

耐性菌に有効な新規抗菌薬の創出

Meiji Seika ファルマ株式会社 医薬研究所

井上 洋子

目次	頁
第1章 序論	1
第2章 肺炎球菌由来の penicillin 結合タンパクに対する ME1036 の結合親和性	12
2-1. 背景	12
2-2. 結果	14
(1) ME1036 の <i>S. pneumoniae</i> に対する抗菌力	14
(2) PBPs に対する親和性	16
(3) 短時間殺菌試験	19
2-3. 考察	21
第3章 新規アミノグリコシド系抗菌薬 TS2037 の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 有効性	23
3-1. 背景	23
3-2. 結果	24
(1) 抗菌スペクトル	24
(2) 臨床分離株に対する抗菌力	26
(3) 殺菌効果	28
(4) アミノグリコシド修飾酵素の影響	30
(5) 全身感染モデルにおける予防効果	32
(6) LLC-PK-1 からの N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)放出	34
3-3. 考察	35
第4章 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効な新規リンコマイシン誘導体 compound A の特性評価	38
4-1. 背景	38
4-2. 結果	38
(1) <i>In vitro</i> 抗菌活性	38

(2) 作用機序	42
(3) 耐性菌の出現頻度	44
(4) MRSA 臨床分離株に対する <i>in vitro</i> 抗菌活性	45
(5) マウス皮膚膿瘍モデルに対する <i>in vivo</i> 有効性	46
(6) ミトコンドリア機能抑制	48
4-3. 考察	49
 第5章 総括	 53
 第6章 実験材料と方法	 56
 掲載論文	 66
参考文献	67
謝辞	79

主な略号

AAC :	Aminoglycoside N-acetyltransferase
AAD :	Aminoglycoside-adenyltransferase
AMR :	Antimicrobial Resistance
APH :	Aminoglycoside-phosphotransferase
BHIA :	Brain Heart Infusion agar
CAMHB :	Cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CA-MRSA	Community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ccr :	Cassette chromosome recombinase
CFU :	Colony forming unit
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
ED ₅₀ :	Effective Dose 50%
IC ₅₀ :	50% inhibitory concentration
MHA :	Mueller-Hinton agar
MHB :	Mueller-Hinton broth
MIC :	Minimum inhibitory concentration
MRSA :	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA :	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG :	N-acetyl-β-D-glucosaminidase
PBP :	Penicillin binding protein
PCR :	Polymerase chain reaction
PISP :	Penicillin-intermediate resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PRSP :	Penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PSSP :	Penicillin-susceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SCCmec :	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>

第1章 序論

1928年にイギリスのアレクサンダー・フレミング博士によって penicillin が発見されてから、あらゆる抗菌薬が開発されてきたが、それらに対する耐性菌の出現が後を絶たない。1940年代には penicillin G が量産化されたが、その直後、penicillin を分解するペニシリナーゼ産生黄色ブドウ球菌が現れ、penicillin が効かない penicillin 耐性黄色ブドウ球菌が出現した。1960年にはペニシリナーゼに安定で penicillin 耐性菌にも有効な methicillin が開発されたが、その2年後には methicillin に耐性を示す黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) が出現している。その後も、複数の系統の抗菌薬が開発されたが、薬剤排出ポンプの獲得による抗菌薬の菌体外への排出、薬剤のターゲット部位の修飾、薬剤の修飾など、その都度耐性菌が出現し、人類と細菌の“いたちごっこ”が続いてきた。

米国内では毎年、抗生物質耐性菌に由来する疾患が約200万件発生し、このうち35,900人以件が死亡に至るとされ、年間200億ドル以上の医療費がかさんでいる。この現状をふまえ米国感染症学会が2020年までに10個の耐性菌に有効な新薬を創出するという目標“bad bugs need drugs 10×2020”を掲げた結果、2010年から2019年までに14の抗生物質が利用可能になり、目標が達成された。また、我が国では厚生労働省が2016年から2020年にかけて「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」を掲げ、感染予防や抗菌薬の適正使用だけでなく、新たな予防・診断・治療法等の開発に資する研究の推進を検討している。しかし、それらの効果が検証される予定であった2020年、我々は地球のほぼ全土においてCOVID-19の急激な感染拡大に直面し、未知のウイルスと耐性菌の混合感染のリスクにさらされている。

このような背景を受けて我々は、耐性菌に有効な新規抗菌薬の創出に取り組んできた。その結果、化合物の脂溶性を上げることでグラム陽性菌に対する活性が向上し、また水溶性を付与することでグラム陰性菌における外膜透過性や薬剤排出の影響を軽減できることが分かってきた。しかし、同時にこれら二つのアプローチによりグラム陽性菌とグラム陰性菌に対する抗菌力を両立させることは難しいことから、我々はグラム陽性菌であるMRSAに対して有効な新規抗菌薬の創出に注力することにした。院内感染で問題となる主な多剤耐性菌はMRSAの他にも、penicillin 耐性肺炎球菌 (Penicillin-resistant

Streptococcus pneumoniae : PRSP)、多剤耐性緑膿菌 (Multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*) など、いくつか知られているが、この中でも MRSA は比較的体力のある健康人にも感染する市中感染 MRSA (Community-acquired MRSA: CA-MRSA) としても問題となっている (1)。

MRSA は、薬剤耐性遺伝子を複数含む外来性の DNA 断片である SCC *mec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*) が挿入されたことで多剤耐性を示す (2)。SCC*mec* は *mecA* を含む *mec* gene complex と cassette chromosome recombinase gene complex の組み合わせにより 8 種類に分類されるが、本邦で分離される MRSA の約 90% は、type-2 *ccr* 遺伝子と class A *mec* 遺伝子複合体を持つ type-II SCC*mec* であることが報告されている (3)。SCC*mec* の中にはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* : MSSA) には存在しない新たな細胞壁合成酵素である penicillin-binding protein 2' (PBP2') をコードする *mecA* 遺伝子が含まれる (Figure 1)。この PBP2' の β -ラクタム系抗菌薬に対する結合親和性の低下により、MRSA はカルバペネム系抗菌薬を含む β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すようになった。MRSA は β -ラクタム系抗菌薬以外の既存母核を有する抗菌薬にも耐性遺伝子を獲得し、ニューキノロン系やアミノグリコシド系にも耐性を示す。これまでに、MRSA に有効な抗菌薬として、グリコペプチド系抗菌薬の vancomycin 及び teicoplanin、アミノグリコシド系抗菌薬の arbekacin、オキサゾリジノン系抗菌薬の linezolid 及び tedizolid、環状リポペプチド系抗菌薬の daptomycin の計 6 剤が本邦で承認されている (Figure 2)。しかし耐性菌と人類の戦いは常に続いており、適正使用を前提としても、多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬の創出が望まれる。そこで我々は、作用機序が明らかであり、安全性及びクラスエフェクトについても情報の多い 3 種類の既存母核 (カルバペネム系、アミノグリコシド系及びリンコマイシン系) に注目し、それら既存母核の誘導体の中から MRSA に有効な新規抗菌薬を見出した。本研究では、これらの取り組みから見いだされた代表的な 3 化合物について、MRSA を含む耐性菌に対する有効性と、作用機序の観点からこれら耐性菌に有効性を示す理由を明らかにすることを目的とした。

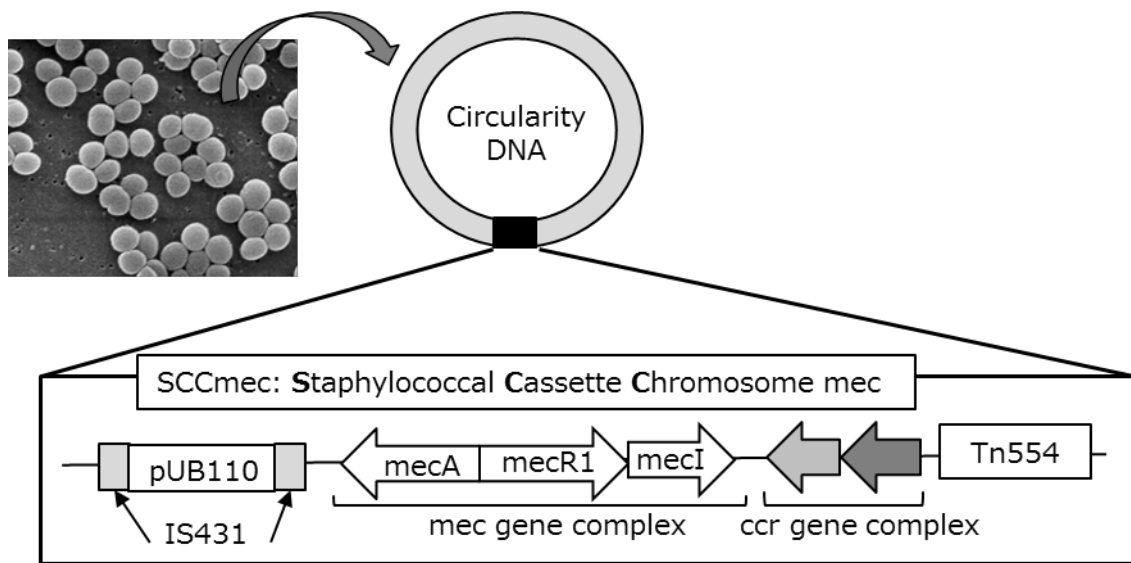


Figure 1 TypeII SCCmec

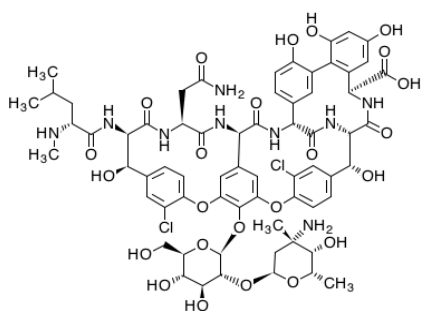
MRSA has acquired SCCmec which includes some resistant genes and it shows resistance against many types of antibiotics. SCCmec is categorized into eight types based on combination of *mec* gene complex and cassette chromosome recombinase (*ccr*) gene complex and Type II SCCmec is major type in Japan. The *mecA* encodes PBP2' and its affinity against β -lactam is lower than other existing PBPs' affinity and MRSA has acquired resistance against β -lactam antibiotics. Tn554 includes spectinomycin resistant gene (*spc*) and erythromycin resistant gene (*erm*). A sequence of pUB110 which is inserted by IS431 includes kanamycin and tobramycin resistant gene (*aadD*) and bleomycin resistant gene (*ble*).

mecA : penicillin binding protein 2'(PBP 2')

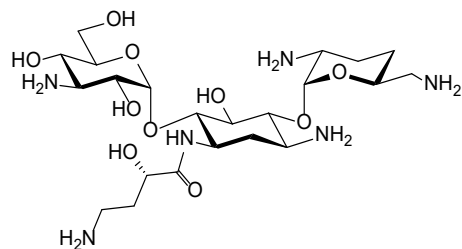
IS431: transposon

Tn554: including spectinomycin resistant gene (*spc*) and erythromycin resistant gene (*erm*)

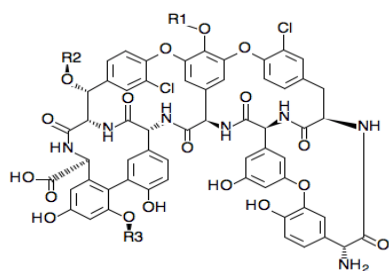
pUB110: including kanamycin and tobramycin resistant gene (*aadD*) and
bleomycin resistant gene (*ble*)



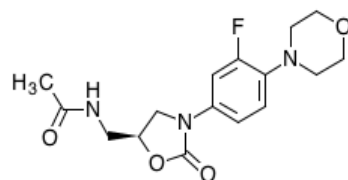
Vancomycin



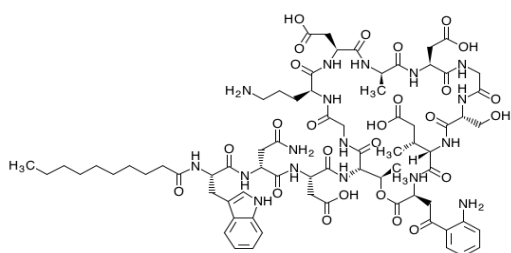
Arbekacin



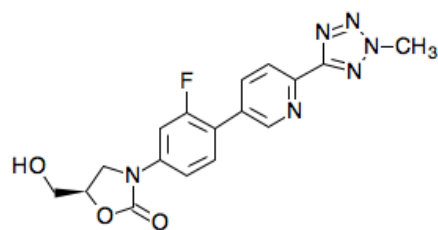
Teicoplanin



Linezolid



Daptomycin



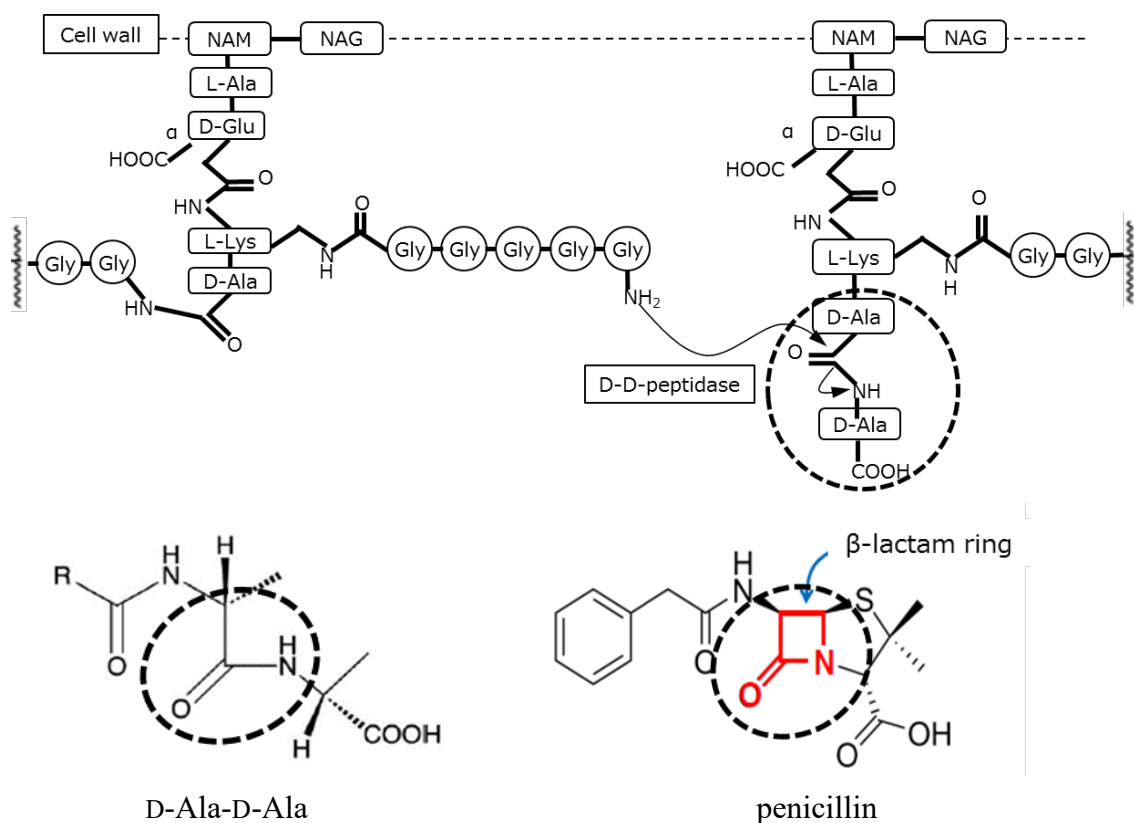
Tedizolid

Figure 2. Anti MRSA drugs launched in Japan

1. カルバペネム系抗菌薬

β -ラクタム系抗菌薬は、細胞壁合成酵素である penicillin binding protein (PBP)が細胞壁の D-Ala-D-Ala に構造の似ている β -ラクタム系抗菌薬の β -ラクタム環に誤って結合することによって抗菌活性を示すことが知られている (Figure 3)。しかし MRSA は新たな細胞壁合成酵素である PBP2'を獲得したことにより β -ラクタム環への親和性が低下し、 β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す。我々は、カルバペネム系母核を展開し、PBP2'に対する親和性が向上し抗 MRSA 活性を有する ME1036 を見出した。そこで、PBP のアミノ酸に変異が入ることで β -ラクタム環への親和性が低下し、結果として β -lactam 系抗菌薬に耐性を示すことが知られている肺炎球菌 (Figure 4) についても、ME1036 の有効性について検討することにした。

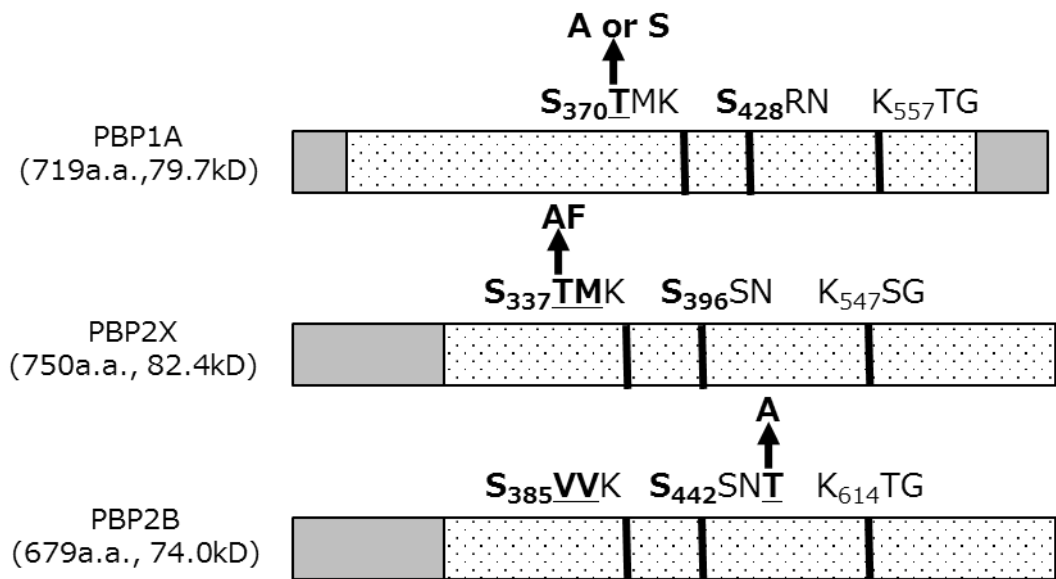
PBP の多様な変異によって耐性を獲得した PRSP は、特に小児や高齢者において中耳炎、髄膜炎、重症肺炎の起因菌として課題となっている。近年ではこれら多剤耐性肺炎球菌に対する予防として、ワクチンの定期接種が導入されている。本邦でも、起因菌として分離頻度の高い血清型を含む 23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン (PPSV23) または沈降 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) の定期接種により肺炎球菌による重症感染症が減っている (4)。しかし、ワクチンではカバーできていない莢膜多糖体抗原血清型 (non-vaccine serotypes: nVT) の肺炎球菌分離率の上昇 (血清型置換: serotype replacement) も報告されており (5)、PRSP に対する有効な抗菌薬が望まれている。我々は、ME1036 が MRSA の PBP2'への親和性が向上したことに着目し、同様に PBP の変異が耐性化に関わっている肺炎球菌においても ME1036 の有効性について調べることにした。本研究では、ME1036 が既存薬よりも PBP2A/2X 及び 2B に対する強い親和性を獲得し、PRSP に対しても強い抗菌力及び殺菌力を有することを示したので報告する。



引用：「酵素反応と化学反応」HP

Figure 3 Mechanism for resistance of MRSA against β -lactam

Penicillin binding protein (PBP), which is one of cell wall synthase, erroneously binds to the β -lactam ring of β -lactam antibiotic whose structure similars to D-Ala-D-Ala and it causes antibacterial activities. On the other hand, PBP2', a new cell wall synthase acquired by MRSA, has low affinity to the β -lactam ring and MRSA acquired resistance to β -lactam antibiotics.



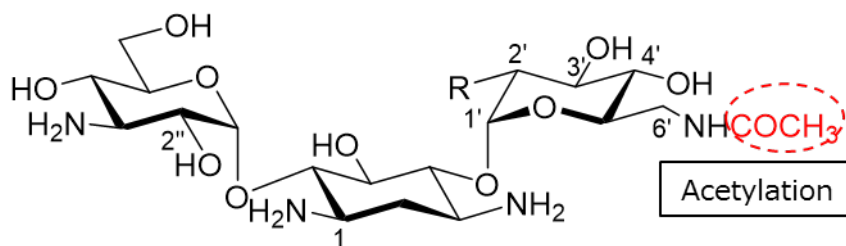
引用：厚生労働省新興・再興感染症研究事業（H22・新興一般-013）

Figure 4 Mechanism for resistance of *Streptococcus pneumoniae* against β -lactam.

