

## 第43回日本化学療法学会東日本支部総会

会期: 1996年11月15日, 16日

会場: 東京 経団連会館

会長: 中山一誠 (日本大学医学部第三外科)

## 招 請 講 演 I

Endotoxin-Initiated Inflammatory Pathways  
—Roles in the Pathogenesis of Gram-Negative Sepsis—

David C. Morrison, Ph. D.

Department of Microbiology, Molecular Genetics and  
Immunology and  
Department of Pathology and Laboratory Medicine,  
University of Kansas Medical Center

In its most fundamental sense, sepsis may be defined as a syndrome of systemic toxicity resulting from the presence of infectious agents or their products in the blood. Clinically, the sepsis syndrome is recognized by two or more of the following symptoms: clinical evidence of infection, either fever or hypothermia, tachypnea, tachycardia, evidence of coagulation abnormality and some manifestation of inadequate organ perfusion or function. As might be anticipated, these symptoms would collectively include a broad spectrum of clinical disorders and would underscore both the difficulty of effective therapeutic intervention and the potential for high levels of morbidity and mortality. In this latter respect, it has been estimated that more than one-half million patients experience sepsis annually in the U.S. alone, and that this is one of the most common causes of mortality in the intensive care setting<sup>1</sup>. Further, the frequency with which this disease is seen has increased significantly by almost five hundred percent during the past forty years. Thus, sepsis and septic shock continue to merit serious attention as causative factors of mortality, particularly among the elderly and the immunocompromised patient.

Infections with Gram-negative microbes have been determined to account for approximately half of all cases of sepsis reported. The incidence of Gram-negative bacteremia in such patients is in the range of 40-70%. Of importance, in patients with Gram-negative bacteremia, the incidence of mortality

has been estimated to be approximately 40%, and this figure increases to 50-70% when the patient is in shock<sup>2</sup>. Perhaps one of the more significant findings during the past several decades is that patients with Gram-negative sepsis frequently manifest endotoxemia; that is, the presence of detectable biologically active endotoxin in the systemic circulation. There have been many efforts to correlate outcome in patients with Gram-negative sepsis to specific levels of circulating endotoxin. Many, but not all, have shown that such correlations do exist with respect to adverse outcome (reviewed in 3). Perhaps one of the best of such studies is the recent demonstration by Brandtzaeg and collaborators that provides evidence of a direct relationship between circulating plasma levels of endotoxin and mortality in patients with meningococemia<sup>4</sup>. Further, in a more heterogeneous population of septic patients, a strong correlation between an "endotoxin-cytokine" index and mortality was established<sup>5</sup>. Thus, there would appear to be reasonably good evidence to support the concept that the presence of endotoxin in the circulation may contribute to the pathogenesis of disease in septic patients.

The potential causative role of endotoxin in the pathogenesis of disease has not, however, been predicated solely upon correlative relationships in the septic patient. Indeed, the evidence from a variety of additional sources would further support this concept. For example, the administration of purified endotoxic lipopolysaccharide (LPS) to experimental animals, and, more recently, to healthy human volunteers, has been shown repeatedly to faithfully reproduce many of the pathophysiological symptoms observed in sepsis. Further, specific antibody to endotoxin has been shown to be significantly protective in experimental models of Gram-negative infections although, as will be discussed further below, this question remains to be definitively resolved in patients with Gram-negative sepsis. Finally, endotoxic LPS is known to be among the

most potent of microbial products for its ability to induce production of proinflammatory cytokines in *in vitro* culture with human monocytes.

It is now a well-established fact that LPS is a major constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria, where it functions both as a molecular interface for the microbe to interact with its external environment, and as a selective permeability barrier for the bacterium. Release of the LPS from the microbial surface markedly enhances many of its biological activities, presumably through enhanced accessibility of the biologically active lipid region of the molecule<sup>6</sup>. LPS is a structurally complex microbial macromolecule containing a highly conserved lipid domain (termed lipid A), a partially conserved core oligosaccharide domain and a repeating polymeric polysaccharide domain, termed the O-antigen. The almost ubiquitous ability of the conserved lipid A region of the molecule to bind to, and stimulate the activation of, host cellular and humoral mediator systems (including macrophages and monocytes, polymorphonuclear leukocytes, endothelial cells and fibroblasts, to name but a few) results in the generation of multiple immunopharmacologic mediators that can contribute to and exacerbate the inflammatory process initiated by the nidus of infection (reviewed in 7). These mediators include, but are not limited to, many of the members of the interleukin family (e.g. IL-1, IL-6, IL-8), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and the interferons (IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ ). In addition, antiinflammatory cytokines, such as the IL-1 receptor antagonist, may also be produced. Finally, it would be important not to neglect the potential contribution of humoral mediation systems such as the coagulation and complement pathways, especially since both of these systems are now known to be triggered by purified LPS. It is the amplification of systemic inflammation caused by the LPS-dependent inflammatory pathways that is thought to be of primary importance to the pathogenesis of Gram-negative sepsis. This LPS-dependent pathway, that we hypothesize functions independently to the direct microbial proliferation pathway but also leads to multiple organ dysfunction, is shown schematically in Fig. 1.

Probably some of the earliest clinical evidence to support the concept of a pathway of tissue damage during sepsis that was not dependent upon the

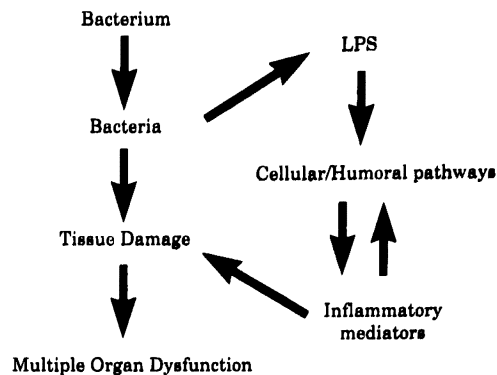


Fig. 1. The pathogenesis of (Gram negative) sepsis.

presence of viable replicating microorganisms' was a study published almost fifty years ago by Spink, Hall, Shafer and Braude in early efforts to treat human Brucellosis, a Gram-negative infection, with antibiotics. In that study, published in 1948, seven patients were treated with a combination of sulfadiazine and streptomycin<sup>8</sup>. As noted in that publication, however, these authors reported that "In three instances (out of seven), therapy with streptomycin had to be discontinued because of toxic reactions to the drug such as fever." These studies both prompted and provided fuel for the hypothesis that the release of specific microbial factors, in particular, endotoxin, following the administration of effective antimicrobial agents to kill the bacteria, might merit therapeutic targeting in order to further reduce mortality in Gram-negative sepsis.

Since the development of the concept of targeting endotoxin therapeutically was correlated in a temporal way with the emerging concepts of endotoxin structure as consisting of conserved (lipid A, core oligosaccharide) and chemically diverse (O-antigen) domains, it was a logical next step to attempt to intervene therapeutically in Gram-negative sepsis by passive immunotherapy with antiserum directed against conserved antigenic epitopes on the endotoxin molecule. Extensive *in vitro* and *in vivo* animal models of Gram-negative bacteremia and/or endotoxemia strongly supported the hypothesis that such cross-reactive antibodies may well serve a protective function in the experimental models. These conclusions were further supported when it was reported by Ziegler et al.<sup>9</sup> in 1982 that a polyclonal human antiserum raised to a heat-killed Gram-negative microbe expressing core LPS structures as immunodominant antigens significantly reduced overall mortality in patients

with Gram-negative sepsis compared to a placebo control in a well-designed randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. This important milestone publication in immunotherapeutic intervention in Gram-negative sepsis established the conceptual foundation for a variety of additional therapeutic approaches designed specifically to deal with the septic patient through targeting of endotoxin.

Predicated upon the early success with polyclonal anti-LPS antibody, and cognizant of the problems attendant to treatment of patients with immunologic reagents obtained from human volunteers, intensive efforts were expended toward the generation and clinical testing of monoclonal antiendotoxin antibodies. During the late 1980's, two such antibodies, one a mouse IgM (MAb-E5), and one of human origin (MAb-HA-1A), both reported to be directed against the conserved lipid A region of LPS, were extensively evaluated. Of interest, in 1991, in separate but similar randomized double-blinded, placebo-controlled, clinical trials, both were reported to have benefit to select subpopulations of septic patients, although the populations of patients reported to have benefited were not identical<sup>9, 10</sup>. While this finding may, on the surface, appear surprising, especially given the reported similarity in antigenic specificity of the two antibodies (lipid A), the lack of competitive binding of the two antibodies suggests a significant difference in epitope specificity<sup>11</sup> that may well have accounted for their differing protective efficacies in patients with sepsis.

Nevertheless, these very promising preliminary clinical trials with anti-lipid A antibody provided some of the first definitive data that would establish endotoxin as a significant factor in human septic shock. It was, therefore, particularly devastating to the field when subsequent repeat clinical trials with these monoclonal antibodies failed to confirm the protective efficacy observed in the earlier studies. Indeed, these latter failures prompted Cross and Opal<sup>12</sup> to state, "Given the attention and expectations surrounding the anti-endotoxin MAbs, the disappointing results (of these repeat clinical trials) raise the question whether the use of anti-endotoxin antibodies in the treatment of sepsis is still a viable concept." Given the potential difficulties that are now appreciated with respect to the conduct of clinical sepsis trials, some of which will

be discussed later in this review, it is perhaps unfortunate that this conclusion has been adopted by many investigators.

Parallel with the studies to explore antiendotoxin antibodies as agents to target endotoxin, there have developed a variety of alternative strategies that have had the same overall objective, namely the reduction and/or neutralization of circulating endotoxin in the septic patient. In general, these strategies can be grouped into four categories: a) antiendotoxin antibodies (both polyclonal, e.g. immune globulin) and monoclonal antibodies; b) other endotoxin binding reagents (e. g. bacterial permeability inducing protein —BPI— or its N-terminal fragment, endotoxin neutralizing protein from *Limulus* amoebocyte lysate), synthetic or natural LPS/lipid A binding peptides, and high density lipoproteins —HDL, c) soluble LPS receptors (e. g. CD-14) or antibody to essential LPS signalling cofactors (e. g. antibody to LPS binding protein —LBP); and finally d) inactive LPS/lipid A analogues/antagonists (e.g. lipid IVA, *Rhodopseudomonas spheroides* diphosphoryl lipid A). Each of these has been shown to be of significant therapeutic benefit in the treatment of experimental Gram-negative bacteremia/endotoxemia (reviewed in 13), and many are now under study in Phase II/III clinical trials.

As an alternative to targeting the endotoxin molecule itself, other investigators have focused upon the cellular/humoral mediation pathways with specific pharmacologic reagents designed to inhibit mediator release. The concept behind this particular approach is that it may be more efficient to direct therapy at the (presumably more uniform) effector cells, especially if the inhibition could be directed selectively against production of one or more inflammatory mediators implicated in the septic pathway. To date, a spectrum of agents have been successfully tested and shown to reduce lethality in a variety of experimental models of sepsis. A partial list would include dexamethasone, pentoxifylline and derivatives (lisofylline), tyroprostin (tyrosine kinase inhibitors), mRNA translation inhibitors (e.g. guanylhydrazone), adenine nucleotide (nucleoside analogues and even protease inhibitors (e. g. TNF- $\alpha$  protease). Some of these agents have also been recently reviewed with respect to their specific mode of action<sup>13</sup>. While this approach would appear to be reasonable, the majority of the agents under study

have not yet been evaluated in clinical trials, and it would be premature to predict their potential for success.

One of the more attractive therapeutic approaches during the past decade has been to target the actual proinflammatory mediators, with a goal of reducing or eliminating the systemic inflammation triggered by endotoxin. The majority of these studies have been predicated upon the seminal findings of Beutler, Milsack and Cerami published in 1985 that demonstrated that rabbit polyclonal antibody to TNF- $\alpha$  was protective in a mouse model of endotoxemia. On the basis of these observations, Beutler et al. concluded that "cachectin/TNF is one of the principle mediators of the lethal effect of endotoxin"<sup>14</sup>. While there can be little question about the validity of that conclusion, based upon the data presented, it would, nevertheless, be relevant to point out that, in actuality, the anti TNF- $\alpha$  antibody used in those studies shifted the normal dose response lethality profile by only two to threefold to the right (i.e. increased the LD<sub>50</sub> by that amount). These results were, however, sufficiently compelling to promote extensive preclinical and clinical efforts to target this and related cytokines (e.g. IL-1) in reduction of lethal sepsis. The results of some of these clinical trials will be summarized below and discussed within a more general framework of clinical sepsis.

