

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

平成 29 年度

藤 居 賢

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

本論文は 2018 年北海道薬科大学における博士(薬学)の
学位取得のために提出し受理されたものである。

藤 居 賢

目次

略語・略号表	1
緒言	4
第1章 抗菌薬使用状況と院内分離菌薬剤感受性	9
第1節 序論	9
第2節 方法	10
1. 対象施設	10
2. 調査方法	10
第3節 結果	11
1. 注射用抗菌薬の使用量推移	11
2. 生体試料の比較	13
3. 薬剤感受性試験	14
3-1 グラム陽性菌に対する耐性率	14
3-2 グラム陰性菌に対する耐性率	16
第4節 考察	18
第2章 日本人における抗MRSA抗菌薬による治療と有害事象発現	21
第1節 序論	21
第2節 方法	22
1. 対象患者	22
2. 調査方法	22
3. 統計処理	23
第3節 結果	24
1. 患者背景と血清検査値	24
2. 有害事象	24
2-1 腎機能低下	24
2-2 血小板減少	24

2 - 3	eGFR と血小板数の変化	25
3.	有害事象の危険因子	28
3 - 1	患者背景と血清検査値	28
3 - 2	腎機能低下	28
3 - 3	血小板減少	28
3 - 4	有害事象の回復	32
第 4 節	考察	33
第 3 章	LZD による培養ヒト単球系細胞への毒性機構	36
第 1 節	序論	36
第 2 節	方法	39
1.	試薬	39
2.	実験手順	40
2 - 1	細胞実験	40
2 - 2	ミトコンドリア内膜電位, ミトコンドリア数, $O_2^- \cdot$ の生成	41
2 - 3	SOD 1 ノックダウン	41
2 - 4	オートファジーの検出	42
2 - 5	統計処理	42
第 3 節	結果	43
1.	LZD 誘導細胞毒性	43
2.	ミトコンドリア機能障害	49
3.	LZD 誘導 $O_2^- \cdot$ の生成と細胞毒性作用に対する SOD 1 の影響	51
第 4 節	考察	53
総括		56
謝辞		57
参考文献		58

略語・略号表

本論文においては以下の略語および略号を用いた。(アルファベット順)

ABK	アルベカシン	arbekacin
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ	alanine aminotransferase
AMR	薬剤耐性	antimicrobial resistance
AS	抗菌薬適正使用支援	antimicrobial stewardship
ASP	抗菌薬適正使用支援プログラム	antimicrobial stewardship program
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	aspartate aminotransferase
ATC	解剖治療化学	anatomical therapeutic chemical
ATP	アデノシン三リン酸	adenosine triphosphate
AUC	薬物濃度時間曲線下面積	area under the curve
AUD	抗菌薬使用密度	antimicrobial usage density
bcl-2	B細胞白血病/リンパ腫 2 タンパク質	B-cell leukemia/lymphoma 2 protein
CAZ	セフトジジム	ceftazidime
CCCP	カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CEZ	セファゾリン	cefazolin
CI	信頼区間	confidence interval
CKD	慢性腎臓病	chronic kidney disease
CLDM	クリンダマイシン	clindamycin
CLSI	臨床・検査標準協会	clinical and laboratory standards institute
CTM	セフォチアム	cefotiam

CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
DDD	1 日投与量	defined daily dose
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
DPC	包括評価制度	diagnosis procedure complex
eGFR	推算糸球体濾過量	estimated glomerular filtration rate
Em	蛍光	emission
Ex	励起	excitation
FADH ₂	還元型フラビンアデニンジヌク レオチド	flavin adenine dinucleotide reduced
FBS	ウシ胎児血清	fetal bovine serum
FOM	ホスホマイシン	fosfomycin
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸デ ヒドロゲナーゼ	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM	ゲンタマイシン	gentamicin
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペ ラジンエタンスルホン酸	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin eethanesulfonic acid
IPM/CS	イミペネム/シラスタチン	imipenem/cilastatin
LVFX	レボフロキサシン	levofloxacin
LZD	リネゾリド	linezolid
MINO	ミノサイクリン	minocycline
mRNA	伝令 RNA	messenger RNA
MRSA	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MSSA	メチシリン感性黄色ブドウ球菌	methicillin sensitive Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-. ジメチルチアゾール-2- イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリ ウムブロミド	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

$O_2^- \cdot$	スーパーオキサイドアニオンラジカル	superoxide anion radical
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate buffered saline
PIPC	ピペラシリン	piperacillin
PZFX	パズフロキサシン	pazufloxacin
RNA	リボ核酸	ribonucleic acid
ROC	受信者操作特性	receiver operatorating characteristic
ROS	活性酸素種	reactive oxygen species
RPMI	ロズウェルパーク記念研究所	Roswell park memorial institute
SBT/ABPC	スルバクタム／アンピシリン	subactam/ampicillin
SBT/CPZ	スルバクタム／セフォペラゾン	subactam/cefoperazone
siRNA	低分子干渉 RNA	small interfering RNA
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ	superoxide dismutase
TDM	治療薬物モニタリング	therapeutic drug monitoring
VCM	バンコマイシン	vancomycin
WHO	世界保健機関	World health organization

緒言

抗菌薬は感染症治療において根治治療の中心的役割を果たしている。抗菌薬の歴史は、1910年 Paul Ehrlich が秦 佐八郎とともに砒素化合物のサルバルサンが梅毒に対し効果を示すことを発見したことに始まる。しかし、サルバルサンは副作用が多数発生したことから、梅毒の菌種によっては効果がなかったことから、現在は使用されていない。1929年には Alexander Fleming が青かびの分泌物によりブドウ球菌の発育が阻止されることを発見し、その物質をペニシリンと名付けた。1940年に Howard Walter Florey と Ernst Boris Chain がペニシリンの抽出と実用化に成功し、これが感染症薬物療法の始まりとなる。しかし、ペニシリンが実用化された数年後には、臨床現場においてもペニシリンの β -ラクタム環を開裂させるペニシリナーゼを産生するペニシリン耐性ブドウ球菌が分離されはじめた。その後、ストレプトマイシンやクロラムフェニコールなど、次々と新しい抗菌薬が開発され医療の現場で頻用することとなり、1960年には半合成ペニシリンのメチシリンが使用され始めた。メチシリンは当時のグラム陽性球菌およびグラム陰性菌もカバーできる抗菌薬であったが、1962年にはメチシリン耐性ブドウ球菌が出現する。なかでもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) はペニシリン・セフェム系などの β -ラクタム抗菌薬のほとんどに耐性を示す黄色ブドウ球菌である。1980年頃には日本においても MRSA が各地の医療施設で問題となり始め、その後も様々な耐性菌が発現、拡散して世界的な脅威となっている^{1,2)}。このように耐性菌が世界的に増加する一方、新しく開発される抗菌薬は年々減少傾向にあり³⁾、国際的にも大きな課題となっている (図 1)。有害事象を発現させることなく、現存の抗菌薬を有効に使用することが、感染症の早期治療と耐性菌発現の抑制につながる。2013年の耐性菌に起因する死亡者数は少なくとも全世界で約 70 万人と推算され、このまま耐性菌が現在のペースで増加した場合、2050年には 1000 万人の死亡が想定され、これは現在のがんによる死亡者数を超える試算になる⁴⁾。

抗菌薬の使用開始

耐性菌の出現

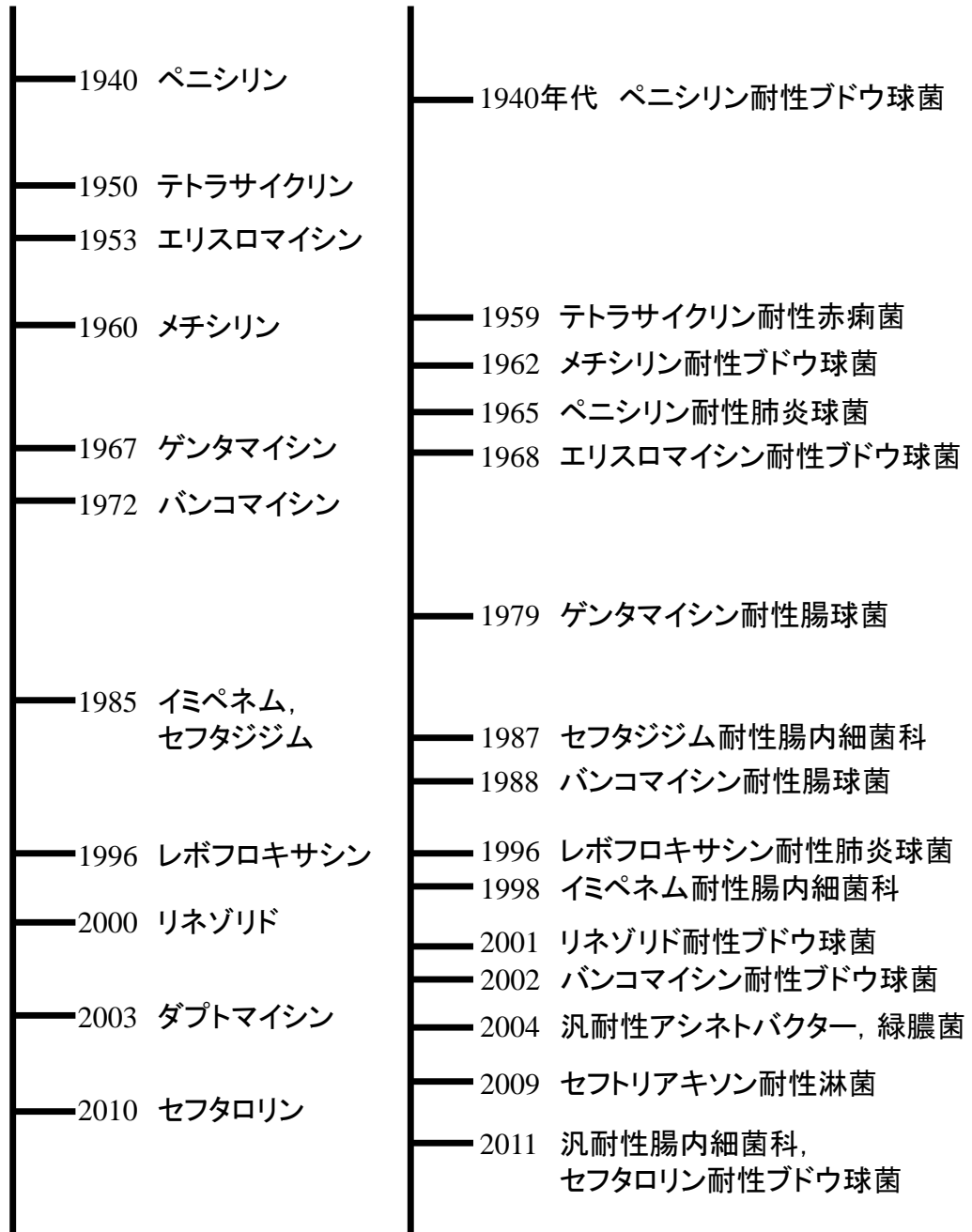


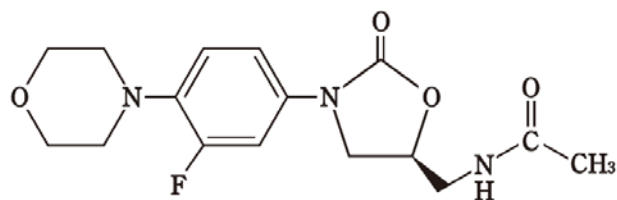
図 1 抗菌薬の使用と耐性菌出現の歴史

世界保健機関（WHO）が初めて耐性菌蔓延の状況を“Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance”としてまとめ⁵⁾、AMR (Antimicrobial Resistance) グローバルアクションプランの策定を各国に求めている。この報告書には、全世界的に多くの細菌の耐性化が起きていることを警鐘し、敗血症、下痢、肺炎、尿路感染症や淋病などの一般的で深刻な病気の原因となる大腸菌、肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、非チフス性サルモネラ、シゲラ属、淋菌の7種細菌における抗菌薬耐性に焦点を当て調査した。その結果は非常に深刻な状態であり、世界のあらゆる地域でこれらの細菌の抗菌薬に対する耐性化が進んでいる。日本においては2015年に厚生労働省医政局地域医療計画課から「薬剤耐性菌対策に関する提言（院内感染対策中央会議策定）」が発出され、2016年にAMR対策に関する行動計画を策定する方針が決められた。その行動計画の1つに抗微生物薬の適正使用が掲げられており、医療機関におけるAMR対策への一層の取組みが求められている。そして、“国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議”において、我が国として初めてのアクションプランが決定された⁶⁾。アクションプランでは、「普及啓発・教育」、「動向調査・監視」「感染予防・管理」「抗微生物剤の適正使用」「研究開発・創薬」、「国際協力」の6つの分野に関する目標や、その目標ごとに戦略および具体的な取組等が盛り込まれており、特に臨床現場では耐性菌の発現を抑制するための「抗微生物剤の適正使用」が重要な課題となる。

医療関連感染を起こす代表的な耐性菌の一つにMRSAがある。近年、日本における入院患者から分離されている黄色ブドウ球菌のMRSAが占めている割合は減少傾向にあるが、MRSAの分離率（MRSA分離患者数/検体提出患者数×100）は中央値として6.5%を示し、MRSAは病院内で分離される耐性菌としては最も分離頻度が高い⁷⁾。MRSA感染症治療で使用される抗MRSA薬は、アルベカシン（ABK）、ダプトマイシン、リネゾリド（LZD）、テイコプラニン（TEIC）、バンコマイシン（VCM）があり、「MRSA感染症の治療ガイドライン」にて抗MRSA薬の適正使用が推進されている⁸⁾。特に、有効性と副作用発現防止のために血中濃度測定が必要とされているVCM、ABK、TEICにおいては「抗菌薬TDMガイドライン」において適正な投与方法が推奨されている⁹⁾。

薬剤師は抗菌薬の使用について、専門性に特化した役割を果たさなければな

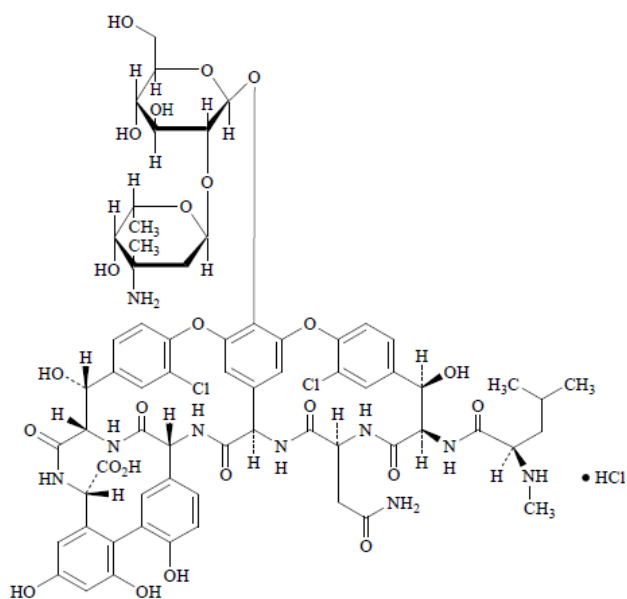
らない。抗菌薬を適正に使用するためには感染症治療における的確な抗菌薬の選択，有害事象の発現および重症化の防止，耐性菌発現の抑制などに尽力し，薬剤師が抗菌薬の適正使用の中心とならなければならない¹⁰⁾。抗菌薬を適正に使用するにあたり，地域における抗菌薬の使用状況と分離菌の薬剤感受性，抗菌薬の有効性および安全性を考慮し，抗菌薬の有害事象とその発症機構を明らかにする必要がある。抗菌薬の使用状況と分離菌の感受性情報を共有化することは，各々の施設における抗菌薬使用方法を見直すことが可能となる。本研究では，脳神経外科を主診療とする病院における注射用抗菌薬の使用量と院内分離菌薬剤感受性について調査し，施設間での相違と特徴について検討した。また，各地域で耐性菌が拡大している現在，耐性菌感染症の治療を有効かつ安全に行うことが重要であり，薬剤師が抗菌薬使用についての支援をしなければならない。さらに，抗MRSA薬であるLZDおよびVCM（図2）投与患者の代表的な有害事象である腎機能障害と血小板減少について検討した。特に有害事象である血小板減少の発生頻度が高いLZDについて血小板減少の発症機序を解明するため，ヒト単球系細胞株U937を用いてミトコンドリア障害とアポトーシスの誘導について検討した。



