

シンポジウム1 「新規マクロライド誘導体EM703の生物評価」

Effects of EM-703, a Macrolide Analogue, on *P. aeruginosa*

館田一博

1. はじめに

エリスロマイシン (EM) を代表とするマクロライド剤の慢性緑膿菌気道感染症に対する有効性は確立したものの、その作用機序は未だ解明されるには至っていない。現在、宿主側と細菌側への両面から検討されており、本剤の臨床の有効性と関連するデータが多数報告されている。我々はsub-MICマクロライド剤の緑膿菌に対する*in vitro*作用を検討し、EMが細菌の外膜蛋白やLPSなどの菌体表層構造に変化を誘導し血清殺菌に対する感受性を高めるという事実を報告してきた。また、これらの実験の過程で、EMによる作用は本剤が緑膿菌に長時間暴露されてはじめて生じる、すなわち暴露時間依存的な現象であることを見出した。Sub-MICであっても緑膿菌が本剤に長時間暴露された場合にはその蛋白合成が強く抑制されており、最終的にはマクロライド剤が緑膿菌に対しても殺菌的に作用している可能性を観察している。これら

の事実は、マクロライド剤が生体内において緑膿菌の病原因子発現を強く抑制していることを示唆しており、これが慢性下気道感染症患者における本剤有効性機序の1つとして機能している可能性を示している。また我々は、sub-MICマクロライド剤が緑膿菌のQuorum-sensing機構、特にautoinducer分子3-oxo-C₁₂-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL)の産生を強く抑制することを報告している。

本発表では、これら知見を踏まえマクロライド剤誘導体であるEM-703の緑膿菌に対するsub-MIC効果について、色素・プロテアーゼ産生抑制効果、3-oxo-C₁₂-HSL産生に及ぼす影響について検討した。

2. EM-703の緑膿菌の色素産生およびプロテアーゼ産生に及ぼす影響

EM-703を含む各種マクロライド剤の緑膿菌色素産生に及ぼす影響について検討した。ミュー

Fig. 1. Effects of Macrolides on Pigment Production.

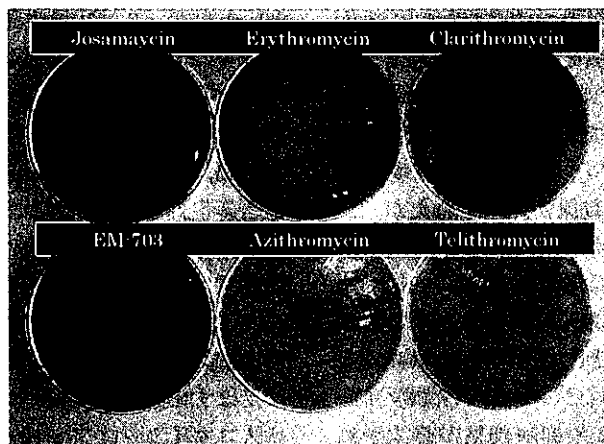
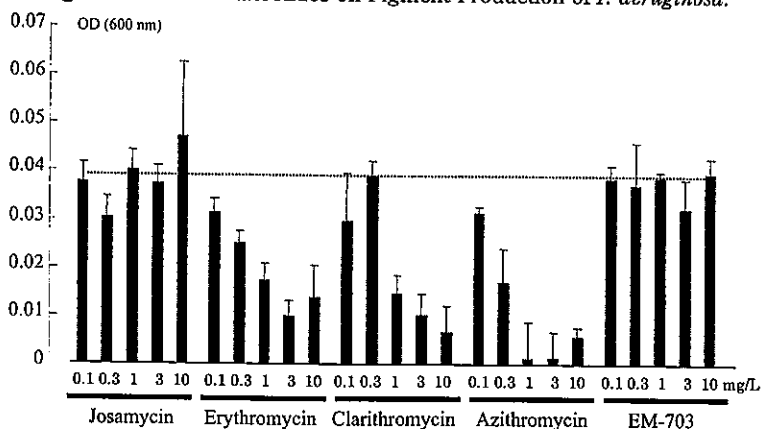
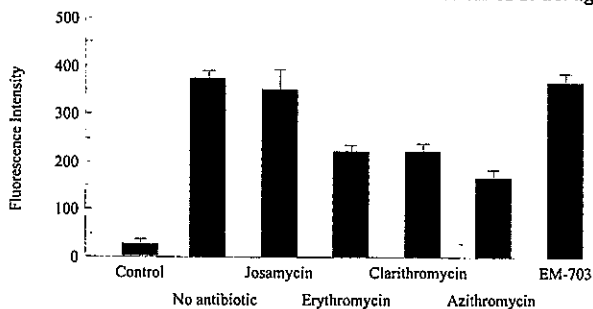


Fig. 2. Effects of Macrolides on Pigment Production of *P. aeruginosa*.

