

令和元年5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16223

研究課題名(和文) CRE感染症に対するカルバペネム・サルベージ治療の開発

研究課題名(英文) Carbapenem salvaging therapy for CRE infections

研究代表者

萩谷 英大 (Hagiya, Hideharu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30718531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、昨今問題となっている薬剤耐性菌のうちカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)に対する既存抗菌薬のリバイバル使用の有効性を検討することを目的とした。本研究を通して、日本国内の臨床では広く使用されているセフメタゾール(セファマイシン系抗菌薬)はカルバペネム系薬剤と併用することでシナジー効果を発揮し、IMP型・KPC型・NDM型カルバペネマーゼを産生するCRE感染症の治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の出現により我々は難治性細菌感染症に直面している。中でもカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)は脅威的なスピードで世界へ拡散しており、CRE感染症に対する有効な治療戦略の模索が急務である。しかし現実的には開発シーズの不足や莫大な開発費用のため、産学領域での新規抗菌薬の開発は滞っているのが現状である。本研究は既存抗菌薬を応用することで、新規抗菌薬の開発を待たずしてCRE感染症に有効な治療戦略を模索することが可能な一例を示したものである。今後、同様の研究が継続され、新たなサルベージ治療が発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) is among the most severe threats to public and clinical health because of their high levels of resistance to various antibiotics. We assessed the efficacy of combination therapy with meropenem (MEM) and cefmetazole (CMZ) against IMP-, KPC-, and NDM-producing CRE.

In vitro studies showed the potential effectiveness of combination therapy using existing antimicrobials, MEM and CMZ, against CRE infections. Further investigations including in vivo animal studies and clinical studies are warranted to corroborate clinical utility of the new combination therapy.

研究分野：薬剤耐性

キーワード：薬剤耐性 カルバペネム カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 併用療法 セフメタゾール

1. 研究開始当初の背景

(1) 国外での動向および位置づけ：世界的な薬剤耐性菌の歴史

薬剤耐性菌の出現により我々は難治性細菌感染症に直面している。中でもカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(**Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE**)は脅威的なスピードで世界へ拡散している。人類は抗菌薬のなかった時代に逆戻りしつつあり、有効な感染対策が為されなかった場合、**2050**年には癌死を抜いて薬剤耐性菌による死亡が世界の死因第一位になるという試算すらされている。こういった状況を危惧し、世界保健機構(**WHO**)は**2015**年にグローバルアクションプラン(薬剤耐性に関する国際行動計画)を発表し、先進諸国に対して早期に具体的対策を開始することを求めている。

(2) 国内での動向および位置づけ

本邦では**2016**年**4**月に日本版アクションプランが発表され、同年**5**月の伊勢志摩サミットでは薬剤耐性菌問題を主要議題として取り上げ、“抗菌薬を公共財として認識し、人及び動物に対する適切かつ適正な使用を通じて、抗菌薬の有効性を維持する努力を優先課題とする”ことが参加国間で確認された。マスメディアでも取り上げられることが増え、薬剤耐性菌問題は今や社会的関心事項である。

(3) CRE に対する新たな治療選択の模索：薬剤耐性菌対策としての「Re-duce, Re-use, Re-cycle」

多剤耐性化した **CRE** の治療は困難を極める一方で、新規抗菌薬の開発は近年滞っている。その中で、抗菌薬全体の使用量を減少させること(**Re-duce**)に加え、既存抗菌薬を再利用すること(**Re-use**)、国・地域限定的に臨床使用されている治療薬を世界的に再分配すること(**Re-cycle**)が一つの解決策につながると考えている。

(4) 併用効果を応用したカルバペネム系抗菌薬のサルベージ治療の検討

CRE はカルバペネマーゼを産生することで薬剤耐性能を獲得するが、耐性度は各カルバペネマーゼと基質であるラクタム剤との親和性に依存する。カルバペネム系薬剤どうしを併用したダブルカルバペネム療法の有効性が報告されているが、**2**種のカルバペネム系薬剤を投与することは抗菌薬適正使用の視点から実臨床には応用しにくい。そこで私たちは他系統・他薬剤が併用として機能し **CRE** に対する有効な併用療法が検討できないかという着想にいたった。私たちはセファマイシン系抗菌薬であるセフメタゾール(**cefmetazole, CMZ**)に着目し、これまでに **NDM** 産生 **CRE** を中心に、メロペネム(**MEPM**)と **CMZ** の併用効果を検討してきた。チェッカーボード法を用いて **CMZ** を併用することで **MEPM** の **MIC** が **4-8** 倍程度低下し、**Fractional inhibitory concentration (FIC) index** が **0.5** 以下になることを確認した。また、殺菌曲線での検討も行い、**MEPM/CMZ** の併用投与は単独投与に比べ有意に **CRE** の増殖を抑制することも判明した(未発表データ)。

