

Title	抗緑膿菌セファロスポリンの薬理学的研究
Author(s)	武田, 忍
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49663
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名	たけだしのぶ 武田忍
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 22573 号
学位授与年月日	平成20年12月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	抗緑膿菌セファロスポリンの薬理学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 八木 清仁 教授 本田 武司 教授 那須 正夫

論文内容の要旨

緑膿菌はヒトにおいても上気道、腸管内などに一過性の常在菌叢を形成していることがあるが、一般的にその病原性は低いものであり健康者には病原性を示さない。しかし、近年の高度医療の発展に伴い、いわゆる immunocompromized host に感染症を引き起こす日和見感染症起因菌として注目されている。元々多くの抗菌薬に自然耐性である緑膿菌に対し、抗菌力を有する薬剤はβ-ラクタム系抗生物質の一部とアミノグリコシド、ニューキノロンに限られているが、最近では有効性が期待されてきたこれらの抗菌薬にさえ耐性を示す株の出現が問題となり、このまま耐性化が進めばますます治療に難渋することが容易に考えられる。そこで我々は耐性菌を含めた緑膿菌に対して優れた活性を有する薬剤の創製を目指し、セファロスポリン誘導体のスクリーニングを行った。

セファロスポリンはβ-ラクタム系抗生物質の一つで、細胞壁ペプチドグリカンの架橋形成反応を阻害することで殺菌作用を示す。本論文ではこのスクリーニングで見出した抗緑膿菌セファロスポリンに関する薬理学的検討を行った。

まず初めに、化合物構造の最適化の結果見出した、セフェム母核3位に2-methyl-4-[(2-aminoethyl)carbamoyl]amino-3-aminopyrazoliomethyl基を有するFR264205の抗菌活性について検討した。臨床分離緑膿菌193株に対するFR264205の最小発育阻止濃度(MIC)を測定したところ、90%の菌株を発育阻止する濃度、MIC₉₀は1 μg/mLであり、ceftazidime(CAZ)やimipenem(IPM)、ciprofloxacin(CPFX)と比べ8~16倍も強い活性を示した。またCAZ耐性菌、IPM耐性菌、CPFX耐性菌に対しても良好な活性を保持した。この優れたin vitro活性はin vivo治療効果に反映され、FR264205は呼吸器感染モデル、尿路感染モデル、熱傷感染モデルの何れのモデルにおいても良好な治療効果を示した。すなわち、FR264205は既存耐性菌を含めた緑膿菌に対する治療薬として、十分な活性を有する薬剤であることが明らかになった。

緑膿菌のセファロスポリンに対する主な耐性機序はAmpC β-ラクタマーゼ(AmpC)の産生であるため、FR264205の大幅な活性向上はAmpCへの安定性向上に大きく起因すると考えられる。そこで次にFR264205のAmpCに対する安定性について、①AmpC発現を負に制御するAmpDを欠損させることにより構築したAmpC構成型発現株に対する活性、②精製AmpCのFR264205に対する酵素学的パラメータ、の2つの方面から詳細に検討し、対照薬であるCAZと比較した。緑膿菌の標準株であるPA01株のAmpD欠損株(PA01ΔAmpD株)に対するFR264205のMICを測定したところ、MICは1 μg/mLであり親株に対するMICと比べて2倍しか上昇しなかった。一方、CAZのPA01ΔAmpD株に対するMICは32 μg/mLであり親株に対するMICよりも16倍も上昇した。この結果よりFR264205はCAZよりもAmpC安定性が高いことが示された。また、精製したAmpCの酵素学的パラメータを測定したところ、FR264205のK_mは120 μMでありCAZの値である6 μMよりも20倍大きく、FR264205の親和性はCAZよりも低いことが明らかになった。k_{cat}はCAZと同等であり、いずれも非常に小さな値を示した。従って、FR264205はAmpCに対して親和性が低いため、非常に安定性が向上した化合物であると考えられた。

FR264205を含め、セファロスポリンは一般的に活性部位に亜鉛を配位するメタロβ-ラクタマーゼ(MBLs)に分解されやすく、MBLs産生菌には活性を全く有さない。MBLsは「切り札」的存在のカルバペネムをも効率よく分解し、β-ラクタマーゼ阻害剤も加水分解するという憂慮すべき性質を示すため、元々活性を有する薬剤が少ない緑膿菌においては脅威であり、更にMBLsを保有する菌は多剤耐性傾向が強いことから治療に苦渋している現状にある。私達はFR264205を見出す過程において、驚くべきことにMBLs産生菌に対しても活性を示す、セフェム母核3位に塩基性置換基を持つジヒドロイミダゾピラゾール環を有するFR295389を見出した。そこで次にFR295389の抗菌活性について詳細に検討した。多種類のMBLsが報告されているが、日本で最も多く分離されているIMP型に焦点を当てて検討を行った。PCRにおいてIMP型MBLsを産生することを確認した、緑膿菌21株に対するFR295389のMICを測定したところMIC₅₀、MIC₉₀はそれぞれ8、32 μg/mLであり、試験した薬剤の中で最も強い活性を示した。この活性はMBLsに唯一分解されないβ-ラクタム系抗生物質であるaztreonamと比べて4倍優れた数値であった。セファロスポリンであるにも関わらずFR295389がMBLs産生緑膿菌に対して活性を有する機序を詳しく解析するために、IMP-1 MBLに対する酵素学的パラメータを測定した結果、FR295389のK_mは同じセファロスポリンであるCAZと比較して24倍大きく、IMP-1に対する親和性が低いことが明らかになった。また分子活性を示すk_{cat}は12倍、酵素の触媒効率を示すk_{cat}/K_mは300倍CAZの値より小さく、酵素学的にFR295389がIMP-1に非常に分解されにくい構造を持つ薬剤であることが明らかになった。