Optical density (600 nm) of culture supernatant of *P. aeruginosa* S-6 was examined at 24 hours after incubation.

Fig. 3. Effects of Macrolides on Protease Production of *P. aeruginosa*.

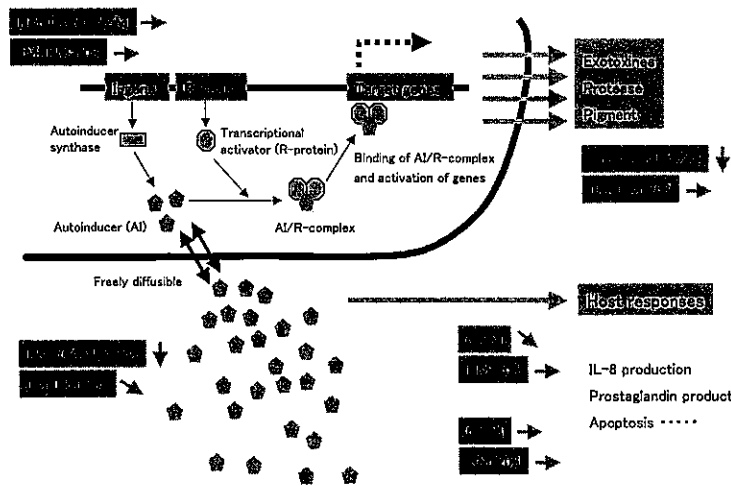
Total protease activity of culture supernatant of *P. aeruginosa* S-6 grown with 10 mg/L for 24 hours was examined.

ラーヒントン培地に各種マクロライド剤が10mg/Lとなるように添加し、これに緑膿菌を接種、24時間後の緑色色素の産生を比較した (Fig. 1)。これまで報告してきたように、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンにおいて強い色素産生抑制効果が観察されたが、ジョサマイシンにはこの作用は見られなかった。一方、エリスロマイシン誘導体であるEM-703においても色素産生抑制効果はみられなかった。これに対して、新規ケトライド剤であるテリスロマイシンにおいてクラリスロマイシン、アジスロマイシンに匹敵する強い色素産生抑制効果が確認された。そこで、この色素産生抑制効果について定量的解析を加えた (Fig. 2)。各種マクロライド剤の

0.1, 0.3, 1, 3, 10mg/Lを含有する液体培地で緑膿菌を24時間培養し、培養上清中のピオシアニン濃度を吸光度計にて測定した。寒天培地における成績と同様に、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンにおいて濃度依存的な色素産生抑制が観察されたが、ジョサマイシンおよびEM-703において10mg/Lの濃度においても抑制効果は認められなかった。

次に、これら薬剤の緑膿菌プロテアーゼ産生に及ぼす影響について検討した (Fig. 3)。色素産生に及ぼす影響と同様に、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンにおいてプロテアーゼ産生抑制効果が確認されたが、ジョサマイシンおよびEM-703において抑制効果は認めら

Fig. 4. Summary of Effects of EM-703 on Bacteria.



れなかった。これらの結果より、EM-703の緑膿菌の色素およびプロテアーゼ産生抑制効果は、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンに比べ弱いと考えられた。

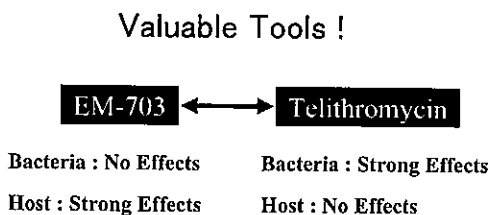
3. EM-703の緑膿菌quorum-sensing機構に対する抑制効果

最近になって、緑膿菌の病原因子の多くが特異的な遺伝子制御メカニズムであるquorum-sensing機構により制御されていることが明らかとなっている。マクロライド剤が細菌の病原因子の発現を強く抑制するという事実と併せて、本剤のquorum-sensing機構に対する効果に興味が持たれている。我々はこれまでに、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシン、エリスロマイシンの緑膿菌quorum-sensing機構に対する抑制効果を確認している。そこで今回、新しく開発したEIA系により3-oxo-C12-HSL産生に及ぼすマクロライド剤の影響について検討を加えた。その結果、これまで報告してきたように、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンにおいて3-oxo-C12-HSL産生抑制効果が観察されたが、ジョサマイシンおよびEM-703において極めて弱い抑制作用が認められたのみであった (data not shown) (Fig. 4)。