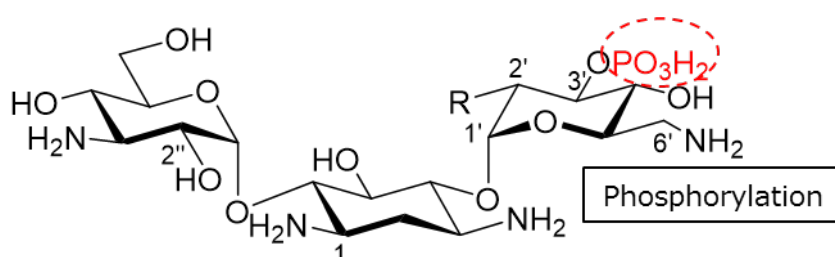
Mutations are easily occurred in dotted area. β -lactam binds to serine of preserved amino acid sequence and mutation near the serine will cause resistance of *S. pneumoniae* against β -lactam.

2. アミノグリコシド系抗菌薬

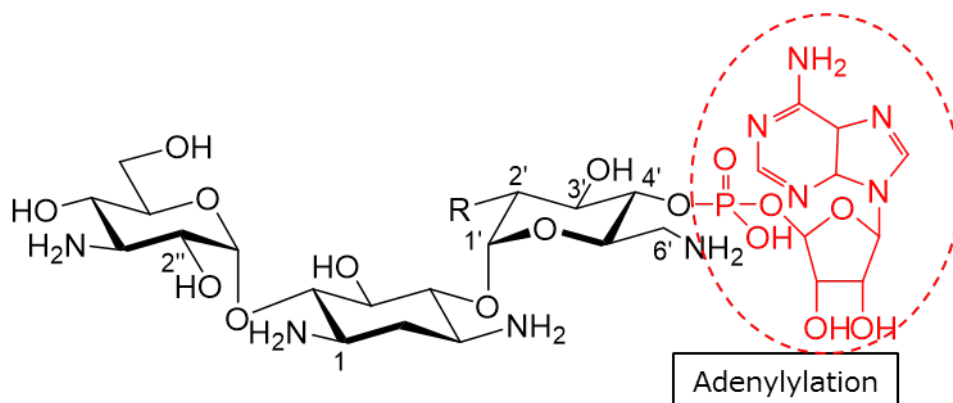
アミノグリコシド系抗菌薬の *arbekacin* は、2008 年に本邦で抗 MRSA 薬として承認されて以来、MRSA 治療薬として貢献を続けている。MRSA のアミノグリコシド系抗菌薬に対する主な耐性機序は、aminoglycoside N-acetyltransferase (*aac*)(6')/ aminoglycoside-2"-O-phosphotransferase (*aph*)(2"), 4',4"-aminoglycoside-adenyltransferase (*aad*)(4',4")及び *aph*(3')-III 遺伝子等によってコードされるアミノグリコシド修飾酵素による不活化である(Figure 5) (6)。本邦で分離頻度の高い MRSA が有する type II SCC mec 上には、メチシリン耐性をコードする *mecA* に加えて、マクロライド-リンコサミド-ストレプトグラミン耐性 (MLS 耐性) をコードする遺伝子 *ermA* 及びスペクチノマイシン耐性遺伝子 *ant*(9)を運ぶトランスポゾン Tn554、及び tobramycin / kanamycin 耐性遺伝子 *aadD* を保持するプラスミド pUB110 が挿入されている (2)。よって、本邦で分離される MRSA の多くが tobramycin や kanamycin に耐性を示すが、*arbekacin* は、(S) -4-amino-2-hydroxybutyric acid (HABA) を置換基として導入することで、MRSA の AAC(6')-APH(2")修飾酵素に対しても安定となり、MRSA にも有効性を示すことが知られている (7)。その一方で、AAC(6')-APH(2")を過剰産生する一部の臨床分離株に *arbekacin* 耐性株がみられることから、我々は *arbekacin* 耐性 MRSA にも有効なアミノグリコシド系抗菌薬の誘導体を探索し、抗 MRSA 活性を改善した TS2037 を見出した。TS2037 は *arbekacin* の 5 位及び 4'位のそれぞれの水酸基をエピ化した 5,4"-diepi-*arbekacin* 誘導体である。本研究では、TS2037 が AAC(6')-APH(2")修飾酵素に *arbekacin* 以上に安定化したことで、MRSA に対して *arbekacin* よりも優れた有効性を有することを示したので報告する。



AAC(6') : Aminoglycoside acetyltransferase (6')



APH(3') : Aminoglycoside phosphotransferase (3')



AAD(4') : Aminoglycoside adenytransferase

引用 : 「感染症・がんの治療薬 抗菌薬の耐性と副作用」 HP

Figure 5 Mechanism for resistance of aminoglycoside antibiotics against MRSA.

Aminoglycoside shows resistance against MRSA because of modification by some types of enzyme which MRSA has acquired.

3. リンコマイシン系抗菌薬

1997年から1999年に米国で広がった CA-MRSA は Panton-Valentine leukocidin と呼ばれる白血球破壊毒素を産生し、遺伝学的には複数の異なったクローンからなりたつ大陸特異的ではあるが、多くの場合 IV 型の SCCmec をもつ (8)。これらの CA-MRSA は clindamycin に感受性を示すこと、及び clindamycin が安全性の高い経口薬であることから、CA-MRSA の治療に幅広く clindamycin が用いられてきた (9)。しかし近年、これら CA-MRSA が clindamycin 耐性遺伝子である構成型の *erm* 遺伝子を獲得したことで、23S rRNA の 2058 番目のアデニンがジメチル化され半数以上が耐性化している (Figure 6)

(10)。Clindamycin と同様に経口投与が可能な抗 MRSA 薬の linezolid 及び tedizolid は、従来の抗 MRSA 薬と異なる作用機序を有し、注射に加え、経口投与も可能であることから、抗 MRSA 薬として汎用されている。しかし長期投与による耐性菌の出現リスクや骨髓抑制の有害事象が課題となっている (11)。我々は、それらの課題を解決する観点から、組織移行性に優れ、経口投与が可能でかつ安全性の高いリンコマイシン系抗菌薬に注目し、合成展開により抗 MRSA 活性を有する compound A を見出した。Compound A は clindamycin 感受性 MRSA に対する活性が向上し、また clindamycin 耐性 MRSA に対しても有効性を示した。本研究において我々は、compound A が clindamycin 感受性の MRSA では linezolid と交差耐性しないが、clindamycin 耐性の MRSA では linezolid と交差耐性する現象を見出したことから、compound A が新たな結合部位を獲得したと仮説を立てた。つまり、MRSA が構成型 *erm* 遺伝子を獲得し clindamycin 耐性となると、compound A は本来の結合部位である 23S rRNA の 2058 番目に結合できなくなるが、7 位側鎖が linezolid 結合部位近傍への親和性を獲得したことで clindamycin 耐性 MRSA にも有効性を示すようになったと考えた。本研究では、上記のように考えた根拠について詳細に説明する。

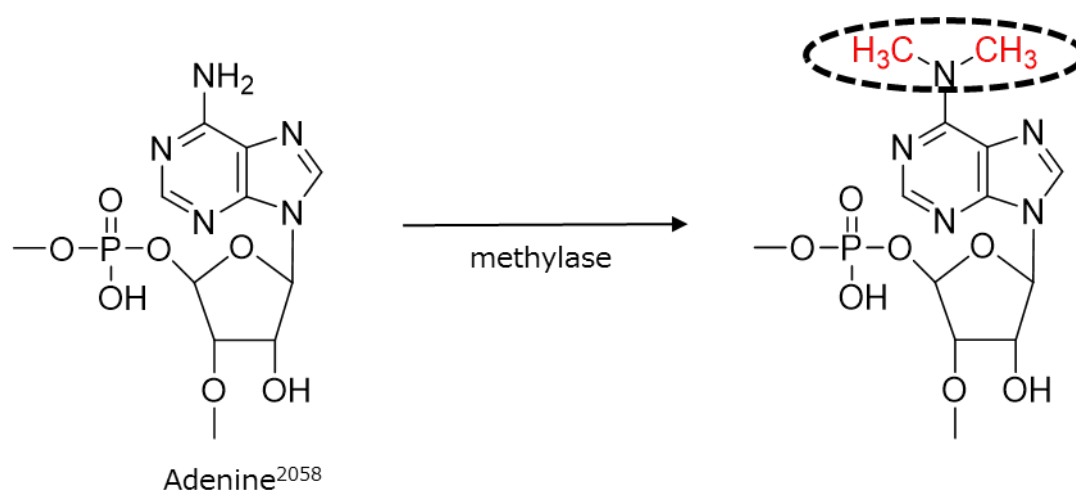


Figure 6 Mechanism for resistance of lincomycin against MRSA

MRSA has acquired resistance against lincomycin because of methylase coded by *erm* (erythromycin resistant methylase) gene which occurs dimethylation at adenine located in 2058 of 23S rRNA.

第2章 肺炎球菌由来の penicillin 結合タンパクに対する ME1036 の結合親和性

2-1. 背景

β -ラクタム系抗菌薬の歴史は、1940 年代後半に臨床で使用されるようになった penicillin に始まる。その後、penicillin が化学的に改良され、グラム陽性菌だけでなくグラム陰性菌にも有効で、かつ penicillin 耐性菌が産生するペニシリナーゼに分解されにくい methicillin など、複数のペニシリン系抗菌薬が開発された。さらに、第 2 の β -ラクタム系抗菌薬である cephalosporin C が発見され、1960 年代より多数のセフェム系抗菌薬が開発された。セフェム系抗菌薬は第一世代～第三世代へと適応菌種が広がり、また利便性の高い経口剤も開発されるようになると、1970 年代後半からはペニシリン系よりも幅広く使われるようになった。1980 年代になるとモノバクタム系抗菌薬が開発され、1990 年代には放線菌 *Streptomyces cattleya* より分離されたチエナマイシンを母核としたカルバペネム系抗菌薬が開発され、 β ラクタマーゼ酸性菌を含む幅広い菌種に強い抗菌力を示すようになった。一方、penicillin 中等度耐性及び耐性肺炎球菌 (Penicillin intermediate-resistant *Streptococcus pneumoniae* : PISP 及び PRSP が欧州で最初に報告されたのは 1970 年代のことである。これらの耐性菌は、1980 年代になると南米やアジアにも広がっていった。一般的に、臨床分離 *S. pneumoniae* の 30~50% は PISP または PRSP である。日本では PISP 及び PRSP は肺炎球菌の 60% 程度分離される (12)。PRSP は、テトラサイクリン系抗菌薬やマクロライド系抗菌薬にも耐性化している。さらに、DNA ジャイレースにも変異を有するフルオロキノロン耐性株も見つかっている (13)。Penicillin、経口セフェム、テトラサイクリン、マクロライド及びキノロンに耐性を示す *S. pneumoniae* の増加は、これらに有効な抗菌薬が減っており、大きな課題となっている。ME1036 (Figure 7) は MRSA や extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* を含め、多剤耐性グラム陽性菌及び緑膿菌以外のグラム陰性菌に有効な幅広い抗菌スペクトラムの注射用カルバペネム系抗菌薬である (14)。ここでは、PBPs の野生型及び変異型に対する ME1036 の親和性とこれら PBPs を有する *S. pneumoniae* に対する有効性の関係性について報告する。

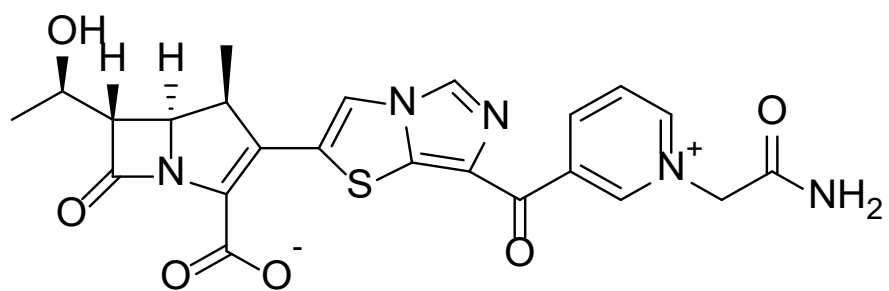


Figure 7 Structure of ME1036

2-2. 結果

(1) ME1036 の *S. pneumoniae* に対する抗菌力

臨床分離 *S. pneumoniae* (129 株) に対する各薬剤の MIC 値ごとの分布を示す (Figure 8)。その分布を、さらに penicillin 耐性に関わる保存アミノ酸の変異数に応じて分類した。すなわち、*pbp1a*、*pbp2x*、*pbp2b* のいずれにも変異があるものを gPRSP、*pbp1a*、*pbp2x*、*pbp2b* のいずれか 1 つまたは 2 つに変異があるものを gPISP、いずれにも変異を有さないものを gPSSP とした。その結果、*S. pneumoniae* に対する ME1036、ceftriaxone 及び panipenem の抗菌力は、*pbp1a*、*pbp2x* 及び *pbp2b* の変異に影響を受け、変異数が多い株ほど低感受性側に分布した。しかし、ME1036 の MIC₁₀₀ は 0.03 µg/mL であり、他の薬剤のそれに比べて大いに小さかった (Table 1)。一方、セフトリアキソンの抗菌力は特に *pbp2x* の変異に大きく影響を受け、また MIC₁₀₀ は 4 µg/mL であった。

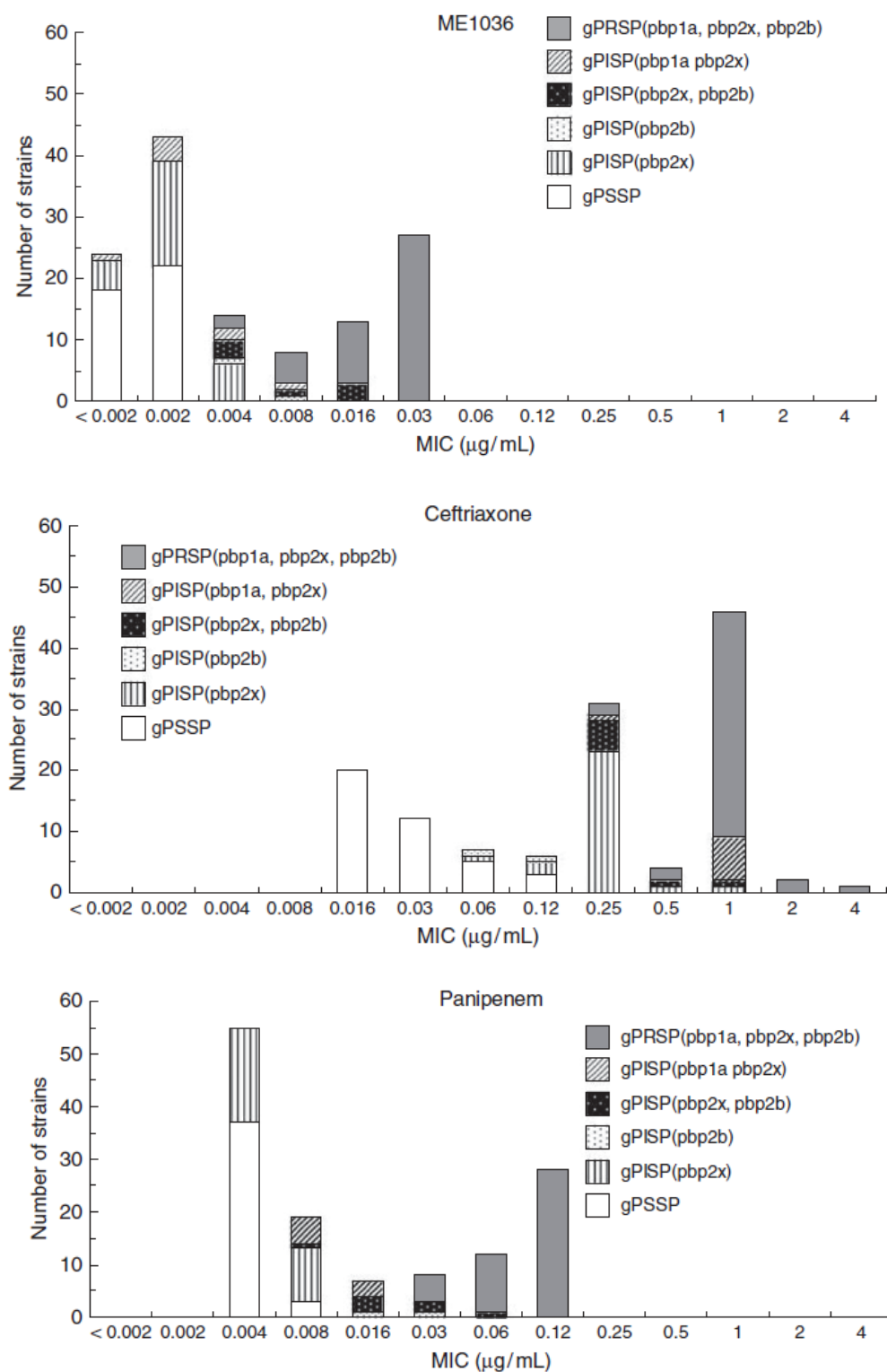


Figure 8 Distribution of clinical isolates of *S. pneumoniae* sorted by MIC values of ME1036, ceftriaxone and panipenem.

Table 1 Susceptibilities of *S. pneumoniae* isolates (n=129) to various antibiotics

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC Range		
ME1036	0.002	0.03	<0.002	-	0.03
Meropenem	0.03	0.5	0.008	-	0.5
Panipenem	0.008	0.12	0.004	-	0.12
Cefotaxime	0.25	1	0.016	-	4
Ceftriaxone	0.25	1	0.016	-	4
Penicillin	0.06	2	0.016	-	4
Amoxicillin	0.06	2	0.008	-	2
Vancomycin	0.5	0.5	0.25	-	0.5
Levofloxacin	1	1	0.25	-	2

(2) PBPs に対する親和性

Penicillin susceptible *S. pneumoniae* (PSSP)である *S. pneumoniae* R6 及び PRSP である *S. pneumoniae* 197 の PBPs に対する ME1036 及び他の抗菌薬の IC₅₀ を決定するための蛍光標識を Figure 9 及び Figure 10 に、該当する IC₅₀ 値は Table 2 及び Table 3 に各々示す。*S. pneumoniae* R6 由来の PBP2A/2X 及び PBP2B に対する ME1036、imipenem 及び panipenem の結合親和性は、ceftriaxone のそれらよりも強かった。*S. pneumoniae* 197 由来の PBP2A/2X に対するカルバペネム系抗菌薬の強い親和性は MIC 値と相関し、ME1036 は最も強い親和性と強い抗菌力を示した。また、*S. pneumoniae* 197 由来の PBP1A、PBP1B 及び PBP2B に対するカルバペネム系抗菌薬の IC₅₀ 値は、それらに対する ceftriaxone の値よりも小さかった。

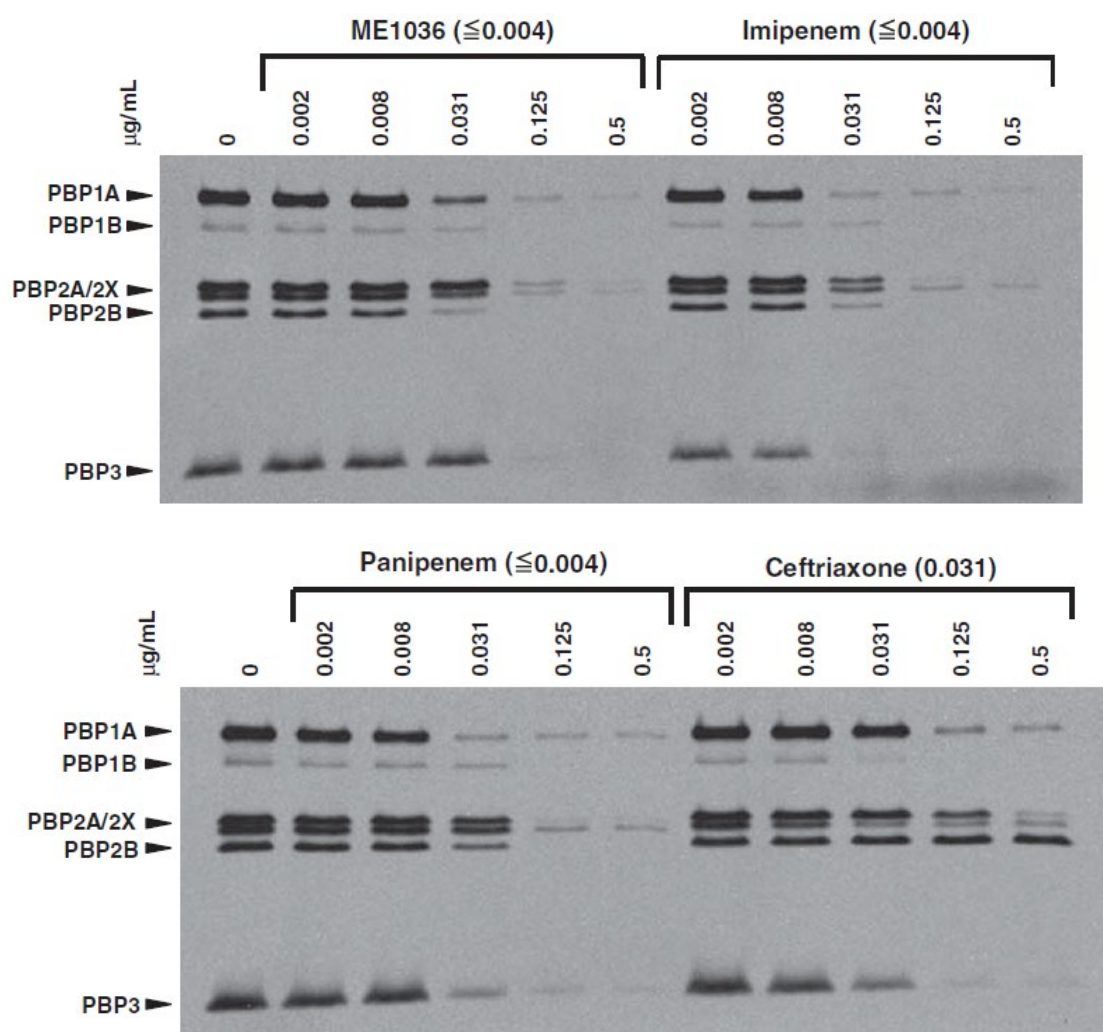


Figure 9 Fluorograms of complexes of (^3H)-benzylpenicillin and PBPs from *S. pneumoniae* R6, a PSSP, that had been pretreated with various β -lactams. The MIC values ($\mu\text{g/mL}$) are shown in parentheses.

