

耐性

マクロライド系抗菌薬の耐性肺炎球菌に対する効果
—肺炎球菌 pneumolysin に対する検討—

柳原克紀 福田雄一 大野秀明 東山康仁 宮崎義継 平潟洋一 田代隆良 河野 茂

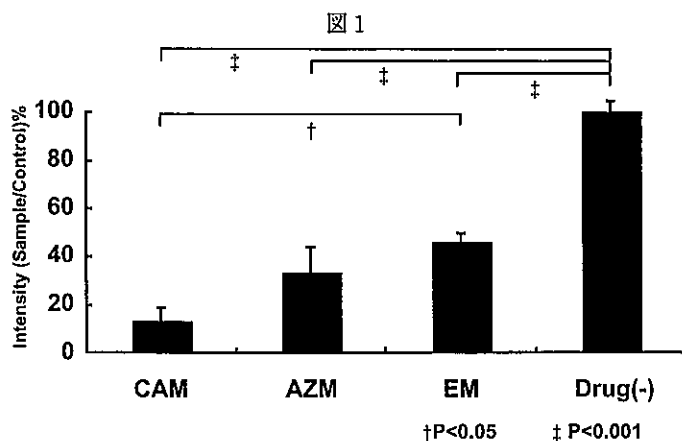
目 的

肺炎球菌は市中肺炎において最も高頻度に分離される原因菌であるが、近年マクロライド系抗菌薬 (MLs) への耐性化が問題となっており、我が国においても肺炎球菌の77.9%がMLS耐性菌であると報告されている¹⁾。しかし、2003年にInfectious Diseases Society of America (IDSA) が発表した成人市中肺炎のガイドラインでは、分離肺炎球菌のMLS耐性化が高いにもかかわらず、MLsでの臨床的な治療失敗例は少ないとされている²⁾。この理由については明らかにされていない。

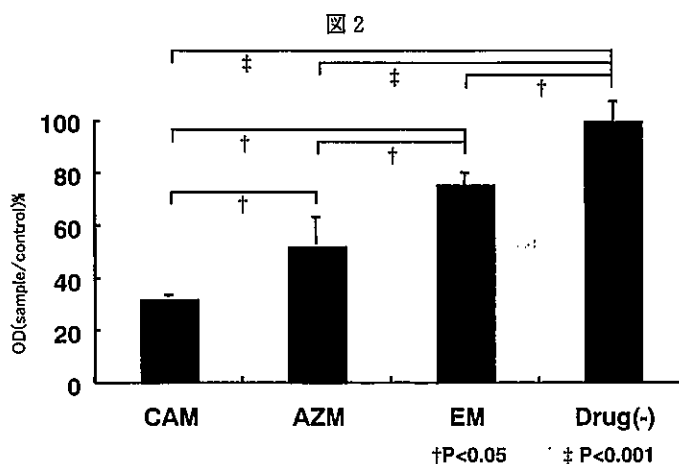
肺炎球菌はさまざまな病原因子を有するが、その中でもpneumolysin (PLY) はコレステロールを含む細胞壁を融解し、宿主細胞にさまざまな障害をおよぼす菌体内毒素であり、肺炎球菌性肺炎の成立および進展において重要な役割を果たしている³⁾。今回我々は、MLsの肺炎球菌に対する*in vitro* 抗菌活性と臨床効果の乖離の機序を解明するために、PLYに対するsub-MICにおける抑制効果について検討した。

材料および方法

1. 使用菌株：喀痰より臨床分離されたMLS耐性肺炎球菌NU4471株を使用した。PCR法にて、*ermB*および*mefA*遺伝子の存在を確認した。
2. 使用薬剤：Clarithromycin (CAM), Azithromycin (AZM), およびErythromycin (EM) を用い、それぞれのMICは64 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, および32 $\mu\text{g/ml}$ であった。
3. sub-MIC抗菌薬の肺炎球菌PLY蛋白合成に及ぼす影響 (Western Blottingによる解析)：各抗菌薬 (1/10MIC) を含有する液体培地にてNU4471株を培養した。培養8時間後に超音波処理を行い、蛋白を抽出および定量し、それぞれ30 μg ずつを用いて、4% /12%のSDS/PAGEにて電気泳動を行い、PVDFメンブレンに転写した。3%BSA/TBSにて2時間ブロッキングを行い、PLYに対するモノクローナル抗体を一時抗体として、4℃にて8時間反応させた。0.05%Tween20/TBSにて洗浄後、HRP標識のヤギ抗マウスIgG抗体を二次抗体として室温にて1時間反応させ、さらに0.05% Tween 20/TBSにて十分に洗浄した後、ECL-plusを用いて検出した。抗菌薬を含まない群をコントロールとした ($n = 4$)。
4. sub-MIC抗菌薬の肺炎球菌PLY活性に及ぼす影響 (馬赤血球溶血活性測定法による解析)：各抗菌薬 (1/10MIC) を含有する液体培地にてNU4471株を培養した。培養8時間後に超音波処理を行い、2-mercaptoethanol (30mM) を加え、室温で15分活性化させた。その後、1mlづつを1mlの1%馬赤血球浮遊液と混和し、37℃で30分間培養し、3000 \times gで5分間遠心した。上清の吸光度をOD $\lambda = 541\text{nm}$ にて測定し、抗菌薬を含まないコントロール群の平均値と比較した ($n = 4$)。
5. 動物モデルの作成：CBA/J, 5週齢, 雄, SPFマウスを用いた。NU4471株を 2.0×10^7 CFU/mlに調製し、十分に麻酔したマウスに、経鼻的に50 μl 接種し感染を惹起した⁴⁾。感染12時間後よりAZM 40mg/kgの1日1回経口投与または、CAM 40mg/kgの1日2回投与を3日間行い、生理食塩水 (NS) 投与群と生存率を比較した ($n = 6$)⁵⁾。



