

# 学位論文の内容の要旨

学位論文題目 抗MRSA抗菌薬による有害事象とリネゾリドによる細胞毒性機構に関する研究

論文指導教授 桜井 光 一 印

学位申請者 藤 居 賢 印

抗菌薬の繁用は耐性菌の発現を導き、世界的な脅威となっている。薬剤師は、感染症に対して抗菌薬の作用機序を理解して適正に使用することで、耐性菌の発現を積極的に抑制しなければならない。抗菌薬を適正に使用するにあたり、地域における使用状況と分離菌の薬剤感受性、抗菌薬の有効性及び安全性を考慮し、抗菌薬の有害事象とその発症機構を明らかにする必要がある。本研究では、脳神経外科を主診療とする病院における注射用抗菌薬の使用量と院内分離菌薬剤感受性について調査し、抗 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 薬であるバンコマイシン及びリネゾリド投与患者の腎機能低下と血小板減少について検討した。さらに、有害事象の発生頻度が高いリネゾリドの細胞傷害機序について、ヒト単球系細胞株 U937 を用いて検討した。

## 1. 抗菌薬使用状況と院内分離菌薬剤感受性

2004年1月から2005年12月までの札幌市内の禎心会病院と中村記念南病院における注射抗菌薬使用量と院内分離菌薬剤感受性について調査した。感受性試験の抗菌薬は、スルバクタム／アンピシリン(SBT/ABPC)、ピペラシリン(PIPC)、セファゾリン(CEZ)、セフォチアム(CTM)、スルバクタム／セフォペラゾン(SBT/CPZ)、セフトジジム(CAZ)、イミペネム／シラスタチン(IMP/CS)、ゲンタマイシン(GM)、アルベカシン(ABK)、バンコマイシン(VCM)、ホスホマイシン(FOM)、レボフロキサシン(LVFX)、パズフロキサシン(PZFX)、クリンダマイシン(CLDM)、ミノサイクリン(MINO)を採用した。抗菌薬使用量は両施設ともカルバペネム系抗菌薬の使用数が増加していた。MRSAに対する耐性率は、GMが禎心会病院において25-30%であったのに対し、中村記念南病院においては73-87%と高率を示した。一方MINOは、禎心会病院において73-83%と高率であったが、中村記念南病院においては23-32%と低率であった。このようにGM、MINOの耐性率に両施設間で逆転現象がみられた(表1)。

表 1 グラム陽性菌に対する抗菌薬耐性率

抗菌薬	菌種	MSSA				MRSA				肺炎球菌			
	病院	禎心会		中村記念南		禎心会		中村記念南		禎心会		中村記念南	
	集計年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年
SBT/ABPC	件数	33	34	17	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	100	100	100	100	45.5		82.1	
PIPC	件数	33	34	14	11	148	90	76	80	2	9	6	3
	耐性率(%)	66.7	73.5	14.3	36.4	100	100	100	100	45.5		0	
CEZ	件数	33	34	17	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	5.9	0	100	100	100	100	45.5		64.3	
CTM	件数	33	34	17	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	100	100	100	100	36.6		64.3	
SBT/CPZ	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	100	100	100	100	18.2		0	
CAZ	件数	33	34	17	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	3.0	0	0	0	100	100	100	100	28.3		0	
IPM/CS	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	100	100	100	100	36.4		0	
GM	件数	33	34	3	1	148	90	60	15	2	9	18	1
	耐性率(%)	0	27.6	50.0		29.8	25.6	86.7	73.3	100		100	
ABK	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	8.8	3.3	0	1.1	100		100	
VCM	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
FOM	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	3.0	8.8	22.2	16.7	97.3	96.7	95.6	98.9	100		10.7	
LVFX	件数	33	34	18	12	148	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	3.0	5.8	27.8	16.7	98.7	97.8	98.5	96.8	45.5		14.3	
PZFX	件数	29	34	18	12	145	90	135	94	2	9	24	4
	耐性率(%)	0	5.8	16.7	16.7	99.3	97.8	97.8	100	27.3		14.3	
CLDM	件数	33	34	15	11	148	90	76	80	2	9	6	3
	耐性率(%)	9.1	8.8	13.3	0	99.3	95.6	84.2	91.3	54.5		0	
MINO	件数	33	34	15	11	148	90	76	80	2	9	6	3
	耐性率(%)	0	0	0	0	82.4	73.3	31.6	22.6	54.5		44.4	