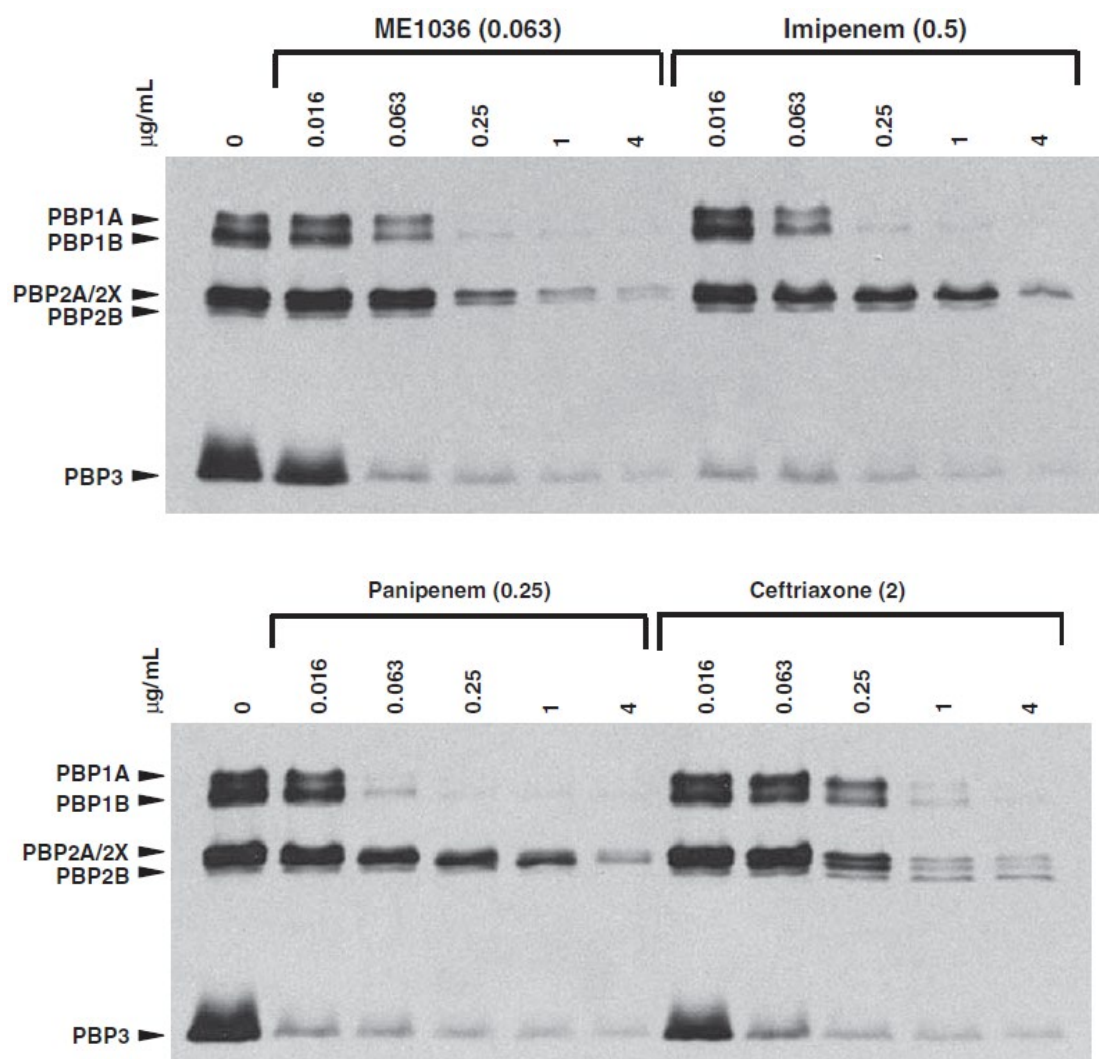


Figure 10 Fluorograms of complexes of (^3H)-benzylpenicillin and PBPs from *S. pneumoniae* 197, a PRSP, that had been pretreated with various β -lactams. The MIC values ($\mu\text{g/mL}$) are shown in parentheses.

Table 2 Antibiotic-binding affinities for PBPs from the *S. pneumoniae* R6, a PSSP

Antibiotic	IC ₅₀ (μg/mL)					MIC (μg/mL)
	PBP1A	PBP1B	PBP2A/2X	PBP2B	PBP3	
ME1036	0.033	0.023	0.073	0.022	0.061	0.001
Imipenem	0.016	0.024	0.050	0.017	0.012	0.004
Panipenem	0.017	0.033	0.064	0.033	0.021	0.002
Ceftriaxone	0.079	0.017	0.23	>0.5	0.035	0.031

Abbreviation: PBPs, penicillin-binding proteins. PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*.

Table 3 Antibiotic-binding affinities for PBPs from *S. pneumoniae* 197, a PRSP

Antibiotic	IC ₅₀ (μg/mL)					MIC (μg/mL)
	PBP1A	PBP1B	PBP2A/2X	PBP2B	PBP3	
ME1036	0.093	0.046	0.19	0.074	0.028	0.06
Imipenem	0.094	0.065	1.1	0.62	<0.016	0.5
Panipenem	0.028	0.030	0.62	0.52	<0.016	0.25
Ceftriaxone	0.41	0.12	0.32	>4	0.028	2

Abbreviation: PBPs, penicillin-binding proteins; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*.

(3) 短時間殺菌試験

S. pneumoniae 197 に対する ME1036 及び他のカルバペネム系抗菌薬の短時間殺菌力を Figure 11 に示す。MIC 以上の濃度では、ME1036 は薬剤接種後 4 時間以内に 99.9%以上殺菌した。逆に、imipenem や panipenem においては、接種後 4 時間以内に ME1036 の MIC 以上の濃度を作用させた場合と同程度の殺菌効果を示すのに 4MIC 以上の薬剤濃度が必要であった。また、ceftriaxone は 4MIC 濃度で 6 時間作用させても殺菌効果を示さなかった。

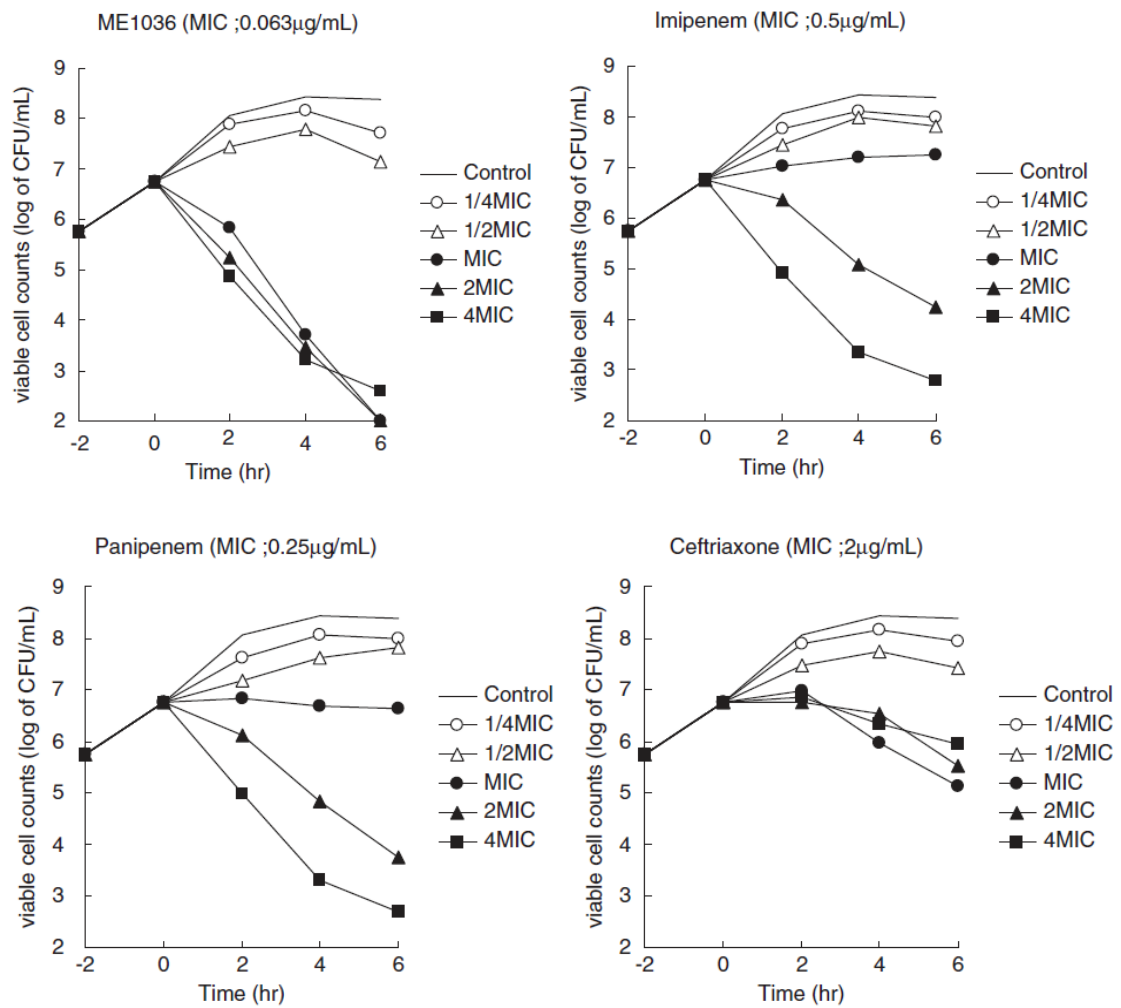


Figure 11 The degree of antibiotic bactericidal activity vs time for ME1036 and other β -lactams assessed with *S. pneumoniae* 197, a PRSP.

2-3. 考察

我々は ME1036 がブロードスペクトラムを有する抗菌薬であり、MRSA 及び PRSP のみならず、*E. coli* 及び extend-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* にも強い抗菌力を示すことを見出した (14)。ヒト及びマウスの血清蛋白に対する ME1036 の結合率は各々、11.5%及び 46.0%であり、*in vivo* 評価系においても優れた有効性を示した (15-18)。また、非臨床においては安全性の高いプロファイルを示した (19)。

ここで報告した通り、ME1036 は *pbps* に変異を有し、 β -lactam に耐性を示す遺伝子型 PRSPs (gPRSPs) に強い抗菌力を示した。特に gPRSP 由来の PBP1A、PBP2X 及び PBP2B に対する強い結合親和性が強い抗菌力を引き出すと考えられた (20)。遺伝子型 PSSP (gPSSP) 及び gPRSP の各 PBPs に対する結合親和性を他剤と比較すると、PBPs に対する ME1036 の親和性はその MIC と相関していた。ゆえに、ME1036 の強い抗菌力は、PBPs への強い親和性によるものと考えられた。カルバペネム系抗菌薬の C-2 側鎖と PBPs の保存配列である Trp 及び Thr 残基間の相互作用が、カルバペネム系抗菌薬の PBPs への結合に重要な役割を持つと報告されている (21)。結晶構造によると、カルバペネム系抗菌薬の C-2 側鎖は PBP2X の Trp374 及び Thr526、PBP1A の Trp411 及び Thr543 の側鎖と非極性相互作用をしていることが明らかとなっている。ME1036 は C-2 側鎖に imidazo[5,1-*b*]thiazole 構成を有しており、それが PBP1A 及び PBP2X の Trp 及び Thr 残基と相互作用し、結果として強い親和性をもたらすと考えられる。PBP2B の該当する箇所も同様に Trp 及び Thr 残基を有していることを考慮すれば (22)、これら 3 つの PBPs 全てに対する ME1036 の強い親和性が ME1036 の C-2 側鎖が関与する同一または類似の非極性相互作用の結果である可能性がある。一方、PBP1A、PBP2X 及び PBP2B への抗菌薬の結合親和性は肺炎球菌に対する抗菌活性にとって重要と考えられている (23)。PBPs への抗菌薬の結合親和性と抗菌活性の相関性はまだ明確に証明されていないが (24)、gPRSPs を含む肺炎球菌に対する ME1036 の強い抗菌活性は PBPs に対するその強い親和性によるものと示唆された。薬剤耐性肺炎球菌は通常、患者の痰、咽頭、鼻腔または耳漏、及び子供の咽頭炎の影響を受けた組織または中耳炎から分離される。PRSP の主な血清型は 6、9、14、19 及び 23 型であり、確定的な検証はできていないが、これらは若年層または小児期に髄膜炎を引き起こす可能性がある。PRSP の主な血清型に対するワクチン接種は広く活用されているが、PRSP による感染はいまだ懸念されており、医学的介入が望まれる (25-27)。結論として、我々は ME1036 が MRSA だけでなく PRSP を含む肺炎連鎖球菌に対して強い抗菌力を有し、それが PBP に対して強い親和性を持っていることに起因することを示唆する結果を示した。

広域スペクトル及び強力な殺菌活性を有する非経口カルバペネムの医学的必要性は依然として大きく、そのため抗菌薬のさらなる開発が必要である。

第3章 新規アミノグリコシド系抗菌薬 TS2037 の *in vitro* 及び *in vivo* 有効性

3-1. 背景

近年、抗生物質耐性株による感染症が臨床分野で深刻な問題となっている。特に、MRSA は院内感染の主な原因菌である (28-32)。近年、市中感染 MRSA (CA-MRSA) が市中に急速に広がり、若年の健常人に深刻な感染症を引き起こしている (32-34)。一方、薬剤耐性緑膿菌を含むグラム陰性菌による感染は、院内感染で大きな懸念となっているが (35)、これらの耐性菌によって引き起こされる深刻な感染症に対して現在利用可能な抗菌薬は効果不十分である (36-38)。

アミノグリコシド系抗菌薬の開発は、1944 年に Selman Abraham Waksman によって *Streptomyces* spp. より発見された streptomycin に始まる。その後、fradiomycin、kanamycin など放線菌などの微生物が産生するアミノグリコシド系抗菌薬が発見され、それらを出発原料として半合成されたものも開発された。1990 年に上市された arbekacin は dibekacin から半合成され、MRSA を含むグラム陽性菌及びグラム陰性菌に幅広い抗菌力を示す。懸念される有害事象として内耳神経や腎臓への毒性などが報告されており、血中モニタリングが必要とされるが、その強い抗菌力によって临床上重要な役割を担っている。薬剤耐性菌、すなわち MRSA 及び薬剤耐性緑膿菌を含むグラム陰性菌による感染症を克服するために、我々はさまざまな arbekacin 誘導体を合成した (39)。その取り組みの中で、5,4''-diepi-arbekacin (TS2037) を最も強力な抗菌薬として見出した (Figure 12) (39)。ここでは、MRSA 及び緑膿菌に対する TS2037 の有効性について、他剤との比較結果を報告する。

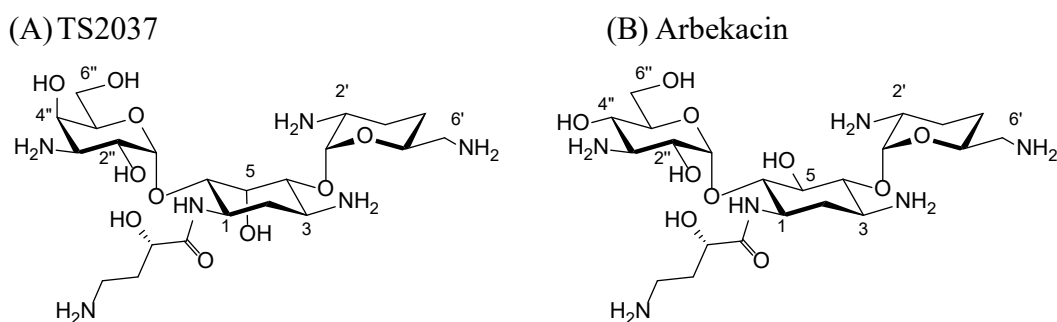


Figure 12 Chemical structures of TS2037 (A) and arbekacin (B)

3-2. 結果

(1) 抗菌スペクトル

アミノグリコシド系抗菌薬に対する複数の耐性メカニズムが TS2037 の活性に及ぼす影響を評価するため、親株とその同質遺伝子株、基準株、及び保有するアミノグリコシド修飾酵素が決定されている臨床分離株に対する MIC を決定した。これら 20 株に対する TS2037、その他のアミノグリコシド系抗菌薬及び imipenem の抗菌力を Table 4 に示す。

TS2037 は、*S. aureus* RN4220 (MSSA) 及び ANT (3') -III、ANT (4') -I 及び AAC (6') -APH (2") を産生する RN4220 同質遺伝子株に対して優れた抗菌力 (MIC : 0.25 µg/ mL) を示した。Arbekacin 及び gentamicin の抗菌力は、AAC(6')-APH(2")産生の黄色ブドウ球菌に対して、各々、わずかに (4~16 倍) 及び著しく (512 倍以上) 低下した。Amikacin 及び tobramycin は、アミノグリコシド修飾酵素を産生する大部分の黄色ブドウ球菌に対して弱い抗菌力を示した。

TS2037 は vancomycin 耐性 *Enterococcus faecium*(VRE)である *E. faecium* VRA に対しても強い活性を示した。さらに、TS2037 は *Burkholderia cepacia*、*Serratia marcescens* 及び AAC(6')-I 産生 *P. aeruginosa* PAO1/GN315 を除く様々なグラム陰性菌に対しても、強い抗菌力を示した。緑膿菌産生のアミノグリコシド系抗菌薬排出ポンプである MexXY の影響については、*P. aeruginosa* PAO1 及び *P. aeruginosa* PAO1 Δ mexXY との比較によると、TS2037 は他のアミノグリコシド系抗菌薬のように MIC 値が上がるが、*P. aeruginosa* PAO1 に対する TS2037 の基礎抗菌力は強く、tobramycin と同程度であった。以上より、TS2037 はグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対して幅広い抗菌力を示し、ANT(3')-III、ANT(4')-I 及び AAC(6')-APH(2")のような様々なアミノグリコシド修飾酵素産生菌に対しても強い抗菌力を示した。

Table 4 *In vitro* antibacterial activities of TS2037 against parent strains and their isogenic derivatives, and type strains and well characterized clinical isolates harboring aminoglycoside modifying enzyme

Strain	Phenotype	MIC (µg/mL)					
		TS2037	Arbekacin	Gentamicin	Amikacin	Tobramycin	Imipenem
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	-	0.25	0.5	0.25	2	0.5	0.015
<i>S. aureus</i> RN4220/pMS18	ANT(3')-III	0.25	0.5	0.5	8	1	N.T.
<i>S. aureus</i> RN4220/pMS91	ANT(3')-III+ AAC(6')-APH(2'')	0.25	2	128	16	64	N.T.
<i>S. aureus</i> RN4220/pMS520	ANT(4')-I	0.25	0.5	0.25	64	>128	0.03
<i>S. aureus</i> RN4220/pCR1948	AAC(6')-APH(2'')	0.25	2	128	8	64	0.015
<i>S. aureus</i> RN4220/pMF490	AAC(6')-APH(2'')	0.25	8	>128	64	>128	0.015
<i>S. epidermidis</i> ATCC14990	-	0.12	0.25	0.12	2	0.12	0.015
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	-	8	16	8	32	16	0.03
<i>Enterococcus faecium</i> VRA	AAC(6')-APH(2'')	8	16	>128	>128	>128	>128
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC25416	-	32	64	64	64	32	8
<i>Serratia marcescens</i> TH-0447	AAC(6')-I	16	64	16	>128	>128	>128
<i>Escherichia coli</i> JM109	-	0.25	0.5	0.25	1	0.25	N.T.
<i>Escherichia coli</i> JM109/pHSG298	APH(3')-I	0.25	0.5	1	2	8	N.T.

