



薬剤耐性(AMR) シンポジウム

～AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線～

抄録集

日時 平成29年9月28日(木) 13:00－18:00

会場 日本橋ライフサイエンスハブ 会議室

主催 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

薬剤耐性(AMR)シンポジウム

～AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線～

目次

ページ

ご挨拶	1
プログラム	2

第一部:AMR対策にむけた研究開発を取り巻く環境:産学官からのメッセージ

座長紹介			3
AMR 対策の推進に向けて	福田 祐典	厚生労働省 健康局長	4
AMR 研究、世界の現状	舘田 一博	日本感染症学会 理事長	6
AMR 研究開発促進に関する提言	山口 栄一	日本製薬工業協会国際委員会 幹事	8
海外における AMR 創薬を取り巻く環境	諸岡 健雄	MSD 株式会社 執行役員	10
創薬促進にむけた PMDA の取り組み	佐藤 淳子	医薬品医療機器総合機構(PMDA)国際協力室長	12

第二部:AMED支援課題紹介

座長紹介	14	
薬剤耐性菌の疫学情報収集体制	柴山 恵吾 国立感染症研究所細菌第二部 部長	16
薬剤耐性菌対策に資する診断法・治療法の開発研究	20	
	柳原 克紀 長崎大学医歯薬総合研究科医療科学専攻 教授	
天然物創薬の可能性(微化研における AMR 克服に向けた取り組み)	24	
	五十嵐 雅之 微生物化学研究所 第2生物活性研究部 部長	
薬用植物ライブラリーを用いた多剤耐性菌に対する新規抗菌薬の探索	28	
	切替 照雄 順天堂大学医学部微生物学講座 教授	
北里微生物資源ライブラリーを基盤とした多剤耐性菌を克服する天然物創薬	32	
	砂塚 敏明 北里大学 北里生命科学研究所 創薬科学部門 教授	
新型多剤耐性菌克服のための新規阻害物質などの探索	36	
	荒川 宜親 名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻 教授	
グラム陰性菌の多剤排出システムと阻害機構	40	
	西野 邦彦 大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野 教授	
新規抗生物質ライソシンの開発	関水 和久 帝京大学医真菌研究センター 教授	44

第三部:新たな動きについて

座長紹介	48	
細菌の酸化ストレス耐性を標的とした新規治療戦略の開発	50	
澤 智裕 熊本大学 大学院生命科学研究部 教授		
薬剤耐性(AMR)菌感染症治療薬を目的とした創薬研究	52	
日高 淳 大日本住友製薬株式会社 創薬開発研究所 スペシャリティ医薬グループ グループマネージャー		
新規治療薬開発のためのモデル構築	石井 良和 東邦大学微生物・感染症学講座 教授	54
多剤耐性菌に対する臨床試験の課題	高橋 義三郎 Meiji Seika ファルマ臨床開発推進部 部長	56

■ ご挨拶



日本医療研究開発機構(AMED)

理事長 末松 誠

AMEDが平成27年度に設立されてから2年半が経ちました。医療研究開発を合理的に加速して、1分1秒でも早く患者の皆様成果を届けることをミッションとし、我々はこれを達成するために発足当初より4つのことを実行して参りました。研究費の効果的運用、若手育成枠の創設による医療研究開発の活性化、そして研究体制の国際化とデータシェアリングです。本シンポジウムのテーマである薬剤耐性(AMR)の分野においては、特に国際協力体制の強化とデータシェアリングが重要であることは論をまちません。

さて近年、薬剤耐性(AMR)の脅威が世界的に拡大している一方で、新規の抗菌薬の開発が停滞、このままでは抗菌薬開発における人材や貴重な研究リソースが枯渇するとの懸念も高まっています。

AMEDでは、平成28年4月に国が策定した「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」に基づき、抗菌薬研究開発をはじめとするAMR研究支援を推進しています。研究費の効果的運用や配分、若手育成に配慮しながら、薬剤耐性(AMR)に対する創薬研究開発を今後とも強力に支援してまいります。

本シンポジウムでは、抗菌薬研究開発課題を中心にAMEDが行うAMR分野の多様な研究支援をご紹介できることを嬉しく思います。創薬や医療機器の開発は、多くの専門家がそれぞれの専門性を活かして、たすきをつないでゴールを目指す、いわば駅伝のような仕事です。この機会が、政府、AMED、アカデミア、製薬業界にとって有益な産学官橋渡しの場、情報共有の場となることを願ってやみません。

ご参加くださった皆様、本シンポジウム開催に向けてご協力、ご尽力くださった皆様に、この場を借りて心より御礼申し上げます。

2017年9月

薬剤耐性(AMR)シンポジウム

～AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線～

■ プログラム

13:00 - 13:10 開会挨拶

末松 誠 日本医療研究開発機構(AMED) 理事長

第一部: AMR対策にむけた研究開発を取り巻く環境: 産学官からのメッセージ 座長: 平井 敬二 杏林製薬株式会社 相談役

13:10 - 13:25 AMR対策の推進に向けて

福田 祐典 厚生労働省 健康局長

13:25 - 13:40 AMR研究、世界の現状

舘田 一博 日本感染症学会 理事長

13:40 - 13:55 AMR研究開発促進に関する提言

山口 栄一 日本製薬工業協会国際委員会 幹事

13:55 - 14:10 海外におけるAMR創薬を取り巻く環境

諸岡 健雄 MSD株式会社 執行役員

14:10 - 14:20 創薬促進にむけたPMDAの取り組み

佐藤 淳子 医薬品医療機器総合機構(PMDA)
国際協力室長

14:20 - 14:35 休憩

第二部: AMED支援課題紹介 座長: 宮村 達男 日本医療研究開発機構(AMED)プログラムディレクター

14:35 - 14:45 AMED事業概要説明

宮村 達男 日本医療研究開発機構(AMED)
プログラムディレクター

基礎研究

14:45 - 15:00 薬剤耐性菌の疫学情報収集体制

柴山 恵吾 国立感染症研究所細菌第二部 部長

15:00 - 15:15 薬剤耐性菌対策に資する診断法・治療法の開発研究

柳原 克紀 長崎大学医歯薬総合研究科医療科学専攻 教授

創薬研究

15:15 - 15:30 天然物創薬の可能性(微化研におけるAMR克服に向けた取り組み)

五十嵐雅之 微生物化学研究所 第2生物活性研究部 部長

15:30 - 15:45 薬用植物ライブラリーを用いた多剤耐性菌に対する新規抗菌薬の探索

切替 照雄 順天堂大学医学部微生物学講座 教授

15:45 - 16:00 北里微生物資源ライブラリーを基盤とした多剤耐性菌を克服する天然物創薬

砂塚 敏明 北里大学 北里生命科学研究所
創薬科学部門 教授

16:00 - 16:15 新型多剤耐性菌克服のための新規阻害物質などの探索

荒川 宜親 名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻 教授

16:15 - 16:30 グラム陰性菌の多剤排出システムと阻害機構

西野 邦彦 大阪大学産業科学研究所
生体分子制御学研究分野 教授

16:30 - 16:45 新規抗生物質ライソシンの開発

関水 和久 帝京大学医真菌研究センター 教授

16:45 - 16:55 まとめ

宮村 達男 日本医療研究開発機構(AMED)
プログラムディレクター

16:55 - 17:15 休憩・ポスターセッション

第三部: 新たな動きについて 座長: 倉根 一郎 国立感染症研究所 所長

17:15 - 17:25 細菌の酸化ストレス耐性を標的とした新規治療戦略の開発

澤 智裕 熊本大学 大学院生命科学研究部 教授

17:25 - 17:35 薬剤耐性(AMR)菌感染症治療薬を目的とした創薬研究

日高 淳 大日本住友製薬株式会社 創薬開発研究所
スペシャリティ医薬グループ グループマネージャー

17:35 - 17:45 新規治療薬開発のためのモデル構築

石井 良和 東邦大学微生物・感染症学講座 教授

17:45 - 17:55 多剤耐性菌に対する臨床試験の課題

高橋義三郎 Meiji Seikaファルマ臨床開発推進部 部長

17:55 - 18:00 閉会挨拶

日本医療研究開発機構(AMED)

18:05 - 研究交流会

第一部

AMR対策にむけた研究開発を取り巻く 環境:産学官からのメッセージ

■ 座長紹介



杏林製薬株式会社 相談役

平井 敬二

1972年杏林製薬に入社し抗菌薬の研究に従事。1978年群馬大学・医・微生物(三橋研)に出向しキノロン薬の作用・耐性機構を研究。1981年から中央研究所でキノロン薬の研究開発に従事、1993年より本社で主に創薬研究企画を担当し、2002年に取締役・創薬研究本部長、その後常務執行役員(2005年)、専務執行役員(2007年)を経て、2009年に代表取締役社長に就任、2013年に相談役となり現在に至る。

20世紀に数多く開発された抗菌薬は感染症治療に大きな貢献をし、一時は細菌感染症を克服したかのようにも思われた。しかし21世紀に入って、これらの抗菌薬の使用量の増加により抗菌薬の効かない薬剤耐性(AMR)菌の出現と増加が大きな社会問題となって来た。薬剤耐性(AMR)菌に有効な新規抗菌薬の開発は世界的な喫緊の課題となっているが、近年多くの製薬企業がこの領域から撤退し抗菌薬の開発パイプラインは枯渇している。この原因として、抗菌薬開発の収益性の低さ、AMR治療薬の臨床試験の困難さ、創薬シーズ探索の難しさがあげられている。これらの課題に対してグローバルレベルで抗菌薬開発促進策(各種のインセンティブ)が動き始めている。本邦においても、2016年に作成されたAMR対策アクションプランに基づいた研究開発促進策が進められており、今後はAMR菌に有効な新規抗菌薬の開発が活発になることを大いに期待している。

AMR対策の推進に向けて

厚生労働省 健康局長
福田 祐典

薬剤耐性(AMR)は、早急に世界的な対策の必要な、国際社会における最も重要な課題のひとつである。英国のエコノミストであるジム・オニールによるレポートでは、このまま何も有効な対策をとらない場合、2050年には薬剤耐性菌による死亡者数は約1000万人にのぼり、現在のがん死亡者数を上回ると推計されている。2015年、WHOによる世界行動計画が採択された後、G7エルマウサミットやG7ベルリン保健大臣会合でもAMR対策は主要議題に取り上げられ、我が国でも昨年の4月、AMR対策を包括的かつ戦略的に進めるために、普及啓発・教育、動向調査・監視、感染予防・管理、抗微生物剤の適正使用、研究開発、国際協力6つの柱からなるアクションプランを策定した。このアクションプランでは日本が2020年までの5年間で実施すべき事項を取りまとめ、達成すべき薬剤耐性率と抗微生物剤の使用量に関する成果目標を設定したものである。

厚生労働省では具体的な施策として、診療現場における不適切な抗微生物剤の使用という課題に対して、「抗微生物薬適正使用等に関する作業部会」を設置し、現場の医療関係者が参考にすべき「抗微生物薬適正使用のための手引き」を策定、6月に公表した。国内において医療現場で使用される抗菌薬の9割以上が経口薬であり、広域抗菌薬の使用割合が高いことが調査で分かっており、この手引きでは、外来で診療に携わる医療従事者を対象として、患者数や不必要な処方の割合が多いとされている風邪と下痢症の適切な診療方法について解

説した。また、日本におけるヒトや動物に対する抗微生物剤の使用量や微生物の薬剤耐性率等の状況等を検討するため、「薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会」を開催し、有識者による議論を行い、現在は、薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書の作成を進めている。また、AMRに係る様々な情報を集約化し、医療関係者や自治体職員等に向けた情報提供や研修の提供等を行うため、4月に「AMR臨床リファレンスセンター」を新たに設立し普及啓発・教育を開始した。

これらの取組によるAMRの抑止だけでなく、今後も増加が予想される薬剤耐性感染症(ARI)の治療薬の研究開発を加速することも国際的な急務である。すでに世界中にARIが拡がりつつある一方で、我が国だけでなく、世界的にみても2000年前後より抗菌薬の開発は明らかに滞っている。1987年以降新規作用機序をもつ抗菌薬は発見されておらず、“discovery void”と呼ばれる状況が続いている。ARI未承認薬迅速実用化スキームや日米欧の薬事規制当局間の会合を通じた共通の臨床試験ガイドライン策定に向けた検討、官民パートナーシップであるGHIT(グローバルヘルス技術振興基金)を通じた薬剤耐性マラリアや多剤耐性結核感染症への効果が期待される新規医薬品開発への投資等、抗微生物剤の研究や開発に対する支援を継続していく必要がある。

日本は、アクションプランを取りまとめた後、昨年4月のアジアAMR 東京閣僚級会議、5月のG7伊勢志摩サミット、G7神戸保健大臣会合、そして国

連総会ハイレベル会合を含む一連の国際会議を通じて、AMR を世界的な優先課題として位置づけてきた。11月にはアジア諸国を中心とした担当者レベルの国際会合を開催予定であり、引き続き国際社会と密接に連携するとともに、AMR に対する国際的な取り組みの最前線を担い続ける所存である。



厚生労働省 健康局長

福田 祐典

長野県生まれ。昭和60年に筑波大学医学専門学群を卒業し、同年厚生労働省に入省。平成14年より宮崎県福祉保健部長、平成21年、厚生労働省社会・援護局障害福祉保健部精神・障害保険課長、平成27年、医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長、平成28年、大臣官房技術総括審議官を経て、平成29年7月より厚生労働省健康局長に着任。

AMR 研究、世界の現状

日本感染症学会 理事長
舘田 一博

1900年代前半のサルファ剤、ペニシリンの発見から20世紀の抗菌薬療法の歴史がスタートし、これまでにβラクタム剤、アミノグリコシド剤、マクロライド剤、キノロン剤など多くの薬剤の発見・合成を通して、我々は抗菌薬による多大な恩恵を享受してきました。今日、150を超える抗菌薬が開発され、化学療法学は医学・獣医学領域のみならず薬学、農学、水産学など広範な分野でなくてはならない学問の1つとなっています。しかし一方で、その応用範囲が広がり、使用量が増加する中で、人類はこれまでにない危機的局面に直面しています。耐性菌の出現とその蔓延の問題です。

近年の耐性菌問題の特徴として、(1)市中感染型耐性菌の出現、(2)動物・食品などを介した耐性菌の広がり、(3)新しい感染症治療薬の枯渇、が重要です。30年前には考えられなかった、元気な子供が市中感染型MRSAによる感染症を発症するという事例が散見されるようになりました。また、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生の大腸菌が健康な女性の膀胱炎の原因菌として分離される時代になっています。このような現象の背景として、耐性菌が市中で生まれ、家畜・ペット・食品を介して伝播するという事実が報告されています。耐性菌問題は病院内だけの問題ではなく、市中・環境・社会、そして地球規模で考えなければいけないグローバルな問題であることが明らかになっています。いわゆる“One Health”の概念ですが、ボーダーレス時代の中で、国境を越えて広がる耐性菌問題に関して世界が連携・協力して対応することの重要性が強調されています。CDCや

WHOの提言はその1例であり、さらに2015年の米国のNational Action Planにおいても耐性菌問題における国際協力体制の確立と強化の重要性が指摘されています。この点に関して本邦も、2013年および2015年のG8サミット(英国 北アイルランド、ドイツ シュロス エルマウ)におけるGサイエンス学術会議との共同声明において病原微生物の薬剤耐性菌問題を人類への脅威として提案し、これに対する対策が急務である旨が採択されました。また2014年には、日本化学療法学会が中心となり「新規抗菌薬の開発に向けた6学会提言」(“耐性菌の現状と抗菌薬開発の必要性を知っていただくために”)を発表しています。幸い、現時点において日本における耐性菌問題は欧米や他のアジア諸国と比較してそれほど深刻なものではないのかもしれませんが、しかし、世界規模で問題となっている耐性菌がいつ日本に持ち込まれるのか、将来蔓延するのか、私たちは細心の注意を払いながらこの問題と向き合っていかなければいけません。このような中で、2016年4月に関係閣僚会議から「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が発表されたことはご承知の通りです。日本は、これまでに感染症治療薬の開発の歴史において大きな功績を残してきました。セファゾリン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、メロペネム、ピペラシリン・タゾバクタムなどの世界標準薬の開発がその代表であり、近年、耐性菌に対する治療薬として注目されているコリスチンも1950年代に日本で見つかった抗菌薬です。しかし近年、そのような日本の企業でさえも新しい抗菌薬の開発を中止

せざるを得ない状況が存在します。その背景には、新しい標的分子探索の難しさ、莫大な開発費用、臨床試験問題、薬価などいろいろな問題が絡んでいます。ビジネスとして成り立ちにくい抗菌薬開発の問題です。このような中、欧米では「10 X 20」(2020年までに10の新しい抗菌薬を開発する)などの国家プロジェクトがスタートしています。GAIN法のような新規の感染症治療薬に対する市場独占期間の延長だけでなく、抗菌薬の開発を促進するpull型、push型の資金援助をはじめ、いくつもの戦略が動き出しています。耐性菌問題と新しい感染症治療薬の開発には、アカデミア、企業、行政の連携に加えて、世界的な視点での国家間での協調・協力が極めて重要になります。我々、感染症関連学会には上記提言に沿った継続した活動が求められています。近年、米国やヨーロッパ諸国、そしてWHOやCDCなどの国際機関が協調の動きを活発化させています。これまでに培ってきた本邦における耐性菌・院内感染対策の経験、そして多くの世界標準治療薬を生み出してきた創薬の歴史・知識・経験・リソースをどのように生かしていくのか、その責任はさらに大きくなっていると考えておかねばいけません。



日本感染症学会 理事長

舘田 一博

1985年に長崎大学医学部を卒業。同第二内科で臨床研修ののち、臨床検査医学で医学博士を取得。1990年より東邦大学医学部微生物学教室に移動。1999年10月～2001年3月までミシガン大学呼吸器内科に留学。2011年から東邦大学医学部微生物・感染症学講座の教授および同大森医療センター感染管理部部長。2013年から日本化学療法学会創薬促進検討委員会委員長。2017年4月から一般社団法人日本感染症学会理事長。

