

論文の内容の要旨

論文題目：高度バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA)感染症に対する治療法の確立

氏名 田淵 史晃

【導入】

現在、様々な薬剤耐性菌による感染症が世界中で蔓延しており、それらに対する治療方法の確立が急務であるにも関わらず、有効な抗生物質の開発が遅れており、大きな社会問題となっている。黄色ブドウ球菌は、日和見感染症の原因菌であり、免疫力が低下した患者において敗血症や髄膜炎など重篤な感染症を引き起こす。近年、メチシリンなどの抗生物質に耐性の黄色ブドウ球菌（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌：MRSA）が世界中で分離されており、臨床上問題となっている。バンコマイシン（VCM）は、MRSA に対して有効な数少ない抗生物質の一つである。VCM の頻用により、VCM に対して中程度耐性となった黄色ブドウ球菌（VISA）が臨床分離されることが世界中で報告されている。VCM の継続的な使用により、VCM に対して高度な耐性を示す MRSA (高度 VCM 耐性 MRSA : VRSA) の出現が危惧されている。将来の高度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌感染症の蔓延に備えて、有効な治療法を確立することは重要な課題である。本研究で私は、変異原処理と VCM による選択の繰り返しにより、人工的に高度 VCM 耐性を示す MRSA 株を作出し、それらの性状解析を行った。さらに私は、高度

VCM 耐性 MRSA 感染症に対して有効な治療方法の探索を行った。

【結果と考察】

(1) 高度 VCM 耐性 MRSA の取得

私は高度 VCM 耐性 MRSA を人工的に取得する目的で、8 株の臨床分離された MRSA に対して、液体培地中で変異原である EMS 処理と VCM 含有培地での選択を行った。各 MRSA 株に対して、20 回以上 EMS 処理/VCM 選択を繰り返した後に、シングルコロニーを分離した。これらの株に対する VCM の最小増殖阻止濃度 (MIC) を測定したところ、8 株全てについて 8~32 $\mu\text{g/ml}$ という値が得られた (図 1)。この結果から、私は高度 VCM 耐性 MRSA を取得できたと判断し、これらの株を以降の実験に用いた。

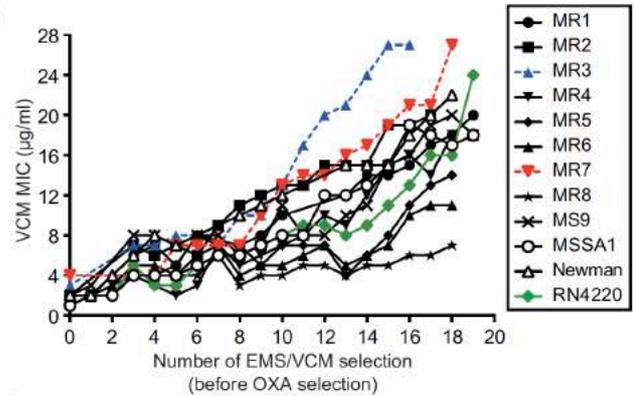


図 1. EMS 処理/VCM 選択による、VCM 耐性度の上昇

(2) 高度 VCM 耐性 MRSA の性状

取得した高度 VCM 耐性 MRSA が示す性質を明らかにする目的でまず、高度 VCM 耐性 MRSA である VR3 株および VR7 株の、各種抗 MRSA 薬に対する感受性を検討した。その結果、VR3 株および VR7 株は、既存の抗 MRSA 薬 (リネゾリド、およびリファンピシン)、ならびに我々の研究グループが発見した新規抗生物質ライソシン E に対