Linezolid

化学名

(-)-N-[[*(S)*-3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl]acetamide



Vancomycin

化学名

(1*S*, 2*R*, 18*R*, 19*R*, 22*S*, 25*R*, 28*R*, 40*S*)-50-[3-Amino-2, 3, 6-trideoxy-3-C-methyl- α -L-lyxo-hexopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyloxy]-22-carbamoylmethyl-5, 15-dichloro-2, 18, 32, 35, 37-pentahydroxy-19-[(2*R*)-4-methyl-2-(methylamino) pentanoylamino]-20, 23, 26, 42, 44-pentaoxo-7, 13-dioxa-21, 24, 27, 41, 43-pentaazaocyclo [26. 14. 2. 23, 6. 214, 17. 18, 12. 129, 33. 010, 25. 034, 39] pentaconta-3, 5, 8, 10, 12 (50), 14, 16, 29, 31, 33 (49), 34, 36, 38, 45, 47-pentadecaene-40-carboxylic acid monohydrochloride

図 2 LZD および VCM の構造式と化学名

第 1 章 抗菌薬使用状況と院内分離菌薬剤感受性

第 1 節 序論

AMR 対策行動計画の一つに抗微生物薬の適正使用が掲げられており，医療機関における AMR 対策への一層の取組みが求められている．2016 年に日本化学療法学会が中心となり感染症関連の 7 学会が共同で作成した抗菌薬の適正使用に向けた 8 学会提言「抗菌薬適正使用支援（Antimicrobial Stewardship ; AS）プログラム推進のために」を発表した¹¹⁾．さらに，2017 年に 8 学会合同抗微生物薬適正使用推進検討委員会から，AS の実践がどのような形で取り組まれるべきかのガイダンスである「抗菌薬適正使用支援プログラム実践のためのガイダンス」が公表された¹²⁾．AS プログラム（ASP）のプロセス評価の一部に，抗菌薬使用量調査と自施設分離菌感受性調査が挙げられる¹³⁾．このように院内分離菌の薬剤感受性情報は，有効な抗菌薬の選択と耐性菌増加の抑制に必要不可欠である．近年，病院の平均在院日数の短縮や治療の専門化等によって施設間での患者の移動が増加している．患者の抗菌薬使用情報を含む治療情報は自施設内だけではなく病院間の情報の共有が重要になる¹⁴⁾．山田らが構築した病院の分離菌培養結果と感受性結果の入力作業を簡略化し，他施設でも使用可能な薬剤感受性結果データベース¹⁵⁾を使用し，第 1 章では札幌市の脳神経外科を主診療とする同規模の病院 2 施設における抗菌薬の使用状況と分離菌の感受性について検討した．

第 2 節 方法

1. 対象施設

禎心会病院（札幌市）は，脳神経外科，循環器科，整形外科，形成外科，リウマチ科を診療科目とする医師数 15 名，病床数 142 床である．中村記念南病院（札幌市）は脳神経外科，神経内科，リハビリテーション科を診療科目とする医師数 9 名，病床数 160 床である．両施設とも脳神経外科を主診療とし，急性期から慢性期の患者を治療対象とする病院である（2006 年 1 月時点）．

2. 調査方法

2004 年 1 月から 2005 年 12 月までの禎心会病院と中村記念南病院における注射用抗菌薬の使用量と院内分離菌の薬剤感受性について調査した．注射用抗菌薬は抗菌薬の系統別で表記し，使用量は払い出し本数単位で集計した．患者から採取された生体試料について調査し，分離された細菌のうち，グラム陽性球菌のメチシリン感性黄色ブドウ球菌（MSSA），MRSA，肺炎球菌，グラム陰性桿菌の緑膿菌，肺炎桿菌，大腸菌の耐性率を調査した．薬剤感受性試験は，両施設とも外部委託で行い，希釈法およびディスク拡散法による薬剤感受性測定と CLSI（clinical and laboratory standards institute）法に基づいて判定した．判定基準は「S（感性）」「I（中間）」，「R（耐性）」に分類し，「I」「R」の判定を耐性として，山田らが構築した薬剤感受性結果データベース¹⁵⁾を用いて，耐性率を算出した．また，抗菌薬は一般名で表記した

感受性試験結果は，両施設共通の抗菌薬であるスルバクタム／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（IPM/CS），ゲンタマイシン（GM），ABK，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）について検討した．また，各施設 2004 年と 2005 年の分離菌種の感受性試験件数がそれぞれ 10 件未満の場合，2004 年と 2005 年の合計した結果で解析した．

第 3 節 結果

1. 注射用抗菌薬の使用量推移

図 3 には 2004 年および 2005 年の禎心会病院および中村記念南病院における注射用抗菌薬使用状況を示した。禎心会病院における 2004 年の注射用抗菌薬総使用量は 6882 本、2005 年は 6116 本、中村記念南病院における 2004 年の注射用抗菌薬総使用量は 3105 本、2005 年は 4156 本であった。注射用抗菌薬注射用抗菌薬の 2005 年における使用量は、禎心会病院での 2005 年の注射用抗菌薬総使用量は 2004 年と比較して約 10%減少した。両年ともペニシリン系抗菌薬が全体の約 50%を占め、第 3, 4 世代セフェム系抗菌薬は 725 本から 590 本と減少傾向であったが、カルバペネム系抗菌薬は 675 本から 760 本、抗 MRSA 薬は 130 本から 220 本と増加傾向が認められた。中村記念南病院での 2005 年の注射用抗菌薬総使用量は 2004 年と比較して約 35%の増加を認めた。両年ともペニシリン系抗菌薬が全体の約 25%を占め、第 3, 4 世代セフェム系は大きな変化は認められなかったが、第 1 世代セフェム系抗菌薬は 340 本から 695 本と 2004 年の約 2 倍、カルバペネム系薬剤が 125 本から 406 本と約 3 倍の増加が認められた。

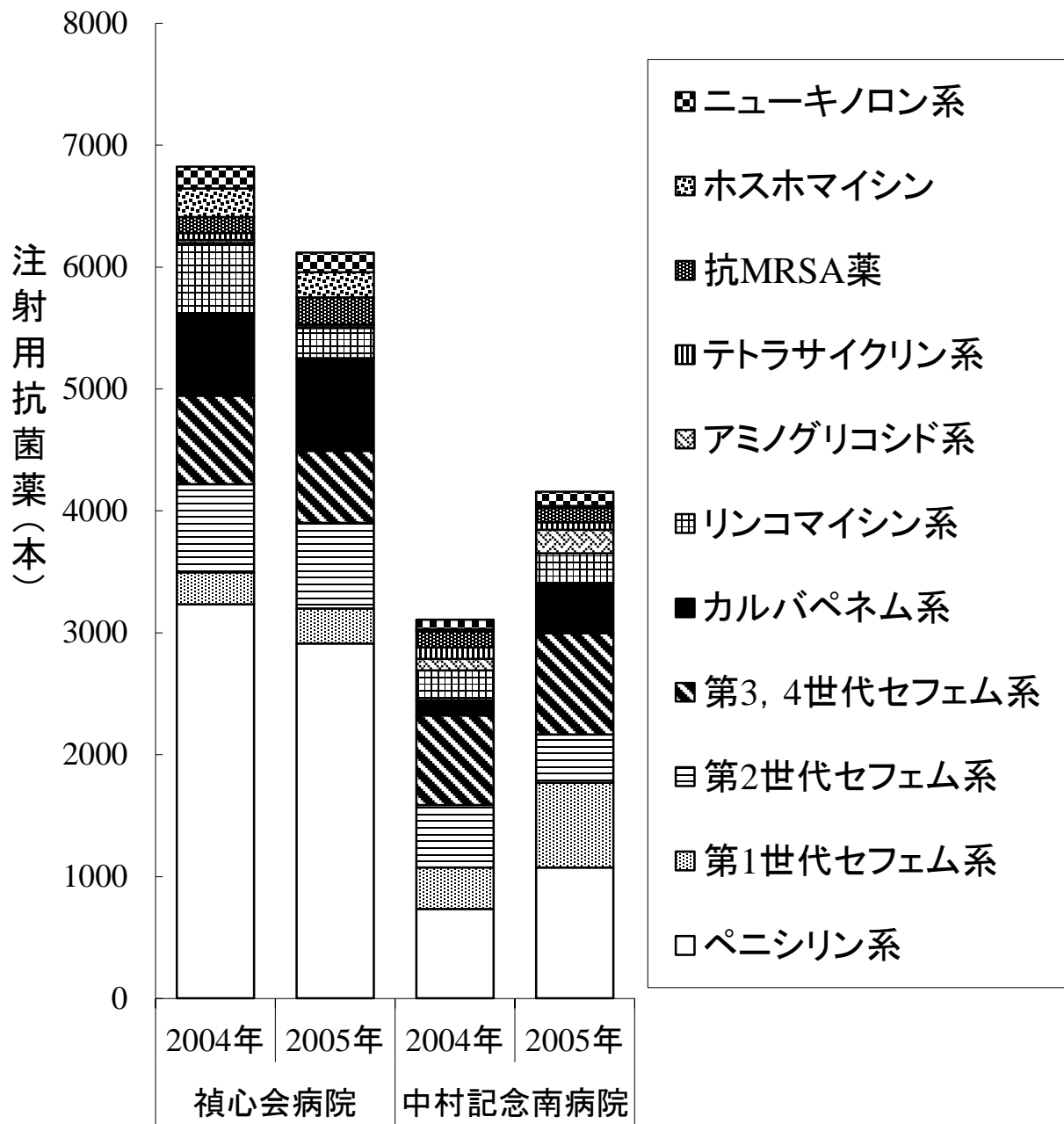


図3 年別注射用抗菌薬の使用状況

禎心会病院および中村記念南病院における2004年と2005年の注射用抗菌薬使用状況を抗菌薬の系統別に示した。

2. 生体試料の比較

図4には2004, 2005年の検査対象とした2年間の生体試料の割合を示した。禎心会病院における生体試料の件数は752件であり、呼吸器関連試料（喀痰、咽頭ぬぐい液、気管内採痰）が437件、全体の58%を占め、泌尿器関連試料（カテーテル尿、自然尿）が115件、全体の21%であった。なお、慢性期の患者に対して定期的に鼻汁の監視培養検査を実施していたため、鼻汁の件数が100件、全体の13%と多い結果となった。

中村記念南病院において、生体試料の件数は1,706件であり、呼吸器関連試料（喀痰、気管内採痰）が1,142件、全体の67%を占め、泌尿器関連試料（カテーテル尿、自然尿）が446件、全体の26%であった。

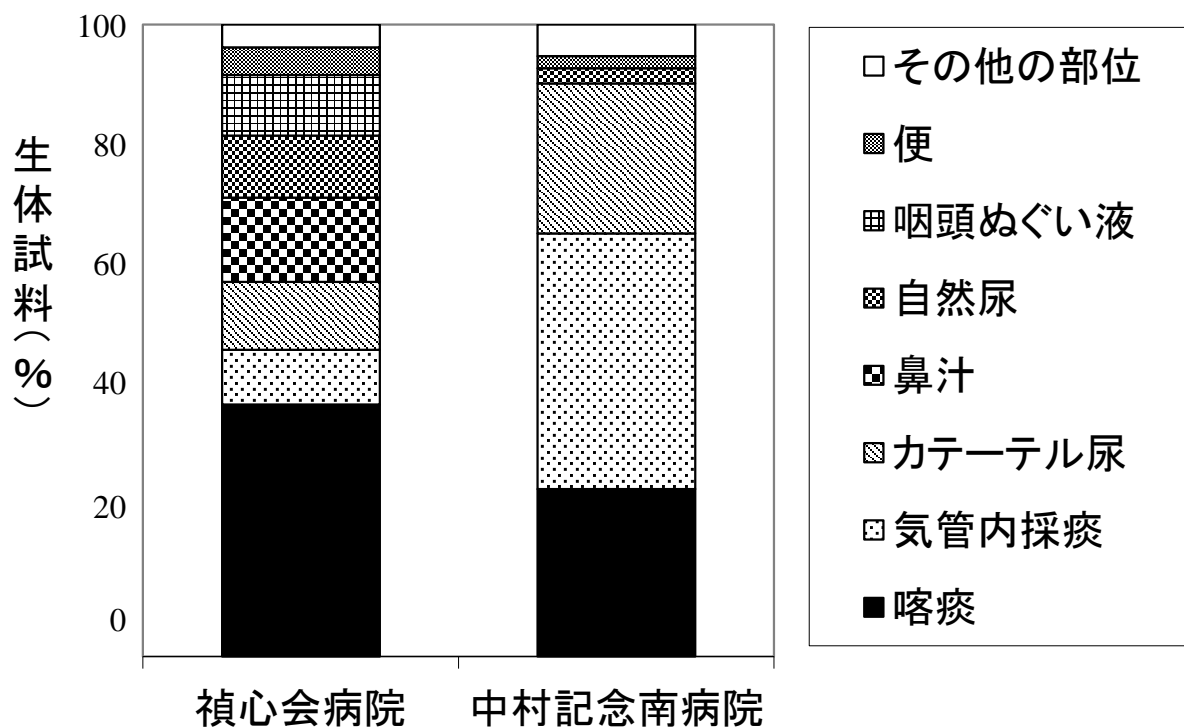


図4 生体試料の割合

禎心会病院および中村記念病院における2004年と2005年の2年間の分離菌検査の生体試料の割合(%)を示した。

3. 薬剤感受性試験

3-1 グラム陽性菌に対する耐性率

表 1 には 2004, 2005 年の 2 施設から得られた生体試料から分離されたグラム陽性球菌の分離件数と種々抗菌薬の耐性率を示した。MSSA に対する耐性化は, PIPC が禎心会病院において 67-74%と高率であったのに対し, 中村記念南病院においては 14-36%と低値を示した。一方, FOM は, 禎心会病院において 3-9%と低率であったのに対し, 中村記念南病院においては 17-22%, LVFX と PZFX のニューキノロン系抗菌薬は, 禎心会病院において 0-6%と低率であったのに対し, 中村記念南病院においては 17-28%であった。その他の抗菌薬の MSSA に対する耐性率に大きな差は認められなかった。MRSA に対する耐性化は, 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。その他の抗菌薬の MRSA に対する耐性率に大きな差は認められなかった。肺炎球菌に対する耐性化は, 両施設とも分離件数は少ないが SBT/ABPC は, 禎心会病院において 46%であったのに対し, 中村記念南病院においては 82%であった。一方, 禎心会病院において IPM/CS 36%, CLDM 54.5%と高率であったのに対し, 中村記念南病院においては両薬剤共に 0%であった。肺炎球菌は感染症において重要な菌種であるが分離培養が困難な菌種のため, 本研究において両施設ともに分離件数が少なく, 比較が困難な結果となった。

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	94.0	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	
MNO	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	

禎心会病院および中村記念南病院における分離菌検査の生体試料を対象とした。グラム陽性球菌である 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。

