



緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症 に対する抗菌薬併用療法に関する基礎的研究

中田, 勝久

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

Z2113

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002113>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	中 田 勝 久 (奈良県)
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1568号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成9年3月7日
学位論文題目	緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症に対する抗菌薬併用療法に関する基礎的研究

審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫
	教授 堀 田 博 教授 島 田 桂 吉

論文内容の要旨

緒 言

近年、広い抗菌スペクトルと強い抗菌力をもつ多くの β -ラクタム薬やニューキノロン薬が盛んに開発され臨床に使用されてきた。それらの単独投与で多くの感染症が治癒に至るが、耐性獲得などにより抗菌薬単独投与では十分な効果が発揮できない場合もみられる。その代表的なものに緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）による感染症がある。緑膿菌は外膜透過性の問題などから、本来優れた抗菌力を有するものが極めて少ないことに合わせて、無計画な化学療法剤の使用が耐性菌を助長したことも相まって本菌による難治性感染症が多くみられるようになった。一方、MRSAについては黄色ブドウ球菌に比較的抗菌力の弱い第3世代セフェム系抗生物質が臨床の場で多く用いられてきたことがその増加の一因であると考えられている。緑膿菌およびMRSA感染症の場合、単独で有効な薬剤が限られているので、十分な治療効果を得るためには抗菌薬の併用などが一つの方策と考えられる。

著者は、緑膿菌およびMRSA感染症に対する新しい治療法の一つとして作用機序の異なるフルオロキノロン薬（DNA gyrase阻害剤）とFOM（ペプチドグライカン合成阻害剤）との併用効果をin vitroおよびin vivo感染モデルを用いて検討し、新たな知見を得たので報告した。

（実験材料および方法）

1. 使用抗菌薬剤

ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), enoxacin (ENX), sparfloxacin (SPFX), ^{14}C -sparfloxacin (^{14}C -SPFX), fleroxacin (FLRX), temafloxacin (TMFX), OPC-17116, imipenem (IPM), minocycline (MINO), ceftazidime (CAZ), fosfomycin (FOM), arbekacin (ABK), gentamicin (GM)およびvancomycin (VCM)を用いた。

2. 使用菌株

緑膿菌は尿路由来34株および教室保存株を、MRSAは各科領域より分離された97株および分与株

を用いた。

3. 薬剤感受性測定

抗菌薬の感受性測定は日本化学療法学会標準法に準じて行なった。

4. フルオロキノロン薬とFOMのin vitro併用効果

緑膿菌およびMRSA株に対するSPFX（被検フルオロキノロン薬の中で両菌に対するMIC分布が最良）とFOMとのin vitro併用効果をcheckerboard法および増殖曲線を用いて検討した。

5. 実験的白血球減少マウスの作製

ICR系雌マウス（5～6週齢，体重23～25g）にcyclophosphamide（300 mg/kg）を，腹腔内に1回投与して作製し，投与4日目に末梢白血球が最低値になることを確認した。

6. In vivo感染防御実験

実験的腎盂腎炎および全身感染の併用実験に用いた菌株はP. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1（いずれもキノロン耐性株）である。菌接種はいずれのモデルでもcyclophosphamide投与4日目の白血球減少状態下で行なった。

6-1)上行性腎盂腎炎モデルではこれら菌株のそれぞれ100 ID₅₀の菌量を経尿道的にマウス膀胱内に接種した。菌接種後3，8，24，30，48および54時間目にSPFXとFOMをそれぞれ単独または同時併用で経口投与した。感染5日目に腎中の生菌数の有無を調べ，腎中からの菌消失率により薬効を判定した。

6-2)全身感染症モデルではP. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1のそれぞれ10 LD₅₀の菌量をマウス尾静脈内に接種し，菌接種後0，6，24および30時間目にSPFXおよびFOMをそれぞれ単独または同時併用で経口投与し，感染7日目の生存マウス数から薬効を判定した。

併用効果は，腎盂腎炎モデルでは併用群の腎からの菌消失率が，全身感染モデルでは併用群の生存率が，各々の単独群のそれらの和より大きい場合を相乗効果，同等の場合は相加効果，下回った場合を拮抗と判定した。

7. 病理組織学的所見

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1による腎盂腎炎マウスに両剤の単独または併用投与後，腎を摘出，常法に従ってパラフィン切片を作成し，H.E.染色後光学顕微鏡で観察した。

