

# 新規Rifamycin誘導体KRM-1648の抗菌作用とその作用メカニズムに関する考察

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 健志 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/16162">http://hdl.handle.net/2297/16162</a>

氏名	藤井健志
生年月日	
本籍	兵庫県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第156号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	新規Rifamycin誘導体KRM-1648の抗菌作用とその作用メカニズムに関する考察
論文審査委員	(主査)板垣 英治 (副査)福森 義宏, 鈴木 健之, 大熊 勝治, 山口 恵三

## 学位論文要旨

### Abstract

KRM-1648 (KRM) is a newly synthesized rifamycin derivative which exhibits excellent antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. In this study, I examined the in vitro and in vivo antibacterial activities of KRM against *M. avium* complex (MAC) (Chapter 1), and also against gram-positive and gram-negative bacteria (Chapter 2), and studied on mechanism of the antibacterial activity of KRM (Chapter 3). KRM has the potent activity against MAC that is stronger than the activities of rifampicin (RFP), a novel rifamycin derivative, and other commercially available antibiotics. In a mouse MAC infection model, KRM showed to be more efficacious than RFP in a dose of 0.2mg/mouse. This activity was also confirmed in vitro experiments against MAC. KRM also exhibited the high activity against gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus subtilis*, but poor activity against gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. These antibacterial properties of KRM are similar to those of RFP. The spectrum of antibacterial activities of KRM was almost the same as that of RFP. In the therapeutic experiment of

KRM in mice infected with *S. aureus*, the drug exhibited strong in vivo-activity like as RFP which corresponded closely with the in vitro-activity.

I studied on the mechanism of antibacterial activity of KRM. The drug inhibited strongly DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli* and *M. avium*. This inhibitory effect was slightly lower than that of RFP. KRM did not inhibit other nucleic acid synthesizing enzymes such as *E. coli* DNA polymerase I, MMLV reverse transcriptase, AMV reverse transcriptase, and rabbit thymus RNA polymerase. On RNA synthesis of *M. avium*, KRM showed more inhibition than RFP. Uptake of  $^{14}\text{C}$ -KRM by *M. avium* cells reached to the maximum level in 1.5 h after incubation, while the uptake by *E. coli* cells was in lower level. These results suggested that the potent antimycobacterial activity of KRM is due to the inhibition of bacterial RNA polymerase and also is dependent on the permeability of cell wall of target organisms.

## 序 論

近年、細菌による感染症は、強い症状を引き起こす強毒菌による感染症から、弱毒菌による日和見感染へと主流が移りつつある。日和見感染は、生体の防御機構の機能低下に便乗して感染が成立することから、便乗感染とも呼ばれ、治療が困難になる場合が少なくない。特に、近年、新たに出現した免疫不全症候群(AIDS)患者では、従来発症し難かった細菌による日和見感染症が頻発することとなった。中でも *Mycobacterium avium* complex (MAC)による感染症は、有効な薬剤がなかったことから大きな問題となった。

MACは、*M. avium*および*M. intracellulare*の総称であるが、これらの非定型抗酸菌は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)と同族の細菌である。結核に対しては、rifamycin系の抗生物質である rifampicin(RFP)が有効な治療薬として用いられているが、副作用として肝機能障害が現れることと、治療期間が長いことが問題となっていた。RFPの後継化合物として、rifamycin骨格の化学修飾によって合成された多くの新規 rifamycin 誘導体の中から、結核菌に対する抗菌活性と動物実験での安全性評価の結果、KRM-1648(3'-hydroxy-5'-(4-isobutyl-1-piperazinyl)benzoxazinorifamycin) (KRM) (図1)が見いだされた。KRMは、結核菌に対してRFPの10倍以上強い活性を示し、高い安全性を持った化合物である。