Table 4 *In vitro* antibacterial activities of TS2037 against parent strains and their isogenic derivatives, and type strains and well characterized clinical isolates harboring aminoglycoside modifying enzyme (continued)

Strain	Phenotype	MIC (μg/mL)					
		TS2037	Arbekacin	Gentamicin	Amikacin	Tobramycin	Imipenem
<i>E. coli</i> JM109/pMW218	APH(3')-II	0.25	0.5	0.25	4	0.5	N.T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	1	4	4	4	1	2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>mexXY</i>	-	0.25	0.5	0.25	1	0.5	N.T.
<i>P. aeruginosa</i> PAO1/GN4925	AAC(6')-II	1	4	64	4	32	1
<i>P. aeruginosa</i> PAO1/GN315	AAC(6')-I	32	16	8	128	128	1
<i>P. aeruginosa</i> PAO1/ML4847	AAC(3)-III	1	4	>128	8	>128	1
<i>P. aeruginosa</i> GN3504	AAC(3)-I	2	8	128	8	2	2

MIC was determined by Clinical and Laboratory Standards Institute guideline

N.T. : Not tested

(2) 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離株 241 株に対する TS2037 の抗菌力を他剤と共に測定した (Table 5)。臨床分離 MRSA 及び MRCNS に対する TS2037 の MIC₉₀ は、各々 0.25 μg/mL 及び 0.12 μg/mL であり、CLSI で他のアミノグリコシド系抗菌薬について規定されている基準を参考にすると、耐性菌はなかった (40)。*E. faecium* に対する TS2037 の抗菌力は中等度であり、gentamicin と同程度であった。TS2037 は、gentamicin 耐性及び tobramycin 耐性の *Escherichia coli* に対して強い抗菌力を示した。さらに、緑膿菌に対する TS2037 の MIC₉₀ は測定した抗菌薬の中で最も小さかった。これらの結果より、TS2037 は MRSA や緑膿菌を含む薬剤耐性グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対して、試験に供したアミノグリコシド系抗菌薬の中で最も強い抗菌力を示した。

Table 5 *In vitro* antibacterial activities of TS2037 and other antibiotics against 241 strains of clinical isolates

Strain		MIC (µg/ml)			Strain		MIC (µg/ml)		
(No. of tested)	Antibiotic	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	(No. of tested)	Antibiotic	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
MRSA	TS2037	0.12 - 0.5	0.25	0.25	<i>Escherichia coli</i>	TS2037	0.5 - 2	1	1
(n = 54)	Arbekacin	0.25 - 8	0.5	2	(n =26)	Arbekacin	0.5 - 2	1	1
	Gentamicin	0.25 - >128	0.5	128		Gentamicin	0.5 - >128	0.5	2
	Amikacin	2 - 64	8	16		Amikacin	1 - 4	2	2
	Vancomycin	0.5 - 2	1	1		Tobramycin	0.5 - 64	1	2
	Teicoplanin	0.5 - 2	1	1		Imipenem	0.12 - 0.25	0.12	0.12
	Linezolid	1 - 2	1	2		Cefepime	0.008 - 0.12	0.03	0.12
MR-CNS	TS2037	0.03 - 1	0.12	0.12		Ciprofloxacin	0.008 - 16	0.03	0.25
(n = 53)	Arbekacin	0.03 - 2	0.5	2	<i>Krebsiella</i>	TS2037	0.25 - 1	0.5	0.5
	Gentamicin	0.06 - >128	32	>128	<i>pneumoniae</i>	Arbekacin	0.25 - 1	0.5	1
	Amikacin	0.12 - 64	4	32	(n = 25)	Gentamicin	0.25 - 1	0.5	0.5
	Vancomycin	0.25 - 2	2	2		Amikacin	1 - 2	1	1
	Linezolid	0.25 - 4	2	4		Tobramycin	0.25 - 1	0.5	0.5
	Imipenem	0.03 - 128	16	64		Imipenem	0.06 - 0.25	0.12	0.12
	Ciprofloxacin	0.12 - >128	16	64		Cefepime	0.02 - 0.06	0.03	0.06
<i>Enterococcus</i>	TS2037	4 - >128	8	128		Ciprofloxacin	0.008 - 0.5	0.03	0.06
<i>faecium</i>	Arbekacin	4 - 64	8	64	<i>Pseudomonas</i>	TS2037	0.25 - 32	1	4
(n = 29)	Gentamicin	4 - >128	8	>128	<i>aeruginosa</i>	Arbekacin	0.5 - 128	2	16
	Amikacin	32 - >128	32	>128	(n = 54)	Gentamicin	0.5 - >128	4	>128
	Vancomycin	0.5 - 2	0.5	1		Amikacin	0.5 - 128	4	32
	Linezolid	2 - 2	2	2		Tobramycin	0.25 - >128	1	128
	Imipenem	4 - >128	>128	>128		Imipenem	1 - >128	4	32
	Ciprofloxacin	2 - >128	64	>128		Cefepime	1 - >128	8	128
						Ciprofloxacin	0.06 - >128	0.5	64

(3) 殺菌効果

MRSA に対する TS2037 の短時間殺菌力を測定する為、gentamicin 耐性 MRSA 5 株に対する TS2037 の殺菌力を評価し、arbekacin、gentamicin、vancomycin 及び linezolid と比較した。各々の MIC 値は Table 6 に示す。TS2037 は MIC 基準濃度で、arbekacin 及び gentamicin よりも強い殺菌力を示した(Figure 13)。その一方で、vancomycin 及び linezolid は MRSA に対して弱い殺菌力であり、静菌的であった。以上の結果より、TS2037 は試験に供した薬剤の中で最も低い濃度で最も強い殺菌力を示した。

Table 6 MICs of strains tested in killing curves

Strains	MIC($\mu\text{g/mL}$)				
	TS2037	Arbekacin	Gentamicin	Vancomycin	Linezolid
<i>Staphylococcus aureus</i> CR0031	0.5	1	64	1	2
<i>S. aureus</i> CR0349	1	4	128	1	2
<i>S. aureus</i> MF535	0.5	2	128	1	2
<i>S. aureus</i> CR0010	1	1	64	1	2
<i>S. aureus</i> CR0020	0.5	2	128	1	2

MIC was determined by microdilution method of CLSI guideline

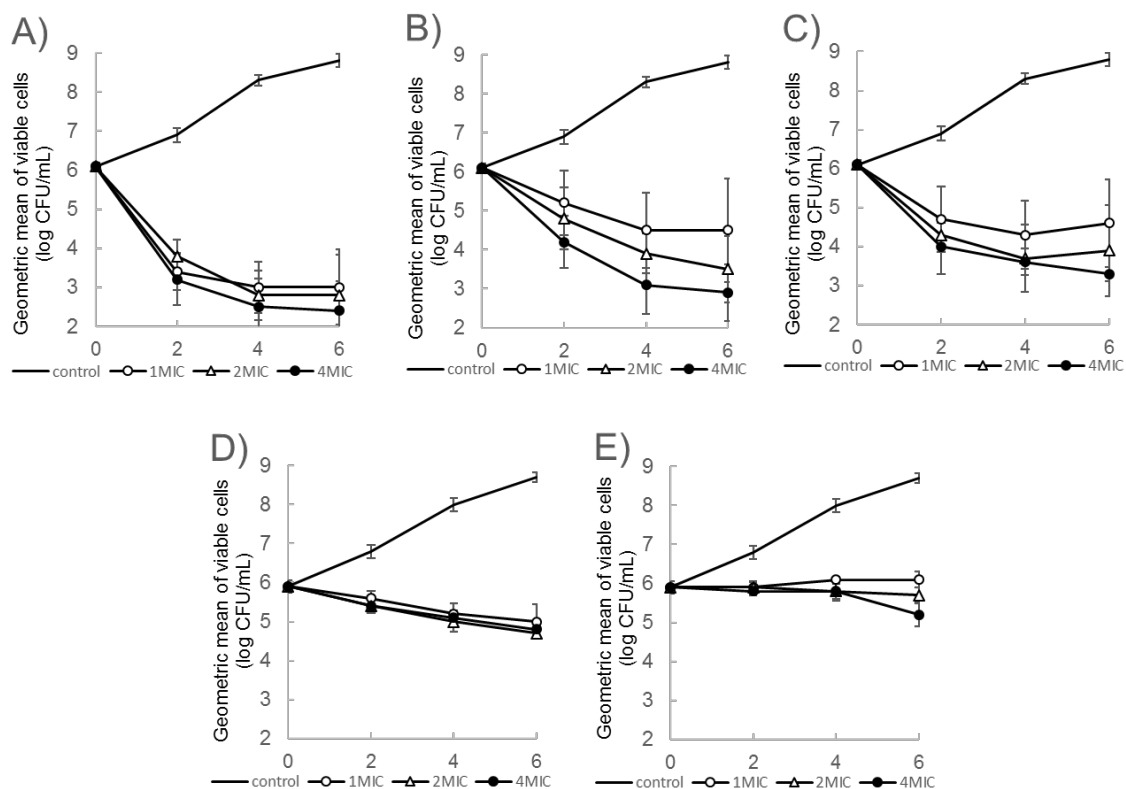


Figure 13 Killing curves of TS2037 and other antibiotics against 5 isolates of methicillin-resistant *S. aureus*.

The data points represent average of geometric mean of viable cells of the five strains tested. **A)** TS2037 (MIC: 0.5-1 $\mu\text{g/mL}$), **B)** arbekacin (MIC: 1-4 $\mu\text{g/mL}$). **C)** gentamicin (MIC: 64-128 $\mu\text{g/mK}$), **D)** vancomycin (MIC: 1 $\mu\text{g/mL}$), and **E)** linezolid (MIC: 2 $\mu\text{g/mL}$). Symbols: \circ , 1 \times MIC; \triangle , 2 \times MIC; \bullet , 4 \times MIC. The solid line indicates growth control. No antibiotic was added to the control. Error bars represent \pm standard deviation

(4) アミノグリコシド修飾酵素の影響

アミノグリコシド系抗菌薬耐性菌に対する TS2037 の優れた抗菌力を分析する為、我々はアミノグリコシド修飾酵素に対する TS2037 の安定性を他のアミノグリコシド系抗菌薬と比較した。*S. aureus* RN4220/pMF490 が産生する二機能性酵素 AAC(6')-APH(2'')による TS2037、arbekacin、gentamicin 及び kanamycinB の修飾を Figure 14 に示す。Gentamicin 及び kanamycinB は AAC(6')-APH(2'')に著しく修飾を受けた。0.3mg/mL のタンパク質量を作用させると、gentamicin 及び kanamycinB は、その誘導体を含めほとんどが 2''-O-phosphorylation 及び 6'-N-acetylation の修飾を受けた。その一方で、TS2037 及び arbekacin は AAC(6')-APH(2'')による修飾に安定であった。特に TS2037 は、粗酵素の高濃度 (1.0 mg/mL のタンパク質濃度) を作用させた場合でも優れた安定性を示した。

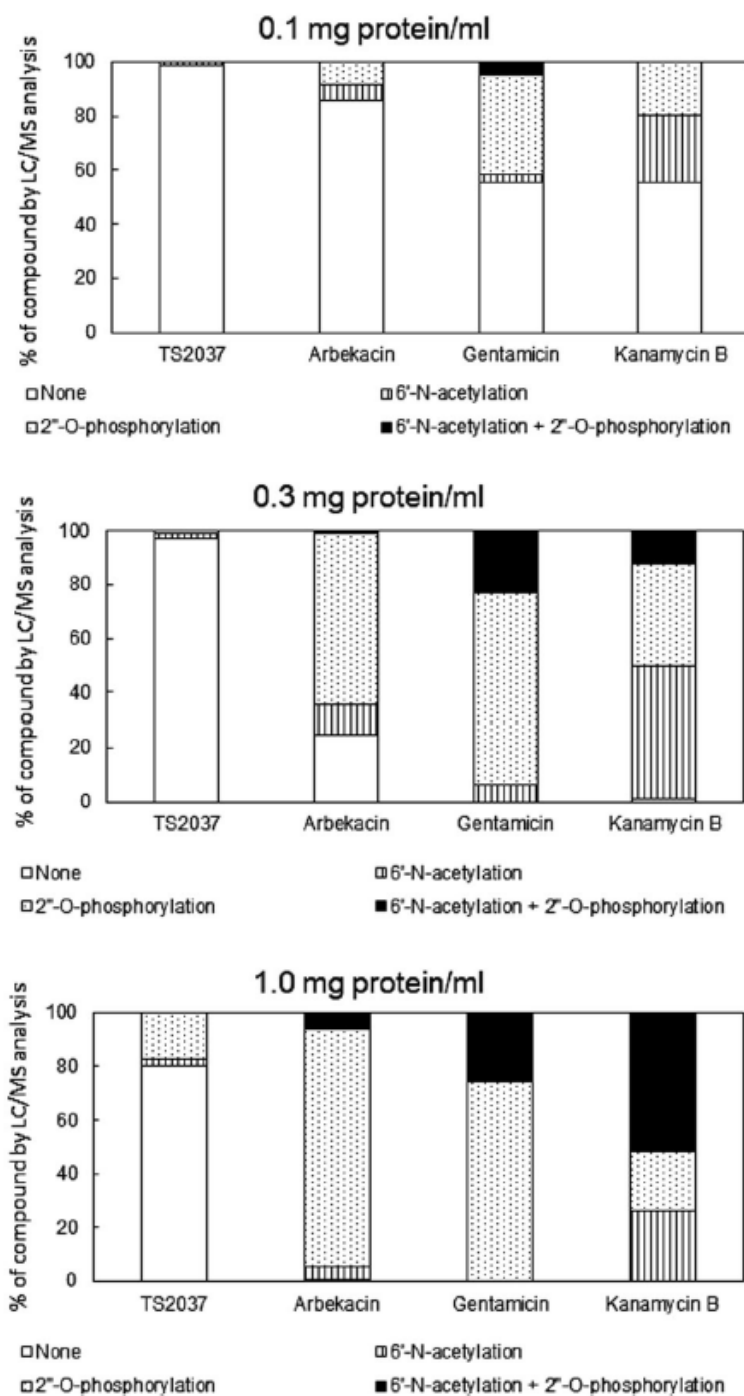


Figure 14 Modification of TS2037 by aminoglycoside modifying enzyme, AAC(6')-APH-(2'') obtained from *S. aureus* RN4220/pMF490.

Modification of aminoglycosides were detected and measured by electrospray ionization method using a liquid chromatography/mass spectrometry

(5) 全身感染モデルにおける予防効果

TS2037 の *in vitro* 抗菌力及び *in vivo* 有効性の相関性を調べるため、MRSA または緑膿菌によるマウス全身感染モデルにおける感染予防効果を調べた。Table 7 に示すように、*S. aureus* MF126 株及び *S. aureus* MF535 株に対する TS2037 の ED₅₀ 値は各々 2.65 mg/kg 及び 0.85 mg/kg であり、arbekacin、gentamicin、vancomycin 及び linezolid のそれらに比べて小さい値であった。*P. aeruginosa* PAO1 及び *P. aeruginosa* MSC3151 に対する TS2037 の ED₅₀ 値は各々 0.38 mg/kg 及び 7.10 mg/kg であり、動物実験においても試験に供したアミノグリコシド系抗菌薬の中で最も強い有効性を示した。

Table 7 Protective effects of TS2037 and other antibiotics against systemic infections caused by MRSA and *P.aeruginosa* in mice.

Strain	Phenotype	Infection dose (CFU/mouse)	Cyclo- phosphamide	Compound	ED ₅₀ (mg/kg)	95% interval	MIC (μg/ml)
<i>S. aureus</i> MF126	ANT(4')-I	5.0×10^6	+	TS2037	2.65	(1.29-7.38)	0.25
				Arbekacin	17.8	(8.67-39.9)	0.5
				Gentamicin	8.22	(3.75-17.9)	0.5
				Vancomycin	20.2	(8.98-46.2)	1
				Linezolid	20.1	(10.1-40.1)	2
<i>S. aureus</i> MF535	ANT(4')-I +AAC(6')- APH(2'')	3.8×10^6	+	TS2037	0.85	(0.18-2.03)	0.5
				Arbekacin	21.0	(9.75-57.6)	1
				Gentamicin	>300	Not calculated	128
				Vancomycin	5.85	(1.96-14.4)	1
				Linezolid	18.0	(8.65-34.6)	2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	—	1.5×10^7	—	TS2037	0.38	(0.24-1.07)	0.5
				Tobramycin	1.26	(0.69-2.41)	0.5
				Arbekacin	1.09	(0.55-2.10)	1
				Imipenem	1.18	(0.54-2.53)	1
				Ciprofloxacin	0.72	(0.31-2.40)	0.12
<i>P. aeruginosa</i> MSC3151	AAC(6')-II	3.0×10^5	+	TS2037	7.10	(5.18-9.66)	1
				Tobramycin	>160	Not calculated	64
				Arbekacin	42.3	(30.4-64.3)	8
				Gentamicin	>160	Not calculated	>128
				Amikacin	20.6	(0.26-33.3)	8

Mice were treated with cyclophosphamide at 200 mg/kg by intraperitoneal administration except for *P. aeruginosa* PAO1 which was infected in mice without the cyclophosphamide treatment.

^aFifty % effective dose (ED₅₀) was determined for each from the total number of surviving mice on 7days after infection using the Probitanalysis method

(6) LLC-PK-1 からの N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) 放出

NAG は腎臓を含め、様々な臓器に発現しているリソソーム酵素である。尿中で増加する NAG 濃度が腎尿細管細胞の破壊を示す。TS2037 及び arbekacin による LLC-PK1 細胞からの NAG 放出量を、アミノグリコシド系抗菌薬の副作用の一つの腎毒性の可能性を比較するために評価した。TS2037 の 2.5 μM 及び 5.0 μM 作用後の LLC-PK1 細胞からの NAG 放出量は各々 2.0 (U/L) 及び 2.1 (U/L) であり、それらは arbekacin よりも有意に高かった (Table 8)。この結果により、TS2037 の腎毒性のリスクは arbekacin よりも高いことが示唆された。

Table 8 N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) assay

Drug	NAG release from LLC-PK1±SE ^b (U/L) at		
	2.5 μM	5 μM	10 μM
TS2037	2.0±0.03	2.1±0.13	Not tested
Arbekacin	1.1±0.18	1.3±0.07	1.9±0.10
Statistical analysis			
t Stat	5.1	6.6	-
P(T≤t) two-tail	0.0022	0.00018	-
t Critical two-tail	2.4	2.3	

^aThe release of NAG from the kidney epithelial cell line, LLC-PK1, was quantified using sodio-m cresolsulfonphthaleinyl N-acetyl-β-D-glucosaminide as substrate.

