

# カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 肺炎マウスモデルに おけるカルバペネム系抗菌薬および アミノグリコシド系抗菌薬の 併用療法の有効性評価

太田 賢治, 賀来 敬仁, 柳原 克紀  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・診断学  
長崎大学病院検査部

**Key words:** carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, meropenem, amikacin,  
antibiotic combination therapy, *in vivo*

## 要旨

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の拡散が世界的に問題となっている。肺炎の主要な原因菌である *Klebsiella pneumoniae* でも CRE が増加しており、特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科菌の割合が高い。本研究では、カルバペネム系抗菌薬およびアミノグリコシド系抗菌薬の併用療法の有効性をカルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* (CP-Kp) 肺炎マウスモデルを作成して評価した。

CP-Kp 臨床分離株を用いて肺炎マウスモデルを作成した。感染6時間後から治療を開始し [メロペネム (MEPM) 100 mg/kg, 6時間ごと, アミカシン (AMK) 100 mg/kg, 12時間ごと 腹腔内投与], 無治療 (control) 群, MEPM 群, AMK 群, MEPM+AMK 併用群で生存率, 治療開始36時間後の肺内・血液内生菌数, 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中好中球数, 肺病理所見を評価した。

Liquid-agar 法により CP-Kp 株を BALB/c マウスに経気管投与する肺炎マウスモデルを確立した。治療実験では, control 群では感染96時間後までにすべてのマウスが死亡したが, MEPM 群, AMK 群, 併用群では死亡したマウスはみられなかった。肺内生菌数 ( $\log_{10}$ CFU/mL, mean  $\pm$  SEM, n=3~4) は, 併用群で  $2.00 \pm 0.00$  であり, MEPM 群 ( $6.38 \pm 0.17$ ), AMK 群 ( $6.17 \pm 0.16$ ) よりも有意に減少していた。BALF 中好中球数 ( $\log_{10}$ CFU/mL, mean  $\pm$  SEM, n=4) は control 群  $5.94 \pm 0.01$ , MEPM 群  $5.36 \pm 0.08$ , AMK 群  $5.33 \pm 0.04$ , 併用群  $5.00 \pm 0.09$  であり, 併用群は有意に細胞数が少なく, 病理所見でも炎症細胞浸潤や肺胞出血所見の軽減がみられた。以上の結果から, CP-Kp 肺炎において MEPM と AMK の併用療法は単剤治療と比較して有効である

ことが示された。

## 1. 序文

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) の拡散が世界的に問題となっている。市中肺炎, 医療介護関連肺炎, 院内肺炎の原因菌として頻度が高い *Klebsiella pneumoniae* においては, CRE のうちカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE) の割合が高い<sup>1)</sup>。CRE に対する有効な治療薬としてコリスチンやチゲサイクリンが挙げられるが, いずれも肺炎に対する治療効果は十分に立証されていない。そのため, 臨床状況次第ではあるが, 従来の抗菌薬の併用による治療が推奨される<sup>2,3)</sup>。抗菌薬併用療法についてはメロベネム (MEPM) とアミカシン (AMK) の相乗効果が *in vitro* で示されているが<sup>4)</sup>, *in vivo* モデルによる評価は少なく, 特に, カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* (CP-Kp) による肺炎マウスモデルの報告はほとんどない。そこで, CP-Kp 肺炎マウスモデルを作成し, カルバペネム系抗菌薬およびアミノグリコシド系抗菌薬の併用療法の有効性を評価した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. CP-Kp 肺炎マウスモデル作成に最適な臨床分離株の選定

肺炎マウスモデル作成のため, 病原性を示す菌株とマウス系統の組み合わせを検索した。菌株は長崎大学病院で 2009 年 1 月から 2015 年 6 月の間に分離同定された IMP-1 産生 *K. pneumoniae* 18 株を使用した<sup>5)</sup>。マウスは BALB/c マウスと BL/6 マウスを用いた。それぞれの菌株を各マウスに  $1 \times 10^7$ /mouse 経気管投与し, 生存率を評価した。

### 2-2. CP-Kp 肺炎マウスモデルの作成

選定した臨床分離株を用いて菌量調整等の条件設定を行ったが, 十分な再現性が得られなかった。そこで, 液体状態の寒天培地 (50°C) を菌液と混合し, agar-based inoculum を作成し気管内投与する liquid-agar 法による CP-Kp 肺炎マウスモデルの作成を行った<sup>6)</sup>。

