

新規 diazabicyclooctane 系 β -ラクタマーゼ阻害薬 OP0595 の作用機序の解析

Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所

盛中 明裕

目次

	頁
第1章 序論	1
第2章 試験材料と方法	12
2-1 試験材料.....	12
(1) 試験薬剤.....	12
(2) 試験菌株.....	12
(3) β -ラクタマーゼの調製.....	13
(4) Penicillin-binding protein (PBP) の調製.....	13
(5) OP0595 抗菌活性耐性株の作成.....	14
2-2 方法.....	15
(1) β -ラクタマーゼ阻害活性の測定.....	15
(2) X線結晶構造解析.....	15
(3) 薬剤感受性の測定.....	15
(4) PBP 結合親和性の測定.....	16
(5) 形態変化の観察.....	17
(6) 殺菌試験.....	17
(7) 好中球減少マウスによる大腿部感染モデル.....	18
第3章 セリン-β-ラクタマーゼ阻害薬、抗菌薬、β-ラクタム系薬増強剤としての 新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の作用機序の解析	20
3-1 実験結果.....	20
(1) β -ラクタマーゼ阻害活性.....	20
(2) X線結晶構造解析.....	20
(3) 抗菌活性とその作用機序.....	21
(4) OP0595 の増強効果.....	22
3-2 考察.....	22
3-3 小括.....	24

第4章 CTX-M-15 陽性の <i>E. coli</i> 及び KPC 陽性の <i>K. pneumoniae</i> に対する新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 活性	32
4-1 実験結果	32
(1) <i>In vitro</i> での併用濃度測定試験	32
(2) β -ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対する OP0595 の単独または cefepime 併用による殺菌効果	32
(3) 好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデル	34
4-2 考察	34
4-3 小括	36
第5章 AmpC 構成型発現 <i>P. aeruginosa</i> に対する新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 活性	43
5-1 実験結果	43
(1) <i>In vitro</i> での併用濃度測定試験	43
(2) AmpC 構成型発現 <i>P. aeruginosa</i> に対する OP0595 の単独または cefepime 併用による殺菌効果	44
(3) 好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデル	44
5-2 考察	45
5-3 小括	46
第6章 総括	52
掲載論文	56
参考文献	57
謝 辞	66

主な略号

BSA :	Bovine serum albumin
CAMHB :	Cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CFU :	Colony forming unit
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
HEPES :	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
IC ₅₀ :	50% inhibitory concentration
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
MHA :	Mueller-Hinton agar
MIC :	Minimum inhibitory concentration
PCR :	Polymerase chain reaction

第1章 序論

(1) β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ

1928年のペニシリン発見から、細菌感染症を治療する為の重要な薬剤として β -ラクタム系抗菌薬が発見・開発されてきた(1)。 β -ラクタム系薬は、その標的タンパク質である penicillin-binding protein (PBP) の酵素活性を阻害する。PBP は細胞壁の主構成成分であるペプチドグリカンのペプチド鎖を架橋し結合させるトランスペプチダーゼと、グリカン鎖を伸長させるトランスグリコシラーゼの2種類の酵素からなり、細胞壁の維持や、細菌の分裂の際に新たな細胞壁の構築を行っている。PBP のトランスペプチダーゼは、ペプチド鎖中の D-Ala-D-Ala 側鎖を基質として認識する (Fig. 1)。 β -ラクタム系薬は D-Ala-D-Ala 側鎖構造に似ている為、PBP に認識される。すると β -ラクタム系薬構造内の β -ラクタム環が PBP による加水分解により開裂され、PBP の活性部位であるセリン残基に不可逆的に結合する (Fig. 2)。そして、PBP が阻害されることで、細菌は細胞壁を維持・構築することが出来なくなり溶菌する(2)。PBP はヒトに存在しないことから、 β -ラクタム系薬は細菌への選択性が高く安全な抗菌薬として広く利用されてきた。一方、細菌は β -ラクタム系薬に対抗する為に進化し、 β -ラクタム系薬を加水分解する β -ラクタマーゼを発現するようになった。 β -ラクタマーゼは、PBP から派生したセリン- β -ラクタマーゼと、亜鉛金属を活性中心にもつメタロ-プロテアーゼから派生したメタロ- β -ラクタマーゼに分類される(3), (4)。一方、人類もこれら β -ラクタマーゼ産生菌による薬剤耐性に対抗する為に、新たな抗菌薬を開発してきた。特に、 β -ラクタマーゼに安定な新たな β -ラクタム系構造であるセファロスポリン系、カルバペネム系、モノバクタム系等の新たな β -ラクタム系薬や、 β -ラクタマーゼを阻害する clavulanic acid、sulbactam、tazobactam 等の β -ラクタム系 β -ラクタマーゼ阻害薬を見出してきた (Fig. 3, Fig. 4) (5)。

(2) β -ラクタマーゼの分類

近年、抗菌薬耐性グラム陰性菌は世界的に増加しており、これらの病原菌による感染症に対して有効な抗菌薬が存在しないという重大な問題が生じている。多くの場合、その耐性機構には β -ラクタマーゼの産生が含まれている。2012年の時点で、1300種を超える β -ラクタマーゼが同定されており、いくつかの方法によって分類することができる

(6)。代表的な方法としては、アミノ酸配列を基にした Ambler の分類が挙げられる。この分類では、セリン-β-ラクタマーゼである TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、KPC 型などをクラス A、AmpC 型、CMY 型、DHA 型などをクラス C、OXA 型をクラス D とし、メタロ-β-ラクタマーゼである IMP 型、VIM 型、NDM 型などをクラス B としている(7)。また、β-ラクタマーゼは同クラスであっても加水分解できる β-ラクタム系薬が異なることから、基質特異性を基にした Bush-Jacoby の分類も挙げられる(8)-(10)。この二つの分類を用いることで、clavulanic acid や tazobactam では阻害することが出来ず、かつ、β-ラクタマーゼに安定とされてきたカルバペネムでさえも加水分解することが出来る β-ラクタマーゼであるカルバペネマーゼを分類することができる (Table 1)。

(3) 問題となる β-ラクタマーゼ及びその産生菌

TEM 型、SHV 型、CTX-M 型等の基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase : ESBL) は、セファロスポリン等を主に加水分解し、カルバペネムは加水分解できない。現在、これらの ESBL 産生菌は世界的に拡散しており、特に、北米、南米、中国、欧州で流行している。その大多数は Enterobacteriaceae、特に、*Escherichia coli* である。通常、ESBL 産生 Enterobacteriaceae による感染症はカルバペネムにて治療可能である(11), (12)。しかし、ESBL 産生菌の拡散は、カルバペネムの使用機会を増大させてしまい、カルバペネムへの耐性化、特に、カルバペネマーゼ産生 Enterobacteriaceae が急速に増えてきている。カルバペネマーゼは地域的に異なっており、KPC 型はアメリカ、中国、イスラエル及び一部の南ヨーロッパ、OXA-48 はイスラエルを除く中東、NDM 型は南アジアで流行している(13)。これらのカルバペネマーゼを有する細菌は重症感染症を引き起こし、特にカルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* による血流感染症の致死率は高いことが報告されている(14)。

(4) *Pseudomonas aeruginosa* の問題と現状

P. aeruginosa は肺炎、血流感染症、尿路感染症、手術部位感染症等の医療関連感染症において共通の病原菌であり(15)、piperacillin、ceftazidime、cefepime、imipenem、meropenem 等の抗緑膿菌 β-ラクタム系薬が臨床現場で使用されている。しかし、*P. aeruginosa* はこれらの β-ラクタム系薬に対し、染色体性セファロスポリナーゼ (AmpC) の構成型発現、

排出システムの高発現、外膜透過孔の欠損等の内因性耐性機構により耐性化してきた(16)-(18)。この場合、抗緑膿菌 β -ラクタム系薬が影響される耐性機構の解析が重要となり、 β -ラクタマーゼ以外の耐性化機構により耐性化している株に対しては β -ラクタマーゼ阻害薬は意味をなさない。具体的には piperacillin、ceftazidime、cefepime は AmpC の構成型発現と排出システムの高発現、imipenem は外膜透過孔の欠損、meropenem は排出システムの高発現と外膜透過孔の欠損の両方が原因となる。しかし、日本では *P. aeruginosa* に対する各種抗菌薬の薬剤感受性は 2008 年から 2013 年を通し、経年的に回復してきている。これは、2007 年に Infectious Diseases Society of America (IDSA) と the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) により Antimicrobial stewardship guideline が提唱され、「抗菌薬の採用（使用）制限」と「介入とフィードバック」が推進されつつあり、病院機能評価 ver.6、平成 24 年度診療報酬改定においては、感染防止対策加算が新設されたことにより、「抗菌薬適正使用」による抗菌薬使用量の減少と「標準予防策＋感染経路別予防策」による二次感染予防の徹底が行われ、耐性菌の減少・感受性率の回復に繋がったと考えられている(19)。以上の様に、内因性耐性機構は制御可能となったかもしれず、かつ、外因性耐性機構も日本ではまだ問題となっていないが、今後、外因性の ESBL やカルバペネマーゼを獲得した *P. aeruginosa* が広がる可能性は残っている。

(5) 問題を解決する為の新たな β -ラクタマーゼ阻害薬

結論として、新しく有効な β -ラクタマーゼ阻害薬は早急に望まれており、avibactam と relebactam (MK-7655) の diazabicyclooctane 系 β -ラクタマーゼ阻害薬や、vaborbactam (RPX7009) のボロン酸系 β -ラクタマーゼ阻害薬が上市・開発されている (Fig. 5)(20)-(22)。これらの新たな β -ラクタマーゼ阻害薬はともに非 β -ラクタム系薬の新規クラスであり、KPC 型を含むクラス A β -ラクタマーゼや、AmpC 型を含むクラス C β -ラクタマーゼに対して強い阻害活性を示す。Avibactam は ceftazidime、relebactam は imipenem、vaborbactam は meropenem を最初の併用 β -ラクタムとして開発しており、それぞれ、セリン- β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌活性を回復させている(23)-(26)。つまり、クラス A、C、D β -ラクタマーゼ阻害薬は新たな母核による新薬パイプラインが上市し始めているが、クラス B β -ラクタマーゼ阻害薬はまだ上市に至った薬剤は無い。今後、これらの新たな母

核からの合成展開、または、基質とならないβ-ラクタム系薬との配合により、全てのクラスのβ-ラクタマーゼ産生菌に対して有効な治療薬・治療手段が期待される。更に、既に上市されている avibactam-ceftazidime (Avycaz) に耐性変異したβ-ラクタマーゼの報告もあり、新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬の創薬開発研究が必要となっている(27)。

(6) 新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬の臨床開発の課題

新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬の創薬は、既存母核や新規母核を研究することにより見出されることが期待されるが、新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬の臨床開発には、倫理面等の課題が生じる。これは、問題となるβ-ラクタマーゼ産生菌による感染症患者を臨床試験に組み入れる必要がある為である。一般的に、これらのβ-ラクタマーゼ産生菌による感染症は急性に増悪する為、患者の命を助ける為には確実な治療を行う必要がある。つまり、薬剤耐性の為に限られた治療選択肢しかない患者の生命を守る為の確実な治療を、これらの患者に対する臨床試験データをもとに創出する必要があるため、このリスクとベネフィットのバランスが議論されてきている。近年、このバランスを解決する為に日米欧三極の規制当局では、少ない人数での臨床試験から確実な有効性を見出すこと議論しており、その方法として、ヒトの薬物動態 (PK) を用いて、フラスコ内でヒトの薬剤血中濃度推移を再現し、β-ラクタマーゼ産生菌への有効性を予測する *in vitro* PK/PD

(Pharmacokinetics/Pharmacodynamics : 薬物動態学/薬力学) 試験や、マウスの PK を用いて、マウス内でマウスの薬剤血中濃度推移を再現させ、β-ラクタマーゼ産生菌への有効性を予測する *in vivo* PK/PD 試験が検討されてきている(28)。三極当局がこれらの情報を新薬の承認申請のデータとして用いることで、ヒトでの臨床試験の数が減るとともに、承認申請の為の情報を得る期間が短縮化されると考える。

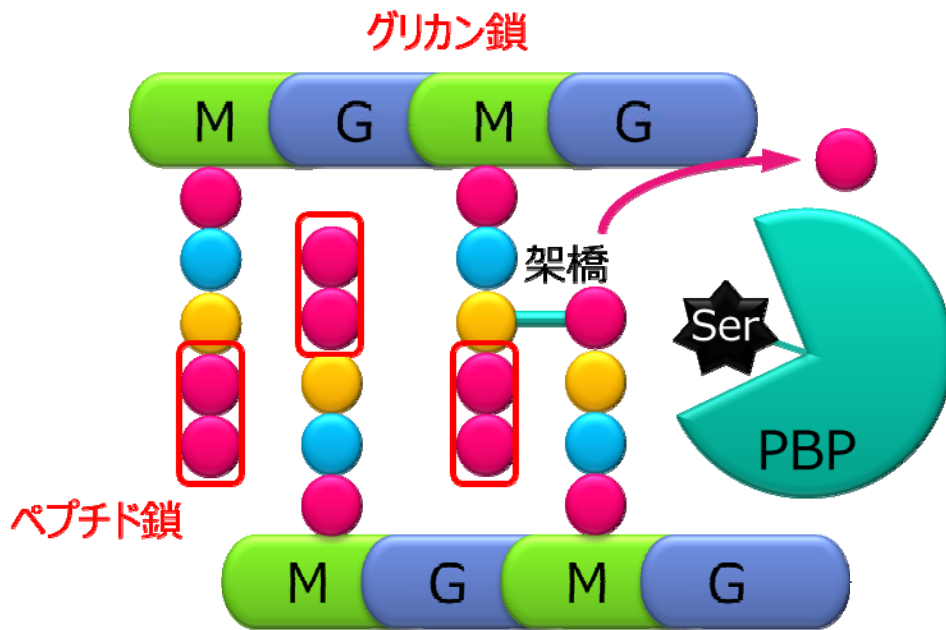
(7) 新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬としての OP0595 の発見

Meiji Seika ファルマ株式会社は、新たなβ-ラクタマーゼ阻害薬の創薬研究として、新たな diazabicyclooctane 系β-ラクタマーゼ阻害薬の合成展開を行った。この際、先行競合品からの進歩性・新規性を目標とし、クラス A、C β-ラクタマーゼに対する阻害活性だけでなく、近年問題となっている ESBL 陽性 Enterobacteriaceae、KPC 陽性肺炎桿菌、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* 等の複数の菌に対する単独抗菌活性とβ-ラクタム系薬との併用

抗菌活性を測定した。したがって、 β -ラクタマーゼ阻害活性だけでなく、細菌の薬剤排出システム・外膜透過の影響、抗菌スペクトル等の複数の情報を同時に評価し、新規化合物の構造活性相関情報を収集した。その結果、先行競合品より進歩性・新規性を持つ OP0595 を見出した (Fig. 5 (c)) (29)。具体的には、先行競合品である avibactam、relebactam とは異なり、OP0595 は、 β -ラクタマーゼ阻害薬としてだけでなく、Enterobacteriaceae に対する抗菌薬として、Enterobacteriaceae に対して幾つかの β -ラクタム系薬の増強薬として作用することが明らかになった。

一方、OP0595 は、Fedora Pharmaceuticals が同時期に独立して見出したことが判明した (30), (31)。そこで両社は協力して海外パートナーの探索を行い、その結果、F. Hoffmann-La Roche Ltd. とライセンス契約を締結し、日本は Meiji Seika ファルマ株式会社、日本を除く全世界は F. Hoffmann-La Roche Ltd. にて、OP0595 の臨床開発を行うこととなった (32)。F. Hoffmann-La Roche Ltd. との共同研究、及び、日本での臨床開発の為に、引き続き、OP0595 の各種研究は継続している。

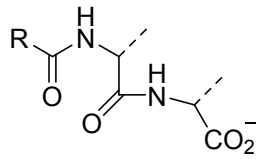
本研究の目的は、新たな diazabicyclooctane 系 β -ラクタマーゼ阻害薬 OP0595 の特徴的な作用である① β -ラクタマーゼ阻害薬、②Enterobacteriaceae に対する抗菌薬、③ Enterobacteriaceae に対して幾つかの β -ラクタム系薬の増強薬としての作用機序を明らかにし、更に、OP0595 の抗菌活性の性質や、PK/PD 試験を実施する為の基礎情報として OP0595 と β -ラクタム系薬の単独・併用による *in vitro* 殺菌試験及び *in vivo* マウス大腿感染モデルを用いて β -ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae 及び AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する有効性を評価することである。



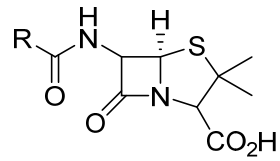
PBP: Penicillin-binding protein
M: *N*-acetylmuramic acid
G: *N*-acetylglucosamine
m-A₂pm: *meso*-diaminopimelic acid

Fig. 1 Structure of peptidoglycan.