薬剤耐性(AMR)対策の研究開発促進策に関する提言

日本製薬工業協会 国際委員会 幹事
山口 栄一

＜講演要旨＞

製薬協は、2016年1月、「世界80億人に革新的な医薬品を届ける」との「製薬協産業ビジョン2025」を発表した。しかし、世界的に製薬産業における薬剤耐性(AMR)対策の研究開発・事業化は、その市場性や予見性が低いことから縮小する傾向にある。それ故に、官民の協力体制と総合的な支援の枠組み構築が欠かせない。そこで今年4月に、製薬協は、下記の「薬剤耐性(AMR)対策のための医薬品等研究開発促進策に関する提言」を厚生労働省に提出した。

＜研究開発の推進＞

○官民パートナーシップ(PPP)によるAMRに特化した基金および研究開発機構(コンソーシアム)の設立

＜薬事承認の迅速化＞

○新規AMR感染症治療薬等の臨床開発促進のための国際共通臨床評価ガイドラインの策定等

＜採算予見性の確保＞

- 新規AMR感染症治療薬等の備蓄・買取制度
- 製造販売承認取得報奨制度(Market Entry Reward)
- 薬剤プロファイルに基づく薬価事前審査制度

これらの内から単一の施策のみを実施するのではなく、総合的な施策の実施が肝要である。尚、本提言は概要のみであり、より実効性を伴う内容に仕上げていくには、密な官民対話が必要と考える。

2019年、日本は、G20ホスト国となることから、薬剤耐性(AMR)対策 アクションプラン(平成28年4月5日、国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議)の「6. 国際協力」の観点からも提言する。



海外におけるAMR創薬を取り巻く環境

MSD 株式会社 執行役員 医薬政策部門統括兼社長室長
諸岡 健雄

AMRに対抗するための世界規模での取り組みが喫緊の課題となっている。AMR対策においては、耐性菌の増加、伝播、拡散の防止、そして耐性菌に有効な新規治療薬の開発が極めて重要である。1960年代以降次々と開発された優れた抗微生物薬のおかげで、先進国における主な死因が感染症から非感染症性疾患へと変化を遂げた。しかし、それに伴い製薬企業の注力領域も次第に非感染性疾患領域へと移行し、1980年代以降新たな抗微生物薬の開発は減少し続けている。さらに、新たな抗微生物薬発見の難しさ、臨床試験の煩雑さと高い費用、そして経済的収益性の低さなどの理由から、感染症領域から完全撤退する製薬企業も後を絶たないのが現状である。世界中のコミュニティがこの現状を知り、公衆衛生だけでなく経済成長へも影響を及ぼすAMRの脅威が拡大していることを認識し、すぐに行動を起こすことが必要である。

製薬企業が、AMR対策のために抗微生物薬の研究開発に持続的な投資を行うためには、この領域が抱える経済的な課題を克服しなければならない。その為には、製薬企業の採算予見性および動機づけを高めるための、新たなインセンティブ制度等の仕組みの導入が不可欠である。欧米諸国では、新しいAMR治療薬等に対するインセンティブ制度導入に向けて多くの議論が始まっている。現在検討されているインセンティブ案を大きく2つに分けると、承認前の研究開発段階に対するPush型と、承認後に企業が収益性を確保するためのPull型に分けられる。Push型の代表的なものとしては、基金等によ

る創薬段階での資金提供(Funding for New Antibiotic Development)、臨床試験・薬事承認要件の簡素化(Regulatory Progress)、そして研究開発に対する税控除(R&D Tax Credits)などがある。抗微生物薬研究に資金提供を行っている団体や基金としては、BARDA、NIH、IMI、GHITなどが知られている。臨床試験・薬事承認要件の簡素化やハーモナイゼーションに向けては、昨年よりPMDA、FDA、EMAの3者間で検討が始まっており、その成果が期待される。また税控除制度の例としては、今年3月に米国で導入が決まったREADI ACTがあり、認定された薬剤の臨床試験費用の50%の税控除が受けられるというものである。

Pull型の代表的なものとしては、AMR治療薬に対する保険償還制度の一部変更(Reimbursement Reform)、他製品への適用が可能な市場独占期間延長(Transferable Exclusivity)、新規AMR治療薬の開発・承認に対する報奨金(Market Entry Reward)などがある。海外には、新規AMR治療薬へのアクセスが制限される可能性がある保険償還制度を導入しているケースがあり、そのようなことが起こらないように制度変更の検討が始まっている。Transferable Exclusivityは、企業によっては非常に効果的なインセンティブであり米国で検討が始まっているが、そのスキームや条件が非常に複雑であるため、導入までにはかなりの議論を要すると言われている。Market Entry Rewardは、AMRという重大課題に取り組んだ企業努力に報いるインセンティブであり、承認という研究開発の最終段

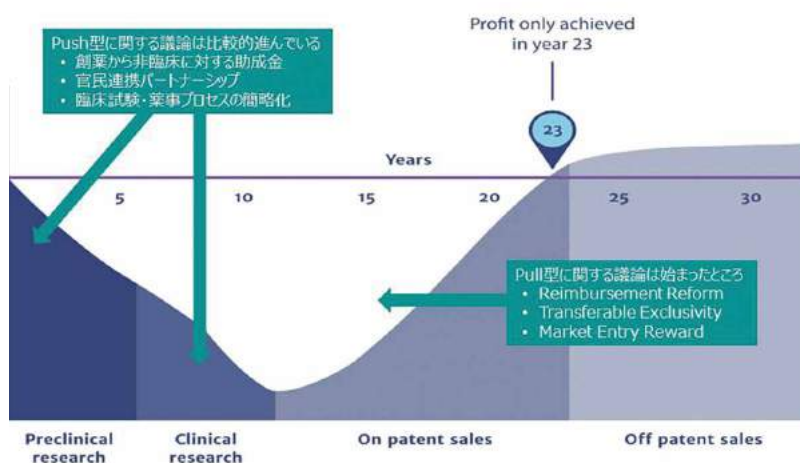
階で受けられるという点ではPush型とも言える。米国で検討が始まっており、スキーム自体は非常にシンプルであるため、現在最も注目されているインセンティブ案である。

このように欧米を中心に世界中で新規AMR治療薬に対するインセンティブの議論が始まっているが、There is no "one size fits all" solution.とも言われており、新規AMR治療薬の研究開発の課題を解決し再び活性化させるためには、製品のライフサイクルに合わせてPush型とPull型を組み合わせること、国や地域毎の医療保険制度、課題、優先度等にフィットさせること、資金が予測可能かつ

持続可能であること、そして新規AMR治療薬の社会的価値が正しく反映されたインセンティブが導入されることが必要である。

直近の製薬企業周りの動きとしては、2016年1月のAMRダボス宣言および同9月策定のロードマップを受けて、今年6月に、製薬企業、診断薬企業、後発品企業、バイオテック企業、業界団体によるAMR Industry Alliance が設立されている。10月には2日間の会議が開催予定で、各国政府関係者、アカデミア、基金等のステークホルダーを巻き込み、AMR対策に対する更なる議論が進められることとなっている。

抗菌薬のライフサイクルにおける経済的課題



出典 'Review on Antimicrobial Resistance' https://amr-review.org/sites/default/files/ENPV-1_0.png



MSD 株式会社 執行役員 医薬政策部門統括兼社長室長 諸岡 健雄

京都大学医学部附属病院形成外科、厚生労働省、WHO(スイス・ジュネーブ)、国際医療福祉大学、コヴィディエン・ジャパン株式会社等、国内外の民間企業および公的機関にて要職を歴任し、2015年7月より現職。2015年9月より公益財団法人MSD生命科学財団代表理事。京都大学医学部卒、米国ハーバード公衆衛生大学院修了。医師。

創薬促進にむけたPMDAの取り組み

医薬品医療機器総合機構〔PMDA〕 国際協力室長
佐藤 淳子

近年、医薬品開発の主流は、慢性疾患や抗がん剤、生物学的製剤等、収益性の高い製品へとシフトしており、抗菌薬の開発は著しく低迷している状況にある。このような状況は、日本のみならず、欧米にも共通であり、欧米では政府や学会、産業界等が一丸となり、医療ニーズの高い抗菌薬の開発促進に向け、経済的サポートを含む包括的な対策が取られてきている。その結果、抗菌薬開発が上向きになってきているとの発言も聞かれるようになったが、いまだ問題解決には程遠い。

様々な系統の様々な抗菌薬が入手可能な状況にはあるが、耐性菌治療薬に代表されるように有効な治療薬が入手困難な疾患も未だ存在していることに加え、新たな耐性菌も続々と登場する状況にあり、これらの耐性菌感染症にどのように戦っていくかが感染症治療領域における課題となっている。

耐性菌感染症を対象とする抗菌薬開発の場合、投与対象となる患者数が限られていること、散発性の急性疾患であり十分な症例登録が困難であること等の理由から、検証的試験の実施や、予め契約を結んだ医療機関にて症例を収集することが困難である等、様々な問題が山積しており、これらの問題を如何に解決するかが大きな課題である。国際共同治験の活用は一つの有用なツールとして考えられるが、現状においては、EMA、FDA、PMDAの要求するデータパッケージが異なり、開発に難渋しているとの声も多い。これらの声に対応するため、2016年よりEMA-FDA-PMDAの3規制当局が協働し、抗菌薬承認審査にかかる規制要件の調和活動に努めており、

会議の開催毎にその概要を公表している。本講演ではこの議論の概要など、抗菌薬領域の創薬促進にむけたPMDAの取り組みについて紹介したい。



平成10年に国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター（現PMDA）に入職、感染症治療薬の治験相談・承認審査（11年）、安全部門（3年）、国際部門（5年）を歴任。この間、米国FDA及びEMAに駐在した経験を活かし、現在はFDA/EMA/PMDAの3者による抗菌薬臨床評価調和活動をリード。国立病院機構東京医療センターや東邦大学医療センター大橋病院で13年に渡る院内感染対策チームとして抗菌薬適正使用やコンサルテーションの経験を有する。

第二部 AMED支援課題紹介

■ 座長紹介



日本医療研究開発機構(AMED)プログラムディレクター

宮村 達男

1970年、新潟大学医学部卒業後、即国立予防衛生研究所(現感染研)入所。途中米国NIH留学、Chiron社勤務後、主任研究官、肝炎ウイルス室長、ウイルス二部部長を経て、2006～2010年まで感染研所長を務めた。

C型肝炎ウイルスの研究で、小島三郎賞、野口英世医学賞など受賞。瑞宝重光章受章。また厚生科学審議会やWHOの肝炎、ポリオの専門部会等の委員を歴任した。2015年のAMED設立以来、感染症実用化研究事業のPDを務めている。

病原体は個として絶えずその種の存続をかけて変異を繰り返し、変貌する環境に適合した集団が生き残ってゆく。病原体と人間のせめぎあいという永遠の課題において今やこのAMR問題は後へ引けない真っ向勝負の時期が来ている。

1980年新潟で開かれた第53回日本細菌学会総会において特別シンポジウム<薬剤耐性機構の生化学>(座長:三橋進教授)が企画された。新しい化学療法剤の発見のスピードが著しく低下していること、その一方で多剤耐性菌が高頻度に蔓延していることが当時から既に深刻な問題として認識されていた。そして(i) 既知薬剤を修飾して耐性菌を再び有効にするには耐性機序を知らなければならない、(ii) 耐性プラスミドの発見とともに耐性機序の研究は我が国において著しく進んだ領域である。という見地から産学の共同研究による各種化学療法剤の耐性機構に関する最先端の開発研究状況がまとめられている。

それから世紀を超えてこの問題は一層深刻、重大となってきた。不適切な抗菌薬の過剰な使用がAMRの出現を助長し、対応を複雑化してきた。また新たな抗菌薬の開発、実用化には安全性の確認に膨大なエネルギーと費用がかかることもあり停滞している。

しかし我々は今や変貌する病原体集団の時間的、空間的実態を把握し、そのゲノムレベルで解析する有効な手段を有し、そのデータベースを国際的に共有、活用することができるようになった。全く新しい手法による耐性菌の早期検出法の開発が期待される領域である。また種々の特徴あるライブラリーから根拠を持った探索系を創出することができる。AMR対策の研究は多領域(医学、獣医学、薬学、生化学、疫学等)を網羅した総合科学であり、産、官、学の協力、国際協力の不可欠な領域である。優れてAMEDの趣旨に合致した緊急性の高い研究領域である。

AMEDにおけるAMR研究開発支援



AMEDでは、感染症実用化研究事業、感染症研究国際展開戦略プログラム、創薬基盤推進研究事業、創薬総合支援事業等を通して、耐性菌感染症対策に資する研究や耐性菌に対する診断法や治療法の開発を総合的に支援しています。

本シンポジウム第二部では、感染症実用化研究事業で支援する薬剤耐性菌に関する疫学研究、創薬研究、診断・治療法開発の研究課題から4課題、創薬基盤推進研究事業、創薬総合支援事業、感染症研究国際展開戦略プログラムの各事業からは、薬剤耐性微生物に対する革新的医薬品の創出を目指す研究課題を中心に4課題、計8課題の研究者より研究内容を紹介いただきます。

薬剤耐性菌の疫学情報収集体制

国立感染症研究所細菌第二部 部長
柴山 恵吾

近年、薬剤耐性菌は国境を越えて拡散し、世界的な問題になっている。菌種や薬剤によっては、耐性菌の割合が数年で大きく増加しているものもある。日本では2016年に国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議が国の薬剤耐性(AMR)対策アクションプランを策定した。アクションプランで今後取り組むべきとされた課題に、薬剤耐性菌の動向調査の強化と国際協力がある。国立感染症研究所では薬剤耐性に関する国のサーベイランスとして厚生労働省院内感染対策サーベイランスを実施し、国内およそ1,900の病院からデータを収集、集計して薬剤耐性に関する情報を公開している< <https://janis.mhlw.go.jp>>。この情報やその他国内外の情報をもとに、我々は特に注意が必要な薬剤耐性菌については国内の医療機関から実際に菌株を収集し、耐性遺伝子や遺伝子型別等を解析した。海外については、感染研独自に協力関係を構築したカンボジア、ベトナム、モンゴルの研究機関、ならびにJ-GRIDとの連携でタイ・マヒドン大学附属病院、中国北京大学などと共同で耐性菌株の収集、解析を行い、またJANISシステムの導入や情報交換体制の構築を進めた。WHOは2015年に薬剤耐性に関するサーベイランスGlobal Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)を立ち上げ、各国にデータの提出を求めている。日本からは国立感染症研究所が中心となって必要なデータを集計し提出した。

近年、世界ではカルバペネム耐性のアシネトバクター属菌や腸内細菌科細菌など、臨床において治

療が困難となる薬剤耐性菌が拡散している。アシネトバクター属菌のカルバペネム耐性の割合は中国では59%、米国では63%がカルバペネムを含む多剤耐性と報告されているが、日本ではカルバペネム耐性はイミペネムで3.2%であり、多剤耐性は1%未満である。腸内細菌科細菌の一つである*Klebsiella pneumoniae*のカルバペネム耐性は中国では7.6%、米国では10%以上と報告されているが、日本においては1%未満と少ない。このように日本で薬剤耐性が少ない背景を調べるため、耐性菌株を収集し、耐性遺伝子の同定と遺伝子型別を行なった。国内の医療機関からアシネトバクター属菌866株を収集して菌種の同定及び型別を調べたところ、大半が*Acinetobacter baumannii*だったが、うち世界的な流行タイプのST2は3割程度だった。そのうちメロペネム耐性は5%だった。海外と比較して日本ではカルバペネムに感性のST2株が多いことが明らかになった。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)は、カルバペネマーゼ産生菌(CPE)と非産生菌に大別されるが、特にCPEが臨床的・疫学的に注意が必要である。国内78医療機関で分離されたCRE100株を用いて、CPEの割合など分子疫学を調べた。カルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌(CPE)は*Enterobacter cloacae*が最も多く、次いで*Klebsiella pneumoniae*、大腸菌などだった。カルバペネマーゼ遺伝子は全て*bla_{IMP}*であり、海外で多い*bla_{NDM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{OXA-48-like}*は検出されなかった。なお、西日本地域では通常の薬剤感受性試験で見逃されやすい*bla_{IMP-6}*を有する菌株が主に分

離された。このように日本においては多剤耐性アシネトバクターのST2や腸内細菌科細菌の*bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA-48-like}など拡散しやすい遺伝子型、耐性遺伝子が現在のところは諸外国と比べて少ないことがわかった。今後輸入例を発端に海外で蔓延している耐性菌が国内で拡散する可能性が十分あるので注意が必要である。

海外については、J-GRID 大阪大学タイ拠点、ならびに感染研独自に共同研究を行なっているベトナム軍医大学、カンボジア National Institute of Public Health(NIPH)とで薬剤耐性菌の収集解析を行い、またモンゴル医科大学とJ-GRID 神戸大学インドネシア拠点と薬剤耐性サーベイランス JANIS の導入を進めた。タイ、ベトナム、カンボジアでは、途上国に多いとされる*bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA-48-like}が多く検出され、プラスミドを介して拡散していることがわかった。なお、カンボジア NIPH では、携帯型の実験機器とシークエンサーを現地に持ち込んでカルバペネム耐性菌株の解析を行う系を確立した。中国では、薬剤耐性に関する国のサーベイランスとして China Antimicrobial Resistance Surveillance System (CARSS) が実施されているが、サーベイランスを実施している北京大学と情報交換体制を構築した。

薬剤耐性サーベイランスの海外展開については、

インドネシア、ベトナム、モンゴルなどの厚生省、ならびに WHO システム開発者と協議をすすめつつ、日本のシステムを海外医療機関のデータ集計ができるようにプログラムを作成した。これまでに、モンゴル医科大学から薬剤感受性試験のデータを試験送信してもらい、JANIS システムで集計解析を行った。今後モンゴルでは5病院に対象を拡大し、入院外来別の集計レポートを作成する予定である。