### 2-3. CP-Kp 肺炎マウスモデルにおける抗菌薬併用療法の有効性評価

KP2 株 (MIC : MEPM 8  $\mu$ g/mL, AMK 8  $\mu$ g/mL) を BALB/c マウス (6~7 週齢, 体重 18~22 g, 雄, 日本エスエルシー株式会社, 静岡) に liquid-agar 法を用いて  $1 \times 10^4$  CFU/mouse 経気管投与して CP-Kp 肺炎マウスモデルを作成した。感染 6 時間後から抗菌薬投与を開始し, 抗菌薬の投与量, 回数は MEPM 100 mg/kg 6 時間ごと, AMK 100 mg/kg 12 時間ごととした<sup>7,8)</sup>。経路は腹腔内投与とした。単剤群と併用群との治療効果を比較するため, 無治療 (control) 群, MEPM 群, AMK 群, MEPM+AMK 併用群の 4 群を設定した。MEPM 投与時には同量のシラスタチンを投与した。

感染 120 時間後まで 6 時間おきにマウスの生存状況を確認し, 生存曲線を作成した。また, 治療開始 36 時間後に肺内生菌数, 血液内生菌数, 肺病理所見, 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中好中球数の評価を行った。

なお, 本研究は長崎大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号 : 1003310842)。

### 2-4. 統計解析

Prism 6 (GraphPad Software) を用い統計解析を行った。菌量, 細胞数は対数表示 ( $\log_{10}$ ) で平均値  $\pm$  標準誤差を表記した。群間評価にあたっては Tukey's multiple comparison test を行い,

P 値<0.05 を統計学的有意差とした。

### 3. 結果

#### 3-1. CP-Kp 肺炎マウスモデル作成に最適な臨床分離株の選定

臨床分離株 18 株とマウス 2 種の計 36 通りとなる組み合わせの中で、病原性を示したものは KP2, KP5, KP12, KP16 株を BALB/c マウスに投与した組み合わせであった。その中で、KP2 株は他の株と比較して感染から死亡までの時間が長く、治療実験を行うのに適切と判断した。

#### 3-2. CP-Kp 肺炎マウスモデルの作成

Liquid-agar 法で KP2 株を  $1 \times 10^3$ /mouse 投与した際の生存率は 50% (3/6) であり、 $1 \times 10^4$ /mouse 投与した際の生存率は 0% (0/6) であった (図 1A)。また、 $1 \times 10^4$ /mouse 投与した際の肺内生菌数は経時的に増加しており (n=3, 図 1B)、感染 24 時間後の病理所見において肺炎像を認めた (図 1C) ことから、安定した肺炎マウスモデルであることを確認した。

#### 3-3. CP-Kp 肺炎マウスモデルにおける抗菌薬併用療法の有効性評価

生存率の検討では、control 群は感染 96 時間後までにすべてのマウスが死亡したのに対し、MEPM 群、AMK 群、MEPM+AMK 群では死亡したマウスはみられなかった (n=3, 図 2)。

肺内生菌数の検討では、各治療群において肺内生菌数 (/mL) は control 群と比較して減少していた (n=3~4, 図 3A)。減少の程度は MEPM+AMK 群において最も大きく、MEPM+AMK 群の治療開始 36 時間後における肺内生菌数 ( $2.00 \pm 0.00$ ) は MEPM 群 ( $6.38 \pm 0.17$ )、AMK 群 ( $6.17 \pm 0.16$ ) と比較し有意に低下していた (vs. MEPM 群  $p < 0.001$ , vs. AMK 群  $p < 0.001$ )。血液内生菌数 (n=5, 図 3B) では、治療開始 36 時間後の生菌数 (/mL) は control 群  $6.12 \pm 0.46$ ,