The recent appreciation of the fact that the induction of the inflammatory response is usually either accompanied by, or followed by, a compensatory antiinflammatory cascade has prompted a number of investigators to pursue therapeutic approaches using recombinant antiinflammatory proteins to treat experimental sepsis. To date, the best studied of this class of therapeutic agents has been the IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) although both recombinant IL-10 and IL-11 have also begun to receive attention. Once again, even though these agents have demonstrated considerable promise in experimental models of infection, it would be premature to predict their potential for efficacy in the septic patient. Clearly, however, such studies merit additional attention.

The final experimental approach that has also targeted specifically the endotoxin molecule is based upon the concept that LPS, as an integral constituent of the outer cell membrane of Gram-negative

bacteria, is unable to manifest its full endotoxic potential until it is released in soluble form into the external environment. One physical-chemical reason that has been given for this is that the biologically active component of LPS, lipid A, is not readily accessible for interaction with host inflammatory mediator cells or humoral mediator systems when present in the microbial outer membrane. In this respect, the available experimental evidence would suggest that free, soluble endotoxin is between 25-100-fold more active than the equivalent amount of endotoxin when it is microbe bound or associated with microbe-sized particles<sup>9</sup>.

There are a number of mechanisms that could, under some circumstances, contribute to the release of endotoxin from the microbe surface. These include "shedding" of LPS from the microbe during normal physiologic growth, a process that can be demonstrated with many Gram-negative microorganisms *in vitro*, but is recognized to be of particularly major potential significance in meningococcal infections. Complement-mediated lysis of bacteria through the membrane attack complex also results in the release of LPS as does microbial death, either natural or following uptake and digestion via host phagocytic cells. Perhaps most important among potential mechanisms of endotoxin release, however, is the demonstrated ability of antibiotics to promote production of soluble non-microbe associated endotoxin. This is particularly true in the case of cell wall-active antibiotics, where recent data have established that antibiotics with equivalent M.I.C. for a given bacteria, but different specificities in terms of penicillin binding protein interactions, differ significantly and quantitatively in their ability to generate soluble endotoxin. As shown first by Jackson and Kropp<sup>15</sup>, *in vitro* treatment of *Pseudomonas* with ceftazidime, a third generation cephalosporin with preferential binding specificity for penicillin binding protein (PBP-3), resulted in much greater amounts of endotoxin release than did equivalent treatment with imipenem, a carbapenem with PBP-2 binding specificity. Additional studies of these investigators that provided compelling data using scanning electron micrography, support the concept that the underlying reason for these differences was that ceftazidime promoted the formation of long bacterial filaments (with a resulting

large increase in microbial biomass); in contrast, imipenem promoted the production of spheroplasts with only very limited increases in microbial biomass.

Evidence that these differences may have direct measurable consequences in experimental models of sepsis has been provided by numerous investigators. As shown by Bucklin and Morrison, in an experimental mouse model of *E. coli* bacteremia using D-galactosamine to sensitize the mice to the lethal effects of endotoxin, imipenem was significantly more protective than was ceftazidime under otherwise equivalent conditions<sup>16</sup>. Further, the observed differences could not be attributable to common potential variables (e.g. dose, time, type of infection, etc.). Essentially the same results have recently been reported by Nakano and Kirikae<sup>17</sup> using a similar D-galactosamine model except that D-galactosamine was given three hours after infection with *Pseudomonas*. In fact, in these latter studies, treatment with ceftazidime actually increased lethality to 100% relative to saline treated controls (50% lethality) whereas imipenem provided complete protection against infection. In another experimental model of experimental sepsis in rats, Opal et al.<sup>18</sup> showed that imipenem was more protective than ceftazidime and that increased protection correlated with decreased levels of circulating proinflammatory cytokines. Whether such findings will be reflected in decreased mortality in septic patients treated with various antibiotics remains to be determined; however, in one recently completed well-controlled clinical trial of patients with urosepsis<sup>19</sup>, imipenem was found to result in more rapid defervescence and lower cytokine levels in urine, although the data were not sufficiently different (due to large patient-to-patient variation) as to preclude precise evaluation of statistical significance. Such studies should, and will be, continued and expanded.

Thus, based upon an impressive increase in our knowledge regarding basic molecular and cellular mechanisms that contribute to the development of the sepsis syndrome, a variety of intervention strategies have been developed and tested in experimental models of bacteremia and/or endotoxemia. These collective intervention strategies are listed in Table 1, and their potential sites of action shown in Fig. 2. Several of these strategies have been critically evaluated in clinical trials to reduce mortality in the septic patient. Remarkably,

Table 1. Intervention strategies in bacterial sepsis

[1] Appropriate surgical intervention and/or antibiotic chemotherapy
[2] Supportive care
[3] Anti Endotoxin agents
anti-LPS (lipid A) antibodies
LPS binding proteins
soluble LPS receptors
LPS receptor antagonists
[4] Inhibitors of cellular activation pathways
[5] Anticytokine reagents
Anticytokine antibodies
Soluble cytokine receptors
[6] Antiinflammatory cytokines
[7] Selective antibiotic chemotherapy (LPS release)

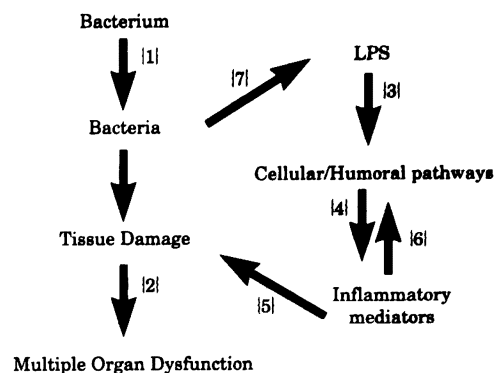


Fig. 2. The pathogenesis of bacterial sepsis

as recently pointed out by Freeman and Natanson<sup>20</sup>, in the past 15 years more than 20 such Phase II/III clinical trials, involving more than 7,500 septic patients, have been carried out. To date, virtually no reproducibly beneficial therapies have emerged and, in at least two or perhaps three of these studies, a potentially statistically significant deleterious manifestation of therapeutic intervention has been suggested. It would be an understatement to conclude that these findings have been both disappointing and discouraging to the scientific medical community at large and, more specifically, those interested in treating the septic patient.

While it would not be possible to review in detail the results of all of these clinical trials, it would, nevertheless, be potentially instructive to consider some of the reasons that might be contributing to these clinical trial failures. Table 2 lists at least some of the reasons that should be critically evaluated and perhaps considered in the design of future preclinical studies and/or their translation or extrapolation to the treatment of the septic patient. The following paragraphs will serve to briefly illustrate some of the reasons that underlie the statements included in

Table 2. Possible reasons for lack of demonstrable efficacy of therapies to treat sepsis

<ul style="list-style-type: none"> <li>· Animal models inappropriate.</li> <li>· Animal models unduly idealistic.</li> <li>· Different diseases require different therapies.</li> <li>· Wrong endpoints to evaluate efficacy</li> <li>· Redundancy of pathways makes intervention difficult/impossible.</li> </ul>
--

Table 2.

Perhaps appropriate to the top of the list is the question of the appropriateness of animal models to the clinically septic patient. As pointed out recently by Dinarello<sup>21)</sup>, the selection for use of experimental animals is far removed from the picture normally present in the septic patient. The former are normally young and healthy with a limited genetic background and no existing co-morbidities. Many animal species are relatively insensitive to both infection and to microbial products such as endotoxin. Selective advantages of therapeutic intervention can be controlled by timing of treatment relative to administration of the infective agent which is often given as a bolus. In contrast, the septic patient may well be older and have one or more existing comorbidities. There is, in addition, considerable potential genetic heterogeneity. Humans are notoriously ultrasensitive to microbial products such as endotoxin. Finally, prolonged preexposure to infectious agents for variable often unknown time periods, usually requires post-infection therapeutic intervention. While such differences should not, a priori, preclude experimental animal model testing of new therapies, these differences should, nevertheless, be acknowledged and appreciated in extrapolation of animal model successes to the septic patient.

It is also possible, in large part based upon the differences summarized in the preceding paragraph, that animal models may always be overly optimistic in predicting clinical outcome. In this respect, and as part of virtually any developmental protocol to establish an experimental model of infection/lethality, a preliminary dose-response lethality profile is established. A typical theoretical profile is shown in Fig. 3a (Control Group). Treatment with a therapeutic agent generally results in a shift in the dose response profile to the right, indicating protective efficacy. Depending upon the extent of the shift to the right and the slope of the dose response lethality curve at the LD<sub>50</sub> (inflection point), a dose can usually be selected from which therapeutic

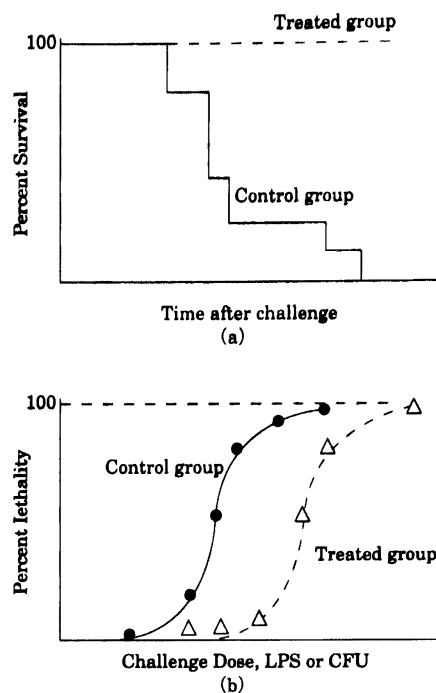


Fig. 3. CONCEPT: Experimental models of endotoxemia/ bacteremia/ sepsis

efficacy in a standard Kaplan Meier time survival profile can be clearly manifest (Fig. 3b). With a homogenous population of animals and treatment regimen, the slope of the standard dose-lethality curve is relatively steep, making it coordinately easy to demonstrate statistical significance in a Kaplan Meier survival study if an appropriate dose is selected. If, however, the shift in the dose response curve (Fig. 3a) is relatively modest (e. g. 2-3-fold), it may well be impossible to translate such findings to the admittedly more complicated situation of clinical sepsis. It would seem clear that those therapeutic strategies that are most effective in profoundly changing the LD<sub>50</sub> (as opposed to changes that are modest but, nevertheless, statistically significant) would have a higher likelihood of clinical success.

A third point that remains to be fully explored experimentally is that different diseases within the general category of sepsis may require different therapeutic approaches. A recently published study by Remick and his collaborators illustrates this point<sup>22)</sup>. These investigators have explored the contribution of TNF- $\alpha$  to pathogenesis of disease in mouse models of bacteremia/peritonitis vs. endotoxin. Using a neutralizing antibody to mouse TNF- $\alpha$ , these investigators examined the protective efficacy of this antibody in both BALB/c inbred and CD1 outbred mice following either challenge with purified

LPS endotoxin or experimental peritonitis using the cecal ligation and puncture (CLP) model. In confirmation of the earlier published studies of Beutler et al.<sup>14)</sup>, these investigators also showed that anti-TNF- $\alpha$  antibody would significantly reduce LPS-induced lethality in Balb/C mice. In striking contrast to these findings, however, Remick et al. have reported that this same anti-TNF- $\alpha$  antibody does not reduce LPS mortality in CD-1 outbred mice. Further, in neither mouse strain was the anti-TNF- $\alpha$  antibody capable of ameliorating septic death due to cecal ligation and puncture. While the precise reasons for these differences remain to be fully established, they, nevertheless, underscore the problems that can result when simple animal models are extrapolated to more complex conditions of infection.

An additional problem with therapeutic targeting of a single mediator is the problem of redundancy in the inflammatory pathways mediated by cytokines. Thus, while endotoxin is known to promote the synthesis and secretion of a variety of mediators, including TNF- $\alpha$  and IL-1, it may be difficult, if not impossible, to identify the "master" cytokine responsible for all of the inflammatory events that eventually result in shock, multiple organ dysfunction and death.

Thus, for example, decreases in mean arterial pressure may be caused by local increases in nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> or platelet activating factor, each of which may be generated by host defense systems in response to endotoxin via pathways that do not have an obligatory role for either TNF or IL-1. Thus, the interference with one of these pathways might not be expected to necessarily provide the necessary degree of inhibition required to abrogate LPS-mediated decreases in the mean arterial pressure that contributes to septic shock.

Nor is the additive approach of targeting more than one inflammatory mediator necessarily an appropriate therapeutic strategy, even though conceptually such approaches might appear logical. This point is well illustrated in recently published studies of Opal et al.<sup>23)</sup> who explored multiple therapeutic intervention strategies in a rat model of experimental *Pseudomonas* sepsis. In those studies, it was shown that both a TNF- $\alpha$  binding (and neutralizing) protein and the IL-1 receptor antagonist protein each provided limited protection

against mortality in comparison to saline controls. Importantly, however, when these two intervention strategies were combined, the consequences were an increased level of mortality. All of the animals died. Thus, dual intervention was neither additive nor synergistic but rather counterproductive. It should be cautioned, however, that dual immunotherapy is not always counterproductive as recently published studies by Bucklin et al.<sup>24)</sup> have clearly documented that monoclonal antibodies to IFN- $\gamma$  and to the IFN- $\gamma$  receptor are clearly synergistic in their ability to protect mice against LPS lethality.

