

## 論文の内容の要旨

論文題目 バイオフィーム形成緑膿菌とグリコペプチド低感受性黄色ブドウ球菌に関する基礎および臨床的研究

氏名 加藤 佳久

### 1. 序論

ヒトに感染症を引き起こす細菌は、生体内の様々な環境下で抗菌薬や宿主の防御機構による攻撃に耐えながら生存している。多くの病原細菌は、その旺盛な増殖力から生じる突然変異や遺伝情報のやり取りにより抗菌薬に耐性を獲得する能力に長け、ときにはバイオフィームの形成により抗菌薬のみならず宿主の免疫機構に対して抵抗性を示す。近年、黄色ブドウ球菌や緑膿菌による院内感染が多発するなか、耐性菌の出現を押し止めることは困難で、新薬の創出も困難な状況にある。我々は細菌と闘うため、難治性・耐性の原因となる細菌の戦略について知識を深め、既存の抗菌薬の性能を理解し適正に使用していく必要がある。本研究は、難治性感染症の代表例である緑膿菌バイオフィーム感染症と、最も注目されている耐性菌の一つであるグリコペプチド低感受性黄色ブドウ球菌への対策を基礎と臨床から検討した。

### 2. バイオフィーム形成緑膿菌に関する研究

細菌は、ストレス環境下などにおいて自身が産生する菌体外多糖に覆われた強固なバイオフィームを形成する性質を持つ。バイオフィームを形成した細菌が抗菌薬や宿主の免疫機構に抵抗性を示す機序として、抗菌薬の通過阻害、細菌の遺伝子発現の変化や増殖速度の低下、多糖類など

のポリマーによる細菌表面のマスキングが挙げられ、バイオフィームは慢性の難治性感染症における病態形成と遷延化の原因となる。

緑膿菌の分離頻度が高い尿路バイオフィーム感染症の治療法を目指し、*in vitro* でバイオフィームを形成した菌を殺菌し得る抗菌薬療法を検討した。生体内での尿流を考慮し、ロビンスデバイスと呼ばれる装置にて人工尿中で緑膿菌を灌流させることでシリコンディスク上にバイオフィームを形成させる実験系を導入した。抗菌薬を含有する人口尿の灌流時には、菌体成分の蓄積による影響が生じないように、新鮮な人口尿を一方向に灌流させた。また、強固なバイオフィームを形成した菌を均一に分散させることは困難なため、コロニー形成による菌数測定法の代わりに ATP 量を指標とする評価系を取入れた。その結果、キノロン系薬（DNA 合成阻害剤で、尿路感染症の起原菌に対し広い抗菌スペクトルと強い殺菌力を示す）とホスホマイシン（細胞壁合成の初期段階の阻害剤で、ユニークな作用機序と単純な化学構造が特徴的である）の併用による ATP 量の減少がみられ、電子顕微鏡下でもバイオフィームの破壊像が観察された。本併用効果は、新たに上市されたキノロン系薬を含め、ヒトの尿中で到達し得る薬剤濃度で得られることが明らかとなった。

次に、臨床病態を模倣した動物モデルとして、非侵襲的手法によりラット膀胱内に留置したポリエチレンチューブに緑膿菌バイオフィームを形成させるモデルを導入し、新たに薬効評価系を確立した。その結果、キノロン系薬単剤でもバイオフィーム中の菌数は減少することが明らかとなったが、3 日間連続投与しても完全な除菌には至らなかった。そこで、キノロン系薬にホスホマイシンを併用したところ、キノロン系薬単剤に比べさらに菌数が減少し、電子顕微鏡下でもバイオフィームの破壊像が認められた。

バイオフィーム感染症の動物モデル作製に関する報告は幾つかあるが、バイオフィーム形成の場として臓器内に何らかの異物を留置するなど、臨床の病態とかけ離れたものが多い。また、留置の際、開腹・開胸手術により誘発される生体反応や動物への負担が問題である。今回のモデルは、これらの問題を解決できるものであり、抗菌薬療法の適応を見極める上で有用と考えられる。併用効果の機序に関しては、ホスホマイシンが菌の細胞壁に損傷を与えることでキノロン系薬の菌体内移行が容易になるためとの報告がある。ホスホマイシンには、負電荷を帯びた菌体外多糖と反応せずバイオフィーム内への通過性に優れ、バイオフィーム内の環境に近い嫌気性条件下で本剤の菌体内取り込みに関与する輸送系の発現量が増加する特徴がある。今後、キノロン系薬とホスホマイシンの併用療法の臨床応用が期待される。

### 3. グリコペプチド低感受性黄色ブドウ球菌に関する研究

院内に蔓延するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の特徴は、メチシリンなどのβ-ラクタム系薬だけでなく多剤に耐性を示すことであるが、近年では治療の切り札とされるグリコペプチド系薬（バンコマイシン、テイコプラニン）に対してもバンコマイシン高度耐性株（VRSA）が出現し、その脅威に対し特別な注意が喚起されている。各国で作成されたガイドラインに基づくバンコマイシンの適正使用などにより、幸いにもこの株の分離頻度はごく稀だが、バンコマイシンに低感受性を示す株（いわゆる VISA）の出現による治療失敗例が増加傾向にある。VRSA の耐性化機構（腸球菌由来の *vanA* 遺伝子の獲得）と異なり、低感受性の獲得は内因性で、細胞壁の肥厚など細胞壁合成系の異常が原因であることが明らかとなりつつある。一方、一部の実験的変異株や臨床分離株の解析により、低感受性の獲得は複数の突然変異の蓄積によると考えられているが、VISA に特徴的な普遍的にみられる変異は明らかとなっておらず、遺伝子レベルでの解明には遠い段階にある。