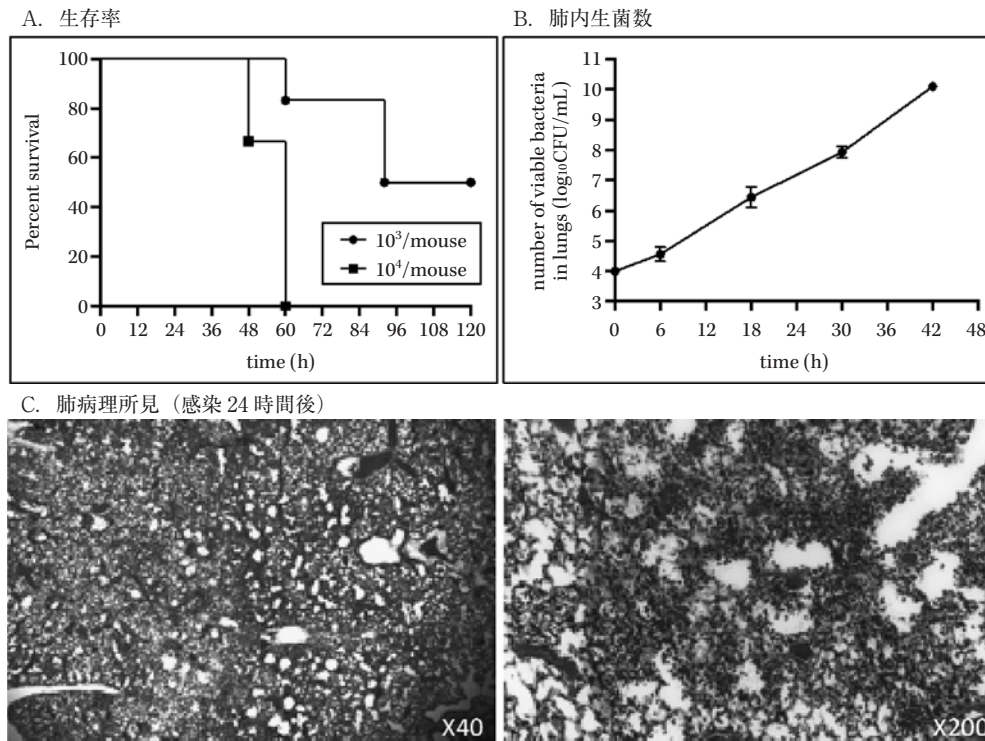


図 1. CP-Kp 肺炎マウスモデルの評価

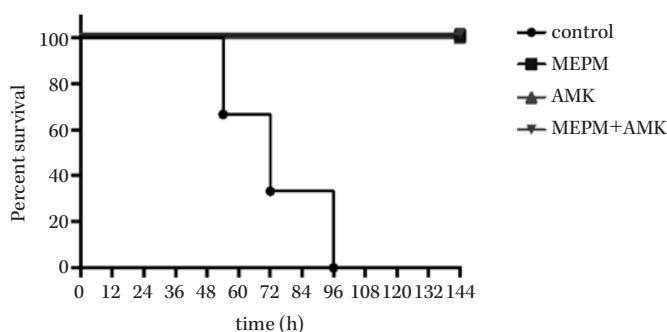


図2. CP-Kp 肺炎マウスモデルに MEPM, AMK, MEPM+AMK を投与した際の生存曲線

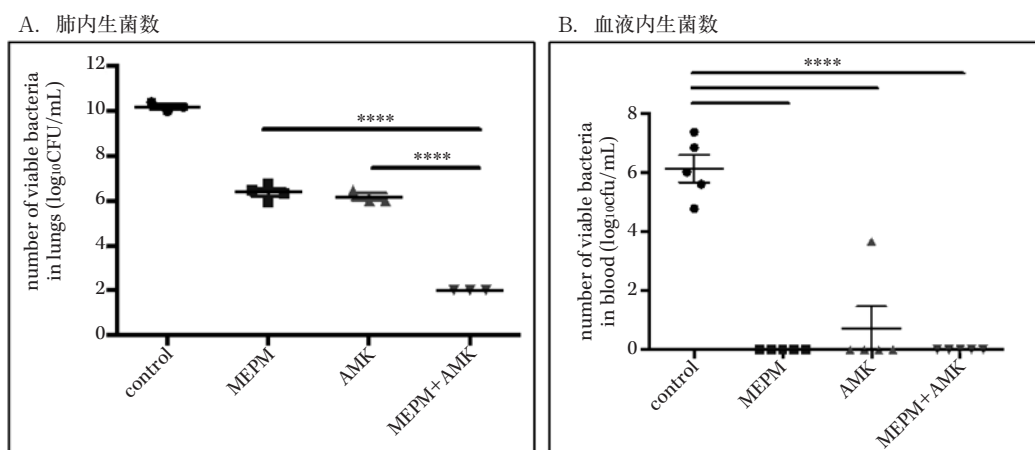


図3. 治療開始36時間後の生菌数

MEPM 群  $0.00 \pm 0.00$ , AMK 群  $0.73 \pm 0.73$ , MEPM+AMK 群  $0.00 \pm 0.00$  であり, control 群では全例菌血症を起こしていた。

治療開始36時間後の肺病理所見(図4)において, control 群では多数の炎症細胞浸潤と肺胞構造の破壊, 肺胞出血がみられた。一方, MEPM 群, AMK 群においては炎症細胞が多くみられるものの肺胞構造は比較的保たれており, 肺胞出血も減少していた。さらに, MEPM+AMK 群においては他の群と比較し炎症細胞の浸潤が軽減している所見がみられた。