A final point to be addressed is the issue of clinical endpoint to assess therapeutic efficacy of an anti-sepsis agent. Current protocols routinely evaluate efficacy on the basis of overall decrease in 28-day mortality due to all causes. While both understanding and appreciating the factors that dictate the adoption of this criterion, at least from the practical point of view of patient survival, it may be equally argued that such expectations are not totally realistic in terms of the capabilities of the therapeutic agent given once to a heterogeneous population of very sick patients. By way of example, in the clinical study of monoclonal antibody to TNF- $\alpha$  reported by Abraham et al.<sup>25)</sup>, it was reported that "there was no decrease in mortality between placebo and TNF MAb in all infused patients," and that "the differences in mortality among shock patients treated with placebo or TNF MAb was not significant (at 28 days)". In that same study, however, it was also pointed out by Abraham that "a significant reduction in mortality was present 3 days after infusion of TNF MAb." While it is difficult to speculate at this point on the actual clinical significance of these findings, it does bring into question an unequivocal conclusion that would reject further study of anti-TNF MAb in the treatment of sepsis.

In summary, it would appear that the past several decades have taught us much about basic mechanisms of pathogenesis of sepsis and septic shock; however, much still remains to be learned. It is unlikely that the incidence of sepsis will decrease dramatically in the forthcoming decade and, thus, therapeutic intervention strategies in addition to surgical intervention and/or antibiotic chemotherapy are critically needed. It is, in any case, reasonable to conclude that microbial products such as an endotoxin as well as the inflammatory mediators generated by

host cells in response to endotoxin stimulation do, in fact, contribute to the pathogenesis of disease, although the precise relative contribution of these factors may remain yet to be fully elucidated. It is clear that therapeutic intervention strategies developed to date have not been particularly effective in reducing mortality and even these therapies would benefit from more realistic and achievable endpoints to assess their effectiveness before being totally abandoned.

#### Acknowledgments

This work was supported by NIH grants R37 AI 23447 and PO1 CA54474 as well as an unrestricted grant from Merck and Co., Whitehouse Station, N J. The author acknowledges the expert assistance of Ms. Kathy Rode in the preparation of this manuscript.

#### References

- Morrison D C, Danner R L, Dinarello C A, et al.: Bacterial endotoxins and pathogenesis of Gram-negative infections: Current status and future direction. Report of a workshop sponsored by the Bacterial Pathogenesis Program, Division of Microbial Infectious Diseases, NIAID, NIH, July 27, 1993. *J Endotoxin Research* 1: 71~83, 1994
- Ziegler E J, McCutchan J A, Fierer J, et al.: Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 307: 1225~1230, 1982
- Novitsky T J, *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J Endotoxin Research* 1: 253~263, 1994
- Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, et al.: Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 184: 51~60, 1996
- Casey L C, Balk R A, Bone R C: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *J Infect Dis* 167: 112~118, 1993
- Leeson M C, Morrison D C: Induction of proinflammatory responses in human monocytes by particulate and soluble forms of lipopolysaccharide. *Shock* 2: 235~245, 1994
- Morrison D C, Ryan J L: Endotoxins and Disease Mechanisms. In: *Annual Rev Medicine*, ed. W P Creger Annual Reviews Inc., Palo Alto, C A, pp.417~432, 1987
- Spink W W, Hall W H, Shaffer J M et al.: Human Brucellosis: Its specific treatment with a combination of streptomycin and sulfadiazine. *Journal of the Am Med Assn* 136: 382, 1948
- Ziegler E J, Fisher C J Jr, Sprung C L et al.: Therapies to treat sepsis with anti-endotoxin monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 324: 429, 1991
- Greenman R L, Schein R M H, Martin M A et al.: A controlled clinical trial of ES murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of Gram-negative sepsis. *JAMA* 266: 1097, 1991
- Fujihara Y, Bogard W C, Lei M-G, et al.: Monoclonal anti-lipid A IgM antibodies HA-1A and E-5 recognize distinct epitopes on lipopolysaccharide and lipid A. *J Infect Dis* 168: 1429~1435, 1993
- Cross A S, Opal S E: Therapeutic intervention in sepsis with antibody to endotoxin: is there a future? *J Endotoxin Research* 1: 57~69, 1994
- Morrison D C, Ryan J L: *Novel Therapeutic Strategies in the Treatment of Sepsis*. Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1995
- Beutler B, Milsark I W, Cerami A C: Cytokines as targets in the immunotherapy of sepsis. *Science* 299: 869~871, 1985
- Jackson J J, Kropp H: Beta lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: *in vitro* comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific *imipenem* and PBP-3 specific *ceftazidime*. *J Infect Dis* 165: 1033, 1992
- Bucklin S E, Morrison D C: Differences in therapeutic efficacy among cell wall-active antibiotics in a mouse model of Gram-negative sepsis. *J Infect Dis* 172: 1519~1527, 1995
- Nakano M, Kirikae T: Biological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin released by antibiotic treatment *in vitro*. *J Endotoxin Research* 3: 195~200, 1996
- Opal S M, Cross A S, Jung J W, et al.: Potential hazards of combination immunotherapy in the treatment of experimental septic shock. *J Infect Dis* 173: 1415~1421, 1996
- Prins J M, van Agtmael M A, Kuijper E J, et al.: Antibiotic-induced endotoxin release in patients with Gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. *J Infect Dis* 172: 886, 1995
- Freeman B D, Natanson C: Clinical trials in sepsis and septic shock in 1994 and 1995. *Current Opinion in Critical Care* 1: 349~357, 1995
- Dinarello C A: New approaches to prevent the effects of IL-1 in sepsis. In: *Abstract, 2nd Annual CHI Symposium, Sepsis/SIRS: Reducing Mortality to Patients and Suppliers*, Washington DC, February 1996.
- Remick D, Manohar P, Bolgos G, et al.: Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock* 4: 89~95, 1995
- Opal S M, Horn D L, Palardy J E, et al.: The *in vivo* significance of antibiotic-induced endotoxin release in experimental Gram-negative sepsis. *J Endotoxin Research* 3: 245~252, 1996
- Bucklin S E, Russell S W, Morrison D C: Augmentation of anti-cytokine immunotherapy by combining neutralizing monoclonal antibodies to interferon- $\gamma$  and the interferon- $\gamma$  receptor: protection in endotoxin shock. *J Endotoxin Res* 1: 45~51, 1994
- Abraham E, Wunderink R, Silverman H et al.: Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. *JAMA* 273: 934~941, 1995



## シンポジウム I: マクロライド薬の新しい展開

## 1) 構造と活性

## 司会のことば

松本文夫

神奈川県衛生看護専門学校附属病院

齋藤 玲

北海道大学医療技術短期大学部

抗菌薬療法の目的は病巣内原因微生物の死滅ないし増殖抑制であり使用抗菌薬の pharmacodynamics と pharmacokinetics によって、その有効性は規定される。特に感染病巣におけるミクロ的 host-parasite-drug relationship が重要な意味をもっていることは周知のところである。

一方、高齢者はじめ基礎疾患を有する患者が多数を占める今日の感染症患者に対する抗菌薬療法では特異的宿主側条件とともに感染症以外の疾患に対する薬物療法との併用を考慮すると適正かつ効果的・安全な抗菌薬療法の確立が要求される。

このような状況の中でマクロライド薬は約 40 年の歴史を有し、ペニシリンGについて古い抗菌薬の一つであるが、 $\beta$ -ラクタム薬の開発の影にかくれて、その存在すらうすらいだ時期もあった。しかし本系薬は 14・16 員環につぐ 15 員環の開発、特殊な病原微生物に対する抗菌作用、すぐれた細胞内移行性をはじめ、抗バイオフィーム作用、抗炎症作用、免疫抑制作用、気管支粘膜分泌抑制作用、モチリン様作用など、多くの注目すべき特徴を有していることから、構造活性相関の研究、抗菌薬の解析方法、適正抗菌薬療法の検討、他の薬剤との相互作用など当面する抗菌化学療法の研究テーマの好適材料としても注目されている。

今学会において中山一誠会長がマクロライド薬をシンポジウムとしてとりあげられた理由もここにあるものと考えられる。マクロライド薬の基礎的臨床的特徴について幅広く討議することは時間的制約があるので本シンポジウムでは構造と活性、抗菌スペクトラムと Sub-MIC 効果、細胞内濃度と感染部位への移送、体内動態の特徴と臨床、Non Antibiotic effects などについてそれぞれの演者からご発表いただいたが、抗菌薬化学療法の発展のためにマクロライド薬の現状把握と臨床的意義について会員各位とともに活発な討議が展開されることを切望する。

森本繁夫

大正製薬株式会社・創薬研究所

マクロライド (Mac と略) という名称は大環状ラクトンに各種の糖が結合した構造を有する天然抗生物質に対して R. B. Woodward が提唱した (1957 年) ことを起源とする。現在、Mac は抗菌物質のほか免疫抑制、抗腫瘍、抗原虫、抗真菌など各種の作用を示す大環状ラクトン化合物も含めた総称として用いられている。Mac はそのラクトン環の大きさによって分類されるが、本シンポジウムでは細菌用として臨床上重要な 14 および 16 員環 Mac 薬についてその構造と活性について述べる。

Mac 薬としては 14 員環の erythromycin (EM), oleandomycin, 16 員環の spiramycin, leucomycin, josamycin, midecamycin ならびにそれらのいくつかの誘導体が各種感染症の治療に繁用されている (16 員環 tylosin 類は動物薬として使用)。Mac 薬は  $\beta$ -ラクタム剤が無効な *Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia* などの特殊細菌に対し強い抗菌力を示すことから、その有用性が再認識されている。一般に 14 員環 Mac は 16 員環に比較し *in vitro* 抗菌力が強く、また培地の pH が高くなるか血清添加により抗菌力が増強する。反面、14 員環は Mac 耐性を誘導する。アミノ糖部分が代謝されやすい、薬物相互作用を起こしやすい、モチリン様の消化管運動促進作用等の性質を有する。これら 14 と 16 員環の違いはラクトン環に結合するアミノ糖の性質と中性糖の結合様式に起因すると考えられる。

EM は Mac 薬の中で最強の抗菌活性を有するが、グラム陰性菌への弱活性、耐性誘導能、酸性での不安定性、低い血中濃度や尿中回収率、胃腸管刺激作用等の欠点を持つ。これらの改良を目的に多くの構造変換研究が行われ、いくつかのエステル類、塩類がプロドラッグとして開発されたが、ほとんどの誘導体では抗菌活性は EM より弱いものであった。一方、抗菌活性発現に必須な部位として 2' 位水酸基、3' 位アミノ基、9 位カルボニル基 (オキシム基やアミノ基も活性示す)、3 位中性糖、1 位ラクトン・エステルなどが明らかになった。

EM が酸性で不安定がある理由はその化学構造に起因する。すなわち EM は酸の存在下で 6 および 12 位水酸基、9 位カルボニル基が関与する反応により速やかに失活体へ変化する。1980 年代に入り EM の 6 位変換体 clarithromycin (CAM), 9 位変換体 roxithromycin, dirithromycin, azithromycin (AZM: 含窒素 15 員環) など多くの誘導体が相次いで合成・開発された。これ

らは“ニューマクロライド (New Mac)”と総称され、いずれも前述した EM の酸分解反応が阻止されるため、EM に比べ高い酸安定性を示す。また強い (特に *in vivo*) 抗菌活性を示し時に CAM はグラム陽性菌、*Chlamydia*, *H. pylori*, *M. avium* などに、AZM は *H. influenzae* に抗菌活性を増強している。さらに、New Mac は薬物相互作用や胃腸管運動促進作用を減少し、また体内動態、血中濃度、持続性、組織移行性、細胞内移行性の面で良好な性質を持つことが特徴である。しかし New Mac もグラム陰性菌には未だ抗菌力が不十分で、また Mac 耐性菌には EM 同様無効で耐性誘導能も有している。活発な構造変換研究がさらに進められ、構造と抗菌活性についての多くの情報が得られている。分子内へのアミノ基や水酸基導入はグラム陰性菌に、そしてラクトン環上へある種の芳香環導入や中性糖部分の変換は Mac 耐性菌に対し抗菌力を増強させる傾向にある。