3-2 グラム陰性菌に対する耐性率

表 2 には 2004, 2005 年の 2 施設から得られた生体試料から分離されたグラム陰性桿菌の分離件数と種々抗菌薬の耐性率を示した。緑膿菌に対する耐性化は, PIPC が禎心会病院において 1-2%と低率であったのに対し, 中村記念南病院においては 10-12%であった。第 3 世代セフェム系抗菌薬の CAZ は両施設とも 10%以下と低い耐性率を維持していた。IPM/CS は禎心会病院において 20-27%, 中村記念南病院においては 18-36%であった。ニューキノロン系抗菌薬の LVFX, PZFX は禎心会病院において 61-79%, 中村記念南病院においては 57-73%と両施設とも特に高い耐性率を示していた。その他の抗菌薬の緑膿菌に対する耐性率に大きな差は認められなかった。肺炎桿菌の耐性化は, 禎心会病院において 2004 年の ABK に対する分離件数が 10 件と少なかったが, 耐性率は 90%と高率であった。しかし, この高い耐性率は, 2005 年には 17%と大幅に減少したが, 中村記念南病院の耐性率 5.3%を上回る耐性率であった。ニューキノロン系抗菌薬に対する耐性率は禎心会病院において 0%であったが, 中村記念南病院では 5-14%であった。その他の抗菌薬の肺炎桿菌に対する耐性率に大きな差は認められなかった。禎心会病院において 2004 年の大腸菌の分離件数が 1 件であったため, 2005 年との合計 37 件で耐性率を算出した。大腸菌の耐性化は, 禎心会病院において SBT/ABPC に対しては 5%, PIPC は 22%, CEZ は 8%, ニューキノロン系抗菌薬は 14%と低率であったのに対し, 中村記念南病院において SBT/ABPC は 24-40%, PIPC は 49-56%, CEZ は 20-27%, ニューキノロン系抗菌薬は 46-59%と高率であった。大腸菌のその他の抗菌薬に対する耐性率に大きな差は認められなかった

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

禎心会病院および中村記念南病院における分離菌検査の生体試料を対象とした。グラム陰性桿菌である緑膿菌，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。

第 4 節 考察

本研究当時は、一定期間の抗菌薬使用量の指標として総バイアル数や総グラム数で算出することが多く用いられていた。現在は、Anatomical Therapeutic Chemical/Defined Daily Dose (ATC/DDD) システムを用いた抗菌薬使用密度 (antimicrobial usage density : AUD) も利用されている¹⁶⁻²⁰⁾。AUD は、入院患者 100 人もしくは 1,000 人あたりの 1 日に使用する人数で表わされ、抗菌薬グラム当たりの抗菌薬使用量を DDD と患者延べ入院日数で補正することで、異なる抗菌薬や他施設間との比較が可能となる。本研究は抗菌薬使用量を総バイアル数で評価したが、同規模、同主診療の施設での検討であり、総バイアル数の評価は AUD の評価と比べ相違は少ないことが推察できる。禎心会病院と中村記念南病院ともに脳神経外科を主診療とする同規模の病院であるが、両施設における注射用抗菌薬使用量に約 2 倍の差が認められた。これは、禎心会病院における脳神経外科以外の診療科目および急性期の患者が増加したこと、中村記念南病院における回復期リハビリ病棟の患者が多いため、急性期の疾患に関連する感染症に罹患する患者が少ないことが要因として考えられた。一方、禎心会病院における注射用抗菌薬使用量は、院内感染対策委員会が 2004 年より推進した周術期感染予防における抗菌薬使用日数の短縮と厚生労働省が 2003 年に導入した包括評価制度 (DPC : diagnosis-procedure-complex) の影響で減少した。また、中村記念南病院における注射用抗菌薬は、大腸菌のニューキノロン系抗菌薬の耐性率が高値であったことを考慮し、2005 年より尿路感染症治療に使用する抗菌薬を経口ニューキノロン系抗菌薬からペニシリン系もしくは第 1 世代セフェム系注射薬へ変更したことにより増加した¹⁵⁾。このように、耐性菌発現を抑制する目的で行った対策により禎心会病院では注射用抗菌薬使用量の減少、一方、中村記念南病院では増加という結果となった。このことは、抗菌薬使用量の増減だけでは耐性菌対策の評価が不可能であることを示している。

感染症の起因菌を同定することは抗菌薬の適正な選択に重要であり、感染部位の微生物分離培養検査と薬剤感受性検査が必要不可欠である。分離菌の生体試料において、中村記念南病院の検体件数が禎心会病院と比較し約 2 倍であっ

た．中村記念南病院では抗菌薬使用時の感受性試験の必要性が理解されていることから，微生物分離培養検査を実施していたことが示唆された．禎心会病院も追従し，院内で感受性試験の必要性を啓発することで微生物分離培養検査の件数が 2006 年には増加した．両施設とも呼吸器関連試料（喀痰，咽頭ぬぐい液，気管内採痰）が半数以上を占めていた．このことは，入院時において脳神経疾患による呼吸器感染症を疑う感染症の頻度が高いことが推察された．また，泌尿器関連試料（カテーテル尿，自然尿）が約 20%を占めており，呼吸器感染症に次いで泌尿器感染症の頻度も高いことが推察された．中村記念南病院においてカテーテル尿が泌尿器関連試料の約 90%を占めていたことは，回復期リハビリ病棟，特に脳疾患慢性期の患者の多くが尿道カテーテルを使用しているためである．病院薬剤師は抗菌薬を適正に使用するために，抗菌薬投与開始前の感染部位の微生物分離培養検査オーダーを積極的に医師に推奨する必要がある．

両施設のグラム陽性球菌およびグラム陰性桿菌の薬剤耐性率にばらつきが認められた．MRSA の GM と MINO に対する耐性率に両施設で相違が認められた．両施設ともに GM と MINO の注射抗菌薬使用量は少ないことから，抗菌薬使用量に依存しない施設間の院内感染対策の遵守等の相違が，施設固有 MRSA 株の発現と拡大に寄与していることを示唆するものであった．緑膿菌においては全国的にカルバペネム系抗菌薬の耐性率の上昇が報告されており²¹⁾，両施設とも全国調査と同様に IPM/CS 耐性率の上昇が認められた．カルバペネム系抗菌薬の使用量増加に伴う緑膿菌の薬剤感受性の低下が報告されている²²⁻²⁵⁾．一方で，カルバペネム系抗菌薬の使用量は必ずしもカルバペネム系抗菌薬耐性緑膿菌の増加と一致しない報告もある²⁶⁾．本研究結果の知見は，両施設ともに増加しているカルバペネム系抗菌薬の使用量が耐性菌の発現を誘導している可能性が示唆された．さらに，ニューキノロン系抗菌薬の緑膿菌耐性率が両施設とも非常に高率であり，このことは緑膿菌感染症におけるニューキノロン系抗菌薬の使用が困難であることを示していた．中村記念南病院において尿路感染症の代表的な起因菌である大腸菌も緑膿菌同様，耐性率が高値であることから，尿路感染症における第一選択薬としては不適であると考えられた．また，禎心会病院では大腸菌におけるニューキノロン系抗菌薬の耐性率は高値では

ないが、今後の耐性化の誘導を考慮し、中村記念南病院と同様に尿路感染症治療には、経口ニューキノロン系抗菌薬からペニシリン系もしくは第1世代セフェム系注射薬への変更を考慮する必要性が示唆された。全国調査²⁷⁻²⁹⁾と本研究を比較して、分離菌の耐性率に違いが認められ、耐性菌発現の原因には様々な要因があり、各施設における耐性率の評価と情報の共有化が重要である。

本研究結果より、同規模、同主診療の施設間での抗菌薬の使用と耐性菌の発現についてその相違が明らかとなった。感受性試験結果の相違は、各施設の抗菌薬の使用状況や感染防止対策の相違によるものと考えられた。特に、脳神経外科などの慢性期の患者が多く入院している施設は、入院が長期間になることで耐性菌に暴露される機会が増加し、院内感染の影響を受けやすい。現在、多くの研究グループが臨床検査材料を使用した分離菌に対する薬剤感受性について検討しており、地域により耐性率が異なり、緑膿菌のカルバペネム系抗菌薬の耐性率の上昇について報告している²⁷⁻²⁹⁾。本研究において地域だけではなく同じ地域内の同規模、同主診療の施設間で耐性率が異なることが判明した。これらの情報は、抗菌薬の適正使用に重要な役割を果たしている。

近年、院内感染対策における薬剤師の役割が大きくなってきており³⁰⁾、薬剤師として抗菌薬の使用状況や分離菌の同定、感受性試験結果について情報提供を行うことは感染症治療および耐性菌発現抑制に必要不可欠である。感染症を専門とする薬剤師の感染対策情報を共有できる地域ネットワークが、耐性菌の拡散の抑制に有効であることが示唆されている³¹⁾。さらに、医療機関におけるAMR対策へ一層の取組みが求められている今、薬剤師が有効かつ安全に抗菌薬を使用するための支援を積極的に行い、感染症の早期治療および耐性菌拡大の抑制に努めなければならない。

本研究結果より、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などを共有することは、地域における耐性菌拡大の抑制に有効な手段である。

第2章 日本人における抗 MRSA 抗菌薬による治療と有害事象発現

第1節 序論

日本において MRSA は病院内で分離される耐性菌としては最も分離頻度が高い⁷⁾。MRSA 感染症治療で使用される抗 MRSA 薬は、ABK、ダプトマイシン、LZD、テイコプラニン、VCM がある。特に VCM および LZD は、ともに MRSA および他剤が無効なグラム陽性球菌感染症治療に使用される代表的な抗菌薬である。札幌医科大学附属病院において VCM および LZD の使用については届出制を導入しているが、両薬剤ともに特別に使用制限は設けていない。両薬剤の多くが *Methicillin-resistant Staphylococci* 感染症治療を想定して使用されている。これら抗菌薬の代表的な有害事象として VCM は腎機能障害^{32,33)}、LZD は血小板減少³⁴⁻³⁶⁾を発現する。医薬品の多くは主に腎臓で排泄され、腎機能障害により血漿中薬物濃度が高値となり³⁷⁾、有害事象が発現しやすくなる。VCM は腎排泄型の薬剤で中毒域が狭く、有効性と安全性の指標となる Therapeutic Drug Monitoring (TDM) が必要である³⁸⁻⁴⁰⁾。LZD は腎機能により血漿中濃度推移は大きく変化せず、腎機能障害時の投与量の調節や TDM は必要ないとされている⁴¹⁾。一方で、LZD は腎機能障害患者において血小板減少が高頻度で発現するとの報告もあるが⁴²⁻⁴⁴⁾、LZD による血小板減少の明確な危険因子は未だに明らかにされていない。近年、海外において院内 MRSA 肺炎患者における VCM と LZD の有効性と安全性が報告⁴⁵⁻⁴⁸⁾されているが、日本人における VCM と LZD の有害事象について比較検討した報告はない。

第2章では札幌医科大学附属病院における VCM および LZD 投与患者の血小板減少と腎機能障害について後方視的に調査し、有害事象の観点から抗菌薬の適正使用について検討した。

第 2 節 方法

1. 対象患者

2011 年 1 月から 2011 年 12 月までの期間に，札幌医科大学附属病院において LZD 注射薬が投与された患者 178 例および，VCM 注射薬が投与された患者 235 例を対象とし，腎機能低下調査および血小板減少調査を行った．腎機能低下調査においては，対象薬剤投与前の推算糸球体濾過量（eGFR）が末期腎不全群である（ $<15\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ）患者および血液透析施行患者，投与日数が 3 日間未満の患者，調査項目について一部確認できなかった患者，18 歳未満の患者および投与中に死亡した患者を対象から除外した．腎機能低下調査は VCM 投与患者 149 例および LZD 投与患者 121 例を対象とした．血小板減少調査においては，対象薬剤投与中に播種性血管内凝固症候群（DIC）発症と診断された患者，血小板輸血を施行した患者，投与日数が 3 日間未満の患者，調査項目について一部確認できなかった患者，18 歳未満の患者，および投与中に死亡した患者を対象から除外した．対象は VCM 投与患者 160 例および LZD 投与患者 91 例であった．

2. 調査方法

患者背景として，性別，年齢，体重，血清クレアチニン，血小板数，血清アルブミン，Aspartate aminotransferase（AST），Alanine aminotransferase（ALT），総ビリルビン，および治療期間について調査した．eGFR は Matsuo ら⁴⁹⁾によって報告された日本の患者において決定した係数で補正された換算式に基づいて算出した．eGFR は，“K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification”⁵⁰⁾を参考にし，chronic kidney disease（CKD）病期ステージは $\text{eGFR} \geq 90\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ をステージ 1， $90\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2 > \text{eGFR} \geq 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ をステージ 2， $60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2 > \text{eGFR} \geq 30\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ をステージ 3， $30\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2 > \text{eGFR} \geq 15\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ をステージ 4， $\text{eGFR} < 15\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ をステージ 5 と分類した．腎機能低下は対象薬剤投与前後の eGFR より CKD 病期ステージが悪化した群を腎機能低下群と定義した．さらに，対象薬剤投与前後の eGFR を調査

し、対象薬剤の腎機能に対する影響についても評価した。また、VCM 血中濃度と腎機能低下についての関係を調査するため、VCM の血中トラフ濃度と腎機能低下について調査した。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、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。

血小板減少は、Takahashi らの報告⁴⁴⁾を参考にし、対象薬剤投与前後で血小板数が 30%以上減少した群を血小板減少群と定義した。血小板数のレベルは CTCAE v.3.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Effects, version 3.0)⁵¹⁾を参考にし、 $>125 \times 10^3/\mu\text{L}$ をグレード 0, $125-75 \times 10^3/\mu\text{L}$ をグレード 1, $74-50 \times 10^3/\mu\text{L}$ をグレード 2, $49-25 \times 10^3/\mu\text{L}$ をグレード 3, $<25 \times 10^3/\mu\text{L}$ をグレード 4 に分類した。

有害事象の回復について、腎機能は薬剤投与終了後から CKD 病期ステージが投与前のステージに回復した症例、血小板数は血小板数レベルがグレード 0 に回復した症例とし、症例数と回復に要した期間を調査した。

本研究は、平成 24 年 1 月 12 日、受付番号 23-113 として札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会で承認された。

3. 統計処理

パラメトリック検定は、 t 検定を用い、ノンパラメトリック検定は、 χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定を用いて分析した。危険率 5%未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的有意な差とした。

第3節 結果

1. 患者背景と血清検査値

対象患者の性別において腎機能低下調査のLZD投与群は121例(男性88例, 女性33例), VCM投与群は149例(男性84例, 女性65例)であった。血小板減少調査のLZD投与群は91例(男性71例, 女性20例), VCM投与群は160例(男性90例, 女性70例)であった。両調査ともにLZD投与群において有意に男性患者が多い結果であった。投与期間においては腎機能低下調査のLZD投与群は 7.0 ± 6.4 日, VCM投与群は 11.0 ± 11.4 日, 血小板減少調査のLZD投与群は 7.0 ± 5.8 日, VCM投与群は 10.0 ± 11.4 日であった。両調査ともにLZD投与群において有意に投与期間が短い結果となった(表3)。また, 両調査ともに年齢および体重については有意な差はなかった。

投与開始前の血清クレアチニン値において血小板減少調査のLZD投与群は 1.2 ± 1.4 mg/dL, VCM投与群は 0.8 ± 0.84 mg/dLであり, LZD投与群において有意に血清クレアチニン値が高値であった。血清AST値において血小板減少調査のLZD投与群は 30.0 ± 39.4 IU/L, VCM投与群は 24.0 ± 64.1 IU/Lであり, LZD投与群において有意にAST値が高値であった(表3)。また, 腎機能低下調査のクレアチニン値およびAST値, 両調査のアルブミン値, ALT値, 総ビリルビン値および血小板数については有意な差はなかった。

2. 有害事象

2-1 腎機能低下

薬剤投与前後の病期ステージ悪化(腎機能低下)は, VCM投与群で35例(24%), LZD投与群で16例(13%)に認められ, VCM投与群において有意に腎機能低下症例が多く認められた($p=0.032$, オッズ比: 2.01, 95%CI: 1.05-3.85)(表3)。

2-2 血小板減少

薬剤投与前後で血小板数30%以上の減少(血小板減少)は, VCM投与群で27例(17%), LZD投与群で37例(41%)に認められ, LZD投与群において有

意に血小板減少症例が多く認められた ($p < 0.001$, オッズ比 : 3.38, 95%CI : 1.87-6.08) (表 3).

2 - 3 eGFR と血小板数の変化

薬剤投与前後の eGFR は, VCM 投与群で $100 \pm 56.9 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ から $91 \pm 55.7 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ へ有意に減少した ($p = 0.002$) . 一方, 血小板数は $204 \pm 136 \times 10^3 /\mu\text{L}$ から $235 \pm 149 \times 10^3 /\mu\text{L}$ へ有意に増加した ($p = 0.001$) . (表 4) LZD 投与群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を示した.