(a) Acyl-D-Ala-D-Ala (cell wall precursor)



(b) Penicillins



(c) Hydrolytic cleavage of penicillins by PBP

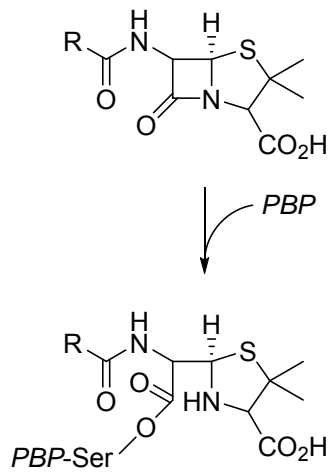
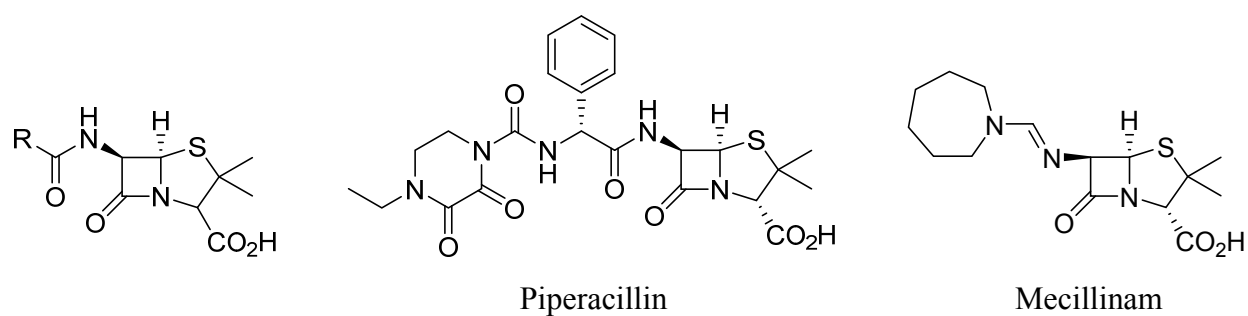
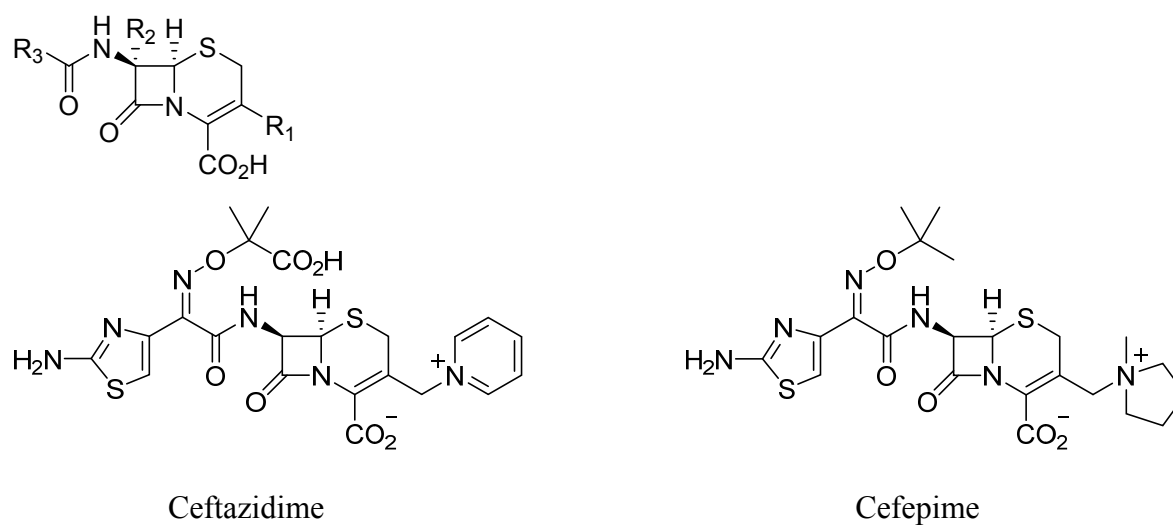


Fig. 2 Mode of action of β -lactams.

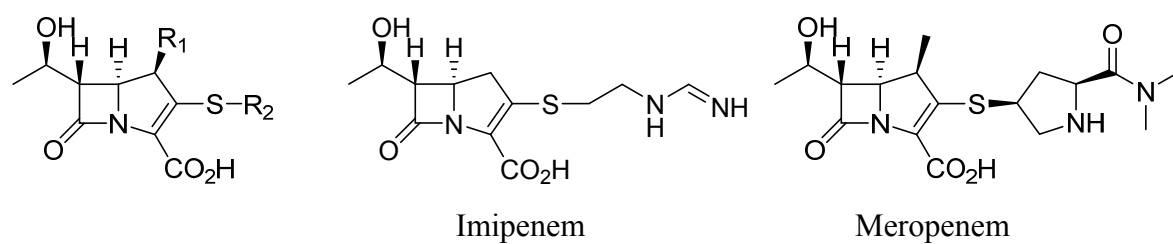
(a) Penicillin



(b) Cefarospirin



(c) Carbapenem



(d) Monobactam

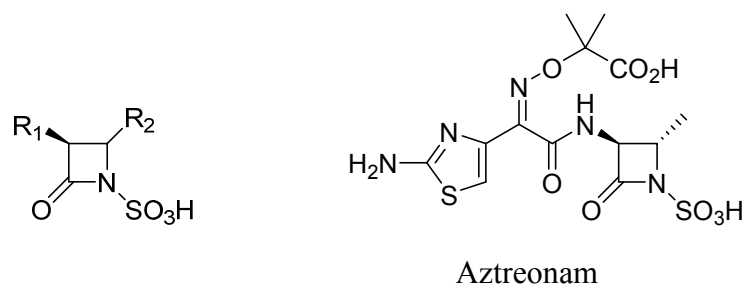
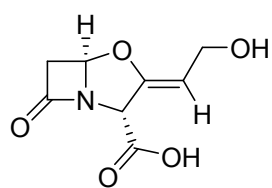
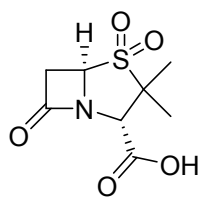


Fig. 3 Structures of β -lactam antibiotics.

(a) Clavulanic acid



(b) Sulbactam



(c) Tazobactam

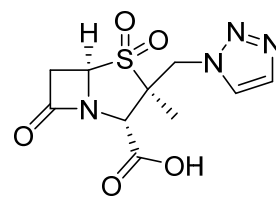


Fig. 4 Structures of β -lactamase inhibitors.

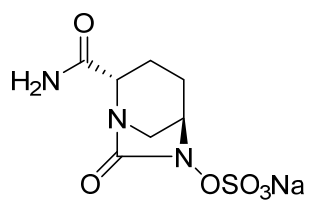
Table 1 Classification schemes for bacterial β -lactamases, expanded from Bush *et al.* (10)

Bush-Jacoby 分類 (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros 分類(1995)	Ambler の クラス分類	代表的な基質	CA または TZB ^a での阻害	代表的な酵素
セリン- β -ラクタマーゼ					
1	1	C	セファロスポリン	不可	<i>E. coli</i> AmpC、P99、ACT-1、CMY-2、FOX-1、MIR-1
1e	NI ^b	C	セファロスポリン	不可	GC1、CMY-37
2a	2a	A	ペニシリン	可	PC1
2b	2b	A	ペニシリン、初期世代セファロスポリン	可	TEM-1、TEM-2、SHV-1
2be	2be	A	広域セファロスポリン、モノバクタム	可	TEM-3、SHV-2、CTX-M-15、PER-1、VEB-1
2br	2br	A	ペニシリン	不可	TEM-30、SHV-10
2ber	NI	A	広域セファロスポリン、モノバクタム	不可	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	可	PSE-1、CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin、cefepime	可	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	酵素による	OXA-1、OXA-10
2de	NI	D	広域セファロスポリン	酵素による	OXA-11、OXA-15
2df	NI	D	カルバペネム	酵素による	OXA-23、OXA-48
2e	2e	A	広域セファロスポリン	可	CepA
2f	2f	A	カルバペネム	酵素による	KPC-2、IMI-1、SME-1
メタロ- β -ラクタマーゼ					
3a	3	B (B1)	カルバペネム	不可	IMP-1、VIM-1、CcrA、IND-1
		B (B3)		不可	L1、CAU-1、GOB-1、FEZ-1
3b	3	B (B2)	カルバペネム	不可	CphA、Sfh-1
NI	4	Unknown			

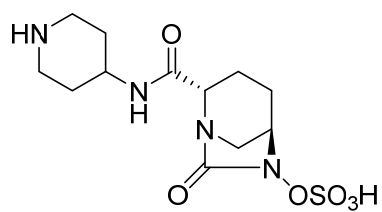
^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

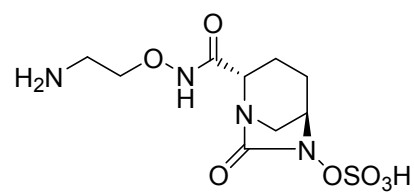
(a) Avibactam



(b) Relebactam



(c) OP0595



(d) Vaborbactam

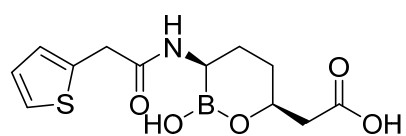


Fig. 5 Structures of non-β-lactam type β-lactamase inhibitors.

第2章 試験材料と方法

2-1 試験材料

(1) 試験薬剤

OP0595 及び avibactam は Meiji Seika ファルマ株式会社（東京）にて合成されたものを用いた(29)。OP0595 は 1 水和物として試験に用いた。Tazobactam 及び sulbactam は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA)、mecillinam は Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canada) より、clavulanic acid、piperacillin、ceftazidime、aztreonam は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、cefepime は United States Pharmacopeial Convention (Rockville, MO, USA) 及びグラクソ・スミスクライン株式会社（東京）より、meropenem は United States Pharmacopeial Convention より購入した。

(2) 試験菌株

ATCC コードが付与されている菌は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。*E. coli* K12 W3110 (NBRC12713) 株は National Bio Resource Project (東京) より購入した。「MSC」が付与されている株は日本の医療移設で分離され、Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所にて保存されている臨床分離株である。

5 株の CTX-M-15 陽性 *E. coli* は MSC20613、MSC20627、MSC20653、MSC20662、MSC20670 を用いた（それぞれ尿、尿、咽頭、尿、喀痰より分離された）。CTX-M 型 β -ラクタマーゼを検出する為の菌株スクリーニングは、Yagi らの方法を用いて行った(33)。具体的には、Meiji Seika ファルマ株式会社にて設計したプライマーである CTXM15-1

(5'-GTTACAATGTGTGAGAAGCA) 及び CTXM15-2

(5'-GGAACCACGGAGCTTATGGC) を用い、熱変性した菌株から PCR にて増幅した。PCR 増幅物は CTXM15-1、CTXM15-2、CTXM15-3 (5'-TACAGCGGCACACTTCCTAA) を用いて遺伝子配列を解析した。それぞれプライマーによる PCR 増幅物を MultiScreen (Merck, Darmstadt, Germany) で精製し、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて配列同定を行い、*bla*_{CTX-M-15} (Genbank accession number AY044436) 陽性と診断された株を使用した。

5株のKPC陽性*K. pneumoniae*はATCC BAA-1705、ATCC BAA-1898、ATCC BAA-1899、ATCC BAA-1900、ATCC BAA-1904を用いた。

3株のAmpC構成型発現*P. aeruginosa*は薬剤感受性サーベイランス研究会（大阪）から入手し、Meiji Seikaファルマ株式会社での管理番号MSC17689、MSC17715、MSC17716（それぞれ胆汁、呼吸器、呼吸器より分離された）を付与した。非誘導下でのAmpCの発現量は既報の定量RT-PCRにより測定した(34)。全ての株は野生型AmpC発現である*P. aeruginosa* ATCC 27853よりも1.5倍以上発現量が多いことからAmpC構成型発現株と見なした(35)。

（3）β-ラクタマーゼの調製

各β-ラクタマーゼ酵素はMeiji Seikaファルマ株式会社横浜研究所保存酵素を用いた。具体的には、β-ラクタマーゼ遺伝子として、OXA-23は*Acinetobacter baumannii*由来 $bla_{\text{oxa-23}}$ (EF016357)、*Enterobacter cloacae*由来AmpCは染色体性 $ampC$ (AB016611)、TEM-1は*E. coli*由来 $bla_{\text{TEM-1}}$ (AY458016)、TEM-10は*E. coli*由来 $bla_{\text{TEM-10}}$ (U09188)、CTX-M-44は*E. coli*由来 $bla_{\text{CTX-M-44}}$ (D37830)、OXA-1は*E. coli*由来 $bla_{\text{OXA-1}}$ (J02967)、CTX-M-14は*E. coli*由来 $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (AF25622)、CTX-M-15は*E. coli*由来 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (AY044436)、CMY-2は*E. coli*由来 $bla_{\text{CMY-2}}$ (AM779748)、KPC-2は*K. pneumoniae*由来 $bla_{\text{KPC-2}}$ (DQ989639)、OXA-2は*P. aeruginosa*由来 $bla_{\text{OXA-2}}$ (AB188812)、*P. aeruginosa*由来AmpCは染色体性 $ampC$ (AE004091)を用いた。これらのβ-ラクタマーゼ遺伝子を有するプラスミド又はゲノムより、シグナルペプチドを排除したβ-ラクタマーゼ遺伝子のPCR増幅物をpET-28(+)-ベクター (Merck) に組換え、その遺伝子配列を確認した。これらのプラスミドを*E. coli* BL21 (DE3) (Merck) に形質転換した。これらの形質転換体を1 mMのIPTGを添加後、20°Cで一晩培養してβ-ラクタマーゼタンパク質を発現させた。これらの培養菌体を集菌後、超音波破碎し、各β-ラクタマーゼタンパク質をカラムクロマトグラフィーにより精製した。IMP-1は既報で精製された酵素を用いた(36)。

（4）Penicillin-binding protein (PBP) の調製

PBP含有膜画分はIidaらの方法に従って調製した(37)。凍結保存した*E. coli* K12 W3110株をMHA (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA) 平板に塗抹し、35°C

で一夜培養した。発育した平板上の菌を CAMHB (Becton, Dickinson and company) に植え継ぎ、35°C で一夜培養した。更に、一夜培養液を CAMHB に植え継ぎ、35°C、140 rpm の振盪培養にて約 5 時間培養した。培養液の OD₅₉₅ が約 0.8 となった後、4°C、6,100×g にて 15 分間遠心した。上清を除去し、菌塊のペレットに氷冷した 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて再懸濁した。この再懸濁液を 4°C、6,100×g にて 15 分間遠心した。上清を除去し、菌塊のペレットに氷冷した 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて再懸濁し、4°C、2,150×g にて 30 分間遠心し、上清を除いた菌塊のペレットに氷冷した 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて懸濁し、懸濁液と同体積量の 0.1 mm ガラスビーズ (安井器械株式会社、大阪) を加え、4°C、2,500 rpm、240 秒の条件でビーズショッカー (安井器械株式会社) を用いて菌体を破碎した。菌体破碎液を氷上で静置し、上清を 4°C、8,000×g にて 10 分間遠心した。更に上清を 4°C、20,400×g にて 90 分間遠心し、上清を除いたペレットを得た。200 mL 培養液から得たペレットあたり、氷冷した 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 50 µL 加えて懸濁した。Protein Assay 用 Quick Start Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を使用し、タンパク質を定量した。タンパク質濃度は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 4.0 µg/µL に調製し、膜画分懸濁液とした。

(5) OP0595 抗菌活性耐性株の作成

凍結保存した *E. coli* K12 W3110 株を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。発育した平板上の菌を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。平板上の菌を 0.5 McFarland standard の濁度となるように生理食塩液を用いて懸濁し、接種菌液とした。複数の接種菌量を 16 µg/mL OP0595 含有 MHA に塗抹し、35°C で一夜培養した際に出現したコロニーを保存した。これらの株のうち、OP0595 の MIC が 64 µg/mL 以上かつ amikacin 及び ciprofloxacin の MIC が親株の MIC と比較して 2 倍以上変化していない株を OP0595 抗菌活性耐性株とした。