グリコペプチド低感受性の機構をより明らかとするため、VISA で変異がみられる遺伝子領域のうち、二成分制御系（細胞膜上のセンサーと細胞質に局在するレスポンスレギュレーターにより構成され、外部からの何らかの刺激に対し、リン酸化を介したシグナル伝達により遺伝子発現を制御し応答する機構）に着目した。二成分制御系とグリコペプチド耐性との関連は、バンコマイシン耐性腸球菌など他菌種でも示唆されており、またβ-ラクタム系薬など他の細胞壁合成阻害剤の耐性との関連も報告されている。従って、二成分制御系は、細胞壁に受けた損傷を感知し、酵素や基質輸送系の発現を制御することで、グリコペプチド系薬を含む細胞壁合成阻害剤への耐性発現に関わると推測される。この仮説を検証するため、先ず薬剤含有平板にて生育したコロニーからグリコペプチド低感受性株を実験的に取得し、二成分制御系センサーを中心に低感受性への関与が疑われる遺伝子の配列を網羅的に解析した。その結果、イミペネム（β-ラクタム系薬）含有培地よりグリコペプチド低感受性株が高頻度に分離され、*vraS*（細胞壁合成を正に制御するセンサー）の上流に位置する機能未知遺伝子 *yvqF* に 1 アミノ酸置換を伴う変異が初めて見出された。*yvqF* に変異のない残りの株からは、*vraS* に 1 アミノ酸置換を伴う変異が見出された。次にこれらの変異株からさらに耐性度の上昇した株を作製したところ、*yvqF* あるいは *vraS* の変異に加え、転写アテニューエーターである *LytR-CpsA-Psr family* に属し膜タンパク質をコードする *msrR*、あるいは推定の金属結合モチーフを持つ膜タンパク質をコードする *tcaA* に変異が見出され、これまで知られていなかった複数の変異の組合せが明らかとなった。最も注目すべきことは、臨床分離株においても、グリコペプチド（特にテイコプラニン）低感受性のほぼすべての株よりこれらの遺伝

子領域に何らかの変異が見出されたことである。今回、疫学的な手法で変異の重要性を明確にするとともに、様々な遺伝的背景を持つ臨床分離株で共通して変異がみられる遺伝子領域を初めて明らかとした。将来的には遺伝子診断技術を用いた特定の変異の検出により、MRSA 感染症の治療への有用な情報の提供に繋がると期待される。

耐性化を認知し、その進行を防ぐという観点から、基礎を臨床に結びつけることが重要と考え、ある病院で経験したテイコプラニン低感受性の MRSA の流行を事例として検討した結果、低感受性の原因として *vraS* 変異を明らかとした。さらに、*vraS* 変異株が流行した原因を当院における抗 MRSA 薬の使用実績から探った結果、グリコペプチド系薬の使用量と本変異株の分離頻度との間に関連性が認められた。一方、タンパク質合成阻害剤であるアルベカシン（アミノ配糖体系薬）の使用量増加に伴い *vraS* 変異株は鎮静化し、*vraS* 変異株の動向は、院内で使用される抗菌薬の選択圧と密接に関連していることが明らかとなった。また、*vraS* 変異株を含むテイコプラニン低感受性株が分離された患者 18 症例について、過去の臨床記録に遡って解析したところ、テイコプラニン投与群での菌消失率は 50% と他剤で治療した場合と比較して低く、本変異により治療効果が低下することも裏付けられた。今回の解析から、薬剤感受性パターンをモニタリングしながら作用機序の異なる抗 MRSA 薬をバランス良く使い分けることで、特定の耐性菌の出現を抑制できることが示唆される。その結果、現状より MRSA 感染の治療効果が高くなることが大いに期待される。

#### 4. 総括

バイオフィームに対するホスホマイシンの効果は、アミノ配糖体系薬との併用でも報告されており、今後はホスホマイシンを中心とした併用療法のさらなる検証を行うことが重要である。また、今回確立したモデルは、バイオフィーム阻害剤の探索など新たな予防法・治療法の開発にも応用が期待される。黄色ブドウ球菌のグリコペプチド低感受性に関与する新規変異の発見は、耐性化機構の解明に繋がる鍵になると考えられる。特に、*yvqF* や *vraS* 変異株の出現には、 $\beta$ -ラクタム系薬の使用がリスク因子の一つになっていることが示唆され、VISA がどのように出現するか解明する手がかりになると考えられる。また、このような VISA の出現に繋がる変異を初期的な段階で検出することは、適切な治療薬の選択と院内での耐性化の進行を防ぐ際の一助になり得ると期待される。