8. P. aeruginosaおよびMRSAの菌体内へのSPFXの取り込み

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1を用いて¹⁴C-SPFXの菌体内への取り込みを経時的に検討した。

（結果）

1. 薬剤感受性試験

緑膿菌34株のうち，いずれのキノロン薬に対してもMIC 12.5 μg/ml以上の耐性株が40～50%認められた。CAZおよびGMではそれぞれ10%および20%の耐性株を認めたが，IPMでは耐性株を認めなかった。一方，MRSA 97株のうち，MIC 12.5 μg/ml以上の耐性株はVCMおよびABKでは1株も認めなかったが，SPFXでは1%，その他のキノロン剤およびIPMでは10-30%認められた。

2. SPFXとFOMのin vitro併用効果

緑膿菌22株およびMRSA 32株のどの菌株に対してもSPFXとFOMの併用で相乗または相加効果を示した。また，緑膿菌4株およびMRSA 3株に対し，SPFXおよびFOMの1/2 MICあるいは1MIC濃度の単独では殺菌効果が得られなかったが，両剤の併用では著明な殺菌作用が認められた。

3. In vivo感染防御効果

3-1)マウス腎盂腎炎モデル

a) *P. aeruginosa* KP-62株接種群でのSPFXとFOMとの併用効果

1)菌回収からみた成績

P. aeruginosa KP-62によるマウス腎盂腎炎において、単独投与で十分な効果の得られない投与量同士の併用、即ち、SPFX 25, 12.5および6.25 mg/kgとFOMの 6.25mg/kgとの併用でそれぞれ100, 100および60%の菌消失率が得られ、相乗効果を示した。また、その他の投与量の併用においても効果の増強が得られた。

2)腎の病理組織学的所見

SPFX (25 mg/kg) およびFOM (3.13 mg/kg) の単独投与群の腎においては膿瘍形成が見られたが、両剤併用群の腎には著明な病変はなく、併用効果が認められた。

b)MRSA K-1株接種群でのSPFXとFOMとの併用効果

1)菌回収からみた成績

MRSA K-1に対し、SPFXおよびFOMの単独投与で十分な効果の得られない投与量同士の併用、即ち、SPFX 25, 12.5および6.25 mg/kgとFOM 6.25 mg/kgとの併用での腎からの菌消失率はそれぞれ100, 80および80%であり、相乗効果が得られた。

2)腎の病理組織学的所見

SPFX (25 mg/kg) あるいはFOM (3.13 mg/kg) の単独投与群の腎では腎盂腎炎の像が見られたが、両剤の併用群の腎には明らかな病変は認められなかった。

3-2)マウス全身感染モデル

P. aeruginosa KP-62株接種群でのSPFXとFOM併用効果

P. aeruginosa KP-62に対し、SPFXおよびFOMの単独投与で有効性の認められない投与量同士の併用、即ち、SPFX 12.5および6.25 mg/kgとFOM3.13 mg/kgとの併用でいずれも50%以上の生存率を示し、用量依存的に効果の増強が認められた。

b)MRSA K-1株接種群でのSPFXとFOMの併用効果

MRSA K-1に対するSPFXおよびFOMの単独投与で十分な効果の得られない投与量同士の併用、即ち、SPFX 25, 12.5および6.25 mg/kgとFOM3.13 mg/kgとの併用でいずれも50%以上の生存率を示し、効果の増強が認められた。

4. *P. aeruginosa*およびMRSAの菌体内へのSPFXの取り込み

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1株に対し、¹⁴C-SPFXとFOMの同時添加および、FOMで前処理し2時間後に¹⁴C-SPFXを加えた場合、SPFX単独に比べて、菌体内への¹⁴C-SPFXの取り込み量は明らかに多かった。

(考 察)

近年、抗菌力が強く、かつ抗菌スペクトルの広いニューキノロン薬が数多く開発され、種々の感染症の治療に広く用いられ、その優れた治療効果により、感染症治療薬として重要な位置を占めるようになった。その反面、キノロン薬が多く使用されるにしたがってキノロン耐性菌の出現頻度が年々高くなりつつある。とりわけキノロン耐性の緑膿菌やMRSAは各科領域において明らかに増加している。これら耐性菌による感染症に対して、単独で有効な抗菌薬として、緑膿菌ではIPM, CAZ, GM, TOBなど、MRSAではVCM, ABKなどが挙げられるが、臨床の場でこれらが単独で十分な有効性を