表 3 VCM および LZD 投与による腎機能低下と血小板減少

患者背景	腎機能低下調査			血小板減少調査		
	LZD n=121	VCM n=149	<i>p</i>	LZD n=91	VCM n=160	<i>p</i>
患者背景						
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
投与開始前血清検査値						
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 ³ /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.

腎機能低下調査および血小板減少調査における患者背景および投与開始前の血清検査値, 有害事象発現例数を示した.

表 4 eGFR と血小板数の変化

	eGFR (mL/min/1.73 m ²)		<i>p</i>
	Initial	Terminal	
VCM (n=149)	100 ± 56.9	91 ± 55.7	0.002
LZD (n=121)	98 ± 112	100 ± 93.9	0.714

	血小板数 (×10 ³ /μL)		<i>p</i>
	Initial	Terminal	
VCM (n=160)	204 ± 136	235 ± 149	0.001
LZD (n=91)	242 ± 153	216 ± 146	0.094

Values represent means ± 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。

3. 有害事象の危険因子

3-1 患者背景と血清検査値

VCM 投与患者において腎機能低下患者および非腎機能低下患者，LZD 投与患者において血小板減少症患者と非血小板減少症患者に分け，患者背景と投与開始前の血清検査値を比較検討した．LZD 投与患者の血小板減少患者において有意に投与期間が長いことが判明した（ 7.0 ± 5.8 vs. 10.0 ± 5.6 日， $p=0.043$ ）（表 5）．この結果は，LZD 投与における血小板減少は投与期間に影響されることを示している．他の患者背景および投与開始前の血清検査値について有意な差は認められなかった．

3-2 腎機能低下

VCM 投与患者において腎機能低下患者および非腎機能低下患者に分け，VCM 血中トラフ濃度を比較検討した．腎機能低下患者は非腎機能低下患者より有意に高い血中トラフ濃度を示した（ 20.2 ± 7.1 vs. $13.7\pm 8.3\mu\text{g/mL}$ ， $p<0.001$ ）（表 5）．この結果は，VCM 治療中における腎機能は VCM 血中濃度に影響を受けることを示している．VCM の血中トラフ濃度に依存して腎機能低下発現率は上昇したが， $20\mu\text{g/mL}$ 以上ではほぼ一定となり $30\mu\text{g/mL}$ で約 45% であった（図 5）．さらに，血中トラフ濃度 $10\text{-}20\mu\text{g/mL}$ と比較して，トラフ濃度 $>20\mu\text{g/mL}$ の患者は，治療中に腎機能低下を発症する可能性が有意に高いことが示された（ $p=0.014$ ）．VCM 血中トラフ濃度における連続変数のカットオフ値を Receiver Operatorating Characteristic curve（ROC）によって求めた結果，ROC 曲線下面積は 0.732，カットオフ値は $18.0\mu\text{g/mL}$ （感度 71.4%，特異度 70.2%）であった．VCM 投与群における血中トラフ濃度 $18.0\mu\text{g/mL}$ 以上の群は有意に腎機能低下の発現が高いことが明らかとなった（ $p<0.001$ ，オッズ比：5.88，95%CI：2.55-13.57）．

3-3 血小板減少

LZD 投与患者において血小板減少症患者と非血小板減少症患者について比較検討した．血小板減少症患者は非血小板減少症患者よりも LZD による治療期間が有意に長かった（ 10.0 ± 5.6 vs. 7.0 ± 5.8 日， $p=0.043$ ）（表 5）． $\text{eGFR}<60\text{mL/min}$

/1.73m²の患者を中等度腎機能障害発症，eGFR<30mL/min/1.73m²の患者を重篤な腎機能障害発症と定義し，LZD投与時の腎機能障害重症度と血小板減少発現について検討した．非血小板減少群および血小板減少群においてCKD病期ステージによる血小板減少発現に有意な差は認められず，さらに，重篤な腎機能障害であるステージ4，5の患者による血小板減少発現に有意な差は認められなかった（表6）．これらの結果は，LZD投与による血小板減少の発現に腎機能は関与しないことを示唆した．LZD投与期間における連続変数のカットオフ値をROCによって求めた．ROC下面積は0.625，カットオフ値は7.5日（感度64.9%，特異度63.0%）であった．また，LZD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の発現が認められた（ $p=0.017$ ，オッズ比：3.14，95%CI：1.31- 7.51）．

表 5 VCM 関連腎機能低下および LZD 関連血小板減少の危険因子

	VCM n=149			LZD n=91		
	非腎機能低下群	腎機能低下群	<i>p</i>	非血小板減少群	血小板減少群	<i>p</i>
性別 (男/女)	63/51	21/14	0.621	44/10	27/10	0.48
年齢	63.5±14.5 (21-88)	64.0±13.1 (39-87)	0.410	67.5±16.6 (21-86)	68.0±13.8 (28-84)	0.987
体重 (kg)	54.9±11.3 (32.1-87.0)	57.3±12.6 (40.4-84.5)	0.506	56.4±8.6 (37.1-79.2)	57.0±11.4 (37.0-84.5)	0.840
投与期間 (日)	12.0±9.7 (3-56)	11.0±15.7 (3-67)	0.594	7.0±5.8 (3-34)	10.0±5.6 (3-28)	0.04
投与開始前血清検査値						
血清アルブミン (g/dL)	3.0±0.5 (1.6-4.4)	3.0±0.6 (1.3-4.7)	0.387	2.9±0.6 (1.8-4.6)	3.0±0.5 (1.9-4.3)	0.62
血清クレアチニン (mg/dL)	0.6±0.4 (0.2-2.3)	0.7±0.4 (0.3-1.9)	0.263	0.7±0.94 (0.1-4.2)	0.9±1.8 (0.1-11.1)	0.76
ALT (IU/L)	24.5±111.8 (4-903)	19.0±76.2 (5-407)	0.094	28.5±76.6 (7-469)	38.5±55.2 (2-290)	0.65
AST (IU/L)	23.5±80.3 (8-544)	21.0±69.7 (7-391)	0.621	29.5±40.9 (11-216)	30.0±37.3 (9-221)	0.69
総ビリルビン (mg/dL)	0.5±1.5 (0.1-10.4)	0.4±0.5 (0.2-2.0)	0.618	0.6±1.8 (0.2-13.0)	0.4±0.7 (0.1-3.5)	0.19
血小板数(×10 ³ /μL)	-	-	-	205±123 (50-651)	274±185.4 (59-788)	0.29
VCM血中トラフ濃度 (μg/mL)	13.7±8.3 (1.7-53.6)	20.2±7.1 (7.6-37.7)	<0.001	-	-	-

Values represent medians ± SD (range), except where indicated otherwise.

LZD=linezolid; VCM=vancomycin; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase.

VCM 関連腎機能低下および LZD 関連血小板減少の患者背景と投与開始前の血清検査値, VCM 投与患者の VCM 血中トラフ濃度を示した.

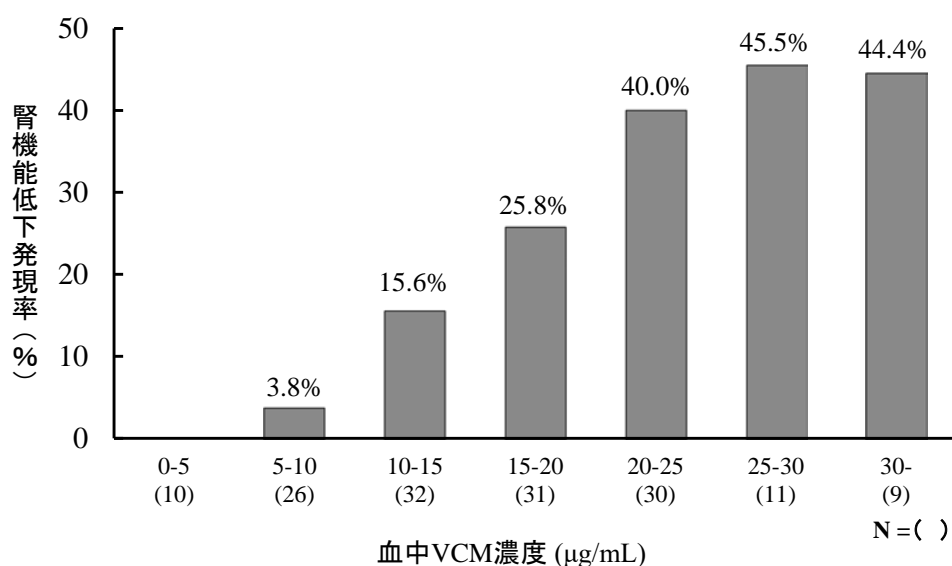


図 5 VCM 血中濃度と腎機能低下発現率の関係

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 × 100 (%) で算出した。

表 6 LZD 投与患者における腎機能障害と血小板減少発現頻度

ステージ	eGFR mL/min/1.73m ²	非血小板減少群	血小板減少群
1	≥90	21	13
2	60-89	13	5
3	30-59	10	13
4	15-29	8	4
5	<15	2	2
1, 2	≥60	34	18
3, 4, 5	<60	20	19
1, 2, 3	≥30	44	31
4, 5	<30	10	6

Values represent numbers of patients, except where indicated otherwise.

LZD 投与患者における投与開始前 eGFR をステージ分類し、血小板減少発現頻度を示した。

3 - 4 有害事象の回復

VCM 投与患者における腎機能低下発現患者 (n = 35) の CKD ステージは、ステージ 5 が 1 例、ステージ 4 が 8 例、ステージ 3 が 13 例、ステージ 2 が 13 例であった。このうち 9 例の患者については治療後の血清クレアチニン値が確認できないため除外とし、26 例の患者の治療後有害事象の腎機能回復について調査した。投与終了後 4 週間以内に 23 例の患者 (88%) のステージ回復が認められ、平均回復期間は 13.7 ± 9.4 日であった。

LZD 投与患者における血小板減少発現患者 (n = 37) の血小板数レベルは、グレード 4 が 1 例、グレード 3 が 5 例、グレード 2 が 7 例、グレード 1 が 10 例、グレード 0 が 14 例であった。14 例の患者はグレード 0 のため、3 例の患者について治療後の血小板数が確認できないため、3 例は治療後の血小板輸血が施行されたために除外とし、治療後有害事象の血小板数回復について 17 例の患者を調査した。13 例の患者 (76%) が 4 週間以内にグレード 0 の血小板数に回復し、平均回復時間は 11.4 ± 4.8 日であった。

これらの結果は、VCM による腎機能低下および LZD による血小板減少は可逆的に回復することを示唆した。

第4節 考察

本研究で示したように LZD 投与の日本人患者における腎機能低下発現は 13.2%、VCM 投与における発現は 23.5%であり、日本人において VCM は LZD に比べ、有意に腎機能低下を引き起こすことを示した。Wunderink ら⁴⁸⁾は、MRSA 感染症患者において血清クレアチニン濃度を指標とした判定で、LZD 投与患者の 8.4%、VCM 投与患者の 18.2%で腎機能低下が認められることを報告した。このことは VCM が腎機能低下を誘導することを示唆している。さらに VCM は血中トラフ濃度 18.0 μ g/mL (カットオフ値) を超えない濃度では腎機能低下の発現は低いが、20 μ g/mL 以上の患者では有意に腎機能低下を高率に発症することが観察された。この結果は、VCM の血中トラフ濃度 20 μ g/mL 以上で腎機能低下の発現が有意に増加した海外の報告^{48,52-56)}と類似するものであり、この報告を参考にしている日本の「抗菌薬 TDM ガイドライン」⁹⁾の推奨血中トラフ濃度を支持する結果となった。また、血小板減少症および腎機能低下は感染症の合併症であり、一般的に感染症が改善するにつれ回復することが多い。本研究では、VCM による治療において感染症の改善に伴って有意に血小板数は回復し、eGFR の減少が観察され、LZD による治療においては治療前後の eGFR に変化は見られず、感染症は改善しているにもかかわらず、血小板数が減少する傾向が認められた。これらの現象は、VCM が腎機能障害発現と関連することを示唆した。一方、LZD 治療は腎機能に影響を与えないが、血小板減少の発現と関連していること示した。これらの結果は Colomo ら⁵⁷⁾が報告した、VCM と比べ LZD による治療は血清クレアチニン値または eGFR に影響しないという報告と一致するものであった。

本研究において VCM 投与による血小板減少の発現は 16.9%、LZD 投与による発現は 40.6%であり、LZD による治療において有意に血小板減少が多く発現することが認められた。さらに、本研究において LZD 投与による血小板減少は投与期間が危険因子であることが示唆され、投与期間 7.5 日以上 (カットオフ値) の群で有意に血小板減少が発現する傾向が認められ、日本人患者では 1 週間以上の LZD 治療で血小板減少が発現しやすいことを示した。Wunderink ら⁴⁸⁾は、血小板減少は VCM 治療で 13.2%、LZD 治療で 16.3%発現したと報告し

ている。Takahashi ら⁴⁴⁾は、日本人患者において血小板減少は LZD 治療で 38.7% 発現し、危険因子として投与期間と腎機能低下を報告した。Gerson ら⁵⁸⁾は 2 週間以上の LZD 治療で血小板減少が発現しやすいと報告した。本研究における患者の平均体重は 57.1kg であったが、米国における研究では、対象患者の平均体重は 73.3kg⁴⁵⁾または 78.1kg⁴⁶⁾であった。Niwa ら⁵⁹⁾は 55kg 未満の体重を血小板減少の危険因子として報告した。米国人の体重は日本人よりも明らかに大きく、日本人において LZD の体重当たりの投与量が過量となることが血小板減少発現頻度の増加と発現時期が早期となった要因の一つと考えられる。本研究において腎機能障害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。Lin ら⁴²⁾や Takahashi ら⁴⁴⁾は、腎機能低下患者において LZD が血小板減少を高率で発現させることを報告した。また、Matsumoto ら^{60,61)}は腎機能が低下した患者において LZD 投与による血小板減少発現に注意が必要であることを提唱した。さらに、Matsumoto ら⁶⁰⁾と Tsuji ら⁶²⁾は腎機能低下が LZD 血中トラフ濃度と Area Under the Curve (AUC) を増加させ、血小板減少症を誘発することを報告した。一方で、Brier ら⁴¹⁾は、腎機能低下患者において、血中濃度や全身クリアランスに大きな変化が認められなかったため、LZD の用量調節の必要がないことを報告している。本研究は Brier らの報告を支持する結果となり、腎機能障害は LZD 関連血小板減少の絶対的な危険因子ではないことを提唱する。これらの報告から、LZD の血中濃度を上昇させる因子は腎機能障害だけではない可能性があり、血中濃度とその上昇因子、および血小板減少発現について、さらには LZD の分布・代謝経路は複雑であることから、LZD やその代謝物の蓄積と血小板減少についての更なる研究が必要である。本研究結果より VCM および LZD によって誘発された有害事象の多くは可逆的であり、2 週間程度で改善する例が多かったことから、薬物誘発性有害事象の危険性と抗菌薬の有益性を把握し、抗菌薬の適正使用に基づいた治療を提供する必要がある。MRSA による院内肺炎を対象とした VCM と LZD との比較試験において、LZD は試験終了時の臨床効果で統計学的な有意差を示している⁴⁸⁾。さらに、MRSA による皮膚・軟部組織感染症を対象としたメタアナリシスの結果、臨床効果、細菌学的効果ともに、LZD の効果は VCM と比較して有意に高かった⁶³⁾。このように臨床効果において、LZD は VCM と同等以上であることが示

唆される。

本研究結果より，日本人における VCM による治療は腎機能障害を回避するために VCM 血中トラフ濃度を 20 μ g/mL 以下にコントロールする必要があり，海外の報告を参考にしている日本の「抗菌薬 TDM ガイドライン」⁹⁾の推奨血中トラフ濃度を支持する。また，LZD は VCM 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から，腎機能のコントロールが困難な患者，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 LZD を推奨する。一方，日本人における LZD 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，LZD による治療が長期間になる場合には，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。

