

称号及び氏名	博士(獣医学)	松本 州平
学位授与の日付	2021年8月31日	
論文名	新規シデロフォアセファロスポリン系抗菌薬セフィデロコルの <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 抗菌効果に関する研究	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	長谷川 貴史
	副査	東 泰孝

論文要旨

緒言

カルバペネム系抗菌薬は、広域抗菌スペクトル及び強力な殺菌力を有する β -ラクタム系抗菌薬であり、重篤なグラム陰性細菌感染症治療における最後の切り札的役割を担っている。その一方で、米国をはじめとする海外では、カルバペネム耐性グラム陰性細菌、特にカルバペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、ならびに腸内細菌科細菌の増加が懸念されている。セフィデロコルはカルバペネム耐性菌を含むグラム陰性細菌に対して幅広く抗菌活性を示す新規シデロフォアセファロスポリン系抗菌薬である。既存セフェム系抗菌薬は外膜ポーリンを介して菌体内に取り込まれるが、セフィデロコルは構造的特徴としてセフェム核3位側鎖末端にカテコール基を有しているため、細菌が生来持つ鉄獲得経路を利用する事によっても菌体内に取り込まれる事が示唆されている。そこで本研究では、セフィデロコルの薬理学的特徴を明らかにする事を目的に、第1章ではセフィデロコルの鉄獲得経路を利用した菌体内取り込みについて、第2章及び第3章ではセフィデロコルのカルバペネム耐性ブドウ糖非発酵細菌及び腸内細菌科細菌に対する殺菌効果及び治療効果について細菌学的観点より検討した。

第1章 セフィデロコルの菌体内取り込み過程に関する検討

緑膿菌 PAO1 株を用いて、セフィデロコルの抗菌活性に及ぼす3価鉄の影響について検討した。鉄制限培地に塩化鉄(III)非添加時のセフィデロコルの MIC は $0.031 \mu\text{g/mL}$ であった。一方で、セフィデロコルの抗菌活性は鉄濃度に依存して大きく減弱し、添

加鉄濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の時のセフィデロコルの MIC は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。セフェム核 3 位側鎖末端カテコール基の水酸基の 1 つをメトキシ基に置換したセフィデロコルカテコール 3-メトキシの塩化鉄(III)非添加時の MIC は 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、同条件のセフィデロコルの MIC と比較して約 256 倍高かった。また、塩化鉄(III)添加の影響も殆ど受けなかった。これらの事より、セフィデロコルはカテコール基を有する事で良好な抗菌活性を示す事ならびに抗菌活性は鉄濃度の影響を大きく受ける事が明らかとなった。

セフィデロコルの菌体内取り込み過程を明らかにするために、界面活性剤存在下で 3 価鉄イオンとキレートを形成し呈色することが知られているクロマゾール B を用いて、セフィデロコルのキレート能を検討した。クロマゾール B と 3 価鉄とのキレート反応は、セフィデロコル添加 (0.1 ~ 1,000 μM) により濃度依存的に阻害され 50%阻害濃度は 30 μM であった。一方で、セフィデロコルカテコール 3-メトキシ添加時の 50%阻害濃度は >1,000 μM と明らかに高く、カテコール基が 3 価鉄とのキレート能に関与している事が明らかとなった。

カルセイン-AM を用いて、緑膿菌 PAO1 株の鉄取り込みに及ぼすセフィデロコルの影響を検討した。カルセイン-AM は生細胞の膜を容易に通過し、細胞質で細胞内エステラーゼにより膜不透過性緑色蛍光のカルセインへと加水分解され細胞内に保持されるが、鉄などの金属イオンの共存により蛍光が消光する事が知られている。セフィデロコル添加後 20 秒の間に蛍光強度は大きく低下し、菌体内への鉄取り込みにセフィデロコルが大きく関与している事が示唆された。一方で、セフィデロコルカテコール 3-メトキシ添加後の蛍光強度の低下はセフィデロコルの場合と比較して明らかに小さく、菌体内への鉄取り込みへの関与は限定的であった。