^bSE standard error, N=4-6

3-3. 考察

MRSA 及び緑膿菌は院内感染の原因菌であり、混合感染を生じ、しばしば多剤耐性を示す。Arbekacin は日本において MRSA 治療薬として上市されたが、薬剤耐性緑膿菌を含むグラム陰性菌にも有効である (41)。Arbekacin よりも有効性を改善した薬剤を見出す一連の研究において、その 5,4"-diepi 誘導体である TS2037 が MRSA 及び緑膿菌に強い活性を示すことを見出した (42)。我々は、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する TS2037 の *in vitro* 及び *in vivo* 活性を評価した。アミノグリコシド系抗菌薬に対する耐性メカニズムの一つに、アセチルトランスフェラーゼ、フォスフォトランスフェラーゼ及びアデニルトランスフェラーゼのようなアミノグリコシド修飾酵素産生による不活化がある (43)。これらの酵素は一般に、基質特異性に基づいて各アミノグリコシドに耐性を与える。実際、多くのアミノグリコシド耐性 MRSA 株が出現しているが、arbkacin はまだ十分な臨床効果を示している (44-46)。Arbekacin が AAC (6') -APH (2'') によって修飾される割合が gentamicin よりも低く、そのために *aac* (6') -*aph* (2'') を保有するブドウ球菌が *in vitro* で arbekacin に感受性を示す理由となっている (47)。本研究では、アミノグリコシド修飾酵素を産生する株から調整した粗酵素液のタンパク質濃度別に反応させた後、抗菌活性を有する TS2037 の残存率が arbekacin の残存率よりも高かった。Gentamicin と amikacin はこれらのアミノグリコシド修飾酵素の影響を大きく受け、これらアミノグリコシド耐性菌に対する活性が弱かった。我々はそれが、*S. aureus* RN4220 / pR1948 及び RN4220 / pMF490 のような AAC(6')-APH(2'')産生株に対する TS2037 の抗菌活性が amikacin より優れている理由だと考えている。我々は、これらの株に対する amikacin の MIC が AAC(6')-APH(2'')酵素の産生量に依存していることを明らかにし、抗菌活性が酵素安定性にも関連することを見出した。これは、CLSI (40) で他のアミノグリコシド系抗菌薬に関して定められている耐性基準を参考にすると、実験菌株及び臨床分離の MRSA の両方において TS2037 の耐性株が見られなかったという結果に一致する。TS2037 は arbekacin の 5 位及び 4''位の OH 基が epi 体になったことにより、立体的に AAC(6')-APH(2'')のような修飾酵素に認識されにくくなり、結果として安定になったと推測している。他の多くのアミノグリコシド系抗菌薬と

同様に、Enterococcus 属に対する TS2037 の活性は強くなかった。腸球菌の多くにおける gentamicin 高度耐性は、二機能性酵素 AAC (6') -APH (2'') の存在に関連している。しかし Table 4 に示すように、TS2037 は、これらの酵素産生 *E. faecium* に対して、arbakacin 以外のアミノグリコシド系抗菌薬よりも強い活性を示した。この結果より、我々は TS2037 及び arbakacin が腸球菌由来の二機能性酵素 AAC(6')-APH(2'') に対して、他のアミノグリコシド系抗菌薬よりも安定であると推測した。TS2037 は MRSA に対してその 4MIC 濃度における殺菌力が、arbakacin、gentamicin、vancomycin 及び linezolid の中で最も強かった。AAC(6')-APH(2'') のようなアミノグリコシド修飾酵素に対する TS2037 の安定性は菌の増殖に影響を及ぼす強い抗菌力だけでなく、殺菌効果を示す短時間殺菌力も強めると考えられた。緑膿菌におけるアミノグリコシド系抗菌薬の耐性メカニズムは次の 5 つが報告されている。(i)酵素による修飾、(ii)外膜による取り込み阻害、(iii)能動輸送の減少、(iv)MexXY-OprM による能動排出の増加及び(v)アミノグリコシド作用部位の変異 (48)。 MexXY は、緑膿菌の臨床分離株における内因性及び後天性のアミノグリコシド耐性に寄与することが知られているアミノグリコシド誘導性の多剤トランスポーターである。よって我々は、PAO1 とその Δ MexXY (MexXY 欠損株) の実験室同質菌株を使用して、緑膿菌の MexXY 排出システムのアミノグリコシド基質特異性を比較した。MexXY が TS2037 の MIC に及ぼす影響は、同程度の抗菌力を示す tobramycin を除いて、他のアミノグリコシド系抗菌薬に対するそれよりも少なかった。我々は、TS2037 の抗菌力に対する MexXY の影響が少ないことは、tobramycin のように、緑膿菌に強い抗菌力を示す理由と考えている。In vitro における抗菌力がより強くなった TS2037 はマウス全身感染モデルの in vivo においても強い有効性を示した。ANT(4) 又は AAC(6')-APH(2'') 産生 MRSA によるマウス全身感染モデルにおいて、TS2037 は皮下投与により、強い感染予防効果を示した。MRSA マウス全身感染モデルにおける TS2037 の ED₅₀ 値は、arbakacin、gentamicin、vancomycin 及び linezolid のそれらと比べて小さかった。アミノグリコシド感受性及び耐性緑膿菌によるマウス全身感染モデルにおいて、TS2037 は試験に供したその他のアミノグリコシド系抗菌薬よりも強い有効性を示した。動物モデルにおけるこれらの結果より、TS2037 のヒトでの臨床効果が期待され、重症感染症における経験的治療の臨床効果も期待される。一方で、LLC-PK1 からの NAG 放出量の結果は、TS2037 に関連する腎毒性のリスクが arbakacin

のリスクよりも高い可能性があることを示唆している。ゆえに、我々は **arbakacin** を参考にし、臨床における **TS2037** の用量用法については **PK/PD** データを注意深く解析する必要がある。しかしながら、取得したデータは、**TS2037** がアミノグリコシド修飾酵素に対してより安定であり、**MRSA** のようなこれらの酵素を産生する菌株に対して、**arbakacin** を含む他のアミノグリコシドよりも高い抗菌力を持っていることを示唆した。したがって、米国で承認されているアミノグリコシド系抗菌薬 **plazomicin** にみる高用量短期治療のような例を参考にし、**TS2037** の強力な有効性を活かす適切な投与法があると我々は考えている (49)。現在、日本において **MRSA** の治療に使用される抗生物質は、**arbakacin**、**vancomycin**、**teicoplanin**、**linezolid**、**tedizolid** 及び **daptomycin** であり、いくつかの新しい抗 **MRSA** 化合物も臨床開発されている。これらの多くがグラム陽性菌だけでなくグラム陰性菌に対しても抗菌力を有する。一方で、グラム陰性菌に有効な抗菌薬の開発数は少ないことから、将来の薬剤開発は **MRSA** だけでなく、緑膿菌を含む薬剤耐性のグラム陰性菌にも焦点を当てる必要がある。**TS2037** は、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に対する幅広い抗菌力があることに加えて、**MRSA** と緑膿菌に対しても活性を有している。いくつかの新しい抗 **MRSA** 薬が臨床で開発中であるが、アミノグリコシド系抗菌薬の **TS2037** は強力な抗菌力を備えた非常に有望な候補の1つであり、さらなる研究開発への道筋を見つけていきたい。

第4章 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効な新規リンコマイシン誘導体 compound A の特性評価

4-1. 背景

市中感染 MRSA (CA-MRSA) は、皮膚及び軟部組織感染症の共通病原体であり、患者は外来で有効な治療薬を必要としている (50-52)。Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMX) と clindamycin は、治療オプションの first-line としてよく使用されるが、耐性菌の出現が世界的な課題となっており、感染症の効果的な治療効果が損なわれている。従来の抗菌薬に耐性を示す MRSA の増加に伴い、科学者たちは安全で有効な薬剤を求めている。現状、linezolid 及び tedizolid は MRSA 感染症に対して有効な経口及び静注剤である。しかし、これら薬剤のミトコンドリア機能障害作用によって引き起こされる骨髄抑制を含め、長期投与による有害事象が課題となっている (53)。また、23S rRNA 遺伝子の変異による linezolid 耐性 MRSA の出現も報告されている (54)。臨床における治療成功は、利用可能な多数の治療オプションとその後の薬剤耐性との闘いにかかっている。したがって、薬剤耐性菌にも有効で、かつ安全性の高い新規抗菌薬を見つけることが必要不可欠である。効果的な抗生物質を探索する中で、我々はリンコマイシンの化学修飾を開始し、penicillin 耐性肺炎球菌に対して優れた効果を示す新規誘導体である compound A (55) (化学構造: No.76) を見出した。Compound A は clindamycin 耐性株を含む MRSA に対しても活性があったため、ここでは compound A の MRSA に対する *in vitro* 及び *in vivo* の有効性と安全性プロファイルの評価について説明する。

4-2. 結果

(1) *In vitro* 抗菌活性

さまざまな特性を備えた黄色ブドウ球菌に対する compound A の *in vitro* 有効性を評価した (Table 9)。Compound A は、Panton-Valentine leukocidin を所有する典型的な CA-MRSA である *S. aureus* MW2 に対して強力な抗菌活性を示した。誘導型 *erm* 遺伝子を持つ *S. aureus* MSC15009 / pMS98 に対する erythromycin の MIC は、その親株 (MSC15009) に対する値から大きく上がったが、clindamycin 及び compound A の MIC は影響を受けなかった。構成型 *erm* 遺伝子を保有する *S. aureus* MSC15009 / pMS99 に対する erythromycin と clindamycin の MIC は耐性を示したが、compound A の MIC は 1.0 µg / mL であった。

S. aureus MSC17016 及び MSC16946 は、それぞれ linezolid 治療の前後に同じ患者から分離された臨床分離株であり、*S. aureus* MSC16946 は linezolid 低感受性株である。*S. aureus* MSC17016 に対する compound A の MIC は 2.0 µg/mL であったが、linezolid 治療後の分離株である MSC16946 に対する MIC は 64µg/mL に増加した。Compound A と linezolid 間の交差耐性の原因を調べるために、*in vitro* で linezolid 耐性黄色ブドウ球菌を選択し、これらの株の活性を調べた (Table 10)。それぞれ 23S rRNA の G2447U 及び G2576U に変異がある *S. aureus* ATCC29213 K-31 及び *S. aureus* Smith K No.1 に対する linezolid の MIC は、親株と比べて有意に増加した。しかしながら、これらの linezolid 耐性株に対する compound A の活性は、親株である *S. aureus* ATCC29213 及び *S. aureus* Smith とほぼ同程度であった。そこで我々は、clindamycin 耐性 MRSA の linezolid 耐性菌に対する compound A の抗菌力を調べる為、全ゲノムシーケンスが決定されている *S. aureus* N315 から、段階的に linezolid 耐性株を選択した。*S. aureus* N315 及びその誘導体に対する linezolid の耐性度は、23S rRNA の変異の数に対して相関性を示した。Compound A の MIC も、これらの変異に比例して増加したが、その程度は linezolid より低かった。以上の結果より構成的 *erm* 遺伝子に加えて、23S rRNA の linezolid 結合部位変異の共存下では、compound A の感受性が低下することが示唆された。

Table 9 *In vitro* antibacterial activity

Strain	Characteristics	MIC (µg/mL)			
		Compound A	Erythromycin	Clindamycin	Linezolid
<i>Staphylococcus aureus</i> MW2	CA-MRSA, PVL, <i>erm</i> (-)	0.06	0.5	0.12	2
<i>S. aureus</i> MSC15009	<i>erm</i> (-)	0.015	0.25	0.06	2
<i>S. aureus</i> MSC15009/pMS98	<i>ermB</i> (inducible)	0.03	>128	0.06	2
<i>S. aureus</i> MSC15009/pMS99	<i>ermA</i> (constitutively)	1	>128	>128	2
<i>S. aureus</i> MSC17016	Clinical isolate before linezolid treatment	2	>128	>128	2
<i>S. aureus</i> MSC16946	Clinical isolate after linezolid treatment	64	>128	>128	16

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by two-fold agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.

Table 10 Cross-resistance between compound A and linezolid

Strain	Sensitivity to linezolid*	Mutation of 23S rRNA (mutated portion of number of 23S rRNA)	MIC (µg/mL)	
			Compound A	Linezolid
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	susceptible	None	0.06	4
<i>S. aureus</i> ATCC29213 K-31	non-susceptible	G2447U	0.12	128
<i>S. aureus</i> Smith	susceptible	None	0.06	4
<i>S. aureus</i> Smith K-No.1	non-susceptible	G2576U	0.06	64
<i>S. aureus</i> N315	susceptible	None	0.5	4
<i>S. aureus</i> N315 LZr-5	susceptible	G2447U(2/5)	0.5	2
<i>S. aureus</i> N315 LZr-5162	non-susceptible	G2447U(2/5)	1	8
<i>S. aureus</i> N315 LZr-5322	non-susceptible	G2447U(3/5)	2	16
<i>S. aureus</i> N315 LZr-5642	non-susceptible	G2447U(4/5)	>16	64

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by two-fold agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.

*According to CLSI, we determined strains with ≤ 4 µg/mL as linezolid susceptible and strains with >4 µg/mL as linezolid non-susceptible.

(2) 作用機序

Compound A の作用機序を調べるために、高分子の標識前駆体取り込みの阻害を、clindamycin 感受性 *S. aureus* ATCC29213 及び clindamycin 耐性 *S. aureus* MSC18042 を用いて検討した。Figure 15 に示すように、compound A は $[^{14}\text{C}]$ イソロイシンのタンパク質画分への取り込みを選択的に阻害したが、他の高分子（すなわち、DNA、RNA、脂肪酸）の前駆体や細胞壁画分の取り込みには影響しなかった。同じ阻害パターンが、別のタンパク質合成阻害剤である linezolid でも観察された。これらの結果は、compound A の標的が clindamycin 及び linezolid と同様に黄色ブドウ球菌におけるタンパク質合成であることを示した。

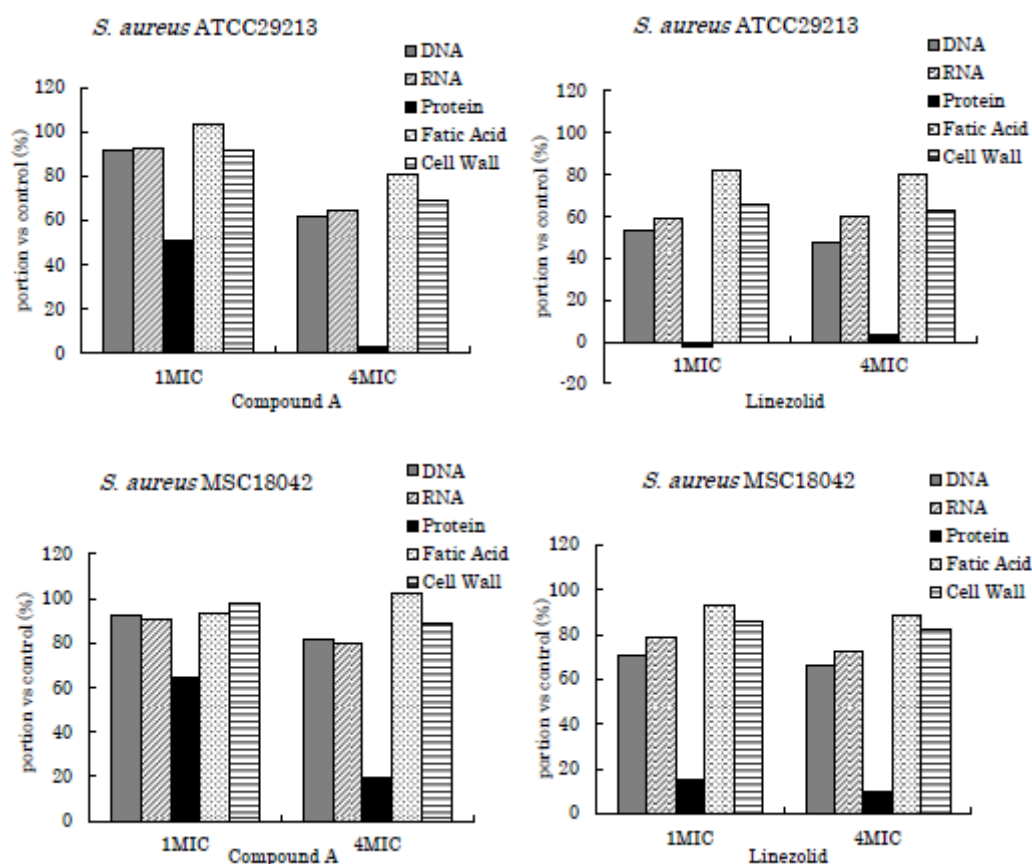


Figure 15 Analysis of mechanism of action using inhibition of uptake macromolecule.

Mechanism of action of compound A was determined from comparison of inhibition degree of uptake macromolecules (thymidine, uridine, isoleucine, AcONa and GlcNAc) labeled with [^{14}C]. Carbon label of each macromolecule was counted by scintillation counter.

(3) 耐性菌の出現頻度

Compound A に対する耐性菌出現のリスクを評価するために、clindamycin 耐性 MRSA (*S. aureus* N315 または *S. aureus* MS15009 / pMS99) を用いて compound A に対する自然耐性出現頻度を測定した。Table 11 に示すように、これらの株の一部は、調べた中で最高濃度である 16MIC (16 $\mu\text{g/mL}$) で増殖する可能性を示した。耐性株の平均出現頻度は、*S. aureus* N315 では 2.26×10^{-6} 、*S. aureus* MS15009 / pMS99 では 5.99×10^{-6} であった。抗菌薬としては、耐性出現頻度が高めであったことから、我々は compound A の 16 $\mu\text{g/mL}$ 含有平板に発育してきた株が、他系統の抗菌薬に交差耐性を示すか調べた。*S. aureus* N315 及び compound A の 16 $\mu\text{g/mL}$ 含有平板でも生育可能な *S. aureus* N315 誘導株 (n=21) に対する compound A 及び対照薬の MIC を Table 12 に示す。*S. aureus* N315 誘導株に対する compound A の MIC は上昇したが、linezolid、chloramphenicol 及び ciprofloxacin の MIC は変化しなかった。

Table 11 Emergent frequency of resistant strains against compound A regarding clindamycin resistant MRSA

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Emergent frequency of resistant strains ($\times 10^{-6}$)						
		32 MIC	16 MIC	8 MIC	4 MIC	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	1	N.G.	2.26	3.84	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> MSC15009/pMS99	1	N.G.	5.99	13.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Each inoculum size was $10^7 \sim 10^8$ CFU/plate. Each strain was plated on agar plate included each concentration of compound A and incubated for 24 h at 35°C. Emergent frequency of resistant strains was calculated using the number of strains which could grow at the highest concentration of compound A on which bacteria could grow.

N.G.: no growth, N.D.: not detected.

Table 12 Cross-resistance of reference drugs against non-susceptible MRSA against compound A

Strain	MIC (μg/mL)				
	Compound A	Clindamycin	Linezolid	Chloramphenicol	Ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	2	2048	2	16	0.5
<i>S. aureus</i> N315 derivatives (n=21)	128->128	1024-2048	1-2	8-16	1

Non-susceptible *S. aureus* N315 against compound A were isolated from strains which could grow at the highest concentration of compound A when we tested “Emergent frequency of resistant strains against compound A (Table 11)”. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by two-fold agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.

(4) MRSA 臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌活性

日本の皮膚感染症から分離された MRSA 37 株に対する compound A、clindamycin、linezolid、arbekacin 及び tetracycline の *in vitro* 有効性を評価した (Table 13)。これらの株には、CA-MRSA (n=23) 及び HA-MRSA (n=14) が含まれる。CA-MRSA に対する clindamycin の MIC₅₀ 及び MIC₉₀ は 0.25 μg/ mL 及び 0.5 μg/ mL であったが、compound A では各々 0.12 μg/mL 及び 0.25 μg/mL であった。一方、HA-MRSA に対する clindamycin の MIC₅₀ と MIC₉₀ は共に > 512 μg/ mL であったが、compound A では各々 1.0 μg/mL と 2.0 μg/mL であった。ここで評価された MRSA に対する linezolid の MIC₅₀ 及び MIC₉₀ は全て 2.0 μg/mL であった。

Table 13 Antimicrobial activity of compound A against MRSA isolated from skin infection

Drug	CA-MRSA (n=23)						HA-MRSA (n=14)				
	MIC range			MIC ₅₀	MIC ₉₀		MIC range			MIC ₅₀	MIC ₉₀
	(μg/mL)			(μg/mL)	(μg/mL)		(μg/mL)			(μg/mL)	(μg/mL)
Compound A	≤0.06	-	0.25	0.12	0.25		0.12	-	2	1	2
Clindamycin	0.12	-	512	0.25	0.5		0.12	-	>512	>512	>512
Linezolid	2	-	2	2	2		2	-	2	2	2
Arbekacin	0.12	-	2	1	1		1	-	2	1	2
Tetracycline	0.5	-	1	0.5	0.5		0.5	-	128	32	64

Minimum inhibitory concentrations (MICs), MIC₅₀ and MIC₉₀ were determined by two-fold agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.

(5) マウス皮膚膿瘍モデルに対する *in vivo* 有効性

Clindamycin 感受性 MRSA (*S. aureus* MF126) の *in vivo* マウス皮膚膿瘍モデルに対する compound A の効果を Figure 16A に示す。Compound A の有効性は Clindamycin より優れており、vancomycin に匹敵した (data not shown)。Clindamycin 耐性株 (*S. aureus* MSC18048) を使用した同マウスモデルにおける compound A の有効性を Figure 16B に示す。Compound A は 100 mg/kg で linezolid より優れた有効性を示し、その有効性には用量依存性が見られた。

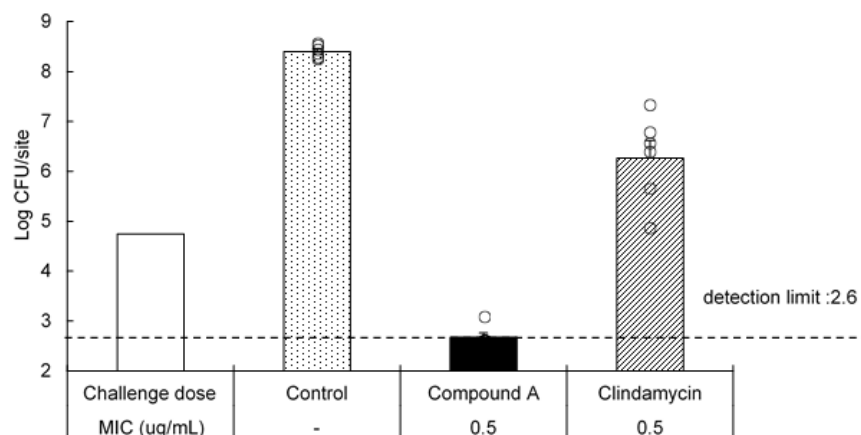


Figure 16 (A)

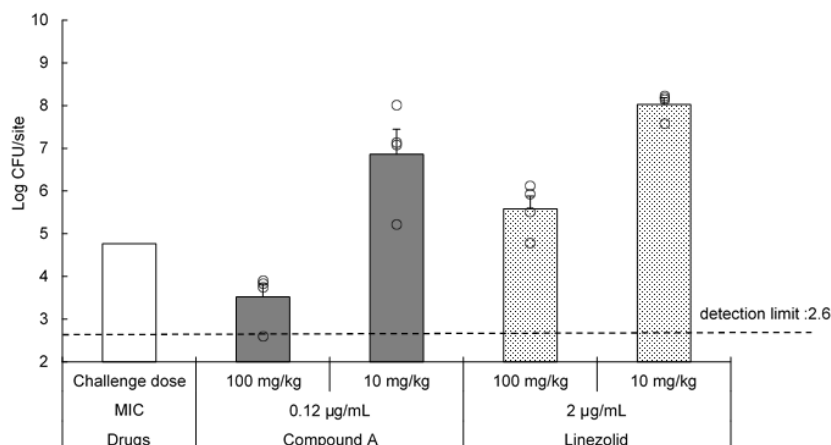


Figure 16 (B)

Figure 16 *In vivo* efficacy against mouse model with abscess under the skin using clindamycin-susceptible/resistant MRSA.