2004 年, 2005 年における methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), MRSA, 肺炎球菌の分離件数と種々抗菌薬の耐性率を示した。

緑膿菌におけるカルバペネム系抗菌薬の耐性率は上昇傾向にあり, ニューキノロン系抗菌薬の耐性率は 50-80%と高率であった(表 2)。多くの研究グループが臨床検査材料を使用した感受性試験の結果を報告しており, 感受性試験の結果を評価するこ

とは抗菌薬の適正使用に重要な役割を果たす。本研究では、同じ脳神経外科を主診療とする病院ではあったが、施設間で感受性試験の結果に大きな相違が認められ、耐性菌の発現を抑制するためには施設内での感受性サーベイランスを継続することが重要であることが示唆された。

表 2 グラム陰性菌に対する抗菌薬耐性率

抗菌薬	菌種	緑膿菌				肺炎桿菌				大腸菌			
	病院	禎心会		中村記念南		禎心会		中村記念南		禎心会		中村記念南	
	集計年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年	2004年	2005年
SBT/ABPC	件数	95	49	233	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	100	100	100	100	0	10.0	0.0	0.0	5.4		24.4	39.7
PIPC	件数	95	49	77	72	10	30	11	18	1	36	16	59
	耐性率(%)	1.1	2.0	11.7	9.7	0	26.7	18.2	16.7	21.6		56.3	49.2
CEZ	件数	95	49	233	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	100	100	100	100	0	10.0	17.9	10.5	8.1		20.0	27.0
CTM	件数	95	49	233	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	100	100	100	100	0	10.0	14.3	5.3	2.8		6.7	6.3
SBT/CPZ	件数	95	49	233	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	2.2	4.0	27.9	21.2	0	10.0	3.6	3.6	2.7		4.4	3.2
CAZ	件数	95	49	233	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	4.3	8.2	6.4	2.4	0	10.0	0	0	2.7		0	0
IPM/CS	件数	95	49	234	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	20.0	26.5	17.9	36.4	0	0	0	0	0		0	0
GM	件数	95	49	157	13	10	30	17	1	1	36	29	4
	耐性率(%)	11.6	26.5	28.7	23.1	0	0	0		10.8		36.3	
ABK	件数	95	49	234	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	100	32.7	20.5	38.4	90.0	16.7	0	5.3	10.8		4.4	12.7
VCM	件数	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	耐性率(%)	-		-		-		-		-		-	
FOM	件数	95	49	234	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	100	100	93.6	95.3	100	100	100	100	2.7		54.3	57.1
LVFX	件数	95	49	234	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	78.9	61.3	57.3	57.0	0	0	14.3	10.6	13.5		58.7	46.0
PZFX	件数	88	49	234	86	10	30	28	19	1	36	46	63
	耐性率(%)	78.4	61.3	66.2	73.3	0	0	10.7	5.3	13.5		56.5	49.2
CLDM	件数	95	49	78	73	10	30	11	18	1	36	17	59
	耐性率(%)	100	100	97.4	100	100	100	100	100	100		100	100
MINO	件数	95	49	78	73	10	30	11	18	1	36	17	59
	耐性率(%)	100	98.0	93.6	94.5	10.0	10.0	0	22.3	5.4		17.6	20.4

