

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06795

研究課題名(和文) 耐性菌感染症の克服を目指した抗菌薬個別最適化投与法の構築

研究課題名(英文) Development of individually optimized dosing regimen for antimicrobial agents aiming at overcoming antimicrobial-resistant bacterial infections

研究代表者

松元 一明 (Matsumoto, Kazuaki)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：60733160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：フロモキシセフとラタモキシセフは基質特異性拡張型-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌に抗菌活性を示すため注目されているが、PK/PD解析が実施されておらず臨床応用に至っていない。そこで、ESBL産生大腸菌に対するフロモキシセフとラタモキシセフのPK/PDパラメータを明らかにすることを目的として研究を行った。In vitro試験で、両剤共に時間依存的な抗菌活性を示した。好中球減少大腿部感染マウスモデルを用いてPK/PD解析を実施した結果、time above MICに最も相関することが示され、最大殺菌効果である1 log<sub>10</sub> killを達成するための目標値はそれぞれ35.1%と69.6%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、世界的に増加しているESBL産生菌に対して、好中球減少大腿部感染マウスモデルを用いてPK/PD解析を実施し、科学的根拠をもって新たな治療法を確立した本研究の社会的意義は大きい。今後、カルバペネム系薬に代わる治療薬として臨床応用が期待される。学術的意義として、これまでセフェム系薬の目標PK/PDパラメータ値は一括りにされていたが、オキサセフェム系薬、セファマイシン系薬で異なることが明らかとなった。本研究より、抗菌薬により目標PK/PDパラメータ値が異なる可能性が示され、治療最適化のためには各薬物の特性を基礎研究でさらに検証する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although flomoxef and cefmetazole has attracted substantial attention as an antibiotic against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-producing *E. coli*), the pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) characteristics of flomoxef and cefmetazole against ESBL-producing *E. coli* is unclear. The aim of this study was to determine the PK/PD index of flomoxef and cefmetazole against ESBL-producing *E. coli*. Time-kill curves exhibited time-dependent activities. In neutropenic murine thigh infection experiments, the antibacterial activities of flomoxef and cefmetazole correlated with the time that the free drug concentration remaining above the minimum inhibitory concentration (MIC) (fT>MIC). The target values of fT>MIC for 1 log<sub>10</sub> kill reduction were 35.1% for flomoxef and 69.6% for cefmetazole. Thus, fT>MIC is the most significant PK/PD index of flomoxef and cefmetazole against ESBL-producing *E. coli* and its target values are 40% and 70%, respectively.

研究分野：医療薬学

キーワード：ESBL産生大腸菌 フロモキシセフ セフメタゾール PK/PD

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に増加の一途を辿っている耐性菌の 1 つに基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌がある。現在、我が国において、ESBL 産生菌の検出率は、2 割を超えていることが報告されている。ESBL はペニシリン系抗菌薬、セファロsporin系抗菌薬、モノバクタム系抗菌薬を分解する酵素であり、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Proteus mirabilis* などが獲得している。とくに、大腸菌は、高齢者が罹患しやすい尿路感染症の主要な原因菌である。ESBL 産生菌の治療薬として、カルバペネム系抗菌薬が第一選択薬となっている。カルバペネム系抗菌薬は、広域スペクトルを有した抗菌薬であり、重症感染症の初期治療薬として重要な役割がある。しかし、近年、ESBL 産生菌検出率の増加などがあり、使用量が増加し、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌が問題となっている。加えて、薬剤耐性対策アクションプランもあり、ほとんどの医療施設では、カルバペネム系抗菌薬は届出制もしくは許可制の対象薬に指定され、使用制限されている。そのため、カルバペネム系抗菌薬にかわる新たな抗菌薬の開発は喫緊の課題となっている。

