

主論文の要旨

**In vitro reduction of antibacterial activity of tigecycline
against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*
with host stress hormone norepinephrine**

宿主ストレスホルモンのノルエピネフリンによる
多剤耐性アシネトバクターバウマニに対する
チゲサイクリンの抗菌活性低下機構

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生体管理医学講座 救急・集中治療医学分野

(指導：松田 直之 教授)

稲葉 正人

【緒言】

ノルエピネフリン (NE) は、交感神経終末から分泌される神経伝達物質であり、生体のストレス反応における主要なカテコラミンである。また、救急・集中治療領域では、血流分布異常性ショックに対する昇圧剤として広く使用されている。近年いくつかの研究で、NE が細菌の増殖や病原性を促進させることが示されているが、*Acinetobacter baumannii* に与える作用や薬剤感受性への影響について検討した研究はない。*A. baumannii* は院内感染の主要な起炎菌であり、特に多剤耐性 *A. baumannii* (MDRAB) による感染症は、集中治療室 (ICU) 内死亡率の上昇や ICU 在室期間の延長に寄与することが示されており、集中治療領域において特に注意すべき病原体の1つである。本研究では、NE の MDRAB に与える作用の解析を目的とし、MDRAB 感染症の第1選択薬である tigecycline (TIG) と colistin (COL) の抗菌活性、およびバイオフィーム産生性と接着性に与える影響について検討した。

【対象および方法】

本邦の4病院で分離された25株のMDRABに対し、Pulsed-field gel electrophoresisと multilocus sequence typingを施行したところ、3つのpulsotypeとsequence typeに分類されたため、各々から1株ずつ選択し、標準株として*Acinetobacter* ATCC 17978株を加えた計4株を解析対象とした (Fig. 1)。すべての分析で、serum-SAPI培地 (6.25 mM NH₄NO₃, 1.84 mM KH₂PO₄, 3.35 mM KCl, 1.01 mM MgSO₄, 2.77 mM glucose, 30% (v/v) adult bovine serum) を使用した。TIGとCOLの抗菌活性に与えるNEの影響を検討するため、生体で確認された濃度である10 μMのNEを添加した培地 (NE+培地) と添加していないコントロール培地 (NE-培地) に、10⁵ colony-forming unit (CFU) /mLのMDRAB と1, 2, 4 × minimum inhibitory concentration (MIC) のTIGやCOLを添加し、殺菌効率を評価するtime-kill assayを施行した。また、増殖に与える影響を評価する目的で、両培地に10² CFU/mLのMDRABを接種し、2時間毎に細菌数を計測した。バイオフィーム産生性に与える影響については、microtitre plate assayを用いて、48時間培養後にNE+培地とNE-培地に形成されたバイオフィーム量を測定し評価した。接着性に与える影響については、NE+培地とNE-培地にポリウレタン、シリコン、ポリ塩化ビニル製のチューブを入れ、10² CFU/mLのMDRABを接種し、20時間培養後の各チューブに接着した細菌数、及び各チューブ上に形成されたバイオフィームを電子顕微鏡で観察し評価した。最後に、*A. baumannii* が保有する代表的な薬剤排出ポンプであるAdeABC, AdeIJK, AdeFGHのmRNA発現に対するNEの影響を評価した。NE+培地とNE-培地に10⁵ CFU/mLのMDRABを接種し、10時間培養後にreal-time PCR法でmRNA発現量を解析した。統計学的解析には、unpaired *t*-testsを用いた。

【結果】

tigecycline と colistin の抗菌活性に与える NE の影響 (Fig. 2, 3) :

NE+培地では、TIG の抗菌活性が著明に低下したが、COL の抗菌活性には影響しなか

った。1×および2×MICのTIGを添加した場合、NUBL-1608株ではNE+培地の生菌数がNE-培地のものより4時間後より、NUBL-11651株とNUBL-11195株では8時間後より有意に多くなった。4×MICのTIGを添加した場合、NUBL-1608株とNUBL-11195株では8時間後より、NUBL-11651株では24時間後にNE+培地の生菌数が有意に多くなった。

増殖に与えるNEの影響 (Fig. 4) :

すべての菌株で、NE添加により有意に増殖が促進された。NUBL-1608株とNUBL-11195株では、8時間後より生菌数の差が有意に認められたのに対し、NUBL-11651株では、10時間後より差が認められた。

接着に与えるNEの影響 (Fig. 5, 6) :

すべてのチューブ素材に対し、NE添加により約2log程度接着菌数が高まった。NEの接着能促進効果に、素材による違いは認められなかった。電子顕微鏡においても、NE添加状態のMDRABが、チューブへの接着性を高め、バイオフィルムを産生していることが確認できた。

バイオフィルム産生に与えるNEの影響 (Fig. 7) :

すべての菌株で、NE刺激により約3~4倍バイオフィルム産生量が高まった。

Efflux pump geneの転写に与えるNEの影響 (Fig. 8) :

すべての菌株で、NE刺激によりAdeFGHのmRNA発現量が約5~6倍高まったが、AdeABCおよびAdeIJKのmRNA発現量に対しては影響しなかった。

【考察】

本研究によって、NEがMDRABに対するTIGの抗菌活性を著明に低下させることが示された。近年、MDRAB感染症に対するTIGとCOLの治療効果を比較検討した研究が報告されているが、多くはTIG治療の方が臨床的、細菌学的効果に劣っていたとしている。これらの研究は、Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II scoreが20点以上の重症症例を対象としており、その多くにカテコラミンが投与されていた。従ってNEの投与が、MDRABに対するTIGの抗菌活性を低下させ、MDRAB感染症に対するTIG治療の効果減弱に寄与する1つの因子となった可能性がある。

本研究で使用したNE濃度である10µMは、現在の臨床においてNEを投与するカテーテル内で十分に達成される濃度である。ポリウレタン、シリコン、ポリ塩化ビニルの3つの主要なカテーテル素材に対して、10µMのNEはMDRABの接着を促進させることが確認された。カテーテル関連血流感染症 (CRBSI) の発症の第一段階は、カテーテルへの細菌の接着であり、本研究結果は、NE併用によりCRBSI発症しやすい環境となる可能性を示すものといえる。

近年、いくつかの研究で細菌のバイオフィーム産生に **efflux pump** が関与していることが示されている。本研究では、NE が **AdeFGH efflux pump gene** の mRNA 発現を促進させることが示された。この結果は、NE 刺激による AdeFGH の **over-expression** が、TIG 耐性だけでなくバイオフィームの過剰産生にも寄与している可能性を示すものである。

【結論】

NE は、MDRAB に対する TIG の抗菌活性を著明に低下させ、MDRAB のバイオフィーム産生性や接着性を促進させることが明らかとなった。本研究は、NE 投与が MDRAB 感染症に対する TIG 治療の効果を減弱させる可能性を示すものである。