2004年、2005年における緑膿菌、肺炎桿菌、大腸菌の分離件数と種々抗菌薬の耐性率を示した。

## 2. 日本人における抗 MRSA 抗菌薬による治療と有害事象発現

バンコマイシンおよびリネゾリドは、MRSA や他剤が無効なグラム陽性球菌感染症治療に使用される抗菌薬である。これら抗菌薬の代表的な有害事象としてバンコマイシンは腎機能障害、リネゾリドは血小板減少が報告されている。しかし、感染症患者の合併症として腎機能障害や血小板減少が認められることがあり、これら有害事象が感染

表 3 患者背景と有害事象調査

患者背景	腎機能低下調査			血小板減少調査		
	LZD n=121	VCM n=149	p	LZD n=91	VCM n=160	p
<b>患者背景</b>						
性別 (男/女)	88/33	84/65	0.005	71/20	90/70	<0.001
年齢	64.0 ± 17.4 (21-86)	64.0 ± 14.2 (21-88)	0.582	68.0 ± 15.4 (21-86)	64.0 ± 14.1 (21-88)	0.153
体重(kg)	56.6 ± 10.0 (37.0-84.5)	55.2 ± 11.6 (32.1-87.0)	0.576	57.0 ± 9.8 (37.0-84.5)	56.2 ± 11.8 (32.1-87.0)	0.805
投与期間 (日)	7.0 ± 6.4 (3-34)	11.0 ± 11.4 (3-67)	<0.001	7.0 ± 5.8 (3-34)	10.0 ± 11.4 (3-67)	0.014
<b>投与開始前血清検査値</b>						
アルブミン (g/dL)	3.0 ± 0.6 (1.8-4.6)	3.0 ± 0.6 (1.3-4.7)	0.784	2.9 ± 0.6 (1.8-4.6)	3.0 ± 0.6 (1.3-4.7)	0.079
クレアチニン (mg/dL)	0.7 ± 0.6 (0.1-3.9)	0.6 ± 0.4 (0.2-2.3)	0.085	1.2 ± 1.4 (0.1-11.1)	0.8 ± 0.8 (0.2-6.1)	0.008
ALT (IU/L)	29.0 ± 63.9 (6-469)	23.0 ± 104.4 (4-903)	0.085	28.0 ± 68.5 (2-469)	22.5 ± 75.2 (4-540)	0.117
AST (IU/L)	27.0 ± 44.4 (7-265)	23.0 ± 77.7 (7-544)	0.064	30.0 ± 39.4 (9-221)	24.0 ± 64.1 (7-404)	0.035
総ビリルビン (mg/dL)	0.5 ± 1.1 (0.1-7.4)	0.5 ± 1.3 (0.1-10.4)	0.384	0.5 ± 1.5 (0.1-13.0)	0.5 ± 1.1 (0.1-10.4)	0.675
血小板数 (×10 <sup>3</sup> /μL)	-	-	-	206 ± 153 (50-788)	186 ± 136 (11-719)	0.059
治療終了後 腎機能低下例数	16 (13%)	35 (24%)	0.032	-	-	-
治療終了後 血小板減少例数	-	-	-	37 (41%)	27 (17%)	<0.001

Values represent medians ± SD (range), except where indicated otherwise. LZD = linezolid; VCM = vancomycin; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase.

腎機能低下調査及び血小板減少調査における患者背景および投与開始前血清検査値、有害事象発現数を示した。

症によるものか、抗菌薬によるものかの判断は難しい。我々はバンコマイシンおよびリネゾリド投与患者の腎機能低下と血小板減少について検討した。2011年1月から2011

年 12 月までの期間にバンコマイシン注射薬, もしくはリネズリド注射薬を投与された患者を対象とし, 腎機能低下と血小板減少に関して後方視的調査と分析を行った. 腎機能低下調査においては対象薬剤治療前後の eGFR (estimated glomerular filtration rate)を算出し, CKD(chronic kidney disease)病期ステージが悪化した群を腎機能低下群と定義した. 血小板減少調査においては対象薬剤治療前後で血小板数が 30%以上減少した群を血小板減少群と定義した.