今回、このKRMのMAC感染症に関する効果をRFPと比較する共に、抗生

物質としての性質を明らかにするために、多くの一般細菌に対する抗菌作用スペクトルを調べた。また、抗菌作用メカニズムについての考察も行った。

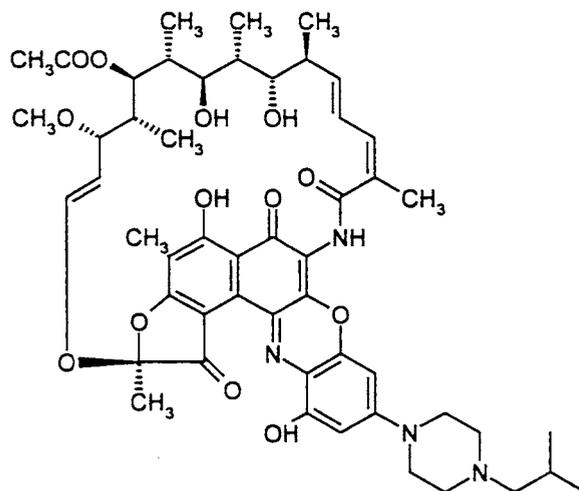


図1 KRM-1648の構造

## 実験

細菌に対する抗菌活性は、以下に示した項目について実施した。即ち、最小発育阻止濃度(MIC)の測定は、寒天平板法、BACTEC法、および微量液体希釈法を用いて行った。感染治療試験は、BALB/c-マウスあるいは beige-マウスに *M. intracellulare*、あるいは *S. aureus* を感染させた後、薬剤を投与した。薬剤の効果は、臓器病変、臓器内生菌数、あるいは生存率で評価した。自然耐性菌出現頻度は、定法に従って *S. aureus* について評価した。

作用機作に関しては、RNA polymerase に対する阻害作用を、*E. coli* 由来の精製標品と *M. avium*、および *M. fortuitum* より部分精製した酵素について測定した。また、*E. coli* DNA polymerase I、2種類のウイルス由来の逆転写酵素、およびウサギ胸腺から部分精製した RNA polymerase についても、薬剤の阻害活性を測定した。KRMの菌体内移行性は、<sup>14</sup>C-KRMを用いて、*E. coli* および *M. avium* について測定した。*M. avium* の RNA 合成に対する KRM-1648 の阻害活性を RFP と比較し、菌体内移行性についての考察を行った。

## 結果と考察

非定型抗酸菌 *M. avium* complex (MAC) に対し、新規 rifamycin 誘導体である KRM は、対照薬である RFP に比較して、2オーダー強い活性を示した(表 1)。

表 1 KRM-1648 および対照薬の抗 MAC 活性(寒天法)

Drug	MIC <sub>90</sub> (μg/ml)			
	<i>M. avium</i>		<i>M. intracellulare</i>	
	AIDS (77)	non-AIDS (62)	AIDS (11)	non-AIDS (49)
KRM-1648	0.1	0.1	0.05	0.05
Rifampicin	25	25	6.25	3.13

( )内は菌株数

KRM は、BACTEC 法を用いた薬剤感受性試験でも、KRM は、既存の抗生物質 10 化合物に比較して最も強い抗菌活性を示した。BALB/c マウスおよび遺伝的に Natural killer 細胞を欠損している系統である beige マウスを用いた MAC 感染モデル動物での治療効果を調べた結果、KRM は 0.2mg/kg の投与量で、肺の病変部位の減少、および肺と脾臓中の生菌数を減少させ、治療効果を示したが、RFP は、同じ投与量では有効性を示さなかった。マウスを用いた体内動態研究の結果、KRM の体内動態は、RFP に比較して薬効の発現に寄与していることはなく、KRM の優れた in vivo 治療効果は、in vitro 抗菌活性が反映しているものと考えられた。

MAC に対する抗菌活性については、KRM は既存の抗生物質の中で最も強く、感染モデル動物に対する治療効果でも良好な成績を示すことが明らかになった。

KRM の一般細菌に対する抗菌作用スペクトラムを調べたところ、グラム陽性細菌に対しては強い抗菌活性を示したが、グラム陰性細菌に対しては効果が弱く、RFP と同様のスペクトラムであった。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に対する自然耐性菌出現頻度を、macrolide 系の抗生物質である clarithromycin、および ciprofloxacin (quinolone 系) と比較したところ、KRM および RFP は自然耐性菌の出現頻度がこれらの 2 剤よりも高く、耐性菌の誘導に対する注意が必要であることが示唆された。黄色ブドウ球菌とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) によるマウス感染モデルでの治療効果を調べたところ、MAC 感染モデルでの結果と同様に、in vitro 活性を反映した強い治療効果が得られた。