示し、かつ安全性を確保できるかという点では限界がある。緑膿菌などによる難治傾向の高い感染症には抗菌薬の併用療法が一つの手段と考えられ、実際種々の組み合わせが検討され、有用性が報告されている。しかし、いずれも注射薬を主体とする併用である。今回、外来治療を想定した経口キノロン薬と経口抗生物質との適切な併用療法を探索する目的で、現有のキノロン薬の中で緑膿菌、MRSAの両菌に優れた抗菌力を有するSPFXと、予備実験においてキノロン薬との間で最も優れた併用効果を示したFOMを選択し、その併用効果についてin vitroおよびin vivoで検討した。

その結果、in vitroでは、緑膿菌およびMRSAに対し、両者の併用は相乗または相加作用を示した。これらin vitroでのSPFXとFOMとの相乗または相加効果が、in vivoに反映されるか否かをさらに、白血球減少マウスを用いて検討した。本実験の結果、緑膿菌あるいはMRSAによる尿路および全身感染モデルにおいて、SPFXとFOMの併用で明らかな効果の増強を認めた。

次に、これら併用効果の機序を明らかにすることを目的にP. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1における¹⁴C-SPFXの菌体内への取り込みを検討した。その結果、SPFXとFOMを併用添加した場合、SPFXの単独添加に比し、いずれの菌株でも菌体内への¹⁴C-SPFXの取り込みの程度は明らかに高かった。

FOMは細菌のpeptidoglycan合成を阻害することが知られている。今回の結果は、FOMの作用により細菌の細胞壁が障害を受け、SPFXの菌体内への透過性が亢進した事を推測させ、このことが相乗効果を示すメカニズムのひとつと推察される。

緑膿菌やMRSAはimmunocompromised hostで重篤な感染症を引き起こしやすいことがよく知られている。今回用いた白血球減少マウスでは健常マウスに比べて、白血球数は約1/10に減少しており、典型的な易感染宿主モデルといえる。本モデルにおいて、SPFXとFOMとの併用が緑膿菌およびMRSAによる実験的尿路あるいは全身感染症に対して良好な効果を示したことより、両菌種のみならず、その他の菌や複数菌等による難治性感染症の治療にも両剤の併用療法は試みる価値のある治療法と推測され、今後臨床に応用し、更に検討をすすめたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は抗菌薬に広く耐性を示し、両菌による感染症は各科領域で大きな問題になっている。これら感染症に対する抗菌薬単剤療法の治療効果は一般的に不良で、十分な治療効果を得るためには抗菌薬の併用が一つの方策と考えられている。従来、併用療法については、注射薬を主体になされており、経口投与薬同士の併用については、いまだ有効な方法は確立されていない。本研究者は、経口投与による新しい併用療法の探索を目的にフルオロキノロン薬（SPFX: DNA gyrase阻害剤）およびfosfomycin（FOM: ペプチドグライカン合成阻害剤）とのin vitroおよびin vivo併用効果を検討し、新しい知見を得た。

（材料および方法）

1. In vitro併用効果

緑膿菌およびMRSA株に対するSPFXとFOMとのin vitro併用効果をcheckerboard法および増殖曲線を用いて検討した。

2. In vivo併用効果

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1（いずれもキノロン耐性株）によるマウス上行性腎盂腎

炎および全身感染における抗菌薬併用治療実験を行った。菌接種はいずれのモデルでもcyclophosphamide投与4日目の白血球減少状態下マウス（末梢白血球数：500 cells/mm³前後，正常値の薬1/10）に行なった。

1)上行性腎盂腎炎モデルではこれらの菌株のそれぞれ100 LD₅₀に当たる菌量を経尿道的に膀胱内に接種した。菌接種後1日2回3日間，SPFXとFOMをそれぞれ単独または同時併用経口投与した。感染5日目に腎からの回収生菌数の有無を調べ，腎からの菌消失率により薬効を判定した。これら摘出腎について，定法に従って，パラフィン切片を作製し，H.E.染色後光学顕微鏡で観察した。

2)全身感染モデルではP. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1株のそれぞれ10 LD₅₀の菌量をマウス尾静脈内に接種し，菌接種後1日2回2日間，SPFXとFOMをそれぞれ単独または同時併用経口投与した。感染7日目の生存マウス数から薬効を判定した。