腎機能低下調査においてバンコマイシン投与群 149 例中 35 例 (24%), リネズリド投与群 121 例中 16 例 (13%)に腎機能低下が認められ, バンコマイシン投与群において有意に腎機能低下が認められた ( $P=0.032$ , オッズ比: 2.01, 95%CI: 1.05-3.85) (表 3).

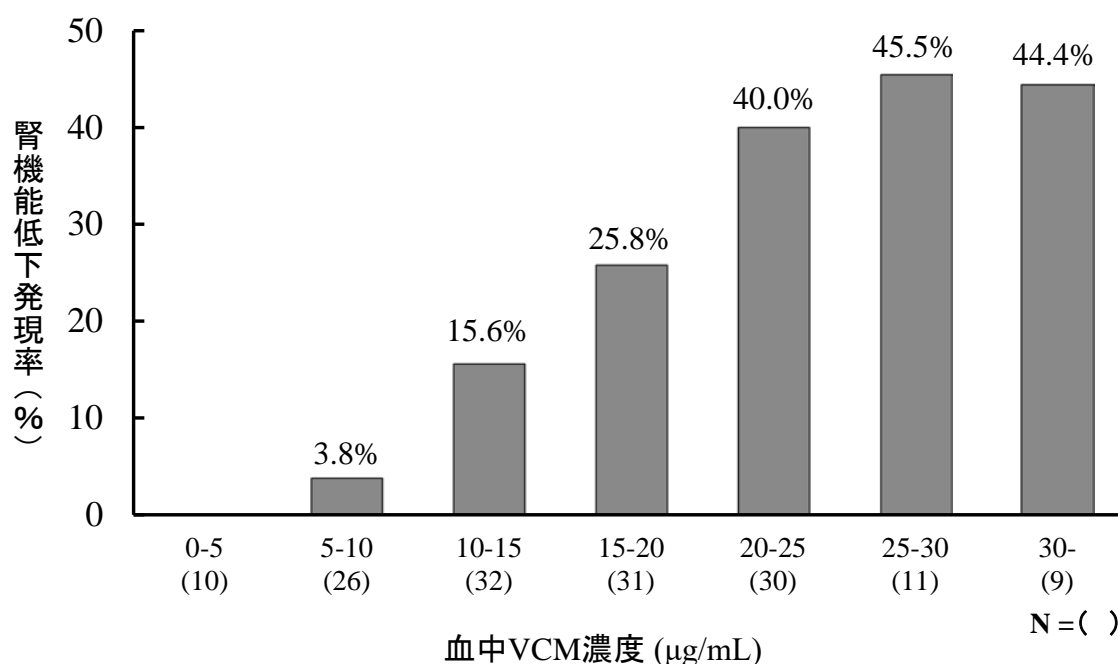


図 1 バンコマイシン血中濃度と腎機能障害発現率の関係

血中トラフ濃度は投与開始から 3 日目以降のトラフ値を用いた. バンコマイシン投与期間中に複数回測定されていた場合は, 最高値を採用した. 腎機能低下発現率は, 各血中濃度の CKD 病期ステージが悪化した症例数 /  $N \times 100$  (%) で算出した.

バンコマイシンによる腎機能低下の危険因子として血中トラフ濃度が挙げられ、バンコマイシン投与群における血中トラフ濃度 20 $\mu$ g/mL 以上で腎障害発現率は 40%まで上昇した(図 1)。さらに、バンコマイシン投与群では治療前後で eGFR の有意な低下が認められたが、リネゾリド投与群では有意な変化は認められなかった(表 4)。

血小板減少調査においてバンコマイシン投与群で 160 例中 27 例(17%), リネゾリド投与群で 91 例中 37 例(41%)が認められ、リネゾリド投与群において有意に血小板減少が認められた( $P < 0.001$ , オッズ比: 3.38, 95%CI: 1.87-6.08)(表 3)。バンコマイシン投与前後において血小板数は有意な増加が認められた。リネゾリド投与前後では有意な差は認められなかったものの血小板数は減少傾向であった(表 4)。