2. 研究の目的

本研究では **CRE** に対する既存抗菌薬のリバイバルの再検討を主眼とし、これまでの実験系における **MEPM** と **CMZ** の併用効果の有効性をさらに詳細に検討することに加え、動物感染モデルを用いた併用効果の比較検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(A) チェッカーボード法

MEPM および **CMZ** の希釈系列をそれぞれ作成し、96 穴プレート内で混合する。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 時間培養する。Fractional inhibitory concentration index (FICI) を算出し、FICI 0.5 以下を相乗効果ありと定義した。

(B) 殺菌曲線による併用効果の確認

有効性の期待できる **MEPM** と **CMZ** の濃度組み合わせについて、time-killing assay にて併用療法の有効性を検討する。試験菌は Mueller-Hinton agar 培地で一夜 37 °C にて発育させ、新鮮な MH 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、目的濃度になるように抗菌薬液 (**MEPM** 単独・**CMZ** 単独・**MEPM/CMZ** 併用) を加えた。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。37 °C で継続的に培養し、培養開始後 1-2-4-8-12-24 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菌数を計測する。経時的な菌数変化を評価し、併用効果について検討した。

(C) 電子顕微鏡による菌体破壊の観察

走査型電子顕微鏡により薬剤の単剤および併用環境での菌体破壊の様子を観察した。

4. 研究成果

研究期間において、主に世界中に拡散する KPC 産生 CRE に対する併用効果を確認した。

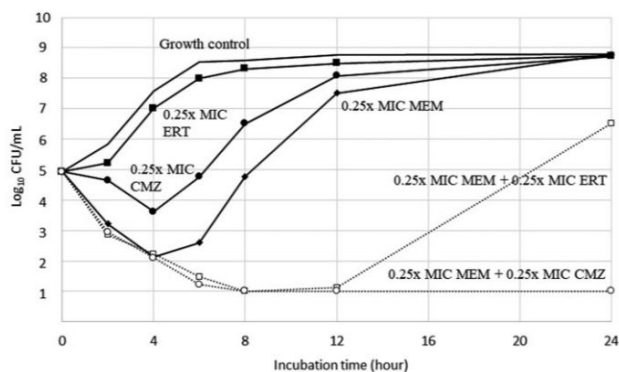
臨床分離された KPC 株を用い、ダブルカルバペネム療法で用いられるエルタペネム (ERT) とセフトアゾール (CMZ) の併用効果をチェッカーボード法で比較した結果を表 1 に示す。