2-2 方法

(1) β -ラクタマーゼ阻害活性の測定

各化合物の β -ラクタマーゼ阻害活性は、nitrocefin (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) を基質として分光光度計を用いて測定した。それぞれ化合物を含まない条件で複数の β -ラクタマーゼ濃度を設定し、nitrocefin の分解反応が 20 分間、線形性を保つ濃度を試験に用いた。96-well マイクロプレートに各化合物の 2 倍の希釈系列と β -ラクタマーゼを添加し、30°C で 10 分間反応させ、nitrocefin を添加して 30°C で 20 分間反応させた。これらの反応は 1 条件あたり 2 回実施した。反応の前後の 492 nm の吸光度を Multiskan Ascent (Termo Fisher Scientific、横浜) を用いて測定し、吸光度の変化量から SAS System version 9.1 (SAS Institute、東京) により Sigmoid 曲線への回帰を行い、各 IC_{50} 値を算出した。IMP-1 以外の β -ラクタマーゼを用いた各反応液の組成は終濃度 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0)、終濃度 2.5% の DMSO、終濃度 10 μ g/mL の BSA、終濃度 100 μ M の nitrocefin であり、IMP-1 を用いた反応液の組成は終濃度 50 mM の HEPES 緩衝液 (pH 7.5)、終濃度 2.5% の DMSO、終濃度 0.1 mM の $ZnSO_4$ 、終濃度 20 μ g/mL の BSA、終濃度 100 μ M の nitrocefin とした。

(2) X 線結晶構造解析

P. aeruginosa 由来の AmpC と *E. coli* 由来の CTX-M-44 を用い、蒸気拡散法にて、それぞれ OP0595 との複合体結晶を調製した(38)。本結晶の X 線回折データをビームライン BL41XU (SPring-8、公益財団法人 高輝度光科学研究センター、兵庫) または AR-NW12A (大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構、つくば) を用いて振動法にて収集した。それぞれの複合体結晶の構造は MOLREP プログラムを用いた分子置換法によって決定した(39)。モデル構築及び結晶学的精密化は、Coot プログラム及び Refmac5 プログラムを用いた(40), (41)。原子座標及び構造因子は Protein Data Bank へ登録し、公開した (accession code : 4X68 (*P. aeruginosa* 由来 AmpC) 及び 4X69 (CTX-M-44))。

(3) 薬剤感受性の測定

CLSI に準じた寒天平板希釈法及び微量液体希釈法によって各化合物の MIC を測定した(42), (43)。凍結保存した試験菌を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。発育し

た平板上の菌を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。平板上の菌を 0.5 McFarland standard の濁度となるように生理食塩液を用いて懸濁し、この懸濁液を約 1×10^4 CFU/スポットまたは約 5×10^4 CFU/well となるように CAMHB にて希釈したものを接種菌液として用いた。接種菌液は寒天平板希釈法では、マイクロプランター（佐久間製作所、東京）を用いて薬物含有 MHA に接種し、微量液体希釈法ではマイクロピペットマンを用いて薬物含有 96-well マイクロプレートに接種した。菌液を接種した MHA 平板または 96-well マイクロプレートを 35°C にて 18~20 時間培養し、菌の発育を観察した。CLSI に従って菌の発育が阻止されたと判断した濃度を測定し、この時の最小薬物濃度を試験菌に対する MIC とした。

（４）PBP 結合親和性の測定

各薬剤を溶解後、4 倍希釈系列を作製した。これらの溶液を膜画分懸濁液と等量混和し、35°C にて 20 分間反応させた。25 μ M となるように Bocillin FL penicillin (Termo Fisher Scientific) を加え、35°C にて 10 分間反応させた。反応液に Sample Buffer Solution (Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6 \times) for SDS-PAGE; ナカライテスク株式会社、京都) を加え、100°C にて 5 分間加熱後、氷上で 1 分間冷却した。当該反応液を XV PANTERA GEL (5~12.5%、12 well; ディー・アール・シー株式会社、東京) にアプライし、300 V で 12 分間電気泳動した。泳動したゲルを脱イオン水で 5 分ずつ 3 回振盪洗浄した。泳動したゲルは Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) を用い、460 nm の励起波長、515 nm の検出波長で PBP に結合した Bocillin FL penicillin を励起させ、測定されたシグナルを PBP として検出した。Image Quant TL (GE Healthcare) を用い、Bocillin FL penicillin 結合量から各 PBP を定量した。PBP の種類は分子量マーカー (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers; GE Healthcare) により決定し、PBP1a/b、PBP2、PBP3、PBP4、PBP5/6 に分け、薬物濃度あたりの Bocillin FL penicillin 結合量を定量し、薬物による結合阻害活性を算出した。結合阻害活性から SAS System version 9.1 により Sigmoid 曲線への回帰を行い、各 IC₅₀ 値を算出した。

(5) 形態変化の観察

凍結保存した *E. coli* K12 W3110 株を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。発育した平板上の菌を MHA 平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。平板上の菌を 0.5 McFarland standard の濁度となるように生理食塩液を用いて懸濁し、接種菌液とした。Dalhoff らの報告に準じ、様々な薬剤濃度を含有する MHA の薄層を、乾熱滅菌したスライドガラスに乗せた(44)。接種菌液を薬物含有 MHA 薄層の表面上に広げ、乾熱滅菌したプレパラートを被せ、融解したパラフィンで密封した。当該スライドガラスを 37°C で培養し、4.5 時間後に位相差顕微鏡 (HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 ; KEYENCE、大阪) を用いて菌の形態を観察し、写真を撮影した。

(6) 殺菌試験

CLSI に準じて殺菌力を測定した(45)。各薬物は CAMHB を用いて溶解し、それぞれの薬液を所定の組み合わせになる様に試験管に分注した。この時の薬液は 100 μ L とした。なお、薬物非添加群には薬液の代わりに CAMHB を分注した。凍結保存した菌液を MHA 平板上に塗抹し、35°C で 6~18 時間培養した。発育した平板上の菌を CAMHB に接種し、35°C で一夜培養する。この菌液を CAMHB で 10^{5-6} CFU/mL となるように希釈し、35°C、振盪条件下 (100 rpm) で 2 時間前培養した。この培養した菌液を 4.9 mL ずつ試験管に加え、この混合液を 35°C、振盪条件下 (100 rpm) で培養した。

薬物作用から -2、0、2、4、6 及び 24 時間後に、各培養液から菌液をサンプリングし、直ちに氷冷した。このサンプリング原液を、生理食塩液を用いて 10 倍希釈系列を作製し、MHA 平板に 50 μ L ずつ塗抹し、35°C で 24 時間培養した。培養後、発育したコロニー数を計測した。コロニー数は、20~200 CFU の範囲内の値を採用した。この範囲に該当するコロニー数が 2 種あった場合、あるいは 20~200 CFU の範囲内の値がない場合には、計測可能な希釈度数の低い方を採用した。なお、検出限界を 20 CFU/mL (すなわち、原液塗抹平板でコロニー数 1 個) とした。コロニー数、希釈度及び塗抹菌液量より、サンプル 1 mL あたりの生菌数 (CFU/mL) 及びその常用対数値 (\log_{10} CFU/mL) を算出した。薬物作用開始時の生菌数 (\log_{10} CFU/mL) を 0 としたときの生菌数変化 ($\Delta \log_{10}$ CFU/mL) を算出した。

(7) 好中球減少マウスによる大腿部感染モデル

すべての動物試験は Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所「動物実験管理に関する指針」に基づき、横浜研究所 動物実験管理委員会の承認を得た試験計画に従った (C2013-144-0、C2014-027-0)。入荷時 18~22g の 4 週齢、SPF グレード、オスの Crlj:CD1 (ICR) マウス (日本チャールス・リバー株式会社、神奈川) をすべての試験に用いた。本種のマウスは *E. coli*、*K. pneumoniae* 及び *P. aeruginosa* による大腿感染モデルが確立されている(46)。マウスは、温度 21~25°C、湿度 50~70%、照明時間 7:00~19:00、飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社、東京) 及び水道水を自由摂取で 1 週間馴化飼育し、試験に用いた。試験中も同条件で飼育した。感染の 4 日前及び感染前日にそれぞれ 150 mg/kg 及び 100 mg/kg の cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) を腹腔内投与し、マウスの好中球を減少させた。

感染前日に凍結保存した菌を MHA 平板に塗抹し、35°C で 6~8 時間培養した。平板上の菌を MHA 平板に継代し、35°C で一夜培養した。感染当日、平板に発育した菌を CAMHB に懸濁して、分光光度計 (UV-2910; 株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いて濁度を測定し、580 nm での濁度が約 0.5 (0.48~0.53) となるように CAMHB を用いて希釈調製した。更に、CAMHB を用いて 10^{5-6} CFU/mL となるように希釈し、それぞれ接種菌液とした。

マウスは薬剤投与 1 条件あたり 6 匹に群分けし、それぞれ接種菌液を左大腿部筋肉内に 100 μ L 接種して大腿感染を惹起した。大腿感染から 1、3、5 時間後に薬剤を皮下投与し、24 時間後に頸部脱臼によって安楽死させ、無菌的に左大腿部を摘出した。左大腿部は生理食塩液 7 mL とともに、マルチビーズショッカー (安井器械、大阪) を用い、メタルコーン (安井器械)、1,800 rpm、120 秒、18°C の条件でホモジナイズし、7 mL のホモジネート液とした。各ホモジネートを原液として、生理食塩液を用いて 10 倍希釈系列を作製し、MHA 平板に 50 μ L ずつ塗抹し、35°C で約 22 時間培養した。培養後、発育したコロニー数を計測した。コロニー数は、20~200 CFU の範囲内の値を採用した。この範囲に該当するコロニー数が 2 種あった場合、あるいは 20~200 CFU の範囲内の値がない場合には、計測可能な希釈度数の低い方を採用した。なお、検出限界を 140 CFU/thigh (すなわち、大腿部を 7 mL としたホモジネート原液の塗抹平板でコロニー数

1個)とした。コロニー数、希釈度及び塗抹菌液量より、大腿部あたりの生菌数(CFU/thigh)及びその常用対数値 (\log_{10} CFU/thigh) を算出した。

各群の平均値、標準偏差を算出し、各投与群の大腿内生菌数を vehicle 群及び薬物投与群とともにグラフ化した。Vehicle 群に対する各薬物投与群の大腿内生菌数の差は、EXSUS Version 8.0 (株式会社 CAC クロア、東京) を用い、Dunnett 型多重比較 (Steel 検定) により検定した。

第3章 セリン-β-ラクタマーゼ阻害薬、抗菌薬、β-ラクタム系薬増強剤としての新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の作用機序の解析

ESBL やカルバペネマーゼを含む強力な β-ラクタマーゼの世界的な拡散は、新しい β-ラクタマーゼ阻害薬の必要性を意味している。本章では、新規の diazabicyclooctane 化合物である OP0595 が、3つの作用、つまり、①クラス A 及び C セリン-β-ラクタマーゼ阻害薬として、②Enterobacteriaceae の PBP 2 を標的とした抗菌薬として、③PBP 3 を第一の標的とするいくつかの β-ラクタム系薬の抗菌活性の増強薬として、働くことを明らかにした。

3-1 実験結果

(1) β-ラクタマーゼ阻害活性

基質として nitrocefin を用い、代表的なクラス A、B、C、D β-ラクタマーゼについて、OP0595 及びその他の β-ラクタマーゼ阻害薬の IC₅₀ 値を測定した (Table 2)。その結果、その値は avibactam と同等かやや高かったものの、クラス A、C セリン-β-ラクタマーゼに対しては全て 1 μM 以下であった。OXA-23 等のクラス D セリン-β-ラクタマーゼに対する OP0595 の IC₅₀ 値は 1 μM 以上であった。また、OP0595 は avibactam と同様にクラス B メタロ-β-ラクタマーゼを阻害せず、その IC₅₀ 値は 300 μM より大きかった。

(2) X線結晶構造解析

P. aeruginosa 由来 AmpC または CTX-M-44 の OP0595 との複合体結晶構造は、それぞれ 1.68 Å 及び 1.42 Å 分解能で決定した。両方の構造において、OP0595 はその 5員環のカルボニル-窒素結合を開裂し、β-ラクタマーゼの活性中心に存在するセリン残基と共有結合していることが明らかとなり、これは avibactam と同様であった (Fig. 6) (47), (48)。

AmpC との複合体においては、OP0595 のカルボキシアミド基は Gln146 及び Asn179 の側鎖、そして Ser345 のカルボニル酸素と水素結合していた。CTX-M-44 との複合体においては、OP0595 のカルボキシアミド基は Asn104 及び Asn132 の側鎖、そして水分子

と水素結合していた。これらの水素結合ネットワークは avibactam における AmpC または CTX-M-15 との複合体中で見られたものと同様であった。CTX-M-44 と OP0595 の複合体では、OP0595 の末端アミンの電子密度は観察されなかったことから、側鎖末端は自由度の高いコンフォメーションを有しており、水素結合の形成に関与していないことが示唆された。

(3) 抗菌活性とその作用機序

寒天平板希釈法により MIC を測定した結果、OP0595 は多くの Enterobacteriaceae の菌に対し 1~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で抗菌活性を示したが、ブドウ糖非発酵菌、プロテウス属、セラチア属、そして、グラム陽性菌に対してはほぼ抗菌活性を示さなかった (Table 3)。また、OP0595 は avibactam より約 8 倍強い抗菌活性を示した。

KPC、ESBL、または、AmpC を発現する Enterobacteriaceae を含む代表的なグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対し、OP0595 を併用した際の piperacillin、cefepime、meropenem の抗菌活性を測定した結果、多くの場合、OP0595 の併用濃度である 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が OP0595 単独の抗菌活性を超えていた為、併用抗菌活性は最低設定濃度以下となった。一方、SHV-18 型 ESBL を産生する *K. pneumoniae* ATCC 700603、AmpC 構成型発現の *P. aeruginosa* である MSC17715 及び MSC17716、*Burkholderia cepacia* ATCC 25416 等の OP0595 が抗菌活性を示さない株に対しては OP0595 の β -ラクタマーゼ阻害活性等により、各 β -ラクタム薬の抗菌活性を高め、相乗効果が認められた。

OP0595 の抗菌活性の作用機序を解明する為に、*E. coli* K-12 W3110 株の PBP に対する OP0595 の阻害活性を、薬剤非添加時の Bocillin FL penicillin 結合量から IC_{50} として測定し、avibactam、mecillinam、aztreonam、piperacillin、cefepime、meropenem の阻害活性と比較した (Table 4)。その結果、OP0595 は PBP 2 のみを阻害することが明らかとなり、その阻害活性は avibactam より強く、mecillinam より弱かった。

更に、*E. coli* K-12 W3110 株を用いて、OP0595、mecillinam、cefepime による形態変化を観察した (Fig. 7)。その結果、OP0595 と mecillinam はともに $1\times\text{MIC}$ の濃度で *E. coli* を球形化させた。したがって、OP0595 が、mecillinam の様に PBP 2 阻害により抗菌活性を示すことが示唆された。一方、cefepime は $1\times\text{MIC}$ の濃度で *E. coli* をフィラメント化

させた。これは PBP 3 阻害による Enterobacteriaceae のフィラメント化に特徴的な形態変化である(49)。

(4) OP0595 の増強効果

Enterobacteriaceae のいくつかの菌に対しては mecillinam の様な PBP 2 阻害薬は抗菌活性を示さない(50), (51)。しかし、この様な状態であっても、mecillinam は他の β -ラクタム系薬の抗菌活性を増強させる効果を持つことが知られている(52), (53)。そこで、OP0595 の抗菌活性に耐性化し、かつ、 β -ラクタマーゼを保有しない *E. coli* K-12 W3110 株の変異株を用いて、OP0595 も同様な増強効果を有するかどうかを試験した (Table 5)。OP0595 は β -ラクタマーゼ阻害活性と抗菌活性を有するため、その耐性化が抗菌活性に対するものであるときは「抗菌活性に耐性化」と表現することにする。なお、この変異株は mecillinam に交叉耐性していたが、他の β -ラクタム系薬に対しては交叉耐性をしていなかった。その結果、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OP0595 を併用することで、mecillinam と同じように piperacillin、cefepime、aztreonam の抗菌活性を 4~32 倍以上増強させた。更に、OP0595 の増強効果は OP0595 の併用濃度が上がることで増加した (Fig. 8)。一方、OP0595 の増強効果は meropenem と mecillinam との併用では見られなかった。

