

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

論 文 題 目 Determination of in vitro Synergy When Three Antimicrobial Agents Are  
Combined against *Mycobacterium tuberculosis*  
(ヒト型結核菌における3つの抗菌薬併用による相乗効果の解析)

氏 名 BHUSAL YOGESHEE



(目的) 結核症治療の問題として薬剤耐性変異株の出現があり,これを防ぐ目的で,複数抗結核薬の併用療法が経験的に行われている。しかし複数の抗結核薬が,同時に結核菌に作用した時の相互作用の解析は充分には行われていない。今回,独自に考案した微量液体希釈法を原理とするチェッカーボード法で,抗菌薬3剤を三次元に展開し,結核菌に対する相互作用を定量的に解析した。

(方法) 試験菌株と試験抗菌薬: 琉球大学医学部附属病院および大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターで分離同定されたヒト型結核菌10株(7株の多剤耐性結核菌を含む)を使用した。一次スクリーニング試験では抗結核薬を含む抗菌薬,計28剤を対象とした。その内 isoniazid(INH)-rifampin(RFP)の組み合わせに有意な相乗効果を認めた gatifloxacin (GFLX), sitafloxacin (STFX) clarithromycin (CLR), minocycline (MIN) ethambutol (EB), streptomycin (SM)の6剤に

ついて、さらに定量的な三次元解析を行った。

三次元チェッカーボード法：INH-RFP 第三の

抗菌薬を組み合わせ、個々の濃度勾配が三次元に展開されるチェッカーボードを作成した。

最初に INH と RFP で構成する二次元チェッカーボードを作成し、さらに第三の抗菌薬を

プレート毎に異なる濃度添加して作成した。

調製した各々のプレートに試験菌液（最終濃度  $10^5$  cells/ml）を接種し、 $36^\circ\text{C}$ 、7% 炭酸ガス培養を行った。

培養 2~3 週間後に、各プレートの菌発育終末点を肉眼的に判定し

fractional inhibitory concentration (FIC)

index を算出した。また組み合わせた 3 剤

のいずれか 1 剤が無添加のプレートで残る 2

剤の相互作用を判定した。Time-kill study：

プロスに試験する抗菌薬を各々単独で添加し

菌液を接種した後培養 0, 3, 5, 8 日目に各々の

培養液の一部を採取し、寒天培地上に定量的




に接種、培養して発育した菌コロニー数を計

測した。

(結果と考察) 試験菌株 10 株では,INH あるいは RFP との 2 剤併用で 1 例(RFP-CLR の 1 株で FIC 0.22)を除き, FIC は 0.59 から 1.50 に算出され,相乗効果は観察されなかった。しかし INH-RFP に第三の抗菌薬を組み合わせると GFLX, STFX, CLR は 10 株中 9 株,SM MIN はそれぞれ 10 株中 5 株と 6 株で有意の相乗効果を示した。Time-kill study の結果も,INH-RFP に GFLX あるいは STFX を加えた 3 剤の併用で,培養 8 日目に菌発育対照と比べ  $10^3$  以上の菌濃度の減少が観察された。この研究成果から,三次元チェッカーボード法は多剤耐性結核菌を含め,結核菌を対象とした抗菌薬 3 剤の相互作用を定量的に解析できる検査手法であることが確認された。また結核症治療の一次選択剤に含まれないフルオロキノロン剤 CLR, MIN といった抗菌薬も RFP, INH と併用することで多剤耐性結核菌にも有効な相乗的な抗菌活性を示すことが示された。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	BHUSAL YOGESH
論文審査委員	審査日	平成17年10月14日	
	主査教授	藤田 次郎	
	副査教授	田中 龍夫	
	副査教授	廣瀬 康行	
(論文題目)			
Determination of in vitro Synergy When Three Antimicrobial Agents Are Combined against <i>Mycobacterium tuberculosis</i>			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術水準につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
結核症治療の問題は抗結核薬治療中における薬剤耐性菌の出現であり、これを防ぐため複数の抗結核薬を用いた併用療法が経験的に行われている。しかし複数の抗結核薬が同時に結核菌に作用した時の薬剤相互の作用については未だ充分には解明されていない。今回、独自に考案した微量液体希釈法を原理とするチェッカーボード法にて、3つの抗菌薬を三次元に展開し、in vitroにおいて異なる抗菌薬が同時に結核菌に作用した時、如何なる相互作用を発現するのか定量的に解析することを目的とした。			
2. 研究内容			
琉球大学医学部附属病院および大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターで分離同定されたヒト型結核菌 10 株（7 株の多剤耐性結核菌を含む）を使用した。試験抗菌薬は、抗結核薬を含む計 28 剤を対象に半定量スクリーニング試験を行い、有意な相乗効果を認めた gatifloxacin (GFLX)、sitafloxacin (STFX) clarithromycin (CLR)、minocycline (MIN)、ethambutol (EB)、streptomycin (SM)の6剤について定量的な三次元解析を行った。三次元解析では isoniazid(INH)と rifampin(RFP)を二次元に展開する常法のチェッカーボード・プレートに第三の試験抗菌薬を2倍濃度希釈系列で添加し、試験菌株を接種、培養した後、各プレートの菌発育終末点を肉眼的に判定し、fractional inhibitory concentration (FIC) index を算出し判定指標とした。また、3剤の内、いずれか1剤が無添加のプレートで残る2剤の相互作用を判定した。併せて、薬剤相互作用の確認試験としてtime-kill study を実施した。試験菌株10株では、INHあるいはRFPと組み合わせた2剤併用においては、RFP plus CLRでの1株を除き、有意の相乗効果は観察されなかった。しかし INH plus RFP にさらに第三の抗菌薬を組み合			

わせた三次元解析試験では、GFLX、STFX、CLR は 10 株中 9 株で、SM、MIN はそれぞれ 10 株中 5 株と 6 株で有意の相乗効果が観察された。Time-kill study の結果からも、INH plus RFP に GFLX あるいは STFX を加えた 3 剤の併用で菌発育対照と比較し  $10^3$  CFU/ml 以上の生菌数濃度の減少を確認した。

### 3. 研究成果の意義と学術水準

今回の研究成果から、独自に開発した三次元チェッカーボード解析法は多剤耐性結核菌を含め、結核菌を対象とした 3 つの抗菌薬の相互作用を高い再現性をもって定量的に解析できる検査手法であることが確認された。また、結核症治療の一次選択剤に含まれないフルオロキノロン剤、CLR、MIN といった抗菌薬も、RFP、INH と併用することで、多剤耐性結核菌にも有効な相乗的抗菌活性を示すことが初めて明らかとなった。これらの研究成果は、今日世界的に大きな問題となっている結核症治療の今後の研究の進展に大きく寄与することが期待され、学術的にも高い水準にあるものと判断される。

以上の審査結果より、本論文は学位授与に十分に値するのものと判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。