WHO が進めているサーベイランス GLASS については、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出、集計し提出した。GLASS は通常は集計していない検体ごとのデータや外来検体の集計を求めているため、別途に集計プログラムを作成した。薬剤耐性の割合は検体ごと、また入院と外来で有意な差があることが分かった。

AMR 関連論文

- 1) Tran DN, Tran HH, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Pham TD, Van Phuong TT, Dang DA, Trinh HS, Loan CT, Nga LTV, van Doorn HR, Wertheim HFL. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase 1 and other carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex among patients in hospitals in Ha Noi, Viet Nam. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 2017 Feb, 36(2):219-225.
- 2) Suzuki M, Shibayama K, Yahara K. A genome-wide association study identifies a horizontally-transferred bacterial surface adhesin gene associated with antimicrobial resistant strains. *Sci Rep*. 2016 6:37811.
- 3) Hayashi M, Kawamura K, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. *J Hosp Infect*. 2017 Mar, 95(3):318-323.
- 4) Tran HH, Ehsani S, Shibayama K, Matsui M, Suzuki S, Nguyen MB, Tran DN, Tran VP, Tran DL, Nguyen HT, Dang DA, Trinh HS, Nguyen TH, Wertheim HF. Common isolation of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jun;34(6):1247-54.
- 5) Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Suzuki M, Konda T, Arakawa Y, Shibayama K. Distribution of carbapenem resistance determinants among epidemic and non-epidemic types of *Acinetobacter* species in Japan. *J Med Microbiol*. 2014 Jun;63(Pt 6):870-7.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究

AMED 事業名

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

研究班構成

代表機関：国立感染症研究所

分担機関：名古屋大学、国立国際医療研究センター、広島大学、群馬大学、富山県衛生研究所、愛媛県衛生環境研究所、東邦大学、東海大学（順不同）

研究開発課題の内容

この研究班では国内外の協力医療機関や研究機関、ならびに J-GRID のアジア拠点と連携して薬剤耐性菌を収集し、耐性遺伝子の分子疫学解析、耐性メカニズムの解明や薬剤耐性菌の迅速検出法の開発を進めた。また薬剤耐性サーベイランス JANIS の改良や海外展開、薬剤感受性試験の精度管理手法開発、抗菌薬販売量の解析を進めた。

代表者柴山は、国内については協力医療機関からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌株を収集し、分子疫学解析を実施した。日本ではカルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌 (CPE) は *Enterobacter cloacae* が最も多く、次いで *Klebsiella*

pneumoniae、大腸菌などだった。カルバペネマーゼ遺伝子は全て *bla_{IMP}* だったが、地域により亜型が異なった。海外で多い *bla_{NDM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{OXA-48-like}* は検出されなかった。海外については、ベトナム・ハノイで臨床分離された CPE 株を解析し、*bla_{NDM-1}*、*bla_{KPC}* などのカルバペネマーゼ遺伝子が伝達性プラスミドに媒介され、院内もしくは市中で拡散している可能性が示唆された。大阪大学 J-GRID タイ拠点との共同研究では *K. pneumoniae* 株の完全ゲノム配列を解析し、一部の耐性遺伝子がプラスミドを介してアジア地域に拡散していることがわかった。JANIS の海外展開については、インドネシア、ベトナム、モンゴルなどの厚生省、ならびに WHO システム開発者と協議しつつ、JANIS で海外医療機関のデータ集計ができるプログラムを作成した。抗菌薬販売量解析では、日本では経口薬ではマクロライドが、注射薬では β ラクタム薬の販売量が多いことを明らかにした。経口マクロライドの使用量が多いことは、日本においてマクロライド耐性が多いことと関連すると考えられる。精度管理については臨床微生物学会精度管理委員会と連携し、病院検査室に菌株を送付して薬剤感受性試験を実施してもらい、結果を集計するプログラムを開発した。



国立感染症研究所細菌第二部 部長

柴山 恵吾

名古屋大学医学部卒業、同細菌学大学院博士課程、助手を経て、平成11年より国立感染症研究所勤務。平成23年より同細菌第二部部長。AMED の支援で薬剤耐性に関する研究班ならびに日米急性呼吸器感染症部会研究班の代表研究者として、また J-GRID 研究班等の分担研究者として国内およびアジア地域の薬剤耐性研究を進めている。その他医薬品等規制調和・評価研究事業で抗生物質標準品の品質評価に関する研究を進めている。

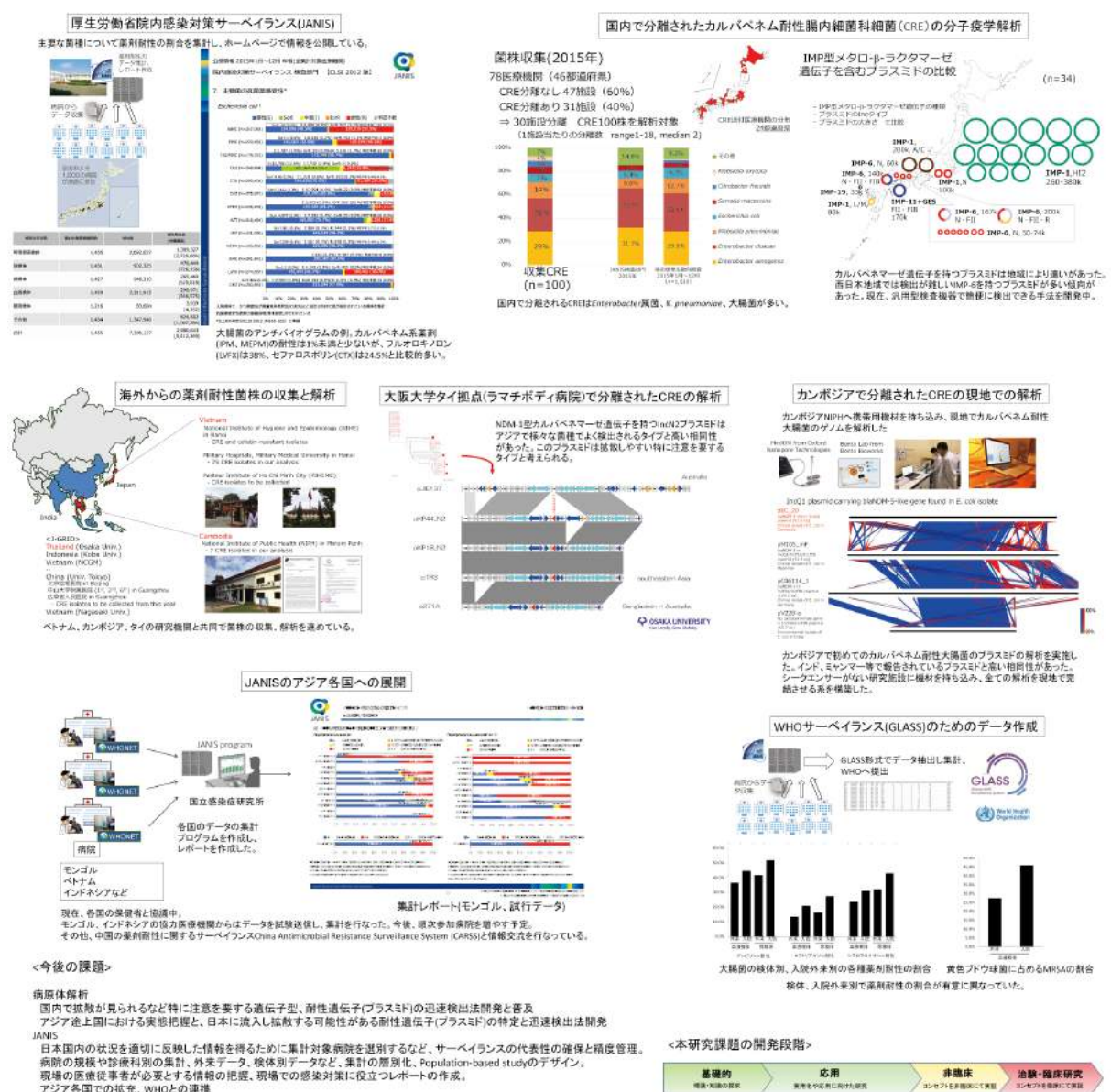
Poster

1 薬剤耐性(AMR)シンポジウム ~AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線~

薬剤耐性菌の疫学情報収集体制

柴山恵吾 国立感染症研究所細菌第二部

国立感染症研究所では薬剤耐性に関する国のサーベイランスとして厚生労働省院内感染対策サーベイランスを実施し、国内およそ1,900の病院からデータを収集、集計して薬剤耐性に関する情報を公開している<https://janis.mhlw.go.jp>。この情報やその他国内外の情報をもとに、我々は特に注意が必要な薬剤耐性菌については国内の医療機関から実際に菌株を収集し、耐性遺伝子や遺伝子型等を解析した。海外については、感染研独自に協力関係を構築したカンボジア、ベトナム、モンゴルの研究機関、ならびにJ-GRIDとの連携でタイ・マヒドン大学附属病院、中国北京大学などと共同で耐性菌株の収集、解析を行い、またJANISシステムの導入や情報交換体制の構築を進めた。WHOは2015年に薬剤耐性に関するサーベイランス Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)を立ち上げ、各国にデータの提出を求めている。日本からは国立感染症研究所が中心となって必要なデータを集計し提出した。



発表論文
Yuan DH, Tran HK, Matsui M, Suzuki M, Shibayama K, Pham TB, Van Phuong TT, Dong DA, Trinh HS, Scott JC, Ng LPH, van Doornum WJ, Wertheimer HFL. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 and other carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii complex among patients in hospitals in Hanoi, Viet Nam. Eur J Microbiol Infect Dis. 2017 Feb; 36(2):210-225.
Tran HN, Thuan S, Shibayama K, Matsui M, Suzuki S, Nguyen MB, Tran DM, Tran VP, Tran DL, Nguyen HT, Dang DA, Trinh HS, Nguyen TH, Wertheimer HFL. Common isolation of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Acinetobacter baumannii in a large surgical hospital in Vietnam. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Jun; 34(6):1247-54.
Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Suzuki M, Konda T, Asakawa K, Shibayama K. Distribution of carbapenem resistance determinants among epidemic and non-epidemic types of Acinetobacter species in Japan. J Med Microbiol. 2014 Jun; 59(Pt 6):870-7.

薬剤耐性菌対策に資する診断法・治療法の開発研究

長崎大学医歯薬総合研究科医療科学専攻 教授
柳原 克紀

抗菌薬の不適切な使用等を背景として、従来問題となっていたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に加え、薬剤耐性緑膿菌(MDRP)や薬剤耐性アシネトバクター(MDRA)といった治療抵抗性の細菌による感染症が増加傾向にある。また、近年、体内に定着しやすい腸内細菌科細菌の多剤耐性や高度耐性化も問題となっている。一方で、抗菌薬の開発が減少傾向にあるため、薬剤耐性菌は世界的な問題としてWHOやG7先進国首脳会議でも取り上げられるようになった。2016年4月には、我が国でも国家行動計画として薬剤耐性(AMR)対策アクションプランが提案され、AMRに関する啓発・教育、適正使用、早期診断方法の開発などの応用的研究と併せて、長期的な展望に基づく基礎研究の重要性が示されている。

代表者は、日本環境感染学会を母体とする多剤耐性菌感染制御委員会の委員長として、多剤耐性グラム陰性桿菌に関するポジションペーパーの策定を手掛けるとともに、厚生労働科学研究費補助金の政策研究班である「医療機関等における薬剤耐性菌の感染制御に関する研究班(耐性菌研究班)」の代表を務め、耐性菌に関する国内外の情報を把握している。また、分担者の掛屋、鶴田、金子が所属する大阪市立大学は、2016年4月に感染症科学研究センターを発足させ、耐性菌の診断・治療の開発に取り組むとともに、国立感染症研究所の鈴木と共同で、耐性菌の全ゲノム解析による分子疫学を精力的に推進し、世界初の耐性菌も報告してきた。さらに、海洋研究開発機構とも共同研究を実施し、同機構に所属していた坪内らが有する海洋微生物を利用して、抗

MRSA薬のシード化合物となりうる抗菌化合物を取得してきた。このように耐性菌領域で実績のある研究者が結集し、それぞれの資源を最大限に活用し、診断から治療までをカバーする総合的で実現性の高い耐性菌対策を提案する。

診断系として、質量分析およびシーケンスによる迅速薬剤耐性因子の検出と、POT法の医療関連対策における効果を検討する。質量分析による迅速耐性因子検出法の開発では、基質の分解活性を質量分析により測定することで、耐性腸内細菌科細菌等が産生する基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)やメタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)といった耐性因子を迅速に検出する診断法を開発する。ナノポアシーケンスによる迅速耐性遺伝子検出法の開発では、携帯型の第3世代シーケンサーであるナノポアシーケンサーを用いて、カルバペネム耐性グラム陰性菌などの菌種、薬剤耐性遺伝子、伝達性の可能性の有無を迅速に検出する革新的遺伝子検査法を開発する。質量分析・遺伝子解析技術を応用した革新的検査法の開発によって、耐性菌を早期に検出することが可能となり、迅速な耐性菌対策に貢献する。POT法を用いた医療関連感染対策の検討では、MRSAの院内伝播の減少に寄与したPOT(PCR based Open Reading Frame Typing)法を、緑膿菌・アシネトバクター、耐性大腸菌にも応用し、院内感染対策における貢献度・医療経済的効果を検証する。MRSA対策で実績のあるPOT法を他の耐性菌にも応用することで、院内感染対策における貢献度や医療経済的効果が明らかとなることが期待される。

治療系として、光線力学療法の実用、深海微生物由来の抗菌薬シードの開発と、耐性菌ライブラリー構築による開発支援を行う。薬剤耐性菌に対する光線力学療法については、MRSA および多剤耐性緑膿菌(MDRP)に感染した皮膚潰瘍に対する光線力学療法(PDT)の有効性を、マウスを用いた動物モデルで評価する。深海微生物由来の抗菌化合物の同定については、既に取得している抗MRSA 活性物質の詳細構造の解明と生合成関連酵素遺伝子群の特定、大量生産系の構築により安定供給化を目指すとともに、MDRP 等の耐性菌に対する候補化合物の取得を行う。光線力学療法の実用と深海微生物由来の新規抗菌化合物の探索により、薬剤耐性菌に対する新たな治療法の提案が可能になることが期待される。また、耐性菌ライブラリー構築と有効性評価では、臨床分離耐性株、自然発生耐性変異株、トランスポゾンミュータゲネシスによる変異株、遺伝子破壊による変異株等をライブラリー化して、光線力学療

法の作用機構の解明や応用、深海微生物由来の新規化合物の効能評価に用いる等、治療法開発を支援する。耐性菌ライブラリーを用いた基礎解析を同時に進めることで革新的な技術開発にも寄与する。

以上のように、診断法と治療法の実用により、薬剤耐性菌の早期検出・蔓延抑制等の攻略が可能となり、効率的・効果的な薬剤耐性菌対策に資することが期待される。

代表者は、関連学会が母体となる多剤耐性菌感染制御委員会の委員長であり、また、厚生労働省の耐性菌研究班の代表でもあることから、委員会及び研究班との円滑な連携により、国家的取り組みへの貢献度も大きい。さらに、関連学会主導で実績やリソースを有する大学や国の研究機関等の英知を結集することで実現可能性が大幅に向上し、複数のアプローチを用いて診断から治療までカバーすることで、総合的な耐性菌対策となりうる。



図 研究の概要

診断系では、質量分析およびシーケンスによる迅速薬剤耐性因子の検出と、POT法の医療関連対策における効果を検討する。治療系では、光線力学療法の実用、深海微生物由来の抗菌薬シードの開発と、耐性菌ライブラリー構築による開発支援を行う。

AMR 関連論文

- 1 Kosai K, Yanagihara K et al. Risk Factors for Acquisition of Fluoroquinolone or Aminoglycoside Resistance in Addition to Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Open Microbiol J. 2017 May 31;11:92-97.
- 2 Yanagihara K et al. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2012: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility. J Infect Chemother. 2017 Sep;23(9):587-597.
- 3 Kaku N, Yanagihara K et al. Efficacy and pharmacokinetics of ME1100, a novel optimized formulation of arbekacin for inhalation, compared to amikacin in a murine model of ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, in press, 2016.
- 4 Uno N, Yanagihara K et al. Clinical application of a ligation-independent pathway of multiplex ligation-dependent probe amplification for the determination of quinolone susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. J Microbiol Methods. 128:13-5, 2016.
- 5 Kaku N, Yanagihara K et al. Antimicrobial and immunomodulatory effects of tedizolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model of hematogenous pulmonary infection. Int J Med Microbiol. 306(6):421-8, 2016.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

薬剤耐性菌対策に資する診断法・治療法等の開発研究

AMED 事業名

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

研究班構成

代表機関：長崎大学

分担機関：国立感染症研究所、大阪市立大学（順不同）

研究開発課題の内容

本研究では、耐性菌領域で実績のある研究者が結集し、それぞれの資源を最大限に活用し、以下の通り、診断から治療までをカバーする総合的で実現性の高い耐性菌対策を提案する。

＜1＞質量分析による迅速耐性因子検出法の開発
基質の分解活性を質量分析により測定することで、耐性腸内細菌科細菌等が産生する基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) やメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) といった耐性因子を迅速に検出する診断法を開発する。

＜2＞ナノポアシーケンスによる迅速耐性遺伝子検出法の開発

携帯型の第3世代シーケンサーであるナノポアシー

クエンサーを用いて、カルバペネム耐性グラム陰性菌などの菌種、薬剤耐性遺伝子、伝達性の可能性の有無を迅速に検出する革新的遺伝子検査法を開発する。

＜3＞ POT 法を用いた医療関連感染対策の検討
MRSA の院内伝播の減少に寄与した POT (PCR based Open Reading Frame Typing) 法を、緑膿菌・アシネトバクター、耐性大腸菌にも応用し、院内感染対策における貢献度・医療経済的効果を検証する。