最近報告されたケトライド類 (CAM の 3 位中性糖を除去した後ケトン体としたもの) は New Mac よりさらに高い酸安定性と強い抗菌力を有し、耐性誘導能がなく、良好な体内動態を示すことから注目されている。また、Mac 薬が示す抗菌活性以外の多種多様な生理作用と化学構造の関係はまだ不明の点が多く、興味ある課題である。また今後の新しい Mac 誘導体開発の方向性・可能性も考察した。

## 2) 抗菌スペクトラムと Sub-MIC 効果

館田一博

東邦大学医学部微生物学教室

エリスロマイシンは開発後 40 年を経た抗菌薬であるが、その臨床における有用性は現在においても依然として高い。その理由としては、特異な抗菌スペクトラム、優れた細胞内移行性、体内動態、そして予期せぬ sub-MIC 効果などが考えられる。特に呼吸器における持続性緑膿菌感染症やヘリコバクター感染症への有効性が確認されたことにより、ますますマクロライド剤の応用範囲は広がっているものと考えられる。また、次々と新しい特徴を有したマクロライド剤が開発されていることはご承知のとおりである。この中でも近々臨床応用される 15 員環系のアジスロマイシンは、その構造学的な特異性に加え、優れた細胞内移行性とグラム陰性菌への抗菌活性の強化などの特徴を有している。本シンポジウムではこれらマクロライド剤の抗菌活性に関して、現在までに報告されているレジオネラ、マイコプラズマ、クラミジア、ヘリコバクターなどの病原体に対する抗菌活性をレビューして報告した。また、新しいマクロライド剤の登場による抗菌スペクトラム

拡大の可能性についても報告した。特に欧米では HIV 感染患者における非定型抗酸菌症に対してマクロライド剤の優れた臨床効果が報告されている。それに加え、最近では HIV 感染患者に合併したトキソプラズマあるいはクリプトスポロジウム感染症に対しても本剤併用療法の有効性が報告されている。幸いにも本邦においては欧米に比しまだ HIV 感染患者は多くないが、今後確実に増加することが考えられることから、これら感染症に対する本剤の臨床効果については十分に熟知していなければならない。その他にも、臨床応用には至っていないがライム病、マラリア、あるいはカリニ感染症に対するマクロライド剤の有効性も実験室レベルで報告されている。以上のように、マクロライド剤は一般細菌からマイコプラズマ、クラミジア、リケッチア、そしてさらに抗酸菌や真菌、原虫にまでその抗菌スペクトラムの拡大が認められている事実をレビューして報告した。

またマクロライド剤の sub-MIC 効果については、その体内動態、細胞内移行性を考慮した上で、生体内におけるマクロライド剤が病原体におよぼす影響の可能性について報告した。この点に関しては、試験管内で測定される MIC はマクロライド剤の生体内効果を正しく反映しているのか、もし試験管内と生体内効果で乖離がみられるとすればどのような因子が関与しているのか、などの疑問点について緑膿菌に対するマクロライド剤の sub-MIC 効果を中心に報告した。その中で最も重要な知見は、マクロライド剤においては通常の 24 時間培養では緑膿菌に対して殺菌的には作用しないものの、さらに培養時間を延長して 48,72 時間と培養時間を延長する。すなわち菌と抗菌薬の接触時間を長くすることにより本剤は緑膿菌に対して殺菌作用を発揮するという結果を報告した。この事実は、暴露時間依存的な殺菌作用 (exposure-dependent bactericidal activity) と言えるものである (Tateda K, et al. AAC 40: 2271, 1996)。また、本剤は sub-MIC レベルにおいて緑膿菌の菌体外酵素、アルギネート、あるいは色素などの病原因子の産生を抑制する、いわゆる bacterial-virulence suppressing activity を有しており、これら作用と臨床効果との関係についても報告した。これら作用をまとめると、マクロライド剤は生体内において緑膿菌による慢性持続性呼吸器感染症をコロニゼーションにシフトさせる作用 (infection-to-colonization promoting activity) としてその有効性を発揮しているのかもしれない。マクロライド剤の臨床における有効性を本剤の菌側への作用だけでは説明できるものではないが、本剤の緑膿菌に対する sub-MIC 効果が臨床における有効性に関与していることに疑いはないものと考えられる。

### 3) マクロライドの食細胞内濃度と感染部位への移送

榎垣一憲

ファイザー製薬株式会社中央研究所

ニューマクロライド系抗生剤（新 MC）の薬物動態的特徴として、ロキシスロマイシンおよびクラリスロマイシン（CAM）の様に高い血中濃度の持続性と、CAM やアジスロマイシン（AZM）に見られるように良好な組織内移行が挙げられる。従来のエリスロマイシン（EM）やジョサマシインは経口投与された場合、胃酸や酵素による分解を受けやすく、生物学的利用率が低いが、新 MC はこれらに対して安定であり高い生物学的利用率を示す。

抗生剤の生物学的利用率と薬効を論じる場合、血中濃度のみならず、組織内濃度、さらには感染部位の濃度を考慮すべきであろう。この観点から CAM は肺組織内濃度が高く呼吸器感染治療に適した体内分布を示す。また、AZM は高い組織内濃度を示し、さらにその濃度が長時間持続する特性を持つ。ヒト組織で半減期は 60~80 時間におよぶ。ラットに AZM を経口投与した場合、胸腺、脾臓、リンパ節ならびに骨髄等の組織内濃度は比較的高く、持続性を示す。これは以下に述べるように AZM が好中球やマクロファージなどの食細胞内に高濃度に保持され、これらの組織に分布しているためと推定される。

食細胞中の抗生剤の濃度については、従来より細胞内寄生菌への効果が注目されてきたが、薬物動態的観点から食細胞による薬物の感染部位への移送についても注目される。新 MC のうち AZM やジリスロマイシンなどマクロライド環上にも塩基性基を持つ薬物は、食細胞中に特に高濃度にかつ長時間保持され、食細胞の感染部位への遊走に伴い、感染部位へ高濃度に送達されるものと考えられている。このような、食細胞による薬物の標的組織への送達は、phagocyte delivery とも言われている。

各種抗生剤の食細胞内移行を見てみると、 $\beta$ -ラクタムやアミノグリコシド類の移行は低く、マクロライド類の移行は高いとされる報告が多い。新 MC のうちアジスロマイシンの細胞内移行は特に高い。以下に AZM を中心に phagocyte delivery について紹介する。

AZM とヒト多核白血球を 24 時間インキュベートした場合、EM は細胞外液の約 20 倍、AZM は 200 倍以上の濃度で細胞内に取り込まれる。実際にイヌに AZM 20 mg/kg、5 日間経口投与した場合の多核白血球ならびに単球内濃度は血漿中濃度の 100~数 100 倍の濃度に達する。

また食細胞に取り込まれた AZM の細胞からの放出は緩やかであることが報告されている。このように、食細胞中に長時間保持されることが食細胞による薬物の感染部位への送達に重要であるものと考えられる。一方、*in vitro* 試験で食細胞に AZM を取り込ませた後、*S. aureus* と共に incubation すると、AZM の放出が促進される。このことは、食細胞が細菌を貪食した場合、細胞内の薬物が細胞外に放出されることを示唆しており、感染部位への薬物の送達において興味ある現象である。

AZM で観察されるこのような現象については、以下のように説明される。すなわち、AZM は生理的 pH 下ではある程度の割合で生体膜を通過しやすい分子型として存在するため、細胞膜を通過し、細胞内へ取り込まれる（能動輸送の可能性も論議されている）。細胞内では AZM は酸性顆粒であるライソゾーム中に移行し、イオン化されライソゾーム内にトラップされる（脂質親和性を示すマクロライド環もイオン化するため、膜透過性が低下することによる）。このことが AZM が食細胞中に高濃度に長時間保持されるメカニズムであると考えられる。また、食細胞が細菌を貪食した場合、ファゴゾームが形成され、ライソゾームと融合することにより、ライソゾーム中の酸が中和され、イオン化していた AZM が膜通過可能な分子型に戻り、細胞膜を通過して細胞外に放出される。

実際に動物試験により AZM、EM ならびにペニシリン-G (PCG) を感染モデルマウスに投与し、感染部位への薬物の分布を検討した。

マウス背部皮下に *S. aureus* を染み込ませたペーパーディスクを埋め込み、処置 5 日後に 20 mg/kg の  $^{14}\text{C}$ -AZM および  $^{14}\text{C}$ -EM を経口投与、 $^{14}\text{C}$ -PCG は静脈内投与した。全身オートラジオグラフィーにより感染部位の薬物の分布を検討した。AZM の場合、感染部位以外の多くの組織では経時的に濃度が低下するのに対し、感染部位の濃度は逆に経時的に高くなり、24 時間後では局部的に周囲の濃度よりかなり高い濃度を示した。感染部位の組織像を見てみると、好中球ならびにマクロファージなどの食細胞が高密度に集積しており、またマイクロオートラジオグラフィーによる検討の結果、食細胞の集積部位と薬物の分布が一致した。これらのことは AZM が食細胞により感染部位へ移送されたことを示唆している。EM では投与初期で感染部位濃度は周辺組織より僅かに高濃度を示したが、その濃度は投与後 6 時間では低下し、24 時間では完全に消失していた。このように、AZM で観察された感染部位における高濃度の分布が EM で見られなかったのは、EM は AZM に比べ食細胞中への移行比が低いことならびに保持される時間が短いため、感染部位へ移送されるまでに食細胞から EM が遊離するためと思われる。このよ

うに、食細胞による薬剤の移送が成立するためには、食細胞による薬剤の保持時間も重要な因子であると考えられる。食細胞中にほとんど取り込まれない PCG は組織内濃度の減衰が速く、投与後 6 時間以降の感染部位への分布はまったく認められなかった。

感染部位における AZM の薬効については動物試験で検討された。ラット背部皮下に空気を注入し作成したポーチ内に *S. aureus* を接種し、AZM の薬効をセフェム系薬物やフルオロキノロン系薬物と比較すると、AZM はこれらの薬剤より強くかつ長時間菌を抑制することが確認された。

臨床試験成績では各種疾患、特に呼吸器感染症においても高い有効率を示した。AZM は *in vitro* の MIC は他の薬剤と比較して特に優れているわけではないが、臨床試験で好成績を示す要因の一つとして上述のような食細胞による AZM の感染部位への移送の結果、感染部位の濃度が高濃度に維持されることが挙げられる。

AZM のように MC のうち、マクロライド環上に塩基性基を持つものは phagocyte delivery の観点から興味ある薬物動態を示すものと思われる。

#### 4) 体内動態の特徴と臨床

柴 孝也

東京慈恵会医科大学内科第二

マクロライド薬の体内動態は呼吸器、皮膚組織などへの良好な移行を特徴としていた。しかし、近年では脳組織、肝、胆道、腎などへすぐれた移行を示すことや、好中球へのそれもすぐれていることも知られるようになってきている。本シンポジウムでは、ニューマクロライド薬の体内動態の特徴を教室の成績を中心に検討し、若干の考察を試みた。

本系薬は 1991 年にいわゆるニューマクロライド薬と呼ばれる roxithromycin (RXM), clarithromycin (CAM) が体内での血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) の長い誘導体として臨床の場に登場した。さらに、認可が待たれる骨格として 15 員環の azithromycin (AZM) がある。これらを含むニューマクロライド薬の特徴と体内動態の面から略記する。

##### 1. 血清内濃度、尿中濃度

Roxithromycin (RXM) の体内動態: 健康志願者に本薬を 15 mg, Midecamycin acetate (MOM) 600 mg を cross over 法により検討した。最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) は RXM が  $5.15 \mu\text{g/ml}$  (2 時間後), MOM が  $1.34 \mu\text{g/ml}$  (30 分後) に達し、以後の血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) はそれぞれ 6.83 時間, 0.69 時間であった。使用後 8 時間までの尿中回収率は RXM で 5.1 %, MOM で 2.1 %であった。

Clarithromycin (CAM) の体内動態: CAM 200 mg, EM 400 mg を空腹時 1 回内服させた。CAM は内服 2 時間後の  $C_{max}$  は  $1.03 \mu\text{g/ml}$  に達し、 $T_{1/2}$  は 3.53 時間、血中濃度曲線下面積 (AUC) は  $6.87 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$  であった。EM では  $C_{max}$   $1.56 \mu\text{g/ml}$  は内服 2 時間後に  $T_{1/2}$  は 1.78 時間、AUC は  $6.05 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$  であり、CAM は  $T_{1/2}$  において有意に長く、また EM の半量使用にもかかわらず AUC は大きな値を示した。使用後 12 時間までの尿中回収率 EM 3.6 %, CAM は 36.9 % と良好であった。

