

学位論文題名

Role of Outer Membrane Protein OprD
in the Activities of Carbapenem
Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*

（緑膿菌に対するカルバペネム系抗生物質の抗菌活性における
OprD 外膜蛋白の役割）

学位論文内容の要旨

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 感染症は難治性であり、臨床
上最も問題となっている感染症の1つである。グラム陰性菌の外
膜には数種類の親水性物質の透過孔が存在する。緑膿菌の外膜透
過孔は他のグラム陰性菌の透過孔よりも薬剤に対する透過性が低
いので、緑膿菌は多くの抗生物質に対して高度自然耐性を示す。
そのため、緑膿菌感染症に対して十分な治療効果を示す抗生物質
は少ない。カルバペネム系抗生物質は、新しい母核をもつ β -ラ
クタム剤であり、従来の抗生物質と比較して多くの菌種に対して
強い抗菌力を持ち、緑膿菌感染症に対しても優れた治療効果を示
す。

本論文は、新規カルバペネム系抗生物質 panipenem (PAPM)
の抗緑膿菌活性を特に外膜透過性の面から検討し、緑膿菌感染症
に対するカルバペネム系抗生物質の作用機構について得られた新
知見を述べたものである。

1. PAPM の OprD 透過孔を介した緑膿菌外膜透過性および抗緑
膿菌作用機構

カルバペネム系抗生物質 imipenem (IPM) は外膜蛋白である
OprD の透過孔を介して緑膿菌外膜を透過するが、セフェム系お

よびペニシリン系抗生物質は他の経路を透過すると考えられている。PAPMは、IPMに次いで世界で2番目に開発された新規カルバペネム系抗生物質であり、多くの菌種に対してIPMとほぼ同等の優れた抗菌力を示す。緑膿菌標準株PAO1およびそのOprD蛋白欠損変異株を用いて、PAPMのOprD透過孔を介した緑膿菌外膜透過性および抗緑膿菌作用機構について検討した。

PAO1株に対するPAPMの最少発育阻止濃度(MIC)は6.25 $\mu\text{g/ml}$ で、IPMよりも4倍、セフェム系抗生物質 ceftazidime (CAZ)よりも2倍、その効果が劣っていたが、ペニシリン系抗生物質 piperacillin (PIPC)とは同等であった。OprD蛋白欠損変異株に対するPAPMおよびIPMの効果は、親株と比較して4から8倍劣っていた。PAO1株およびOprD蛋白欠損変異株への $[^{14}\text{C}]$ PAPMの取り込み量を測定したところ、OprD蛋白欠損変異株の方がPAO1株よりも有意に取り込み量が少なかった。これらのことから、PAPMはIPMと同様にOprD透過孔を介して緑膿菌外膜を透過し、抗菌活性を示すと考えられた。

PAPMの抗緑膿菌作用機構について調べるため、PAO1株を用いて細胞壁合成酵素(PBPs)に対するPAPMの親和性および菌形態に与える影響について検討した。 β -ラクタム剤は、内膜上に存在する数種類のPBPsに結合し、細胞壁合成を阻害することにより抗菌力を示すことが知られている。 $[^{14}\text{C}]$ penicillin GとPBPsの結合を50%阻害する薬剤濃度から薬剤のPBPsに対する結合親和性を求めたところ、いずれの薬剤もPBPIAには親和性を示したが、CAZおよびPIPCは隔壁形成に関与するPBP3に対して高い親和性を示したのに対し、PAPMは伸張開始に関与するPBP2に対して高い親和性を示した。走査型電子顕微鏡により薬剤作用時の菌の形態を観察すると、これら薬剤の作用を反映してCAZまたはPIPC作用時には菌が著しく伸張化した像が観察されたが、PAPM作用時には菌が球形化または溶菌した像が多く観察された。

以上のことから、PAPM は、OprD 透過孔を介して緑膿菌外膜を透過し、内膜上の特に PBPIA および PBP2 に結合して菌の細胞壁合成を阻害することにより、抗菌力を示すことが明らかとなった。

2. アミノ酸濃度が低い培地中におけるカルバペネム系抗生物質の抗緑膿菌活性の上昇

低栄養性の培地である最少培地中における緑膿菌に対する PAPM の抗菌力を測定したところ、カルバペネム系抗生物質は Mueller-Hinton 培地 (MH 培地) のような感受性測定標準培地中よりも強い抗緑膿菌活性を示すことを見いだした。この機構を、PAO1 株および OprD 蛋白欠損変異株を用いて外膜透過性の面から検討した。

カルバペネム系抗生物質の抗菌力に影響を与えている培地成分について調べるため、最少培地に MH 培地の成分を添加して抗菌力を測定したところ、最少培地に塩基性アミノ酸を添加すると、PAO1 株に対する抗菌力が濃度依存的に低下することが明らかとなった。しかし、OprD 蛋白欠損変異株は影響を受けなかった。