第3章 LZDによる培養ヒト単球系細胞への毒性機構

第1節 序論

LZDは、グラム陽性球菌感染症治療に有効なオキサゾリジノン系合成抗菌剤である。ペプチド鎖の伸長過程もしくは終結過程を阻害する従来の細菌のタンパク質合成阻害作用を有する抗菌剤とは大きく異なり、LZDはリボソーム50Sサブユニットに結合し、70S開始複合体の形成を阻害することによりタンパク質合成過程を阻害して抗菌作用を発現する^{64,65}。LZDの代表的な有害事象に血小板減少や貧血などの骨髄抑制^{34-36,66}や視神経障害⁶⁷が報告されている。しかしながら、LZDによる真核細胞障害機構の詳細は不明である。細菌のリボソームを標的とする抗菌薬は、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^{68,69}。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、LZD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することが推定される。

ミトコンドリアは物質の酸化エネルギーを用いてATPを合成する細胞内小器官である。呼吸鎖に共役するリン酸化反応を介してATPが生成し、分子状酸素(O₂)は電子を受け取り水分子が生成する。生体内に取り込まれたO₂のほとんどがミトコンドリアで消費され、呼吸鎖の機能不全により活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の生成は著しく上昇する。近年、FADH₂により複合体IIに渡された電子が複合体Iへ逆流し、多量のスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻・)が形成されることも報告された⁷⁰。心筋細胞において、虚血/再かん流により過量のROSが生成し、生成したROSに起因して細胞傷害が惹起される⁷¹。これらの知見は、LZDがミトコンドリアにおけるタンパク質合成阻害を介して機能不全を惹起し、ROSの生成が増大することによる細胞傷害を引き起こす可能性を示唆する。

ミトコンドリア機能障害はアポトーシス細胞死誘導の一つの原因である。多くのアポトーシス誘導シグナルはミトコンドリアに機能変化を誘導し、ミトコンドリア膜の透過性亢進に集約する^{72,73}。ミトコンドリアの膜間腔には数種類

のアポトーシス誘導タンパク質が存在しており、膜透過性亢進に伴ってシトクロム C が細胞質に漏出し、システインプロテアーゼである一連のカスパーゼが活性化し、DNA 鎖切断酵素の活性化を誘導してプログラム細胞死が執行される^{74,75)}。Bcl-2 ファミリーメンバーのいくつかはミトコンドリア透過性の亢進を阻害してアポトーシスを抑制し、他のメンバーは透過性亢進を促進してアポトーシスを誘導する^{76,77)}。LZD がミトコンドリア機能を障害した場合、アポトーシス性細胞死が誘導される可能性が推定されるが、そのことについて検討はされていない。

LZD がミトコンドリアにおけるタンパク質合成阻害を介して真核細胞傷害を誘導することを明らかにするため、ヒト骨髄性白血病細胞株 U937 を実験に用いた。近年、細胞死の分子レベルの研究はアポトーシスを中心に行われてきたが、アポトーシス以外にもプログラム化された細胞死が哺乳類細胞で認められている^{78,79)}。オートファジーは、酵母から哺乳類に至るまで進化的に保存された機構であり生体の恒常性維持に必要であるが、オートファジー介在の細胞死の分子機構も解明されつつある^{80,81)}。オートファジーは外部から侵入してきた病原体を直接捕らえて分解することもできることから、病原体に対する免疫応答にも係っている^{82,83)}。また、オートファジーがミトコンドリア機能に影響を与え ROS 産生を制限することも報告されている⁸⁴⁾。本研究で、免疫機構に関与する細胞に対する LZD の影響を検討するために、マクロファージの前駆細胞で CD14 陽性であり、活性酸素産生能は有さない U937 細胞株を用いて細胞毒性作用を検討した。

生体内において LZD は不安定なヘミアセタール化合物 PNU-143011 を経て酸化体ヒドロキシ LZD に代謝される⁸⁵⁾。In vitro における肝ミクロゾームの代謝実験において、このヒドロキシ LZD への代謝反応に薬物代謝酵素 CYP はほとんど関与せず、非酵素的に進行する酸化反応であることが示され、この代謝反応は内在性の ROS 濃度に依存し、 O_2 の一電子還元物質である $O_2\cdot^-$ が重要な役割を果たすことが示唆された⁸⁶⁾。一方、LZD によるミトコンドリア機能障害により漏出する $O_2\cdot^-$ を介した細胞傷害が生じる場合は、細胞内スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) 1 は防御作用を示す可能性も考えられる。これらの知見は、細胞内 $O_2\cdot^-$ 濃度を調節する酵素 SOD 1 が LZD

による細胞障害に影響を及ぼす可能性を示唆する。それゆえ、第 3 章では LZD のヒト単球系細胞株 U937 に対する細胞傷害過程におけるミトコンドリア機能障害とアポトーシス死の関与について、さらに、この現象への細胞内 SOD 1 の役割について検討する。

第 2 節 方法

1. 試薬

LZD は Pfizer Inc. (Groton, CT, U.S.A.) より寄与された. RPMI Medium 1640 with L-glutamine and HEPES, Penicillin/Streptomycin, Alexa Fluor[®] 488, Donkey Anti-Mouse IgG, MitoTracker[®] Green FM, MitoSOX[®] Red, SOD1 Silencer Select Pre-designed siRNA は Life Technologies (Carlsbad, CA, U.S.A.) より, fetal bovine serum (FBS) は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, U.S.A.) より, Cell proliferation assay キットは Promega Co. (Madison, WI, U.S.A.) より, ウシ血清由来 albumin は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) より, Phosphate Buffered Salts (PBS) Tablets はタカラバイオ (株) (Kusatsu, Japan) より, GFP-Certified Apoptosis/Necrosis Detection Kit for microscopy and flow cytometry は Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, U.S.A.) より, Hoechst 33258 および Hoechst 33342 は同仁化学研究所 (株) (Kumamoto, Japan) より, anti GAPDH 抗体 (6C5) は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.) より, Mito PT JC1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'- tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) assay kit は Immuno Chemistry Technologies, LLC (Bloomington, IN, U.S.A.) より, anti-SOD 1 抗体は Gene Tex (Los Angeles, CA, U.S.A.) より, anti-Rabbit IgG 抗体 H&L Antibody Dylight 488 conjugated は, ROCKLAND Inc. (Limerick, PA, U.S.A.) より, INTERFERin siRNA Transfection Reagent はフナコシ株式会社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した. その他の試薬は市販特級品を用いた. 実験に用いた全ての溶液の調製は, Milli-Q 超純水製造装置 Academic-A10 (Merck Millipore Co., Darmstadt, Germany) によって精製した超純水を用いた.

2. 実験手順

2-1 細胞実験

ヒト単球系細胞株 U937 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.) より購入し, RPMI Medium 1640 with 25mM HEPES and L-glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin, 熱非働化 (56°C, 30 分) した 10% FBS から構成される培養液を用い, CO₂ インキュベーター MCO-175 (SANYO Electric Co. Ltd, Osaka, Japan) 内で 37°C, 5%CO₂, 95% 空気, 加湿下で培養した.

細胞障害は, 96well マイクロプレートの各 well に細胞 (1.0×10^5 cells/well) を播種し, 細胞培養液に溶解した各濃度 LZD を添加し, CO₂ インキュベーター内で 37°C, 24 時間インキュベートして誘導した. 細胞生存率は, Cell proliferation assay キットを用いた MTT 還元法によって評価した. 簡単に記述すると, 種々の条件下で処理した細胞を PBS で遠心洗浄 (200×g, 5 分間) し, 1 well あたりに Dye solution 7.5μL と PBS 50μL の混合溶液を添加して 37°C, 2 時間インキュベーションを行った後, Solubilization Solution/Stop Mix 50μL を加えて一晩インキュベーションした. サンプルをマイクロプレートリーダー model 680 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules) を用いて 570nm の吸光度を測定した. 細胞生存率 (%) は, コントロール細胞の MTT 還元能に対する LZD 処理群の還元能で表した. また, 同様な条件で細胞を LZD 処理した後, 1μg/mL Hoechst 33342 を含む細胞培養液 30μL で 30 分インキュベートして核を染色した後 PBS で洗浄し, Cytell Cell Imaging System (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire) を用いて細胞数の変化を測定した.

アポトーシス様細胞死は, 核の形態学的変化, ホスファチジルセリンの細胞膜表面への露出, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の核への局在性, および GFP-Certified Apoptosis/Necrosis Detection Kit による染色を指標とした. 細胞内 GAPDH の局在性は免疫蛍光染色法により確認した. 簡単に記述すると, 種々条件で処理した細胞を PBS で遠心洗浄後 (5 分間, 1000rpm), 室温で 30 分間 4% パラホルムアルデヒドで固定化を行い, さらに遠心洗浄後メタノール中 -20°C で 10 分間インキュベートした. 細胞を室温で 30 分間 3% FBS 液でブロッキングした後, 1% アルブミンで 1:400 に希釈したマウスモノクローナル IgG GAPDH Antibody 溶液と 1 時間インキュベートし, 遠心洗浄

後 1 : 500 に希釈した Alexa fluor[®] 488 donkey anti-mouse IgG と Hoechst 33258 の混合液で室温，暗所で 30 分間インキュベートした．遠心洗浄後(5 分間，1000rpm)，PBS に懸濁したサンプルを 35mm Glass Base Dish 上に付着させ，直ちに共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 LSM 700(Carl Zeiss, Baden-Württemberg, Germany) で観察した．

2 - 2 ミトコンドリア内膜電位，ミトコンドリア数，O₂[·] の生成

ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) は，蛍光カチオン性色素である JC-1 を用いて測定した．簡単に記述すると，96well プレートに播種した細胞 (1.0×10^6 cells/mL) を LZD で処理した後，PBS で遠心洗浄 (5 分間，1000rpm) し，ペレットを JC-1 溶液 500 μ L に懸濁して 37°C で 15 分間インキュベーションした．Mito PT JC1 assay buffer で遠心洗浄 (5 分間，1000rpm) し，PBS に懸濁した後，35mm Glass Base Dish 上に付着させ，直ちに共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡で観察した．ミトコンドリア数は，MitoTracker[®] Green FM を用い，ミトコンドリア内の O₂[·] の生成は MitoSOX[®] Red を用いた蛍光染色法で測定した．簡単に記述すると，96 well プレートに播種した細胞 (1.0×10^6 cells/mL) を LZD で処理した後，PBS で遠心洗浄 (5 分間，1000rpm) し上清を除去した．そのペレットに 1 μ g/mL Hoechst 33342 と共に 200nM MitoTracker[®] Green FM または 5.0 μ M MitoSOX[®] Red を含む細胞培養液 30 μ L を添加して懸濁後，室温で 30 分間または 10 分間インキュベーションした．再び PBS で遠心洗浄した後，100 μ L PBS に懸濁し，それぞれ Cytell Cell Imaging System を用いて測定して解析した．

2 - 3 SOD 1 ノックダウン

無血清培養液で siRNA を終濃度 40nM に希釈した調製液に INTERFERin を 5 μ L 添加したのち室温で 10 分間インキュベーションを行い INTERFERin/siRNA 複合体を形成させた．オーバーナイトでプレインキュベーションした U937 細胞 (1.0×10^6 cells/2mL/well) に INTERFERin/siRNA 複合体を添加し，72 時間インキュベーションし SOD 1 mRNA をノックダウンした．細胞内 SOD 1 含量は，上述した免疫蛍光染色法を用いて確認した．SOD 1 の一次抗体および二次抗体

Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) antibody Dylight 488 Conjugated は 1 : 250 に希釈して用いた。サンプルに含まれる SOD 1 タンパク質量に関連する二次抗体の蛍光強度は Cytell Cell Imaging System を用いて測定し、同時に行った核染色 Hoechst33258 の蛍光強度を用いて標準化して解析した。細胞生存率は、上述した MTT 還元法により評価した。

2 - 4 オートファジーの検出

オートファジーは Cyto-ID[®]Autophagy detection Kit を用いて染色した後、Cytell Cell Imaging System を用いて評価した。染色方法は、U937 細胞を種々条件下で処理した後、200 μ L の Assay Buffer で 2 回遠心洗浄後 (5 分間, 1000rpm), 培養液に 0.2% Cyto-ID[®]Green Detection Reagent と 0.1% Hoechst 33342 Nuclear Stain を混合した染色液 200 μ L を入れ, 30 分間室温でインキュベーションした。その後, 再度 200 μ L Assay Buffer で 1 回洗浄し, Assay Buffer (500 μ L/well) に懸濁した後, 35mm Glass Base Dish 上に付着させ, 直ちに共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡で観察した。Hoechst 33342 Nuclear Stain による核の蛍光検出には, Ex 390nm / Em 430nm, Cyto-ID[®]Green Detection Reagent によるオートファジー発現の検出は, Ex 473nm / Em 512.5nm の波長を用いた。

2 - 5 統計処理

測定値は, 少なくとも 3 回行った実験の平均値 \pm 標準偏差で表した。F 検定で分散検定後, Student-*t* 検定または Welch の *t* 検定, 3 群以上の検定には多重比較検定 (William 法) を用い, $p < 0.05$ を統計的有意とした。

第3節 結果

1. LZD 誘導細胞毒性

LZD による真核細胞への傷害の有無についてヒト単球系細胞 U937 を用いて検討した。U937 細胞を 1-4mM LZD で 24 時間処理すると、濃度依存的に生存率は 83-59% へと低下した (図 6 A)。また、細胞を 4mM LZD で処理すると、1-24 時間の処理時間に依存して生存率は 97-57% に低下した (図 6 B)。同条件下における LZD の細胞毒性作用を Hoechst 33342 による蛍光核染色による計数法で観察した場合、LZD 濃度とインキュベーション時間に依存して細胞数の減少が観察され (データに示さず)、MTT assay による生存率の減少とほぼ同じ結果が得られた。これらの結果から、LZD がヒト単球系細胞 U937 に細胞傷害を惹起することが明らかとなった。

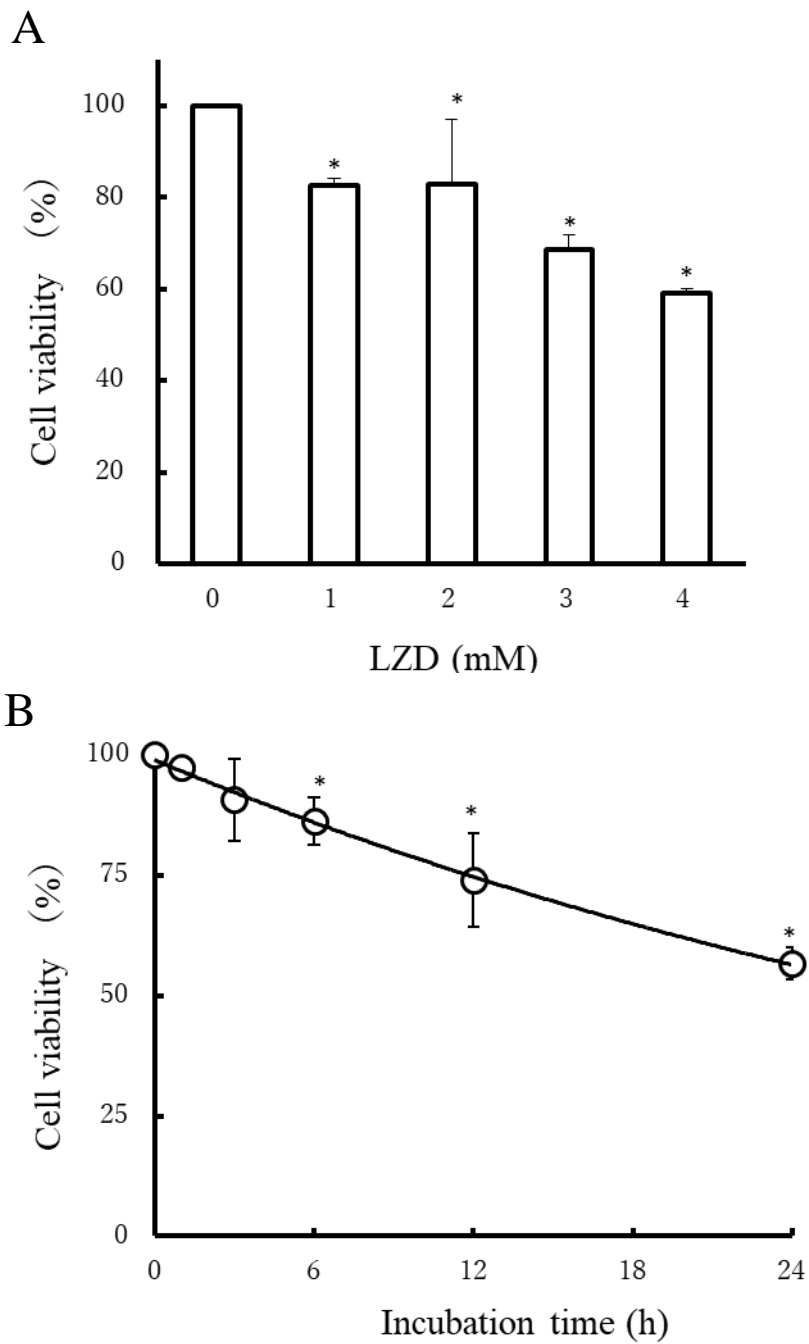


図 6 U937 細胞における LZD 誘導細胞毒性

(A)U937 細胞を 1, 2, 3, 4mM LZD で 24 時間処理, (B)4mM LZD で 1, 3, 6, 12, 24 時間処理した. 細胞生存率は MTT 環元法で測定した. データは 4 回の実験結果の mean±S.D. で示している. * $p < 0.05$:リネゾリドを添加しない細胞と比較した.