このようにFR295389はMBLs産生緑膿菌に対して良好な活性を示したが、一株(No. 20232株)のみMICが>128 μg/mLと高度耐性を示す株が存在した。そこで最後にNo. 20232株の高度耐性機序について、その他任意に選択した8株と比較することにより解析を行った。各株のMBLsの酵素活性を比較すると、No. 20232株は1.89±0.42 mmol/min/mg of proteinの活性を示し、他の8株の値である0.25-0.37 mmol/min/mg of proteinよりも5~8倍高い活性を示した。No. 20232株のMBLのプロモーター配列はstrongプロモーターとして報告されている配列、-35領域; TTGACA, -10領域; TAAACTであり、その他任意に選択した8株のMBLのプロモーター配列であるhybridプロモーター(-35領域; TGGACA, -10領域; TAAACT)と異なっていた。strongプロモーターはtacプロモーターの6倍強いとされている強プロモーターである。これらのことよりNo. 20232株ではstrongプロモーターに起因してMBL酵素活性が

向上し、FR295389に対する高度耐性を引き起こしているものと予想された。そこで、検証実験として各々のプロモーターを持つMBLをクローニングし緑膿菌で発現させたところ、strongプロモーターを持つMBL産生株はhybridプロモーターを持つMBL産生株よりもMBL酵素活性が高く、FR295389に対して高度耐性を示した。すなわち、No. 20232株のFR295389に対する高度耐性の機序は、プロモーター配列の違いにより高度に発現したMBLに主に起因することが裏付けられた。

本研究ではスクリーニングにより見出された化合物の薬理学的活性、良好な活性を引き起こしている作用機序、及び化合物に高度耐性を示す菌の耐性機序を解析したが、これらの検討は今後の抗緑膿菌剤開発に有用な情報を提供したと考えられる。今後FR264205の臨床開発やFR295389を上回る活性を示すMBL産生株治療薬など、新薬の誕生が期待される。

論文審査の結果の要旨

武田忍さんの学位論文「抗緑膿菌セファロスポリンの薬理学的研究」について論文審査を行った。

緑膿菌は日和見感染菌であり、術後患者や新生児、高齢者などの免疫状態の低下した人に感染すると重篤な症状を引き起こし、とくに院内感染菌という形で問題になっている。この菌は、もともと多くの抗生物質に自然抵抗性を示し、有効な薬剤としてはカルバペネムなどの一部のβ-ラクタム剤やアミノ配糖体、ニューキノロンに限られている。本研究では、良好な抗緑膿菌活性を持つセファロスポリン剤のスクリーニングを行い、FR264205を見出した。この薬剤は、AmpC β-ラクタマーゼ過剰産生菌に対しても良好な抗菌活性を示し、AmpC β-ラクタマーゼによる分解を受けにくく、高い安定性を持つことが明らかになった。しかしながら、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対しては抗菌力を示さず、メタロβ-ラクタマーゼにより容易に分解を受けた。その研究の過程で、このメタロβ-ラクタマーゼに対しても高い安定性を示すFR295389を発見した。この化合物は、メタロβ-ラクタマーゼの分解を受けにくいとされる唯一のβ-ラクタム薬であるアズトレオナムと比べても4倍優れた抗菌力を示した。さらに、酵素学的検討を行い、メタロβ-ラクタマーゼに安定な化合物であることを証明した。しかしながら、本化合物に対し、臨床分離株の中の一株のみ高度耐性を示した。そこで、この臨床分離株の抗FR295389耐性機序を解析した。その結果、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子のプロモーターが非常に強力なstrong promoter配列に変異しており、その結果、メタロβ-ラクタマーゼ産生能が非常に高まっていることによるものと判明した。本研究で得られた化合物は、今後の抗緑膿菌抗菌剤開発のリード化合物として極めて有力であり、本研究が新薬の開発に多く寄与することが期待される。

本研究は有用なものであるばかりでなく、手堅く研究が構築されており、本学薬学研究科博士学位論文としてふさわしい内容を備えていると判定した。