KRM の抗菌作用の特徴として、MAC に対する強い抗菌活性とグラム陰性細菌に対する抗菌活性の弱さが挙げられる。このような KRM の抗菌作用機作を明らかにするために以下の研究を行った。KRM は、大腸菌および MAC 由来の DNA dependent RNA polymerase に対して、RFP と同様に強い阻害作用を示した(図 2)。また、DNA polymerase 等その他の核酸合成系酵素に対しては阻害活性を示さなかったことから、抗菌作用の主なメカニズムは、RNA polymerase 阻害であると推定した。

KRM が、ウサギ胸腺由来の RNA polymerase に対しては阻害活性を示さず、細菌の RNA polymerase に対する選択性を有していることは、ヒトに対して細胞毒的に働かないことを示している。KRM の RNA polymerase 阻害活性は、RFP と同等、あるいは弱いものであり、MAC に対する抗菌活性の強さは、RNA polymerase 阻害活性の増強による結果ではないことが明らかになったことから、次に KRM の菌体内移行性に注目した。MAC とグラム陰性細菌である大腸菌に対する菌体内移行性を比較したところ、MAC に対しては経時的な移行がみられたのに対し、大腸菌に対しては、一過性の弱い移行がみられるものの、薬剤添加 1 時間後

には、background level にまで細菌中の薬剂量は減少した(図 3)。この結果より、KRM のグラム陰性細菌に対する抗菌作用の弱さは、細菌の外膜による透過障壁のために、薬剤の細菌内への移行が阻害された結果であることが明らかになった。また、この結果より MAC に対する強い作用は、良好な移行性が関与している可能性が示された。そこで RFP との比較を行うために、MAC の RNA 合成に対するこれらの薬剤の影響を図 4 に示した。MAC 菌液に添加した KRM あるいは RFP の濃度に依存して MAC の RNA 合成は阻害されたが、KRM により、

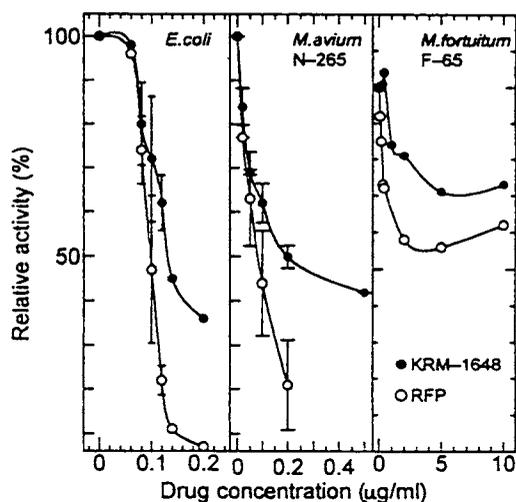


図 2 RNA polymerase に対する薬剤の効果

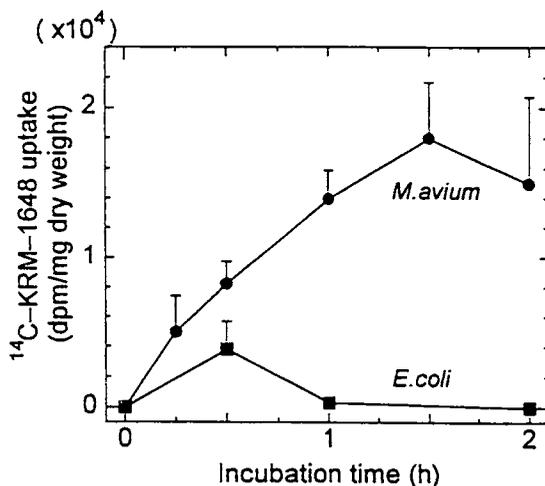


図 3 KRM-1648 の菌体内移行性

より強く阻害されていることが判る。この細菌から部分精製した RNA polymerase に対しては、RFP がより強い阻害効果を示していたことから、この結果は、KRM と RFP の MAC 内への移行性の差によるものと考えられる。従って、KRM の強い抗 MAC 活性は、RNA polymerase に対する阻害作用と共に、良好な菌体内移行性が寄与していることが明らかになった。

