

氏名	小崎 弘貴
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5695号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	非結核性抗酸菌の薬剤排出能に関する検討
論文審査委員	高柴 正悟 教授      岡元 邦彰 教授      稲葉 裕明 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

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。

### 【材料・方法】

#### 1. 供試菌株

独立行政法人国立病院機構刀根山病院において肺 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症と診断された患者から分離された、*M. avium* 9 株 (OCU855、OCU 867、OCU 873、OCU 881、OCU 889、S1、S2、S3、S8) と *M. intracellulare* 1 株 (OCU 963) の計 10 株を実験に供した。OCU 855、OCU 867、OCU 873、OCU 881、OCU 889、および OCU 963 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 *M. avium subsp hominissuis* (MAH) 104 株を対照株として用いた。

#### 2. 薬剤取込み実験

供試菌液に EtBr を終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $0.5 \times 10^7$  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。

#### 3. 薬剤排出実験

はじめに  $0.5 \times 10^7$  個/mL の供試菌液 0.8 mL に終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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。

#### 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

4 種類の薬剤排出ポンプ阻害剤（efflux pump inhibitor; EPI）、Reserpine、Verapamil、Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (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 の濃度は既報に従った。

#### 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 RFU 比較及び各株内における EPI 使用群との比較には Steel 法を用いた。進行型と安定型の二群間の比較には、Wilcoxon の順位和検定（マン・ホイットニーの U 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、OCU 873、OCU 881、および OCU 889 の 3 株が、標準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、OCU 855 と OCU 963 株の 2 株が、標準株に対して有意に高い排出を示した。一方、OCU 873、OCU 881、および S2 の 3 株が、標準株に対して有意に低い排出を示した。

#### 3. EtBr の取込みと排出に関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、OCU 873 と OCU 881 は薬剤の取込み能と排出能の両者が低い株、OCU 855 と OCU 963 は取込み能は標準株と変わらないが排出能は顕著に高い株、OCU 889 株は排出能は標準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。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関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

近年、非結核性抗酸菌（NTM）による感染症が増加しているが、NTMの細菌学的動態については不明な点が多い。また、多剤併用化学療法が奏功しない症例も報告されており、それらの起因菌の多くが多剤耐性を有すると考えられている。細菌の薬剤耐性機序のひとつに、薬剤の取込み能と排出能が変化することによって、菌体内における薬剤濃度が低下することが知られている。この機序に関与する薬剤排出ポンプは、一つのグループで複数種の薬剤を排出することが知られている。本研究は、ethidium bromide (EtBr) を用いて薬剤排出を観察する手法を応用し、報告例の少ないNTM臨床分離株の薬剤排出能の評価を行うことを目的として実施された。また、同時に、菌体全体としての薬剤排出能力に加え、各ポンプの能力に関する情報を得ることを目的とし、既知の薬剤排出ポンプ阻害薬（EPI）の影響も観察された。

実験には、*Mycobacterium avium* 1株を対照として、*M. avium* 及び *Mycobacterium intracellulare* の臨床分離株10株が供試された。なお、これら10株は、由来患者の重症度から進行型患者由来株と安定型患者由来株に分けられた。対象株を含めた11株に対して、薬剤の取込み実験と排出実験が行われた。薬剤取込み実験は、EtBrを供試菌株に作用させ、蛍光強度の変化を4時間経時的に測定する方法で行われた。薬剤排出実験は、供試菌株をEtBr存在下で4時間ほど培養した後、培地を入れ替えて蛍光強度を経時的に測定する方法で行われた。この方法により、蛍光強度の変化から菌体内に集積していたEtBrの排出量が推定された。なお、両実験共に、蛍光測定前にEPIを加えた系も設定し、既報にある薬理作用について、他の臨床分離株においても同様の効果を認めるか否かが確認された。上記の2実験で得られたデータは、平均値を用いて動的なグラフを作成すると同時に、取込み実験については4時間時点、排出実験においては2時間時点のデータに対して統計学的検定が行われた。

実験の結果、薬剤の集積と排出において由来患者の重症度間における差はなかった。しかし、重症患者由来株6株中5株において、薬剤耐性に関与すると考えられる特徴的な性状が見出された。なお、EPIの中には蛍光強度に影響を与えるものが存在したが、株間における差はなかった。今回用いた手法によって、臨床分離株における薬物動態が評価でき、株間に差異のあることが示された。また、EPIを用いて株間の差を得ることは困難であったが、薬剤耐性を付与すると考えられる薬剤の取込み・排出に関する特性が、重症患者由来株の多くに見出された。これは、現状では困難とされている疾患予後予測に有益であると考えられた。

本研究は、近年増加する肺NTM症の臨床分離株に対して、従来法に改良を加えた薬剤の蓄積・排出能評価法が、応用可能であることを示した。また、重症患者由来株に特徴的な動態を観察し、疾患予後の予測因子となる可能性も示した。得られた結果は、研究対象の絞り込みや検査法確立の一助となることが期待され、細菌学的、臨床的に意義のあるものと評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。