

指導教授氏名	指導役割
大原 直也 印	研究計画に関わる全般的な指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 口腔微生物学	身分 大学院生	氏名 小崎 弘貴
論文題名 非結核性抗酸菌の薬剤排出能に関する検討		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【緒言】</p> <p>近年、非結核性抗酸菌（non-tuberculous mycobacteria: NTM）による感染症は増加している。非結核性抗酸菌症（NTM 症）は日和見感染症のように発症することが多いが、多くの抗結核薬に抵抗性を示すことや、治療に結核症よりも長期間を有することから問題となっている。さらに薬剤耐性株の存在や、感受性試験の結果と治療効果が相関しない乖離症例が散見されることで、NTM 症の標準治療法の確立を困難にしている。NTM 症は肺に症状を現すことが多いが、顎顔面領域にも症状を呈することがあり、歯科領域においても無視できない疾患である。ところで NTM が多剤に対して感受性が低い機構は明らかではない。細菌が多剤に耐性を示す場合、薬剤排出ポンプが関係することがある。そのため、NTM の薬剤耐性における薬剤の取込み能と排出能の関与を明らかにすることを目的とし、エチジウムブロマイド（ethidium bromide: EtBr）を用いて NTM 臨床分離株の薬剤取込み能と排出能を評価することを試みた。</p> <p>【材料・方法】</p> <p>1. 供試菌株</p> <p>独立行政法人国立病院機構刀根山病院において肺 <i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC) 症と診断された患者から分離された、<i>M. avium</i> 9 株 (OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889、S1、S2、S3、S8) と <i>Mycobacterium intracellulare</i> 1 株 (OCU963) の計 10 株を実験に供した。OCU855、OCU867、OCU873、OCU881、OCU889、および OCU963 は病態が進行型の患者由来で、S1、S2、S3、S8 は病態が安定型の患者由来であった。また、<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> 104 株 (MAH104) を対照株として用いた。</p> <p>2. 薬剤取込み実験</p> <p>供試菌液に EtBr を終濃度 5 µg/mL となるように添加し、その蛍光強度の変化を経時的に測定することで行った。なお、測定開始時における菌数は 0.5×10^7 個/mL となるように調整した。また蛍光測定の励起波長は 510 nm、測定波長は 590 nm とした。</p> <p>3. 薬剤排出実験</p> <p>はじめに 0.5×10^7 個/mL の供試菌液 0.8 mL に終濃度 5 µg/mL となるように EtBr を添加し、4 時間曝露させることによって EtBr を菌体に取り込ませた。その後、遠心分離を行うことにより培地を除き、菌体をグルコース溶液（終濃度 0.4%）に再懸濁し、EtBr 非存在下において蛍光強度の変化を経時的に測定した。なお、励起波長と測定波長は薬剤取込み実験と同じとした。</p> <p>4. 薬剤取込みと薬剤排出における各タイプの排出ポンプの関与</p> <p>4 種類の薬剤排出ポンプ阻害剤（efflux pump inhibitor : EPI）、reserpine、verapamil、carbonyl cyanide <i>m</i>-chlorophenylhydrazone (CCCP)、および chlorpromazine (CPZ) を用いて上記の薬剤取込み実験と薬剤排出実験を行った。EPI の使用濃度は感受性試験結果および既</p>		

報を基に決定した。

5. 統計処理

データの処理には統計ソフト R を使用し、株間の蛍光強度比較及び各株内における EPI 使用群の比較には Steel 法を用いた。進行型患者由来株と安定型患者由来株の群間比較には、Wilcoxon の順位和検定を行った。どちらの検定においても有意水準は 5%とした。

【結果】

1. 薬剤取込み実験

測定開始 2 時間後において比較したところ、OCU873、OCU881、および OCU889 の 3 株が、対照株に対して有意に低い EtBr の集積を示した。

2. 薬剤排出実験

測定開始 2 時間後において比較したところ、OCU855 と OCU963 の 2 株が、対照株に対して有意に高い排出を示した。一方、OCU873、OCU881、および S2 の 3 株が、対照株に対して有意に低い排出を示した。

3. EtBr の取込みと排出に關与する薬剤排出ポンプの同定

いずれの EPI も株間で明らかな違いは認められなかった。reserpine、verapamil は各株の薬剤取込みと薬剤排出を顕著には変化させなかった。しかし、CCCP は供試菌株の薬剤の排出を顕著に低下させ、また菌体内における EtBr の量を顕著に増加させた。CPZ は数株に対して薬剤取込みを有意に低下させ、排出を有意に亢進させた。

【考察】

各株における EtBr の取込みおよび排出動態は株間で異なり、また進行型患者由来株と安定型患者由来株の間に有意な差はなかった。特徴的な動態を示す株が存在し、薬剤の取込みと排出の結果から、OCU873 と OCU881 は薬剤の取込み能と排出能の両者が低い株、OCU855 と OCU963 は、取込み能は対照株と変わらないが排出能は顕著に高い株、OCU889 は、排出能は対照株と変わらないが取込み能は低い株と推測され、いずれも菌体内の薬剤蓄積量が少ないことが示唆された。これらの株はいずれも進行型の患者由来であるという興味深い結果となった。また、EPI を使用した実験結果から、MAC においては薬剤の菌体内外の輸送に複数の装置が關与していることが示唆された。