Azithromycin (AZM) の体内動態: 北里研究所バイオマトリックセンターにおける健康成人男子志願者の成績では次の通りであった。AZM 250, 500, 1,000 mg を単回投与した際の血中濃度、尿中排泄では投与後 2~3 時間後のそれぞれの  $C_{max}$  は 0.24, 0.58 そして  $0.74 \mu\text{g/ml}$  であり、容量との間にほぼ相関が認められた。AUC は 1.73, 3.32 そして  $7.29 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$  と容量に応じて高く、大きくなっており、血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) は投与初期には 3~4 時間であるのに対して 48 時間まででは 20 時間前後となり、さらに 168 時間まででは 60~70 時間となり、時間とともに  $T_{1/2}$  の延長が認められた。尿中排泄は 500, 1,000 mg での投与後 168 時間までで約 9 % であった。

検討した薬動学的パラメーターについては、EM と  $C_{max}$  を比較すると RXM では高値、CAM, AZM では低値であった。AUC は RXM では大きく、CAM では差がなく、AZM では小さくなっていった。

##### 2. 好中球への移行

AZM の血液細胞成分への移行性をみた成績は以下に示す通りである。(A.WILDFOER: Antimicrob Agents Chemother. Jan. 1996)。

AZM 500 mg を 3 日間内服し経時的に検討した結果、血清中、赤血球への移行に比べ、好中球、単球における高い移行性で持続することを特徴としているという。この際の薬動学的パラメーターは好中球での  $C_{max}$  は  $114 \text{ mg/l}$ , 単球で  $34 \text{ mg/l}$  と血清における  $0.40 \text{ mg/l}$  に比較して高く、AUC では好中球で  $6,291 \text{ h} \cdot \text{mg/l}$ , 単球で  $886 \text{ h} \cdot \text{mg/l}$  であり好中球、単球で極めて高い値を示している。

##### 3. 好中球機能への影響

貪食能 (Phagocytosis): EM では、血清中の濃度依存的に好中球の貪食能を亢進させることが証明され、CAM でもやや弱いものの同様の成績を得た。

遊走能 (Chemotaxis): ここでも EM は濃度依存的に遊走能の亢進を認め、CAM においても EM よりも弱いものの遊走能の増強を認めた。

##### 4. 細胞外カルシウム濃度、カルシウム拮抗薬の影響

*In vitro* の実験において細胞外カルシウムをキレートさせ、濃度を低下させた状態での EM, RXM の好中球内移行を検討した (E. M. TAIRAG: Antimicrob

Agents Chemother. Aug. 1995)。

コントロールと比べ、約 5% と細胞内への移行をおさえられることを証明している。さらに、カルシウム拮抗薬であるベラパミル (ワソラン®) が 250, 500  $\mu\text{M}$  存在下におけるマクロライド薬の好中球への取り込みは、500  $\mu\text{M}$  の方がマクロライド薬の取り込みを抑制していた。ここでも濃度依存的にマクロライドの取り込みを阻止していた。

#### 5. マクロライド薬の移行性からみた臨床的有効性

マクロライド薬の体内動態、組織移行のすぐれた臓器は、肺、気管支、副鼻腔、歯槽、扁桃、唾液腺、肝、前立腺、脳、皮膚などから食細胞を含む白血球などがあげられ、これら体内動態から有効な感染症として期待される疾患は、呼吸器感染症、歯科・口腔外科領域感染症、耳鼻科領域感染症、泌尿器・生殖器感染症、浅在性化膿性疾患などである。

#### 6. マクロライド薬の今後の展開

組織移行性の優れた薬剤が臨床使用されるようになり、好中球を含めた組織移行の検討が必要になるであろう。

*In vitro* でカルシウム拮抗薬がマクロライド薬の好中球への移行を妨げるという結果がでており、生体内でも同様の作用を引き起こすのか、さらなる検討が必要である。

マクロライド薬の体内動態を理解することにより、広範囲において、臨床使用が可能になるとと思われる。

### 5) Non Antibiotic Effects

齋藤 玲

北海道大学医療技術短期大学部

マクロライド薬 (Mac) は巨大な環状ラクトン構造を有し、エリスロマイシン (EM) をはじめとして、抗菌作用を主たる薬理作用とする抗菌薬として使用されてきた。近年、抗菌作用以外の新しい作用についての見直しがあり、多くの研究者により検討されている。これらの作用はきわめて多彩であり、ここでは non antibiotic effects と表現してまとめた。Bryskier ら (1995) は、Mac の構造—活性による分類を示している。その作用は、抗菌、抗真菌、抗寄生虫、抗炎症、心血管系 (抗不整脈、降圧)、胃腸管蠕動促進などをあげている。抗菌作用以外の生物活性として、伊藤、大村ら (1984) は、EM に腸管蠕動促進作用を示す、モチリン (消化管ホルモン) 作用を発見した。モチリンのアゴニストとして抗菌作用を示さない EM の誘導体として、EM-523, EM-574 などが作られ、その効果の検討が行われている。また、開発時に免疫抑制効果が認められた FK-506 (タクロリムス) は免疫抑制剤とし

て臨床使用されている。本剤は 23 員環で広い意味で Mac に含まれるものである。

Non antibiotic effects として、もっとも注目されているものは、抗炎症作用であるが、Bryskier らは、この作用に ? をつけている。個々の作用機序についての明確な結果がないとのことであるが、我が国においては、多くの新知見があり、多様な研究が行われている。工藤 (1987) は、びまん性汎細気管支炎 (DPB) に対する EM など 14 員環マクロライドの少量長期療法の有効性を報告している。その作用機序は、①細菌の排除がなくても病気は改善すること、②感染性を持たない緑膿菌感染例でも改善すること、③EM の血中・喀痰中最高濃度は 1  $\mu\text{g/ml}$  程度であり、有効例と非有効例に有意差がみられない、などの臨床症状より、抗菌作用によらない抗炎症作用などの薬理作用によるものと考えられた。その奏効機序として、気道の分泌抑制効果、慢性炎症の抑制効果、細菌そのものに対する効果などに分けられ、多くの研究が行われている。気道粘膜の炎症病態に対する EM の作用として、①気道上皮細胞の Cl<sup>-</sup> チャンネル障害による水分分泌とムチン産生の抑制による過剰分泌抑制作用、②好中球遊走因子遊離抑制による好中球集積抑制作用、③リンパ球、マクロファージなどに対する作用、などがあげられている。細菌そのものに対する効果は、本来ならば抗菌作用であるが、Mac は緑膿菌に対しては抗菌力はないといわれている。緑膿菌の病原性規定因子として、内毒素、外毒素 A, 外毒素 S, エラスターゼ, プロテアーゼ, ロイコシジン, フォスホリパーゼ, グリコリピッド, スライム, 色素などがあげられている。これらに対して Mac の緑膿菌に対する効果として、外毒素 A 産生抑制, エラスターゼ産生抑制, フォスホリパーゼ C 産生抑制, ロイコシジン産生抑制, アルギネート産生抑制, バイオフィーム形成障害, 線毛運動阻害物質産生抑制, 好中球走化性因子産生抑制などがあげられている。これらの作用が、緑膿菌による感染病態を改善するものと考えられる。だが、これが非抗菌作用としてみるべきものか、抗菌作用とすべきかは今後の課題である。炎症、免疫細胞への作用として、好中球、リンパ球、単球、マクロファージなどへの影響を、ヒト、動物などで多くの研究が行われているが、種々の条件が異なる結果もあって、明確な解答を得るにはなお時間が必要である。

これら Mac の non antibiotic effects により、気道炎症をもつ感染性疾患として、DPB 以外にも、慢性気管支炎、気管支拡張症、慢性副鼻腔炎 (成人、小児)、小児渗出性中耳炎、気管支喘息などに用いられ、炎症病態に対する有効性があげられている。特に気管支喘息は、Mac は古くから用いられ、その抗炎症作用を追跡できる疾患である。Kaplam (1959) は、感染性の喘息

患者にトリアセチルオレアンドマイシン (TAO) の使用で、喀痰の分泌量を減少させ、副腎皮質ステロイド剤の投与量を減少することに注目を示した。Fox (1961) は、TAO がステロイド代謝に影響すること、Goncharova (1963) は、EM などに副腎皮質刺激作用があると報告した。Itkin (1970)、Spector (1974) などは、ステロイド依存性気管支喘息患者で、TAO は喀痰の減少、ステロイドの減量などの効果を認め、ステロイド代謝について検討している。その作用機序として、TAO、EM-estolate は肝障害を起こすので、それとの関連性を考慮している。我が国では、水谷 (1977) が動物実験で EM のステロイド類似の作用を認め、その非抗菌性作用として報告している。1977年に Weinberger が TAO とテオフィリンの相互作用について報告し、ステロイド様作用は、薬剤相互作用によると断定し、この問題に終止符を打ったが、疑問の残るところである。堀 (1996) は、視床下部一下垂体—副腎系において Mac の影響を報告した。また、気管支喘息に対する Mac の有用性も報告され、その作用機序についても再検討されることであろう。

DPB に対する EM の作用として、好中球の集積を抑制することがあり、その機序を応用し、各種疾患に用いられている。未熟児の慢性肺障害、虚血再灌流障害、プレオマイシン肺障害と間質性肺炎、インフルエンザウイルス感染症、クローン病などと、血管新生抑制効果、抗腫瘍効果を期待して悪性腫瘍などについても検討が行われている。Mac の non antibiotic effects として、DPB の経験にもとづき、抗炎症作用がクローズアップし、その作用を有効に活用すべく、種々の疾患に用いられているが、その作用機序の解明など今後多くの問題が残されている。

## シンポジウム II: 化学療法は何故効き、 何故効かなくなるか

### 司会の言葉

国井乙彦

帝京大学医学部第二内科

橋本 一

北里研究所生物機能研究所

感染症学会東日本地方会、化学療法学会東日本支部会、および細菌学会関東支部会の合同シンポジウムとして、3学会に共通して深い関連のある「細菌の薬剤耐性」に関するものとして、このテーマがとりあげられることとなった。薬剤耐性の領域では、もっとも一般的なペニシリン分解酵素がセフェムもこわすようにな

ったこと、MRSA や肺炎球菌のベータラクタム耐性に見るように、種の違う菌から耐性遺伝子が移行して、宿主の染色体に挿入したり、組み換えを起こしたりして耐性化したりすること、また緑膿菌などに見るキノロン耐性化に伴う多剤耐性化が、癌の化学療法で以前から知られていた多剤耐性化と共通する排出機構を持つことなど、新しい話題が多くなってきた。現実の感染病巣では、複数菌感染があり、1菌種の場合でも、種々の耐性型のもものが混在していて、時に治療を誤らせる。またメチシリンや新キノロンで、耐性度が高度化し、それが2種以上の耐性機構によることも分かってきた。すなわち、同じ薬剤に対する MIC の変化でも、異なる遺伝子の変異による異なる作用点の変化が積み重なることがあり、それが菌種によって順序が違っていたりする。現在は薬剤耐性も多元的であり、化学療法も多元的であることが要求されている。

細菌も、他のあらゆる生物と同じように、その固有の性質を発現させるために、DNA からはじまって RNA、タンパク質にいたる情報伝達系に変わりはない。薬剤はこれら情報伝達の種々の段階、およびその後の物質代謝における酵素阻害であり、基質と拮抗し、または酵素や基質を修飾して、菌の分裂、生存を不可能にする。

菌の薬剤耐性機構は大別して、相手である薬剤を変えて無害なものにする方法と、自分自身を変えて害を受けなくする方法とある。相手を変える場合、これを薬剤の不活化といい、分解と修飾とある。分解の例としては、ベータラクタマーゼの他にもマクロライドの環状構造を切るエステラーゼ、またテトラサイクリンを酸化的に分解する系などが知られている。修飾の例としては、アミノグリコシドをリン酸化、アセチル化、アデニル化する諸酵素がもっともよく知られ、マクロライドやホスホマイシンでもリン酸化が知られている。

自分自身が変わる場合、薬剤の作用点に変化する場合と薬剤が作用点に到達しないようにする場合とある。作用点の変化とは、酵素やその基質が質的にか量的に変化して薬剤の作用を受けなくなる場合であり、MRSA や肺炎球菌のペニシリン耐性は PBP の質的变化により、腸球菌のペニシリン耐性は PBP の量的変化の例である。腸球菌のバンコマイシン耐性の場合、基質とも言うべき細胞壁構成単位の構造を変え、薬剤の作用を受けなくしている。サルファ剤、トリメトプリム、ホスホマイシンなどでも酵素の質的变化が知られている。新キノロン耐性の場合、DNA ジャイレースの他に、トポイソメラーゼ IV も作用点であることが新しく知られてきた。両酵素のキノロン感受性が、菌種によって異なるのも興味ある点である。