併用効果は，腎盂腎炎モデルでは併用群の腎からの菌消失率が，全身感染モデルでは併用群の生存率が，各々の単独群のそれらの和より大きい場合を相乗効果，同等の場合は相加効果，下回った場合を拮抗と判定した。

3. P. aeruginosaおよびMRSAの菌体へのSPFXの取り込み

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1株を用いてin vitro実験系における¹⁴C-SPFXの菌体内への経時的な取り込み量をFOMの有無別に検討した。

（結果）

1. In vitro併用効果

緑膿菌およびMRSAに対するSPFXとFOMとのin vitro併用効果をcheckerboard法および増殖曲線により検討した結果，用いたすべての菌株に対し，両剤の併用で相乗あるいは相加作用が得られた。

2. In vivo併用効果

1)上行性腎盂腎炎モデル

(i) P. aeruginosa KP-62株による上行性腎盂腎炎に対し，SPFXとFOM各々の単独投与では十分な効果が得られない投与量，即ち，SPFX25，12.5および6.25 mg/kgとFOM6.25 mg/kgとの併用で腎からの菌消失率はそれぞれ100，100および60%であり，相乗効果が得られた。また，腎の病理組織学的所見では，SPFX（25 mg/kg）あるいはFOM（3.13 mg/kg）の単独投与群の腎においては膿瘍形成が見られたのに対し，両剤併用群の腎は著明な病変はなく，併用効果が認められた。

(ii) MRSA K-1株による上行性腎盂腎炎に対し，SPFXとFOM各々の単独投与では十分な効果が得られない投与量，即ち，SPFX 25，12.5および6.25 mg/kgとFOM6.25 mg/kgとの併用での腎からの菌消失率はそれぞれ100，80および80%であり，相乗効果が得られた。また，腎の病理組織学的所見では，SPFX（25 mg/kg）あるいはFOM（3.13 mg/kg）の単独投与群の腎は腎盂腎炎の像を呈したが，両剤併用群の腎には明らかな病変は認められなかった。

2)全身感染モデル

(i) P. aeruginosa KP-62株による全身感染症に対し，SPFXとFOM各々の単独投与では有効でない投与量，即ち，SPFX 12.5および6.25 mg/kgとFOM3.13 mg/kgとの併用によりいずれも50%以上の生存率が得られ，併用効果を認めた。

(ii) MRSA K-1株による全身感染症に対し，SPFXとFOM各々の単独投与で十分な効果の得られない投与量，即ち，SPFX 25，12.5および6.25 mg/kgとFOM3.13 mg/kgとの併用によりいずれも50%以上の生存率得られ，併用効果を認めた。

3. 緑膿菌およびMRSAの菌体内へのSPFXの取り込み

P. aeruginosa KP-62およびMRSA K-1株に対し、SPFXおよびFOMの同時添加ならびにFOMで前処理し2時間後にSPFXを加えた場合の菌体内へのSPFXの取り込み量は、明らかにSPFX単独添加に比べて高かった。

以上、本研究者は、外来治療を想定した経口キノロン薬と経口抗生物質との適切な併用療法を探索する目的で、キノロン薬としては緑膿菌、MRSAの両菌に比較的優れた抗菌力を有するSPFXを、抗生物質として作用機序の異なるFOMを選択、基礎的実験にて優れた併用効果を証明することに成功した。即ち、*in vitro*併用実験で緑膿菌およびMRSAに対し、両薬剤の併用が相乗または相加作用を示すことを見出し、さらに*in vivo*の検討として行なわれた白血球減少マウスを用いた尿路および全身感染モデルでの治療実験において、SPFXとFOMとの併用が相乗効果を示すことを証明した。このことは病理組織学的にも裏付けられた。さらに、これら併用効果の機序についての検討において、緑膿菌およびMRSAに対し、SPFXとFOMを併用した場合、SPFXの菌体内取り込み量がSPFX単独添加に比し明らかに高かったことから、FOMの作用により細菌の細胞壁が何らかの障害を受け、SPFXの菌体内への透過性が亢進したものと考えた。

本研究は各科領域で大きな問題になっている緑膿菌およびMRSAによる難治性感染症の新しい併用療法について、その基礎的検討成績を報告したものである。本療法は、従来ほとんど行われていなかった治療法であり、外来を含めた広い範囲で臨床に応用可能な点からも重要な新しい知見を得たものとして、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。