^{14}C 標識セフィデロコルを用いて緑膿菌 PAO1 株のセフィデロコル取り込みについて検討した。鉄制限培地及び鉄過剰培地を用いて、セフィデロコルの菌体内取り込み量の経時推移を比較したところ、いずれの培地においてもセフィデロコルの時間依存的な菌体内取り込みが観察されたが、検討したいずれの時点においても、鉄制限培地では鉄過剰培地と比較して菌体内取り込み量が有意 ($p < 0.05$) に多く、セフィデロコルは鉄制限状況下で高発現される鉄取り込み蛋白を介して菌体内に取り込まれる事が示唆された。

第 2 章 セフィデロコルのヒト血中濃度推移下における *in vitro* 殺菌効果

臨床における薬剤濃度推移を試験管内で再現できる *in vitro* chemostat model を用いて、セフィデロコルの殺菌効果を検討した。評価菌株は、セフィデロコルのグローバルサーベイランス試験の結果を参考に MIC₉₀ 付近を示す株として、臨床分離されたメロペネム耐性の緑膿菌 NUBL-7808 株及び SR27001 株、アシネトバクターバウマニ SR08626 株、大腸菌 DU48916 株、ならびに肺炎桿菌 SR08667 及び VA-384 株を含む計 6 株を用いた。セフィデロコル、コリスチン/アミカシン及びメロペネムの MIC は、それぞれ 0.5 ~ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.125 ~ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

セフィデロコルをヒトに 2 g、1 日 3 回、3 時間かけて点滴した時の血中濃度条件下で殺菌効果を検討したところ、試験管内の生菌数は時間経過と共に減少した。セフィデロコル作用 6 時間後の生菌数は 1.00 ~ 2.08 log₁₀ CFU/mL であり、同作用開始時のも

のと比較して $3.00 \log_{10}$ CFU/mL 以上低下した。その後も殺菌効果は維持され、セフィデロコル作用 24 時間後の生菌数は $1.00 \sim 1.90 \log_{10}$ CFU/mL であり、菌の再増殖は認められなかった。コリスチン (2.5 mg/kg, 1 日 2 回, 0.5 時間かけての点滴時)/アミカシン (5 mg/kg, 1 日 3 回, 0.5 時間かけての点滴時) 併用群においても、試験管内の生菌数は時間経過と共に減少した。作用 4 時間後の生菌数は $1.00 \log_{10}$ CFU/mL であり、作用開始時の生菌数と比較して $3.00 \log_{10}$ CFU/mL 以上低下した。腸内細菌科細菌の 3 株についてはその後も殺菌効果は維持され菌の再増殖は認められなかったが、ブドウ糖非発酵菌の 3 株 (緑膿菌 NUBL-7808 株及び SR27001 株ならびにアシネトバクターバウマニ SR08626 株) については、作用 18 時間以降において菌の再増殖が認められた。メロペネム (1 g, 1 日 3 回, 1 時間かけての点滴時) 群は同薬剤作用開始後初期において殺菌効果を示したものの、その後は評価したいずれの菌株においても菌の再増殖が認められ、作用 24 時間後の生菌数は作用開始時のものと比較して $2.00 \log_{10}$ CFU/mL 以上高く殺菌効果を示さなかった。

以上の事より、セフィデロコルはヒト血中濃度推移下において、カルバペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、大腸菌、ならびに肺炎桿菌に対して、優れた殺菌効果及び持続的な増殖抑制効果を示す事が明らかとなった。

第 3 章 セフィデロコルのヒト血中濃度推移下における *in vivo* 治療効果

臨床における抗菌薬の治療効果をより精査するためには、宿主免疫や抗菌薬の組織移行性を考慮できる *in vivo* model を用いた検討が必要である。そこで、頸静脈カニューレより薬剤を持続点滴する事でヒト血中濃度推移を再現したラット肺感染モデルを用いてセフィデロコルの治療効果を検討した。評価菌株として、臨床分離されたメロペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、ならびに肺炎桿菌を含む計 5 株及びセフトジジム感性株の計 6 株を用いた。メロペネム耐性を示す計 5 株に対するセフィデロコル及びメロペネムの MIC は、それぞれ $0.125 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ 及び $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ であった。