薬剤が作用点に到達しない耐性機構は、以前は透過性変異として述べられてきた。緑膿菌が多くの薬剤に

耐性である理由の1つは、ポーリンの透過孔が小さいせいであるし、ホスホマイシンは細胞膜に於ける糖の透過系を介して菌体内に入るので、その変異で耐性となる。その変異に数種の遺伝子が関係している。ほとんどのテトラサイクリン耐性は、排出タンパクによることが分かっているが、最近、特に緑膿菌で、いわゆる多剤耐性機構 (Multiple Drug Resistance, MDR) が明らかになり、キノロン、アミノグリコシド、クロラムフェニコールなど、構造も、作用機序も違う多くの薬剤に同時に耐性になる排出タンパクが知られてきた。この機構は、1970年代から知られていた癌細胞の多剤耐性機構と似ているが、癌の場合はATPをエネルギー源とする膜タンパクから構成されていてABC (ATP-Binding Cassette) ファミリーと総称されているのに対し、微生物の場合は、Proton-motive Forceをエネルギー源とする違いがある。微生物における薬剤耐性機構を癌における薬剤耐性と対応させて考察するのは、上のMDRが、癌で解析される方が早かったことでも意義の深いことである。

今回のシンポジウムでは、以上の考察の流れにそって、それぞれの分野の最先端で活躍しておられる5人の演者に話題提供をお願いした。今回の基礎的考察が、複雑な化学療法の現実にどう適用されたらよいか、もっとも新しい示唆を各各員の方が読み取られたら幸いと思う。

## 1) 標的 (PBPs) の変化による $\beta$ -ラクタム系薬の耐性

生方公子

帝京大学医学部臨床病理

はじめに

欧米より問題となったペニシリン (PCG) 耐性肺炎球菌 (PRSP) の  $\beta$ -ラクタム薬に対する耐性機構は、標的の PBP に対する薬剤の親和性の低下であることが知られている。日本においては1970年代にすでに存在していたという報告もあるが、それが事実であるとするなら、なぜそれから20年も経過した今日において急速に増加しつつあるのかという疑問も生じる。このことは1980年代の初めにMRSAが急速に増加したことと対比して興味深い。

### PRSPの出現と薬剤感受性

我々が1980年以前に小児の呼吸器感染症から分離した菌株、ならびに1988年前後に東京大学医学部附属病院で収集された菌株について詳細に解析した成績では、前者は0.016  $\mu\text{g/ml}$  にピークを有する1峰性の分布であったが、後者ではPBP遺伝子の変異した菌株が認められ、それらのMICは0.031~0.125  $\mu\text{g/ml}$  ヘシフト

していた。この時期はちょうど小児科においてPRSP感染症が注目されはじめた時期に一致している。

このような状況下で「ペニシリン耐性肺炎球菌研究会」は1993年に発足し、3年間にわたって全国各地から4,255株を収集し解析を行った。これらの株のPCGに対する感受性分布は0.25  $\mu\text{g/ml}$  に谷間を有する2峰性分布である点が特徴である。NCCLSのリコメンドでは薬剤の体内動態にもとづき、感性 (PSSP)、中間 (intermediate: PISP)、耐性の3つに分類されるが、そのブレイクポイントは必ずしも明確ではない。PRSPは他の  $\beta$ -ラクタム系薬に対してもMICは高く、交叉耐性を示している。しかしながら、その中ではカルバペネム系薬がPRSPに対して比較的優れた抗菌力を有しているということもある。

### $\beta$ -ラクタム系薬の標的としてのPBPs

PSSPでは分子量の大きい順にPBP1A, 1B, 2A, 2B, 3と通常5本の蛋白のバンドが見い出される。各薬剤のMICとPBPに対する親和性の関係は、1Aに約40%結合する点をもっともよく相関している。次いで2Bと2Aであるが、MICとの相関は1Aに比してはるかに低い。このことは裏返すとPBP1Aをコードする遺伝子変異が耐性化のkeyになっていることを意味している。また、このPBP1Aは新しく合成されるペプチドグリカンの架橋反応、PBP2Aは隔壁合成における架橋反応、PBP2Bは肺炎球菌特有のランセット型の形態保持に関与していると推測される。

一方、PRSPにおいてはこれらのPBPのうち、1A, 2B, および2Aの薬剤親和性が低下している。同時に、2Xと呼ばれる新たなバンドが認められる株もある。つまり、これらの酵素蛋白をコードする遺伝子変異しているのである。

### 遺伝子変異と耐性度との関係

多くの菌株についてPBPを調べることは必ずしも容易ではないことから、PCRによって遺伝子変異を解析した。PCGの感受性とPBP1Aと2Bの遺伝子変異の関係をみると、0.25  $\mu\text{g/ml}$  以上ではほとんどの株で両遺伝子変異している。1A, あるいは2B単独変異の菌株のMICは0.063~0.25  $\mu\text{g/ml}$  である。MIC 0.031  $\mu\text{g/ml}$  以下では変異は認められず、感受性成績と遺伝子変異とはよく相関している。

一方、CTXの感受性分布にPBP1Aと2X遺伝子の変異の有無を重ねると、両遺伝子が同時に変異した株のMICはやはり0.125  $\mu\text{g/ml}$  以上で、真の感性菌のそれは0.016  $\mu\text{g/ml}$  以下である。

要約すると、2Bあるいは2X遺伝子変異するとPCGやCTXのMICは真の感性レベルから約10倍上昇し、さらに1A遺伝子変異するとMICはさらに10倍程度上昇するということである。

日本で検出されるPRSPの80%以上は、既に

PBP1A, 2B, 2X の 3 つの遺伝子に変異した株なのである。

#### PRSP の臨床的意義

一説によれば、このようなレベルでの耐性菌は臨床的にはさしたる問題をもたらさないという意見も聞かれる。しかし、研究会によって集積され、解析された成績からは、小児においては化膿性髄膜炎、肺炎、敗血症、中耳炎の起炎菌としてきわめて重要であることが浮き彫りにされている。特に化膿性髄膜炎では血清型 6 型の PRSP が重要であることが示されている。中耳炎からの肺炎球菌は血清型 19 型の PRSP が圧倒的に多く、治療に難渋している症例が見受けられる。

小児に比べ、成人の化膿性髄膜炎例からは耐性菌は少なく、むしろ重症感染症を惹起しやすいムコイド型のペニシリン感性の 3 型が多く、その他には昔から病原性が強いといわれていた 14 型や 6 型がみられ、発症後に急速に予後不良となっている例が散見される。

おわりに

以上、肺炎球菌を例にとり標的 PBP の変化による耐性機構と臨床における耐性菌の意義について述べた。

## 2) 不活化による耐性とその対策

井上松久

北里大学医微生物

1980 年代に入り上市された抗菌薬は、主として quinolone 系薬と  $\beta$ -lactam 系薬である。そのため、現在感染症の治療には主に  $\beta$ -lactam 系薬や quinolone 系薬が使われており、次いで macrolide 系薬、aminoglycoside 系薬 (AGs)、あるいは fosfomycin (FOM) が使われている。これら抗菌薬の抗菌力は強く、感受性菌が 1 段階変異によって臨床で問題となるような高度耐性菌になる確率は低い。ところが、現実には当初我々が予想もしなかった耐性菌が臨床分離菌の中から分離されてきている。臨床分離細菌が抗菌薬を不活化することによって耐性を獲得し得る抗菌薬は  $\beta$ -lactam, AGs, FOM, chloramphenicol (CP) と限られている。しかも不活化酵素の主なもの外来性の遺伝子によるものであり、内在性の遺伝子が関与する不活化酵素はグラム陰性桿菌の class C 型  $\beta$ -lactamase, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* の class A 型  $\beta$ -lactamase による耐性が挙げられる。したがって、施設、診療科間での AGs や  $\beta$ -lactam 系薬などに対する耐性菌の疫学的動向を把握すれば耐性菌出現の背景を知る大きな手がかりとなる。

ところで、使用頻度が減った抗菌薬は前よりも良好な感受性を示すことが多い。事実、現在 AGs の使用量

は減る傾向にあり、それに伴って臨床分離細菌での AGs 耐性菌分離頻度は大きく減少している。抗菌薬の使用量が減れば耐性菌は選択されず、むしろ減ることを示唆している。そこで、化学構造類似の抗菌薬をある一定期間使用停止にしたり、施設間、診療科間で互いに異なる抗菌薬を使うことは耐性菌出現防止対策の 1 つの方法である。また、AGs の中では ABK が MRSA に対して強い抗菌力を発揮する。これは MRSA が保有している AGs 双頭酵素 APH (2'')/AAC (6') に対して ABK は GM に比べて大きな  $K_m$  値を示すためである。すなわち、ABK は GM に比べて APH (2'')/AAC (6') に対してより基質になり難いことが ABK の優れた抗菌力の理由である。不活化酵素との親和性の低い抗菌薬を選ぶことが、耐性菌をより選択しない対策と言えよう。この他、CP 耐性菌も減少傾向にある。

化学構造類似の抗菌薬は大なり小なり交差耐性を示す。したがって、当初効いた抗菌薬と言えども構造類似の抗菌薬の使用を繰り返せば高度耐性菌を選択する。たとえば、*E. cloacae* から第一世代 cephem 薬耐性菌を選択すると種々の酵素量の変異株が選択され、選択濃度が高くなるほど酵素多量産生株が得られる。これは、第一世代 cephem 薬が class C 型  $\beta$ -lactamase (CEPase) によって容易に加水分解がされる ( $V_{max}$  が大きい) ためであり、選択濃度が増すと耐性菌の選択頻度は下がるものの酵素量の多い変異菌が濃縮されてくる。この結果は、class C 型  $\beta$ -lactamase 産生に複数の遺伝子が関与していることを示す。一方、第三世代 cephem 薬は酵素との親和性が強く ( $K_m$  が小さい)、 $V_{max}$  も小さい。すなわち、酵素に cephem 薬が容易に補足されるものの、補足された cephem 薬は酵素から解離し難いため酵素は失活状態を保つ。その結果、余分の第三世代 cephem 薬が抗菌力を発揮する。また、高濃度の第三世代 cephem 薬による耐性菌の選択率は低い、選択された変異菌の酵素量は第一、二 cephem 薬耐性菌に比べてさらに多く、中には質的変異菌も分離される。これに対して、cefepime, ceftazidime, ceftazidime, cefepime 等の新しい cephem 薬は、第三世代 cephem 薬よりさらに大きな  $K_m$  値を示す。そのため第三世代 cephem 薬が有意に耐性を示す量の酵素産生菌に対しても cefepime は感受性とほぼ同程度の MIC を示し、耐性菌の選択率は  $4-32 \times \text{MIC}$  で  $10^{-9}$  以下と低い。このように、 $\beta$ -lactam 耐性の主因は  $\beta$ -lactamase であることから、 $\beta$ -lactamase 産生菌を選択し難い抗菌薬あるいは投与方法を考える必要が重要となる。 $\beta$ -lactamase 阻害剤による酵素の失活や外膜透過性の高い抗菌薬を選ぶことも耐性菌対策の 1 つの方法である。

$\beta$ -lactamase 産生遺伝子 DNA の塩基配列をもとに Ambler は、class A は典型的 PCase, class B は carbapenemase (CBPase), class C は CEPase,



class D は OXA 型 PCase に対応させた。ESBL は Ambler の分類の class A 型  $\beta$ -ラクタマーゼ群のことである。ESBL は、TEM-1, 2, SHV-1 が加水分解し得ない CTX あるいは CAZ などの cephem 系薬を加水分解するところから、酵素の基質特異性が拡大したという意味で Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), あるいは Broad Spectrum  $\beta$ -lactamases (BSBLs) と呼ばれている。ESBL 産生菌の特徴は、CTX あるいは CAZ ないしは AZT に耐性を示すが、CFX や IPM には感受性を示すこと、class A 型酵素であることから clavulanic acid (CVA) によって酵素活性が阻害されるため ABPC/CVA に対しては感受性である。また、MIC も用いる菌数によって左右されるため、できれば  $5 \times 10^7$  cfu/ml を用いて MIC を調べることが ESBL を見逃さないコツである。この ESBL による耐性菌は *K. pneumoniae* や *E. coli* から検出され、ヨーロッパやアメリカの老人病院や ICU を中心に院内感染菌として分離されている。今のところ、我が国では TEM, SHV 型 ESBL とは別の型の ESBL が出現してきている。これは、それぞれの国で繁用されている cephem 薬の結果を反映していると考えられる。この他、我が国では carbapenem 薬を加水分解する plasmid 支配の耐性菌が問題となっている。この酵素は class B 型  $\beta$ -lactamase であり、その活性保持に  $Zn^{2+}$  イオンを必要とすることから metalloenzyme と呼ばれる。この酵素は、CTX, CAZ, CFX, PIPC に加えて IPM などすべての carbapenem 薬を加水分解するが、AZT は壊さない。したがって、IPM, CTX, CAZ, CFX 耐性、AZT 感受性であり、CVA によって阻害されず、EDTA 存在下で IPM の MIC は感受性に傾く。この carbapenemase 産生菌は、感受性菌に比べてすべての carbapenem 薬に耐性を示すが、carbapenem 薬はその外膜透過性が優れているため、少ない菌数で MIC を調べるとやはり感受性と見逃がしてしまう。耐性限界値をどこに設定するか、どのくらいの菌数をもちいて MIC を求めるかによってかかる菌株の検出が左右される。したがって、抗菌薬評価の菌数の問題を再検討することも基礎結果と臨床成績との差異を少なくする 1 つの試みかもしれない。 $\beta$ -lactamase の量的・質的变化による耐性菌を早く検出し、対処することが耐性菌対策としてもっとも重要と思う。