4. 考察

マクロライド剤の細菌への影響は、(i) 菌体外産生物質への影響、(ii) 菌体表層構造への影響、(iii) 菌体内における変化、に大別して考えることができる。(i) に関しては緑膿菌の産生する菌体外毒素に対する抑制効果があり、(ii) に関しては外膜蛋白、LPSあるいは線毛への影響が報告されている。また、(iii) に関してはマクロライド剤への長時間暴露条件において本来の作用である蛋白合成抑制効果がみられることがわかってきた。また興味深いことに、マクロライド剤は菌の生存に必須であるストレス蛋白の構成的発現および反動的産生にも変化を誘導する。これらの作用は何れも試験管内で測定されるMICでは評価されない作用であり、この点で一般に用いられる抗菌薬感受性試験はマクロライド剤の生体内効果を正しく反映していない可能性がある。以上をまとめると、マクロライド剤に暴露された菌は、見かけ上は生菌であってもその病原因子の産生・発現は強く抑制されており、また菌体表層構造の変化あるいはストレス応答の変化などから宿主感染防御能に対する感受性が高まった状態にあると考えられる。今回のEM-703を用いた検討から、本誘導体はエリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンと異なり、緑膿菌に対しては極めて弱い

Fig. 5. Clear contrast between EM-703 and Telithromycin.



sub-MIC効果しか認められなかった。

最近になって、菌は環境における自らの濃度を感知し、その濃度に応じて病原因子遺伝子の発現を巧妙に制御していることがわかってきた。菌と菌との情報伝達機構、すなわちquorum-sensingと呼ばれるシステムである。緑膿菌のquorum-sensing機構 (lasおよびrhl) は、それぞれI- 遺伝子 (*lasI*, *rhlI*) およびR- 遺伝子 (*lasR*, *rhlR*) 産物であるautoinducerおよび転写活性化因子を介した遺伝子発現機構により、菌体外毒素、ピオシアニン、菌体外多糖などの病原因子発現を制御している。これまでに我々が報告したように、アジスロマイシンは2 mg/Lという非常に低い濃度、しかも臨床的に感染部位に到達可能な濃度において、緑膿菌のquorum-sensing機構を強く抑制するという事実が明らかになっている。さらに最近になって、緑膿菌の産生するC12-HSLが生体細胞に対しても大変興味深い影響を与えていることがわかってきた。すなわち、培養マクロファージ細胞に対するケモカインMIP-2の誘導である^{1,5)}。MIP-2は好中球遊走に作用するCXCケモカインの1つで、ヒトのIL-8に相当する分子である。C12-HSLが生理的濃度においてMIP-2を誘導したという事実は、慢性緑膿菌気道感染症の発症病態を考える上で大変興味深い成績であると考えられる。また、これら一連の実験の中で、3-oxo-C12-HSLがマクロファージ系の細胞に対してアポトーシスを誘導する現象も観察された。好中球遊走を惹起しながら、アポトーシスにより細胞死を誘導する。なぜこのような現象が生じるのか詳細は不明であるが、結果的には

気道内における細菌の生存、あるいは慢性感染の助長という点においては細菌にとって有利な状況が作りだされることが推定される。この点に関して、EM-703においては緑膿菌のQuorum-sensing機構に対する抑制効果は認められなかった。これらの知見は、菌側への作用から考えると、EM-703はエリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンとは明らかに異なる特徴を有するものと考えられた。

興味深い点は、新規ケトライド剤テリスロマイシンの特徴である。今回の検討でテリスロマイシンの強い緑膿菌に対する作用が確認された。重要な点は、テリスロマイシンの生体細胞への作用は極めて弱いということであり、この点でEM-703と対照的である。したがって、テリスロマイシンとEM-703を組み合わせることで、菌側への作用と生体側への作用のどちらかが臨床的有効性と関連するのかを解析することが可能となる (Fig. 5)。今後、これらマクロライド剤の有効性・新作用に関して動物実験モデルを含めた検討が必要になってくるものと考えられる。

5. 文献

- 1) TAKEDA K., et al. : The *Pseudomonas aeruginosa* quotoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 71 : 5785~5793, 2003
- 2) TAKEDA K., et al. : Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence : Potential role as Quorum-sensing inhibitors. *Current Pharmaceutical Design.* 10 : 3055~3065, 2004