表 4 eGFR と血小板数の変化

	eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )		<i>p</i>
	Initial	Terminal	
VCM (n=149)	100 $\pm$ 56.9	91 $\pm$ 55.7	0.002
LZD (n=121)	98 $\pm$ 112	100 $\pm$ 93.9	0.714
	血小板数 ( $\times 10^3/\mu$ L)		<i>p</i>
	Initial	Terminal	
VCM (n=160)	204 $\pm$ 136	235 $\pm$ 149	0.001
LZD (n=91)	242 $\pm$ 153	216 $\pm$ 146	0.094

Values represent means  $\pm$  SD. LZD = linezolid; VCM = vancomycin.

eGFR 値および血小板数は、VCM または LZD 投与前 (Initial) と投与後 (Terminal) に測定した血液検査値を用いた。

リネゾリドによる血小板減少の危険因子として投与期間が挙げられ、リネゾリド投与群における投与期間 7.5 日以上の群で有意に血小板減少が認められた ( $P=0.017$ , オッズ比:3.14, 95%CI:1.31-7.51)。また、リネゾリド投与群において治療前の腎機能と血小板減少との間に有意な関連性は認められなかった。バンコマイシン投与による腎機能障害の正常化には、投与終了後に平均  $13.7\pm 9.4$  日を必要とし、リネゾリド投与による血小板減少の正常化には  $11.4\pm 4.8$  日を必要とした。これら抗菌薬による治療は起因菌の薬剤感受性、感染組織への移行性などの治療効果と併せて、腎機能障害や血小板減少の有害事象の影響を考慮した治療計画が必要である。

### 3. リネゾリドによる培養ヒト単球系細胞への毒性機構

リネゾリドは、リボゾーム 50S サブユニットに結合し、70S 開始複合体の形成を阻害し、タンパク質合成を阻害することより、菌の増殖を抑制して抗菌作用を発現する。リネゾリドの代表的な有害事象は血小板減少や貧血などの骨髄抑制であるが、真核細胞へのリネゾリドの詳細な傷害機構は不明である。ヒトミトコンドリア内のタンパク質合成は基本的に原核細胞と同様な機構で行われることから、リネゾリドは 50S リボソームに結合してミトコンドリアにおけるタンパク質合成を阻害して機能障害を惹起することが推定される。細菌のリボソームを標的とする抗菌薬のいくつかは、真核細胞のミトコンドリア機能障害を惹起し、副作用を発現させる可能性が示唆されている。有害事象の発生頻度が高値であったリネゾリドによる血小板減少の発症機序について、ヒト単球系細胞株 U937 を用いて検討した。リネゾリドは、濃度および処理時間に依存してアポトーシス様細胞死を誘導し(図 2 A,B)、ミトコンドリア膜電位の崩壊を短時間で惹起した。しかし、同条件下でミトコンドリア数の明らかな減少は観察されなかった。一方、細胞をリネゾリドで処理すると、その濃度とインキュベート時間に依存してミトコンドリアからのスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) 生成の増加が認められた(図 3A)。リネゾリドの毒性作用における  $O_2^{\cdot-}$  の役割を明らかにするため、細胞内 superoxide dismutase(SOD) 1 をノックダウンした U937 細胞において検討した。SOD 1 をノックダウンした細胞におけるリネゾリド毒性作用は、コントロール細胞と比べてわずかに細胞生存率の低下が抑制された(図 3B)。一方、マクロファージの貪食作用に関与することが示唆されているオートファジーに対して、リネゾリドは影響を及ぼさなかった。これらの実験により、リネゾリドはヒト単球系細胞株 U937 のミトコンドリア機能障害を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