[¹⁴C] PAPM を用いて、緑膿菌の PAPM 取り込み量に対する塩基性アミノ酸の影響について検討した。塩基性アミノ酸・(リジン) は PAO1 株の [¹⁴C] PAPM 取り込みを阻害したが、OprD 蛋白欠損株の取り込みには影響を与えなかった。PAPM や IPM は塩基性アミノ酸と構造が類似していることから、OprD 透過孔を介したこれらの薬剤の透過が塩基性アミノ酸によって競合的に阻害されると考えられた。

以上のことから、最少培地のような塩基性アミノ酸濃度が低い培地中では、カルバペネム系抗生物質は OprD 透過孔を介する透過が阻害されないので強い抗緑膿菌活性を示すと考えられた。

3. カルバペネム系抗生物質の *in vivo* 抗緑膿菌活性における OprD 透過孔の役割

ヒト血清のような体液は MH 培地のような感受性測定標準培地に比べて塩基性アミノ酸濃度が 1 / 40 以下と低いので, *in vivo* においてカルバペネム系抗生物質は最少培地中と同様に強い抗緑膿菌活性を示すと考えられた。そこで, 緑膿菌に対するカルバペネム系抗生物質の体液中の抗菌力および *in vivo* 抗菌活性について検討した。

非働化したヒトおよびマウス血清, マウス腹水を用いて, PAO1 株および OprD 蛋白欠損変異株に対する PAMP, IPM および CAZ の体液中の抗菌力を測定し, MH 培地中の抗菌力と比較した。PAO1 株に対するこれら体液中のカルバペネム系抗生物質の抗菌力は, MH 培地中よりも 4 から 32 倍強かった。また, 体液に塩基性アミノ酸を添加することにより, 抗菌力は減弱した。臨床分離株 12 株についても同様な検討を行なったところ, PAO1 株と同様であった。一方, OprD 蛋白欠損変異株では, 塩基性アミノ酸による抗菌力の変化は認められなかった。

緑膿菌によるマウス全身感染症に対する薬剤の治療効果と *in vitro* 抗菌力との関係について検討した結果, カルバペネム系抗生物質は他の β -ラクタム剤に比べて優れた治療効果を示し, その効果は MH 培地中の抗菌力よりもマウス血清中の抗菌力とよく相関した。

以上のことから, カルバペネム系抗生物質は *in vivo* においても最少培地中と同様に OprD 透過孔を介して外膜を透過し, 強い抗緑膿菌活性を示すと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 清水 悠紀臣
副査 教授 中里 幸和
副査 教授 藤田 正一
副査 教授 小沼 操

学位論文題名

Role of Outer Membrane Protein OprD in the Activities of Carbapenem
Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa

(緑膿菌に対するカルバペネム系抗生物質の抗菌活性におけるOprD外膜蛋白の役割)

緑膿菌の外膜透過孔は他のグラム陰性菌のそれに比べて薬剤が透過し難いため、有効な抗生物質が少ない。しかし、カルバペネム系抗生物質は、他の抗生物質に比べて抗菌力が強く、緑膿菌感染症に対しても治療効果がある。

本論文は新規カルバペネム系抗生物質 panipenem (P A P M) の抗緑膿菌活性の作用機構について検討し、次のような新しい知見を得た。

1. P A P Mは外膜蛋白であるOprDの透過孔を介して緑膿菌外膜を通過し、内膜上に存在するP B P 1 AとP B P 2に結合する。P B P 1 Aは細胞壁合成に、またP B P 2は菌の伸長開始に関与する酵素であることから、P A P Mが菌に作用すると球形化または溶菌し、それがP A P Mの抗菌作用であることを明らかにした。

2. P A P Mの緑膿菌に対する抗菌力は塩基性アミノ酸濃度の低い最少培地で測定したほうが、感受性測定標準培地である Mueller-Hinton 培地で測定するよりも強かった。¹⁴C標識P A P Mを用いて緑膿菌の取り込みに及ぼす塩基性アミノ酸の影響を調べたところ、同アミノ酸は、O p r D透過孔を介する透過を阻害することを明らかにした。

3. In vivoにおけるP A P Mの緑膿菌に対する抗菌機構を明らかにするため、血清と体液中での抗菌力を調べるとともにマウスの全身感染症に対する治療効果を調べた。その結果、P A P Mのマウスの全身感染症に対する治療効果は Mueller-Hinton 培地で測定した抗菌力よりもマウス血清中の抗菌力と相関し、作用機序は in vivo においても in vitroと同様であることが明らかになった。

以上、本論文では、新しく開発されたカルバペネム系抗生物質P A P Mの緑膿菌に対する抗菌機構を明らかにし、抗生物質の評価に新しい方向を与えた。よって著者は博士(獣医学)の学位を授与される資格があるものと認めた。