対象株において ERT 併用環境ではシナジー効果は認められなかった一方で、CMZ 併用では 11 株中 7 株において有意な併用効果が認められた。

(表 1) 臨床分離 KPC 株に対する MEM/CMZ 併用効果

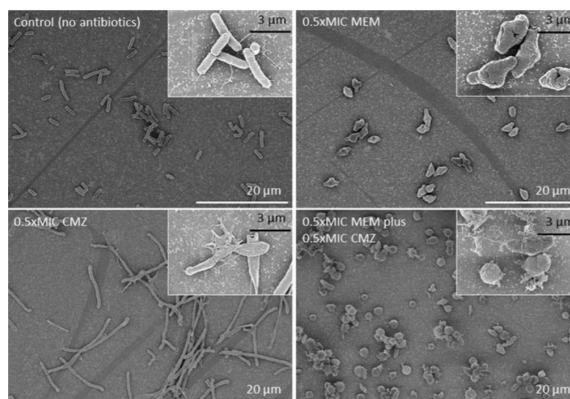
| Bacterial isolates | Checkerboard assay | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----|-----|------------------|-------------|------------------|-------------|----|------------------------|
| | MIC (mg/L) | | | MEM + ERT | | MEM + CMZ | | | MEM MIC fold reduction |
| | MEM | ERT | CMZ | FIC index | Evaluation | FIC index | Evaluation | | |
| <i>E. coli</i> | | | | | | | | | |
| TUM15665 | 4 | 4 | 8 | 0.75, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.38, 0.38, 0.50 | Synergistic | 8 | |
| TUM15671 | 2 | 2 | 2 | 0.50, 0.63, 1.00 | Indifferent | 0.63, 0.75, 1.00 | Indifferent | NA | |
| <i>K. pneumoniae</i> | | | | | | | | | |
| TUM15667 | 8 | 8 | 16 | 0.53, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.53, 0.75, 0.75 | Indifferent | NA | |
| TUM15669 | 32 | 32 | 16 | 0.50, 0.63, 1.00 | Indifferent | 0.50, 0.63, 0.63 | Indifferent | NA | |
| TUM15670 | 16 | 16 | 8 | 0.50, 0.56, 0.56 | Indifferent | 0.50, 0.75, 1.00 | Indifferent | NA | |
| BAA-1705 | 32 | 32 | 64 | 0.75, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.38, 0.38, 0.50 | Synergistic | 4 | |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | | | | | | | | | |
| TUM15663 | 16 | 16 | 128 | 0.53, 0.63, 0.63 | Indifferent | 0.38, 0.50, 0.50 | Synergistic | 8 | |
| TUM15664 | 8 | 8 | 128 | 0.63, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.38, 0.50, 0.50 | Synergistic | 4 | |
| TUM15666 | 8 | 8 | 256 | 0.75, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.38, 0.38, 0.50 | Synergistic | 8 | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> complex Hoffmann cluster IV | | | | | | | | | |
| TUM15672 | 2 | 2 | 512 | 0.56, 0.75, 0.75 | Indifferent | 0.31, 0.38, 0.38 | Synergistic | 8 | |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | | | | | | | | | |
| TUM15668 | 8 | 8 | 256 | 0.50, 0.56, 0.75 | Indifferent | 0.28, 0.50, 0.50 | Synergistic | 4 | |

次に KPC 産生 CRE に標準株 (BAA-1705) に対して殺菌曲線実験を行った (図 1)。その結果、ERT 併用に比べて CMZ 併用環境では細菌増殖が優位に抑制されることが判明した。



(図 1) KPC 産生 CRE に標準株 (BAA-1705) に対する殺菌曲線実験

最後に、同標準株に対する CMZ 併用環境がもたらす菌体破壊の様子を走査型電子顕微鏡を用いて観察した (図 2)。その結果、MEM/CMZ 併用環境では MEM 単剤環境での菌体破壊と同様の形態を示すことが判明し、CMZ が阻害として機能し、MEM の薬剤効果に positive に影響していることが推定された。



(図 2) KPC 産生 CRE に標準株 (BAA-1705) に対する電子顕微鏡観察

以上、KPC 産生 CRE に対する MEM/CMZ 併用療法の基礎的実験の結果に関しては、Microbial Drug Resistance 誌において発表した。また同様の基礎実験は NDM 産生 CRE、IMP 産生 CRE に対しても行った。NDM に関しては Km 値などの酵素反応係数等も算出して、現在論文投稿の準備中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. **Hagiya H**, Aoki K, Akeda Y, Yamamoto N, Shanmugakani RK, Ishii Y, Tomono K. In Vitro Effectiveness of Meropenem and Cefmetazole Combination Treatment Against KPC-2-Producing Enterobacteriaceae. Microbial Drug Resistance. 2019. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. **Hagiya H**. 46th Myanmar Health Research Congress, Symposium on Antimicrobial Resistance (10th January, 2018). Emergence of Antimicrobial Resistance and Antimicrobial Stewardship
2. **Hagiya H**, Sugawara Y, Shanmugakani RK, Yamamoto N, Sakamoto N, Takeuchi D, Kumwenda GP, Yoshida H, Akeda Y, Tomono K. ASM microbe 2017 (1st to 5th June, 2017, poster presentation). In Vitro Efficacy of Combination Therapy with Meropenem and Cefmetazole against KPC-producing Enterobacteriaceae
3. **Hagiya H**, Sugawara Y, Shanmugakani RK, Hara N, Yamamoto N, Sakamoto N, Takeuchi D, Kumwenda GP, Yoshida H, Akeda Y, Tomono K. 27th ECCMID (22nd to 25th April, 2017) Advances in Japanese Chemotherapy (oral presentation). In vitro efficacy of Meropenem-Cefmetazole combination therapy against NDM-producing Escherichia coli

〔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 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：朝野和典、石井良和、明田幸宏、山本倫久、青木弘太郎、Shanmugakani Rathina Kumar

ローマ字氏名：Kazunori Tomono, Yoshikazu Ishii, Yukihiro Akeda, Norihisa Yamamoto, Kotaro Aoki, Shanmugakani Rathina Kumar

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。