

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659478

研究課題名(和文)精密粒度分布測定による抗菌薬の短時間殺菌能評価法の開発

研究課題名(英文)A research on analyses of short-term antimicrobial activity by measuring particle size distribution

研究代表者

八田 益充(Hatta, Masumitsu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80528258

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)：抗菌薬の短時間殺菌能の新しい評価法として精密粒度分布測定の有用性を検証した。MRSA臨床分離株に対し、新規開発中の抗菌薬WAP-8294A2(以下WAP)とバンコマイシンを用いて、抗菌薬後短時間での生菌数の変化、精密粒度分布測定による菌径の変化などを評価した。その結果、WAP投与後短時間での生菌数の減少に一致して精密粒度分布測定での菌径の変化が確認され、短時間殺菌能の評価方法として精密粒度分布測定の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For evaluating of short-time antimicrobial activities of antibiotics, we assessed the usefulness of a new method, which could detect changes in diameters of the bacteria in real-time by measuring particle size distribution. We prepared clinical isolates of MRSA, and compared the antimicrobial activities of WAP-8294A2 (WAP) and vancomycin (VCM), through the decrease in viable bacterial counts, the changes in diameters of the bacteria by measuring particle size distribution. Changes in mean diameters of MRSA were simultaneously detected in the extremely short-time, which corresponded with the decrease in viable bacterial counts. This suggested the usefulness of measuring particle size distribution in the evaluation of short-time antimicrobial activities of antibiotics.

研究分野：感染症

キーワード：抗菌薬 短時間殺菌能 精密粒度分布測定

1. 研究開始当初の背景

1950年代以降ペニシリンをはじめとした各種抗菌薬の開発が進み、今日までに150を超える抗菌薬が臨床応用された。そして、医療領域のみならず広く獣医学、農業、水産など多方面で社会は抗菌薬の恩恵を受けてきた。しかし、抗菌薬の適応範囲が広がりその使用量が増加する一方で、耐性菌の出現とその蔓延という、これまでにない危機的局面に現代社会は直面している。

近年の薬剤耐性菌の問題は極めて深刻であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、多剤耐性アシネトバクターなど耐性菌の出現は極めて多岐の病原体にわたる。中にはMDRPや多剤耐性アシネトバクターなど多くの薬剤に対して耐性を示し、抗菌薬の選択が困難となった病原菌も出現し、実際にこれらの病院内での集団発生により患者が死亡するなどの院内感染事例も近年多数報告されている。また、ニューデリー・メタロラクタマーゼ1(NDM-1)産生菌などのように、メディカルツーリズムを含めた海外旅行や国際交流により、耐性菌が国境を越えて容易に世界中へ伝播することが知られており(Lancet Infect Dis 2010;10:597-602)耐性菌は医療機関だけでなく個人レベルでも問題となるなど、まさに社会全体の問題として捉えなければならない。さらに、最近の新規抗菌薬開発の停滞は、耐性菌感染症に対する治療を今後さらに難しいものにしていくことを予想させる。

これらの薬剤耐性菌が実際に感染症を起こした場合には、いかに早くから有効な抗菌薬治療を開始できるかが患者の生命予後を大きく左右する。そのため、薬剤耐性菌に対する有効な治療法の確立は今や喫緊の課題であり、多方面からの研究が必要である。

2. 研究の目的

今回我々は、抗菌薬のもつ殺菌力を総合的に評価する上で重要なファクターの一つである短時間殺菌能に焦点を絞り、精密粒度分布測定法を用いて抗菌薬投与後の病原菌の形態変化をリアルタイムに数値化し短時間殺菌能を評価する新しい方法について、開発研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象菌種と薬剤

まずは対象菌種として、院内感染の原因菌の1つとして国内外で最も多いされているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus;以下MRSAと略)を対象とし、東北大

学病院において実際に分離されたMRSA臨床分離株76株について検討を行った。

対象薬剤としては、短時間に作用を発揮することが確認されている現在開発中の新規抗菌薬WAP-8294A2(以下WAPと略)および現在市販されている各種抗MRSA薬であるバンコマイシン(VCM)、テイコブラニン(TEIC)、リネゾリド(LZD)、アルベカシン(ABK)を用いた。

(2) 抗菌薬の最小発育阻止濃度測定

上記の薬剤について、Clinical Laboratory Standard Institute(以下CLSIと略)に準じ、最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration;以下MIC)を微量液体希釈法にて測定した。羊血液寒天培地(日水製薬)に発育したコロニーを被験菌とし、Mueller-Hinton broth(栄研化学;以下MHBと略)にMcFarland 1になるように菌量を調整した。MHBを用いて感受性測定用プレートに被験薬剤の2倍希釈系列を作成し、最終濃度が 5×10^4 CFU/mLとなるように菌を接種した。さらに、一部の抗菌薬については血清を添加すると抗菌活性が高まるとされており、血清添加による抗菌活性の増強作用を評価するため、Fetal calf serum(FCS)を添加したMHB(FCS終濃度10%)においても2倍希釈系列も作成し、同様に菌量を調節し接種した。菌接種後は 35°C で培養し、18~24時間後にMICを判定した。