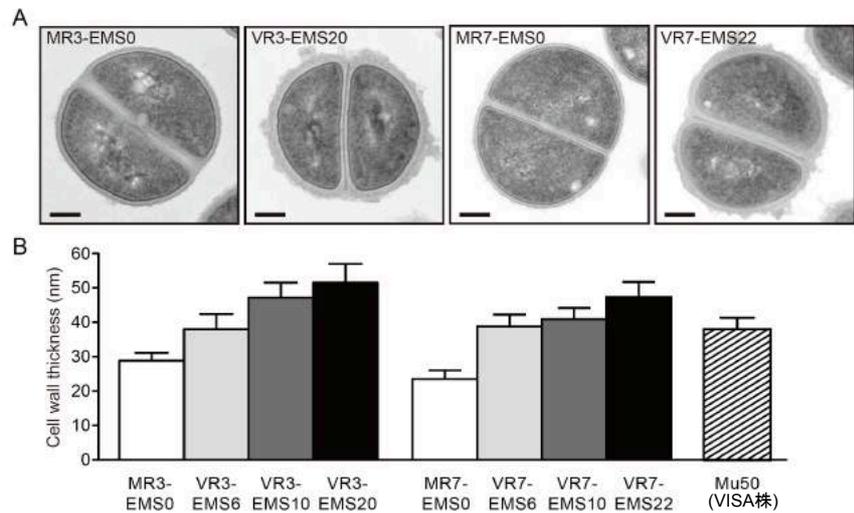


図 2. 高度 VCM 耐性 MRSA の細胞壁の肥厚
A. 電子顕微鏡写真
B. 高度 VCM 耐性 MRSA の細胞壁の厚さ

して、親株と同等の感受性を示した。次に、取得した株の細胞壁の厚さを親株と比較した。すでにこれまで中程度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) の細胞壁が、VCM 感受性黄色ブドウ球菌に比べて肥厚していることが報告されている。私は本研究で得た高度 VCM 耐性 MRSA の細胞壁の厚さを電子顕微鏡下で測定した。その結果、親株と比べ、1.8 ないし 2.0 倍

に肥厚していることが明らかとなった (図 2)。次に、高度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌のゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し、親株と比較した。その結果 VCM の MIC が 32 $\mu\text{g/ml}$ である高度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌 4 株 (VR3、VR4、VR7、VR4220) のうち 3 株において、*ausA*、*sdrC*、SA1584 が変異していることを見出した。これらの遺伝子の変異と VCM 耐性との関連についての報告はなく、本研究が初めての知見である。さらに、VR3 株および VR7 株において、EMS 処理/VCM 選択の回数の増加に相関してゲノム中の遺伝子変異の蓄積と VCM の MIC の上昇が認められた (図 3)。以上の結果は、VCM 感受性の MRSA が、遺伝子変異を蓄積することにより、細胞壁の肥厚化を伴う高度 VCM 耐性を獲得したことを示唆している。

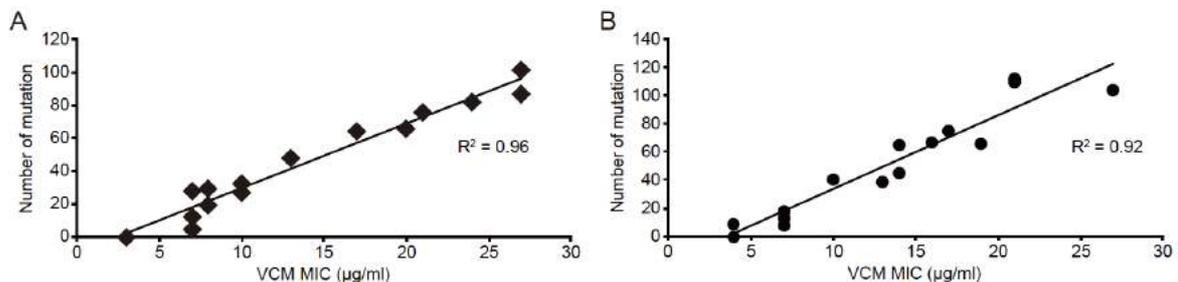


図 3. 高度 VCM 耐性 MRSA における遺伝子変異の数と VCM の MIC との相関
 A. EMS 処理/VCM 選択が 3~16 回の MR3 由来株についてプロットした。
 B. EMS 処理/VCM 選択が 3~18 回の MR7 由来株についてプロットした。