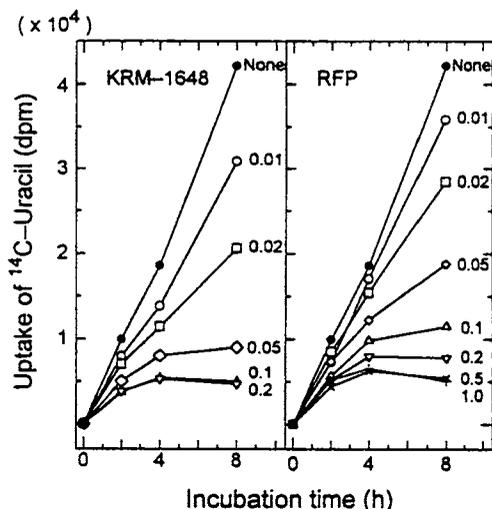


図4 *M. avium* N-265株のRNA合成に対するKRM-1648、およびRFPの効果

## 結論

1. 新規 rifamycin 誘導体 KRM-1648 は、強い抗 MAC 活性を in vitro および in vivo で示した。
2. KRM-1648 は、グラム陽性細菌に対しては強く、陰性細菌には弱い作用スペクトラムを示し、グラム陽性細菌に対する有用性が示唆された。
3. KRM-1648 の抗菌作用機作は、細菌の DNA-dependent RNA polymerase に対する阻害であり、MAC に対する強い抗菌作用には、その良好な菌体内移行性が寄与している。

## 学位論文審査結果の要旨

平成9年11月15日に当該講座担当教官による予備審査を行い、その後、提出された学位論文および資料を各審査委員が検討するとともに、平成9年11月28日の口頭発表の結果を踏まえて論文審査委員会を開催し、協議の結果、以下の通り判定した。

本論文は新規抗生物質であるKRM-1648 (3'-hydroxy-5'-(4-isobutyl-1-piperazinyl)benzoxazinorifamycin) の *Mycobacterium avium complex* (MAC) およびグラム陽性、陰性の一般細菌に対する *in vitro* および *in vivo* での抗菌活性を調べ、その作用特性と作用メカニズムについて明らかにしたものである。

MACに対してKRM-1648はRifamycinなどの既存の抗生物質に比較して、10倍以上の強い *in vitro* 抗菌活性を示し、MAC感染マウスでの *in vitro* 治療効果でも有効性が確認できたことから、エイズ患者で深刻な問題となっているMAC感染症に対しても有効な抗菌剤となりうることが示唆された。本薬剤の抗菌作用スペクトルは、グラム陽性菌に強く、グラム陰性菌に弱く、rifamycin系の抗結核薬と同様であった。Methicillin耐性ブドウ球菌に対しても強い *in vitro* 活性および *in vivo* 治療効果を示すが、自然耐性菌の出現頻度が高い事が明らかとなった。KRM-1648は *E. coli* および *M. avium* のDNA-依存RNA polymeraseに対し、Rifamycinと同様に阻害効果を示し、ウサギ胸腺のRNA polymeraseに対しては阻害効果を示さないことから、細菌酵素に対する選択性を持つものであることが明らかとなった。KRM-1648の菌体内移行性はグラム陰性菌では見られず、グラム陽性菌の *M. avium* では良好であることが示され、この薬剤の *M. avium* に対する強い抗菌性はこの菌体内移行性に大きく依存していることが示唆された。また、本菌の懸濁液にKRM-1648を加え、菌体内RNA合成を調べたところ、Rifamycinより低濃度で強く阻害したことは、先の優れた菌体内移行性を支持するものである。以上、本研究により、新規抗生物質KRM-1648は *Mycobacterium avium complex* に対し、優れた抗菌作用を持ち、その作用機構は菌体内移行性とDNA-依存RNA polymeraseの阻害作用によるものであることが明らかとなり、得られた多くの知見は、本薬剤の臨床的研究に大いに寄与するものと考えられる。従って、本論文は博士論文に値するものと判定した。