＜4＞ 薬剤耐性菌に対する光線力学療法
MRSA および多剤耐性緑膿菌 (MDRP) に感染した皮膚潰瘍に対する光線力学療法 (PDT) の有効性をマウスを用いた動物モデルで評価する。耐性菌ライブラリーを用いて PDT の作用機構解析と効率化を目指す。

＜5＞ 深海微生物由来の抗菌化合物の同定
抗 MRSA 活性物質については、詳細構造の解明と生合成関連酵素遺伝子群の特定、大量生産系の構築により安定供給化を目指す。また、MDRP 等の耐性菌を標的として、年間 200 株程度の抗菌物質候補生産株を分離する。

＜6＞ 耐性菌ライブラリー構築と有効性評価
臨床分離耐性株、自然発生耐性変異株、トランスポゾンミュータゲネシスによる変異株、遺伝子破壊による変異株等をライブラリー化して、光線力学療法の作用機構の解明や応用、深海微生物由来の新規化合物の効能評価に用いる等、治療法開発を支援する。



長崎大学医歯薬総合研究科医療科学専攻 教授

柳原 克紀

1991年に長崎大学医学部を卒業後、長崎大学医学部附属病院第二内科で研修を行った。1993～1997年長崎大学大学院(内科学)で慢性気道感染症の研究を行い、1997～1998年米国ネブラスカ大学に留学した。帰国後は、長崎大学で助手、講師、准教授を経て、2013年より現職。日本環境感染学会多剤耐性菌感染制御委員会委員長、厚生労働科学研究費補助金の耐性菌研究班の代表も務める。

Poster

2

薬剤耐性(AMR)シンポジウム ~AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線~

薬剤耐性菌対策に資する 診断法・治療法の開発研究

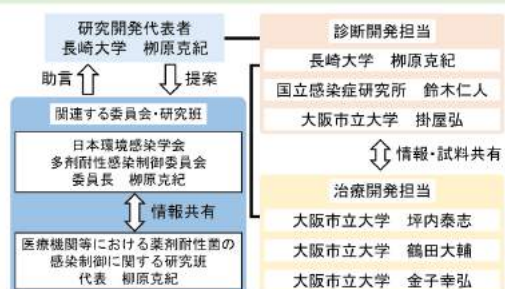
柳原 克紀

長崎大学医歯薬総合研究科医療科学専攻

背景

抗菌薬の不適切な使用等を背景として、従来問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に加え、薬剤耐性緑膿菌(MDRP)や薬剤耐性アシネトバクター(MDRA)といった治療抵抗性の細菌による感染症が増加傾向にある。また、近年、体内に定着しやすい腸内細菌科細菌の多剤耐性や高度耐性化も問題となっている。一方で、抗菌薬の開発が減少傾向にあるため、薬剤耐性菌は世界的な問題としてWHOやG7先進国首脳会議でも取り上げられるようになった。2016年4月には、我が国でも国家行動計画として薬剤耐性(AMR)対策アクションプランが提案され、AMRに関する啓発・教育、適正使用、早期診断方法の開発などの応用的研究と併せて、長期的な展望に基づく基礎研究の重要性が示されている。

研究体制



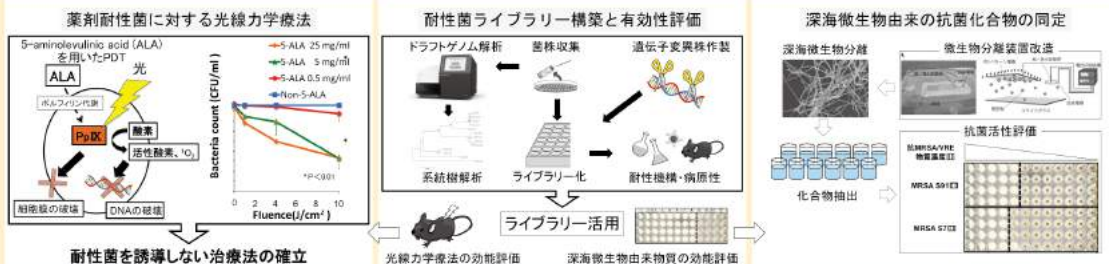
開発概要

本研究では、上述のように耐性菌領域で実績のある研究者が結集し、それぞれの資源を最大限に活用し、診断から治療までをカバーする総合的で実現性の高い耐性菌対策を提案する。
診断系では、質量分析およびシーケンスによる迅速薬剤耐性因子の検出と、POT法の医療関連対策における効果を検討する。
治療系では、光線力学療法の実用、深海微生物由来の抗菌薬シードの開発と、耐性菌ライブラリー構築による開発支援を行う。

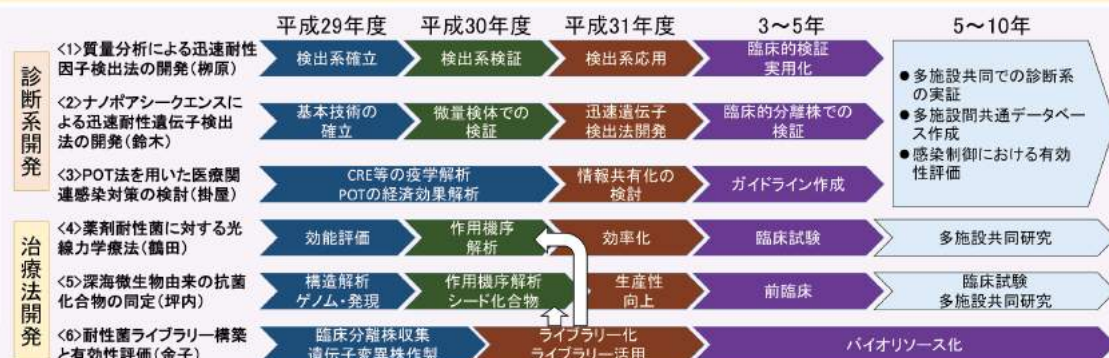
診断系開発



治療系開発



応用と展開



天然物創薬の可能性 (微化研におけるAMR克服に向けた取り組み)

微生物化学研究所 第2生物活性研究部 部長
五十嵐 雅之

近年、薬剤耐性(AMR)は世界の公衆衛生や世界経済に対する大きな驚異として捉えられています。WHOは2011年の世界保健デーにおいてAMRを取り上げ、“no action today means no cure tomorrow”なるメッセージを発信し、国際社会にワンヘルス・アプローチに基づいた世界的な取り組みの必要性を訴えました。2016年のG7伊勢志摩サミットでは世界経済やテロ対策と並ぶ大きな課題としてAMRが取り上げられ、各国が協調してAMRの問題に取り組むことが発表されました。これを受けて、我が国では“AMR アクションプラン”が策定され、この中で6つの分野に関して目標が掲げられています。AMRに対する研究開発・創薬もその一つに挙げられていますが、残念なことに抗微生物薬の創薬に関してはすでに多くの企業が研究開発から撤退しており、そのため新規抗菌薬のパイプラインが枯渇してきているのが現状となります。この理由の一つには、創薬ターゲットや新規骨格の探索が難しいことが挙げられています。

天然物は感染症、がん、高脂血症の治療や臓器移植等の医療に用いられる医薬品として重要な位置を占めており、新薬の60%以上が天然物から得られる多彩な構造をヒントに創製されていると言われています。特に感染症の領域では、多くの上市薬剤の開発において天然物が関与していることから、天然物が最も活躍出来る領域の一つであると考えられます。新規構造や新しい作用機序を持つ天然物は、現行の化学療法を転換する可能性を内包すること

からも大きな期待が寄せられます。

微生物化学研究所は、1957年の梅澤濱夫博士によるカナマイシン(カナマイシンA)の発見を契機に創設された研究所です。爾来、本研究所は天然物創薬を事業の柱として活動を行っており、ベカナマイシン(カナマイシンB)、ジベカシン、アルベカシン、ジョサマイシンなどの抗菌薬やブレオマイシンなどの抗がん薬を世に送り出して来ました。創立時より収集してきた放線菌およびその抽出物による微生物ライブラリー、並びに単離した天然化合物、天然物誘導体、合成化合物などの化合物ライブラリーを保有し、これらのライブラリーを活用することで天然物創薬研究を推進しています。

微生物化学研究所では、AMED新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業において、“超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の探索と創製”の課題のもと国立感染症研究所、JSR株式会社と共同で超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の探索研究を行っています。初年度は、化合物ライブラリーより超多剤耐性グラム陰性菌であるNDM-1やKPCなどを生産するカルバペネム耐性腸内細菌科細菌やMCR-1などを有するコリスチン耐性グラム陰性菌に有効な化合物の探索を行いました。その結果、超多剤耐性グラム陰性菌に抗菌力を示す幾つかの化合物を得ています。

また、微生物化学研究所独自のAMR克服研究開発中の化合物として、新規抗生物質カブラザマイシンより既存の抗結核薬と異なる作用機序を有する超多剤耐性結核薬CPZEN-45(図1)を創製しまし

た。また、16S rRNA メチルトランスフェラーゼに焦点を当てた次世代アミノ配糖体の開発研究により創製された新規アミノ配糖体(図2)は、NDM-1を含むCREを始めとした超多剤耐性グラム陰性菌に強い抗菌力を示します。

本講演では、微生物化学研究所で進められているAMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業および独自に開発中の二化合物について紹介したいと思います。

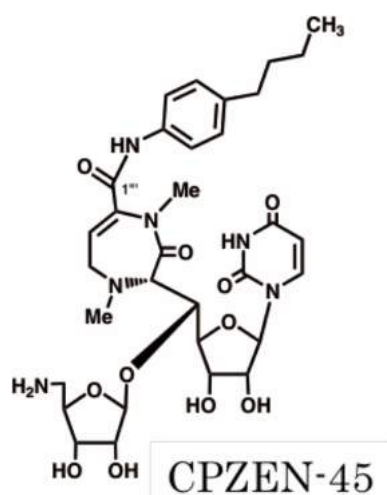


図1

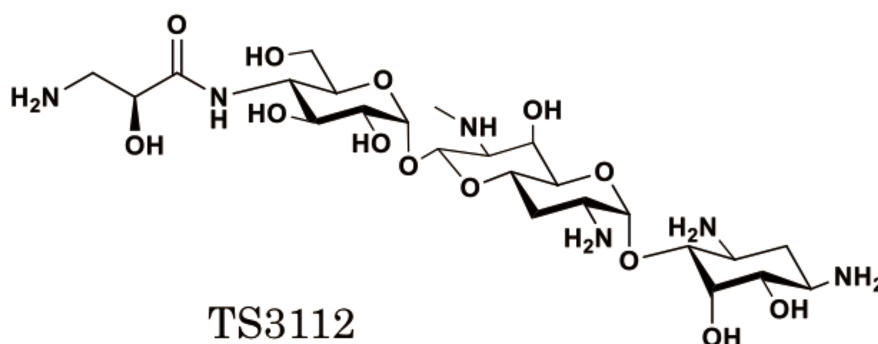


図2

AMR 関連論文

Umemura, E., Takahashi, Y., Igarashi, M., Hayashi, C., Shibasaki, M., Yamada, K., Ida, T., Yonezawa, M. TS3112, a novel aminoglycoside antibiotics active against multidrug-resistant pathogens producing 16S rRNA methyltransferases: synthesis and structure-activity relationships. ASM Microbe 2017, Poster Sunday-335, New Orleans, LA, USA (2017).

Ishizaki Y, Hayashi C, Inoue K, Igarashi M, Takahashi Y, Pujari V, Crick DC, Brennan PJ, Nomoto A. Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. J Biol Chem. 288, 30309-30319 (2013)

Takahashi Y, Igarashi M, Miyake T, Soutome H, Ishikawa K, Komatsuki Y, Koyama Y, Nakagawa N, Hattori S, Inoue K, Doi N, Akamatsu Y. Novel semisynthetic antibiotics from caprazamycins A-G: caprazene derivatives and their antibacterial activity. J Antibiot. 66, 171-178(2013)

Igarashi M, Takahashi Y, Shitara T, Nakamura H, Naganawa H, Miyake T, Akamatsu Y. Caprazamycins, novel liponucleoside antibiotics, from Streptomyces sp. II. Structure elucidation of caprazamycins. J Antibiot. 58, 327-337(2005)

Igarashi M, Nakagawa N, Doi N, Hattori S, Naganawa H, Hamada M. Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from Streptomyces sp. J Antibiot. 56, 580-583(2003)

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の探索と創製

AMED 事業名

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

研究班構成

代表機関：国立感染症研究所

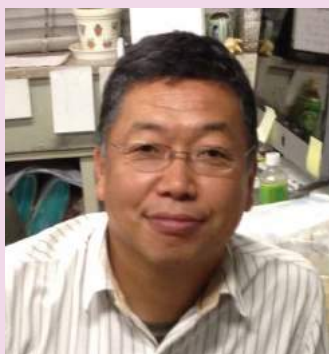
分担機関：微生物化学研究所、JSR株式会社（順不同）

研究開発課題の内容

近年、薬剤耐性菌による難治性の感染症が世界の公衆衛生上の重大な問題となっています。2000年代に急速に世界に拡散した超多剤耐性のグラム陰性菌には、臨床で汎用されているカルバペネム系、アミノ配糖体系、フルオロキノロン系を含めて有効な抗菌薬がほとんどありません。ポリミキシン系抗菌薬はXDR グラム陰性菌にも比較的有効で、2015年3月に日本ではコリスチン注射剤が再承認されましたが、同11月に中国で伝播性のコリスチン耐性機構が初めて発見され、もはや有効な抗菌薬が存在しない汎耐性グラム陰性菌の世界的蔓延も危惧されています。このような危機的な状況下において尚、グラム陽性菌と異なり外膜を有するグラ

ム陰性菌に対する新たな創薬は長く停滞しています。将来の感染症対策のために、専門分野を超えた産学官の研究者の叡智を結集し、新たな抗菌薬の研究開発を促進させることが急務であると考えています。

本研究課題では、国立感染症研究所は国内外の耐性菌の臨床分離株を収集しており、現在までに8000超の菌株を保管し、抗菌薬感受性、分子疫学的分類、ゲノム配列情報など多くの微生物資源が集積しています。微生物化学研究所は現在までに4万種類を超える微生物と天然物・培養物ライブラリーを構築し、抗菌活性を有する天然化合物の情報とその誘導体の有機合成技術を有しています。JSR 株式会社は国立感染症研究所と共同で高分子合成技術を応用した抗菌化合物を開発しています。現在の臨床で特に重要なESKAPE 耐性菌を標的とし、国立感染症研究所が有する微生物資源と、微生物化学研究所とJSR 株式会社が確立してきた知的基盤を最大限活用し、超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物を探索しています。五十嵐は、放線菌およびその抽出物による微生物ライブラリー、並びに単離した天然化合物、天然物誘導体、合成化合物などの化合物ライブラリーより超多剤耐性グラム陰性菌に有用な化合物の探索を行っています。



微生物化学研究所 第2生物活性研究部 部長

五十嵐 雅之

1962年生まれ、山形大学大学院農学研究科修士(農学)農芸化学専攻、現在 公益財団法人 微生物化学研究会附属微生物化学研究所 第2生物活性研究部 部長。研究テーマは、放線菌から主に感染症領域を中心とした生理活性物質の探索と開発を行っています。所属学会は、日本放線菌学会、日本化学療法学会、日本農芸化学会。

薬剤耐性 (AMR) シンポジウム ~ AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線~ 天然物創薬の可能性 (微化研におけるAMR克服に向けた取り組み) 五十嵐雅之 微生物化学研究所 第2生物活性研究部



薬用植物ライブラリーを用いた多剤耐性菌 に対する新規抗菌薬の探索

順天堂大学医学部微生物学講座 教授
切替 照雄

薬剤耐性菌が医療施設を中心に新興し地球規模で拡大し、世界の医療安全を根底から脅かすようになってきた。抗生剤カルバペネムに耐性の細菌が院内感染の原因菌として分離されるようになり、このような高度薬剤耐性菌が感染症の治療成績を著しく低下させ、多くの国々で死亡率を押し上げる要因となっている。2015年、WHOはGlobal Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR)を公表した。このうち、新規抗菌薬の開発はこの分野の最重要課題の1つである。我々は日本、ベトナム、ネパール、ミャンマーの医療機関で分離される多剤耐性菌の分子疫学解析を通して、アジア大陸において流行しているカルバペネム耐性因子をはじめとする種々の薬剤耐性因子を同定してきた。本研究ではこの疫学解析を通して収集した高度耐性臨床分離株(多剤耐性結核菌、多剤耐性緑膿菌・アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌)および種々のカルバペネム耐性因子を用い、植物由来天然物から新規の抗菌物質および新規のカルバペネマーゼ阻害剤を同定する。スクリーニングに用いる植物天然物は医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターが収集し、順天堂大学で*in vitro*のスクリーニングを実施し、栃木県保健環境センターで動物実験を実施している。

医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターでは創薬支援ネットワークの技術支援拠点の1つである薬用植物スクリーニングプロジェクトとして、創薬資源としての植物を利用するべく植物由来エキスライブラリーの構築が進行中である。

現在までのところ、国内外の植物由来のエキス約10,000サンプルがライブラリーとして利用可能である。現在、医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターの植物エキスライブラリーは質量ともに世界トップクラスである。エキスは多成分系であるために、含有される微量成分には未知の新規化合物も期待できる。本エキスライブラリーには高知県立牧野植物園と寄託契約により、ミャンマー、ボリビア、ソロモン諸島などの貴重な植物資源も含まれており、当該国との利用契約がすでに締結されている。本薬用植物エキスライブラリーの特徴として、国内の野生植物を中心とした植物エキスが多数含まれていること、正確な植物同定を行い採取地点・時期を記録していること、国内流通生薬(モデル生薬)も含まれること、創薬に有用と思われるシダ植物を重点的に採集していること、があげられる。すべての植物エキスライブラリーはアルコール抽出後、DMSO溶液として保存している(40mg/ml)。