(3) *in vitro* で高度 VCM 耐性 MRSA に対して VCM と相乗効果を示す抗菌薬

中程度 VCM 耐性 MRSA (VISA) に対して、VCM と β -ラクタム系抗生物質が相乗的に作用し、抗菌作用が上昇することが報告されている。私は取得した高度 VCM 耐性 MRSA が、 β -ラクタム系抗生物質を併用することにより VCM に対して感受性化するのではないかと考え、それを検証した。その結果、VR7 株に対して、各種 β -ラクタム系抗生物質を 2 $\mu\text{g/ml}$ 併用すると、VCM の MIC が顕著に低下することが明らかとなった。オキサシリン (OXA) およびセフトリアキソン (CTRX) については、VCM との併用効果において用量依存性があることを確認した。次に私は、高度 VCM 耐性 MRSA に対して、 β -ラクタム系抗生物質以外の抗生物質が、VCM と併用効果を示すか否かを検討した。様々な作用機序を有する抗生物質を併用した時の VR7 株に対する VCM の MIC を測定した。その結果、20 $\mu\text{g/ml}$ の D-サイクロセリン (CS) を併用した時に、VR7 株に対する VCM の MIC が 1/4 に低下することが分かった。さらに、VCM との併用効果において、CS の用量依存性が確認された。一方、VCM と、エリスロマイシンやレボフロキサシンの併用では、VCM の MIC の顕著な低下はみられなかった。以上の結果は、*in vitro* において、VCM と β -ラクタム系抗生物質、および VCM と CS の組み合わせが、高度 VCM 耐性 MRSA に対して併用効果を示すことを示唆している。

(4)カイク感染モデルを用いた、抗生物質の併用療法の有効性の検討

次に私は、上記で見出した抗生物質の併用療法の、*in vivo*における有効性を、カイク感染モデルを用いた実験系により検討した。カイクを VR7 株で感染させ、VCM と CTRX を同時に投与した場合は、これらを単独投与した場合に比べて、有意な延命が認められ、併用による治療効果があることが示された (図 4)。一方、OXA は、*in vitro* で併用効果を示したが、カイクでの感染実験では、VCM と併用投与しても、治療効果はほとんどみられなかった (図 4)。また、VR7 株を感染させたカイクに対して VCM と CS を併用投与した場合においては、治療効果が認められた (図 5)。以上の結果は、高度 VCM 耐性 MRSA 感染症に対して、VCM と CTRX、もしくは VCM と CS の併用療法が有効であることを示唆している。*in vivo*での薬効評価において、CTRX では VCM との併用効果がみられたのに対して、OXA ではみられなかったのは、CTRX が OXA より血中半減期の長いためであると考えられる。

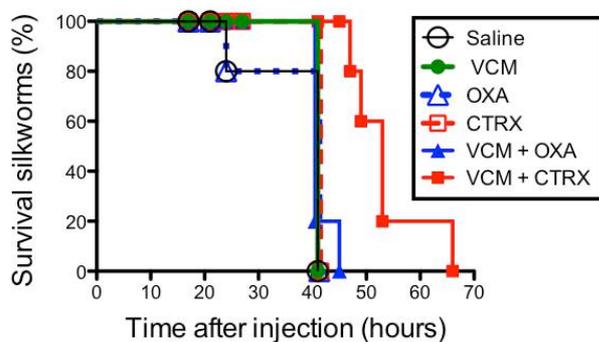


図 4. 高度 VCM 耐性 MRSA 感染カイクに対する VCM と CTRX の併用による治療効果 (n=5)

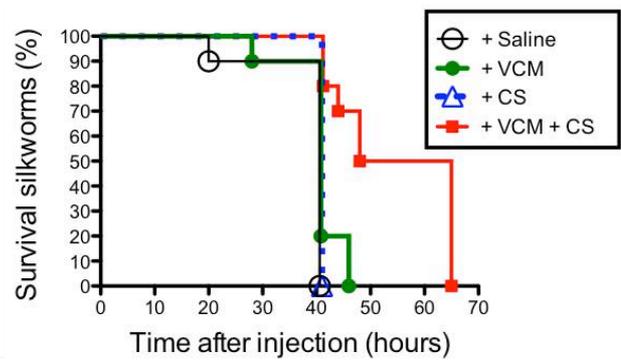


図 5. 高度 VCM 耐性 MRSA 感染カイクに対する VCM と CS の併用による治療効果 (n=10)

【まとめ】

私は、VCM の存在下での変異原処理により、臨床分離された MRSA から高度 VCM 耐性株 (VRSA) を獲得できることを示した。また、高度 VCM 耐性 MRSA 感染症に対して、VCM と CTRX または CS との併用が治療に有効であることが示唆された。

【参考文献】

Kenichi Ishii, **Fumiaki Tabuchi**, Miki Matsuo, Keita Tatsuno, Tomoaki Sato, Mitsuhiro Okazaki, Hiroshi Hamamoto, Yasuhiko Matsumoto, Chikara kaito, Tetsuji Aoyagi, Keiichi Hiramatsu, Mitsuo Kaku, Kyoji Moriya and Kazuhisa Sekimizu.

Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by *in vitro* mutagenesis.

Scientific Reports. 2015 ; 5 : 17092