### 3) 標的の変化による耐性獲得

佐藤謙一

第一製薬(株)創薬第一研究所

#### 1. はじめに

細菌の標的酵素の変異による薬剤耐性機構は、最近

の分子生物学的手法の進歩により、驚くほどの巧妙さ、多様性を有することが明らかになりつつある。特に、世界中でその対策に苦慮しているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) は、外来性の薬剤低感受性のペニシリン結合性酵素 (PBP) 遺伝子の獲得と発現によるものと考えられている。また、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) では、バンコマイシンの標的である D-Ala-D-Ala を、その合成酵素変異により、機能を維持しつつ薬剤に結合しない新しい基質 (D-Ala-D-Ser など) へ変換する耐性と考えられている。

一方、合成抗菌剤であるキノロン剤に対する耐性は、標的酵素である DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV の段階的変異により高度耐性化することが明らかになりつつある。本シンポジウムでは、特にキノロン剤の標的酵素による耐性変異について、最近の実験成績より考察したい。

#### 2. キノロン剤の作用

ニューキノロン剤の作用は、細菌の DNA 合成に必須な酵素であるトポイソメラーゼ II (DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV) の阻害によるものと考えられている<sup>1)</sup>。この 2 種の酵素は 2 本鎖 DNA の切断と再結合を繰り返すことで、DNA の立体構造を変化させ DNA の複製初期の複製酵素群 (ヘリケース、ポリメラーゼなど) 認識部位の形成と複製フォークに生じるよじれの解消、および複製後期に作られた 2 量体 DNA を娘細胞に分配することで正常な細菌の増殖に貢献すると考えられる<sup>2)</sup>。これら酵素を支配する遺伝子群の欠損、あるいはニューキノロン剤による阻害は、細菌にとって致死的である。

#### 3. ニューキノロン自然耐性出現頻度

試験管内における耐性菌出現頻度について検討した。大腸菌を一夜培養すると、その菌数は約  $10^9$  個/ml となる。その菌数中の自然耐性菌を、寒天培地に薬剤を添加して選別すると、レボフロキサシン (LVFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) の 2 倍、および 4 倍の薬剤中では、約  $10^8 \sim 10^9$  個/ml に 1 個以下であった。緑膿菌および黄色ブドウ球菌に対する LVFX の耐性菌出現率もほぼ同様な頻度であった。この結果より、臨床においてもニューキノロン剤の耐性菌の出現はきわめて低頻度であると期待された。しかし、選択圧を下げた時の、10 代培養の結果は、異なることが明らかとなった。選択圧とは薬剤による濃度を意味し、この場合は、1/2 MIC 濃度の培地に発育した菌を、次の世代の接種菌にして、順次 2 倍段階に希釈した薬剤加液体培地で継代した結果である。その 10 代間の MIC 値をプロットすると、その MIC はどの薬剤による選択によっても、耐性を上昇させ、10 代目には 4~128 倍もの MIC 上昇を示した。しかもその耐性は比較的安定した形質を示

し、次の世代に受け継がれた。この試験管内における耐性獲得性の相違は、臨床における投与量を考える上で重要である。すなわち、起因菌の MIC と、薬剤の最高血中濃度あるいは、MIC を越える血中、尿中および組織内濃度および持続時間を考慮しなければ、強い殺菌作用を保有するニューキノロン剤を投与しても、容易に耐性菌を選択することになりかねないからである。

#### 4. ニューキノロン耐性メカニズム

細菌が抗菌剤に耐性を示す方法として、①β-ラクタマーゼを代表とする薬剤不活化酵素による薬剤の修飾、破壊、②脂質多糖体 (LPS)、外膜あるいは内膜による透過性障壁形成、および③標的酵素の耐性変異が考えられる。ニューキノロン耐性菌において、薬剤不活化酵素による分解は現在まで見出されていない。主なメカニズムは、標的酵素の変異と薬剤の汲み出しを含む薬剤透過性障壁である。ニューキノロン剤の標的はトポイソメラーゼ II に分類される DNA ジャイレースと考えられてきた。しかし、最近、トポイソメラーゼ IV が発見され、その機能の類似性が明らかになるに従い、耐性への関与も含め注目されている。

DNA ジャイレースの変異による耐性化は、その精製酵素での阻害作用とともに、遺伝学的解析が進み、その耐性変異部位が明らかとなった。DNA ジャイレースは 2 つのサブユニット (GyrA, GyrB) のうち、おもに GyrA の特定の部分に変異が集中している (キノロン耐性決定領域, Quinolone Resistance Determining Region, QRDR)。その中でも、GyrA のアミノ酸配列の 83 位のセリンがロイシン、トリプトファンやアラニンに変わったり、87 位のアスパラギンがアスパラギン酸、バリンやグリシンに変異すると耐性を示す。キノロン高度耐性株は、83 位と 87 位の 2 重変異を示す GyrA を持つものが多い。GyrB の変異による耐性は、2 種類が知られているが、その耐性度は低い。一方、遺伝学的に DNA ジャイレースと高い相同性を示すトポイソメラーゼ IV の、2 種のサブユニット (ParC および ParE) のうち、ParC も GyrA と類似の塩基配列および QRDR を保有し、80 位のセリンがロイシンに変わると耐性を示す。キノロン感受性の野性株より精製した両酵素に対する LVFX の阻害効果 (IC<sub>50</sub> 値) は、DNA ジャイレースの方がトポイソメラーゼ IV より、約 10 倍感受性であるが、DNA ジャイレースの GyrA 変異 (セリン 83→ロイシン) 酵素では、感受性株より約 50~100 倍耐性を示す。この変異株に対する MIC の上昇は 4~8 倍に過ぎないので、その変異株の MIC は変異していないトポイソメラーゼ IV 阻害を反映していると推測される。興味あることに、黄色ブドウ球菌では、トポイソメラーゼ IV の方がキノロン剤に感受性を示し、一次耐性変異株では、トポイソメラーゼ IV 変異が集中して認められる<sup>9)</sup>。さらに、臨床分離キノロン高度耐性

株では、トポイソメラーゼ IV と共に、DNA ジャイレースの耐性化が認められたことから、大腸菌と同様に両酵素の段階的変異によって、耐性化すると推測される。最近、肺炎球菌<sup>10)</sup>、淋菌<sup>11)</sup> などにおいても同様なメカニズムが働き耐性化していることが明らかになりつつある。

#### 5. おわりに

細菌はキノロン剤に対しても、巧妙な手段で段階的に耐性を獲得しているようである。さらに、これら耐性機構の他に、薬剤排出機構および外膜透過性障壁が存在する。緑膿菌では薬剤排出機構の関与が、標的酵素変異よりその耐性度に大きな影響を与えていることが明らかになりつつある。これらの複数の耐性因子を獲得することで、高度耐性菌が出現するものと考えられる。

しかし、キノロン剤の殺菌力および体内動態の特徴を生かし、耐性菌の選択を避ける投与方法であれば、このような耐性菌の増加を防ぐこともある程度可能ではないだろうか。また、これら耐性機構研究を、新規抗菌剤探索に生かすことができれば、次世代のキノロン剤の創成も可能であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Kumagai Y, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 710, 1996
- 2) Kato J, et al.: *J. Biol. Chem.* 267: 25676, 1992
- 3) Ferrero L, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1554, 1995
- 4) Pan X, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2321, 1996
- 5) Deguchi T, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1020, 1996

#### 4) 透過性変異による耐性

中江太治

東海大学医学部分子生命科学部門

はじめに

ほとんどの薬剤は細胞内に浸透しその標的に到達することによって抗菌作用をあらわすことができる。したがって一部の例外をのぞけば細胞膜を透過出来ない薬剤は薬剤としての作用がないといっても過言ではない。それでは薬剤の透過性が問題となる耐性にはどんなものがあるかという大きく 2 つに大別することができる。(i) これまで薬剤に対して感受性であった菌が変異することによって薬剤の透過性が低下した結果耐性化する場合も、もしくは一部の菌種にみられるように元来細胞膜の薬剤に対する透過性が低いため自然耐性を示す場合。(ii) いったん細胞内に到達した薬剤が細胞外に排出されるために細胞内の抗生物質濃度が低下して効力を発しない場合である。これら細胞膜がかかわる薬剤耐性の一般的な傾向としては 1 種類の抗菌

物質に対してのみ耐性となるのではなく、多くの抗生物質に対して同時に耐性となる場合が多い。ここでは臨床的に多くの問題を有する緑膿菌における薬剤の細胞内への浸透性および細胞内からの能動的排出について論じる。

#### 緑膿菌外膜を介しての抗生物質の透過経路

大腸菌および緑膿菌における低分子物質の透過性をブドウ糖-6-リン酸などで測定するとその透過率の比は約 200 対 1 であるという報告がある。抗生物質の透過速度は技術的な問題もあってごく限られた基質でしか測定できない。たとえばセファロチンを基質としてこれのペリプラズムにおける  $\beta$ -ラクタマーゼによる分解速度を測定することによって透過率を測ると緑膿菌外膜におけるセファロチンの透過速度は大腸菌のその数百分の 1 である。この結果から、緑膿菌外膜の透過性が大腸菌のそれに較べいかに低いものであるかが伺いしれる。

同様の方法を使って緑膿菌外膜を介してのイミペネムの透過速度を測定するとそれはセファロチンのそれに比べて約 26 倍程度高い。このことはすでに報告されているようにイミペネムは外膜の OprD ポーリンを特異的また効率的に透過するためであろうと考えることができる。それでは緑膿菌外膜の OprD 欠損株におけるイミペネムの透過率はどの程度であるかという点、それは OprD 産生株のそれに比べ約 1/16~1/36 程度に低下しておりセファロチンのそれとかなり近づくことがわかる。すなわち OprD 陽性株ではイミペネムは OprD を介して効率よく透過しており、OprD 欠損株では他の  $\beta$ -ラクタム剤同様の透過経路を介して細胞内に浸透しているものと考えることができる。

それでは  $\beta$ -ラクタム剤などの抗生物質は緑膿菌の別のポーリンを介して透過しているのであろうかという疑問が残る。我々は緑膿菌に OprC, D, E の 3 種類のポーリンが存在することを明らかとし、これらのポーリンの透過孔は 2 糖類以下の低分子物質のみを透過させることができる程度のものであることを示してきた。したがってカルバペネムを除く多くの抗生物質はこれらのポーリン孔を透過できないのものであろうことを示唆してきた。この疑問に答えるために我々は次に述べるような実験を行った。さきに述べたようにペリプラズムに達した  $\beta$ -ラクタム剤が加水分解される速度から  $\beta$ -ラクタム剤の透過速度を算出する方法で、OprC および OprE を共に欠損した株におけるセファロチンの透過速度を野生株におけるそれと比較した。その結果 OprC および OprE 欠損株では野生株におけるセファロチンの透過とほぼ同じかわずかに高い透過率が得られた。さらに同様の実験を OprC, OprD および OprE のすべてを欠損した菌株を用いて測定してもセファロチンの透過率は野生株のそれと区別つかなかった。した

がってセファロチンを用いて測定する限りでは緑膿菌ポーリンは抗生物質の透過にほとんど役割を果たしていないという結論になる。それではセファロチンなどの抗生物質は外膜のどの部分を透過して細胞内に達しているかという疑問が残る。抗生物質がタンパク質の透過孔を透過しているのかあるいは脂質二重層を透過しているのかを区別するために我々はセファロチンの透過を 37°C と 17°C で測定した。その結果 17°C でのセファロチンの透過率は 37°C でのそれに比べ約 60 パーセント低い値であることが明らかとなった。すなわち緑膿菌外膜の脂質層は温度が低下するとその液状結晶状態がより密となるためセファロチンの透過速度がより低下したものと解釈した。一方ポーリンの孔を透過していることが明らかとなっているイミペネムの透過率は 37°C と 17°C でほとんど差がなかった。そのほかにもキノロン剤、テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールの透過性を 37°C と 17°C で測定するといずれの場合にもセファロチンと同様 17°C での透過率は 37°C でのそれに較べかなり低かった。したがって、これらの薬剤は緑膿菌の脂質二重層を透過しているものと結論した。