多剤耐性結核菌および多剤耐性緑膿菌に対して8872種、カルバペネマーゼ阻害活性に対しては8870種類、多剤耐性アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌(CRE)に対しては8797種類のエキスの一次スクリーニングを実施した。結核菌株では8872中512サンプルが陽性であった(陽性率5.8%)。多剤耐性緑膿菌株では8872中518サンプルが陽性であった(陽性率5.8%)。多剤耐性アシネトバクター株では8797中415サンプルが陽性であった(陽性率4.7%)。CREでは8797中10サンプルが陽性であった(陽性率0.11%)。2



次スクリーニングによって、多剤耐性結核に抗結核活性を示した28サンプル、多剤耐性緑膿菌だけに抗菌活性を示した152サンプル、多剤耐性アシネトバクターだけに抗菌活性を示した140サンプルに絞られた。2次スクリーニングで分析可能なサンプルを解析した結果、抗結核作用のある3種類の化合物を同定した。カルバペネマーゼ阻害剤に関するスクリーニングでは予定されたカルバペネマーゼの内、IMP-1およびNDM-1を用いた阻害剤スクリーニングを実施した。6109中46サンプルがIMP-1阻害活性を示した（陽性率0.75%）。7254中80サンプルがNDM-1阻害活性を示した（陽性率1.1%）。予定されたカルバペネマーゼ以外のカルバペネマーゼVIM-2においても阻害剤スクリーニングを実施した結果、7254中22サンプルがVIM-2阻害活性を示した（陽性率0.30%）。IMP-1阻害活性を示したサンプルを更に分画し、活性の主成分を同定した。

カルバペネマーゼ阻害に対するスクリーニングで陽性だったサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。アシネトバクター及びCREに対して共通に陽性であった5種のサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。抗多剤耐性結核菌活性が認められた5種の化合物を精製し化学構造を解明した。多剤耐

性結核菌に対する抗菌活性を示した1化合物に対して結核感染マウスを用いた薬効試験を実施中である。

AMR 関連論文

1. Tada T, Uechi K, Nakasone I, Shimada K, Nakamatsu M, Kirikae T, Fujita J: Emergence of a colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harboring *mcr-1* in Japan. *Int J Infect Dis*. 2017 [Epub ahead of print]
2. Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T: *Pseudomonas aeruginosa* Clinical isolates in Nepal coproducing metallo- β -lactamases and 16S rRNA methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 [Epub ahead of print]
3. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, Ohmagari N, Kirikae T: Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2017, 4;17(1):467.
4. Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tsuchiya M, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T: Multidrug-resistant sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates producing IMP-26 with increased carbapenem-hydrolyzing activities in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, 60(11):6853-6858.
5. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shiroma A, Nakano K, Teruya K, Satou K, Hirano T, Shimojima M, Kirikae T: A carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate harboring two copies of *bla*_{IMP-34} encoding a metallo- β -lactamase. *PLoS One*. 2016, 11(4):e0149385.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

薬用植物ライブラリーを用いたカルバペネム耐性腸内細菌、多剤耐性アシネトバクター・緑膿菌および薬剤耐性結核菌に対する新規抗菌薬の探索

AMED 事業名

創薬基盤推進研究事業

研究班構成

代表機関：順天堂大学

分担機関：医薬基盤・健康・栄養研究所、栃木県保健環境センター(順不同)

研究開発課題の内容

日本、ベトナム、ネパール、ミャンマーの医療機関で分離される多剤耐性菌の分子疫学解析を通して、アジア大陸において流行しているカルバペネム耐性因子をはじめとする種々の薬剤耐性因子を同定してきた。本研究の目的はこの疫学解析を通して収集した高度耐性臨床分離株(多剤耐性結核菌、多剤耐性緑膿菌・アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌)および種々のカルバペネム耐性因子を用い、植物由来天然物から新規の抗菌物質および新規のカルバペネマーゼ阻害剤を同定することである。スクリーニングに用いる植物天然物は医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターが収集し、順天堂大学で*in vitro*のスクリーニングを実施し、

栃木県保健環境センターで動物実験を実施している。

多剤耐性結核菌および多剤耐性緑膿菌に対して8872種、カルバペネマーゼ阻害活性に対しては8870種類、多剤耐性アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌(CRE)に対しては8797種類のエキスの一次スクリーニングを行った。その結果、多剤耐性結核に抗結核活性を示した28サンプル、多剤耐性緑膿菌だけに抗菌活性を示した152サンプル、多剤耐性アシネトバクターだけに抗菌活性を示した140サンプルに絞られた。2次スクリーニングで分析可能なサンプルを解析した結果、抗結核作用のある5種類の化合物を同定した。カルバペネマーゼ阻害剤に関するスクリーニングでは予定されたカルバペネマーゼの内、IMP-1を用いた阻害剤スクリーニングを実施した結果、6109中46サンプルがIMP-1阻害活性を示した(陽性率0.75%)。IMP-1阻害活性を示したサンプルを更に分画し、活性の主成分を同定した。カルバペネマーゼ阻害に対するスクリーニングで陽性だったサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。アシネトバクター及びCREに対して共通に陽性であった5種のサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。抗多剤耐性結核菌活性が認められた2種類の化合物に対して、結核感染マウスを用いた薬効試験を実施している。



順天堂大学医学部微生物学講座 教授

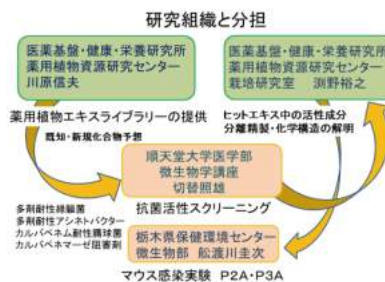
切替 照雄

1982年岩手医科大学医学部卒業、1986年同大学大学院病理(細菌学)専攻を修了する。1987～1989年まで日本学術振興会特別研究員(岩手医科大学)、その後アレキサンダーフォンフンボルト財団奨学研究員(ドイツボルステル研究所)、米国カンザス大学医学部博士研究員、自治医科大学微生物学教室講師、国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部長を経て、2017年より順天堂大学医学部微生物学講座教授。

薬剤耐性(AMR)シンポジウム ~AMEDにおける基礎から創薬までの研究開発最前線~ 4 薬用植物ライブラリーを用いた 多剤耐性菌に対する新規抗菌薬の探索 切替 照雄 順天堂大学医学部微生物学講座

概要

日本、ベトナム、ネパール、ミャンマーの医療機関で分離される多剤耐性菌の分子疫学解析を通して、アジア大陸において流行しているカルバペネム耐性因子をはじめとする種々の薬剤耐性因子を同定してきた。本研究の目的はこの疫学解析を通して収集した高度耐性臨床分離株(多剤耐性結核菌、多剤耐性緑膿菌・アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌)および種々のカルバペネム耐性因子を用い、植物由来天然物から新規の抗菌物質および新規のカルバペネマーゼ阻害剤を同定することである。スクリーニングに用いる植物天然物は医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターが収集し、順天堂大学でin vitroのスクリーニングを実施し、栃木県保健環境センターで動物実験を実施している。



薬用植物エキスライブラリーの作成から化合物の同定まで



スクリーニングに用いた薬剤耐性菌

スクリーニングに用いるバネル菌



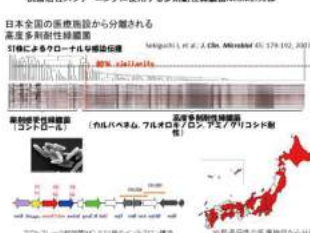
多剤耐性結核菌に対する抗菌活性スクリーニングの経過

スクリーニング	方法	陽性サンプル数	総サンプル数
1次	1濃度のみの抗菌活性	512	8872
2次	MIC決定	28	512

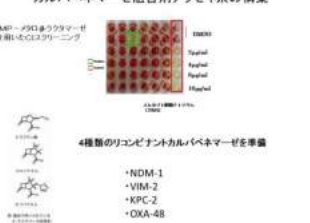
抗結核薬 (μg/ml)											
INH	RFP	EB	SM	AM	TH	PAZ	CS	EVN	...	...	...
1	50	50	50	50	50	50	50	50	...	...	...

Strain	INH	RFP	EB	SM	AM	TH	PAZ	CS	EVN
HCCM48482	10	10	10	10	10	10	10	10	10

抗菌活性スクリーニングに使用する多剤耐性緑膿菌HCCM251株



カルバペネマーゼ阻害剤アッセイ系の構築



多剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性スクリーニングの経過

スクリーニング	方法	陽性サンプル数	総サンプル数
1次	1濃度のみの抗菌活性	512	8872
2次	MIC	28	512

プレート読取装置 (Bio Synergy 4)

プレート読取装置 (Bio Synergy 4)

ヒットエクスからの活性化合物の特定



多剤耐性結核菌および多剤耐性緑膿菌に対して8872種、カルバペネマーゼ阻害活性に対しては8870種類、多剤耐性アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌 (CRE) に対しては8797種類のエキスの一次スクリーニングを行った。その結果、多剤耐性結核に抗結核活性を示した28サンプル、多剤耐性緑膿菌だけに抗菌活性を示した152サンプル、多剤耐性アシネトバクターだけに抗菌活性を示した140サンプルに絞られた。2次スクリーニングで分析可能なサンプルを解析した結果、抗結核作用のある5種類の化合物を同定した。カルバペネマーゼ阻害剤に関するスクリーニングでは予定されたカルバペネマーゼの内、IMP-1を用いた阻害剤スクリーニングを実施した結果、6109中46サンプルがIMP-1阻害活性を示した(陽性率0.75%)。IMP-1阻害活性を示したサンプルを更に分離し、活性の主成分を同定した。カルバペネマーゼ阻害に対するスクリーニングで陽性だったサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。アシネトバクター及びCREに対して共通に陽性であった4種類のサンプルを特定した。多剤耐性緑膿菌・アシネトバクター及びCREに対して共通に陽性であった1種類のサンプルを精製し、1種の化合物を同定し、化学構造を解明した。抗多剤耐性結核菌活性が認められた2種類の化合物に対して、結核感染マウスを用いた薬効試験を実施している。最終的には多剤耐性結核菌に対するリード化合物2種類以上、多剤耐性緑膿菌・アシネトバクターに対するリード化合物1種類以上、カルバペネマーゼ阻害剤3種類以上を同定したい。

現在の開発段階



北里微生物資源ライブラリーを基盤とした 多剤耐性菌を克服する天然物創薬

北里大学 北里生命科学研究所 創薬科学部門 教授、研究推進センター長
砂塚 敏明

【研究概要】

本研究課題では、北里大学北里生命科学研究所の
大村創薬研究グループにおいて開発された抗寄生
虫薬エバーメクチンをはじめ、およそ500種におよ
ぶ新規天然物を発見してきた北里微生物資源ライ
ブラリーを用いて、多剤耐性菌に対して効果のある新
規抗菌物質の探索並びに*in situ* click chemistry
を含めた有機合成化学による構造展開を行い、天然
物を基盤とした創薬を目指している(図1)。

【はじめに】

これまでの微生物創薬研究ではペニシリンやス
トレプトマイシンなどの抗菌薬、マイトマイシンなど
の抗腫瘍薬、スタチン系高脂血症薬、タクロリムス
などの免疫抑制薬、エバーメクチンなどの抗寄生虫
薬などが人類、家畜を多くの疾病から解放してきた。
1981年から2014年の34年間に開発された新
規低分子医薬品1211のうち、65%は天然物、その
誘導体と天然物の構造を模した化合物である。しか
し、90年代にコンビケム合成ライブラリーへの期待
から、費用対効果が見込みづらい天然物探索から撤
退する企業が相次いだ。一方、北里生命科学研究所は、
独自の微生物創薬グループを構築し、他機関および
製薬企業との共同研究を行い、天然物からの医薬探
索と開発を継続し、新たな医薬の開発候補化合物を
育ててきた(図2)。当研究グループでは、これらを
臨床開発へ推進するため、製薬企業をはじめとした
外部機関と連携して微生物創薬研究を50年間以
上継続している。

【結果】

微生物の分離・ライブラリー化を糸状菌および
放線菌で実施した。スクリーニングサンプルとして
5,560サンプル、および6,355サンプルをそれぞ
れ供給し(合計11,915サンプル)、新規活性物質発
見の効率化を図る目的で分類情報を生産物の予測
にも活用した。

多剤耐性菌を克服する活性化合物の取得のため
に、耐性機構(β -ラクタム薬耐性、アルベカシン耐
性、アミカシン耐性、カルバペネム耐性)を標的とし
た耐性克服活性物質のスクリーニング系の構築と
活性物質の探索を実施した。アルベカシンおよび
アミカシン耐性克服活性物質のスクリーニング系
をアルベカシンおよびアミカシンを不活性化する
修飾酵素が発現した臨床分離株、黄色ブドウ球菌
RN4220および大腸菌にそれぞれの修飾酵素を
安定発現させた検定菌を作製し、スクリーニング
系を構築した。北里微生物資源ライブラリーより供
給された糸状菌および放線菌の培養サンプルを含
めた検体をスクリーニングし、これまでに6つの耐
性克服活性物質を取得した。これらの化合物はい
ままでに耐性克服活性が報告されていなく、新しい
生物活性の知見であった。 β -ラクタム薬耐性克服
活性物質のスクリーニング系については、PBP2'
が発現した臨床分離MRSA株を用いて構築した。
北里微生物資源ライブラリーより供給された糸状
菌および放線菌の培養サンプルを含めた検体を
スクリーニングし、新規化合物naphthacemycin
類を取得した。さらに、naphthacemycin類の効

率的な全合成法を確立した。カルバペネム耐性克服活性物質のスクリーニング系を *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase および metallo- β -lactamase が発現している臨床分離株を用いてそれぞれ構築した。北里微生物資源ライブラリーより供給された糸状菌および放線菌の培養サンプルを含めた検体をそれぞれスクリーニングし、metallo- β -lactamase が発現している臨床分離株に対して耐性克服活性を示す化合物として、3Z,5E-Octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride (ODTAA) に加えて4つの耐

性克服活性物質を見出した。さらに、*in situ* click chemistry を駆使した高活性化化合物の創製研究のために、ODTAAの全合成および誘導体合成を行い、高活性化化合物の取得に成功した。

【今後の展望】

耐性克服活性を示す活性物質の誘導体化を含めた *in situ* click chemistry による高活性化化合物を創製し、*in vivo*での治療効果を検証後に、特許出願および企業などへの導出をはかる。

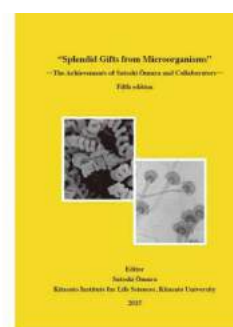
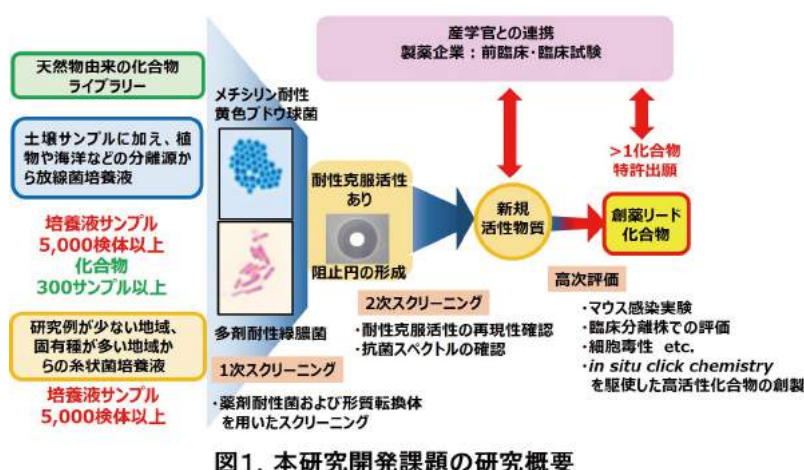


図2. Splendid Gifts from Microorganisms (第5版(2015年) 483化合物を収載) 北里生命科学研究所で発見された微生物が創る化合物の総目録

AMR 関連論文

- Goh Sennari, Ryo Saito, Tomoyasu Hirose, Masato Iwatsuki, Aki Ishiyama, Rei Hokari, Kazuhiko Otaguro, Satoshi Ōmura and **Toshiaki Sunazuka**. Antimalarial troponoids, puberulic acid and viticolins; divergent synthesis and structure-activity relationship studies. *Sci. Rep.* 2017, doi:10.1038/s41598-017-07718-3.
- Hiroyasu Ando, Aoi Kimishima, Motoyoshi Ohara, Tomoyasu Hirose, Takanori Matsumaru, Hirokazu Takada, Keisuke Morodome, Takehiro Miyamoto, Akihiro Sugawara, Satoshi Ōmura and **Toshiaki Sunazuka**. Toward the total synthesis of luminamicin; an anaerobic antibiotic: construction of highly functionalized cis-decalin containing a bridged ether moiety. *J. Antibiot.* 2017, advance online publication.
- Akihiro Sugawara, Hitomi Maruyama, Sho Shibusawa, Hidehito Matsui, Tomoyasu Hirose, Ayumi Tsutsui, Robrecht Froyman, Carolin Ludwig, Johannes Koebberling, Hideaki Hanaki, Gerd Kleefeld, Satoshi Ōmura and **Toshiaki Sunazuka**. 5-O-Mycaminosyltylonolide antibacterial derivatives: design, synthesis and bioactivity. *J. Antibiot.* 2017, 70, 878-887.
- Tomoyasu Hirose, Yasuhiro Kojima, Hidehito Matsui, Hideaki Hanaki, Masato Iwatsuki, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura and **Toshiaki Sunazuka**. Total synthesis of (±)-naphthacemycin A9, possessing both antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and circumventing effect of β -lactam resistance. *J. Antibiot.* 2017, 70, 574-581.
- Tomoyasu Hirose, Nobuo Maita, Hiroaki Gouda, Jun Koseki, Tsuyoshi Yamamoto, Akihiro Sugawara, Hirofumi Nakano, Shuichi Hirono, Kazuro Shiomi, Takeshi Watanabe, Hisaaki Taniguchi, K. Barry Sharpless, Satoshi Ōmura and **Toshiaki Sunazuka**. Observation of the controlled assembly of preclick components in the *in situ* click Chemistry generation of a chitinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 15892-15897.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