セフィデロコルをヒトに 2 g, 1 日 3 回, 1 時間かけて点滴した時の血中濃度推移下で治療効果を検討したところ、セフィデロコルはいずれの菌株に対しても殺菌効果を示したが、肺内での菌増殖が遅かった一部メロペネム耐性アシネトバクター属菌及び肺炎桿菌に対する殺菌効果は、その他菌株のものと比較して弱かった。一方で、点滴時間を 1 時間から 3 時間に延長した条件下で治療効果を検討したところ、セフィデロコルはいずれの菌株に対しても良好な殺菌効果を示した。治療開始 96 時間後の肺内生菌数は $3.04 \pm 1.33 \log_{10}$ CFU/lung (n=4) $\sim 4.41 \pm 0.82 \log_{10}$ CFU/lung (n=6) であり、治療開始時のものと比較して $3.00 \log_{10}$ CFU/lung 以上有意 ($p < 0.05$) に減少した。既存セフェム系抗菌薬セフトジジンをヒトに 1 g, 1 日 3 回, 0.5 時間かけて点滴した時の血中濃度推移下で治療効果を検討したところ、セフトジジム感性株に対して殺菌効果を示した。治療開始 96 時間後の肺内生菌数は $1.45 \pm 0.61 \log_{10}$ CFU/lung (n=6) であり、治療開始時のものと比較して $2.67 \log_{10}$ CFU/lung 以上有意 ($p < 0.05$) に減少した。一方で、メロペネム耐性株 計 5 株に対しては殺菌効果を示さなかった。

以上の事より、セフィデロコルの 2 g, 1 日 3 回, 3 時間かけて点滴する用法は、カルバペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、ならびに肺炎桿菌を原因菌とする

肺感染症に優れた肺内殺菌効果を示す事が明らかとなった。

結論

- セフィデロコルは、3価鉄とキレート複合体を形成し、鉄欠乏状態で高発現される鉄取り込み蛋白を介して菌体内に取り込まれる事で良好な抗菌活性を示した。
- セフィデロコルは、メロペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、大腸菌、ならびに肺炎桿菌に対して優れた殺菌効果及び持続的な増殖抑制効果を発揮した。
- セフィデロコルは、メロペネム耐性の緑膿菌、アシネトバクター属菌、ならびに肺炎桿菌を原因菌とする肺感染症に対して優れた肺内殺菌効果を示し、臨床現場においても良好な治療効果が期待できる。
- 細菌学的検討により見出されたセフィデロコルに関する知見は、適応疾患及び適応菌種を検討し、臨床試験計画を立案する上での基礎的情報として、セフィデロコルの開発推進に貢献する事が期待される。

審査結果の要旨

カルバペネム系抗菌薬は、広域抗菌スペクトル及び強力な殺菌力を有するβ-ラクタム系抗菌薬であり、重症グラム陰性細菌感染症治療における最後の切札となっているが、米国をはじめとする海外では、カルバペネム耐性緑膿菌・アシネトバクター属菌・腸内細菌科細菌の増加が懸念されている。セフィデロコルは、カルバペネム耐性グラム陰性細菌に対して幅広く抗菌活性を示す新規シデロフォアセファロスポリン系抗菌薬であり、構造的特徴としてセフェム核3位側鎖末端にカテコール基を有している。セフィデロコルは、細菌が生来持つ鉄獲得経路を利用する事によって菌体内に取り込まれる事が示唆されており、本研究では、セフィデロコルの薬理学的特徴を明らかにする事を目的とした。

第1章では、セフィデロコルの鉄獲得経路を利用した菌体内取り込みの可能性について検討した。緑膿菌 PAO1 株を用いて、セフィデロコルの抗菌活性に及ぼす3価鉄の影響について検討したところ、鉄制限培地に塩化鉄(III)を添加した時のセフィデロコルの MIC は鉄濃度依存的に大きく減弱したが、鉄とキレート形成能のないセフィデロコルカテコール 3-メトキシの抗菌活性は鉄濃度の影響を殆ど受けず、塩化鉄(III)非添加時の MIC は同条件のセフィデロコルの MIC と比較して64倍高かった。次に、クロマゾール B を用いて、セフィデロコルの鉄キレート能を検討したところ、クロマゾール B と3価鉄とのキレート反応は、セフィデロコル添加において濃度依存的に阻害されたが、セフィデロコルカテコール 3-メトキシ添加では殆ど阻害されなかった。カルセイン-AM を用いた緑膿菌 PAO1 株への鉄取り込みの検討では、セフィデロコル添加において蛍光強度が大きく減弱し、更に、¹⁴C 標識セフィデロコルを用いた緑膿菌 PAO1 株への菌体内取り込みの検討では、時間依存的な取り込みが観察され、鉄制限培地における菌体内取り込み量は鉄過剰培地と比較して有意 ($p<0.05$) に多かった。以上より、