(3) 抗菌薬添加後の生菌数カウントと精密粒度分布測定

短時間殺菌能の変化をよりシンプルに評価するために、対象薬剤をWAPおよびVCMの2薬剤に絞って、各々添加後早期(0-2時間)のTime killing kineticsと精密粒度分布測定を行うこととした。対象菌株としては、前述のMRSA臨床分離株76株のうち無作為に2株を選択した。

まず10mlのMHBあるいは10%FCS/MHBに最終菌量 1×10^7 CFU/mLとなるように菌を調整し、2時間振とう培養した後、WAPおよびVCMを添加し、5分、15分、30分、1時間、2時間後に経時的にサンプリングを行い、コロニーカウントによる生菌数の測定(Time killing curveの作成)およびMultisizer™3(BECKMAN COULTER社)を用いた菌の形態変化の解析を行った。添加する抗菌薬の濃度は、(2)で決定したMIC値をもとに、終濃度がそれぞれ4MIC、2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC濃度となるように調整した。

生菌数の測定は、上記の各タイミングで100 μl ずつ採取し、生理食塩水で10倍希釈系列を作成し、普通寒天培地にコンラージした。18~24時間後に、発育コロニーが20~200の間でカウントできるものを有効とし、最終発育コロニー数を計測し、Time killing curveを作成した。

精密粒度分布測定については、上記の各タイムリングで500 μ lずつ採取し、MultisizerTM3を用いてサンプル中の粒度分布(菌の直径)を測定し、抗菌薬添加後の早期の菌の形態変化を観察した。

(4) 電子顕微鏡による菌の形態変化の評価

電子顕微鏡撮影は、東北大学医学部内の電子顕微鏡設備を使用し、同医学部共通機器室の動物実験病理プラットフォームのスタッフから技術的サポートを受けて標本作成や電子顕微鏡撮影を行った。

4. 研究成果

(1) 各種抗 MRSA 薬の最小発育阻止濃度測定

MRSA 臨床分離株 76 株の WAP および各種抗 MRSA 薬の MIC 測定の結果(表1) 血清添加なしの場合、各薬剤の MIC₉₀ 値は WAP; 2 μ g/ml, VCM; 2 μ g/ml, TEIC; 4 μ g/ml, ABK; 2 μ g/ml, LZD; 2 μ g/ml であった。一方で、血清を添加した場合、WAP では MIC₉₀ 値が 0.5 μ g/ml と抗菌活性の増強を認めた。しかし、VCM、TEIC、ABK、LZD では血清添加後の抗菌活性増強は認められず、WAP 特有の新しい知見であった。

表1: 東北大学病院での臨床分離株(n=76)に対するMIC値(μ g/ml)

	Serum (-)			Serum (+)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
WAP (18hrs)	2	2	1-2	0.25	0.5	0.06-1
WAP (24hrs)	2	2	1-4	0.5	1	0.06-2
VCM	1	2	1-2	1	2	1-4
TEIC	1	4	0.5-8	1	2	0.5-8
ABK	1	2	0.5-2	0.5	1	0.25-2
LZD	1	2	0.5-2	1	2	0.5-2

(2) WAP と VCM 添加後の菌の粒度分布変化と生菌数変化

対象菌株としては、前述の MRSA 臨床分離株 76 株のうち無作為に 2 株を選択した。

WAP および VCM を用いて、各々の MIC 値の濃度で、作用後 5 分~120 分までの各タイムポイントにおいて、Time-killing assay 法を用いた生菌数カウントおよび精密粒度分布測定による菌径の変化を行った。

まず、生菌数カウントでは、2 株ともに WAP では 5 分の時点で菌量が 1/1000~1/10 万へ減少したのに対し、VCM では 120 分の時点で有意な生菌数の減少が見られなかった(図1、図2)。