LZD による U937 細胞の細胞死に伴う変化を共焦点レーザースキャン顕微鏡像により観察した (図 7)。細胞質局在性酵素 GAPDH は、LZD 処理 12, 24 時間で核への部分的な移行が認められた。Hoechst 33258 による核の染色により、時間の経過とともに多核化細胞の増加と核小体の生成とみられる DNA の断片化が認められた。細胞膜統合性変化の指標である Annexin V-EnzoGold による膜成分ホスファチジルセリンの染色により、LZD 添加から 6 時間でわずかに、12 時間で明らかな蛍光強度の増加が確認された。一方、細胞膜非透過性物質 7-AAD-Red による核染色は、LZD 処理 6 時間後では認められず、12 時間でわずかに赤色の染色が観察された。これらの結果は、LZD で処理した U937 細胞は 6 時間以降にアポトーシス様細胞死が生じることを示唆した。

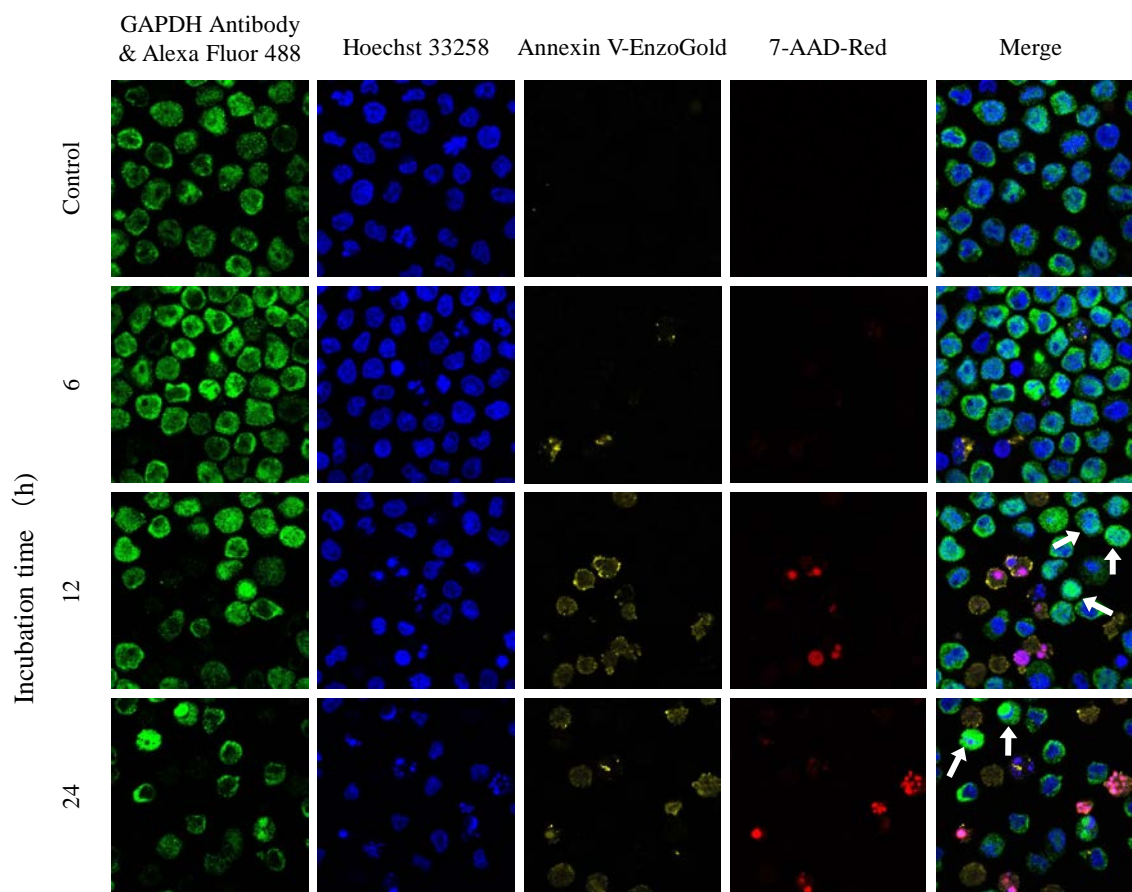


図 7 U937 細胞における LZD によるアポトーシスの誘導

U937 細胞に 4mM LZD を添加後, 6, 12, 24 時間処理し, 共焦点レーザー走査顕微鏡 (倍率 630 倍) で観察した. 細胞内 GAPDH を GAPDH Antibody と Alexa Fluor 488 (緑色), 核を Hoechst 33258 (青色), 細胞膜を Annexin V-EnzoGold (黄色), 膜透過性を 7-AAD-Red (赤色) で染色した. 同条件下における 4 回の実験の代表的画像を示す. 核内の GAPDH は矢印で示す.

図 8 には LZD によるオートファジーの誘導について検討した結果を示した。U937 細胞を LZD 4mM で 24 時間処理した場合、オートファジーの検出を示す緑色蛍光強度の変化は観察されず、オートファジーの発現は認められなかった (図 8 A)。一方、ポジティブコントロールであるラパマイシン処理により明らかなオートファジーの誘導が認められた (図 8 B)。また、オートファジー阻害剤 spautin-1 は LZD による細胞生存率の低下に対して有意な影響を及ぼさなかった (図 8 C)。これらの結果は、LZD による細胞障害にオートファジーは関与しないことを示唆した。

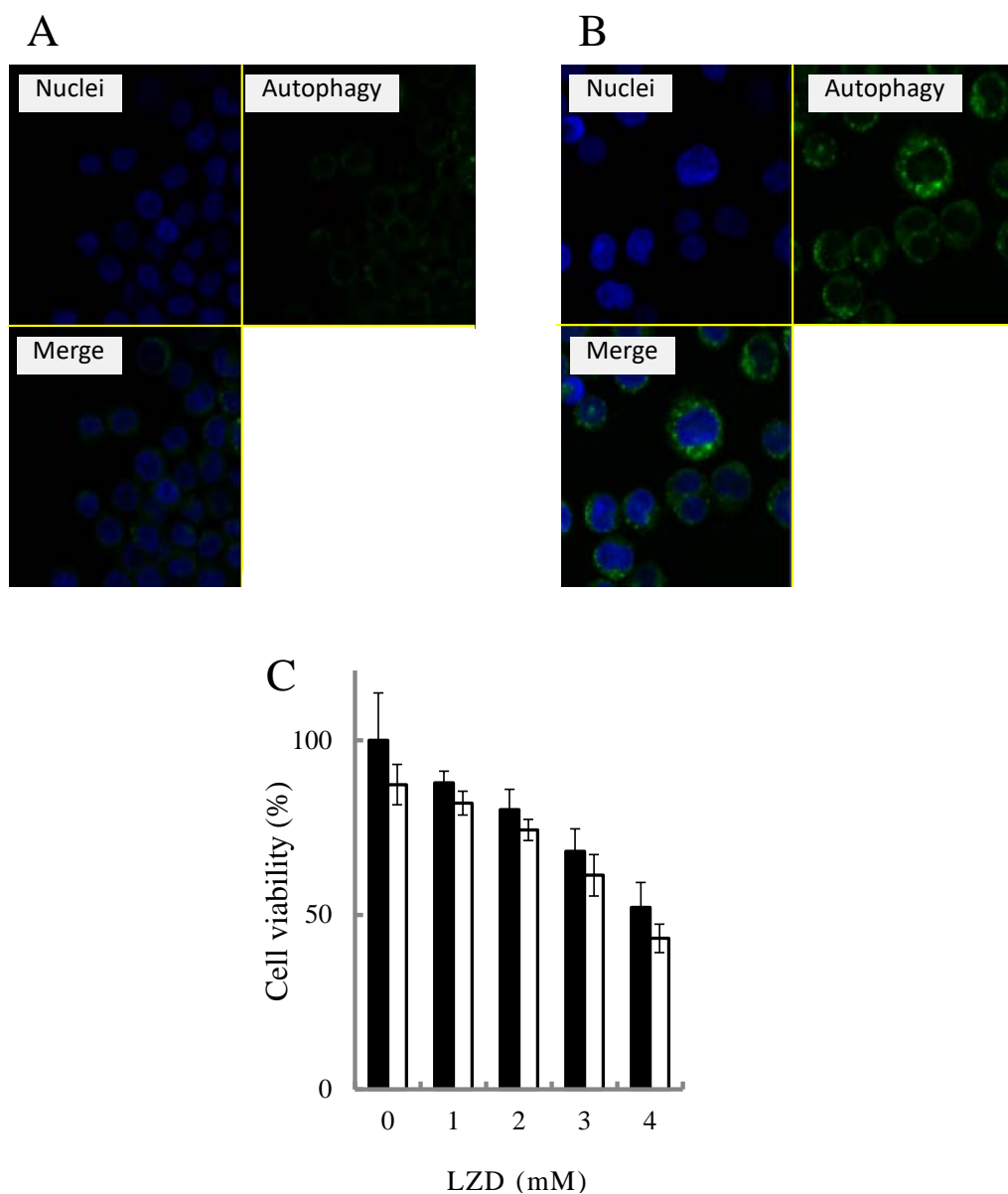


図 8 LZD によるオートファジーの誘導

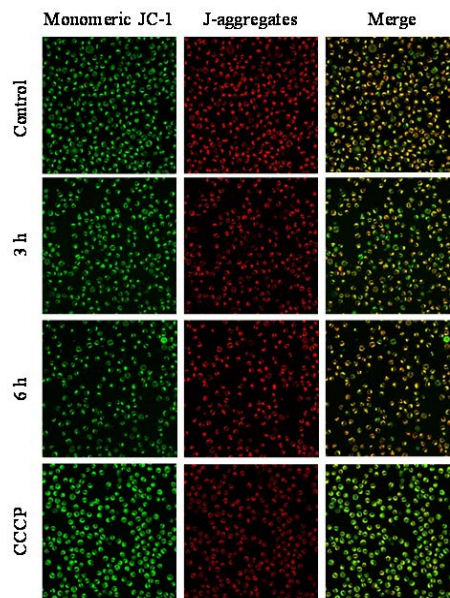
U937 細胞に 4mM LZD を添加 24 時間後 (A), または 0.1µM ラパマイシンを添加 18 時間後 (B), 共焦点レーザースキャン顕微鏡 (倍率 630 倍) で観察した. Hoechst 33342 (青色) 処理により核を, Cyto-ID® Autophagy detection Kit (緑色) を用いて染色した. オートファジーの発現のポジティブコントロールとしてラパマイシン処理細胞を用いた. 同条件下における実験を 4 回行い, 代表的画像を示す. (C) オートファジー阻害剤 10µM spautin-1 存在下, 細胞を 1, 2, 3, 4mM LZD で 24 時間処理し, 生存率を測定した.

■: control cells, □: + spautin-1.

2. ミトコンドリア機能障害

アポトーシスの誘導機構にミトコンドリア機能障害が関与する経路が存在することから⁸⁷⁾, LZD による U937 細胞のアポトーシス誘導にミトコンドリア機能障害が関与する可能性について検討した (図 9 A). コントロール細胞において, ミトコンドリア膜電位の構築を示す JC-1 の強い強度の赤色蛍光とその凝集が観察された. LZD 4mM で 3 または 6 時間処理した細胞において, 赤色蛍光強度の時間依存的な減少がみられ, LZD がミトコンドリア内膜電位の崩壊を 3 時間以内の短時間で引き起こすことが明らかとなった. ポジティブコントロールである脱共役剤 CCCP は直ちにミトコンドリア膜電位を低下させ, 赤色蛍光の顕著な減少が観察された. 一方, 種々濃度 LZD で 3 または 6 時間処理した場合, ミトコンドリア数の減少は認められなかった (図 9 B). これらの結果は, LZD がミトコンドリア内膜電位を容易に短時間で崩壊させるが, ミトコンドリア数には影響を及ぼさないことを示唆した.

A



B

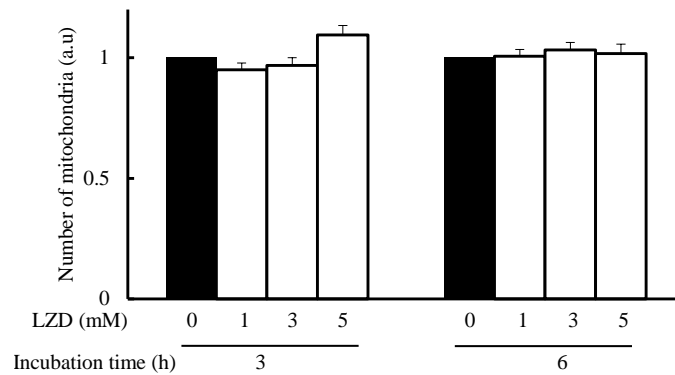


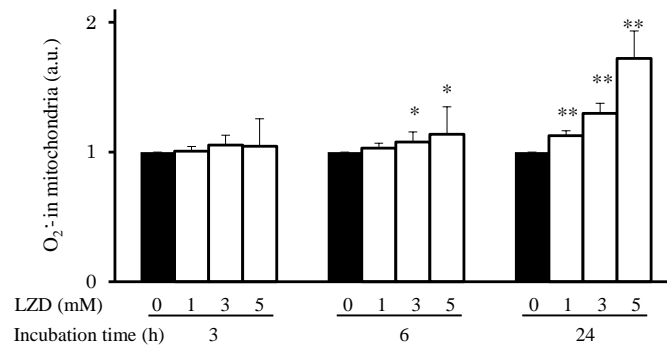
図 9 LZD のミトコンドリア機能への影響

(A) U937 細胞を 4mM LZD で 3, 6 時間処理後, ミトコンドリア膜電位を Mito PT JC1 assay kit 用いて染色した. ミトコンドリア膜電位は膜間空に集積した色素の J-aggregates (赤色) および細胞内に透過した Monomeric JC-1 (緑色) を共焦点レーザー顕微鏡 (倍率 200 倍) で観察し評価した. (B) U937 細胞を 1-5mM LZD で 3, 6 時間処理後, ミトコンドリア数は MitoTracker[®] Green FM を用いて, 方法に記載されているように検出した. データは 4 回の実験結果の mean±S.D. で示している.

3. LZD 誘導 $O_2\cdot^-$ の生成と細胞毒性作用に対する SOD 1 の影響

LZD で処理した U937 細胞における $O_2\cdot^-$ 生成についての実験結果を図 10 A に示した. U937 細胞を LZD で処理すると, 濃度とインキュベーション時間に依存してミトコンドリアにおける $O_2\cdot^-$ 生成量が増加し, 3 または 5mM LZD でインキュベーション 6 時間と, 1mM 以上 LZD でインキュベーション 24 時間において $O_2\cdot^-$ 生成量の増加に有意な差が認められた. LZD の細胞毒性作用に対する SOD 1 の関与について SOD 1 ノックダウン法を用いて検討した結果 (図 10 B), U937 細胞への SOD 1 の siRNA 導入は, 細胞生存率に有意な影響は及ぼさなかった. LZD 0-3mM で 24 時間処理した場合, コントロール細胞と同様に, SOD 1 ノックダウン細胞において LZD 濃度に依存して細胞生存率の低下が観察された. LZD 4mM で処理した場合, SOD 1 ノックダウン細胞においてわずかではあるが, コントロール細胞と比べて有意な生存率の上昇が認められた. なお, 細胞内 SOD 1 含量は, ノックダウン処理により 53.9% へ低下したが, 細胞生存率に有意な影響は及ぼさなかった (データに示さず). これらの結果は, 細胞内 SOD 1 が LZD の細胞毒性効果に部分的に関与することを示唆した.