北里微生物資源ライブラリーを基盤とした多剤耐性菌を克服する天然物創薬

AMED 事業名

創薬基盤推進研究事業

研究班構成

代表機関：北里研究所北里大学

分担機関：①北里大学大学院感染制御科学府（分担研究開発課題名（実施内容）：微生物資源ライブラリーの提供、微生物分離）、②北里大学大学院感染制御科学府（分担研究開発課題名（実施内容）：多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質探索並びに単離、構造決定）、③北里大学大学院感染制御科学府（分担研究開発課題名（実施内容）：動物を用いた感染防御モデルの解析や薬理学的検証、物性、体内動態、吸収排泄等の検討）、④北里大学大学院感染制御科学府（分担研究開発課題名（実施内容）：*in situ* click chemistry を駆使した高活性化合物の創製）、⑤北里大学大学院感染制御科学府（分担研究開発課題名（実施内容）：合成による化合物最適化特許出願、企業導出）

研究開発課題の内容

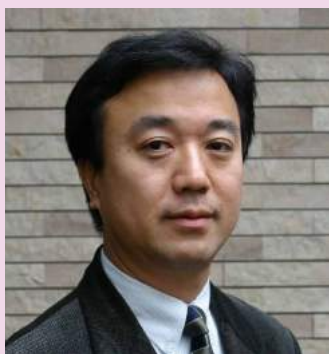
本研究開発課題は、多剤耐性菌に対して有効な天然物創薬をすることを目的とし、最終年度までに特許出願、企業導出を計ることである。多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質の発見に寄与し得る微生物群を分離・ライブラリー化することを目的とし、独自の微生物分離法を駆使して微生物の分離を行い、微生物分類情報等を付加した独自性の高い有用な微

生物ライブラリーの構築を目指す。

多剤耐性菌に対して有効な活性物質の探索は、アミノグリコシド耐性とカルバペネム耐性を標的とした。これらの耐性は酵素による修飾と分解によるものであり、これらの酵素阻害剤を見出すことが出来れば、既存の有用な多くの抗菌薬の再利用が可能となる。また、多剤耐性菌として問題となっている MRSA は外来から獲得した細胞壁合成酵素(PBP2')によってβ-ラクタム薬耐性を獲得している。したがって、これらの耐性機構を阻害することが出来れば新たな耐性克服薬シード化合物として開発することが可能になる。

加えて、耐性機構を阻害する新たな耐性克服薬開発のためには、動物を用いたシード化合物の感染モデルに対する治療効果および、体内での薬物動態を明らかにすることが重要である。そこで、耐性克服活性物質の評価のために *in vitro* で血清中での化合物の安定性と耐性克服活性を検証する。そのなかで有望な高活性化化合物を用いて感染動物モデル系を利用して、治療効果を評価する。

さらに、標的酵素と親和性を有するビルディングブロック（耐性克服活性物質）を標的酵素自体のリガンド結合部位を反応場として用い、アジドとアセチレンのトリアゾール形成を指標に、親和性の高い耐性克服活性を示す化合物を探索するために、*in situ* click chemistry を駆使した高活性化化合物の創製を行う。*in situ* click chemistry および、合成により最適化された最適化合物の特許出願を行い、これまでに北里微生物資源ライブラリーから医薬・動物薬として上市した開発ノウハウを活かして企業導出を計る。



北里大学 北里生命科学研究所 創薬科学部門 教授、研究推進センター長
砂塚 敏明

1982年北里大学薬学部薬科学卒業、1988年北里大学大学院薬学部研究科博士課程修了（薬学博士）、1988年ペンシルバニア大学化学科留学。2005年より北里大学北里生命科学研究所（教授）、北里大学大学院感染制御科学府（教授）、現在に至る。優れた抗生物質を始めとする生理活性物質の発見とそれらの応用研究、次いで創薬に向けて生理活性物質の生物活性を一層引き出すために有機合成化学手法による創薬研究を展開。

北里微生物資源ライブラリーを基盤とした 多剤耐性菌を克服する天然物創薬

砂塚 敏明

北里大学 北里生命科学研究所

1. 研究の目的

【研究概要】

本研究課題では、北里大学北里生命科学研究所の北里創薬研究グループにおいて開発された抗寄生虫薬エバメクチンをはじめ、およそ500種におよぶ新規天然物を発見してきた北里微生物資源ライブラリーを用いて、多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質の探索並びに*in situ* click chemistryを含めた有機合成化学による構造展開を行い、天然物を基盤とした創薬を目指している(図1. 本研究開発課題の研究概要)。

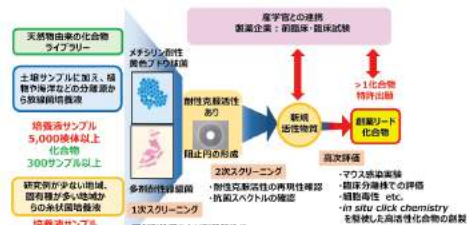


図1. 本研究開発課題の研究概要

【はじめに】

これまでの微生物創薬研究ではペニシリンやストレプトマイシンなどの抗菌薬、マイトマイシンなどの抗腫瘍薬、スタチン系脂血症薬、タクロリムスなどの免疫抑制剤、エバメクチンなどの抗寄生虫薬などが人類、家畜を多くの疾病から解放してきた。1981年から2014年の34年間に開発された新規低分子医薬品1211のうち、65%は天然物、その誘導体と天然物の構造を模した化合物である。

しかし、90年代にコンビケム合成ライブラリーへの期待から、費用対効果が見込みづらい天然物探索から撤退する企業が相次いだ。一方、北里生命科学研究所は、独自の微生物創薬グループを構築し、他機関および製薬企業との共同研究を行い、天然物からの医薬探索と開発を継続し、新たな医薬の開発候補化合物を育ててきた(図2. Splendid Gifts from Microorganisms 第5版, 2015年; 北里生命科学研究所で発見された微生物創薬化合物の総目録)。

当研究グループでは、これを臨床開発へ推進するため、製薬企業をはじめとした外部機関と連携して微生物創薬研究を50年間にわたって継続している(図3. 北里生命科学研究所で上市された代表的な化合物)。

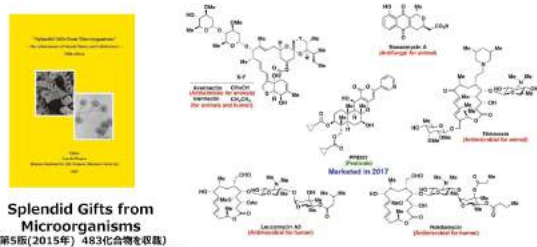


図2. Splendid Gifts from Microorganisms (第5版(2015年) 482化合物を収録) 北里生命科学研究所で発見された微生物創薬化合物の総目録

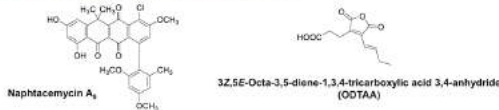
図3. 北里生命科学研究所で上市された代表的な化合物

2. 本研究のロードマップと開発段階



本研究課題の到達目標

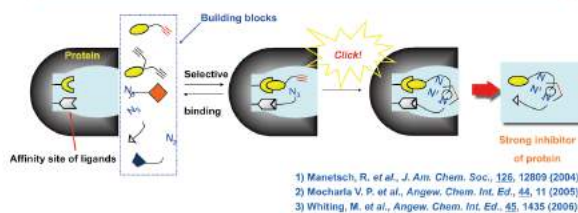
- ✓ 耐性克服活性物質をスクリーニングでアッセイ系を構築し、北里微生物資源ライブラリーより供給された米状菌および放線菌の培養サンプルを含めたおよそ12,000株体をスクリーニングした。
- ✓ アミノグリコシド耐性克服活性物質を6化合物取得した。
- ✓ β-ラクタム薬耐性克服活性物質として新規化合物naphthacemycin A₉を取得した。さらに、naphthacemycin A₉の全合成を試み、naphthacemycin A₉の全合成に成功した。
- ✓ カルバペネム耐性克服活性物質としてODTAAを取得した。さらに、ODTAAを全合成し、ODTAA類似化合物の高活性化合物の合成に成功した。



3. 今後の展望

1. In situ クリックケミストリーによる耐性克服活性物質の高活性化

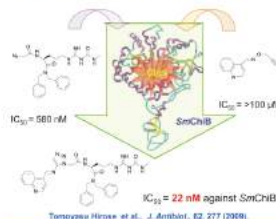
標的タンパク質と親和性を有するビルディングブロックに対してそのタンパク結合部位を反応場とした、2種の官能基間の特異的な連結反応(例えばアゾとアセチレンのトリアゾール化)の促進効果を指標にして、より親和性の高い化合物を探索する方法。



- 1) Manetsch, R. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 12809 (2004)
- 2) Mocharia, V. P. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 11 (2005)
- 3) Whiting, M. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 1435 (2006)

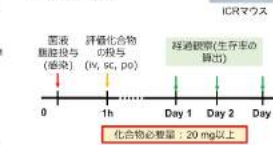
今後は有望な耐性克服活性物質およびその誘導体を基盤に標的タンパク質を用いて本スクリーニングを実施することで、高活性化合物の探索も計画している。

2. In situ クリックケミストリー実施例



3. マウス感染実験

- 全身感染モデルの構築
- *in vivo* 実験に適した菌株の選定
- 実験条件の確立



4. 関連論文および特許情報

【関連論文】

1. Goh Sennart, Ryo Saito, Tomoyasu Hirose, Masato Iwatsuki, Aki Ishiyama, Rei Hokani, Kazuhiko Otaguro, Satoshi Omura and Toshiaki Sunazuka. Antimalarial trponocids, puberulic acid and viticolsins; divergent synthesis and structure-activity relationship studies. *Sci. Rep.* 2017, doi:10.1038/s41598-017-07718-3.
2. Hiroyasu Ando, Aoi Kimishima, Motoyoshi Ohara, Tomoyasu Hirose, Takanori Matsumaru, Hirokazu Takada, Keisuke Morodome, Takehiro Miyamoto, Akihiro Sugawara, Satoshi Omura and Toshiaki Sunazuka. Toward the total synthesis of luminamicin, an anaerobic antibiotic: construction of highly functionalized cis-decalin containing a bridged ether moiety. *J. Antibiot.* 2017, advance online publication.
3. Akihiro Sugawara, Hitomi Maruyama, Sho Shibusawa, Hidehito Matsui, Tomoyasu Hirose, Ayumi Tsutsui, Robert Froyman, Carolin Ludwig, Johannes Koebberling, Hideaki Hanaki, Gerd Kleefeld, Satoshi Omura and Toshiaki Sunazuka. 5-O-Mycaminosyltyronolide antibacterial derivatives: design, synthesis and bioactivity. *J. Antibiot.* 2017, 70, 878-887.
4. Tomoyasu Hirose, Yasuhiro Kojima, Hidehito Matsui, Hideaki Hanaki, Masato Iwatsuki, Kazuo Shiomi, Satoshi Omura and Toshiaki Sunazuka. Total synthesis of (±)-naphthacemycin A₉, possessing both antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and circumventing effect of β-lactam resistance. *J. Antibiot.* 2017, 70, 574-581.
5. Tomoyasu Hirose, Nobuo Maita, Hiroaki Gouda, Jun Koseki, Tsuyoshi Yamamoto, Akihiro Sugawara, Hirofumi Nakano, Shuichi Hirono, Kazuo Shiomi, Takeshi Watanabe, Hisaki Taniguchi, K. Barry Sharpless, Satoshi Omura and Toshiaki Sunazuka. Observation of the controlled assembly of preclick components in the *in situ* click Chemistry generation of a chitinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 15892-15897.

【関連特許】

1. Satoshi Omura; Yoko Takahashi, Young Hee Kim, Hideaki Hanaki, Hiroshi Tomoda, Makoto Suzuki, Kazuaki Shiomi. KB-3346-5 substances, their fermentative manufacture, and antibacterial agents containing them. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 2009, JP 2009046404 A 20090305.
2. Satoshi Omura, Kazuo Shiomi, Yukihiko Asami, Yui Kashima, Kenichi Nonaka, Hideaki Hanaki. Novel metallo-β-lactamase inhibitor containing 2,5-furandione derivative, and antiseptic composition containing the same with β-lactam. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 2016, JP 2016179964 A 20161013.

5. 自己紹介

プロフィール

砂塚敏明 (すなづか としあき) 1959年生まれ 千葉県・船橋市

所属

北里大学北里生命科学研究所 教授・研究推進センター長
北里大学大学院感染制御科学府 教授

研究分野

天然物化学・有機合成化学・創薬化学

趣味

サッカー

連絡先

TEL: 03-5791-6340

E-mail: sunazukatoshiaki@yahoo.co.jp

<http://seibutyuui.sakura.ne.jp/index.html>



ホームページQRコード

新型多剤耐性菌克服のための新規阻害物質などの探索

名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻 分子病原細菌学／耐性菌制御学分野 教授
荒川 宜親

1980年代から国内でも問題視され始めたMRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)や1990年代に世界的に広がり始めたVRE(バンコマイシン耐性腸球菌)等のグラム陽性の多剤耐性菌に加え、その後、多剤耐性を獲得したグラム陰性の緑膿菌やアシネトバクター属菌など多種多様な広範囲多剤耐性菌が国内外の医療現場に広がってきた。また2010年以降、カルバペネム系のみならずフルオロキノロン系やアミノ配糖体系などに対し広範な耐性を獲得した、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)、さらにCREなどの感染症の治療において有効性が期待できるコリスチンに耐性を付与するMCR-1(ホスホエターノールアミンをLPSに付加する酵素)などをプラスミド依存性に産生する大腸菌などが、世界各地で分離されるようになり、臨床現場で大きな現実的脅威となっている。そのため、先の伊勢志摩サミットでも薬剤耐性(Antimicrobial resistance: AMR)問題が国際的に協同して取り組むべき主要な緊急課題の一つとして取り上げられ、各国でAMR対策のための様々な取り組みが開始されている。

このような事態を踏まえ、当教室では、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)の佐藤綾人准教授や金城学院大学薬学部黒崎博雅教授らと協同し、細菌学、化学、薬学の3分野の専門家で協力し、それぞれの学術的知識や研究技術を提供しあい、学際的に連携してCRE等の新型の広範囲多剤耐性菌に有効性が期待される新規物質等の探索等を実施している。具体的には、カルバペネマーゼの中で最も一般的かつ多様なタイプが出現して

いるメタロ- β -ラクタマーゼの活性を阻害する物質を、ITbMの所有する20,000種類以上の化合物ライブラリーとともに市販の化合物ライブラリーの中から選択し、酵素化学的阻害パラメーターの測定を実施するとともにSchrödingerなどの専用解析ソフトを用いたドッキング・シミュレーション解析、さらに阻害物質との共結晶の作成とX線結晶構造解析による結合状態の解明などを行っている。同時に、得られたデータに基づいて、より強い阻害活性を有する分子への構造改変なども試みている。

これまでの研究により、23,250種のITbM化合物ライブラリーの中からMBLに対して阻害活性を有する33種類の化合物を選択した。その中で、IMP型やNDM型などのMBLに対して強い阻害活性(IMP-1に対する IC_{50} は $0.22\ \mu M$)を示す分子量が約300の化合物Aを発見した。IMP-1産生大腸菌などを用い、メロペネム等のカルバペネム薬共存下で化合物Aを数 $\mu g/ml$ の濃度で共存させることで、カルバペネムのMICが4-6管程度低下するなどの結果が得られている(図)。さらに、化合物AとMBLとの共結晶のX線結晶構造解析により、活性中心への化合物Aの詳しい結合状態を解明しつつある。同時に、化合物Aの類縁体や誘導体などを複数入手あるいは新規に合成し、それらの阻害活性パラメーターの測定やドッキング・シミュレーションなどにより、結合形態の推定や阻害様式を解析しつつある。また、マウスを用いた感染実験も実施中である。

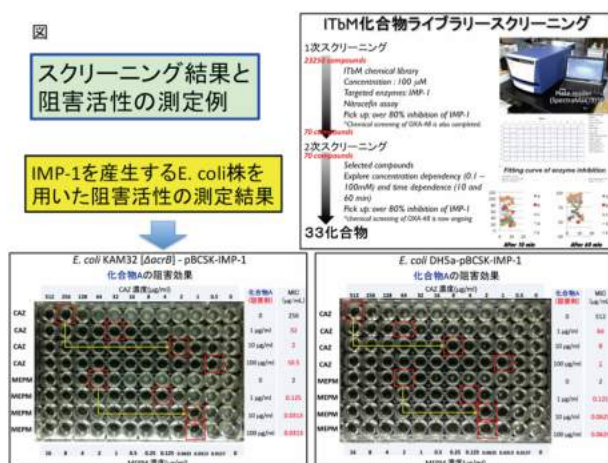
一方、市販の化合物ライブラリーについても、MBL等に対して阻害活性を有する物質の探索を行

い、精製したMBL酵素に対して、強い阻害活性を示す阻害物質Bなどを選択することができた。しかし、阻害物質Bは、精製したMBLに対しては強い阻害活性を示すものの、MBL産生大腸菌株を用いた実験では、メロペネムなどの共存下で阻害活性がはっきり観察できない。おそらく、MBL分子が機能するグラム陰性菌のペリプラズムに到達し難いなどのメカニズムが関係しているものと推定されたため、細菌に取り込まれやすくなるような化学構造の修飾改変などを試みている。

