

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Analysis of synergy between beta lactams and anti methicillin resistant Staphylococcus aureus agents from the standpoint of strain characteristics and binding action
別タイトル	菌株の特徴および抗菌薬結合能の観点からみた ラクタム系薬の有する抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌薬とのシナジー効果についての検討
作成者（著者）	小野, 大輔
公開者	東邦大学
発行日	2019.03.13
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 61.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：草地信也 / タイトル：Analysis of synergy between beta lactams and anti methicillin resistant Staphylococcus aureus agents from the standpoint of strain characteristics and binding action / 著者：Daisuke Ono, Tetsuo Yamaguchi, Masakaze Hamada, Shiro Sonoda, Ayami Sato, Kotaro Aoki, Chiaki Kajiwara, Soichiro Kimura, Momoko Fujisaki, Hiroyuki Tojo, Masakazu Sasaki, Hinako Murakami, Keisuke Kato, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Journal of Infection and Chemotherapy / 巻号・発行年等：25 (4):273 280, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第911号
学位記番号	甲第624号
学位授与年月日	2019.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD23681724

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

小野大輔より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 624 号

学位申請者 : お の だ い すけ
小 野 大 輔

学位審査論文: Analysis of synergy between beta-lactams and anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* agents from the standpoint of strain characteristics and binding action

(菌株の特徴および抗菌薬結合能の観点からみたβラクタム系薬の有する抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌薬とのシナジー効果についての検討)

著 者 : Daisuke Ono, Tetsuo Yamaguchi, Masakaze Hamada, Shiro Sonoda, Ayami Sato, Kotaro Aoki, Chiaki Kajiwara, Soichiro Kimura, Momoko Fujisaki, Hiroyuki Tojo, Masakazu Sasaki, Hinako Murakami, Keisuke Kato, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Infection and Chemotherapy

論文内容の要旨 :

【背景】 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内および市中感染において最も遭遇する機会の多い薬剤耐性菌のひとつであるが、侵襲性感染症の起因菌としても重要である。より効果的な治療戦略の確立が望まれるが、近年、MRSA 感染症に対して抗菌薬を複数使用する併用療法が注目を集めている。今回我々は、抗 MRSA 薬に様々な抗菌薬を併用し薬剤感受性を評価する事で、最もシナジー効果が期待できる併用薬の組合せを検討し、シナジー効果の機序解明を試みた。

【方法】 ① MRSA 菌株を対象に抗 MRSA 薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を単剤および併用薬存在下で測定した。対象菌株は、標準株 3 株および東邦大学医療センター大森病院・微生物検査室にて集められた臨床分離株 37 株の計 40 株とした。抗菌薬は 3 つの抗 MRSA 薬 (バンコマイシン VCM、ダプトマイシン DAP、リネゾリド LZD)、および 13 の併用薬 (オキサシリン、セファゾ

リン、セフォキシチン、セフメタゾール、メロペネム、リファンピシン、クリンダマイシン、ミノサイクリン、トリメトプリム/スルファメトキサゾール、レボフロキサシン、クラリスロマイシン、ゲンタマイシン、アルベカシン)を用いた。シナジー効果の評価は、指標としてMaximum Synergy Effect (MSE、 $MSE = \log_2$ (単剤使用時の抗MRSA薬のMIC/併用薬を併用したときの抗MRSA薬のMIC)で定義)を用い、MSEが0未満、0、0より大きいときに、それぞれシナジー効果あり、不関、拮抗効果ありとした。そして、40株のうち、MSEが判定できた株のMSEの中央値が0未満、0、0より大きいときに、該当する抗MRSA薬と併用との組合せを、それぞれシナジー効果あり、不関、拮抗効果ありとした。② ①でシナジー効果が認められたβラクタム系薬(セフメタゾール、メロペネム)、シナジー効果が認められた非βラクタム系薬(アルベカシン)、シナジー効果が認められなかった抗菌薬(クリンダマイシン)を抗MRSA薬に併用し、Killing Curve Assayを行った。③ 対象株はSCCmecタイプIIおよびbIaZ遺伝子の保有状況をPCRにて確認した。それぞれSCCmec type IIおよびtype IV、bIaZ遺伝子保有および非保有の2群に分け、2群間でMSEの平均値を比較した。④ 蛍光標識したVCMおよびDAPをMRSA株に作用させ、セフメタゾール、メロペネム、アルベカシン、クリンダマイシン併用時の蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】① 抗MRSA薬とβラクタム系薬の組合せにおいて、シナジー効果が認められた。抗MRSA薬によりシナジー効果のパターンは異なっており、VCMでは、βラクタム系薬の種類によってシナジー効果の度合いが異なったが、DAP、LZDではβラクタム系薬の種類によらず様なシナジー効果が観察された。βラクタム系薬以外の併用薬では、VCMとDAPで、アルベカシンを併用した際にシナジー効果を認めたが、LZDでは認めなかった。他の組合せでは有意なシナジー効果は認められなかった。② VCMとDAPでは、Killing Curve Assayにおいて①と同様の併用時の結果が再現された。LZDでは再現されなかったが、観察時間を8時間から24時間に延長したところ、①と同様の結果となった。③ 併用薬の薬剤感受性の感性群/耐性群、SCCmecタイプII群/IV群、bIaZ遺伝子保有群/非保有群のあいだで、2群間のMSE平均値を比較したが、一部では有意差をもって平均値に差があったものも認められたが、シナジー効果の違いを一元的に説明できるような、一定の傾向は認められなかった。④ 蛍光標識VCMでは、セフメタゾールとメロペネム併用時には相対蛍光強度が有意に低下したが、アルベカシン、クリンダマイシン併用時には有意な変化は認められなかった。一方で、蛍光標識DAPでは、セフメタゾール、メロペネム、アルベカシン併用時には相対蛍光強度が有意に上昇したが、クリンダマイシン併用時には有意な変化は認められなかった。