各マクロライド系抗菌薬 (MLS) を投与 8 時間後の PLY 抑制効果について, Western Blotting により検討した。抗菌薬を含まない control (Ctr) 群と比し, MLS 投与群では有意に PLY を抑制した。また, EM と比し, CAM および AZM は有意に PLY を抑制した。



各MLSを投与8時間後のPLY抑制効果について, 赤血球溶血活性にて検討した。抗菌薬を含まないcontrol (Ctr) 群と比し, MLS投与群では有意にPLYを抑制した。また, CAMおよびAZMは, EMと比し有意にPLYを抑制し, さらにCAMはAZMよりも有意に抑制した。

解析

Western Blotting (W/B) における各バンドのシグナル強度を測定し, PLY を定量化した。W/B および溶血活性はそれぞれ, コントロール群の平均値との比で検討した。有意差検定においては, 対応のない Student t 検定により解析し, $P < 0.05$ を有意とした。生存率解析には Kaplan-Meier 法を用いた。

結果

sub-MIC 抗菌薬の肺炎球菌 PLY 蛋白合成に及ぼす効果 (W/B による解析): 培養開始 8 時間後, W/B 法ではコントロール群と比し, CAM 投与群で 13%, AZM 投与群で 33%, EM 投与群で 46% まで PLY を抑制した (図 1)。

sub-MIC 抗菌薬の肺炎球菌 PLY 活性に及ぼす効果 (馬赤血球溶血活性測定法による解析): 培養開

始8時間後、コントロール群と比しCAM投与群で33%、AZM投与群で53%、EM投与群で76%までPLYを抑制した(図2)。

マウスモデルにおける生存率への影響：生理食塩水投与群は感染後3日間で全て死亡したが、CAMおよびAZM投与群では6日間生存し、生食群と比し有意に生存率が改善した。

考 察

MLsは市中肺炎の外来治療において、第一選択薬とされている⁶⁾。しかし、近年MLsの過剰投与により、肺炎球菌に対するEMおよびCAMのMICが $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上、またはAZMのMICが $2.0 \mu\text{g/ml}$ 以上のMLs耐性肺炎球菌⁷⁾が増加しており問題とされている。しかしながら、臨床的にはMLSが肺炎球菌に対して無効であったとの報告は少なく、現在でも呼吸器感染症において高い効果が認められている⁸⁾。今回我々は、この*in vitro*抗菌活性と臨床効果の乖離の機序に、MLsによる肺炎球菌の病原因子であるPLYの抑制が関与しているとの仮説をたてて検討を行った。

肺炎球菌のPLYは感染初期において、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞に対し細胞障害性を有し、菌の増殖や播種を促進する菌体内毒素である。また、免疫細胞や炎症細胞への直接の障害作用や補体を活性化することにより、肺の間質や血中からの肺炎球菌の排除を困難にする作用を有し、肺炎や菌血症の発症において重要な役割を担っている⁹⁾。本研究において、MLsは1/10MICにおいてPLY抑制効果を認めた。さらに、CAMおよびAZMは溶血活性において、EMと比し有意に抑制効果が高く、なかでもCAMが最も抑制効果が高かった。

これまでにMLs耐性肺炎球菌を用いた好中球減少下でのマウス肺炎モデルにおいて、MLsは*mefA*遺伝子による低度耐性菌に対しては有効であり、*ermB*遺伝子による高度耐性菌には無効であると報告されている⁵⁾。本研究では、免疫能正常なマウスを用いた結果、高度耐性菌に対してもMLsが

有効であった。MLsは臨床上免疫能正常人に発症した軽症例に対して使用されており、本モデルはより臨床に近いモデルであると思われる。

今回、我々の検討では*in vitro*においてsub-MICのMLsがPLYを抑制し、さらに*in vivo*においてMLsの投与により生存率の改善がみられた。この結果により、MLsが臨床的に有効である機序として、PLY抑制効果が寄与している可能性が示唆された。

今後はMLsの、マウス肺内におけるPLY抑制効果について検討する必要があると思われる。

参考文献

- 1) INOUE M., LEE N. Y., HONG S. W., *et al.* : PRO-TEKT 1999-2000 : a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23 : 44~51, 2004
- 2) MANDELL L. A., BARTLETT J. G., DOWELL S. F., *et al.* : Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin. Infect. Dis.* 37 : 1405~1433, 2003
- 3) RUBINS J. B., JANOFF E. N. : Pneumolysin : a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab. Clin. Med.* 131 : 21~27, 1998
- 4) OTSU Y., YANAGIHARA K., FUKUDA Y., *et al.* : *In vivo* efficacy of a new quinolone, DQ-113, against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 : 3699~3703, 2003
- 5) HOFFMAN H. L., KLEPSE M. E., ERNST E. J., *et al.* : Influence of macrolide susceptibility on efficacies of clarithromycin and azithromycin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine lung infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 : 739~746, 2003
- 6) BARTLETT J. G., DOWELL S. F., MANDELL L. A., *et al.* : Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 31 : 347~382, 2000
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixth information supplement M100~S6. NCCLS, villanova, PA, 1995
- 8) AMSDEN G. W. : Pneumococcal macrolide resistance-myth or reality? *44* : 1~6, 1999