感染症治療は、従来の経験的な投与方法ではなく、抗菌薬の薬物動態と抗菌効果に焦点をあて、pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) アプローチから最大限の効果、副作用防止かつ耐性菌の発現阻止を考慮し、患者個別に最適化した抗菌薬投与を行うことが重要視されるようになってきた。PK/PD パラメータには、濃度依存的に効果を示す「最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) / 最少発育阻止濃度 (MIC)」、時間依存的に効果を示す「Time above MIC ( $T > MIC$ )」、抗菌薬の体内曝露量に依存する「血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) / MIC」がある。臨床研究において、PK/PD に基づき患者個別に最適な投与設計を行うことにより、治癒率、死亡率の改善、入院期間の短縮が認められており、耐性菌の発現抑制に繋がることも明らかになっている。

申請者は安全性が既に確立されている既存の薬物から、ESBL 産生菌に抗菌活性がある薬物を探索し、フロモキシセフ、セフメタゾールが ESBL により分解されず、*in vitro* において、ESBL 産生菌に抗菌活性があることを見出している。本研究を遂行し、各薬物の目標 PK/PD パラメータ値を明らかにすることができれば、いわゆる drug repositioning により、迅速に臨床応用が可能と考える。

### 2. 研究の目的

本研究では、ESBL 産生大腸菌を用いて、マウス大腿部感染モデルを作製し、フロモキシセフ、セフメタゾールの PK/PD 解析を行い、薬物毎の目標 PK/PD パラメータ値を算出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

*In vitro* および *in vivo* マウス大腿部感染モデルを用いた感染実験でフロモキシセフ、セフメタゾールの ESBL 産生大腸菌に対する PK/PD 特性を評価した。

#### (1) 薬剤感受性評価

寒天平板希釈法で ESBL 産生大腸菌臨床分離株 2 株 (EC9 および EC12) に対するフロモキシセフおよびセフメタゾールの MIC を測定した。

#### (2) *In vitro* time-kill curve 実験

EC9 を液体培地に  $10^6$  colon-forming units (CFU) /mL になるように懸濁させた。そこにフロモキシセフ ( $0-128 \times MIC$ ) またはセフメタゾール ( $0-64 \times MIC$ ) を曝露させ、振盪培養開始規定時間後の生菌数を定量した。

#### (3) PK 試験

5 週齢 ddY 系雌性マウスにフロモキシセフ、セフメタゾール (両剤とも 60-240 mg/kg) をそれぞれ皮下投与し規定時間 (5-90 分) 後麻酔下で心臓採血により血液サンプルを回収した。その血液サンプルから 2 剤をそれぞれ抽出後、高速液体クロマトグラフィーで血漿中全濃度を測定した。さらに限外濾過法により蛋白結合率を測定した。得られたマウス血漿中濃度推移から Phoenix<sup>®</sup> Winnonlin<sup>®</sup> を用いてマウスにおける両剤の PK パラメータを算出した。

#### (4) PD 試験

シクロホスファミド (感染実験 4 日前: 150 mg/kg、1 日前: 100 mg/kg) を腹腔内投与し作製した好中球減少マウスの右大腿部に EC9 または EC12 を接種 ( $3.75 \times 10^5$  CFU/thigh) した。その好中球減少マウス大腿部感染モデルに菌接種 2-26 時間後の 24 時間で抗菌薬を様々な用法用量 (フロモキシセフ [30-240 mg/kg、1-12 回]、セフメタゾール [5-120 mg/kg、1-24 回]) で皮下投与した。Control 群には抗菌薬を投与しなかった。菌接種 2 時間後および 26 時間後にマウスから右大腿部を回収し生菌数を定量することで、2 時間後に比べた 26 時間後の生菌数の変化 (change

in log<sub>10</sub> CFU/thigh) を算出した。

#### (5) PK/PD 解析

PK 試験で算出した PK パラメータと蛋白結合率から、PD 試験における各用法用量の蛋白非結合型 (*f*) PK/PD パラメータを予測した。その予測したパラメータと PD 試験での大腿部の生菌数の変化 (change in log<sub>10</sub> CFU/thigh) の関係を Sigmoid I<sub>max</sub> model で評価した。決定係数 (R<sup>2</sup>) と視覚的評価から最適な PK/PD パラメータを決定し、その目標値も算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 薬剤感受性評価