【考察】 抗MRSA薬にβラクタム系薬を併用するとシナジー効果が得られ、なかでもVCMにセフメタゾールを併用したときにはシナジー効果をもっとも高く(MSE中央値=-2)、臨床現場においても効果が期待できる可能性がある。蛍光標識したVCMの検討では、βラクタム系薬は細胞壁を薄くすることでVCMとの併用効果を示すと考えられた。蛍光標識したDAPの検討では、βラクタム系薬の作用により細胞膜の電荷が変化し結合するDAP量が増加することが考えられた。我が国固有の抗菌薬であるアルベカシンのシナジー効果も確認され、今後、臨床現場における評価が期待される。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 624 号	氏 名	小 野 大 輔
学位審査担当者	主 査	草 地 信 也
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	瓜 田 純 久
	副 査	杉 山 篤
	副 査	本 間 栄

学位審査論文の審査結果の要旨 :

当該研究の結果は、Journal of Infection and Chemotherapy に平成 30 年 12 月にアクセプトされた。抗 MRSA 薬は、VCM の他に LZD、DAP が存在するが、いずれも抗菌力が不十分であり、治療に難渋する症例は少なくない。そこで、抗菌薬を組合せ、MRSA に対してより高い抗 MRSA 効果を得ようとする抗菌薬併用療法に期待が集まっている。本研究は、本来、抗 MRSA 活性はないが、抗 MRSA 薬と併用すると抗 MRSA 活性が増強する β ラクタム系薬との最適な組合せや機序など明らかにするため、当該研究は行われた。まず最適な抗菌薬の組合せを明らかにするため、MRSA40 菌株を対象に、抗 MRSA 薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を単剤および併用薬存在下で測定し、併用薬存在下で抗 MRSA 薬の MIC がどの程度低下するか (=シナジー効果) を検討した。抗菌薬は 3 薬剤 (バンコマイシン、ダブトマイシン、リネゾリド)、および 13 の併用薬 (β ラクタム系 5 薬剤、非 β ラクタム系 8 薬剤) を用いた。結果、抗 MRSA 薬とほぼすべての β ラクタム系薬の組合せにおいて、シナジー効果が認められた (図 1)。特にバンコマイシンと 2 つの β ラクタム系薬 (セフメタゾール、メロペネム) の組合せで、シナジー効果が高かった。次に殺菌能をみる Killing Curve Assay が行われ、これらのシナジー効果が再現された (図 2)。高いシナジー効果が期待される MRSA 菌株の特徴を明らかにするため、対象とした MRSA40 菌株を 3 つの属性でそれぞれ 2 群 (併用薬の薬剤感受性の感性群と耐性群、SCC_{mec} 遺伝子のタイプ II 群と IV 群、bla-Z 遺伝子の保有群と非保有群) に分け、2 群間で併用効果に違いがあるかを検討したが、結果として有意と考えられる一定の傾向は認められなかった (表 2)。次に蛍光標識したバンコマイシンおよびダブトマイシンを用いて、β ラクタム系薬 (セフメタゾール、メロペネム) などを併用したときの蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡で観察した。β ラクタム系薬併用時にバンコマイシンは蛍光強度が低下しており、一方でダブトマイシンでは上昇していた (図 3)。これは既報の知見と併せると、前者は β ラクタム系薬によりバンコマイシンの結合部位である細胞壁が薄くなったため、後者は β ラクタム系薬により細胞膜の荷電が陰性に傾きダブトマイシンの結合率が上昇したため、と推察された。以上の結果から、特にバンコマイシンとの併用の際には β ラクタム系薬の種類が重要であること、今回検討した 3 つの属性は併用効果を予測する因子である可能性は低いこと、併用薬の存在下においては抗 MRSA 薬の結合性が変化していることが明らかになった。

学位審査会は、平成 31 年 1 月 22 日の 16 時から行われた。審査委員から、MRSA 感染症が致死的になってしまう原因、β ラクタム系薬の黄色ブドウ球菌への作用機序および MRSA には効果がないことの機序、本来抗 MRSA 薬活性がないはずの β ラクタム系薬がシナジー効果を生み出す機序、バンコマイシンの細胞壁合成の阻害機序、薬剤感受性のよい抗 MRSA 薬と併用薬の組合せが結局よいのではないかと、ダブトマイシンは MRSA の細胞膜の荷電状態に強く影響を受けるがアシドーシスなど pH が変化した際や低アルブミン血症の際についての報告はあるか、MRSA と他の菌との混合感染時についてはどうか、シナジー効果で高められた抗 MRSA 活性は高い抗黄色ブドウ球菌活性をもつ抗菌薬と比較するとどの程度か、などの質問がなされた。申請者は、それぞれの質問に対して当該研究の結果及び文献的なデータをもとに、的確に回答した。また加えて、審査委員から今後当該研究をさらに進めていくうえで、抗菌薬併用時の実際の体内での血行動態 (PK/PD)、in vivo での検討、などについて助言がなされた。以上より、当該研究は難治性 MRSA 感染症に対する抗菌薬併用療法について新しい知見をもたらすものであり、審査委員全員の一致のもとで、学位授与に相当する論文であるとの結論を出した。