A



B

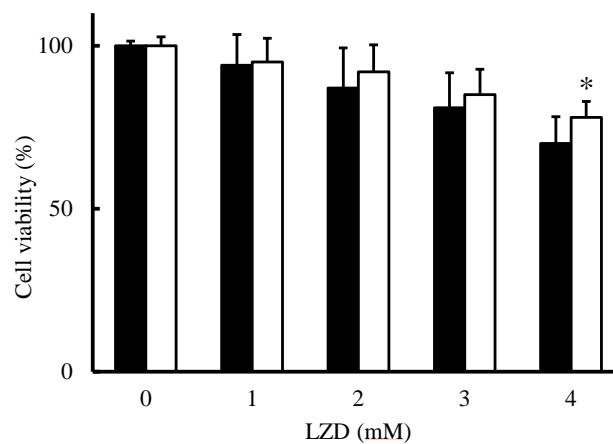


図 10 LZD 処理 U937 細胞における O₂^{·-} の生成および SOD 1 ノックダウンの細胞毒性への影響

(A) U937 細胞を 1-5mM LZD で 3, 6, 24 時間処理後, ミトコンドリアにおける O₂^{·-} の生成を MitoSOX[®] Red を用いて, 方法に記載されているように測定した. データは 3 回の実験結果の mean±S.D.で示している. **p* < 0.05: LZD 未処理 6 時間の細胞, ***p* < 0.05: LZD 未処理 24 時間の細胞と比較した. (B) U937 細胞を 5.0×10⁵ cells/mL に播種し, INTERFERin 5μL と 40nM siRNA で 72 時間処理して SOD 1 をノックダウンした. SOD 1 ノックダウン細胞に 0, 1, 2, 3, 4mM LZD を添加し, 24 時間処理後, MTT assay により細胞生存率を測定した. **p* < 0.05: 4mM LZD で処理したコントロール細胞の生存率と比較した.

■: control cells, □: SOD 1-knockdown cells

第 4 節 考察

LZD 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止し、タンパク質合成を抑制する^{64,65}。本研究で、ヒト単球系細胞株 U937 を LZD で処理するとミトコンドリアの内膜電位の崩壊、それに引き続いてアポトーシス様細胞死の誘導が確認された。ミトコンドリアへのストレス負荷により、膜電位崩壊と内膜透過性亢進が惹起された場合、シトクロム C が細胞質へ漏出し、引き続きシトクロム C, Apaf-1 とカスパーゼ-9 によるアポトソーム (apoptosome) 集合体が細胞質で形成される^{74,88,89}。この現象により活性化されたカスパーゼ-9 が下流の実行酵素カスパーゼ-3 を活性化し、細胞はアポトーシス様細胞死に至る。真核細胞における核 DNA の遺伝情報の翻訳に 80S リボソームが関与するが、ミトコンドリア DNA の翻訳にはミトコンドリア内に存在する 70S リボソームが用いられる。これらの知見は、LZD による U937 細胞へのアポトーシス様細胞死がミトコンドリア機能障害を介して誘導されることを示唆している。通常の生体内血中 LZD 濃度は平均 0.046mM、組織への移行率（組織/血漿濃度）は、肺胞被覆液は約 415%⁹⁰、髄液は 160%⁹¹、皮膚（炎症性水泡）は 104%⁹² で組織移行性が良好である。本実験結果は 1-4mM 高濃度 LZD、24 時間における結果であったが、過量投与や長期間の投与等により LZD の組織への蓄積および組織濃度が上昇すると高濃度の LZD が細胞内に局在することで、免疫細胞の傷害を含む血液毒性や神経障害などの有害事象の発現に関与する可能性が推察される。

本実験で示したように、LZD が U937 細胞にオートファジーを誘導しなかったことより、LZD 誘導アポトーシス様細胞死にオートファジーが関与しないことが示唆された。近年、オートファジーが細胞内で細菌の分解を含む殺菌過程に関与することから、免疫防御機構としても機能していることが報告された^{93,94}。本研究において LZD の細胞毒性作用にオートファジーの影響が観察されなかったことより、免疫機構におけるオートファジーの発現に対して LZD は影響を及ぼさない可能性が考えられる。

LZD は、ミトコンドリアにおける $O_2\cdot$ 生成を促進させ、24 時間後に $O_2\cdot$ 量の顕著な増大が認められた。ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応は、副産物

として ROS を生成させ、過剰な ROS 生成はミトコンドリア機能障害を増大させる^{95,96)}。細胞質局在性酵素 SOD 1 をノックアウトしたマウスより分離したミトコンドリアにおいて、ROS 生成量は増大してミトコンドリア機能障害が増大することが報告されている^{97,98)}。本実験で示したように、4 mM LZD 処理による細胞死は、SOD 1 ノックダウン U937 細胞において、部分的に軽減された。これらの知見は、LZD 処理により生成する O_2^- は細胞障害を惹起すること、また細胞質に多量に O_2^- が存在した場合には LZD による細胞障害に対してむしろ防御的に作用する可能性を示唆した。LZD の未変化体は体内において活性化化合物であり、肝ミクロゾームにおいて不活性体モルホリン環開裂カルボン酸化合物へと代謝され、尿中へ排泄される。代謝研究において、LZD の酸化的代謝物の生成に ROS が関与する非酵素的反応で進行することが提唱された⁸⁶⁾。本研究において、SOD 1 をノックダウンすると、LZD による細胞死誘導が有意に防御された。これらの知見を考え合わせると、SOD 1 による細胞内 O_2^- 濃度の低下は、未変化体 LZD の酸化的代謝を阻害して毒性作用を増大させる可能性が推定される。

本研究において、LZD が単球系細胞株 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を示した。細菌感染時において活性化マクロファージは異物の貪食に伴い形質膜形態変化と NADPH oxidase の活性化が生じ、非ミトコンドリア性シアン耐性酸素吸収が増加する⁹⁹⁾。LZD は O_2^- により酸化的に代謝されることから⁸⁶⁾、活性化マクロファージにおいて LZD の代謝が促進され、LZD の細胞毒性作用は軽減されることが推定される。一方、本研究では、LZD がミトコンドリアからの活性酸素生成を増加させることを示した。この酸化ストレスに対してミトコンドリア局在性の SOD 2 が防御的に関与することが推定される。免疫細胞の貪食過程における LZD 代謝と O_2^- の相互作用における SOD 1 の役割について、また LZD によるミトコンドリア内の O_2^- 生成と機能障害に対する SOD 2 の役割について、さらに詳細に検討する必要がある。臨床的観点から、LZD の他の作用として LZD 誘導体が前立腺がん株 DU145 にアポトーシス様細胞死を介して抗腫瘍作用を示すことが実証された¹⁰⁰⁾。また、モノアミン酸化酵素阻害作用を有すること¹⁰¹⁾、LZD がサイトカインの産生抑制作用を有すること¹⁰²⁾、抗炎症作用を有することが提唱され

ている¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾。今後、LZD の薬理作用発現におけるミトコンドリア機能と SOD 1 の役割を明らかにすることは、LZD の有害事象の発生の抑制やいくつかの疾患の治療法の開発に有用となる可能性がある。

総括

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。抗菌薬関連の有害事象は入院患者において共通して発現しやすく、抗菌薬を適正に使用することで有害事象を回避することができる¹⁰⁷⁾。VCM および LZD 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 VCM トラフ濃度を 20 μ g/mL 以下にコントロールする必要があり、「抗菌薬 TDM ガイドライン」⁹⁾の推奨血中トラフ濃度を支持する。LZD は VCM 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^{48,63)}こと、抗炎症作用を有する¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾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、LZD による治療を推奨する。一方、日本人における LZD 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、LZD 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、LZD は、アポトーシス性細胞死を誘導すること、さらに LZD 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。LZD 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、LZD 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 LZD 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。

謝辞

本研究に際し，終始懇切なるご指導，ご鞭撻を賜りました北海道薬科大学 桜井光一 教授に深甚なる謝意を表します．さらに有益なご助言とご指導を賜りました佐藤久美 教授，佐藤秀紀 教授，村岡早苗 准教授，に深く感謝致します．また，本研究の機会を与えて頂き，終始ご支援を賜りました札幌医科大学附属病院薬剤部 宮本篤 部長，野田師正 副部長，中田浩雅 主任技師，木明智子 主任技師に深謝いたします．さらに，本研究に際し，終始ご支援を賜りました札幌医科大学医学部 高橋聡 教授，北海道医療大学 唯野貢司 客員教授，中村記念南病院薬剤科 山澤裕司 科長に心より御礼申し上げます．最後に本研究の実施にあたりご協力頂きました中村記念南病院 薬剤科 山田和範 主任，札幌医科大学附属病院薬剤部 国本雄介 係長，牧野新輝氏，北海道薬科大学大学院 稲村明洋 氏，新田侑生 氏，薬学部 山口淳仁 氏，斉藤章紗 氏に感謝いたします．

参考文献

1. 紺野 昌俊: 抗菌薬の開発と薬剤耐性菌の歴史, 日本臨床微生物学雑誌, **14**, 1-24, 2004
2. CDC: ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013
[<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>]
(accessed 2017-11-23)
3. IDSA: Antibiotic Resistance Fact Sheet, 2013
[<http://www.idsociety.org/AntibioticResistanceFactSheet-April2013.pdf>]
(accessed 2017-11-23)
4. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS, the O'Neill Commission, UK, 2016
[https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf] (accessed 2017-11-23)
5. WHO: Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance, 2014
[http://www.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1] (accessed 2017-11-23)
6. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議: 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン(2016-2020), 2016
[<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>] (accessed 2017-11-23)

7. 厚生労働省:院内感染対策サーベイランス検査部門公開情報(2016年報), 2017
[https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2016/3/1/ken_Open_Report_201600.pdf] (accessed 2017-11-23)
8. 公益社団法人日本化学療法学会, 一般社団法人日本感染症学会: MRSA 感染症の治療ガイドライン—2017年改訂版, 杏林舎, 東京, 2017
9. 公益社団法人日本化学療法学会, 一般社団法人日本 TDM 学会: 抗菌薬 TDM ガイドライン改訂版, 杏林舎, 東京, 2017
10. 藤居 賢, 吉岡 薫, 國本 雄介, 清治 翔伍, 桧山 佳樹, 高橋 聡, 舛森 直哉, 宮本 篤: 抗菌化学療法認定薬剤師の役割と病棟専従薬剤師への支援—泌尿器科領域—, 日本化学療法学会雑誌, **65**, 564-567, 2017
11. 8学会合同抗微生物薬適正使用推進検討委員会: 抗菌薬の適正使用に向けた8学会提言「抗菌薬適正使用支援(Antimicrobial Stewardship ; AS)プログラム推進のために」, 日本化学療法学会雑誌, **64**, 379-385, 2016
12. 8学会合同抗微生物薬適正使用推進検討委員会: 抗菌薬適正使用支援プログラム実践のためのガイダンス, 日本化学療法学会雑誌, **65**, 650-687, 2017
13. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM: Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*, **44**, 159-177, 2007

14. 佐藤 秀紀, 牧野 あずさ, 瀧ヶ平 雄介, 石田 佐知子, 和田 佳子, 廣畑 多恵, 山田 和範, 藤居 賢, 風間 正人, 唯野 貢司: 2施設間の呼吸器内科における抗菌薬の使用状況および耐性菌検出率の算出, 日本病院薬剤師会雑誌, **43**, 653-656, 2007
15. 山田 和範, 藤居 賢, 佐藤 秀紀, 唯野 貢司, 福井 正人, 藤井 亮, 河内 邦仁, 山澤 裕司: 市販データベースソフトを利用した抗菌薬適正使用支援ソフトの開発, 日本病院薬剤師会雑誌, **43**, 105-108, 2007
16. CDC NNIS System: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, *Am J Infect Control*, **32**, 470-485, 2004
17. Müller-Pebody B, Muscat M, Pelle B, Klein BM, Brandt CT, Monnet DL: Increase and change in pattern of hospital antimicrobial use, Denmark, 1997-2001, *J Antimicrob Chemother*, **54**, 1122-1126, 2004
18. P. M. G. Filius, T. B. Y. Liem, P. D. van der Linden, R. Janknegt, S. Natsch, A. G. Vulto, H. A. Verbrugh: An additional measure for quantifying antibiotic use in hospitals, *J Antimicrob Chemother*, **55**, 805-808, 2005
19. 室 高広, 秀島 里沙, 中村 権一, 神村 英利: 抗 MRSA 薬および carbapenem 系抗菌薬適正化の試み, 日本化学療法学会雑誌, **54**, 511-519, 2006
20. 植田 貴史, 竹末 芳生, 中嶋 一彦, 一木 薫, 土井田 明弘, 和田 恭直, 土田 敏恵, 高橋 佳子, 石原 美佳, 木村 健: 抗 MRSA 薬における antimicrobial usage density —自施設における使用状況の評価—, 日本化学療法学会雑誌, **63**, 411-418, 2015

21. 霜島 正浩: 各都道府県から分離された新鮮臨床分離株 76 万株の各種抗菌薬に対する感受性検査成績, 診療と新薬, **42**, 980-1035, 2005
22. 栃倉 尚広, 鍋木 盛雄, 山舘 周恒, 本石 寛行, 林 国樹: カルバペネム系抗菌薬の使用と緑膿菌の薬剤耐性, 日本環境感染学会誌, **24**, 195-201, 2009
23. 宮崎 博章, 抗菌薬制限下における緑膿菌の薬剤感受性の推移, 感染症学雑誌, **82**, 6-13, 2008
24. 小口 正義, 藤森 愛子, 小口 はるみ, 跡部 治, 両角 和雄, 今井 美雪, 藤森 洋子, 蜂谷 勤, 落合 二葉: カルバペネム系抗菌薬の 1 日投与回数と緑膿菌感受性の関係, 日本病院薬剤師会雑誌, **44**, 1537-1540, 2008
25. 鴨志田 聡, 篠原 由憲, 和泉 裕一, 樗木 智聡, 長峯 裕二, 福田 光司, 菊池 充, 下村 昌史: Antimicrobial Use Density 値変動が及ぼす薬剤感受性への影響の調査, 日本病院薬剤師会雑誌, **47**, 553-557, 2011
26. 梅村 拓巳, 望月 敬浩, 村木 優一, 片山 歳也, 滝 久司, 大曲 貴夫, 山岸 由佳, 三鴨 廣繁, 森 健: Anatomical Therapeutic Chemical Classification/Defined Daily Dose System を利用した注射用抗菌薬の使用量と緑膿菌耐性率, 日本環境感染学会誌, **25**, 376-382, 2010
27. 吉田 勇, 木村 美司, 東山 伊佐夫, 杉森 義一, 山野 佳則: 各抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランスー2000 年分離グラム陽性球菌および嫌気性菌に対する抗菌力ー, 日本化学療法学会雑誌, **51**, 179-208, 2003
28. 吉田 勇, 杉森 義一, 東山 伊佐夫, 木村 美司, 山野 佳則: 各抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランスー2000 年分離グラム陰性菌に対する抗菌力ー, 日本化学療法学会雑誌, **51**, 209-231, 2003