フロモキシセフの EC9 および EC12 の両株に対する MIC は 0.25 μg/mL であった。セフメタゾールの EC9 および EC12 の両株に対する MIC は 2.0 μg/mL だった。

#### (2) *In vitro* time-kill curve 実験

フロモキシセフは 4-16 × MIC で時間依存的、32-128 × MIC では濃度依存的な抗菌活性を示した (Fig. 1)。対してセフメタゾールは 4-64 × MIC で時間依存的な抗菌活性のみを示した (Fig. 2)。

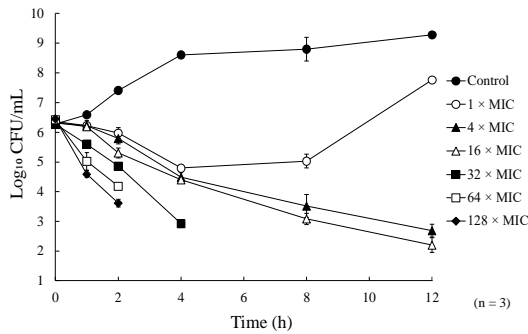


Fig. 1 FMOX の time-kill curves

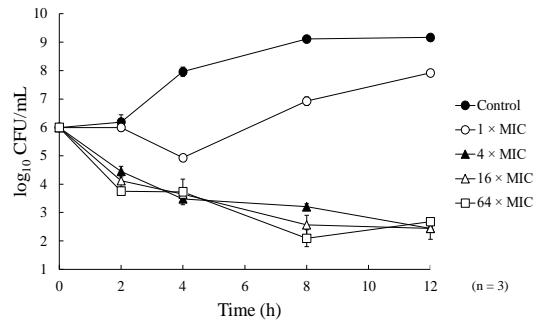


Fig. 2 CMZ の time-kill curves

#### (3) PK 試験

フロモキシセフおよびセフメタゾールのマウスにおける PK パラメータはそれぞれ吸収速度定数 = 6.20 ± 1.22 /h、9.97 ± 1.45 /h、消失速度定数 = 5.28 ± 0.48、4.92 ± 0.21 /h、分布容積/バイオアベイラビリティ (F) = 0.34 ± 0.07、0.51 ± 0.04 L/kg、クリアランス/F = 1.76 ± 0.24、2.49 ± 0.14 L/h/kg であった。蛋白結合率はそれぞれ 11.2 ± 3.79、8.57 ± 6.12% であった。

#### (4) PD 試験および (v) PK/PD 解析

フロモキシセフの抗菌活性は *f*AUC<sub>24</sub>/MIC (R<sup>2</sup> = 0.796) や *f*C<sub>max</sub>/MIC (R<sup>2</sup> = 0.032) に比べ、*f*T>MIC (R<sup>2</sup> = 0.824) と最も相関した。したがって、*f*T>MIC が最適な PK/PD パラメータであり、最大殺菌効果である 1 log<sub>10</sub> kill を達成するための目標値は 35.1% となった (Fig. 3)。セフメタゾールの抗菌活性は *f*AUC<sub>24</sub>/MIC (R<sup>2</sup> = 0.492) や *f*C<sub>max</sub>/MIC (R<sup>2</sup> = 0.0926) に比べ、*f*T>MIC (R<sup>2</sup> = 0.715) と最も相関した。したがって、*f*T>MIC が最適な PK/PD パラメータであり、最大殺菌効果である 1 log<sub>10</sub> kill を達成するための目標値は 69.6% となった (Fig. 4)。