ICR mice (4 weeks, male) were treated with cyclophosphamide at 200 mg/kg by intraperitoneal administration. The bacterial suspension with equal volume of 2% w/v dextran beads was injected intradermally to mice (2 abscess/mouse). Each drug (10 or 100 mg/kg) was administered subcutaneously 2 h and 6 h after the bacterial challenge. Twenty-four hours after the bacterial infection, abscesses were removed from mice under anesthesia and homogenized. Bacterial counts of homogenate were determined by agar plating method after overnight culture at 35°C. (A) *S. aureus* MF126 (n = 6), (B) *S. aureus* MSC18048 (n = 4).

(6) ミトコンドリア機能抑制

Linezolid の MRSA に対する有効性はタンパク質合成に対する阻害活性によるものであるが、細菌の 23S rRNA とヒトミトコンドリアの 16S rRNA の類似性があることから、linezolid がミトコンドリアにも作用することで骨髄抑制などの有害事象を引き起こすと考えられている(56)。そこで我々は compound A、chloramphenicol 及び linezolid によるミトコンドリア機能抑制の強さを、マウス肝臓ホモジネートからの無細胞系で評価した。Figure 17 に示すように、compound A の阻害活性は、linezolid 及び chloramphenicol よりも低かった。Compound A では 10 μ M 濃度ではほとんど阻害能を示さなかった。

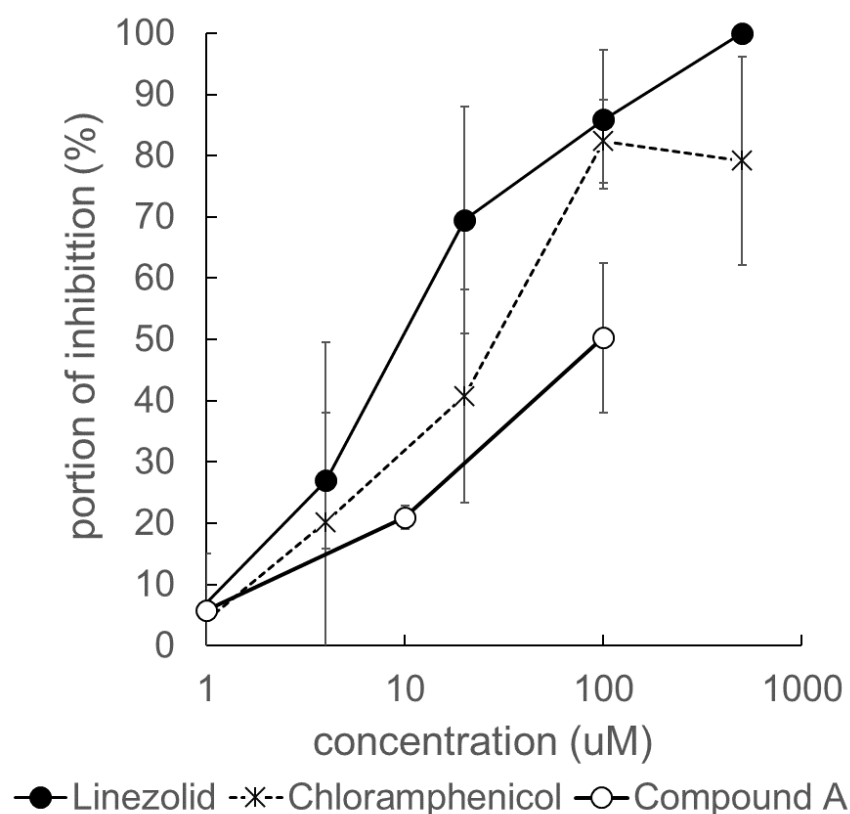


Figure 17 Inhibition of mitochondrial function.

Mouse mitochondria was acquired from livers of four-week old female ICR mice. Ten μ M [35 S] Met was added to mixture of tested compounds (0.01, 0.1, 1, 10 mM) and 10 mg/mL mitochondria and incubated at 25°C for 30 min. After stop solution was added, each sample was determined 35 S by using scintillation counter and analyzed.

4-3. 考察

薬剤耐性グラム陽性菌に有効な新規薬剤探索の過程で、我々はリンコマイシンの C-6 及び C-7 の側鎖を化学的に修飾し、compound A を見出した (Figure 18)。Compound A は clindamycin 耐性株を含む MRSA に対しても強い有効性を示した。

Compound A の特性を解析するため、我々は複数の clindamycin 耐性株及び linezolid 耐性株を用いて compound A の抗菌活性を測定した。誘導型 *erm* 遺伝子を有する *S. aureus* に対する compound A の活性は clindamycin より強かった。ゆえに、我々は compound A の *erm* 誘導能は clindamycin のそれよりも弱い、又は結合部位への親和性が強いと考えた。一方、*erm* 遺伝子を構成的に発現している *S. aureus* に対する compound A の MIC は、*erm* 誘導型の *S. aureus* に対するそれよりも少し高くなったが、clindamycin のように著しく上昇しなかった。Clindamycin 耐性 MRSA に対する compound A の MIC は linezolid のそれとほぼ同じであり、clindamycin 耐性でかつ linezolid 耐性の MRSA に対して linezolid と交差耐性を示したことから、我々は compound A の clindamycin 結合部位親和性は 23S rRNA のジメチル化 (57) により減少するが、linezolid 結合部位の近くに追加的な結合部位を獲得したのではないかと推測した。これらの現象を詳細に分析するため、我々は clindamycin に感受性又は耐性を示す親株とその各々について linezolid 非感受性の派生株に対する compound A の抗菌力を測定した。Clindamycin に感受性の親株を用いた場合、linezolid に耐性を示すその派生株に対する compound A の MIC は低いままであり、親株に対する MIC 値とほぼ同程度であった。逆に、clindamycin 耐性の親株では、linezolid 耐性の派生株に対する compound A の MIC は親株よりも高くなったが、その上昇度は linezolid より低かった。構成的に *erm* 遺伝子を発現し、かつ 23S rRNA の linezolid 結合部位に変異を有する linezolid 耐性 MRSA に対する compound A の MIC は、23S rRNA の変異の数とともに増加し、それは 23S rRNA の 2447 番及び 2576 番のいずれの変異に対しても同様の傾向が見られた。これらの興味深いデータは、compound A の clindamycin 結合部位への親和性の向上と linezolid 結合部位に近い追加的な結合部位の獲得を示唆した。高分子取り込み阻害アッセイ系の結果によると、compound A は clindamycin 感受性及び clindamycin 耐性 MRSA の両方において、タンパ

ク質の前駆体の取り込みを阻害した。これは、compound A の作用機序が clindamycin 及び linezolid と同じタンパク質合成阻害であることを明確に示している。したがって我々は、compound A は *erm* 遺伝子の発現を誘導せずに優先的に clindamycin 結合部位に結合し、その低い MIC 値は clindamycin よりも高い親和性によるものと考えている。一方、*erm* 遺伝子を構成的に発現する MRSA に対して、compound A はメチル化により直接 clindamycin 結合部位に結合できなくなると、代わりに別の部位に結合することにより有効性を保持しているのではないかと考えた。

MRSA に対して compound A の新規耐性メカニズムを生じるリスクがあり得ることから、我々は clindamycin 耐性 MRSA を用いて compound A に対する低感受性株を取得した。Clindamycin 耐性かつ Linezolid 耐性 MRSA は compound A と交差耐性したが、compound A 低感受性 MRSA は、linezolid だけでなく chloramphenicol や ciprofloxacin のような他系統の抗菌薬に対して交差耐性を示さなかった。ゆえに、我々は compound A は clindamycin 耐性黄色ブドウ球菌に対しては linezolid と全く同じ結合部位ではなく、linezolid の結合部位近くの新たな結合部位を獲得したと考えた。また、この段階では、これらの菌株は異なる系統の抗菌薬に対して交差耐性がないため、compound A に対する耐性化が他系統の抗菌薬の有効性に影響を与えるリスクは低いことが期待される。今後は PK/PD の観点から、compound A の適切な投与量を臨床的な観点で検討していきたい。そして我々は、compound A は MRSA 感染症の治療において将来有効な選択肢の一つになる可能性があると考えている。

近年、CA-MRSA による皮膚感染症は特に米国にて社会的な懸念として広がりつつある (58, 59)。皮膚感染症は細菌が薬剤耐性のみならず毒素産生能を獲得する潜在的な場であり、それらの菌に対する有効性を示す抗菌薬は非常に有用である。我々は、日本において皮膚感染症から分離された MRSA に対する compound A の抗菌力を測定した。Compound A は皮膚感染症からの分離株である MRSA に対して対照薬よりも優れた抗菌力を示した。我々はマウス皮下膿瘍モデルを用いて、compound A の皮膚感染症を模した *in vivo* 有効性を評価した。Clindamycin 感受性の *S. aureus* MF126 に対する compound A 及び clindamycin の MIC は同じ値であったが、compound A の *in vivo* 有効性は clindamycin よりも優れていた。これは、compound A の皮膚への移行性が clindamycin よりも優れている可能性があると考えられた。また、compound A と linezolid は、

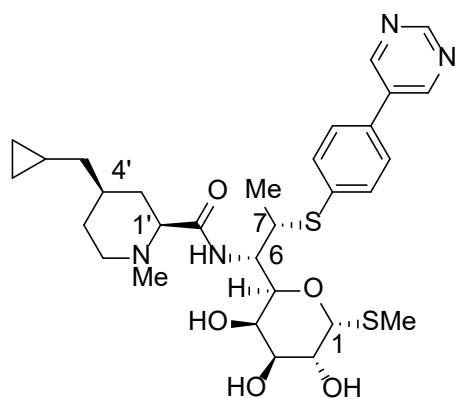
clindamycin 耐性株である *S. aureus* MSC18048 を用いた皮下膿瘍モデルに対して用量依存的な有効性を示した。Clindamycin は CA-MRSA に主に処方されることから、将来 compound A も clindamycin のように、MRSA を含む市中感染症に有効な薬剤となる可能性が示唆された。

Linezolid 及び chloramphenicol はミトコンドリア機能抑制に起因すると考えられる骨髄抑制などの有害事象があるため、我々は compound A のミトコンドリア機能抑制について評価した。Linezolid 及び chloramphenicol によるその阻害能はほぼ同程度であったが、compound A の阻害能は比較的弱く、この点においては compound A が linezolid や chloramphenicol より安全なプロファイルであることが示唆された。

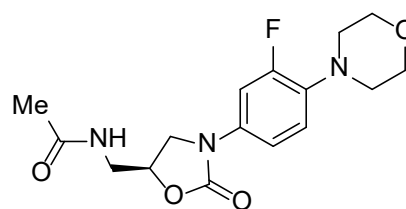
リンコマイシン誘導体により有効性を改善していく課程において、我々は構造活性相関に関する経験的な知識に基づき、C-6 位及び C-7 位を修飾した。我々は以前、compound A に類似のリンコマイシン誘導体に関する三次元構造解析を報告している。その解析によると、C-7 位側鎖のカルボニル基は大腸菌の 23S rRNA の U2585 位と水素結合により相互作用していた (60)。ゆえに我々は、MRSA が clindamycin に耐性を獲得した場合、compound A は C-7 位側鎖が linezolid の結合部位に近い上記推測部位に結合することができることで、その抗菌力を保持すると考えた。Clindamycin と linezolid は 23S rRNA の G2032A の変異により感受性が低下し、また U2504 位近くで結合することも報告されており、それらの知見も我々の仮説を後押ししている (61)。

本研究において分析した通り、compound A は clindamycin 耐性株に対して有効性を示すが、linezolid と交差耐性を示すリスクも有する。しかし、compound A は本来の clindamycin 結合部位だけでなく、新たな結合部位を獲得したことが考えられたことから、我々は compound A に対する耐性株が他剤に対する交差耐性を獲得する可能性は低いと考えている。そして、適正使用により compound A は有用な抗 MRSA 薬として新たな選択肢になると考えている。

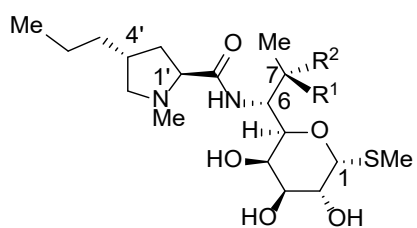
Compound A はより安全性の高いプロファイルを兼ね備えた上で、clindamycin や linezolid よりも幅広い抗 MRSA 活性を示したことから、我々は compound A が将来有効な抗 MRSA 薬になると期待している。



Compound A



Linezolid



Lincomycin : $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$

Clindamycin : $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Cl}$

Figure 18 Chemical structure of compound A, lincomycin, clindamycin and linezolid

第5章 総括

我々は耐性菌に有効な新規抗菌薬の創出に取り組む上で、既存母核を展開するアプローチを選んだ。別のアプローチとして、新規母核である **first-in class** によるアプローチも考えられたが、新規メカニズムによる耐性菌への有効性が期待できる一方で安全性に関する情報が少なく、開発失敗のリスクが高い。そこで本研究では、有効性、安全性及びその耐性機序が明らかとなっている既存母核の中から3つの母核に注目し、各々から見出したリード化合物について、MRSAを含む耐性菌に対する有効性と、その有効性を示すメカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

1. カルバペネム系抗菌薬

我々は臨床において有効性及び安全性に対する信頼の高いカルバペネム系抗菌薬を合成展開し、抗MRSA活性を有するME1036を見出した。他の β -ラクタム系抗菌薬との比較により、ME1036は新たな細胞壁合成酵素であるPBP2'に対する親和性が向上したことで、MRSAに有効性を示すと考えられた。グラム陽性菌である *S. aureus* 及び *S. pneumoniae* のPBPは相同性が高いことから(62)、我々はME1036がPBPの多様な変異による耐性が問題となっているPISP/PRSPについても有効であると考え、本研究の中で調べた。

肺炎球菌は、PBPの多様なアミノ酸変異により β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すことが知られている。特に保存アミノ酸配列のうち、 β -ラクタム系抗菌薬が結合するセリンの近傍に変異が入ると感受性が低下することが知られている(63)。我々は、 β -ラクタム系抗菌薬の耐性に主に関与するPBP1A/2X/2Bの保存アミノ酸配列の変異数に応じて、gPRSP (pbp1a/2x/2bの全てに変異を有する)、gPISP (pbp1a/2x/2bのうち1~2個に変異を有する)、gPSSP(変異なし)と遺伝子変異の観点から分類し、感受性分布の内訳を解析した。その結果、低感受性側の菌株はgPRSPが多く、感受性の高い菌株はgPSSPが分布し、その間はgPISPが分布していたことから、肺炎球菌はPBPの変異数に応じて β -ラクタム系抗菌薬に対する感受性が低下することが示され、変異数の多いgPRSP

に対しても ME1036 は強い抗菌力及び殺菌力を有した。PRSP の各 PBP に対する結合親和性を調べた結果、ME1036 はいずれの PBP に対しても強い親和性を示し、特に PBP2A/2X については他のカルバペネム系抗菌薬の中でも強い親和性を示すことで、それに相関した強い抗菌力を示すと考えられた。また、PRSP に対する短時間殺菌力は試験に供した対照薬の中でも強く、MIC 以上の濃度で速やかに生菌数を下げた。

以上の結果より、MRSA には PBP2' に対する親和性を、肺炎球菌には PBP2A/2X に対する親和性を改善することで、 β -ラクタム系抗菌薬の有効性が回復すると考えられた。ME1036 のように PBP に対する親和性を改善させることで、今後 MRSA のような多剤耐性菌に有効な治療薬が生まれると期待される。

2. アミノグリコシド系抗菌薬

我々は、抗 MRSA 薬として本邦で承認されている arbekacin の創薬開発経験を活かせるアミノグリコシド系抗菌薬に注目し、arbekacin よりも抗 MRSA 活性を改善した TS2037 を見出した。TS2037 は、MRSA 由来の二機能性酵素 AAC(6)-APH(2'') に対して、arbekacin を含む他のアミノグリコシド系抗菌薬よりも安定性が改善したがゆえに強い抗菌力及び殺菌力を示すと考えられた。また TS2037 は、試験に供した対照薬の中でも最も優れた *in vivo* 有効性を示した。Arbekacin は、殺菌的な抗菌力と胸水・腹水・心嚢液・滑膜液への良好な移行により貴重な治療選択肢の一つではあるが、腎毒及び耳毒のリスクがあることから血中モニタリングが必要である。我々は、腎上皮細胞由来の LLC-PK1 を用いた NAG 放出アッセイ系を構築し、TS2037 に関連する腎毒性のリスクが arbekacin のリスクよりも高い可能性を示した。ただし、plazomycin (64) にみる高用量短期治療といった用法用量の最適化によって、TS2037 の有効性を最大化し、腎毒性を回避することが可能と考えている。また将来的には、腎毒性軽減剤の開発など、既存薬を生かすような薬剤開発も AMR 問題を解決する 1 手段になる可能性があると考えている。

3. リンコマイシン系抗菌薬

我々は、経口投与可能で安全性の高いリンコマイシン系抗菌薬を展開し、誘導型 *erm* 産生 MRSA 及び構成型 *erm* 産生 MRSA のいずれに対しても有効性を示す新規リンコマ

イシン系抗菌薬 compound A を見出した。さらに compound A は、構成型 *erm* 産生 MRSA に対して clindamycin と同等以上の強い抗菌力を有し、linezolid とは交差耐性することを明らかにした。具体的には、compound A は誘導型 *erm* 産生の linezolid 耐性 MRSA とは交差耐性しないが、構成型 *erm* 産生の linezolid 耐性 MRSA に対しては交差耐性を示した。Compound A と類似化合物の三次元構造解析結果や文献情報などから、我々は compound A が本来の clindamycin 結合部位だけでなく linezolid 結合部位の近傍にも親和性が上がったことで、clindamycin 耐性 MRSA にも有効性を獲得したという考えを導き出した。一方で、実験的に取得した compound A 耐性 MRSA に linezolid が交叉耐性を示さなかったことから、compound A 耐性菌は linezolid 結合部位と全く同じではない、その近傍に獲得した新たな結合部位に何等かの変異が入ることで耐性化し、linezolid を含む他系統の抗菌薬の感受性には影響を及ぼさないと考えた。Clindamycin は経口投与可能な安全性の高い抗菌薬であり、米国では CA-MRSA に処方されるケースが多い。しかし近年、米国において CA-MRSA の clindamycin 耐性株蔓延に伴い、新たな抗菌薬の創出が期待されている。Compound A は linezolid で臨床上問題となっている骨髄抑制のリスク評価系としたミトコンドリア機能抑制において linezolid よりも弱い抑制効果を示したことから、市中及び院内での MRSA 感染に対して幅広く有効であり、安全性の高い抗菌薬となることが期待される。

Penicillin 発見当時より、人間と細菌は新薬の創出とその耐性化を繰り返し、闘いを続けてきた。新たな耐性菌の出現を防ぐために、不要な抗菌薬の処方を控える動きが各医療機関で積極的に行われているが、いまだ耐性菌問題は後を絶たない。これら耐性菌に有効かつ安全性の高いケミカルクラスの異なる新薬を複数創出することは、治療の選択肢を広げ、偏った抗菌薬処方を回避させることが可能となり、結果として新たな耐性菌の出現を抑制することにつながる。我々は MRSA を含む多剤耐性グラム陽性菌に有効な新規抗菌薬の創出を目指して既存母核を用いた創薬を実施し、その中から臨床応用が期待される 3 つの候補化合物を見出した (ME1036 は、安全性の問題で開発を中止した)。現状、AMR としてはグラム陰性菌が注目されているが、歴史的にみても耐性 MRSA が近い将来問題になる可能性があり、本研究結果が今後のグラム陽性菌による AMR 対策に貢献できるものと期待される。