3-2 考察

OP0595 は、クラス A、C セリン- β -ラクタマーゼに対して、avibactam と同等かやや弱い阻害活性を示したが、OXA-23 等のクラス D セリン- β -ラクタマーゼに対する阻害活性は弱く、クラス B メタロ- β -ラクタマーゼは阻害しなかった。この結果を詳細に解析する為に、*P. aeruginosa* 由来 AmpC または CTX-M-44 との結晶構造解析を行った結果、OP0595 は avibactam と同様に β -ラクタマーゼの活性部位に存在するセリン残基と共有結合し、そのカルボキシアミド側鎖が活性部位のポケットにおいて水素結合を形成していることが明らかになった。更に、OP0595 のアルキルアミン側鎖の末端アミンは、これらの酵素の活性部位への相互作用にあまり貢献していないことが示唆された。具体的には、このアルキルアミン側鎖は水素結合の形成に関与しておらず、むしろ、活性部位ポケットの底部との弱い疎水性相互作用が示唆されるに留まった。これは avibactam より伸長された OP0595 の側鎖が β -ラクタマーゼ阻害活性を増強していない結果と一致して

いる(47), (48)。しかしながら、OP0595 と avibactam の β -ラクタマーゼ阻害活性を厳密に比較する為には、アシル化や脱アシル化の反応速度パラメータの算出を含む更なる試験が必要である(54)。

OP0595 は多くの Enterobacteriaceae に対して 1~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で抗菌活性を示した為、OP0595 の併用濃度である 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で OP0595 が抗菌活性を示し、併用された β -ラクタム系薬の併用抗菌活性は最低設定濃度以下となった。しかし、*K. pneumoniae* ATCC 700603 及び AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* の様な OP0595 の抗菌活性に耐性化した株については OP0595 の相乗効果が見られ、クラス A、C セリン- β -ラクタマーゼを阻害していることが示された。

OP0595 の抗菌活性の作用機序は PBP 結合親和性測定により、PBP 2 阻害によるものであることが示され、これは mecillinam 及び avibactam と同様であった。更に、OP0595 は、PBP 2 阻害により典型的にみられる *E. coli* の球形化を引き起こした(55), (56)。1980 年代及び 1990 年代には、mecillinam は β -ラクタム系薬の抗菌活性を増強することが幾度も報告されていたが、その作用機序は解明されていない(52), (53), (55), (56)。OP0595 も、OP0595 の抗菌活性に耐性化し、かつ、 β -ラクタマーゼを保有しない *E. coli* に対して piperacillin、cefepime、aztreonam の抗菌活性を増強した。一方、本菌に対して、meropenem または mecillinam は相乗効果を示さなかった。これは meropenem 及び mecillinam は OP0595 と同様に PBP 2 への結合が最も強く、piperacillin、cefepime、aztreonam は PBP 3 に対する結合が最も強いことから説明することができる。これは、Livermore らによっても示されており、クラス A 及び C セリン- β -ラクタマーゼだけでなく、OP0595 が阻害活性を示さないクラス B メタロ- β -ラクタマーゼを保有する Enterobacteriaceae に対しても OP0595 が PBP 2 を第一の標的としない β -ラクタム系薬の抗菌活性を増強した(57)。したがって、PBP 2 を第一の標的としない β -ラクタム系薬に PBP 2 阻害活性を付与することで増強作用が示されることが示唆された。なお、avibactam も PBP 2 への結合が最も強いが、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用濃度では ceftazidime の抗菌活性を増強しなかった。つまり、avibactam の増強効果は、臨床現場では到達不可能な程、高い濃度にてみられる可能性がある。また、Doumith らにより、OP0595 の抗菌活性に耐性化した *E. coli* の遺伝子変異解析から、PBP 2 の遺伝子変異ではなく、緊縮応答を促す二成分制御経路である RpoS 経路の遺伝子変異が見つかっている(58)。これは、mecillinam に対する耐性株の遺伝子変異としても

報告されており、更に、同じく *mecilinam* に対する耐性株の遺伝子変異として報告されている *RcsBC* 経路と同様に、呼吸鎖、リボソーム、システイン合成、tRNA 合成、ピロリン酸代謝に影響を与え、緊縮応答を活性化し、グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の細胞内量を増やし、FtsZ を過剰発現させることで、PBP 2 阻害によって誘導された球形形態での安定した成長を可能にさせている(59), (60)。OP0595 と *mecillinam* の PBP 結合親和性から、これら耐性機序は類似していると予想され、更には、OP0595 と同様に *mecillinam* も OP0595 耐性菌に対して β -ラクタム系薬の抗菌活性を増強させることが示されている(52), (53)。

3-3 小括

OP0595 は以下の 3 つの作用機序、①クラス A 及び C セリン- β -ラクタマーゼ活性部位への共有結合を介した β -ラクタマーゼ阻害作用、②Enterobacteriaceae の PBP 2 を標的とした抗菌作用、③Enterobacteriaceae に対して *mecillinam* と同様に PBP 2 以外の PBP を第一の標的とする β -ラクタム系薬へ PBP 2 阻害作用の付与による抗菌活性の増強作用、を有することが示された。したがって、OP0595 と β -ラクタム系薬との併用により、薬剤耐性を克服する可能性が見出された。本研究で使用された β -ラクタム系薬はすべて OP0595 の併用相手となる可能性を有しており、特に piperacillin、cefepime、aztreonam と OP0595 の併用は OP0595 の 3 つの特徴を全て発揮できる組み合わせであった。

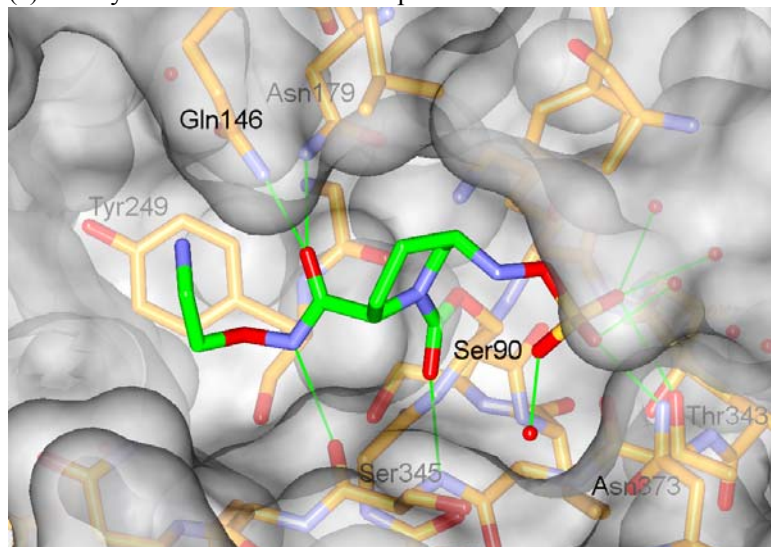
Table 2 Inhibitory activity of OP0595 against various β -lactamases

Enzyme	Molecular class	IC ₅₀ (nM)					
		Diazabicyclooctane structure		Tazobactam		β -lactam structure	
		OP0595	Avibactam	Tazobactam	Clavulanic acid	Sulbactam	Sulbactam
Serine- β -lactamase							
TEM-1	A	26.1	6.97	9.60	49.5	615	
TEM-10	A	95.7	12.9	33.7	4.85	136	
CTX-M-14	A	9.49	2.99	2.92	39.8	464	
CTX-M-15	A	13.1	1.00	1.67	6.16	167	
CTX-M-44	A	22.0	4.40	2.93	23.9	181	
KPC-2	A	869	186	ND ^a	ND	ND	
AmpC of <i>Enterobacter cloacae</i>	C	845	923	5430	>300000	32200	
AmpC of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	271	401	947	>300000	5704	
CMY-2	C	15.0	43.6	723	76100	6550	
OXA-1	D	3050	130	1400	988	5470	
OXA-2	D	1070	485	2.43	230	66.6	
OXA-23	D	46400	2320	957	6460	20800	
Metallo- β -lactamase							
IMP-1	B	>300000	>300000	ND	ND	ND	

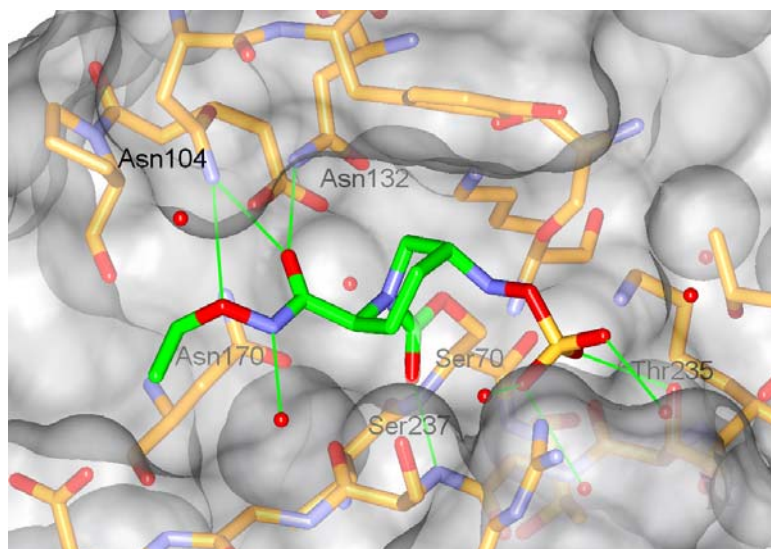
^a ND means not determined.

Carbapenemases are universally agreed to be resistant to clavam and penicillanic acid inhibitors.

(a) Co-crystal of OP0595 with AmpC



(b) Co-crystal of OP0595 with CTX-M-44



(c) Frame format of OP0595 with serine residue of β -lactamase

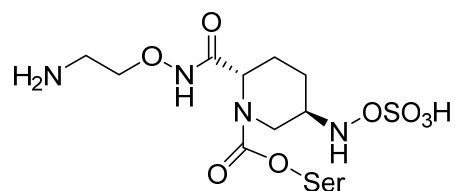


Fig. 6 X-ray crystallographic analyses of co-crystal of OP0595 with AmpC or CTX-M-44 β -lactamases.

OP0595 and neighbouring amino acids within 5 Å are shown as stick models, with their carbon atoms coloured green and yellow, respectively. Water molecules and active-site pockets are displayed by ball and surface models, respectively. Hydrogen bonds are represented by thin green lines. The terminal amine of OP0595 has a flexible conformation in the CTX-M-44 complex.

Table 3 Antimicrobial spectrum of OP0595 alone and in combination with β -lactam agents against Gram-positive and -negative bacteria determined by CLSI agar dilution

Organism, β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a										
	OP0595	Avibactam	Piperacillin	Piperacillin/ OP0595	Piperacillin/ Tazobactam	Cefepime	Cefepime/ OP0595	Meropenem	Meropenem/ OP0595	Ceftazidime	Ceftazidime/ avibactam
Enterobacteriaceae											
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	4	32	1	≤ 0.008	0.5	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.12	0.03
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	2	16	4	≤ 0.008	8	0.06	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	2	0.25
<i>Escherichia coli</i> NBRC 12713 (K-12 W3110)	2	16	1	≤ 0.008	1	0.03	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.12	0.12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	8	4	≤ 0.008	2	0.06	≤ 0.008	0.015	≤ 0.008	0.25	0.06
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, TEM-1	1	16	128	≤ 0.008	0.5	0.03	≤ 0.008	0.015	≤ 0.008	0.06	0.03
<i>Escherichia coli</i> MSC20653, CTX-M-15 + OXA-1	2	16	>128	≤ 0.008	8	64	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	64	0.12
<i>Escherichia coli</i> MSC20662, CTX-M-15	4	16	>128	≤ 0.008	8	64	≤ 0.008	0.06	≤ 0.008	32	0.12
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	4	32	4	≤ 0.008	1	0.03	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.06	0.06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	2	16	1	≤ 0.008	0.03	0.015	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.06	0.06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603, SHV-18	>32	>32	64	0.5	8	1	0.03	0.03	0.015	16	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705, KPC-2	2	8	>128	≤ 0.008	>128	8	≤ 0.008	2	≤ 0.008	32	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1904, KPC-3	2	32	128	≤ 0.008	>128	2	≤ 0.008	2	≤ 0.008	32	0.5
<i>Morganella morganii</i> ATCC 25830	8	>32	≤ 0.008	≤ 0.008	≤ 0.008	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	0.015	≤ 0.008	≤ 0.008
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	>32	32	0.5	≤ 0.008	0.25	0.06	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.06	0.03
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29905	2	32	0.015	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.03	0.03
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	>32	>32	1	0.25	1	0.015	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.12	0.12
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	>32	>32	1	0.12	1	0.06	0.015	0.03	0.015	0.12	0.12
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903	4	16	0.5	≤ 0.008	0.5	0.015	≤ 0.008	0.015	≤ 0.008	0.06	0.06
Glucose non-fermenting gram-negative strains											
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-2093	>32	>32	8	4	$\leq 0.008^c$	4	4	0.25	0.25	2	4
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	16	>32	16	2	16	32	2	4	0.5	4	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>32	>32	4	2	2	1	1	0.25	0.25	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSC17715, AmpC ^b	>32	>32	64	4	64	8	2	4	2	16	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSC17716, AmpC ^b	>32	>32	64	4	16	4	1	8	2	8	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	>32	>32	16	8	8	8	4	128	128	16	16
Gram-positive strains											
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>32	>32	0.12	0.12	0.12	0.5	0.5	0.03	0.06	4	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>32	>32	2	2	2	128	64	4	4	>128	>128
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	>32	>32	8	8	8	>128	>128	8	8	>128	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	>32	>32	1	1	0.5	2	2	0.06	0.12	8	8

^a The combined concentration of β -lactamase inhibitors was fixed at 4 $\mu\text{g/mL}$.

^b AmpC derepressed strain.

^c Inhibition by tazobactam alone.

Table 4 PBP binding activity of OP0595 against *E. coli* K-12 strain W3110

<i>E. coli</i> PBP	IC ₅₀ (µg/mL) ^a						
	OP0595	Avibactam	Mecillinam	Aztreonam	Piperacillin	Cefepime	Meropenem
1a/1b	>8	>8	>8	>8	1.1	2.3	0.73
2	0.12	0.49	<0.008	>8	0.44	0.24	<0.008
3	>8	>8	>8	0.011	<0.008	0.012	0.082
4	>8	>8	>8	>8	6.9	6.6	0.011
5/6	>8	>8	>8	>8	6.3	>8	0.28

^a Concentration of β-lactam that inhibits 50% of Bocillin FL penicillin binding to that PBP compared to a no-drug control.

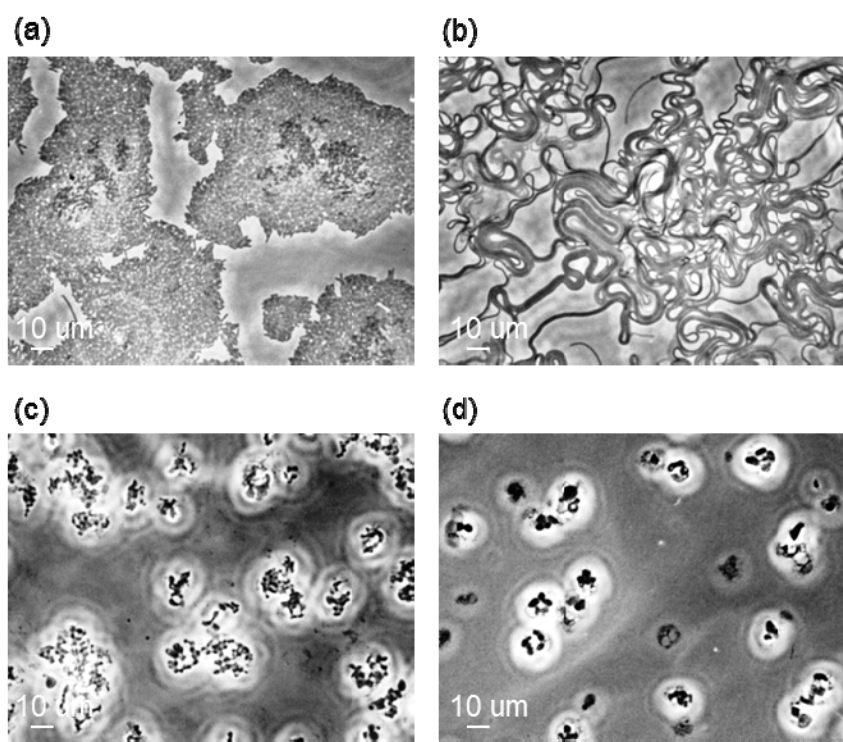


Fig. 7 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 strain W3110 after exposure to OP0595 or β -lactam agents at $1\times$ MIC taken at 4.5 hours after the addition of each compound.