29. メロペン特別調査(全国感受性調査)研究会: Meropenem を含む各種抗菌薬に対する2004臨床分離株の感受性サーベイランス: *THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, **58**, 655-689, 2004
30. 日本病院薬剤師会編集 : 薬剤師のための感染制御マニュアル 第3版, 薬事日報社, 東京, 2011
31. 山田 和範, 齊藤 嘉津彦, 藤居 賢, 藤田 敏広, 宮本 剛典, 黒沼 博史, 大江 利治, 本郷 文教, 佐藤 秀紀, 唯野 貢司, 武田 清孝: 札幌病院薬剤師会における感染制御専門薬剤師セミナーに関するアンケート調査ーセミナー参加者の背景と意識についてー, 医薬品情報学 JASDI 会誌, **10**, 60-67, 2008
32. Moellering RC Jr: Vancomycin: a 50-year reassessment, *Clin Infect Dis*, **42** (suppl 1), S3-4, 2006
33. Levine DP: Vancomycin: a history, *Clin Infect Dis*, **42** (suppl 1), S5-12, 2006
34. Attassi K, Hershberger E, Alam R, Zervos MJ: Thrombocytopenia associated with linezolid therapy, *Clin Infect Dis*, **34**, 695-698, 2002
35. Lu PL, Wang JT, Chen CJ, Chen WC, Chen TC, Hwang YC, Chang SC: Compassionate use of linezolid for adult Taiwanese patients with bone and joint infections, *Chemotherapy*, **56**, 429-435, 2010
36. 小野 麻里子, 海老原 卓志, 岩田 敏, 木津 純子: Linezolid の使用状況と有効性・安全性の検討, 日本化学療法学会雑誌, **59**, 163-171, 2011

37. Kunimoto Y, Ikeda H, Fujii S, Kitagawa M, Yamazaki K, Nakata H, Noda N, Ishida T, Miyamoto A: Plasma tenofovir trough concentrations are associated with renal dysfunction in Japanese patients with HIV infection: a retrospective cohort study, *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, **2** (22), 2016, Published online (DOI 10.1186/s40780-016-0056).
38. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R Jr, Craig W, Billeter M, Dalovisio JR, Levine DP: Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists, *Am J Health Syst Pharm*, **66**, 82-98, 2009
39. Evan J Begg, Murray L Barclay, Carl M J Kirkpatrick: The therapeutic monitoring of antimicrobial agents, *Br J Clin Pharmacol*, **52** (suppl 1), S35-43, 2001
40. Suzuki Y, Kawasaki K, Sato Y, Tokimatsu I, Itoh H, Hiramatsu K, Takeyama M, Kadota J: Is peak concentration needed in therapeutic drug monitoring of vancomycin? A pharmacokinetic- pharmacodynamic analysis in patients with methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Chemotherapy*, **58**, 308-312, 2012
41. Brier ME, Stalker DJ, Aronoff GR, Batts DH, Ryan KK, O'Grady M, Hopkins NK, Jungbluth GL: Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction, *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2775-2780, 2003
42. Lin YH, Wu VC, Tsai IJ, Ho YL, Hwang JJ, Tsau YK, Wu CY, Wu KD, Hsueh PR: High frequency of linezolid-associated thrombocytopenia among patients with renal insufficiency, *Int J Antimicrob Agents*, **28**, 345-351, 2006

43. Wu VC, Wang YT, Wang CY, Tsai IJ, Wu KD, Hwang JJ, Hsueh PR: High frequency of linezolid-associated thrombocytopenia and anemia among patients with end-stage renal disease, *Clin Infect Dis*, **42**, 66-72, 2006
44. Takahashi Y, Takesue Y, Nakajima K, Ichiki K, Tsuchida T, Tatsumi S, Ishihara M, Ikeuchi H, Uchino M: Risk factors associated with the development of thrombocytopenia in patients who received linezolid therapy, *J Infect Chemother*, **17**, 382-387, 2011
45. Stevens DL, Herr D, Lampiris H, Hunt JL, Batts DH, Hafkin B, the Linezolid MRSA Study Group: Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clin Infect Dis*, **34**, 1481-1490, 2002
46. Wunderink RG, Rello J, Cammarata SK, Croos-Dabrera RV, Kollef MH: Linezolid vs. vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia, *Chest*, **124**, 1789-1797, 2003
47. Walkey AJ, O'Donnell MR, Wiener RS: Linezolid vs. glycopeptide antibiotics for the treatment of suspected methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Chest*, **139**, 1148-1155, 2011
48. Wunderink RG, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, McGee WT, Reisman A, Chastre J: Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study, *Clin Infect Dis*, **54**, 621-629, 2012

49. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A; Collaborators developing the Japanese equation for estimated GFR: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan, *Am J Kidney Dis*, **53**, 982-992, 2009
50. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, *Am J Kidney Dis*, **39** (2 suppl 1), S1-S266, 2002
51. Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, Langer C, Murphy B, Cumberlin R, Coleman CN, Rubin P: CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment, *Semin Radiat Oncol*, **13**, 176-181, 2003
52. Kullar R, Davis SL, Levine DP, Rybak MJ: Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets, *Clin Infect Dis*, **52**, 975-981, 2011
53. Wong-Beringer A, Joo J, Tse E, Beringer P: Vancomycin-associated nephrotoxicity: a critical appraisal of risk with high-dose therapy, *Int J Antimicrob Agents*, **37**, 95-101, 2011
54. Lodise TP, Patel N, Lomaestro BM, Rodvold KA, Drusano GL, Relationship between initial vancomycin concentration-time profile and nephrotoxicity among hospitalized patients, *Clin Infect Dis*, **49**, 507-514, 2009

55. Jeffres MN, Isakow W, Doherty JA, Micek ST, Kollef MH: A retrospective analysis of possible renal toxicity associated with vancomycin in patients with health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia, *Clin Ther*, **29**, 1107-1115, 2007
56. van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP: Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter, *Antimicrob Agents Chemother*, **57**, 734-744, 2013
57. Rodriguez Colomo O, Álvarez Lerma F, González Pérez MI, Sirvent JM, García Simón M; Study Group of Infection in Critical Patients: Impact of administration of vancomycin or linezolid to critically ill patients with impaired renal function, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **30**, 635-643, 2011
58. Gerson SL, Kaplan SL, Bruss JB, Le V, Arellano FM, Hafkin B, Kuter DJ: Hematologic effects of linezolid: summary of clinical experience, *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2723-2726, 2002
59. Niwa T, Watanabe T, Suzuki A, Ohmori T, Tsuchiya M, Suzuki T, Ohta H, Murakami N, Itoh Y: Reduction of linezolid-associated thrombocytopenia by the dose adjustment based on the risk factors such as basal platelet count and body weight, *Diagn Microbiol Infect Dis*, **79**, 93-97, 2014
60. Matsumoto K, Takeda Y, Takeshita A, Fukunaga N, Shigemi A, Yaji K, Shimodozono Y, Yamada K, Ikawa K, Morikawa N: Renal function as a predictor of linezolid-induced thrombocytopenia, *Int J Antimicrob Agents*, **33**, 98-99, 2009

61. Matsumoto K, Takeshita A, Ikawa K, Shigemi A, Yaji K, Shimodozono Y, Morikawa N, Takeda Y, Yamada K: Higher linezolid exposure and higher frequency of thrombocytopenia in patients with renal dysfunction, *Int J Antimicrob Agents*, **36**, 179-181, 2010
62. Tsuji Y, Hiraki Y, Matsumoto K, Mizoguchi A, Kobayashi T, Sadoh S, Morita K, Kamimura H, Karube Y: Thrombocytopenia and anemia caused by a persistent high linezolid concentration in patients with renal dysfunction, *J Infect Chemother*, **17**, 382-387, 2011
63. Yue J, Dong BR, Yang M, Chen X, Wu T, Liu GJ: Linezolid versus vancomycin for skin and soft tissue infections, *Cochrane Database Syst Rev*, **(1)**, CD008056, 2007
64. Shinabarger D: Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents, *Expert Opin Investig Drugs*, **8**, 1195-1202, 1999
65. Aoki H, Ke L, Poppe SM, Poel TJ, Weaver EA, Gadwood RC, Thomas RC, Shinabarger DL, Ganoza MC: Oxazolidinone Antibiotics Target the P Site on *Escherichia coli* Ribosomes, *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 1080-1085, 2002
66. Fujii S, Takahashi S, Makino S, Kunimoto Y, Nakata H, Noda N, Sakurai K, Miyamoto A: Impact of vancomycin or linezolid therapy on development of renal dysfunction and thrombocytopenia in japanese patients, *Chemotherapy*, **59**, 319-324, 2013
67. Saijo T, Hayashi K, Yamada H, Wakakura M: Linezolid-induced optic neuropathy, *Am J Ophthalmol*, **139**, 1114-1116, 2005

68. Li CH, Cheng YW, Liao PL, Yang YT, Kang JJ: Chloramphenicol causes mitochondrial stress, decreases ATP biosynthesis, induces matrix metalloproteinase-13 expression, and solid-tumor cell invasion, *Toxicol Sci*, **116**, 140-150, 2010
69. Palenzuela L, Hahn NM, Nelson RP Jr, Arno JN, Schobert C, Bethel R, Ostrowski LA, Sharma MR, Datta PP, Agrawal RK, Schwartz JE, Hirano M: Does linezolid cause lactic acidosis by inhibiting mitochondrial protein synthesis?, *Clin Infect Dis*, **40**, e113-e116, 2005
70. Korge P, Calmettes G, John SA, Weiss JN: Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III, *J Biol Chem*, **292**, 9896-9905, 2017
71. Hausenloy DJ, Yellon DM: Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J Clin Invest*, **123**, 92-100, 2013
72. Sakurai K, Cederbaum AI: Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitriilotriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1, *Mol Pharmacol*, **54**, 1024-1035, 1998
73. Kumarswamy R, Seth RK, Dwarakanath BS, Chandna S: Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: Evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells, *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 1430-1440, 2009
74. El Maadidi S, Faletti L, Berg B, Wenzl C, Wieland K, Chen ZJ, Maurer U, Borner C: A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis, *J Immunol*, **192**, 1171-1183, 2014

75. Ichimura T, Ito M, Takahashi K, Oyama K, Sakurai K: Involvement of mitochondrial swelling in cytochrome c release from mitochondria treated with calcium and Alloxan, *J Biophys Chem*, **2**, 10-18, 2011
76. Jacobson MD, Raff MC, Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen: *Nature*, **374**, 814-816, 1995
77. Buccellato LJ, Tso M, Akinci OI, Chandel NS, Budinger GR: Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells, *J Biol Chem*, **279**, 6753-6760, 2004
78. Kaul A, Overmeyer JH, Maltese WA: Activated Ras induces cytoplasmic vacuolation and non-apoptotic death in glioblastoma cells via novel effector pathways, *Cell Signal*, **19**, 1034-1043, 2007
79. Bhanot H, Young AM, Overmeyer JH, Maltese WA: Induction of non-apoptotic cell death by activated Ras requires inverse regulation of Rac1 and Arf6, *Mol Cancer Res*, **8**, 1358-1374, 2010
80. Wu DJ, Adamopoulos IE: Autophagy and autoimmunity, *Clinical Immunology*, **76**, 55-62, 2017
81. Kumar D, Shankar S, Srivastava RK: Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Cancer Lett*, **343**, 179-189, 2014

82. Chang YP, Tsai CC, Huang WC, Wang CY, Chen CL, Lin YS, Kai JI, Hsieh CY, Cheng YL, Choi PC, Chen SH, Chang SP, Liu HS, Lin CF: Autophagy Facilitates IFN-gamma-induced Jak2-STAT1 Activation and Cellular Inflammation, *J Biol Chem*, **285**, 28715-28722, 2010
83. Nancy RG: Autophagy for Inflammation, *Sci Signal*, **3**, ec277, 2010
84. Levine B, Elazar Z: Inheriting Maternal mtDNA, *Science*, **334**, 1069-1070, 2011
85. Slatter JG, Stalker DJ, Feenstra KL, Welshman IR, Bruss JB, Sams JP, Johnson MG, Sanders PE, Hauer MJ, Fagerness PE, Stryd RP, Peng GW, Shobe EM: Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of [¹⁴C] linezolid to healthy human subjects, *Drug Metab Dispos*, **29**, 1136-1145, 2001
86. Wynalda MA, Hauer MJ, Wienkers LC: Oxidation of the novel oxazolidinone antibiotic linezolid in human liver microsomes, *Drug Metab Dispos*, **28**, 1014-1017, 2000
87. Zhang D, Lu C, Whiteman M, Chance B, Armstrong JS: The mitochondrial permeability transition regulates cytochrome c release for apoptosis during endoplasmic reticulum stress by remodeling the cristae junction, *J Biol Chem*, **66**, 3476-3486, 2008
88. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, **90**, 405-413, 1997
89. Yuan S, Akey CW: Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation, *Structure*, **21**, 501-515, 2013

90. Conte JE Jr, Golden JA, Kipps J, Zurlinden E: Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid, *Antimicrob. Agents Chemother*, **46**, 1475-1480, 2002
91. Villani P, Regazzi MB, Marubbi F, Viale P, Pagani L, Cristini F, Cadeo B, Carosi G, Bergomi R: Cerebrospinal fluid linezolid concentrations in postneurosurgical central nervous system infections, *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 936-937, 2002
92. Gee T, Ellis R, Marshall G, Andrews J, Ashby J, Wise R: Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses, *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1843-1846, 2001
93. Johansen T, Lamark T: Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins, *Autophagy*, **7**, 279-296, 2011
94. Chang SY, Lee SN, Yang JY, Kim DW, Yoon JH, Ko HJ, Ogawa M, Sasakawa C, Kweon MN: Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: A murine model, *PLoS ONE*, **8**, e81095, 2013
95. Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, **82**, 47-95, 2002
96. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann Rev Biochem*, **58**, 79-110, 1989
97. Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H: Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**, R1159-1168, 2007

98. Jang YC, Lustgarten MS, Liu Y, Muller FL, Bhattacharya A, Liang H, Salmon AB, Brooks SV, Larkin L, Hayworth CR, Richardson A, Van Remmen H: Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration, *FASEB J*, **24**, 1376-1390, 2010
99. Gomez-Mejiba SE, Zhai Z, Della-Vedova MC, Muñoz MD, Chatterjee S, Towner RA, Hensley K, Floyd RA, Mason RP, Ramirez DC: Immuno-spin trapping from biochemistry to medicine: advances, challenges, and pitfalls. Focus on protein-centered radicals, *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 722-729, 2014
100. Naresh A, Venkateswara Rao M, Kotapalli SS, Ummanni R, Venkateswara Rao B: Oxazolidinone derivatives: Cytozone-Linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells, *Eur J Med Chem*, **80**, 295-307, 2014
101. Jones TZ, Fleming P, Eyermann CJ, Gravestock MB, Ramsay RR: Orientation of oxazolidinones in the active site of monoamine oxidase, *Biochem Pharmacol*, **70**, 407-416, 2005
102. Takahashi G, Sato N, Yaegashi Y, Kojika M, Matsumoto N, Kikkawa T, Shozushima T, Akitomi S, Aoki K, Ito N, Hoshikawa K, Suzuki Y, Inoue Y, Wakabayashi G, Endo S: Effect of linezolid on cytokine production capacity and plasma endotoxin levels in response to lipopolysaccharide stimulation of whole blood, *J Infect Chemother*, **16**, 94-99, 2010
103. Matsumoto K, Obara S, Kuroda Y, Kizu J: Anti-inflammatory effects of linezolid on carrageenan-induced paw edema in rats, *J Infect Chemother*, **21**, 889-891, 2015

104. Diep BA, Equils O, Huang DB, Gladue R: Linezolid effects on bacterial toxin production and host immune response: review of the evidence, *Curr Ther Res Clin Exp*, **73**, 86-102, 2012
105. Bhan U, Podsiad AB, Kovach MA, Ballinger MN, Keshamouni V, Standiford TJ: Linezolid has unique immunomodulatory effects in post-influenza community acquired MRSA pneumonia, *PLoS ONE*, **10**, e0114574, 2015
106. Yoshizawa S, Tateda K, Saga T, Ishii Y, Yamaguchi K: Virulence-suppressing effects of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible contribution to early defervescence, *Antimicrob Agents Chemother*, **56**, 1744-1748, 2012
107. Tamma PD, Avdic E, Li DX, Dzintars K, Cosgrove SE: Association of adverse events with antibiotic use in hospitalized patients, *JAMA Intern Med*, **177**, 1308-1315, 2017