治療開始36時間後のBALF中好中球数(/mL) (n=4) はcontrol 群  $5.94 \pm 0.01$ , MEPM 群  $5.36 \pm 0.08$ , AMK 群  $5.33 \pm 0.04$ , MEPM+AMK 群  $5.00 \pm 0.09$  であり, MEPM+AMK 群において各単剤群と比較し有意に細胞数の減少がみられた (vs. MEPM 群  $p < 0.01$ , vs. AMK 群  $p < 0.05$ )。

#### 4. 考察

本研究では, CP-Kp による肺炎マウスモデルを作成し, 同モデルにおいて MEPM と AMK の併用療法の有効性評価を行い, 併用療法は単剤療法と比較し肺内・血液内生菌数を減少させ, 肺内炎症細胞数を低下させ, 病理学的に炎症像を改善させることを明らかにした。

CP-Kp を用いた肺炎マウスモデル実験では, シクロフォスファミド投与による好中球減少マウスを用いたモデルが Hirsch らによって報告されている<sup>9)</sup>。しかし, *K. pneumoniae* は市中肺炎の

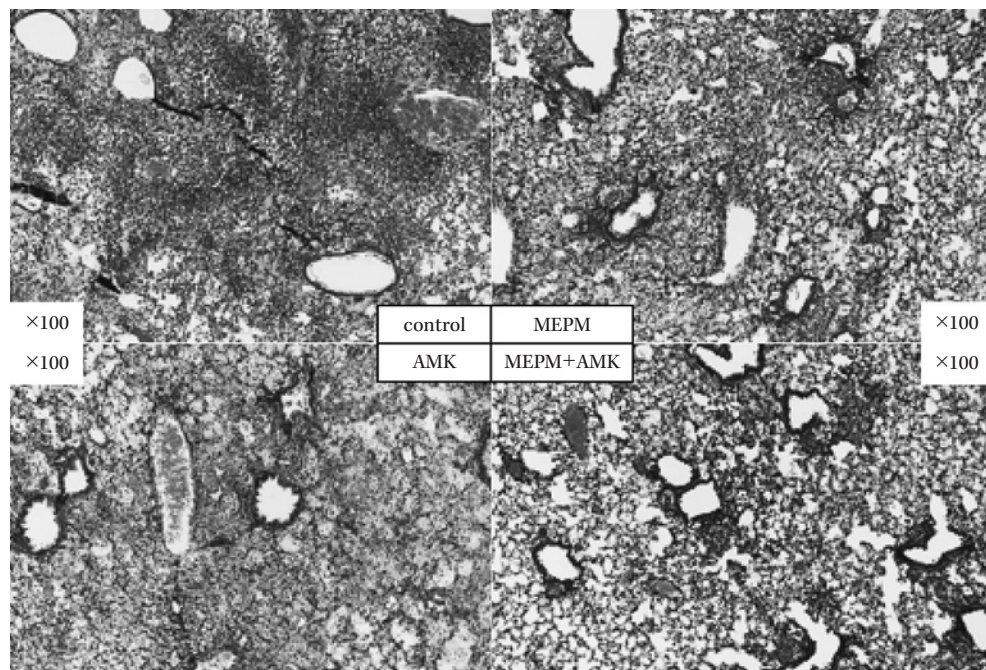


図 4. 治療開始 36 時間後の肺病理所見

原因菌として頻度が高い病原体であり、健常者にも肺炎を引き起こす。そのため、本マウスモデルの作成にあたっては免疫正常マウスを用いた。肺炎マウスモデル作成に一般的に用いられる方法（生理食塩水で菌液を調整し、気管内投与する）では安定した肺炎マウスモデルを作成することができなかった。Liquid-agar 法を用いたところ、免疫正常マウスにおいて安定した CP-Kp 肺炎モデルを作成することができた。本研究で用いた liquid-agar 法<sup>6)</sup>では、投与された agar そのものにより、異物に対する宿主の反応として非感染性の炎症反応が引き起こされる可能性がある。しかし、本研究では、肺内での経時的菌量の増加と病理学的に細菌性肺炎像を認めたことから、感染性の炎症反応が生じていることが確認された。Liquid-agar 法は再現性が高く、また、菌株とマウスの組み合わせに依らず肺炎モデルを作成できる可能性がある。

