

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

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 ファルマ株式会社は新たな diazabicyclooctane 系 β -ラクタマーゼ阻害薬 OP0595 を見出した (Fig. 1)。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。本研究の目的は、それぞれの作用機序の解析を行うとともに、OP0595 の抗菌活性の性質と β -ラクタム系薬を併用した際の有効性を *in vitro* 殺菌試験と *in vivo* 感染症モデルにより評価し、セリン- β -ラクタマーゼ陽性の Enterobacteriaceae 及び AmpC 構成型発現 *Pseudomonas aeruginosa* に対する有効性を評価することとした。

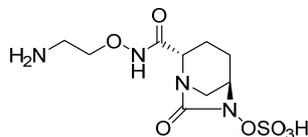


Fig.1 OP0595 の構造

2. 方法

各 β -ラクタマーゼに対する阻害活性は nitrocefin を基質として分光光度計を用いて測定した。*P. aeruginosa* 由来の AmpC と *Escherichia coli* 由来の ESBL である CTX-M-44 を用いた OP0595 との複合体結晶は X 線回折データから解析した。薬剤感受性及び殺菌効果は CLSI に準じて測定した。PBP 結合親和性は、Bocillin FL penicillin を検出試薬として *E. coli* K12 W3110 株の PBP を用いて測定した。*E. coli* K12 W3110 株の化合物添加による形態変化は位相差顕微鏡を用いて観察した。好中球減少マウスを用いた大腿部感染モデルは 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」に基づき行った。

3. 結果

3.1. 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 μ M 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事が明らかとなった (Fig. 2)。

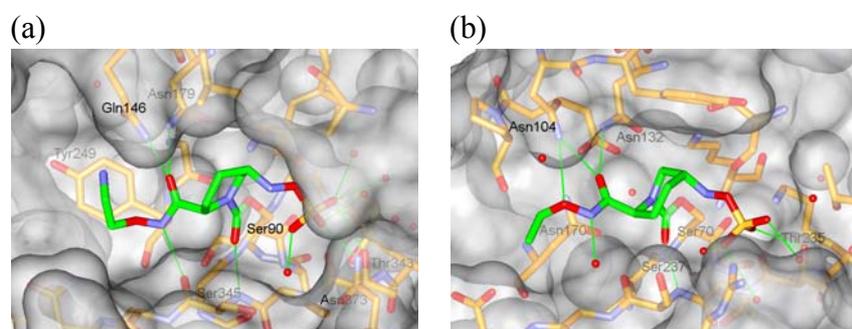


Fig. 2 OP0595 と β-ラクタマーゼ (AmpC (a)、CTX-M-44 (b)) の複合体結晶構造解析

3.2. 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 (PIP)、cefepime (FEP)、meropenem (MEM) 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 (MEC) と同じく球形であった事から、OP0595 の抗菌活性は MEC と同様に PBP 2 阻害である事が示唆された。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、PIP、FEP、aztreonam (AZM) の抗菌活性を 4~32 倍以上増強させたが、MEM 及び MEC とは相乗効果を示さなかった (Table 1)。これは PIP、FEP、AZM は PBP 3 に対する結合が最も強く、MEM 及び MEC は OP0595 と同様に PBP 2 への結合が最も強いためであり、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事が明らかとなった。

Table 1 OP0595 の β-ラクタム系薬増強作用

<i>E. coli</i> K-12 W3110	MIC (μg/mL), OP: 4 μg/mL of OP0595											
	OP0595		PIP		FEP		AZM		MEM		MEC	
	Alone	+OP	Alone	+OP	Alone	+OP	Alone	+OP	Alone	+OP	Alone	+OP
Parent	2	1	≤0.008	0.03	≤0.008	0.06	≤0.008	0.03	≤0.008	0.5	≤0.008	
OP0595-resistant	>16	2	0.5	0.03	≤0.008	0.12	≤0.008	0.03	0.03	>8	>8	

3.3. 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 (Table 2、Table 3)。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の FEP 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OP0595 を併用する事で、0.25 及び 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の FEP 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 FEP との併用による有効性を明らかにした。CTX-M-15 陽性 *E. coli* を 2 株、KPC 陽性 *K. pneumoniae* を 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 FEP 単独の生菌数は vehicle 群と同等であったが、OP0595 と FEP 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 (Fig. 3)。

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、FEP と併用する事で FEP 単独よりも強い抗菌活性を示す事が明らかとなった。