The concentrations of compounds were as follows: (a) antibiotic-free control; (b) $0.03\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of cefepime; (c) $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of OP0595; (d) $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of mecillinam.

Table 5 Antibiotic activity of OP0595 alone and in combination against β -lactamase-negative and OP0595-resistant *E. coli* determined by CLSI broth microdilution

<i>E. coli</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a															
	OP0595	AVI	Piperacillin		Cefepime		Aztreonam		Meropenem		Mecillinam		Ceftazidime			
	Alone	Alone	Alone	+OP	+MEC	Alone	+OP	+MEC	Alone	+OP	+MEC	Alone	+OP	Alone	+AVI	
Parent	2	16	1	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	≤ 0.008	0.06	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	≤ 0.008	0.5	≤ 0.008	0.12
OP0595-resistant	>16	>16	2	0.5	0.12	0.03	≤ 0.008	≤ 0.008	0.12	≤ 0.008	≤ 0.008	0.03	0.03	>8	>8	0.12

^aThe combined concentration of β -lactamase inhibitors was fixed at 4 $\mu\text{g/mL}$.

Abbreviations: OP, OP0595; MEC, mecillinam; AVI, avibactam.

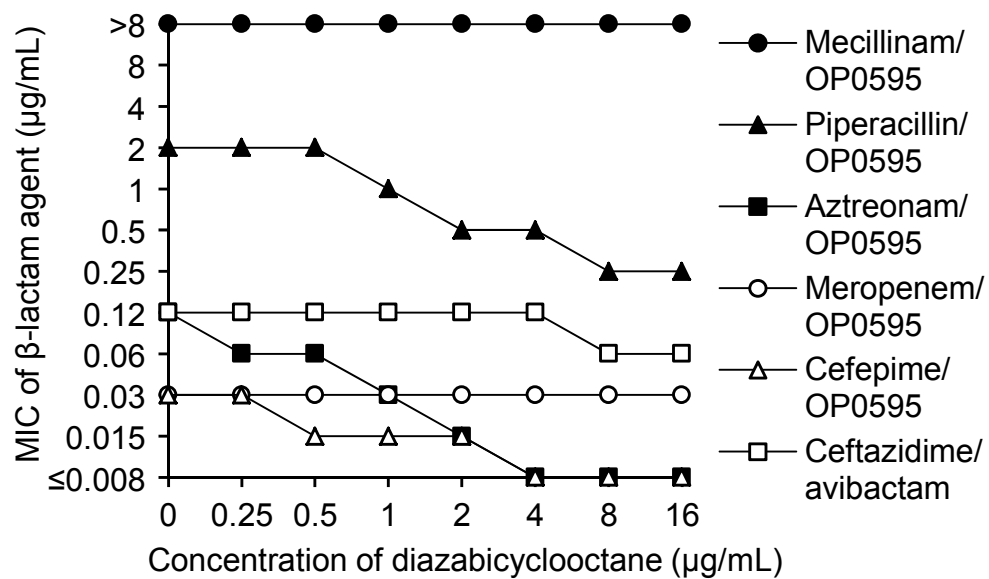


Fig. 8 Activity of OP0595 as an enhancer of the antibiotic activity of various β -lactam agents against a β -lactamase-negative and OP0595-resistant mutant of *E. coli* K-12 W3110.

Symbols: ●, mecillinam/OP0595; ▲, piperacillin/OP0595; ■, aztreonam/OP0595; ○, meropenem/OP0595; △, cefepime/OP0595; □, ceftazidime/avibactam.

第4章 CTX-M-15 陽性の *E. coli* 及び KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対する新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の *in vitro* 及び *in vivo* 活性

第3章では、OP0595 は、Enterobacteriaceae に対して抗菌薬として作用し、さらに、 β -ラクタム系薬増強剤としても作用する β -ラクタマーゼ阻害薬であることから、OP0595 を併用した際の β -ラクタム系薬の抗菌活性を正確に評価できないことが分かった。そこで、OP0595 の抗菌活性の性質や、OP0595 併用時の β -ラクタム系薬の有効性の情報を集める為に、 β -ラクタマーゼ陽性の Enterobacteriaceae を用いた *in vitro* 殺菌試験及び *in vivo* マウス大腿感染モデルの評価を行った。

4-1 実験結果

(1) *In vitro* での併用濃度測定試験

β -ラクタム系薬と併用する際に最適な OP0595 の濃度を評価する為に、様々な濃度の OP0595 を併用した時の piperacillin、cefepime、meropenem の MIC を微量液体希釈法により測定した。CTX-M-15 陽性の *E. coli* 5 株と、KPC 陽性の *K. pneumoniae* 5 株について、それぞれの株に対する MIC の幾何平均値を算出し、OP0595 の併用濃度とともにプロットした (Fig. 9)。その結果、全ての β -ラクタム系薬について、細菌の種類に因らず、OP0595 の併用濃度の増加にしたがって MIC の幾何平均値が減少し、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用濃度で全ての β -ラクタム系薬の MIC が CLSI ガイドラインにおいて Enterobacteriaceae に対して感受性となる濃度に達した(42)。

(2) β -ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対する OP0595 の単独または cefepime 併用による殺菌効果

これまでの結果から、OP0595 の併用濃度である 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が OP0595 単独の抗菌活性を超えている場合が多い為、OP0595 を併用した際の β -ラクタム系薬の MIC は最低設定濃度以下となることが分かった。そこで、cefepime と OP0595 の併用抗菌活性を明らかにする為に、5 株の CTX-M-15 陽性の *E. coli* と、5 株の KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対し

て、cefepime と OP0595 の組み合わせによる殺菌効果を測定した。まず、殺菌試験での参照抗菌活性を測定する為に、それぞれの株に対する cefepime 及び OP0595 の単独または併用時の MIC を微量液体希釈法により測定した (Table 6)。その結果、*K. pneumoniae* ATCC BAA-1899 を除いた 9 株の Enterobacteriaceae に対して OP0595 の MIC は $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ であり、かつ、全ての Enterobacteriaceae に対して OP0595 を $4 \mu\text{g/mL}$ 併用した時の cefepime の MIC は $\leq 0.004 \mu\text{g/mL}$ となった。したがって、OP0595 単独の抗菌活性と cefepime と OP0595 の併用抗菌活性を分けることが難しいことが明らかとなった。そこで、CLSI ガイドラインにおいて cefepime が Enterobacteriaceae に対して感受性となる濃度である $2 \mu\text{g/mL}$ を基準とし、1/8 倍及び 1/2 倍、つまり、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 及び $1 \mu\text{g/mL}$ の cefepime の濃度を用いて殺菌試験を行った(42)。この時、OP0595 の濃度は $1 \mu\text{g/mL}$ 及び $4 \mu\text{g/mL}$ とした。Enterobacteriaceae のうち、CTX-M-15 陽性 *E. coli* MSC20653 と KPC 陽性 *K. pneumoniae* ATCC BAA-1904 に対する殺菌曲線をそれぞれ Fig. 10 に示し、全ての株に対する殺菌効果を Table 7 と Table 8 にまとめた。

OP0595 単独については、*K. pneumoniae* ATCC BAA-1899 を除いた 9 株の Enterobacteriaceae に対する MIC は $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ であったが、殺菌試験では、 $4 \mu\text{g/mL}$ の OP0595 において、薬剤作用開始から 4 または 6 時間後に複数の株の生菌数を減少させたものの、その後に再増殖が起こり、いずれの株に対しても薬剤作用開始から 24 時間後の生菌数は減少させなかった。

Cefepime 単独については、 $1 \mu\text{g/mL}$ の濃度において試験に用いた株の生菌数は減少しなかったが、OP0595 を cefepime に併用することで殺菌効果が生じた。特に $4 \mu\text{g/mL}$ の OP0595 の併用は $0.25 \mu\text{g/mL}$ 及び $1 \mu\text{g/mL}$ の cefepime 両方の条件について殺菌効果を示し、5 株全ての CTX-M-15 陽性 *E. coli* 及び 4 株の KPC 陽性 *K. pneumoniae* に対して、薬剤作用開始時から 24 時間後の生菌数を $3 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 減少させた。*K. pneumoniae* ATCC BAA-1900 では薬剤作用開始時から 24 時間後に再増殖が見られたが、その生菌数は薬剤作用開始時の生菌数よりも 10 倍少なかった。Cefepime の殺菌力は OP0595 の併用濃度により異なり、薬剤作用開始時から 24 時間後の生菌数を $3 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 減少させた株数は $1 \mu\text{g/mL}$ よりも $4 \mu\text{g/mL}$ の併用濃度の方が多かった。

(3) 好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデル

好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデルにより、OP0595 単独及び cefepime との併用による *in vivo* 試験での有効性を明らかにした。好中球が減少した Crlj:CD1 (ICR) マウスの大腿部で増殖することが確認された CTX-M-15 陽性 *E. coli* MSC20662 及び MSC20653、KPC 陽性 *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 及び ATCC BAA-1904 の 4 株を試験株として用い、感染から 24 時間後の生菌数を Fig. 11 に示した。その結果、CTX-M-15 陽性 *E. coli* に対しては、10 mg/kg の cefepime 単独または 2.5 mg/kg の OP0595 単独で治療したマウスの大腿部生菌数は、vehicle 群とほぼ同等であり、生菌数を減らさなかった。一方、cefepime と OP0595 の併用群(それぞれ 5 mg/kg の cefepime と 1.25 mg/kg の OP0595 の併用群と、10 mg/kg の cefepime と 2.5 mg/kg の OP0595 の併用群) では、vehicle 群よりも有意に生菌数を減らした ($p < 0.05$)。

次に、KPC 陽性 *K. pneumoniae* に対しては、10 mg/kg の cefepime 単独または 2.5 mg/kg の OP0595 単独で治療したマウスの大腿部生菌数は、vehicle 群とほぼ同等であり、生菌数を減らさなかった。一方、cefepime と OP0595 の併用群(それぞれ 5 mg/kg の cefepime と 1.25 mg/kg の OP0595 の併用群と、10 mg/kg の cefepime と 2.5 mg/kg の OP0595 の併用群) では、vehicle 群よりも有意に生菌数を減らした ($p < 0.05$)。以上の結果から、好中球減少マウスの大腿部感染モデルにおいて、cefepime と OP0595 はそれぞれ単独投与ではなく、併用投与することで、マウスの大腿部生菌数を減らすことが明らかとなった。

4-2 考察

近年、ceftazidime-avibactam、imipenem-relebactam、ceftrolozane-tazobactam などの β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ阻害薬の合剤に於いて、 β -ラクタマーゼ阻害薬の併用濃度は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にて試験されている(20), (24), (61)。そこで、まず OP0595 の最適な併用濃度を確認する為に、様々な濃度の OP0595 を piperacillin、cefepime、meropenem に併用させ、Enterobacteriaceae である CTX-M-15 陽性の *E. coli* や KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対する MIC を測定したところ、OP0595 の併用濃度の増加にしたがって MIC の幾何平均値が減少し、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用濃度で全ての β -ラクタム系薬の MIC が CLSI ガイドラインにおいて Enterobacteriaceae に対して感受性となる濃度に達した。これは Livermore らの OP0595 を用いた試験と同様であった(62)。つまり、他の β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ阻害

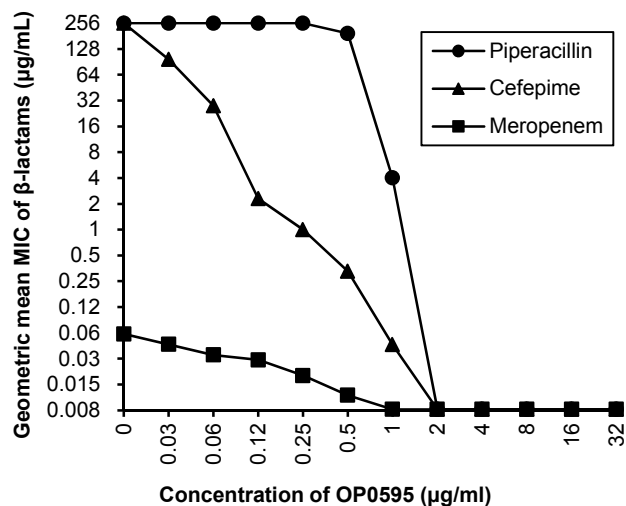
薬の合剤と同じように、*in vitro* 試験では OP0595 は 4 µg/mL の併用濃度で充分であることが示唆された。次に、OP0595 の単独、及び、cefepime と併用した際の殺菌試験を行った。Cefepime は、OP0595 と併用することで CTX-M-15 陽性の *E. coli* や KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対して強い併用抗菌活性を示した為、OP0595 の最も良い組み合わせ β-ラクタム系薬の一つと考えられる。殺菌試験は、通常、試験薬の MIC を基準としてその倍数の濃度を用いるが、OP0595 は自身が抗菌活性を有している為、4 µg/mL の OP0595 を併用した時の MIC をベースとした濃度を用いることが出来ない。そこで、CLSI ガイドラインでの cefepime の Enterobacteriaceae に対する感受性濃度は 2 µg/mL であることを利用し(42)、本濃度より低濃度で cefepime の殺菌作用が生じれば cefepime-OP0595 併用の有効性が確認できると考えた。したがって、本試験では cefepime の感受性濃度を基準として試験濃度を設定した。その結果、cefepime 単独に対して耐性化している CTX-M-15 陽性の *E. coli* や KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対して、OP0595 を併用した cefepime は殺菌効果を示した。これらの結果は、OP0595 が自身の抗菌活性、β-ラクタマーゼ阻害活性、β-ラクタム系薬増強作用によって、cefepime の殺菌活性を回復させたことが示唆された。一方、OP0595 は一部の β-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対しては 4 µg/mL で抗菌活性を示したが、OP0595 単独による殺菌試験では、生菌数の変化は殺菌的ではなく、かつ、全ての菌が再増殖した。これらの所見は、幾つかの Enterobacteriaceae が OP0595 の PBP 2 阻害活性による抗菌活性に耐性化し、これらの耐性株が主のポピュレーションになったことを示唆している。この PBP 2 阻害薬への耐性化は容易に起こり、他の PBP 2 阻害薬である mecillinam においても報告されており、かつ、Doumith らにより、これらの耐性クローンのフィットネスコストが高いことが報告されている(58), (60)。更に、前述の通り、OP0595 耐性 Enterobacteriaceae は、OP0595 の抗菌活性に影響されることなく、OP0595 の β-ラクタマーゼ阻害活性と β-ラクタム系薬増強作用により、β-ラクタム系薬と OP0595 の併用抗菌活性に対して高い感受性を示している。これらの結果をまとめると、OP0595 の抗菌活性は単独では不十分であるが、cefepime の殺菌作用に貢献していることが示された。更に、β-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対する殺菌試験に於いて、OP0595 の β-ラクタマーゼ阻害活性と β-ラクタム系薬増強作用も cefepime の殺菌効果に強く貢献していることが示された。

本章では、CTX-M-15 陽性の *E. coli* や KPC 陽性の *K. pneumoniae* を用い、cefepime を併用相手薬とした試験による OP0595 の *in vivo* データを報告している。OP0595 及び cefepime のそれぞれ単独での治療ではマウス大腿部の生菌数を減少させないが、両者を併用して治療することで、vehicle 群より有意に生菌数を減少させた。この結果から、OP0595 の抗菌活性は単独では不十分であるが、OP0595 の β -ラクタマーゼ阻害活性と β -ラクタム系薬増強作用は cefepime と併用させることで発揮されることが *in vivo* 試験に於いても示唆された。OP0595 の特徴を *in vivo* 試験で明らかにする為には、ヒトでの薬物動態 (PK) を再現する用量設定と、PK/PD 試験が必要である。しかし、PK/PD パラメータを測定する為の OP0595 併用時の β -ラクタム系薬の MIC を測定することは、多くの Enterobacteriaceae に対する OP0595 の抗菌活性が併用濃度と同じ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることから困難となる(62)。最近では、ceftaloline-avibactam、aztreonam-avibactam、ceftolozane-tazobactam の様な β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ阻害薬の併用による PK/PD 試験が *in vitro* 試験や *in vivo* 試験にて行われている(46), (63)-(65)。これらの試験の中には *in vitro* hollow-fiber モデルを用い、一定の濃度の β -ラクタマーゼ阻害薬に、ヒトの PK の β -ラクタム系薬を作用させ、 β -ラクタマーゼ阻害薬の影響を明らかにしているものがある。しかし、この試験系に OP0595 を用いた場合、 β -ラクタマーゼ阻害活性だけでなく、抗菌活性と β -ラクタム系薬増強作用が上乘せされることから、試験結果の解釈が難しいことが予想される。これらの課題の解決には更なる研究が必要である。