第6章 実験材料と方法

1. 第2章の実験材料と方法

(1) 菌株

2001年に日本で臨床分離された *S. pneumoniae* の合計 129 株は、gPSSP 株 (*pbp1a*、*pbp2x* 及び *pbp2b* のいずれの *pbp* においても、保存アミノ酸に変異がない)、gPISP (*pbp2x* または *pbp2b* のいずれか、*pbp1a* 及び *pbp2x*、または *pbp2x* 及び *pbp2b* に変異を有する) 及び gPRSP (*pbp1a*、*pbp2x* 及び *pbp2b* の全てに変異を有する) (65, 66) を含んでおり、これらは生方公子博士 (前 北里大学 北里生命科学研究so 病原微生物分子疫学研究室 教授) より提供を受けた。*S. pneumoniae* R6 (BAA-255) は American Type Culture Collection から購入した。*S. pneumoniae* 197 は臨床分離株である。本試験で用いたこれらの株は Meiji Seika ファルマ 医薬研究所で保管しており、外部発表については Meiji Seika ファルマ の社外発表申請で承認されている (2020-013)。

(2) 抗菌薬

ME1036 は Meiji Seika ファルマ 医薬研究所で合成したものをを用いた。他の抗生物質は以下の購入品を使用した。Meropenem (大日本住友製薬、大阪、日本)、panipenem (第一三共、東京、日本)、cefotaxime (Sanofi-aventis KK、東京、日本)、ceftriaxone (中外製薬、東京、日本)、penicillinG 及び amoxicillin (Sigma-Aldrich Chemical、ミズーリ州セントルイス、USA)、vancomycin (シオノギ、大阪、日本)、levofloxacin (第一三共、東京、日本) 及び imipenem (MSD KK、東京、日本)。

(3) 感受性試験

S. pneumoniae に対する MIC は、Mueller-Hinton agar (MHA、Becton, Dickinson and company、Franklin Lakes、NJ、USA) を使用した 5% の脱繊維血液入り寒天平板希釈法で決定した (67)。凍結保存していた試験菌を上記平板に塗抹し、35℃ で一夜培養した。寒天平板に発育した菌を Mueller-Hinton broth (MHB、Becton, Dickinson and company、Franklin Lakes、

NJ, USA) に 0.5 McFarland standard の濁度となるように直接懸濁した。各接種菌を、multiple inoculator (ミクロプランター、佐久間製作所、東京、日本) を用いて各々の濃度に調整した薬剤含有平板に接種した (10^4 CFU/spot)。MIC 値は、35°Cで 20 時間の培養後に視覚的に菌の発育が阻止されている最小濃度で決定した。

(4) PBP 遺伝子の同定のための PCR

各 PBP 遺伝子及び *S. pneumoniae* に特異的な autolysin15 (68) をコードする *lytA* の断片は既報の通り PCR で増幅した (66)。PCR 増幅後、これらの遺伝子断片の DNA が検出されなかった場合、または予想とは異なるサイズであった場合は変異 PBP を保有していると見なし、その *S. pneumoniae* は gPSSP、gPISP、または gPRSP に分類した。

(5) PBP に対する抗菌薬の親和性測定

ME1036 と他の β -ラクタムの PBP に対する親和性は、既報の通り [3 H]-ベンジル penicillin を用いた競合アッセイにより評価した (69)。Spratt の方法 (70) に準じ、PBPs を含む膜画分を調製した。 *S. pneumoniae* R6 及び *S. pneumoniae* 197 を Brain Heart Infusion 液体培地に植菌し、 $OD_{595} = 0.8-1.0$ 程度になるまで 35°Cで静置培養した。遠心分離 ($12000 \times g$ 、20 分) により集菌し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.0) -10 mM $MgCl_2$ で 1 回洗浄した。少量の同緩衝液に懸濁させた菌体を氷冷下で超音波破碎後、遠心分離 ($8000 \times g$ 、20 分) した上清をさらに超遠心機で分離 ($110000 \times g$ 、30 分) し、膜画分を得た。膜画分は DC protein assay (BIO-RAD) を用いてタンパク量を定量し、最終タンパク濃度が 2 mg/mL となるよう調製した。タンパク量 2 mg/mL の膜画分に所定濃度の各薬剤を添加し、30°Cで 10 分間反応させた。これに 3 H-PCG (111 kBq) を加え、さらに 30°Cで 10 分間反応させた。この反応液に 30 mg/mL penicillin G-10(w/v)% sarcosyl 液を加え、室温に 20 分放置し反応を停止した。不溶画分を遠心分離 ($10000 \times g$ 、30 分) で除いた後、その上清 30 μ L に 15 μ L の SDS buffer と 5 μ L のメルカプトエタノールを加え、沸騰水中で 2 分間加熱することでタンパク質を変性した。このサンプルを 8%polyacrylamide gel で電気泳動した。ゲルは 7%酢酸-50%メタノール水溶液で固定後、2,5-diphenyloxazole (PPO) で 3 時間処理し、水洗して乾燥させた。乾燥したゲルを X 線フィルムに密着し、-80°Cで 6 日から 3 週間感光させ fluorography を行った。現像したフィルムは NIH image を用いて画像解析を

行い、 ^3H -PCG の結合を 50% 阻害する濃度 (IC_{50}) を求めた。

S. pneumoniae R6 及び *S. pneumoniae* 197、いずれの膜画分を用いた場合においても PBP2A と PBP2X のバンドを完全に分離することはできなかったため、PBP2A と PBP2X は合わせて PBP2A/2X として解析を行った。

(6) 短時間殺菌力

5% の馬無菌脱線血を添加した MHA で一晩培養した *S. pneumoniae* を、5% 馬溶血液を添加したカチオン調整ミュラーヒントンブロス (CAMHB, Mueller Hinton II Broth, cation-adjusted, Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA) 5ml に各々接種した。35°C で 2 時間の培養後、抗生物質をそれぞれ MIC の 1/4、1/2、1、2、または 4 倍に相当する濃度となるように加えた。5% の馬無菌脱線血を添加した MHA に一連の 10 倍希釈液を 50 μL ずつ塗抹し培養することにより、各々の抗生物質と 35°C で 0、2、4 及び 6 時間インキュベーション後の生存細菌を数えた。各サンプルのコロニー数は、35°C で 24 時間インキュベートした後にカウントした。

2. 第 3 章の実験材料と方法

(1) 抗菌薬

TS2037 は、Meiji Seika ファルマ 医薬研究所で合成したものを用いた (39)。以下の抗菌薬は購入した。Arbekacin、amikacin 及び kanamycinB (Meiji Seika ファルマ)、tobramycin 及び gentamicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、imipenem/cilastatin (MSD、東京、日本)、vancomycin (塩野義製薬、大阪、日本)、teicoplanin (Sanofi K.K., 東京、日本)、linezolid (ファイザー・ジャパン株式会社、東京、日本)、ciprofloxacin (Sequoia Research Products Ltd., オックスフォード、イギリス)、cefepime (Bristol Myers Squibb Company、東京、日本)。

(2) 菌株

S. aureus RN4220 及び *E. coli* JM109 の同質遺伝子株は、アミノグリコシド耐性遺伝子を保有する臨床分離株から得られたプラスミドの形質転換または形質導入によって作製した。*S. aureus* RN4220/pMS18、*S. aureus* RN4220/pMS91、*S. aureus* RN4220/pMS520 は、北里大学より分与された *S. aureus* RN4220 に、同じく北里大学より分与されたプラスミド pMS18、pMS91 及び pMS520 を形質導入して作製した。*S. aureus* RN4220/pCR1948 は、*S. aureus* RN4220 に臨床分離株である *S. aureus* CR1948 のプラスミドを形質転換して作製した。*S. aureus* RN4220/pMF490 は、*S. aureus* RN4220 に臨床分離株である *S. aureus* MF490 のプラスミドを接合伝達により導入して作製した。プラスミド pMS18、pMS91、pMS520、pCR1948 及び pMF490 に含まれるアミノグリコシド耐性遺伝子は、各々 *aph*(3')-III (5'-CGATGTGGATTGCGAAACT, 3'-CACCGAAATAACTAGAACCC)、*aac*(6')-*aph*(2'') (5'-CATTATACAGAGCCTTGGGA, 3'-AGGTTCTCGTTATTCCCGTA)、*ant*(4')-I (5'-ATGGCTCTCTTGGTCGTCAG, 3'-TAAGCACACGTTTCCTGGCTG) のプライマーを用いた PCR にて決定した (71)。*E. coli* JM109/pHSG298 は、*E. coli* JM109 に購入したプラスミド pHSG298 (タカラバイオ、Code No. 3298、マルチクローニングサイト及び 1446 番の G を除き pHSG299 (GenBank Accession No. M19415) と同じ配列) を形質転換して作成した。*E. coli* JM109/pMW218 は、*E. coli* JM109 に購入したプラスミド pMW218 (ニッポン・ジーン、Code No. 317-02601、NCBI Accession No. AB005477) を形質導入して作成した。*P. aeruginosa* PAO1/GN4925、*P. aeruginosa* PAO1/GN315 及び *P. aeruginosa* PAO1/ML4847 は、旧エピソード研より分与された *P. aeruginosa* GN4925、*P. aeruginosa* GN315 及び *P. aeruginosa* ML4847 より、*P. aeruginosa* PAO1 に接合伝達により作製した。*P. aeruginosa* PAO1 及びその Δ mexXY/oprM 誘導体株である *P. aeruginosa* PAO1 Δ mexXY は、京都薬科大学の後藤直正教授から提供を受けた (72)。臨床分離株は、日本の様々な病院から 10 年間にわたって収集した。本試験で用いたこれらの株は Meiji Seika ファルマ 医薬研究所で保管しており、外部発表については Meiji Seika ファルマの社外発表申請で承認されている (2020-013)。

(3) 抗菌剤感受性試験

最小発育阻止濃度 (MIC) は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドラインに従って、MHA を用いた寒天平板希釈法によって測定した (40)。CLSI ガイドラインに記載されているように、MRSA 及びメチシリン耐性コアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (MR-CNS) は、2%NaCl を含む MHA の oxacillin の MIC ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$) によって測定した (40)。凍結保存していた試験菌を上記平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。寒天平板に発育した菌を生理食塩液に 0.5 McFarland standard の濁度となるように直接懸濁した。各接種菌を、multiple inoculator (ミクロプランター、佐久間製作所、東京、日本) を用いて各々の濃度に調整した薬剤含有平板に接種した (10^4 CFU/spot)。MIC 値は、35°C で 20 時間の培養後に視覚的に菌の発育が阻止されている最小濃度で決定した。MIC₅₀ 及び MIC₉₀ は、評価した菌株のそれぞれ 50% と 90% の発育阻止された抗菌薬の最小濃度として定義した。

(4) MRSA に対する殺菌力測定

本試験では gentamicin 耐性 MRSA の臨床分離株を 5 株用いた。凍結保存していた菌株を MHA に塗抹し、35°C で一夜培養した。発育してきた菌を MHB で 35°C、18 時間培養し、同培地にて終濃度が約 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL となるように調製した。これを 35°C で 2 時間の浸透培養後、最終薬剤濃度が 1、2、4MIC 濃度になるように各薬剤を培養液に加えた。コントロール群には抗菌薬は何も加えなかった。35°C で一晩培養した寒天平板に生育したコロニー数から生菌数を測定した。

(5) アミノグリコシド修飾酵素アッセイ

無細胞抽出液の準備のため、*aac(6')-aph(2'')* 遺伝子を保有する *S. aureus* RN4220/pMF490 を Luria-Bertani 液体培地で 35°C、振盪培養した。625 nm での吸光度が 0.7~0.8 に達した後、細胞は遠心分離により回収し、50mM の tris-(hydroxymethyl)aminomethane buffer (pH 7.6) で洗浄した。その後、細胞を 0.1mm のガラスビーズを含有する同培地に再懸濁し、Beads Shocker (安井器械、東京、日本) で破碎した。17,000×g、4°C で 30 分間遠心し、上清を無細胞抽出液として回収した。上清のタンパク質濃度は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Japan、東京、日本) で測定し、使用するまで -80°C で保存した。TS2037、arbekacin、gentamicin 及び kanamycinB をアセチル

CoA 及び ATP と共に *S. aureus* RN4220/pMF490 の無細胞抽出物と共培養した。アミノグリコシド系抗菌薬の修飾は、液体クロマトグラフィー及びエレクトロスプレー法 (ESI) を用いて解析した。

(6) *In vivo* 有効性

TS2037 の全ての動物実験及びプロトコルは、Meiji Seika ファルマ 医薬研究所によって作成され、Meiji Seika ファルマ医薬研究所の動物実験管理委員会に承認された動物実験の管理に関するガイドラインを遵守した (承認番号 : C145-294、C145-339、C145-384、C145-472)。4 週齢の雄の ICR マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県、日本) より購入した。*In vivo* 有効性は MRSA 及び緑膿菌マウス全身感染モデルによって評価した。*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 による感染用以外のマウスは、事前に 200 mg/kg のサイクロフォスファミドで前処置した。4 日後、5% ムチンに懸濁した接種菌を ICR マウスに腹腔内投与した。菌接種 2 時間後 (*P. aeruginosa* MSC3151 は菌接種 6 時間後) に薬物を皮下投与した。菌接種 7 日後の生存数及び投与した薬剤量から、プロビット法を用いて 50% 有効用量 (ED₅₀) を算出した。

(7) N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) アッセイ

本試験に用いたブタ腎由来 LLC-PK1 細胞は、大日本住友製薬株式会社より購入した。5% 非働化ウシ胎仔血清 (大日本住友製薬株式会社製) 及び 5 mL / 500 mL ITS-X (GIBCO 社製) を含む DMEM/F12 培地 (GIBCO 社製、以下培養培地) を用いて 3-4 日毎に継代した。培養には CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C 加湿条件下) を使用した。また、被検物質の処理には血清及びフェノールレッドを含有しない ITS-X を添加した DMEM/F12 培地 (GIBCO 社製、以下処理培地) を使用した。

6 穴プレート (MULTIWELLTM6 Well、FALCON 社製) に培養培地 3 mL を分注してトランスウェル (Cell Culture Insert 3.0 μM pore size 6 well format、FALCON 社製) をセットした。続いてトランスウェルに培養培地 1.5 mL を分注し、CO₂ インキュベーター内で 20-30 分保温した。培養開始後 2-3 回継代した細胞を 0.125% Trypsin を用いて回収し、培養培地を用いて 1.5 × 10⁵ cells/mL に調製した後、トランスウェルに 1 mL/well で播種した。培養 2 日目及び 4 日目に培地を交換し、7 日目にはトランスウェルを処理

培地 2 mL で 2 回洗浄した。得られた細胞のウェルに終濃度 2.5. 5 μ M に調製した被検物質を含む処理培地を 2.5 mL/well 添加した。新しい 6 穴プレートに培養培地 3.25 mL を分注し、細胞のウェルをセットして CO₂ インキュベーター内で 3 日間処理した。処理後 1 日目及び 2 日目に下層の培地を交換した。3 日目には上層の培養液 1-2 mL をチューブに移して 4°C で 2,000 rpm、5 分間遠心し、上清を回収して NAG 濃度測定サンプルとした。サンプル中の NAG 活性は、NAG テストシオノギ（塩野義製薬社製）を用いて Automatic Analyzer7050（日立社製）で測定した。腎上皮細胞 LLC-PK1 から放出された NAG の量を、*in vitro* での腎毒性として決定し、測定値は平均値±標準誤差で表した（73）。薬剤間の NAG 値の有意差検定は、Student の t 検定を用いた。

3. 第 4 章の実験材料と方法

(1) 抗菌薬

Compound A は、Meiji Seika ファルマ株式会社 医薬研究所で合成したものを用いた。硫酸 arbekacin は、Meiji Seika ファルマ株式会社の北上工場で合成したものを用いた。Clindamycin、chloramphenicol 及び linezolid は、Sigma Chemical Co.（セントルイス、MO、米国）から購入した。

(2) 菌株

S. aureus Smith（74）、*S. aureus* MW2（75）及び *S. aureus* ATCC29213（76）は、American Type Culture Collection から購入した。*S. aureus* MSC15009/pMS98 及び *S. aureus* MSC15009/pMS99 は、臨床分離株である *S. aureus* MSC15009 に誘導型 *ermB* 及び構成型 *ermA* を含むプラスミド pMS98 及び pMS99 を形質転換して作製した。*S. aureus* MSC15009、*S. aureus* MSC16946、*S. aureus* MSC17016、*S. aureus* MSC18042、*S. aureus* MSC18048 及び *S. aureus* MF126 は臨床分離株である。*S. aureus* N315 LZr-5、*S. aureus* N315 LZr-5162、*S. aureus* N315 LZr-5322 及び *S. aureus* N315 LZr-5642 は、*in vitro* で linezolid の高濃度下で *S. aureus* N315（77）から段階的に選択した linezolid 低感受性株である。*S. aureus* ATCC29213 K-31 及び *S. aureus* Smith K-No.1 は、*S. aureus* ATCC29213 及び *S. aureus* Smith からそれぞれ *in vitro*

で linezolid の高濃度下で選択した linezolid 低感受性株である。Linezolid に対する非感受性株の遺伝子変異の箇所は、シーケンサー (Applied Biosystems 3730 DNA アナライザー) を使用して識別し、変異の各部位は、linezolid 耐性 MRSA (54) として報告されている臨床分離株と同一であることを確認した。Compound A 低感受性の *S. aureus* N315 由来の分離株は、*in vitro* において compound A 高濃度下で *S. aureus* N315 から選択した。本試験で用いたこれらの株は Meiji Seika ファルマ 医薬研究所で保管しており、外部発表については Meiji Seika ファルマの社外発表申請で承認されている (2020-013)。

(3) 抗菌薬感受性試験

最小発育阻止濃度 (MIC) は、CLSI ガイドラインに従って MHA を用いた 2 倍寒天平板希釈法によって測定した (78)。凍結保存していた試験菌を上記平板に塗抹し、35°C で一夜培養した。寒天平板に発育した菌を生理食塩液に 0.5 McFarland standard の濁度となるように直接懸濁した。各接種菌を、multiple inoculator (ミクロプランター、佐久間製作所、東京、日本) を用いて各々の濃度に調整した薬剤含有平板に接種した (10^4 CFU/spot)。MIC 値は、35°C で 20 時間の培養後に視覚的に菌の発育が阻止されている最小濃度で決定した。

(4) 高分子合成アッセイ

凍結保存していた試験菌を LB 寒天プレートに塗抹し、35°C で一夜培養した。平板上に発育したコロニーを LB ブロスに $OD_{625} = 0.7$ となるように懸濁し、コロニー懸濁液を調製した。コロニー懸濁液の 50 μ L (但し MSC18042 株は 500 μ L) を LB(50 mL) に希釈し、35°C、120/min で振盪しながら 2 時間インキュベートした。炭素標識の高分子 (チミジン、ウリジン、イソロイシン、AcONa、GlcNAc) は全て Amersham Biosciences Corp から購入した。水で希釈した各標識高分子、試験化合物及び菌懸濁液を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。トリクロロ酢酸により反応を止めた後、ろ過し (マルチスクリーン、GF/B フィルター (ワットマン))、乾燥した。MICROSCINT20 シンチレーションカウンターを使用して放射線量をカウントし、トップカウント Galanin³⁵S フィルターを使用して分析した。

(5) Compound A に対する黄色ブドウ球菌の耐性出現頻度

凍結保存していた試験菌を Brain Heart Infusion agar (BHIA, Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA) に塗抹し、35°Cで24時間培養した。平板に発育した菌から3~5コロニーをCAMHB (2mL) に懸濁し、35°Cで18時間培養した。その菌液をすべて100mLのCAMHBに接種し、100rpmで4~5時間振盪培養した。その後、遠心分離機で濃縮し、ペレットを10mLの生理食塩水に懸濁し接種菌液とした。接種菌液の0.1 mL 溶液を、各濃度の compound A を含む BHIA に播種し、35°Cで24時間培養した。耐性菌の出現頻度は、菌が増殖した compound A 含有平板の中で、最高濃度含有平板で増殖したコロニーの数を接種菌数で除して算出した。