Table 2 CTX-M-15 陽性 *E. coli* (5 株) に対する殺菌試験

Concentration of FEP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentration of OP0595 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. of strains reaching 99.9% decrease in CFU/mL after the period shown			
		2 h	4 h	6 h	24 h
Growth control		0	0	0	0
1	-	0	0	0	0
0.25	4	1	5	5	5
1	1	1	4	5	4
1	4	1	5	5	5
-	1	0	0	0	0
-	4	0	0	0	0

Table 3 KPC 陽性 *K. pneumoniae* (5 株) に対する殺菌試験

Concentration of FEP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentration of OP0595 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. of strains reaching 99.9% decrease in CFU/mL after the period shown			
		2 h	4 h	6 h	24 h
Growth control		0	0	0	0
1	-	0	0	0	0
0.25	4	2	5	5	4
1	1	3	4	5	2
1	4	3	5	5	4
-	1	0	0	0	0
-	4	0	1	0	0

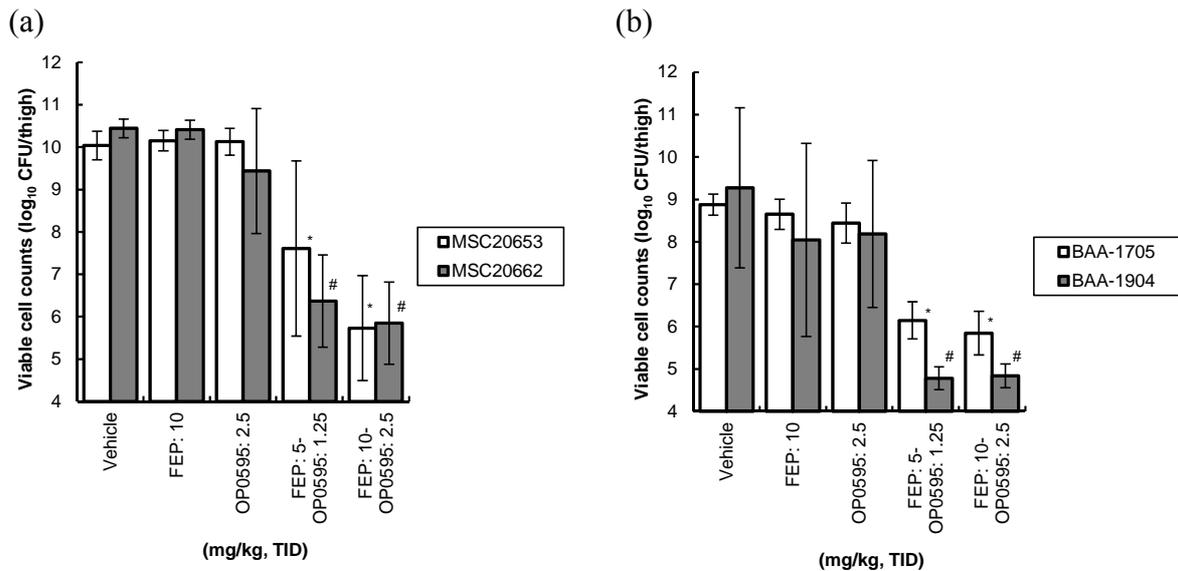


Fig. 3 CTX-M-15 陽性 *E. coli* (a)及び KPC 陽性 *K. pneumoniae* (b)に対するマウス大腿感染モデル

3.4. 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事から、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 (Table 4)。16 μg/mL の FEP 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 と併用する事で、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 FEP 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 FEP 単独の生菌数は vehicle 群と同等であったが、OP0595 と FEP 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 (Fig. 4)。

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、FEP と併用する事で FEP 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事が示唆された。

Table 4 AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* (3 株) に対する殺菌試験

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

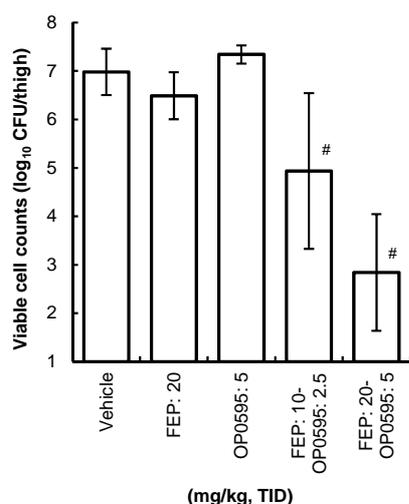


Fig. 4 AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対するマウス大腿感染モデル

4. 考察・結論

OP0595 は、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、Enterobacteriaceae の PBP 2 を標的とした抗菌作用、Enterobacteriaceae に対して 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。*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、Enterobacteriaceae 及び AmpC 構成型発現 *P. aeruginosa* に対して OP0595 は FEP の抗菌活性を増加することが明らかとなり、特に、*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。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。