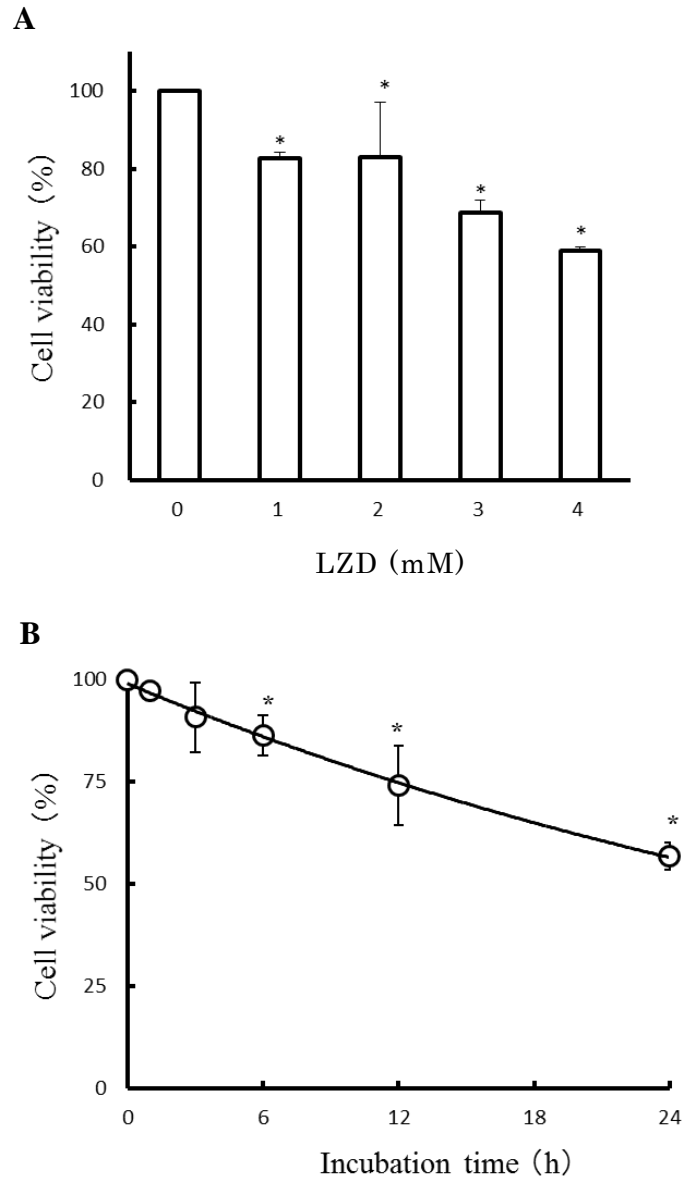


図 2 リネゾリドによる U937 細胞傷害

(A) ヒト単球系 U937 細胞を 1-4mM リネゾリドで 24 時間インキュベートした。

(B) 細胞を 4mM リネゾリドで 1-24 時間インキュベートした。細胞生存率は MTT アッセイで測定した。データは 4 回の実験結果を平均±標準偏差で示した。

