析可能であるが、現在までに抗菌薬投与による細菌の変動と pre-rRNA 量の関係性について詳細に検討した報告はない。本研究では臨床で耐性化が問題となっている緑膿菌に対して、作用機序の異なる抗生剤 (β ラクタム系、アミノグリコシド系、ニューキノロン系) を曝露した場合の生菌数、pre-rRNA のプロファイルを測定し、pre-rRNA と各抗菌薬の薬効の関連性を薬力学的に評価する。

2. 研究の目的

pre-rRNA と各抗菌薬曝露との関連性を明らかにし、最適な薬剤選択法の構築を試みる。これにより抗菌薬の効果判定を迅速に行えるだけでなく、新たな抗菌薬治療のストラテジーの構築に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 測定法の汎用性と測定感度を改善する目的で既存の RNA 抽出キットを用いた系に変更するとともに、核酸の測定方法を従来用いていたインターカラー法から感度、特異度の高いプローブ法に変更したプロトコルへ変更を行った。また、寒天培地を用いた生菌数を元に細菌当たりの pre-rRNA を算出していたが、測定に長時間を要するとともに、細菌の取り扱い技能が必要であった。生菌数の代わりに細菌のペレットから抽出したゲノム DNA の測定系を確立し、標準化することが可能か検討した。
- 2) pre-rRNA をマーカー利用するための条件検討として、抗菌薬非曝露条件において、緑膿菌 PAO-1 株の細菌増殖と pre-rRNA の関係について詳細に検討を行うとともに、 β ラクタム系抗菌薬を緑膿菌 PAO-1 株に対して曝露した際の、生菌数の変化と細菌から抽出した pre-rRNA の関係性の解析を行った。
- 3) メロペネム以外の各種抗生物質(アミノグリコシド系、ニューキノロン系)を緑膿菌 PAO-1 株に対して曝露した際の、生菌数の変化と細菌から抽出した pre-rRNA の関係性の解析を行った。一部の抗菌薬において細菌の死滅と pre-rRNA の関係が単純な相関関係として表せられないことが確認されたため、すべての抗菌薬において用いることができるモデル式に組み込むべき因子を探索する目的で細菌に対するプロテオーム解析を検討した。

4. 研究成果

- 1) 既存の RNA 抽出キットを用いた汎用性の高いプロトコルを構築することで、臨床現場で使用しやすい測定法を確立した。核酸の測定方法をインターカラー法から特異度の高いプローブ法に変更したことで、測定感度が上昇し $1.0 \times 10^4 / \text{mL}$ の少量の生菌まで定量可能な系となった。敗血症患者の血液検体までは対応ができないが、肺炎患者の喀痰や尿路感染症患者の尿サンプルを対象に取り扱う場合は十分な感度であると言える。また、生菌数の代わりに細菌のゲノム DNA の測定値を用いることで、一細菌あたりの pre-rRNA 値に相当する値を約 6 時間程度と短時間で得ることを可能とした。

- 2) pre-rRNA をマーカー利用するための条件検討を行った結果、細菌増殖と最も関連が強いものは一細菌あたりの pre-rRNA 値であることが示唆された。次に、緑膿菌 PAO-1 株を培養しながら継時的にサンプリングを行い最適な判定時間を検討した結果、一細菌あたりの pre-rRNA 値は、細菌増殖 2~3 時間後に最大値を示したことから、この 3 時間値をマーカーとして使用した。緑膿菌 PAO-1 株に対するメロペネムの曝露実験では、上記の培養 3 時間後の一細菌あたりの pre-rRNA の上昇が抑制される現象を見出した。細菌サンプルの曝露前後の差異を測定することで、感染症サンプル中の起因菌の抗菌薬感受性の判定が可能となった。
- 3) メロペネム以外の抗菌薬としてシプロフロキサシンとトラマイシンを用いて同様の検討を行った結果、pre-rRNA のプロファイルに薬剤間の違いがみられた。これは各抗菌薬の作用機序の違いにより pre-rRNA の合成・分解に変化が起こったためと考えられた。これらの現象を踏まえ、同一のモデル式で抗菌効果を表すことを検討しているがモデル化にはいたっていない。現在は pre-rRNA プロファイルの違い、もしくは抗菌薬の効果と直接関連がある因子を探索する目的で細菌から抽出したタンパク質のプロテオーム解析を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。