図1: 抗菌薬添加後の生菌数の変化

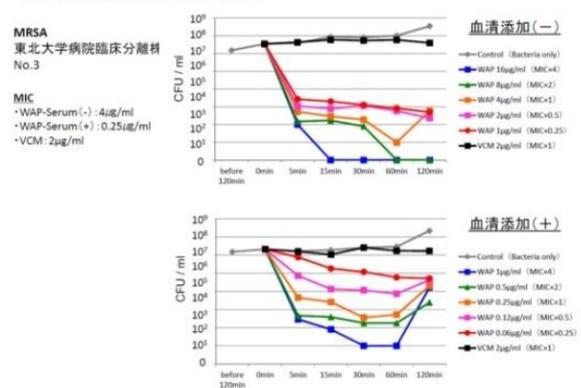
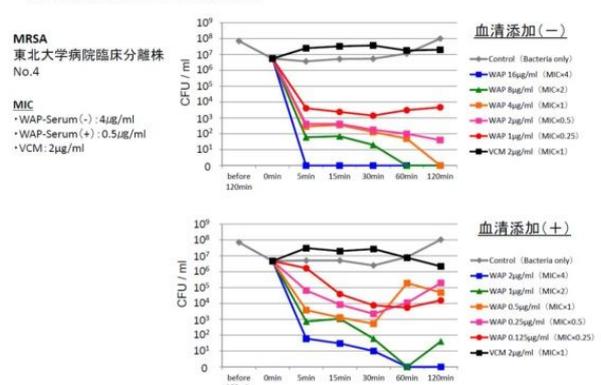


図2: 抗菌薬添加後の生菌数の変化



次に、生菌数カウントと同じ各タイムポイントで精密粒度分布測定を行った。2 株ともに、WAP では作用後 5 分の時点で菌径の減少が認められたのに対し、VCM では作用後 120 分の時点で有意な菌径の変化は認められなかった(図3、4)。

図3: 抗菌薬作用後の菌の粒子径の変化(Early phase)

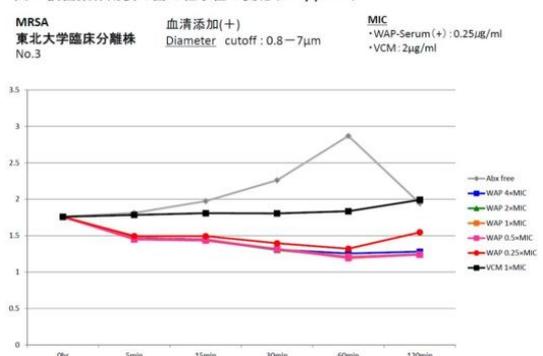
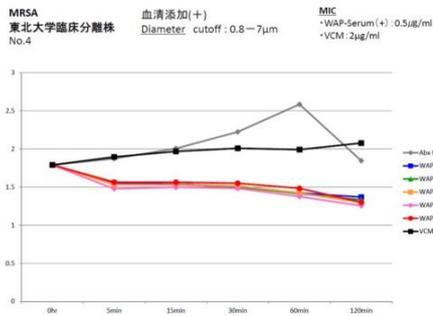


図4: 抗菌薬作用後の菌の粒子径の変化 (Early phase)



この抗菌薬添加後早期の菌の直径の変化は、WAP や VCM の作用発現の特徴と合致し、また生菌数カウントの結果とも一致していた。このことから、精密粒度分布測定での菌径変化が殺菌能評価として有用であることが示唆された。

(3) WAP 添加後の電子顕微鏡での形態観察
上記の WAP 添加後短時間での菌の粒度分布変化と生菌数変化について、菌形態の実際の変化をとらえるために、電子顕微鏡を用いて菌の形態観察を行った。しかし、WAP 添加後(図5)と抗菌薬非添加後(図6)と比べて明らかな形態変化を確認することができなかった。

図5: 電子顕微鏡写真 (WAP添加後)

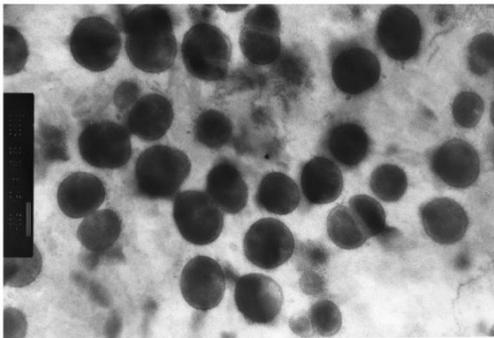
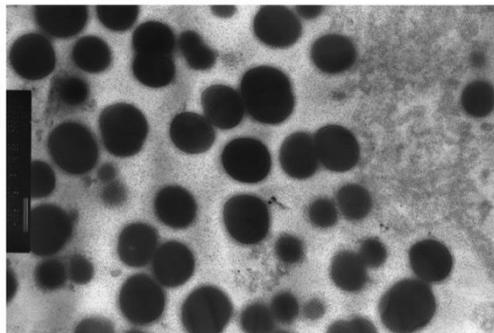


図6: 電子顕微鏡写真 (抗菌薬添加なし)



粒度分布測定で認められた菌の直径の変化が電子顕微鏡では確認できなかった原因としては、電子顕微鏡の検体準備過程における乾燥操作そのものが菌の形態を変えてしまう可能性が考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八田 益充 (HATTA, Masumitsu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 80528258