4-3 小括

In vitro の殺菌試験及び *in vivo* のマウス大腿感染モデルの両方に於いて、OP0595 の単独の抗菌活性は不十分であるが、cefepime と併用することで cefepime 単独よりも強い有効性を示すことが明らかとなった。これらのデータから、OP0595 と β -ラクタム系薬を併用して使用することは、OP0595 の抗菌活性を発揮させるのに重要であることが示唆された。

(a) CTX-M-15-positive *E. coli*



(b) KPC-positive *K. pneumoniae*

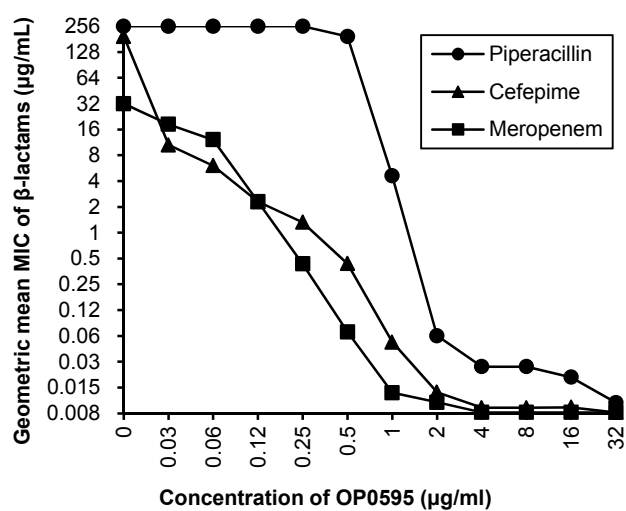


Fig. 9 Antimicrobial activity of β -lactam agents in combination with various concentrations of OP0595 against five strains of CTX-M-15-positive *E. coli* and five strains of KPC-positive *K. pneumoniae*.

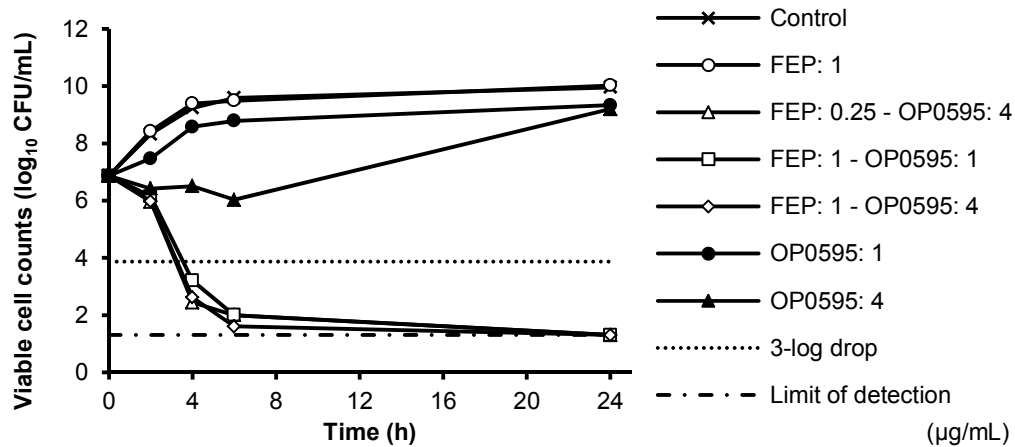
A MIC of $>128 \mu\text{g/mL}$ was counted as $256 \mu\text{g/mL}$ when calculating the geometric mean, and a MIC of ≤ 0.008 as $0.008 \mu\text{g/mL}$.

Table 6 *In vitro* antibacterial activity of cefepime and OP0595 against CTX-M-15-positive *E. coli* and KPC-positive *K. pneumoniae*

Organism	β -Lactamase	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		OP0595	Cefepime	Cefepime-OP0595 ^a
<i>E. coli</i> MSC20613	CTX-M-15	2	>64	≤ 0.004
<i>E. coli</i> MSC20627	CTX-M-15	2	>64	≤ 0.004
<i>E. coli</i> MSC20653	CTX-M-15, OXA-1	2	>64	≤ 0.004
<i>E. coli</i> MSC20662	CTX-M-15	2	>64	≤ 0.004
<i>E. coli</i> MSC20670	CTX-M-15, OXA-1	1	>64	≤ 0.004
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	KPC-2	2	>64	≤ 0.004
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1898	KPC-2	2	64	≤ 0.004
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1899	KPC-2	16	>64	≤ 0.004
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1900	KPC-3	2	64	≤ 0.004
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1904	KPC-3	4	>64	≤ 0.004

^a The combined concentration of OP0595 was fixed at 4 $\mu\text{g/mL}$.

(a) CTX-M-15-positive *E. coli* MSC20653



(b) KPC-positive *K. pneumoniae* ATCC BAA-1904

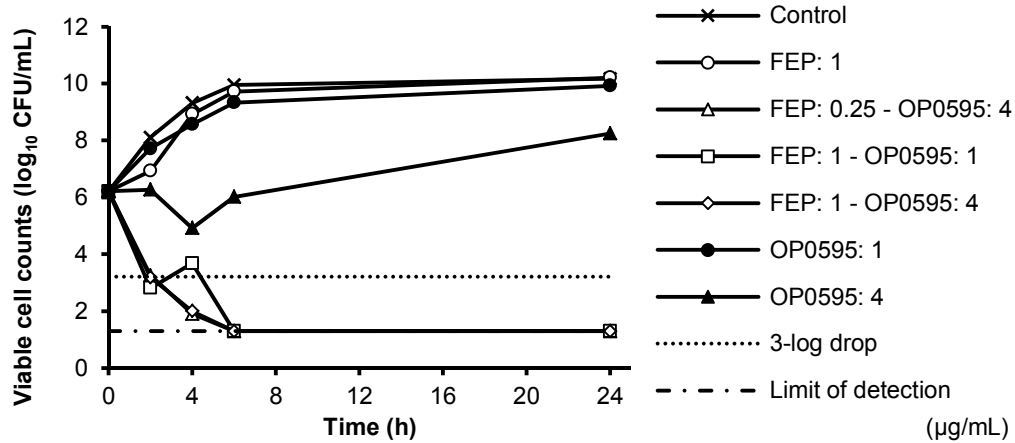


Fig. 10 Time-kill curve of a combination of OP0595 and cefepime against CTX-M-15-positive *E. coli* MSC20653 and KPC-positive *K. pneumoniae* ATCC BAA-1904.

Abbreviations: FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; AVI, avibactam. The detection limit was 1.30 log₁₀ CFU/mL.

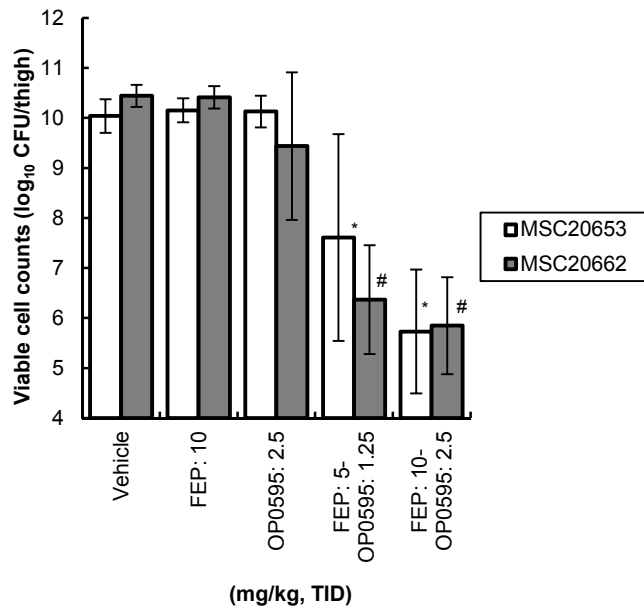
Table 7 Effect of OP0595 on the bactericidal activity of cefepime against CTX-M-15-positive *E. coli*

Concentration of cefepime (µg/mL)	Concentration of OP0595 (µg/mL)	No. of strains reaching the indicated decrease in CFU/mL after the period shown												
		2 h			4 h			6 h			24 h			
		90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	
Growth control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	4	3	3	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1	1	4	2	1	5	5	4	5	5	5	4	4	4	4
1	4	4	2	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	4	1	0	0	2	0	0	4	2	0	0	0	0	0

Table 8 Effect of OP0595 on the bactericidal activity of cefepime against KPC-positive *K. pneumoniae*

Concentration of cefepime (µg/mL)	Concentration of OP0595 (µg/mL)	No. of strains reaching the indicated decrease in CFU/mL after the period shown												
		2 h			4 h			6 h			24 h			
		90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	
Growth control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	4	5	5	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
1	1	5	5	3	5	5	4	5	5	5	3	3	2	
1	4	4	4	3	5	5	5	5	5	5	5	4	4	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	1	0	0	5	2	1	3	1	0	0	0	0	

(a) CTX-M-15-positive *E. coli*



(b) KPC-positive *K. pneumoniae*

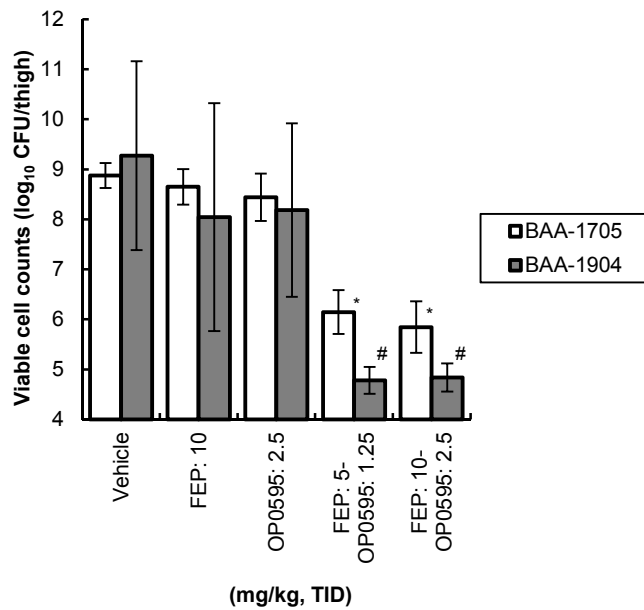


Fig. 11 Comparison of the efficacy between sole and combined administration of β -lactam agents in a neutropenic murine model of thigh infection with CTX-M-15-positive *E. coli* and KPC-positive *K. pneumoniae*.

Abbreviations: FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; AVI, avibactam. Six mice per group were rendered neutropenic, and $6.28 \log_{10}$ CFU/mouse of *E. coli* MSC20653, $6.10 \log_{10}$ CFU/mouse of *E. coli* MSC20662, $5.60 \log_{10}$ CFU/mouse of *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 or $5.49 \log_{10}$ CFU/mouse of *K. pneumoniae* ATCC BAA-1904 was injected into the thigh, followed by subcutaneous administration of the test compounds at 1, 3 and 5 h after infection. The mean \log_{10} CFU per thigh recovered from the infected thigh after 24 h is shown; error bars represent the SD. A P value of <0.05 indicates significance relative to the untreated control (vehicle) and is indicated by an asterisk (*) or a hash (#).

第5章 AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する新規 diazabicyclooctane 化合物 OP0595 の *in vitro* 及び *in vivo* 活性

第3章では、OP0595 は Enterobacteriaceae に対して抗菌活性を有し、さらに、 β -ラクタム系薬増強剤としても作用するセリン- β -ラクタマーゼ阻害薬であることが分かったが、*P. aeruginosa* の様なブドウ糖非発酵菌に対しては、抗菌活性を示さないことが分かった。そこで本章では、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対し、cefepime と OP0595 の併用に関する可能性を *in vitro* 殺菌試験と *in vivo* 感染症モデルにより証明した。

5-1 実験結果

(1) *In vitro* での併用濃度測定試験

β -ラクタム系薬と併用する際に最適な OP0595 の濃度を評価する為に、様々な濃度の OP0595 を併用した時の piperacillin、cefepime、meropenem の MIC を微量液体希釈法により測定した。AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* 3 株について、それぞれの株に対する MIC の幾何平均値を算出し、OP0595 の併用濃度とともにプロットした (Fig. 12)。その結果、全ての β -ラクタム系薬について、OP0595 の併用濃度の増加にしたがって MIC の幾何平均値が減少した。また、いずれの場合も 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用濃度で β -ラクタム系薬の MIC はプラトーに達した。試験に用いた β -ラクタム系薬の中では cefepime で最も MIC の低下が見られた。これらの結果から、*in vitro* 試験での MIC 減少に十分な OP0595 の併用濃度は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、かつ、cefepime は最適な併用相手薬の一つであることが示唆された。一方、AmpC の発現量が野生型レベルである *P. aeruginosa* ATCC 27853 に対する piperacillin、cefepime、meropenem の抗菌活性には OP0595 は影響を与えなかったことから、OP0595 は AmpC 阻害薬として作用したことが示唆された (data not shown)。

(2) AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する OP0595 の単独または cefepime 併用による殺菌効果

Cefepime の抗菌活性に対する OP0595 の併用効果を詳細に評価する為に、3 株の AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する殺菌効果を測定した。まず、殺菌試験での参照抗菌活性を測定する為に、それぞれの株に対する cefepime 及び OP0595 の単独または併用時の MIC を微量液体希釈法により測定した結果、全ての株に対し OP0595 は 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では抗菌活性を示さず、cefepime は弱い抗菌活性を示した (Table 9)。一方、cefepime と OP0595 の併用はこれらの株に対して強い抗菌活性を示し、CLSI ガイドラインでの感受性となった(42)。殺菌試験では OP0595 の β -ラクタマーゼ阻害活性の強さを評価する為に 2 つの OP0595 併用濃度を設定した。Fig. 12 より、適切な OP0595 の併用濃度は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である為、不十分な併用濃度と適切な併用濃度を比較する為に OP0595 の併用濃度は 1 または 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。Cefepime の濃度は CLSI ガイドラインにて緑膿菌に対して感受性と中等度となる 8 または 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。それぞれの AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する殺菌曲線を Fig. 13 に示し、全ての株に対する殺菌効果を Table 10 にまとめた。

16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の cefepime は全ての株に対して生菌数を減少させなかった。一方、OP0595 を併用した場合の 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の cefepime は全ての株にて生菌数を減少させた。特に、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OP0595 の併用により強い殺菌作用が見られた。全ての株に対して薬剤作用開始時と比較し、24 時間目には 3 \log_{10} CFU/ml の生菌数の減少が見られた。対照的に、cefepime 単独、OP0595 単独、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OP0595 と 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の cefepime の併用はどの株に対しても殺菌作用は見られなかった。これらの結果は、OP0595 が AmpC 阻害薬として cefepime の殺菌作用を回復させたことが示唆された。

(3) 好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデル

好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデルにより、OP0595 単独及び cefepime との併用による *in vivo* 試験での有効性を明らかにした (Fig. 14)。好中球が減少した Crlj:CD1 (ICR) マウスの大腿部で増殖することが確認された AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* MSC17715 を試験株として用いた。20 mg/kg の cefepime 単独または 5 mg/kg の OP0595 単独で治療したマウスの大腿部生菌数は、vehicle 群とほぼ同等であり、生菌数を減らさなかった。一方、cefepime と OP0595 の併用群(それぞれ 10 mg/kg の cefepime と 2.5 mg/kg

の OP0595 の併用群と、20 mg/kg の cefepime と 5 mg/kg の OP0595 の併用群)では、vehicle 群よりも有意に生菌数を減らした ($p < 0.05$)。