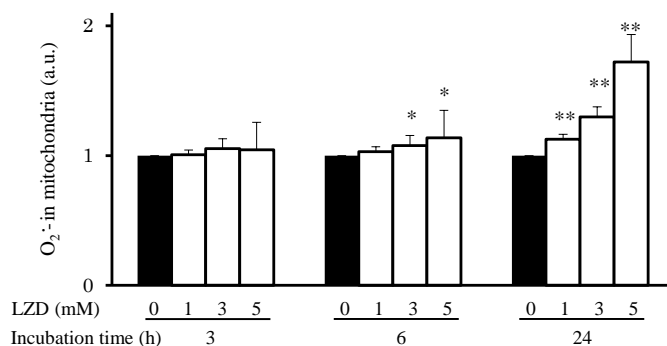
\*  $P < 0.05$  リネゾリドを添加しない細胞と比較

細菌感染時において活性化マクロファージは、異物を貪食後に活性酸素生成を増加させ殺菌作用を示す。リネゾリドは活性酸素により酸化的に代謝されることから、活



性化マクロファージにおいて、リネゾリドの細胞毒性作用は軽減されることが推定される。

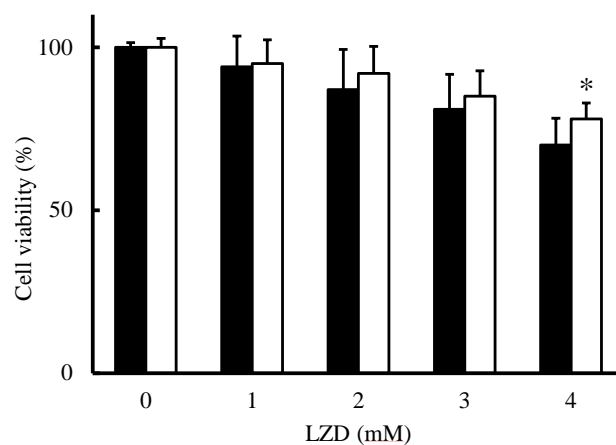
A



\*  $P < 0.05$  6時間インキュベートコントロール細胞と比較

\*\*  $P < 0.05$  24時間インキュベートコントロール細胞と比較

B



\*  $P < 0.05$  4mM リネゾリド処理コントロール細胞と比較

図 3 リネゾリド処理細胞における活性酸素生成と SOD 1 ノックダウンの影響

(A) ヒト単球系 U937 細胞を 1-5mM リネゾリドで 3, 6, 24 時間インキュベートした。ミトコンドリアからの活性酸素生成は Mito SOX Red プローブを用いて測定した。

(B) SOD 1 をノックダウンした細胞を 1-4mM リネゾリドで 24 時間インキュベートした。データは 4 回の実験結果を平均±標準偏差で示した。

## 結 語

本研究において医療施設間で感受性サーベイランスや抗菌薬使用状況と分離菌情報等を共有することは、地域における耐性菌拡大の抑制に有効であることが示唆された。バンコマイシンおよびリネゾリドの有害事象について調査した結果、日本人患者において腎機能障害を回避するためにバンコマイシントラフ濃度を  $20\mu\text{g/mL}$  以下にコントロールする必要がある、「抗菌薬 TDM ガイドライン」の推奨血中トラフ濃度を支持する。リネゾリドはバンコマイシンと比べ、クレアチニン排泄と糸球体濾過量の維持に優れていたこと、臨床効果も同等以上であること、抗炎症作用を有することから、腎機能のコントロールが困難な患者、感染症治療に腎機能の保護が必要な患者における重症 MRSA 感染症治療には、リネゾリドによる治療を推奨する。一方、日本人におけるリネゾリド治療は血小板減少の早期発現が懸念されることから、早期からの血小板数モニタリングが必要不可欠である。また、リネゾリドによる治療が長期間になる場合や出血傾向のある患者には、血小板減少発現を回避するために適宜、他の抗菌薬への変更を考慮する必要がある。培養細胞を用いた実験において、リネゾリドは、アポトーシス性細胞死を誘導すること、さらにリネゾリドによるミトコンドリア機能障害が細胞死の誘導に関与することを明らかにした。リネゾリドの抗菌作用のターゲットとなる 50S リボソームは、ヒトミトコンドリアのタンパク質合成に用いられることから、リネゾリドによる治療において機能障害を生じない投与方法や対策について、更なる検討が必要である。

本研究で、抗菌薬の使用情報と分離菌情報の共有が地域における薬剤耐性菌の発生と拡散の抑制に有益であること、抗 MRSA 抗菌薬の有効性と安全性の確保に有効な指標を提唱し、さらにリネゾリドがヒト細胞のミトコンドリア機能障害を介して細胞毒性を誘導することを明らかにした。本研究により、病院薬剤師が従来の薬剤業務に加え、抗菌薬の有効性と安全性の情報を活用すること、抗菌薬の作用機序等について基礎研究を通して検討することは、抗菌薬の適正使用に貢献し、薬剤耐性菌発現の遅延が期待できる。