本研究では *in vivo* における MEPM と AMK の併用療法を評価した。これらの抗菌薬は日常診療において比較的良好に用いられるが、それぞれ単剤での投与は初期治療失敗のリスクや耐性誘導の危険性があるため、重症度が高い症例や耐性菌が疑われる場合には併用して用いることが推奨される<sup>10-12)</sup>。本研究では MEPM と AMK の併用療法により、単剤よりも肺内生菌数が減少し、炎症反応を低下させたため、その有効性が明らかになった。ただし、生存曲線では、単剤治療群においても死亡例がみられなかった。これは免疫正常マウスであったため、単剤でも個々の個体における短期的な生存率を改善した可能性が考えられる。しかし、本研究で併用療法が示した菌量の減少と炎症反応の低下は、臨床的には微生物学的効果と臨床効果にあたる重要なエンドポイントの一つである<sup>13)</sup>。加えて、併用療法の目的の一つとして、耐性菌出現の抑制も挙げられる<sup>14)</sup>。今回はこの点に対する評価は行っていないため、耐性菌出現に対する併用療法の効果を検証するためには、さらなる研究が必要である。

本研究の目的は至適投与量を決定することではなく、単剤治療と併用治療の比較を行うことであったため、薬物動態解析および適切な抗菌薬投与量の算出は行っていない。本研究では、MEPM と AMK の併用量の有効性を示したため、今後は薬物動態解析等を行い、臨床における併用療法

での投与量の検討を行っていく必要がある。また、本研究で作成したマウスモデルを元に、他の菌株や抗菌薬での検討も可能であり、今後さらなる研究の推進を計画している。

## 5. 利益相反自己申告

太田 賢治, 賀来 敬仁は申告すべきものなし。

柳原 克紀は、第一三共 (株), ファイザー (株), MSD (株), 大正富山医薬品 (株), 日本ベクトン・ディッキンソン (株), アステラス製薬 (株), ビオメリュー・ジャパン (株) より講演料を受けている。柳原 克紀は、日本ベクトン・ディッキンソン (株), 塩野義製薬 (株), 杏林製薬 (株) より研究費を受けている。柳原 克紀は、第一三共 (株), 大日本住友製薬 (株), MSD (株), 富山化学工業 (株), ファイザー (株), Meiji Seika ファルマ (株) より奨学 (奨励) 寄付金を受けている。

## 6. 参考文献

- 1) Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, et al: Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: e01882-17
- 2) 二木芳人, 館田一博, 中嶋一彦, 藤村 茂, 堀 誠治, 三嶋廣繁, 他: コリスチンの適正使用に関する指針—改訂版—. *日化療会誌* 2015; 63: 289-329
- 3) 三嶋廣繁, 藤村 茂, 渡辺晋一: チゲサイクリン適正使用のための手引き 2014. *日化療会誌* 2014; 62: 311-66
- 4) Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess D S: *In vitro* activity of Carbapenems alone and in combination with Amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res* 2011; 3: 106-10
- 5) Yamakawa H, Kosai K, Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Uno N, et al: Molecular and epidemiological analysis of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Japan. *J Infect Chemother* 2019; 25: 240-6
- 6) Hoover J L, Lewandowski T F, Mininger C L, Singley C M, Socoloski S, Rittenhouse S: A robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. *J Vis Exp* 2017; 119: 55068
- 7) Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Nakamura S, Uno N, Hasegawa H, et al: *In vitro* and *in vivo* activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O831-9
- 8) Andes D, Craig W A: Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 261-8
- 9) Hirsch E B, Guo B, Chang K T, Cao H, Ledesma K R, Singh M, et al: Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *J Infect Dis* 2013; 207: 786-93
- 10) Mikasa K, Aoki N, Aoki Y, Abe S, Iwata S, Ouchi K, et al: JAID/JSC Guidelines for the treatment of respiratory infectious diseases: the Japanese Association for Infectious Diseases/

Japanese Society of Chemotherapy - The JAID/JSC Guide to Clinical Management of Infectious Disease/Guideline-preparing Committee Respiratory Infectious Disease WG. J Infect Chemother 2016; 22 (7 Suppl): S1-65

- 11) 河野 茂, 青木洋介, 今村圭文, 門田淳一, 志馬伸朗, 高橋 洋, 他: 成人肺炎診療ガイドライン 2017, 日本呼吸器学会, 東京, 2017
- 12) Kalil A C, Metersky M L, Klompas M, Muscedere J, Sweeney D A, Palmer L B, et al: Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clin Infect Dis 2016; 63: e61-111
- 13) 河野 茂, 青木信樹, 門田淳一, 館田一博, 徳江 豊, 二木芳人, 他: 呼吸器感染症における新規抗菌薬の臨床評価法 (第二版)。日化療会誌 2012; 60: 29-45
- 14) Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P: Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther 2013; 11: 159-77