これらの結果から、OP0595 は AmpC 阻害薬として働き、かつ、OP0595 単独は *in vivo* 試験に於いて抗菌活性を示さないことが示唆された。

5-2 考察

近年、ceftazidime-avibactam、imipenem-relebactam、ceftrolozane-tazobactam などの β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ阻害薬の合剤に於いて、 β -ラクタマーゼ阻害薬の併用濃度は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にて試験されている(20), (24), (61)。第 4 章の結果から、CTX-M-15 陽性の *E. coli* や KPC 陽性の *K. pneumoniae* に対する piperacillin、cefepime、meropenem と併用した OP0595 の最適濃度も 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。本章に於いても同様な結果が得られ、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対し、OP0595 が AmpC 阻害薬として十分に作用する併用濃度も 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることが明らかとなった。

OP0595 は piperacillin 及び cefepime の MIC を下げたが、meropenem の MIC を下げる効果は弱かった。Piperacillin 及び cefepime は AmpC により容易に加水分解されるが、meropenem は AmpC に対して安定であり(66)、これは Fig. 12 に示された結果と一致していた。OP0595 は KPC の様なセリン-カルバペネマーゼを阻害する為、meropenem と OP0595 の併用は KPC 陽性の *P. aeruginosa* 株に対して強い抗菌活性を示すことが期待される。

ヒトに於ける OP0595 の有効性を予測する為には、ヒトの PK を用いた *in vitro* hollow-fiber 殺菌モデルや、マウスの PK を用いたマウス大腿部感染モデルの様な *in vitro* 及び *in vivo* での PK/PD 試験が必要となる。Enterobacteriaceae に対しては、OP0595 は β -ラクタマーゼ阻害薬だけでなく、抗菌薬及び β -ラクタム系薬増強薬として作用してしまう。しかし、本章の結果から、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対しては β -ラクタマーゼ阻害薬としてのみ作用することが *in vitro* の殺菌試験及び *in vivo* のマウス大腿感染モデルの両方の試験に於いて示された。したがって、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* を試験菌として用いることで OP0595 併用時の β -ラクタム系薬の MIC が確定し、PK/PD パラメータが AUC/MIC、 $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 、Time above MIC のどれに相関するかを測定できると考えられる。最近では、ceftaloline-avibactam、aztreonam-avibactam、ceftolozane-tazobactam

の様な β -ラクタム系薬と β -ラクタマーゼ阻害薬の併用による PK/PD 試験が *in vitro* 試験や *in vivo* 試験にて行われている(46), (63)-(65)。例えば *in vitro* hollow-fiber 殺菌モデルは、 β -ラクタマーゼ阻害活性の効果を検討する為に用いられており、これは一定の濃度の β -ラクタマーゼ阻害薬に、ヒトの PK の β -ラクタム系薬を作用させている。OP0595 の効果も AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* を用いることで複雑にせず明らかにでき、臨床試験の為の詳細な情報を得ることができると考えられる。

5-3 小括

OP0595 は *P. aeruginosa* に対しては β -ラクタマーゼ阻害薬として働くことが示された。そして、*in vitro* の殺菌試験及び *in vivo* のマウス大腿感染モデルの両方に於いて、OP0595 は cefepime の抗菌活性を増加させることが明らかとなった。これらの情報は OP0595 が *P. aeruginosa* 感染症を治療する為の新たな β -ラクタマーゼ阻害薬としての可能性を有していることを示している。

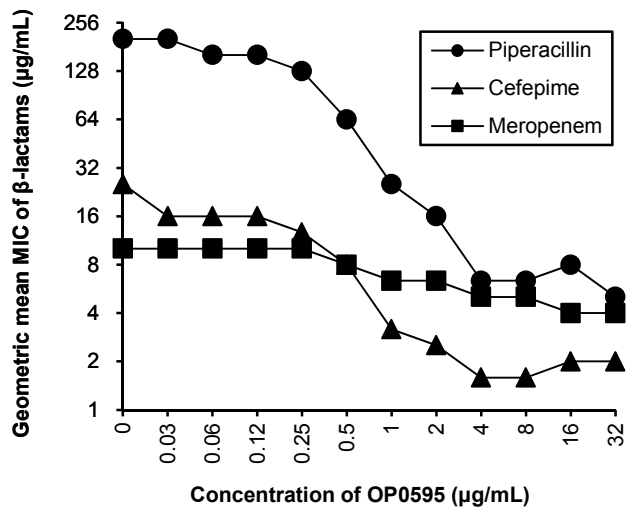


Fig. 12 Antimicrobial activity of β -lactam agents in combination with various concentrations of OP0595 against three strains of AmpC-derepressed *P. aeruginosa*.

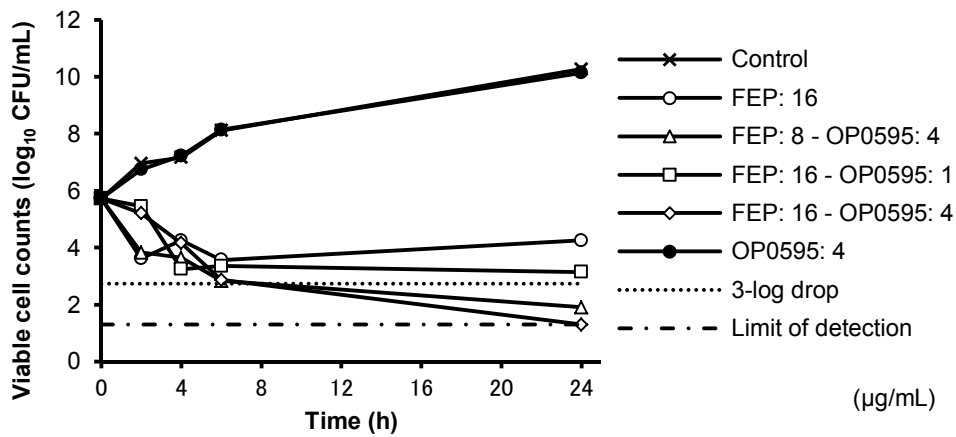
A MIC of $>128 \mu\text{g/mL}$ was counted as $256 \mu\text{g/mL}$ when calculating the geometric mean.

Table 9 *In vitro* antibacterial activity of cefepime and OP0595 against AmpC-derepressed *P. aeruginosa*

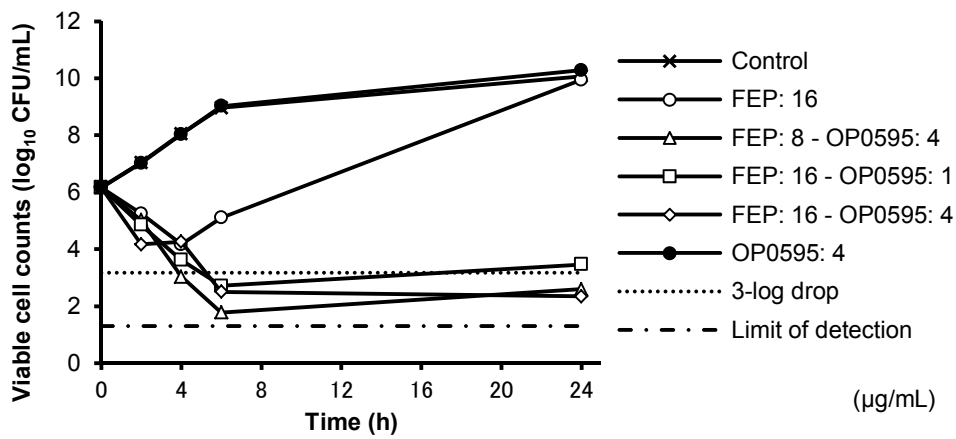
Organism	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	OP0595	Cefepime	Cefepime-OP0595 ^a
<i>P. aeruginosa</i> MSC17689	>16	>64	2
<i>P. aeruginosa</i> MSC17715	>16	32	2
<i>P. aeruginosa</i> MSC17716	>16	16	2

^a The combined concentration of OP0595 was fixed at 4 $\mu\text{g/mL}$.

(a) *P. aeruginosa* MSC17689



(b) *P. aeruginosa* MSC17715



(c) *P. aeruginosa* MSC17716

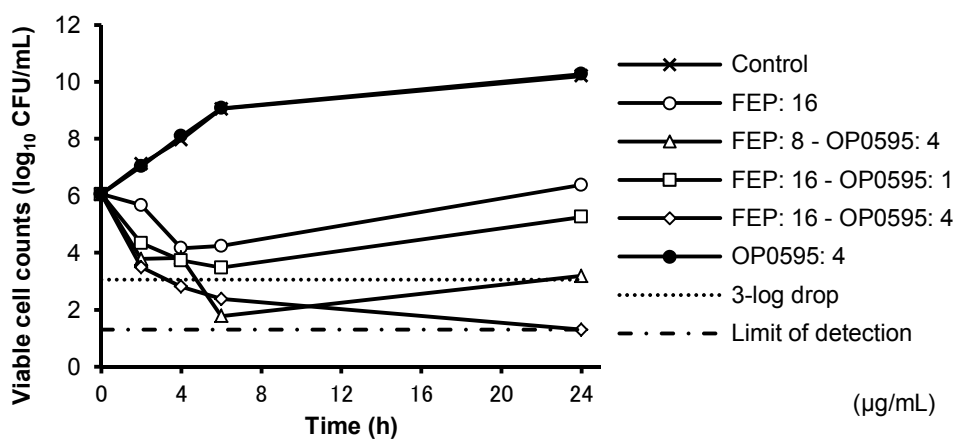


Fig. 13 Time-kill curve of a combination of OP0595 and cefepime against AmpC-derepressed *P. aeruginosa*.

Abbreviation: FEP, cefepime. The detection limit was 1.30 log₁₀ CFU/mL.

Table 10 Effect of OP0595 on the bactericidal activity of cefepime against AmpC-derepressed *P. aeruginosa*

Concentration of cefepime (µg/mL)	Concentration of OP0595 (µg/mL)	No. of strains reaching the indicated decrease in CFU/mL after the period shown											
		2 h			4 h			6 h			24 h		
		90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%	90%	99%	99.9%
Growth control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16		1	1	0	3	1	0	3	1	1	0	0	0
8	1	1	0	0	3	3	0	3	3	3	0	0	0
8	4	3	1	0	3	3	1	3	3	3	3	2	2
16	1	2	0	0	3	3	0	3	3	2	2	0	0
16	4	2	2	0	3	1	1	3	3	3	3	3	3
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

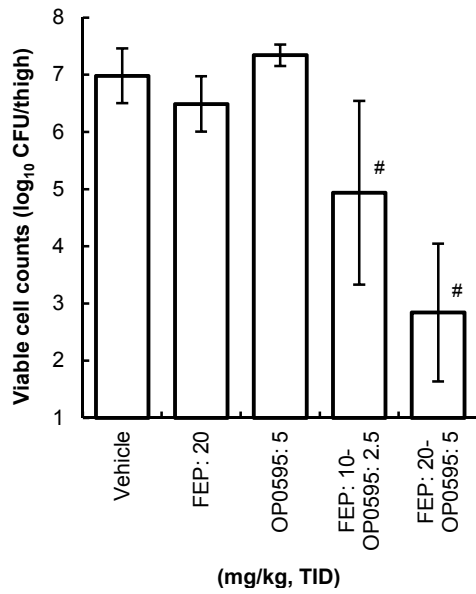


Fig. 14 Comparison of the efficacy between sole and combined administration of β -lactam agents in a neutropenic murine model of thigh infection with AmpC-derepressed *P. aeruginosa* MSC17715.

Six mice per group were rendered neutropenic, and $5.36 \log_{10}$ CFU/mouse of *P. aeruginosa* MSC17715 was injected into the thigh, followed by subcutaneous administration of the test compounds at 1, 3 and 5 h after infection. The mean \log_{10} CFU/thigh recovered from the infected thigh after 24 h is shown; error bars represent the SD. A *P* value of <0.05 indicates significance relative to the untreated control (vehicle) and is indicated by a hash (#). Abbreviation: FEP, cefepime.

第6章 総括

1. 背景・目的

近年、抗菌薬耐性グラム陰性菌は世界的に増加しており、これらの病原菌による感染症に対して有効な抗菌薬が存在しないという問題が生じている。多くの場合、その耐性機構にはβ-ラクタマーゼの産生が含まれており、既存のβ-ラクタマーゼ阻害薬で阻害できず、かつ、β-ラクタマーゼに安定とされてきたセファロスポリン系β-ラクタム、カルバペネム系β-ラクタムさえも加水分解するセファロスポリナーゼ（ESBL、AmpC等）、カルバペネマーゼ（KPC等）が出現している。

Meiji Seika ファルマ株式会社及び Fedora Pharmaceuticals は同時期に独立して新たな diazabicyclooctane 系β-ラクタマーゼ阻害薬 OP0595 を見出し、臨床開発を行っている。OP0595 は同系統の先行品である avibactam とは異なり、抗菌薬及びβ-ラクタム系薬増強薬としても作用するセリン-β-ラクタマーゼ阻害薬である。そこで、本研究の目的は、OP0595 の特徴的な作用である①β-ラクタマーゼ阻害薬、②Enterobacteriaceae に対する抗菌薬、③Enterobacteriaceae に対して幾つかのβ-ラクタム系薬の増強薬としての作用機序を明らかにし、更に、OP0595 の抗菌活性の性質や、PK/PD 試験を実施する為の基礎情報として OP0595 とβ-ラクタム系薬の単独・併用による *in vitro* 殺菌試験及び *in vivo* マウス大腿感染モデルを用いてβ-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae 及び AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する有効性を評価することとした。

2. 結果

2.1. β-ラクタマーゼ阻害活性及びその阻害方法の解析

OP0595 のβ-ラクタマーゼ阻害活性を測定した結果、KPC 及び ESBL を含むクラス A、C セリン-β-ラクタマーゼに対する IC₅₀ 値は全て 1 μM 以下であったが、OXA-23 等のクラス D セリン-β-ラクタマーゼに対する阻害活性は弱く、クラス B メタロ-β-ラクタマーゼは阻害しなかった。この阻害活性を更に解析する為に AmpC または CTX-M-44 の OP0595 との複合体結晶構造を解析した結果、OP0595 は 5 員環のカルボニル-窒素結合を開裂し、β-ラクタマーゼの活性部位に存在するセリン残基と共有結合していることが明らかとなった。

2.2. OP0595 の単独抗菌活性と β-ラクタム系薬増強作用の解析

OP0595 はブドウ糖非発酵菌、プロテウス属、セラチア属、グラム陽性菌に対して抗菌活性を示さなかったが、多くの Enterobacteriaceae に対し、1~8 µg/mL で抗菌活性を示した。その為、ESBL、KPC を発現する Enterobacteriaceae に対し、4 µg/mL の OP0595 を併用した際の piperacillin、cefepime、meropenem の抗菌活性を測定した結果、多くの場合、OP0595 単独で抗菌活性を示した為、併用抗菌活性は最低設定濃度以下となった。OP0595 は *E. coli* K-12 W3110 株の PBP 2 へ特異的に結合し、更に、同株の OP0595 による形態変化が mecillinam と同じく球形であったことから、OP0595 の抗菌活性は mecillinam と同様に PBP 2 阻害によるものであることが示唆された。そこで、OP0595 の抗菌活性に耐性化し、かつ、β-ラクタマーゼを保有しない *E. coli* K-12 W3110 株の変異株を用いて併用抗菌活性を測定した結果、OP0595 は 4 µg/mL の併用により、piperacillin、cefepime、aztreonam の抗菌活性を 4~32 倍以上増強させたが、meropenem 及び mecillinam とは相乗効果を示さなかった。これは piperacillin、cefepime、aztreonam は PBP 3 に対する結合が最も強く、meropenem 及び mecillinam は OP0595 と同様に PBP 2 への結合が最も強いと考えられ、Enterobacteriaceae に対し、OP0595 は PBP 3 を標的とする β-ラクタム系薬の抗菌活性を増強することが明らかとなった。

2.3. β-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対する OP0595 の *in vitro* 及び *in vivo* 活性

OP0595 自体の抗菌活性の性質を解析する為に β-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae を用いて検証した。5 株の CTX-M-15 (ESBL) 陽性 *E. coli* 及び 5 株の KPC 陽性 *K. pneumoniae* を用いて殺菌試験を行った結果、OP0595 単独はいずれの株に対しても薬剤作用開始から 24 時間後の生菌数を減少させなかった。1 µg/mL の cefepime 単独も全ての株に対して生菌数を減少させなかったが、4 µg/mL の OP0595 を併用することで、0.25 及び 1 µg/mL の cefepime は、5 株全ての CTX-M-15 陽性 *E. coli* 及び 4 株の KPC 陽性 *K. pneumoniae* に対して生菌数を 3 log₁₀ CFU/mL 以上減少させた。

