

論文審査の結果の要旨

界を超えた複合菌種による難治性バイオフィルム感染症

—複合バイオフィルム形成と代替動物モデルを用いた治療法の検討—

Biofilm infection Due to Cross-Kingdom Dual-Species: Evaluation of Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* Induced by *Candida albicans* and the Development of Alternative Animal Models for Developing New Treatment Methods

論文提出者 江島 慎太郎 (Eshima, Shintaro)

菌血症は微生物が血液中に存在する状態であり、高齢者や易感染性患者では重篤な感染症に進展する。厚生労働省の院内感染対策サーベイランスによると、国内の入院患者の血液検体から最も頻繁に分離される細菌は *Escherichia coli* で、真菌では *Candida albicans* となっている。血流を通じて医療デバイスに付着した病原微生物は、細胞外マトリックス(多糖類、タンパク質、核酸、脂質)を伴うバイオフィルムを形成する。バイオフィルム内の微生物は、浮遊細胞状態と比べて抗菌薬抵抗性が大きく上昇する。また、カテーテル関連血流感染症の約 15% は、複数の菌種が起因する複合感染であり、真菌と細菌の界を超えた複合バイオフィルム感染も確認されている。しかし、高頻度に分離される組み合わせの *E. coli* と *C. albicans* による複合バイオフィルム系に関する研究は限られており、抗菌薬治療への影響も不明である。この要因の 1 つには適切な *in vivo* 評価モデルが確立されていないことがあると考えられる。

申請者は、*E. coli* が、*C. albicans* と複合バイオフィルムを形成することで生じる抗菌薬抵抗性に着目し、臨床株の *E. coli* を用いて抗菌薬治療への影響を *in vitro* で定量的に検証した。初めに、血流感染症患者から分離された *E. coli* 52 株のバイオフィルム形成能を検証したところ、26.9% (14/52) がバイオフィルム形成能を有し、バイオフィルム高形成能株が 7.7% (4/52) を占めていた。また、高形成能株はメロペネム (MEPM)、セフメタゾール、セフトリアキソン、レボフロキサシンに対する浮遊細胞条件下での感受性は良好であったが、バイオフィルム形成後は全てに抵抗性を示した。さらに、バイオフィルム高形成能株の *E. coli* は *C. albicans* と複合バイオフィルムを形成することで MEPM 抵抗性が *E. coli* 単独バイオフィルムと比較してより上昇した。この *E. coli* -*C. albicans* 複合バイオフィルム内の *E. coli* と *C. albicans* は互いの増殖に影響を与えずに共存していた。また、申請者はこの *E. coli* -*C. albicans* 複合バイオフィルム内の *E. coli* の MEPM 抵抗性上昇には *C. albicans* が産生する可溶性物質が関与していることを明らかにした。この可溶性物質の特定と耐性機序の解析を試みたところ、この活性成分は、多糖類、DNA、タンパク質以外の 10kDa 以下の耐熱性小分子であることを見出した。さらに、この可溶性物質による耐性機序には *E. coli* の RND 型薬剤排出ポンプの発現亢進が関与している可能性は低いことを示した。次に、申請者はこれまでの *in vitro* の事象を宿主環境下で検討するため、カイコを用いた代替動物モデルを構築し、抗菌薬併用療法の有効性を評価した。本研究では、代替動物モデルとしてポリウレタン繊維 (PF) 挿入カイコを採用し、*E. coli* -*C. albicans* 複合バイオフィルムによる MEPM 抵抗性を生菌数で定量的に評価できる実験系を確立した。これにより、宿主環境下の *E. coli* 単独バイオフィルムに対し、臨床用量相当の MEPM では効果が認められないこと、また *E. coli* -*C. albicans* 複合バイオフィルム

内では *C. albicans* の存在によって、*E. coli* の MEPM 抵抗性がさらに上昇することを明らかにした。さらに、PF 挿入カイコを用いて、MEPM とミカファンギン (MCFG) の併用投与を評価したところ、*E. coli* と *C. albicans* 共に生菌数の減少は認められなかった。申請者が構築した *in vivo* 評価系により、*E. coli* -*C. albicans* 複合バイオフィルム内の *E. coli* は宿主環境下でも MEPM 抵抗性を示し、MCFG 併用療法では有効性が期待できない可能性が示唆された。

本研究は、*E. coli* - *C. albicans* 複合バイオフィルム形成による *E. coli* の MEPM 抵抗性の上昇を、*in vitro* と *in vivo* 評価系で定量的に証明した。今回構築した一連の評価系は、定量的指標に基づく有効な併用療法の探索にも応用可能なことから、新たな治療戦略の開発が期待される。

以上の成果は、博士(薬学)の学位を授与するのに相応であると判断する。

令和 6 年 3 月 1 日

主査 明治薬科大学 教授

小 笠 原 裕 樹 印

副査 明治薬科大学 教授

蒲 生 修 治 印

副査 明治薬科大学 講師

鈴 木 陽 介 印

なお、上記の者が提出した博士学位論文（本論文）について、剽窃のチェックを行った結果、問題は認められませんでした。

令和 6 年 3 月 1 日

主査（自署）：