同様に、セリン型カルバペネマーゼであるOXA-48に対して阻害活性を有する化合物をITbM化合物ライブラリーの中から選択しつつ、化合物の電子情報データベースの中から、バーチャルなドッキング・シミュレーションにより、OXA-48を阻害する可能性のある物質を複数選択し、それらの幾つかについて実際に入手して、精製OXA-48に対する阻害活性を測定するなどでも並行して実施した。その結果、精製したOXA-48を阻害する化合物が複数選択されたが、生きたOXA-48産生株を用いた阻害実験では、十分な阻害現象が観察されず、おそらく、グラム陰性菌の外膜の透過性が低いことなどが影響しているものと考えられ、分子構造改変の可能性について検討中である。

まとめ: IMP-1やNDM-1を産生する大腸菌株に

おいて強い阻害活性を示す阻害物質A等を発見した。さらに精製したMBLに対しては強い阻害活性を示すものの、生菌を用いた阻害実験では、十分な阻害現象が観察されない阻害物質B等、またセリン型カルバペネマーゼであるOXA-48の精製酵素に対して阻害活性を示す複数の化合物を見出した。同時にX線結晶構造解析などの手法を用いて、酵素への結合状態の解明および分子改変の可能性の検討などを進めてきた。今後は、MBL酵素への結合親和性がより高くかつグラム陰性菌に取り込まれやすい化学構造を有する阻害物質の作成を目指して研究を進める計画である。(研究協力者:名古屋大学分子病原細菌学/耐性菌制御学 木村幸司、和知野純一)



AMR 関連論文

- Jin W, Wachino J, Yamaguchi Y, Kimura K, Kumar A, Yamada M, Morinaka A, Sakamaki Y, Yonezawa M, Kurosaki H, Arakawa Y. Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum β -lactamase and its inhibition by avibactam and OP0595. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jul 24. In press.
- Norizuki C, Wachino J, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K, Arakawa Y. Specific *bla*_{CTX-M-8}/IncI1 plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* isolates between humans and chickens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May 24;61(6). In press.
- Kawamura K, Sugawara T, Matsuo N, Hayashi K, Norizuki C, Tamai K, Kondo T, Arakawa Y. Spread of CTX-Type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of epidemic clone B2-O25-ST131 among dogs and cats in Japan. *Microb Drug Resist*. 2017 Apr 5. In press.
- Inaba M, Matsuda N, Banno H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Kimura K, Arakawa Y. In vitro reduction of antibacterial activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with host stress hormone norepinephrine. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):680-689.
- Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Jin W, Kimura K, Kurosaki H, Arakawa Y. Structural insights into recognition of hydrolyzed carbapenems and inhibitors by subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jun 20;60(7):4274-82.
- Nakane K, Kawamura K, Goto K, Arakawa Y. Long-term colonization by *bla*_{CTX-M}-harboring *Escherichia coli* in healthy Japanese people engaged in food handling. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jan 8;82(6):1818-27.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

カルバペネマーゼ阻害活性を有する既承認薬をベースとした新たなカルバペネマーゼ阻害薬の開発

AMED 事業名

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

研究班構成

代表機関：名古屋大学

研究開発課題の内容

多剤耐性菌の治療に有効な新しい抗菌性物質の開発と実用化が急務となっている。そこで、FDAやEMA、厚生労働省等が認可している医薬品の中から、カルバペネマーゼ、特にメタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)の阻害活性を有する物質の探索を試みている。MBL阻害活性を有する既承認医薬品が発見された場合、細菌が産生するMBLを阻害するため、多くのカルバペネム系やセフェム系薬の有効性が復活することが期待できる。

そこで、FDAの既承認医薬品ライブラリーなどを入手し、精製したMBLやMBL産生株を用いて β -ラクタム薬共存下で、阻害活性を探索した。その結果、複数の既承認医薬品が、精製したMBLに対し大なり小なり阻害活性を有することが明らかとなった。

しかし、それらの多くは、MBL産生株においては、明確な阻害活性を示さなかった。その理由は、それらの既承認医薬品が、細菌の外膜を透過し難いなどの可能性が考えられた。

ただし、既承認薬の一つである医薬品Cの構造の一部となっている物質C'は、生体内で容易に遊離することがその構造上想定されるが、C'は精製したMBLおよびMBL産生株の双方に対して、阻害活性(IMP-1に対するKiは $2.1 \mu\text{M}$ 、IC₅₀は $8.2 \pm 1.7 \mu\text{M}$)を示すことが観察されたため、C'とMBLとの共結晶のX線結晶構造解析による結合様式の解明とともにC'と β -ラクタム薬とをカップリングした化合物Dの合成を試みている。物質Dを投与することで、細菌が物質Dを取り込み、産生するMBLにより、細菌のペリプラズムにおいて物質Dの β -ラクタム環が開裂して、阻害分子C'が遊離することで、MBLが阻害されるため、MBL産生株に対して既存の多くの既承認セフェム系やカルバペネム系の抗菌活性を復活させることが期待される。(研究分担者: 名古屋大学分子病原細菌学/耐性菌制御学 木村幸司、和知野純一; 研究協力者: 名古屋大学ITbM 佐藤綾人、金城学院大薬学部 黒崎博雅、他)



名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻 分子病原細菌学/耐性菌制御学分野 教授
荒川 宜親

1983年に名古屋大学医学部を卒業後、臨床研修を経て名古屋大学大学院医学研究科病理系細菌学に入学。1989年に博士課程を修了後、同大学医学部細菌学の助手、助教授を経て、1996年に厚生省の国立予防衛生研究所(現在の厚生労働省国立感染症研究)の細菌・血液製剤部長に着任。厚生省の研究所在職中は、各種の新型薬剤耐性菌の研究等に従事。2011年に出身校に戻り、多剤耐性菌を抑制する新規抗菌薬の研究等に従事。

新型多剤耐性菌克服のための 新規阻害物質などの探索

荒川 宜親 名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻

【研究の目的】

カルバペネム系薬のみならず、フルオロキノロン系やアミノ配糖体系などの広範な抗菌薬に多剤耐性を獲得した腸内細菌科細菌(CRE)やアシネバクター属菌(MDRA)などが地球規模で蔓延しつつある。そこで、それらによる感染症に有効な新規の抗菌薬等の開発が急務となっているため、我々は、多剤耐性の主要因子の一つであるカルバペネマーゼを阻害する物質の探索や合成を実施している。

【方 法】

IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)等を精製し、それらを用いて、ニトロセフィンをMBLの基質とし、名古屋大学生命分子研究所(ITbM)の所有する20,000種以上の化合物ライブラリーの中から、MBLを阻害する化合物をPerkinElmer社の自動注入口ボットを用いてハイスループットで選択した。同時に、disk拡散法や微量液体希釈法を応用して、ITbMの化合物ライブラリーや市販の化合物ライブラリーの中から、MBLを阻害する物質を選択した。

選択されたMBL阻害物質については、IMP-1などのMBLとの共結晶を作成し、X線結晶構造解析により、阻害物質がどのようにMBLの活性中心に結合しているかを解析した。同時に、化合物とMBLとのドッキング・シミュレーションを専用解析ソフト(Schrödinger)を用いて実施した。その結果得られた知見に基づいて、阻害物質のMBLとの結合親和性や細菌に取り込まれやすくなるための化学修飾の可能性について検討を行うとともに、実際に新しい構造の化合物を合成したり購入し、MBLの阻害活性等を化学的、細菌学的に測定した。また、セリン型カルバペネマーゼであるOXA-48についても、ITbM化合物ライブラリーからの阻害物質の探索および、化合物の電子情報データベースから得られた情報に基づいてドッキング・シミュレーションを実施し、阻害活性を示すであろう化合物を選択し、それらの幾つかについて実際に入手して、阻害活性などを測定した。

【研究開発のグループ】

 名古屋大学大学院医学系研究科 分子細胞細菌学 / 新薬創製学 研究開発責任者 職 名 准教授 氏 名 荒川 宜親 協 力 者 氏 名 佐藤 健一 氏 名 山崎 孝一	 名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM) 研究開発責任者 職 名 准教授 氏 名 佐藤 健一 協 力 者 氏 名 山崎 孝一	 金城学院大学 薬学部 研究開発責任者 職 名 准教授 氏 名 佐藤 健一 協 力 者 氏 名 山崎 孝一
--	--	--

「阻害物質のスクリーニング」

- ハイスループットスクリーニングによる阻害物質の探索
- 化合物ライブラリーセンターで受託する化合物目録
- 阻害物質のスクリーニング・シミュレーション
- 阻害物質のスクリーニング・シミュレーションで得られた知見を元に、新しい化合物の探索

スクリーニングのイメージ

阻害物質の探索

阻害物質の探索

阻害物質の探索

「新規の阻害物質の分子の探索と精製、結晶化および分子構造の解析」

- 多剤耐性菌のゲノム解析等により、新規阻害物質の候補分子の探索と精製、結晶化、および構造解析
- 阻害物質のスクリーニング・シミュレーション
- 阻害物質のスクリーニング・シミュレーション
- 阻害物質のスクリーニング・シミュレーション

阻害物質の探索

阻害物質の探索

阻害物質の探索

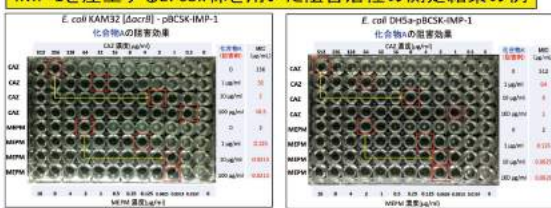
【研究の成果と考察】

23,250種のITbM化合物ライブラリーの中から、特にIMP型などのMBLに対して強い阻害活性(IMP-1に対するIC₅₀は0.22 μM)を示す分子量約300の化合物Aを発見した。IMP-1産生大腸菌などを用い、カルバペネム等の共存下で化合物Aを数μg/mlの濃度で共存させることで、セフトアジム(CAZ)やメロペネム(MEPM)のMICが4-6管程度低下する結果が得られている(図)。さらに、X線結晶構造解析により、活性中心への化合物Aの詳しい結合状態を解明しつつある。同時に、化合物Aの類縁体や誘導体などを複数購入あるいは合成し、それらの阻害活性パラメーターの測定やドッキング・シミュレーションなどにより、阻害様式を解析しつつある。また、マウスを用いた感染実験も実施中である。

一方、市販の化合物ライブラリーについても、阻害活性を有する物質を探索し、精製したMBL酵素(SMB-1)に対して、強い阻害活性を示す化合物Bなどを選択した。しかし、化合物Bは、精製したSMB-1に対しては強い阻害活性を示すが、SMB-1産生大腸菌株では、阻害活性がはっきり観察できない。その理由として、化合物Bはグラム陰性菌に取り込まれ難いなどが推定されたため、細菌に取り込まれやすい構造的改变などを試みている。

同様に、セリン型カルバペネマーゼであるOXA-48に対して阻害活性を有する化合物をITbM化合物ライブラリーから選択しつつ、同時に、パーシャルなドッキング・シミュレーションにより、OXA-48を阻害する可能性のある化合物を複数選択し、それらの幾つかについて実際に入手して、精製したOXA-48に対する阻害活性を測定するなど並行して実施した。その結果、精製OXA-48を大なり小なり阻害する化合物が複数選択されたが、OXA-48産生株を用いた場合は、十分な阻害活性が観察されず、おそらく、グラム陰性菌の外膜の透過性が低いことなどが影響しているものと考えられた。

IMP-1を産生するE. coli株を用いた阻害活性の測定結果の例



今後の発展(future plan)

選択されたMBL阻害化合物について、X線結晶構造解析などの結果を参考に、さらに阻害活性が強い物質や細菌に取り込まれやすい構造の物質へと分子構造の改変を試みる。

AMR関連論文

1. Jin W, Wachiyo J, Yamaguchi Y, Kimura K, Kumar A, Yamada M, Monma A, Sakamaki Y, Yanozono M, Kuroki H, Arahawa Y. Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum β-lactamase and its inhibition by azobactam and OXA-95. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jul 24. In press.
2. Norikazu C, Wachiyo J, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K, Arahawa Y. Specific β -lactamase-mediated plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* isolates between humans and children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May 24;16(5). In press.
3. Kawamura K, Sugawara T, Matsuo N, Hayashi K, Norikazu C, Tani K, Kondo T, Arahawa Y. Spread of CTX-type extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of epidemic clone ST-215-2131 among dogs and cats in Japan. *Microb Drug Resist*. 2017 Apr 5. In press.
4. Inaba M, Matsuda H, Banno H, Jin W, Wachiyo J, Yamada K, Kimura K, Arahawa Y. In vitro reduction of antibacterial activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with heat stress hormone nonglycylserine. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec 43(6):580-585.
5. Wachiyo J, Yamaguchi Y, Mori S, Jin W, Kimura K, Kuroki H, Arahawa Y. Structural insights into recognition of hydrolyzed carbapenems and inhibitors by subclass B3 metallo-β-lactamase SMB-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jun 20;50(7):4274-4282.
6. Nakano K, Kawamura K, Goto K, Arahawa Y. Long-term colonization by β -lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy Japanese people engaged in food handling. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jan 82(1):1818-27.

連絡先、電話番号、e-mail、その他

荒川 宜親 052-744-2106, yarakawa@med.nagoya-u.ac.jp



グラム陰性菌の多剤排出システムと阻害機構

大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野 教授
西野 邦彦

細菌の薬剤排出ポンプは抗菌薬を細菌内から外に輸送する膜蛋白質である。特に、複数の薬剤を排出しているものを多剤排出ポンプと呼び、細菌の多剤耐性の原因になることが知られている。代表的なものとして、大腸菌のAcrBや緑膿菌のMexBなどがある。ゲノムの解析が進むにつれ、各細菌には数多くの薬剤排出ポンプが存在していることが分かってきた。例えば、大腸菌に20個、サルモネラには少なくとも10個の薬剤排出システムが存在していることが実験的に証明されている。X線結晶解析の結果、薬剤排出ポンプの構造が明らかになり、抗菌薬の認識・輸送機構や阻害剤の作用点等が明らかになりつつある。本講演では、グラム陰性菌の薬剤排出システムの薬剤耐性における役割ならびに、抗菌薬輸送機構や阻害機構について紹介したい。

多剤排出ポンプは、細菌の自然耐性と獲得耐性の両方に貢献しており、多くの耐性株においてポンプの発現上昇が確認されている。薬剤排出ポンプはその構造および共役するエネルギーの違いから、ABC、MF、RND、MATE、SMRの5つのファミリーに分類することができる。2015年には新しいファミリーである、PACEが同定された。各ファミリーに保存されているアミノ酸配列から、各細菌のポンプの数を推定することができ、例えば、大腸菌では37個推定遺伝子の内、少なくとも20個が大腸菌の薬剤耐性化に関与していることが実験的に証明されている。また、病原細菌のサルモネラでも少なくとも10個の薬剤排出ポンプが存在している。排出ポンプは、抗菌薬だけではなく、色素、界面活性剤等、構

造的に関連性のない多くの化合物を認識する。特に、大腸菌RND型排出ポンプのAcrBは研究が最も進んでおり、高い相同性を示すポンプとして、緑膿菌のMexB、カンピロバクターのCmeB、アシネトバクターのAdeB、そして淋菌のMtrD等がある。恒常的に発現しているポンプは、細菌の抗菌薬に対する自然耐性に寄与しており、また、ポンプ遺伝子の発現が上昇することにより、細菌の獲得耐性に関与することも分かっている。

2002年にAcrBの結晶構造が報告された。2006年にミノサイクリンやドキシソルビシンとAcrBの共結晶構造解析から、薬物はホモ三量体の内、一つのモノマーだけに結合しており、各モノマーの立体構造が互いに異なっていることが明らかになり、これらは待機モノマー、結合モノマー、排出モノマーと名付けられ、機能的回転機構によって薬物が排出されていることが提唱された。2011年に、エリスロマイシン、リファンピシンといった薬剤は、結合モノマーではなく待機モノマーに結合していることが分かった。これら薬剤の結合部位は、ミノサイクリン・ドキシソルビシン結合部位に比べ、よりポンプの入り口に近い部位に存在していた。各々の結合ポケットは、遠位ポケット、近位ポケットと名付けられた。各ポケットの間はループ構造により仕切られており、近位ポケットに結合する薬剤は、ループのスイングを含む一連の構造変化により遠位ポケットに送り込まれるペリスタポンプ排出機構により抗菌薬が排出されていると考えられる。

既存のポンプ阻害剤として、ピリドピリミジン誘

導体 ABI-PP がある。ABI-PP は、大腸菌 AcrB や、緑膿菌 MexB を阻害するが、多剤耐性緑膿菌で発現している MexY を阻害できない。ABI-PP と AcrB・MexB との共結晶構造解析の結果、ABI-PP は遠位ポケットに結合していることが判明した。しかし、基質薬剤とは異なり、ABI-PP はポケットから分岐した疎水性の狭い領域に突き刺さるような状態で結合していた。ABI-PP は、疎水性ピットに強く結合し、ポンプの機能的回転ペリスタポンプの運動を抑制していることが示唆された。AcrB および MexB の阻害剤結合ピット中腹にあるフェニルアラニンが、MexY では、より側鎖の大きいアミノ酸であるトリプトファンに置換されている。モデリング解析と変異体解析の結果、この大きな側鎖存在が、立体障害を引き起こし、ABI-PP が MexY に結合できないと考えられ、阻害特異性は、結合ピット内部のごくわずかな立体障害によって決まることが示された。これら結果は、立体障害を回避する誘導体の設計に役立ち、複数のポンプの活性を抑制することのできるユニバーサル阻害剤の開発につながる。

薬剤排出ポンプは阻害剤開発の魅力的なターゲットであり、耐性の軽減や、既存の抗菌薬を再利用することにもつながると考えられる。また、薬剤排出ポンプはバイオフィーム形成等の生理機能に関与していることも報告されており、阻害剤は、これらの現象も軽減する効果が期待できる。グラム陰性菌では、

菌体内に複数の RND 型排出ポンプが存在するため、臨床応用のためには、複数の主要なポンプの機能を同時に阻害できる化合物の開発が必要と考えられる。

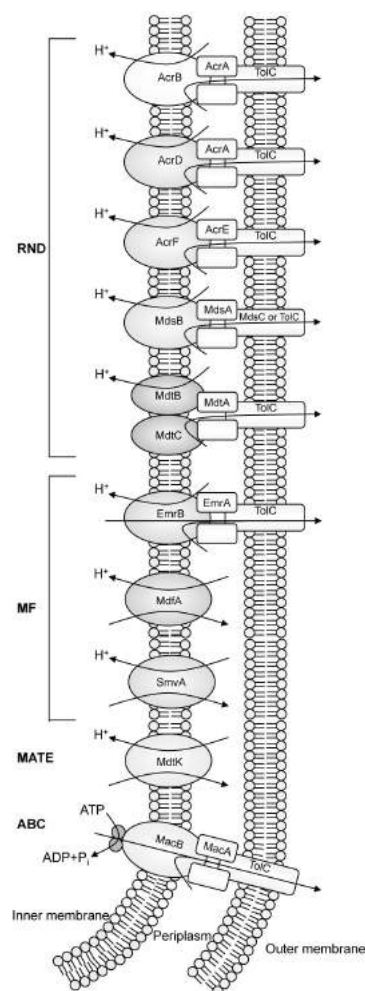


図. サルモネラに存在する薬剤排出システム群. サルモネラには 10 個の薬剤排出トランスポーターが存在している。(図は、Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Antimicrob Chemother 65 :1372-1376, 2010 を改変)。

AMR 関連論文

1. Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Yamasaki S, Fujioka T, Hayashi K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, **Nishino K**. J Infect Chemother. 2016;22:780-784.
2. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. Yamasaki S, Nikaido E, Nakashima R, Sakurai K, Fujiwara D, Fujii I, **Nishino K**. Nat Commun. 2013;4:2078.
3. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, **Nishino K**, **Yamaguchi A**. Nature. 2013;500:102-6.
4. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, **Nishino K**, **Yamaguchi A**. Nature. 2011;480:565-9.
5. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Nishino K**, Latifi T, Groisman EA. Mol Microbiol. 2006;59:126-41.
6. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. **Nishino K**, **Yamaguchi A**. J Bacteriol. 2001;183:5803-12.