次に、マウス大腿部感染モデルにより、OP0595 単独及び cefepime との併用による有効性を明らかにした。CTX-M-15 陽性 *E. coli* 2 株、KPC 陽性 *K. pneumoniae* 2 株試験株として用い、感染から 24 時間後の生菌数を測定した結果、4 株全てについて、OP0595 単

独または cefepime 単独の生菌数は vehicle 群と同等であったが、OP0595 と cefepime の併用群では 3~4 log₁₀ CFU/thigh の生菌数を減少させ、vehicle 群よりも有意に生菌数を減らした。

以上の結果から、β-ラクタマーゼ陽性 Enterobacteriaceae に対して OP0595 は、単独の抗菌活性は不十分であるが、cefepime と併用することで cefepime 単独よりも強い抗菌活性を示すことが明らかとなった。

2.4. AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対する OP0595 の *in vitro* 及び *in vivo* 活性

OP0595 は、*P. aeruginosa* に対して抗菌活性を示さないことから、β-ラクタマーゼ阻害薬として働くかどうかを、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* を用いて検証した。3 株の AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* を用いて殺菌試験を行った結果、OP0595 単独はいずれの株に対しても薬剤作用開始から 24 時間後の生菌数を減少させなかった。16 µg/mL の cefepime も全ての株に対して生菌数を減少させなかったが、4 µg/mL の OP0595 と併用することで、3 株全ての株に対して生菌数を 3 log₁₀ CFU/mL 以上減少させた。

次に、マウス大腿部感染モデルにより、OP0595 単独及び cefepime との併用による有効性を明らかにした。AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* MSC17715 を試験株として用い、感染から 24 時間後の生菌数を測定した結果、OP0595 単独または cefepime 単独の生菌数は vehicle 群と同等であったが、OP0595 と cefepime の併用群では 2~4 log₁₀ CFU/thigh の生菌数を減少させ、vehicle 群よりも有意に生菌数を減らした。

以上の結果から、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対して OP0595 は、単独での抗菌活性を示さず、cefepime と併用することで cefepime 単独よりも強い抗菌活性を示し、β-ラクタマーゼ阻害薬として働くことが示唆された。

3. 考察・結論

OP0595 は以下の 3 つの作用機序、①クラス A 及び C セリン-β-ラクタマーゼ活性部位への共有結合を介した β-ラクタマーゼ阻害作用、②Enterobacteriaceae の PBP 2 を標的とした抗菌作用、③Enterobacteriaceae に対して mecillinam と同様に PBP 2 以外の PBP を第一の標的とする β-ラクタム系薬へ PBP 2 阻害作用の付与による抗菌活性の増強作用、を有することが示された。

β -ラクタマーゼ陽性の Enterobacteriaceae に対する *in vitro* の殺菌試験及び *in vivo* のマウス大腿感染モデルの両方に於いて、OP0595 の単独の抗菌活性は不十分であるが、cefepime と併用することで cefepime 単独よりも強い有効性を示すことが明らかとなった。これらのデータから、OP0595 と β -ラクタム系薬を併用して使用することは、OP0595 の抗菌活性を発揮させるのに重要であることが示唆された。また、AmpC 構成型発現の *P. aeruginosa* に対する *in vitro* の殺菌試験及び *in vivo* のマウス大腿感染モデルの両方に於いて、OP0595 は単独の抗菌活性を示さずに cefepime の抗菌活性を増加させることが明らかとなり、OP0595 は *P. aeruginosa* に対しては β -ラクタマーゼ阻害薬として働くことが示された。したがって、AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* を試験菌として用いることで OP0595 併用時の β -ラクタム系薬の MIC が確定し、PK/PD パラメータが AUC/MIC、 C_{\max} /MIC、Time above MIC のどれに相関するかを測定できると考えられる。以上の研究結果が、これらの臨床試験や上市後の臨床現場における有効性の解釈に貢献できるものと期待される。

掲載論文

本論文は以下の論文を中心にまとめた。

(1) OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine β -lactamase inhibitor, antibiotic and β -lactam 'enhancer'.

Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada M, Suzuki K, Watanabe T, Abe T, Furuuchi T, Inamura S, Sakamaki Y, Mitsuhashi N, Ida T, Livermore DM. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct;70(10):2779-86.

(2) *In vitro* and *In vivo* Activities of OP0595, a New Diazabicyclooctane, against CTX-M-15-Positive *Escherichia coli* and KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae*.

Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada K, Takayama Y, Sakakibara S, Takata T, Abe T, Furuuchi T, Inamura S, Sakamaki Y, Tsujii N, Ida T. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Apr 22;60(5):3001-6.

(3) *In vitro* and *in vivo* activities of the diazabicyclooctane OP0595 against AmpC-derepressed *Pseudomonas aeruginosa*.

Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada K, Takayama Y, Sakakibara S, Takata T, Abe T, Furuuchi T, Inamura S, Sakamaki Y, Tsujii N, Ida T. *J Antibiot (Tokyo).* 2017 Mar;70(3):246-250.

参考文献

- (1) Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Aug 1;6(8). pii: a025247
- (2) Höltje JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):181-203.
- (3) Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jan;42(1):1-17.
- (4) Rosanna G, Alderson, Daniel Barker, John B. O. Mitchell. One origin for metallo- β -lactamase activity, or two? An investigation assessing a diverse set of reconstructed ancestral sequences based on a sample of phylogenetic trees. *J Mol Evol*. 2014; 79(3-4): 117-129.
- (5) Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct;8(4):557-84.
- (6) Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Jan;1277:84-90.
- (7) Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321-31.
- (8) Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989 Mar;33(3):259-63.
- (9) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211-33.

- (10) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969-76.
- (11) Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466-75
- (12) Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011 Jul 1;53(1):60-7.
- (13) Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013 Sep;13(9):785-96.
- (14) Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(7):943-50.
- (15) Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 2013.
- (16) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(12):3322-7.
- (17) Winkler ML, Papp-Wallace KM, Hujer AM, Domitrovic TN, Hujer KM, Hurless KN, Tuohy M, Hall G, Bonomo RA. Unexpected challenges in treating multidrug-resistant Gram-negative bacteria: resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Feb;59(2):1020-9.

- (18) Castanheira M, Mills JC, Farrell DJ, Jones RN. Mutation-driven β -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov;58(11):6844-50.
- (19) 水谷哲、村谷哲郎、松本哲朗、三嶋廣繁、中浜力、大石智洋、岩田敏、尾内一信、青木洋介、斧康雄。2008年から6年間の緑膿菌薬剤感受性サーベイランス成績。第63回日本化学療法学会。2015年6月6日。Abstract O2-24。
- (20) Watkins RR, Papp-Wallace KM, Drawz SM, Bonomo RA. Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Front Microbiol*. 2013 Dec 24;4:392.
- (21) Olsen I. New promising β -lactamase inhibitors for clinical use. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jul;34(7):1303-8.
- (22) Bush K. Game Changers: New β -Lactamase Inhibitor Combinations Targeting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect Dis*. 2018 Feb 9;4(2):84-87.
- (23) Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PR, Denisuik A, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowsky JA. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. *Drugs* 2013 Feb;73(2):159-77.
- (24) Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang J, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jan;55(1):390-4.
- (25) Hirsch EB, Ledesma KR, Chang KT, Schwartz MS, Motyl MR, Tam VH. *In vitro* activity of MK-7655, a novel β -lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Jul;56(7):3753-7.

- (26) Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2013 Oct;68(10):2286-90.
- (27) Livermore DM, Warner M, Jamrozy D, Mushtaq S, Nichols WW, Mustafa N, Woodford N. *In vitro* selection of ceftazidime-avibactam resistance in Enterobacteriaceae with KPC-3 carbapenemase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5324-30.
- (28) EMA（欧州医薬品庁）、FDA（アメリカ食品医薬品局）、PMDA（医薬品医療機器総合機構）。抗菌薬開発促進に向けたEMA-FDA-PMDA 対面会合について。2016年9月1日~2日、ロンドン。2017年4月26日~27日、ウィーン。2017年10月24日~25日、京都。
- (29) Abe T, Furuuchi T, Sakamaki Y, Inamura S, Morinaka A. Novel β -Lactamase Inhibitor and Process for Preparing the Same. Meiji Seika Pharma, WO2013180197.
- (30) Kano A, Koresawa T, Matsumoto K, Ouchi S, Kondo K. First in human study to assess safety, tolerability and pharmacokinetics of β -lactamase inhibitor OP0595. In: Abstracts of the Twenty-fifth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, 2015. Abstract P0236. ESCMID, Basel, Switzerland.
- (31) Maiti SN, Nguyen D, Ling R, Ha CM, Ganguli B, Ou L, Shan R, Singh R, Kully M, Khan J, Salama SM, Parr Jr TR. Design, Synthesis and Structure Activity Relationship of Novel Substituted Amides Containing Diaza Bicyclic Heterocyclic Compounds as Broad-spectrum β -Lactamase Inhibitors. In: Abstracts of Fifty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Denver, CO, 2013. Abstract F1190. ASM, Washington, DC.
- (32) Meiji Seika ファルマ株式会社。ベータラクタマーゼ阻害薬 OP0595 に関するライセンス契約締結のお知らせ。2015年01月13日。
https://www.meiji-seika-pharma.co.jp/pressrelease/2015/detail/150113_01.html

- (33) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Mar 1;184(1):53-6.
- (34) Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol.* 2003 May;52(Pt 5):403-8.
- (35) Tam VH, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Lolans K, Quinn JP, Garey KW. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Apr;13(4):413-8.
- (36) Livermore DM, Mushtaq S, Morinaka A, Ida T, Maebashi K, Hope R. Activity of carbapenems with ME1071 (disodium 2,3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with carbapenemases, including NDM enzymes. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):153-8.
- (37) Iida K, Hirata S, Nakamuta S, Koike M. Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by a new synthetic penicillin, piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978 Aug;14(2):257-66.
- (38) McRee DE. Practical Protein Crystallography. San Diego: *Academic Press.* 1993.
- (39) Vagin A, Teplyakov A. MOLREP. *Appl Cryst.* 1997; 30: 1022–5.
- (40) Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Apr;66(Pt 4):486-501.
- (41) Murshudov GN1, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1997 May 1;53(Pt 3):240-55.

- (42) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement M100-S25. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- (43) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-Tenth Edition: Approved Standard M7-A10. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- (44) Dalhoff A, Nasu T, Okamoto K. Target affinities of faropenem to and its impact on the morphology of gram-positive and gram-negative bacteria. *Chemotherapy*. 2003 Jul;49(4):172-83.
- (45) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; approved guideline M26-A. CLSI, Wayne, PA, USA, 1999.
- (46) Craig WA, Andes DR. *In vivo* activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum β -lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1577-82.
- (47) Lahiri SD, Mangani S, Durand-Reville T, Benvenuti M, De Luca F, Sanyal G, Docquier JD. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclization mechanism: avibactam in complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jun;57(6):2496-505.
- (48) Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PL, McLaughlin RE, Olivier NB, Alm RA. Avibactam and class C β -lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):5704-13.
- (49) Curtis NA, Eisenstadt RL, Turner KA, White AJ. Inhibition of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* K-12. Effects upon growth, viability and outer membrane barrier function. *J Antimicrob Chemother*. 1985 Sep;16(3):287-96.

- (50) Young KD. Why spherical *Escherichia coli* dies: the inside story. *J Bacteriol.* 2008 Mar;190(5):1497-8.
- (51) Laubacher ME, Ades SE. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 2008 Mar;190(6):2065-74.
- (52) Verbist L. *In vitro* activity of the combinations of ampicillin with mecillinam or with beta-lactamase inhibitors against strains resistant to ampicillin. *J Antimicrob Chemother.* 1985 Dec;16(6):719-25.
- (53) Isenberg HD, Sampson-Scherer J, Cleeland R, Titsworth E, Beskid G, Christenson JG, DeLorenzo WF, Unowsky J. Correlation of the results of antibiotic synergy and susceptibility testing *in vitro* with results in experimental mouse infections. *Crit Rev Microbiol.* 1982;10(1):1-76.
- (54) Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Durand-Réville TF, Lahiri S, Thresher J, Livchak S, Gao N, Palmer T, Walkup GK, Fisher SL. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β -lactamases. *J Biol Chem.* 2013 Sep 27;288(39):27960-71.
- (55) Eng RH, Liu R, Smith SM, Johnson ES, Cherubin CE. Amdinocillin: interaction with other beta-lactam antibiotics for gram-negative bacteria. *Chemotherapy.* 1988;34(1):18-26.
- (56) Gutmann L, Vincent S, Billot-Klein D, Acar JF, Mrèna E, Williamson R. Involvement of penicillin-binding protein 2 with other penicillin-binding proteins in lysis of *Escherichia coli* by some beta-lactam antibiotics alone and in synergistic lytic effect of amdinocillin (mecillinam). *Antimicrob Agents Chemother.* 1986 Dec;30(6):906-12.
- (57) Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Woodford N. Interactions of OP0595, a Novel Triple-Action Diazabicyclooctane, with β -Lactams against OP0595-Resistant Enterobacteriaceae Mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov 9;60(1):554-60.

- (58) Doumith M, Mushtaq S, Livermore DM, Woodford N. New insights into the regulatory pathways associated with the activation of the stringent response in bacterial resistance to the PBP2-targeted antibiotics, mecillinam and OP0595/RG6080. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Oct;71(10):2810-4.
- (59) Nanninga N. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Mar;62(1):110-29.
- (60) Thulin E, Sundqvist M, Andersson DI. Amdinocillin (Mecillinam) resistance mutations in clinical isolates and laboratory-selected mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Mar;59(3):1718-27.
- (61) Melchers MJ, van Mil AC, Mouton JW. *In vitro* Activity of Ceftolozane Alone and in Combination with Tazobactam against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4521-5.
- (62) Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. Activity of OP0595/ β -lactam combinations against Gram-negative bacteria with extended-spectrum, AmpC and carbapenem-hydrolysing β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Nov;70(11):3032-41.
- (63) Singh R, Kim A, Tanudra MA, Harris JJ, McLaughlin RE, Patey S, O'Donnell JP, Bradford PA, Eakin AE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of a β -lactam and β -lactamase inhibitor combination: a novel approach for aztreonam/avibactam. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Sep;70(9):2618-26.
- (64) Louie A, Castanheira M, Liu W, Grasso C, Jones RN, Williams G, Critchley I, Thye D, Brown D, Vanscoy B, Kulawy R, Drusano GL. Pharmacodynamics of β -lactamase inhibition by NXL104 in combination with ceftaroline: examining organisms with multiple types of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):258-70.
- (65) VanScoy B, Mendes RE, Nicasio AM, Castanheira M, Bulik CC, Okusanya OO, Bhavnani SM, Forrest A, Jones RN, Friedrich LV, Steenbergen JN, Ambrose PG.

Pharmacokinetics-pharmacodynamics of tazobactam in combination with ceftolozane in an *in vitro* infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2809-14.

- (66) Moya B, Zamorano L, Juan C, Pérez JL, Ge Y, Oliver A. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected *in vitro* and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1213-7.

謝 辞

本論文の作成及び発表にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました北里大学大学院 感染制御科学府・細菌感染制御学研究室の阿部章夫教授・感染制御 免疫学部門長に深く感謝いたします。

本研究は、Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所 医薬研究所 薬理研究室の井田孝志博士の御指導の下に行われたものであり、心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました Meiji Seika ファルマ株式会社の前橋一紀博士、近藤賢一郎博士、吉田卓史氏、そして East Anglia 大学の David M. Livermore 教授、名古屋大学大学院の荒川宜親教授、和知野純一博士に深く感謝いたします。

本研究を行うに当たり、終始御協力頂きました Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所 医薬研究所の設楽永紀博士、阿部隆夫博士、古内剛博士、渡邊尚氏、故 山田雅胤氏、山田恵子氏、坂巻儀晃氏、鈴木健史氏、堤裕子氏、辻井那佳子氏、村瀬えるみ氏、山田亜衣氏、また御協力頂きました後に Meiji Seika ファルマ株式会社を退社された米沢実博士、稲村誠一博士、榊原四郎氏、高山吉弘氏、高田利彦氏、鈴木由美子氏、小出智美氏に感謝申し上げます。

また、多くの御助言、御協力を頂きました Meiji Seika ファルマ株式会社 横浜研究所 医薬研究所、CMC 研究所、三協ラボサービス株式会社の皆様に御礼申し上げます。

最後に、終始御理解と御支援をしてくれた妻 貴子と長男 浩耀に感謝します。