セフィデロコルは鉄制限状況下で高発現される鉄取り込み蛋白を介して菌体内に取り込まれる可能性を示した。

第2章では、*in vitro* chemostat model を用いて、セフィデロコルのヒト血中濃度推移下における殺菌効果を検討した。臨床分離されたメロペネム耐性緑膿菌・アシネトバクター属菌・大腸菌・肺炎桿菌を含む計6株に対するセフィデロコル及びコリスチン/アミカシンのMICは、それぞれ0.5～4 µg/mL及び0.125～2 µg/mLであった。セフィデロコルをヒトに2 g、1日3回、3時間点滴時の血中濃度推移下で検討した時の生菌数は時間経過と共に減少し、作用6時間後の生菌数は作用開始時のものと比較して3.00 log₁₀ CFU/mL以上低下し、その後も殺菌効果は維持され菌の再増殖は認められなかった。コリスチン(2.5 mg/kg、1日2回、0.5時間点滴)/アミカシン(5 mg/kg、1日3回、0.5時間点滴)併用群においても生菌数は時間経過と共に減少し、作用4時間後の生菌数は作用開始時の生菌数より3.00 log₁₀ CFU/mL以上低下したが、腸内細菌科細菌の3株についてはその後も殺菌効果は維持され菌の再増殖は認められなかったものの、ブドウ糖非発酵菌の3株については、作用18時間以降で菌の再増殖が認められた。以上より、セフィデロコルはヒト血中濃度推移下において優れた殺菌効果及び持続的な増殖抑制効果を示す事が明らかとなった。

第3章では、セフィデロコルの治療効果をより精査するために、頸静脈カニューレより薬剤を持続点滴する事でヒト血中濃度推移を再現したラット肺感染モデルを用いて、セフィデロコルの治療効果を検討した。評価菌株として、臨床分離されたメロペネム耐性緑膿菌・アシネトバクター属菌及び肺炎桿菌を含む計5株並びにセフトジジム感性緑膿菌の計6株を用いた。メロペネム耐性を示す計5株に対するセフィデロコル及びセフトジジムのMICは、それぞれ0.125～8 µg/mL及び>32 µg/mLであった。セフィデロコルをヒトに2 g、1日3回、1時間点滴時の血中濃度推移下で治療効果を検討したところ、セフィデロコルはいずれの菌株に対しても殺菌効果を示したが、肺内での菌増殖が遅かった一部メロペネム耐性アシネトバクター属菌及び肺炎桿菌に対する殺菌効果は、その他菌株のものと比較して弱かった。一方で、点滴時間を1時間から3時間に延長した用法用量で治療効果を検討したところ、セフィデロコルはいずれの菌株に対しても良好な殺菌効果を示した。治療96時間後の肺内生菌数は3.04±1.33 log₁₀ CFU/lung (n=4)～4.41±0.82 log₁₀ CFU/lung (n=6)であり、治療開始時のものと比較して3.00 log₁₀ CFU/lung以上有意(p<0.05)に減少した。セフトジジムをヒトに1 g、1日3回、0.5時間点滴時の血中濃度推移下で治療効果を検討したところ、セフトジジム感性緑膿菌に対して殺菌効果を示し、治療96時間後の肺内生菌数は治療開始時のものと比較して2.67 log₁₀ CFU/lung以上有意(p<0.05)に減少した。一方で、メロペネム耐性5株には殺菌効果を示さなかった。以上より、セフィデロコルの2 g、1日3回、3時間点滴の用法用量は、肺感染の原因となる多剤耐性菌に対して優れた肺内殺菌効果を示す事が明らかとなった。

以上の結果は、セフィデロコルが3価鉄とキレートを形成し鉄獲得経路を介して菌体内に取り込まれ、カルバペネム耐性グラム陰性細菌に対して治療効果を発揮できる事を示しており、有用性の高い新規抗菌薬の創薬開発の一助となる事が期待される。よって、本研究成果は、医学のみならず獣医学の分野においても多大な貢献をすると

考えられる。従って、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与する事を適当と認める。