以上、フロモキシセフおよびセフメタゾールは *in vitro* 試験により時間依存的に効果を示し、*in vivo* 試験から殺菌効果を示す目標 PK/PD パラメータ値はそれぞれ *f*T>MIC 40% 以上、70% 以上であることが明らかとなった。本研究は ESBL 産生大腸菌感染症の新たな治療薬とその使用方法を示すことに成功しており、今後の感染症治療に大いに役立つと考えられた。

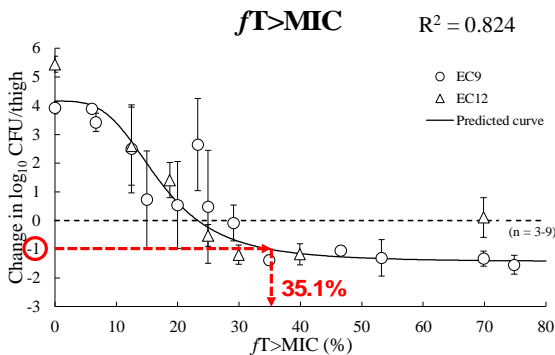


Fig. 3 FMOX の *f*T>MIC と抗菌活性の関係

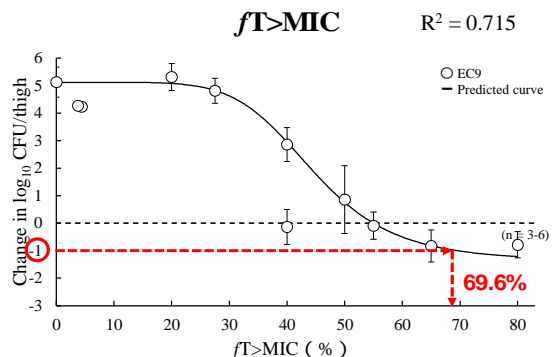


Fig. 4 CMZ の *f*T>MIC と抗菌活性の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sho Tashiro, Marina Hayashi, Wataru Takemura, Yuki Igarashi, Xiaoxi Liu, Yuki Mizukami, Nana Kojima, Yuki Enoki, Kazuaki Taguchi, Yuta Yokoyama, Tomonori Nakamura, Kazuaki Matsumoto.	4. 巻 38
2. 論文標題 Pharmacokinetics/pharmacodynamics evaluation of flomoxef against extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in vitro and in vivo in a murine thigh infection model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-020-02977-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松元一明
2. 発表標題 オキサセフェム系薬、セファマイシン系薬
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会 / 第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松元一明
2. 発表標題 ESBL産生菌感染症治療up to date
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代涉, 林茉里奈, 五十嵐裕貴, 劉小茜, 竹村涉, 榎木裕紀, 田口和明, 横山雄太, 中村智徳, 松元一明
2. 発表標題 好中球減少マウス大腿部感染モデルを用いたESBL産生大腸菌に対するflomoxefのPK/PD評価
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村渉, 林茉里奈, 田代渉, 五十嵐裕貴, 劉小茜, 榎木裕紀, 田口和明, 横山雄太, 中村智徳, 松元一明
2. 発表標題 マウスにおけるCefmetazoleの薬物動態解析
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代渉, 林茉里奈, 五十嵐裕貴, 劉小茜, 竹村渉, 榎木裕紀, 田口和明, 横山雄太, 中村智徳, 松元一明
2. 発表標題 オキサセフェム系抗菌薬
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元一明
2. 発表標題 耐性菌治療における効果的な投与方法
3. 学会等名 第33回日本外科感染症学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代渉, 松元一明
2. 発表標題 In vitro及びin vivoマウス大腿部感染モデルを用いた基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生大腸菌に対する既存抗菌薬の pharmacokinetics/pharmacodynamics評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾研究者情報データベース  
[https://k-ris.keio.ac.jp/html/100012999\\_ja.html](https://k-ris.keio.ac.jp/html/100012999_ja.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------