さらにこれらの結果をより確実なものにするために遺伝子置換法を用いて OprC, OprD, OprE およびこれらの 3 種類のポーリンのすべての組み合わせにおいてポーリン欠損株を作成した。そしてこれらの変異菌に対するセフトジタイム、ラタモキシセフ、カルベニシリン、クロラムフェニコール、の MIC を測定しそれらの値を野生株の値と比較した。その結果これらのポーリンが欠損したことはこれらの抗生物質の MIC に何の影響も与えないものであることが証明された。

#### 緑膿菌における薬剤の細胞外への排出と耐性

緑膿菌を低濃度の  $\beta$ -ラクタム剤、もしくはキノロン剤で選択すると多剤耐性表現型を持った変異菌が容易に得られる。これらの変異菌は  $\beta$ -ラクタム剤、クロラムフェニコール、キノロン剤、テトラサイクリンなどに耐性を獲得すると共に、分子量 50,000 前後の新たな外膜蛋白質を産生する。そのような多剤耐性表現型を持つ菌を用いてキノロンの細胞内への取り込みを測定すると変異菌は野生株の約 1/2~1/3 量のキノロンを取り込んだ。さらにこの取り込みの実験をアンカプラーである CCCP の存在下で行うと多剤耐性変異株と野生株の間に取り込みの差は見られなくなった。これらのことから、緑膿菌の多剤耐性は H<sup>+</sup>イオン濃度勾配依存的に働く薬剤排出機構によるものであることがわかった。

多剤耐性表現型を示す耐性菌から多剤耐性を付与している遺伝子をクローン化したところ、得られたクローンは *mexA-mexB-oprM* と同じ遺伝子であった。さらに多剤耐性変異株ではこれらの遺伝子の転写活性が

亢進していることが mRNA の測定の結果明らかとされた。またこれらの遺伝子産物と考えられる 41 kDa および 112 kDa の内膜蛋白質と 50 kDa の外膜タンパク質の量的な増加も観察された。

そこでこれら MexA-MexB-OprM 蛋白がどのように薬剤排出にかかわっているかを知るために遺伝子置換法を用いて MexA, MexB および OprM の遺伝子を独立に破壊した変異菌を作成し、それらの菌における抗生物質の MIC を測定した。その結果キノロン系、クロラムフェニコールなどの抗生物質においては MexA が欠損した場合と MexB が欠損した場合には薬剤の MIC が数倍かつ同程度に低下し、菌は薬剤感受性となった。すなわち、薬剤の排出が効率よくなされないために薬剤は細胞内に停留する結果となり、その効力が上昇したものと考える。一方、OprM が欠損した場合には MexA/MexB が欠損した場合よりもさらに 4 倍程度薬剤に対してより感受性が高まっていることが明らかとなった。これらの結果を総合して考えると MexA/MexB が欠損した場合には内膜における薬剤排出が低下するが、しかし内膜には別の薬剤排出ポンプが作動していて、これが外膜の OprM と連携することによって薬剤をある程度の効率で細胞外に排出するものであるといえる。ところが外膜の OprM が欠損すると内膜での MexA/MexB が働いてペリプラズムに薬剤を排出しても外膜における出口がないため抗生物質は細胞内に停留し効力を発するものと解釈できた。

このように緑膿菌においては外膜の薬剤に対する障壁性および内膜における能動的薬剤排出が供役的に作用することによって構造的にも、また作用機作の上からも大きく異なる多くの抗生物質に対して耐性を示すことが明らかとされつつある。

## 5) がん細胞の薬剤耐性

鶴尾 隆

東京大学分子細胞生物学研究所

### 1. はじめに

抗癌剤を用いた治療において、はじめから抗癌剤が効かない、あるいは治療中に抗癌剤が効かなくなり癌が進行するという事は臨床的にしばしば認められ、化学療法における重大な問題となっている。この臨床での抗癌剤に対する抵抗性には、大きく分けて 2 つの側面がある。第 1 は個々の癌患者にその原因が求められる場合であり、第 2 は癌細胞、あるいは癌細胞そのものに原因が求められる場合である。この 2 つのうち、いずれが臨床的に重要であるかの判断は難しい。しかし第 1 の場合は、たとえば患者における抗癌剤の肝での不活性化、代謝排泄の増大などが原因となつてみら

れる抵抗性であり、この原因は主に患者個々の問題であり、現在では臨床的な解析、対応に難しい面を含んでおり、研究の対象とはなりにくい。第 2 の原因にもとづく抵抗性、特に細胞レベルでの抵抗性については古くから実験癌で研究され、臨床における薬剤抵抗性が癌細胞そのものの抵抗性と密接な関係をもつことが証明された。シンボジウムでは癌細胞の薬剤抵抗性のうち最近研究の進んだ多剤耐性と、最近我々が興味をもって研究しているアポトーシス耐性について述べる。

### 2. 多剤耐性細胞の性質

1 つの抗癌剤に耐性化した癌細胞は、他の構造も作用機作も異なる抗癌剤に対しても抵抗性を示すことが知られている。1 つの遺伝子の変化が多くの形質 (耐性化) を支配すると言った意味合いから pleiotropic drug resistance (PDR) とも呼ばれている。

PDR を示す癌細胞は、興味深い性質を示し、生化学的変化を受けていることが知られている。それを列挙すると、1) まず他の抗癌剤に対しても抵抗性 (交差耐性) を示すこと、2) 抗癌剤の排出が亢進しており、その結果細胞内抗癌剤が低く保たれる、3) 膜タンパクに変化がある、ことが知られている。

ビンクリスチン系、あるいはアドリアマイシン系抗癌剤に耐性を示す癌細胞は、チューブリン系に作用する vinca alkaloid 系、colchicum alkaloid 系あるいはメイタンシン系の薬剤と、DNA にインターカレートする anthracycline 系、アクチノマイシン系の薬剤に交差耐性を示すし、蛋白合成阻害剤であるピューロマイシン、エメチンなどにも交差する。

これら交差耐性を示す細胞におけるピンカアルカロイド系薬剤の細胞内薬理動態を調べると、交差耐性を示す細胞においては、多くは排出の亢進、また binding の変化によって、細胞内濃度が低く保たれる。同様のことはアンストラサイクリンの膜輸送についても言える。アンストラサイクリン耐性の場合、膜輸送の変化のみで耐性機構が説明できにくい面もあるが、耐性を示す細胞では排出の亢進によって、細胞内抗癌剤は低く保たれる。

これらの耐性の phenotype を説明する物質生化学的変化として一番注目されているのは細胞膜の変化である。我々はアドリアマイシンに耐性化したヒト骨髄性白血病細胞 K562 には染色体が増幅した HSR や DM と言われるものが存在し、特に膜には分子量 180 K の膜タンパク (P-糖タンパク質) が強く発現することを見出している。P-糖タンパク質は多剤耐性において中心的機能、すなわち抗がん剤の細胞外排出を行うポンプ作用をもったタンパクであり、このタンパクが存在するゆえに、耐性細胞では抗がん剤の濃度が低く保たれ、細胞は抗がん剤に対し抵抗性を示す。P-糖タンパク質は、もともと抗がん剤に反応しない一部のがんに

も存在することが示され、注目されている。P-糖タンパク質の機能を阻害する物質、カルシウム拮抗薬などが耐性克服に有効であることが見いだされ耐性の克服の研究も進んでいる。

### 3. 抗癌剤によるアポトーシスと薬剤耐性

アポトーシスはプログラム細胞死に伴ってよく観察される死の様式であるが、抗癌剤や放射線などの非生理的な各種ストレスで癌細胞を処理したときにも誘導され、アポトーシスの研究は癌化学療法の分野に非常に重要な情報を与えるものと思われる。アポトーシスを誘導できる抗癌剤として、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、そして、チューブリン阻害剤と様々な作用機構を有する抗癌剤が報告されているが、特にトポイソメラーゼ阻害剤によるアポトーシスが比較的良く研究されている。エトポシドなどに代表されるトポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼと DNA の結合体 (cleavable complex) を安定化することにより、DNA 鎖切断を導入すると考えられていた。

我々は、抗癌剤によるアポトーシスのメカニズムを解明することを目的として、抗癌剤によるアポトーシスに耐性な細胞株の樹立を試みた。ヒト単球性白血病 U 937 細胞を変異処理し、得られた変異株のクローンの集合から作用メカニズムの異なるエトポシド、Ara-C 両薬剤により誘導されるアポトーシスに耐性な株 UK 711 細胞を選択した。従来知られている薬剤耐性細胞には、薬剤の細胞外への排出能の上昇、ターゲット分子の量的質的变化、修復能の亢進などにより細胞に導入されるダメージの低下が認められる。UK 711 細胞は、エトポシドにより 1 次的に導入されるトポイソメラーゼ II 依存的な DNA ダメージは親株 U 937 細胞とほとんど同じであるにもかかわらず、2 次的に発生する DNA のヌクレオソーム単位への断片化がまったく異なる点が従来の薬剤耐性細胞と異なっていた。このアポトーシス耐性 UK 711 細胞は、エトポシド、Ara-C 両薬剤はもちろんのことアドリアマイシン、マイトマイシン C、カンプトテシンなど、アポトーシスを誘導することが知られている種々の抗癌剤に耐性であった。この実験結果は、アポトーシス耐性が癌細胞の多剤耐性の原因になりうることを示唆している。

### 4. おわりに

抗がん剤多剤耐性の一般的性質、耐性の生化学的側面について述べた。多剤耐性に関しては P-糖タンパク質が明らかになり、あるいはカルシウム拮抗薬などが耐性克服に有効であることが見いだされて以来、その分子機構の解明が急速な勢いで進んできた。その結果、P-糖タンパク質が耐性機構の中心的役割をもつタンパク質であることがわかり、さらにもともと抗がん剤に反応しない一部のがんにもこの種のタンパク質が存在

することが示され、注目されている。一方アポトーシス耐性も抗癌剤多剤耐性に結びつくことがわかりつつある。アポトーシス研究が新規抗癌剤の開発研究に与えるインパクトは大きいといえる。

## 一般演題

### 003 ホスホマイシンは iNOS 遺伝子発現を抑制することにより一酸化窒素産生を抑制する

渡部宏臣・小林 香・三國谷雄

明治製菓(株)薬品総合研究所

目的: 一酸化窒素 (NO) は生体の恒常性の維持に関与する重要な因子の一つである。ホスホマイシン (FOM) が LPS 刺激マクロファージの NO 産生を抑制することは以前に本学会で報告した。今回、我々は FOM の NO 産生抑制の機序の解明を目的として、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA 発現と iNOS 蛋白産生に及ぼす FOM の影響について検討した。

方法: チオグリコレートで誘導したマウス腹腔マクロファージを LPS で刺激した後、培養上清中の亜硝酸塩を Griess 反応法で定量することで NO の生成量を測定した。iNOS mRNA の発現は RT-PCR 法で測定した。凍結融解で調製した細胞内画分の iNOS はウェスタンブロッティング法で検出した。iNOS 活性は市販の測定キットで測定した。

結果: FOM は LPS 刺激マクロファージの iNOS mRNA 発現と iNOS 蛋白質の産生を抑制した。FOM はマクロファージ細胞内に誘導された iNOS 活性を阻害せず、無細胞抽出液中の iNOS を阻害しなかった。FOM は LPS 刺激マクロファージの NO 産生を抑制したが、TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$  刺激による NO の産生を抑制しなかった。また LPS 刺激開始 2 時間目以降のマクロファージに FOM を添加しても NO の産生は抑制されなかった。

考察: FOM は、LPS 刺激マクロファージの iNOS mRNA 発現を抑制し、iNOS 蛋白質の産生量を減らすことにより、NO の産生を抑制した。従って、FOM の作用点は LPS 刺激開始時から iNOS の mRNA 発現にいたる刺激伝達経路に存在することが示唆された。

また、FOM はサイトカイン刺激による NO 産生誘導経路には作用せず、LPS 刺激による NO 産生誘導経路に選択的に作用することが示唆された。

### 004 Fosfomycin の好中球機能に及ぼす影響について

本田順一・杉原栄一郎・草場珠郁子  
猿渡直子・大泉耕太郎

久留米大学医学部第一内科

目的: 近年、Fosfomycin (FOM) に抗菌作用以外の作用が存在することが判ってきた。そこで今回我々は、FOM のヒト末梢血好中球機能に対する影響を観察した。

方法: 正常健康人よりヘパリン加採血し、デキストラン法により好中球を分離した。FOM-Na は明治製菓株式会社より供与されたものを使用した。好中球の活性酸素産生能の測定には、DCFH-DA 法を用いた。クレブス・リングルフォスフェイト緩衝液で  $2 \times 10^6$ /ml 濃度の好中球浮遊液を作製し、各濃度の FOM で処理した後、FMLP または LPS で好