(6) Clindamycin 感受性/耐性 MRSA を使用したマウス皮下膿瘍モデルにおける *in vivo* 有効性

本研究の全ての *in vivo* 試験は、Meiji Seika ファルマ株式会社 医薬研究所によって確立され、医薬研究所 動物実験管理委員会によって承認された動物実験の管理に関するガイドラインに従った (承認番号: C149-240)。4週齢の雄 ICR マウスは、Charles River Japan, Inc. (神奈川県、日本) から購入した。腹腔内投与により 200 mg/kg のサイクロホスファミドでマウスを前処理した。凍結保存した菌を、BHIA に塗抹し、35°Cで一晩培養した。BHIA 上に発育した菌株を Brain Heart Infusion ブロス (BHIB, Becton Dickinson Company) に懸濁し、吸収分光計 (UV-2400, Shimadzu) を用いて 660 nm の吸光度における濁度を 0.5 に調整した。上記細菌懸濁液を BHIB で 1/100 に希釈し、BHIB で調製した等量の 2%w/v デキストランビーズに加えた。接種材料を ICR マウスに皮内注射した。薬物は、菌接種の2時間後及び6時間後に皮下投与した。菌接種の24時間後、膿瘍を麻酔下でマウスから摘出した。摘出した膿瘍を 2.0mL の生理食塩水に加えて均一になるように混ぜた。上記ホモジネートとその希釈液は、寒天平板に塗抹し、35°Cで一晩培養した。培養後、寒天平板上に生育したコロニー数を数え、各膿瘍の細菌数を決定した。

(7) ミトコンドリア機能阻害

4週齢の雌 ICR マウスは、Charles River Japan, Inc. (神奈川県、日本) から購入した。

マウスの肝臓を麻酔下で取り出し、本研究で使⽤した。エーテル麻酔下で緩衝液 MSE (220mM マンニトール、70mM スクロース、5mMMOPS、2mMEGTA、pH 7.0) を使⽤してポータルから還流した後、マウスの肝臓を分離した。マウスの肝臓をバッファー MSE で均質化した後、上清を高速遠心分離 (8500 x g、4°C、10 分、Avanti 30、F1010、BECKMAN COULTER) で分離し、マウスのミトコンドリアをペレットとして取得し、MSE Buffer にて 50mg/mL のミトコンドリア液に調整した。放射性同位元素アッセイの直前に、アッセイバッファー (90mM KCl、4mM MgSO₄、2.5mM KH₂PO₄、25mM MOPS、0.1mM アミノ酸、グルタミン酸/マレイン酸/メチオニンは非含有、20mM グルタミン酸、0.5mM リンゴ酸、2mM ADP、1 mg/mL BSA、pH 7.0) で調整した 0.1 mg/mL シクロヘキシミドを⽤いてミトコンドリア液を 10 mg/mL に希釈した。10 μM の [³⁵S]Met を試験化合物 (0.01、0.1、1、10mM) と 10mg/mL ミトコンドリアの混合物に加え、25°C で 30 分間培養した。停止溶液 (10mM メチオニンを含む 3% スルホサリチル酸) を添加した後、各サンプルをセルハーベスター (GF/B フィルター) で洗浄し、シンチレーションカウンタ MICROSINT 20 を⽤いて ³⁵S の値を決定し、Top Count の Galanin³⁵S フィルターを⽤して分析した。

掲載論文

本論文は以下の論文を中心にまとめた。

- 第2章 Yoko Hirai, Sho Takahata, Keiko Yamada, Takashi Ida and Kazunori Maebashi.
Correlation of the antimicrobial activity of ME1036 with its binding affinities to the penicillin-binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* strains. J Antibiot. 2011, **64**, 741–746.
- 第3章 Yoko Hirai, Kazunori Maebashi, Hideki Fushimi, Yukiko Hiraiwa, Shoichi Murakami, Takayuki Usui, Yoshihisa Akiyama, Nobuto Minowa and Daishiro Ikeda. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of TS2037, a novel aminoglycoside antibiotic. J Antibiot. 2018, **71**, 363-371.
- 第4章 Yoko Hirai, Kazunori Maebashi, Keiko Yamada, Yoshinari Wakiyama, Ko Kumura, Eijiro Umemura and Keiichi Ajito. Characterization of compound A, a novel lincomycin derivative active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antibiot. 2021, **74**, 124-132

参考文献

1. S. Boyle-Vavra and R. S. Daum, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leucocidin. *Lab Invest.* 2007, **87**, 3-9.
2. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53**, 4961–4967
3. 今井 大助, 馬 笑雪, 柳川 宏之, 伊藤 輝代, 平松 啓一, 黒澤 尚. 本邦の MRSA の薬剤感受性と SCCmec のタイプ, *Juntendo Medical Journal*, 2003, **49**, 343-354.
4. K. P. Klugman and S. Black, Impact of existing vaccines in reducing antibiotic resistance: Primary and secondary effects. *PNAS*, 2018, **115**, 12896-12901
5. C. P. Andam, C. J. Worby, R. Gierke, L. McGee, T. Pilishvili, and W. P. Hanage, Penicillin Resistance of Nonvaccine Type *Pneumococcus* before and after PCV13 Introduction, United States. *Emerg Infect Dis.* 2017, **23**, 1012–1015.
6. S. Garneau-Tsodikova and K. J. Labby. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm.* 2016, **7**, 11–27.
7. T. Matsumoto, H. Hanaki, T. Kimura, M. Nemoto, M. Higashihara, H. Yokota, S. Oda, N. Akiyama, N. Miyao, M. Yoshida, T. Yukioka, K. Soma, K. Ohyashiki, Y. Suzuki, T. Arai, K. Ikegami, T. Ichiwata, Y. Otsuka, M. Kobayashi, K. Totsuka, K. Sunakawa, and ABK Dose Finding Study Group, Clinical efficacy and safety of arbekacin sulfate in patients with MRSA sepsis or pneumonia: a multi-institutional study. *J Infect Chemother.* 2013, **19**, 128-37.
8. V. F. Vandenesch, T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine,

- M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and Jerome Etienne corresponding author. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**, 978-984.
9. C. R. Frei, M. L. Miller, J. S. Lewis 2nd, K. A. Lawson, J. M. Hunter, C. U. Oramasionwu, and R. L. Talbert, Trimethoprim-sulfamethoxazole or clindamycin for community-associated MRSA (CA-MRSA) skin infections. *J Am Board Fam Med*. 2010, **23**, 714-719.
 10. M. Patel, K. B. Waites, S. A. Moser, G. A. Cloud, and C. J. Hoesley, Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance among Community- and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2006, **44**, 2481–2484.
 11. S. L. Green, J. C. Maddox, and E. D. Huttenbach, Linezolid and reversible myelosuppression. *JAMA*, 2001, **14**, 285, 1291.
 12. H. Goto, K. Shimada, H. Ikemoto, T. Oguri, and Study Group on Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Isolated from Respiratory Infections, Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from more than 10000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. *J. Infect. Chemother*. 2009, **15**, 347–360.
 13. G. V. Doern, S. S. Richter, A. Miller, N. Miller, C. Rice, K. Heilmann, and S. Beekmann, Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Clin. Infect. Dis*. 2005, **41**, 139–148.
 14. M. Kurazono, T. Ida, K. Yamada, Y. Hirai, T. Maruyama, E. Shitara, and M. Yonezawa, *In vitro* activities of ME1036 (CP5609), a novel parenteral carbapenem, against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004, **48**, 2831–2837.

15. J. Nagura, K. Kijima, M. Kurazono, S. Takahata, T. Sugano, Y. Tanaka, Y. Hirai, K. Yamada, Y. Takayama, E. Shitara, and M. Yonezawa, Therapeutic Effect of ME1036 on Endocarditis Experimentally Induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49, 3526–3528.
16. J. Nagura, T. Sugano, A. Yamamoto, Y. Takase, S. Sakakibara, H. Takata, K. Matsumoto, E. Shitara and M. Yonezawa, CP5609, a Novel Parenteral Carbapenem: Efficacy on Experimental Endocarditis due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2002, 42nd ICAAC, F321.
17. M. Yonezawa, J. Nagura, Y. Takase, T. Sugano, Y. Takayama T. Takata, A. Shimizu, S. Sakakibara, H. Takata, K. Matsumoto, K. Tohyama and E. Shitara, CP5609, a Novel Parenteral Carbapenem: *In Vivo* Activities against Methicillin-Resistant *S. aureus*, Penicillin-Resistant *S. pneumoniae* and β -Lactamase Negative Ampicillin-Resistant *H. influenza*. 2002, 42nd ICAAC, F322
18. J. Nagura, Y. Takayama, K. Kijima, M. Yamamoto, T. Yoshida and M. Yonezawa, ME1036, a Novel Parenteral Carbapenem: Efficacy on Mouse Subcutaneous Abscesses Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2005, 45th ICAAC F1450
19. E. Matsuhisa, K. Hasunuma, H. Suzuki, M. Ogawa, N. Senju, E. Shitara, and M. Yonezawa, CP5609, a Novel Parenteral Carbapenem: Pre-Clinical Toxicological Profile. 2002, 42nd ICAAC, F323
20. K Kosowska-Shick, P. L. McGhee, and P. C. Appelbaum, Affinity of ceftaroline and other beta-lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54**, 1670–1677.
21. M. Yamada, T. Watanabe, N. Baba, Y. Takeuchi, F. Ohsawa, and S. Gomi, Crystal structures of biapenem and tebipenem complexed with penicillin-binding proteins 2X and 1A from

- Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2008, **52**, 2053–2060.
22. C. Contreras-Martel, C. Dahout-Gonzalez, A. D. S. Martins, M. Kotnik, and A. Dessen, PBP active site flexibility as the key mechanism for beta-lactam resistance in pneumococci. J. Mol. Biol. 2009, **387**, 899–909.
23. F. Cafini, R. del Campo, L. Alou, D. Sevillano, M. I. Morosini, F. Baquero, J. Prieto, and Spanish Pneumococcal Network (G03/103), Alterations of the penicillin-binding proteins and murM alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. J. Antimicrob. Chemother. 2006, **57**, 224–229.
24. A. Dalhoff, T. Nasu, and K. Okamoto, Target affinities of faropenem to and its impact on the morphology of gram-positive and gram-negative bacteria. Chemotherapy 2003, **49**, 172–183.
25. P. L. Ho, S. S. Chiu, I. Ang, and Y. L. Lau, Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, Hong Kong, 1995–2009. Vaccine 2011, **29**, 3270–3275.
26. M. H. Rozenbaum, C. Boersma, M. J. Postma, and E. Hak. Observed differences in invasive pneumococcal disease epidemiology after routine infant vaccination. Expert Rev. Vaccines 2011, **10**, 187–199.
27. K. H. Yao, L. B. Wang, G. M. Zhao, Y. J. Zheng, L. Deng, J. F. Huang, J. X. Wang, R. Z. Zhao, Q. L. Deng, Y. H. Hu, S. J. Yu, Y. H. Yang, and M. Young, Pneumococcal serotype distribution and antimicrobial resistance in Chinese children hospitalized for pneumonia. Vaccine 2011, **29**, 2296–2301.
28. S. Tokajian, New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in the Middle East. Clin Microbiol Infect. 2014, **20**, 624–628.

29. C. J. Chen and Y. C. Huang, New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. Clin Microbiol Infect. 2014, **20**, 605–623.
30. Y. Sharma, S. Jain, H. Singh, and V. Govil, *Staphylococcus aureus*: Screening for nasal carriers in a community setting with special reference to MRSA. Science. 2014, 479048.
31. G. W. Coombs, S. Monecke, J. C. Pearson, H. L. Tan, Y. K. Chew, L. Wilson, R. Ehricht, F. G. O'Brien, and K. J. Christiansen, Evolution and diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a geographical region. BMC Microbiol. 2011, **11**, 215.
32. P. Cocchi, G. Taccetti, C. Montagnani, L. Galli, C. Braggion, and M. de Martino, Evidence of transmission of a Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone: a family affair. Clin Microbiol Infect. 2013, **19**, 1158–1162.
33. V. Shetty, K. Trumbull, A. Hegde, V. Shenoy, R. Prabhu, K. Sumathi, E. Palavecino, and A. K. Shetty, Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among children. J Clin Diagn Res. 2014, **8**, DC12–5.
34. W. T. Lo, W. J. Lin, M. H. Tseng, J. J. Lu, S. Y. Lee, M. L. Chu, and C. C. Wang, Nasal carriage of a single clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among kindergarten attendees in Northern Taiwan. BMC Infect Dis. 2007, **7**, 51.
35. Z. Ali, N. Mumtaz, S. A. Naz, N. Jabeen, and M. Shafique, Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals. J Pak Med Assoc. 2015, **65**, 12–16.

36. A. C. S. Rodrigues, M. R. Chang, G. D. Nóbrega, M. S. Rodrigues, N. C. P. Carvalho, B. G. Gomes, D. L. Almeida, K. R. Carvalho, and M. D. Asensi, Metallo- β -lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011, **15**, 195–199.
37. J.A. Karlowsky, D. J. Hoban, M. A. Hackel, S. H. Lob, and D. F. Sahm, Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. *J Med Microbiol.* 2017, **66**, 61–69.
38. J. R. Mediavilla, A. Patrawalla, L. Chen, K. D. Chavda, B. Mathema, C. Vinnard, L. L Dever, and B. N. Kreiswirth, Colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaNDM-5, causing a complicated urinary tract infection in a patient from the United States. *MBio.* 2016, **30**, 7.
39. Y. Hiraiwa, N. Minowa, T. Usui, Y. Akiyama, K. Maebashi, and D. Ikeda, Effect of varying the 4''-position of arbekacin derivatives on antibacterial activity against MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007, **17**, 6369–6372.
40. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012, M100-S22.
41. S. Kondo, K. Iinuma, and H. Yamamoto, Syntheses of 1-N-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot.* 1973, **26**, 412–415.
42. Y. Hiraiwa, T. Usui, Y. Akiyama, K. Maebashi, and N. Minowa. Synthesis and antibacterial activity of 5-deoxy-5-episubstituted arbekacin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007, **17**, 3540–3543.

43. S. Magnet and J. S. Blanchard, Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* 2005, **105**, 477–498.
44. H. Goto and M. Iwasaki, Susceptibilities of bacteria isolated from patients with lower respiratory infectious diseases to antibacterial agents (2010). *Jpn J Antibiot.* 2015, **68**, 85–104.
45. T. Matsumoto, Arbekacin: another novel agent for treating infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Clin Pharmacol.* 2014, **6**, 139–148.
46. S. Y. Holbrook and S. Garneau-Tsodikova, Expanding aminoglycoside resistance enzyme regiospecificity by mutation and truncation. *Biochemistry.* 2016, **55**, 5726–5737.
47. M. Tabata, M. Shimizu, M. Araake, and H. Ogawa, Relationship between arbekacin-susceptibility and aminoglycoside-resistant gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jpn J Antibiot.* 2003, **56**, 36–43.
48. P. Keith, Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, **49**, 479–487.
49. R. T. Cass, C. D. Brooks, N. A. Havrilla, K. J. Tack, M. T. Borin, D. Young, and J. B. Bruss, Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of ACHN-490 injection administered intravenously in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, **55**, 5874–5880.
50. J. W. Agostino, J. K. Ferguson, K. Eastwood, and M. D. Kirk, The increasing importance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Med J Aust.* 2017, **207**, 388–93.

51. G. W. Coombs, D. A. Daly, J. C. Pearson, G. R. Nimmo, P. J. Collignon, M. L. McLaws, J. O. Robinson, J. D. Turnidge, and Australian Group on Antimicrobial Resistance, Community-onset *Staphylococcus aureus* Surveillance Programme annual report, 2012. Commun Dis Intell Q Rep. 2014, **38**, E59-69.

52. A. E. Peterson, M. F. Davis, K. G. Julian, G. Awantang, W. H. Greene, L. B. Price, A. Waters, A. Doppalapudi, L. J. Krain, K. Nelson, E. K. Silbergeld, and C. J. Whitener, Molecular and Phenotypic Characteristics of Healthcare- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at a Rural Hospital. PLoS One. 2012, **7**, e38354.

53. S. Flanagan, E. E McKee, D. Das, P. M. Tulkens, H. Hosako, J. Fiedler-Kelly, J. Passarell, A. Radovsky, and P. Prokocimer, Nonclinical and pharmacokinetic assessments to evaluate the potential of tedizolid and linezolid to affect mitochondrial function. Antimicrob Agents Chemother. 2015, **59**, 178-185.

54. S. Iguchi, T. Mizutani, K. Hiramatsu, and K. Kikuchi, Rapid Acquisition of Linezolid Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Role of Hypermutation and Homologous Recombination. PLOS ONE. 2016, **11**, e0155512

55. Y. Wakiyama, K. Kumura, E. Umemura, S. Masaki, K. Ueda, Y. Sato, Y. Hirai, Y. Hayashi, and K. Ajito, Synthesis and SARs of novel lincomycin derivatives Part 5: optimization of lincomycin analogs exhibiting potent antibacterial activities by chemical modification at the 6- and 7-positions. J Antibiot. 2018, **71**, 298-317

56. O. K A. Hassan, M. Karnib, R. El-Khoury, G. Nemer, M. Ahdab-Barmada, and P. B. Khalil, Linezolid Toxicity and Mitochondrial Susceptibility: A Novel Neurological Complication in a Lebanese Patient. Frontiers in Pharmacology, 2016, **7**, 325-329

57. S. Douthwaite. Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1992, **20**, 4717–4720.
58. M. Z. David and R. S. Daum, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010, **23**, 616-687
59. L. Braun, D. Craft, R. Williams, F. Tuamokumo, and M. Ottolini, Increasing clindamycin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 57 northeast United States military treatment facilities. *Pediatr Infect Dis J*. 2005, **24**, 622-626.
60. Y. Wakiyama, K. Kumura, E. Umemura, S. Masaki, K. Ueda, T. Watanabe, M. Yamamoto, Y. Hirai and K. Ajito, Synthesis and structure–activity relationships of novel lincomycin derivatives. Part 2. Synthesis of 7(S)-7-deoxy-7-(4-morpholino carbonylphenylthio) lincomycin and its 3-dimensional analysis with rRNA. *J Antibiot*. 2016, **69**, 428-39.
61. C. Davidovich, A. Bashan, and A. Yonath. Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics. *PNAS*. 2008, **105**, 20665–20670.
62. H. Moisan, M. Pruneau, and F. Malouin. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010, **65**, 713-716
63. Y. Asahi, Y. Takeuchi and K. Ubukata. Diversity of Substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in Cephalosporin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, **43**, 1252–1255

64. F. M.E. Wagenlehner, D. J. Cloutier, A. S. Komirenko, D. S. Cebrik, K. M. Krause, T. R. Keepers, L. E. Connolly, L. G. Miller, I. Friedland, and J. P. Dwyer for the EPIC Study Group, Once-Daily Plazomicin for Complicated Urinary Tract Infections. *N Engl J Med* 2019, **380**, 729-740
65. R. Kobayashi, M. Konomi, K. Hasegawa, M. Morozumi, K. Sunakawa, and K. Ubukata, *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 889–894.
66. K. Ubukata, N. Chiba, K. Hasegawa, R. Kobayashi, S. Iwata, and K. Sunakawa, Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, **48**, 1488–1494.
67. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard M7-A7 (Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2006).
68. P. Garcia, J. L. Garcia, E. Garcia, and R. Lopez, Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promotor in *Escherichia coli*. *Gene* 1986, **43**, 265–272.
69. Y. Utsui and T. Yokota, Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985, **28**, 397–403.
70. R. G. Spratt, Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975, **72**, 2999-3003.

71. T. Ida, R. Okamoto, C. Shimauchi, T. Okubo, A. Kuga, and M. Inoue, Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, **39**, 3115-3121.

72. N. Masuda, E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino, Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000, **44**, 2242–2246.

73. Y. Takahashi, E. Umemura, Y. Kobayashi, S. Murakami, T. Nawa, A. Morinaka, T. Miyake, and M. Shibasaki, Discovery of 2-hydroxyarbekacin, a new aminoglycoside antibiotic with reduced nephrotoxicity. *J Antibiot* 2017;1–3.<https://doi.org/10.1038/ja.2017.60>.

74. D. E. Rogers and M. A. Melly, Further observations on the behavior of staphylococci within human leukocytes. *J Exp Med*. 1960, **111**, 533-558.

75. T. Baba, F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu, Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002, **359**, 1819-1827.

76. I. Soni, H. Chakrapani, and S. Chopra. Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc*. 2015, **3**, e01095-15.

77. M. Kuroda, T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu, Whole

genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001, **357**, 1225-1240.

78. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

謝 辞

本論文の作成にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました大村智記念研究所 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・免疫学大講座主任に深く感謝いたします。

本研究は、Meiji Seika ファルマ株式会社 臨床開発部の前橋一紀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北里環境科学センターの味戸慶一常務理事に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始御協力頂きました Meiji Seika ファルマ株式会社 医薬研究所の伏見英樹博士、村上省一氏、高畑祥博士、久村興博士、山田恵子氏、村瀬えるみ氏、箕輪宣人氏、秋山佳央氏、平岩由起子博士、故 脇山佳也博士、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梅村英二郎博士、井田孝志博士、臼井孝之博士 及び 高山吉弘氏に感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さった池田大四郎先生、生方公子先生 及び 京都薬科大学長の後藤直正先生に感謝致します。

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 医薬研究所の皆様 及び 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、終始温かい支援をしてくれた夫 直樹 と 長男 拓樹に感謝します。

2021 年 3 月

井上 洋子