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

細菌多剤排出ポンプ阻害剤開発に関する研究

AMED 事業名

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

研究班構成

代表機関：大阪大学

研究開発課題の内容

多剤排出ポンプは複数の抗菌薬を菌体外に排出することにより、細菌の多剤耐性化に関与している。これらポンプは、抗菌薬に対する細菌の自然抵抗性と獲得耐性の両方に関与していることが知られている。我々は、これまで、ポストゲノム解析から数多くの多剤排出ポンプを実験的に同定し、各多剤排出ポンプ発現による細菌の薬剤耐性パターンを明らかにしてきた。多剤排出系を標的とする薬剤は、多剤耐性を克服することのできる、全く新しい可能性を秘める創薬のターゲットとしても注目される。そこで、本研究計画では、これまでに構築した排出ポンプ発現系と化合物ライブラリを利用したスクリーニングで、細菌の薬剤感受性を高めることを目的とした多剤排出ポンプ阻害剤候補化合物を取得する。多剤排出ポンプを阻害することにより、抗菌

薬の細胞内蓄積量を増やし、阻害剤と併用することで、従来よりも低濃度での抗菌薬による細菌感染症治療が可能になると考えられる。臨床分離株を用いて、得られた排出ポンプ阻害剤の効果についても検証し、実用可能性が高い候補化合物の取得を目指す。多剤排出ポンプを阻害することにより、抗菌薬との併用で、多剤耐性を軽減して治療する既存の抗菌薬を有効利用する感染症治療につながると期待される。



大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野 教授
西野 邦彦

大阪大学産業科学研究所教授。98年京都薬科大学卒。00年大阪大学薬学研究科修士課程修了。03年同博士課程修了。01年JSPS特別研究員(DC・PD) この間ワシントン大学医学部に留学。05年大阪大学産業科学研究所特任助手。06年JSTさきがけ研究者(兼任)。07年助教。09年准教授。15年現職。細菌の多剤耐性を軽減させる新しい薬を創ることを目指している。

【研究概要】多剤排出ポンプは複数の抗菌薬を菌体外に排出することにより、細菌の多剤耐性化に関与している。これらポンプは、抗菌薬に対する細菌の自然抵抗性と獲得耐性の両方に関与していることが知られている。我々は、これまで、ポストゲノム解析から数多くの多剤排出ポンプを実験的に同定し、各多剤排出ポンプ発現による細菌の薬剤耐性パターンを明らかにしてきた。多剤排出系を標的とする薬剤は、多剤耐性を克服することのできる、全く新しい可能性を秘める創薬のターゲットとしても注目される。そこで、本研究計画では、これまでに構築した排出ポンプ発現系と化合物ライブラリを利用したスクリーニングで、細菌の薬剤感受性を高めることを目的とした多剤排出ポンプ阻害剤候補化合物を取得する。

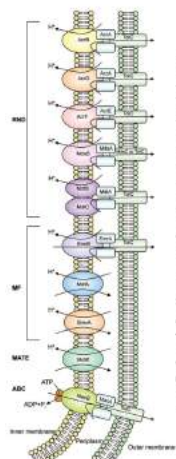


図1 サルモネラに存在する薬剤排出ポンプ群
サルモネラには10個の薬剤排出ポンプが存在している。各薬剤排出システムの構造と膜上での位置を示す(図は、Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Antimicrob Chemother 65:1372-1376, 2010を改変)。

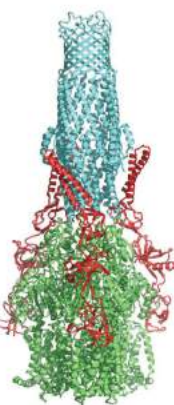


図2 大腸菌薬剤排出システムAcrAB-TolCの複合体モデル
内膜に存在する薬剤排出ポンプAcrB(緑)と外膜蛋白質TolC(水色)、ペリプラズムに存在するAcrA(赤)が複合体を形成して機能していると考えられる。図は別々に解かれた各蛋白質結晶構造を組み合わせたもの(西野邦彦, 薬剤排出トランスポーターの機能と制御. 化学療法の領域29: 81-89, 2013)。

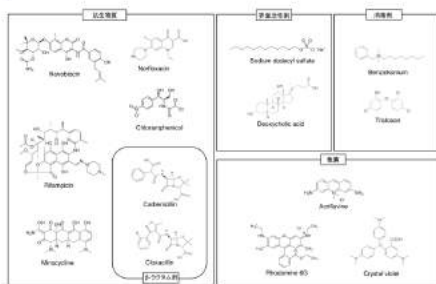


図3 多剤排出タンパクの基質の一例
大腸菌多剤排出システムAcrAB-TolCの基質の一例を示す。構造に関与しない多くの抗菌薬・毒物を認識して排出することにより細菌の多剤耐性化に関与している(西野邦彦, 細菌の薬剤排出タンパクと生存戦略. 感染・炎症・免疫41:335-338, 2011)。

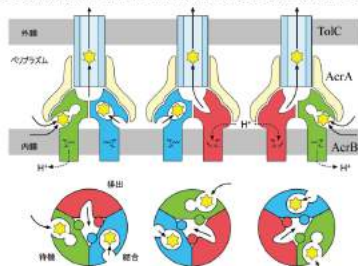


図4 薬剤排出システムAcrAB-TolCによる薬剤輸送機構
AcrBポンプはプロトン駆動力として薬剤をペリプラズムもしくは内膜から取り込み、排出していると考えられる。AcrB三量体の各モノマーは、それぞれ異なる構造であり、待機→結合→排出の順番で薬剤を輸送している。薬剤認識ポケットは入り口側に存在する近位ポケット(待機モノマー)と出口側に近い遠位ポケット(結合モノマー)の二つが存在することが分かった。エリスロマイシン(分子量734)やリファンピシン(分子量823)といった比較的大きな分子量の薬剤は、一旦、近位ポケットに結合した後で、遠位ポケットに送り出されるというペリスタポンプの機構によって輸送されていると考えられる(Nakashima R et al. Nature 480:565-569, 2011)。

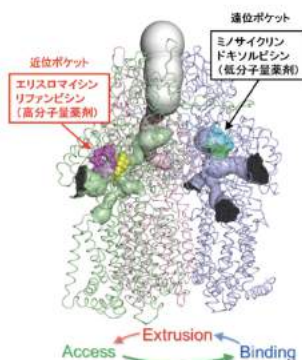


図5 基質結合型AcrBの三量体構造
RND型薬剤排出ポンプ大腸菌AcrBは、ホモ三量体を形成しており、運動した構造変化(機能的回転)によって、各モノマーに存在する2つの基質結合ポケットを介しペリスタポンプ機構により薬剤を排出する(Nakashima R et al. Nature 480:565-569, 2011)。

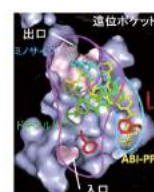


図6 薬剤排出ポンプ基質と阻害剤ABI-PPの結合様式の違い
阻害剤ABI-PPは、基質輸送経路(紫色)から分岐した疎水性の狭い領域(水色)に深く入り込んで結合しており、阻害剤結合ポケットの存在が確認された(Nakashima R et al. Nature 500:102-106, 2013)。

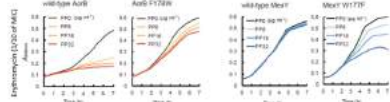
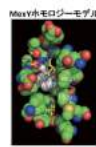
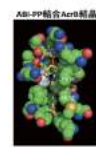


図7 阻害剤結合ポケットの比較と増殖曲線測定による変異体解析
ABI-PP結合AcrB結晶中のABI-PPを黄色で示す。MexYホモロジーモデルにはMexB結合型ABI-PP(黄色)を重ね合わせている。増殖曲線測定は、AcrB・MexB・MexYの基質薬剤である抗菌薬エリスロマイシンを一定濃度加えた条件で行い、ABI-PP(PP)の添加による各トランスポーター発現株の増殖抑制を調べたものである(Nakashima R et al. Nature 500:102-106, 2013)。



【達成目標と展望】多剤排出ポンプを阻害することにより、抗菌薬の細胞内蓄積量を増やし、阻害剤と併用することで、従来よりも低濃度での抗菌薬による細菌感染症治療が可能になると考えられる。臨床分離株を用いて、得られた排出ポンプ阻害剤の効果についても検証し、実用可能性が高い候補化合物の取得を目指す。多剤排出ポンプを阻害することにより、抗菌薬との併用で、多剤耐性を軽減して治療する既存の抗菌薬を有効利用する感染症治療につながると期待される。

新規抗生物質ライソシンの開発

帝京大学医真菌研究センター 教授 関水 和久
帝京大学医真菌研究センター 准教授 浜本 洋

多剤耐性菌(MAR)の蔓延は世界の保健衛生における深刻な問題である。多剤耐性菌に対抗するため新規抗生物質の開発が必要とされている。しかしながら、既存の手法による天然物からの治療効果を有する化合物の発見は、徐々に困難になってきている。その理由の1つとして、既存の抗菌活性を指標とした探索では既知の抗生物質の再発見率が高いこと、さらに、たとえ新しい化合物を見いだしたとしても治療効果を示すものはごく僅かであるためである。実際に、開発に値する医薬品の候補化合物が得られるのはきわめてまれである。そこで、カイコ細菌感染モデルにおける治療効果を指標とした新規抗生物質の探索系を確立し、実際に新規抗生物質ライソシンEを同定した。本講演では、ライソシンEの発見に至る経緯と、そのメカニズムについて中心に、本支援によって得られた成果もあわせて報告する。

カイコモデルでの治療効果を指標とした探索によるライソシンEの発見

カイコモデルは哺乳動物と異なり、コストの安さと、倫理的な問題がないため、多数の個体を利用した実験が可能である。飼育のための設備も、インキュベーター1つあればよく、マウスのように大掛かりな飼育設備は不要であるため、大きな設備投資をせずに研究をスタートできる。また、カイコの特徴として、一つの箱に多頭飼育しても問題なく、卵から約3週間という短時間で多数の個体を準備することができる。さらに、カイコは、高度に家畜化されており動きが遅いこと、及び、人間の手で扱うにはちょうどよ

い大きさであるため実験が容易である。さらに、活性の有無が不明な粗抽出液を投与も可能である。これらの特徴により、治療効果を指標とした探索が可能となっている。

さらに、カイコは哺乳動物と同等な薬物代謝に関わる臓器を備えており、抗生物質の体内動態もよく一致している。従って、カイコを用いて抗生物質の治療効果を定量的に評価でき、かつ、体重あたりの治療に必要な薬剤量もほぼ同等である。そこで、我々は上記のカイコモデルの利点を生かし、治療効果を指標とした抗生物質の探索を行った。日本全国から土壌を採取し、土壌細菌を1.5万株分離した。それらの培養上清を調製し、MRSAに対して抗菌活性を示したサンプルについて、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果を検討した。その結果、20株以上の培養上清がカイコモデルにおいて治療効果を示した。それらについて、治療効果を指標に精製したところ、沖縄の土壌より分離したRH2180-5株の培養上清から、新規抗生物質ライソシンを同定した(図1)。ライソシンEは、臨床分離されたMRSAに対して検討した限りすべての株に対して抗菌活性を示した。また、ライソシンEはマウス全身感染モデルでもMSSA株だけでなくMRSA株に対してもきわめて良好な治療効果を示した。その治療効果の発揮メカニズムの一端として、宿主因子による抗菌活性の亢進が寄与していることがわかっており、現在メカニズム解析を実施している。

ライソシンEの菌を殺す新しいメカニズム

RH2180-5株は9種のライソシンを生産しているが、どれも抗菌活性は同じであった。そこで、最も生産量が多かったライソシンEを用いて、その作用機序を解析することとした。他の抗生物質とは異なるライソシンEの特長として、その強力な殺菌活性が挙げられる。ライソシンEはMRSAを含む検討したどの黄色ブドウ球菌株に対しても1分以内に99%以上を殺菌するという、短時間で強力な殺菌活性を示した。しかしながら同じ膜破壊によって殺菌する消毒剤とは異なり、その作用は極めて特異的であり、細胞障害性は低い。我々の研究から、ライソシンEは細胞膜中のメナキノンと相互作用を示し、膜傷害性により、殺菌することを明らかにしている。メナキンは黄色ブドウ球菌など一部のグラム陽性細菌が、唯一の電子伝達系の補酵素として利用する。ヒトなどの真核生物ではユビキノンが電子伝達系の補酵素として利用されており、ライソシンE

はユビキノンとは相互作用を示さないことから、ライソシンEの選択毒性が説明できる。細胞膜中の低分子化合物と特異的に相互作用を示し、膜障害によって速やかな殺菌活性を示す化合物は、ライソシンEが初めてである。現在、本助成を受け、ライソシンEの臨床応用に向けた試験研究を実施している。

カイコの抗生物質探索における有用性

カイコモデルで見いだされた新規の抗生物質はライソシンEだけでない。化合物ライブラリーからは治療効果を示す新規抗菌化合物を3化合物見いだしており、さらにアステラス製薬の中村らによって新規抗真菌薬ASP2397が見いだされたりしている。従って、ライソシンEは決して偶然の産物ではなく、カイコを用いることによって新規の治療効果を有する抗生物質を効率的に見いだすことができると考えられる。

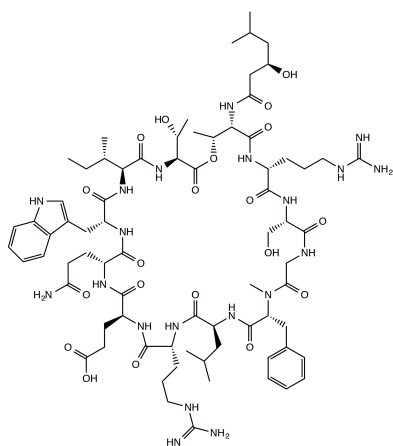


図1. ライソシンEの構造

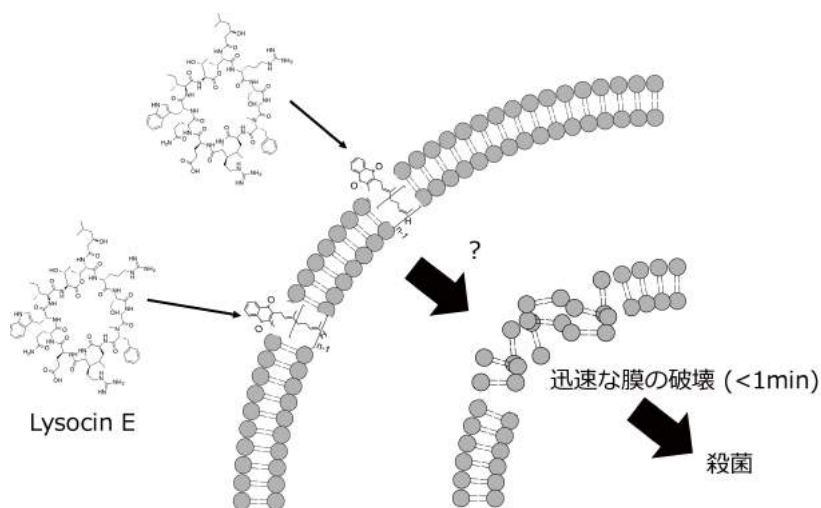


図2. 推定されるライソシンEの作用機序

AMR 関連論文

- 1) Paudel A., Hamamoto H., Panthee S., Kaneko K., Matsunaga S., Kanai M., Suzuki Y., Sekimizu K., *Front Microbiol.* **8**, 712 (2017).
- 2) Panthee S., Hamamoto H., Suzuki Y., Sekimizu K., *J Antibiot (Tokyo)*, **70**, 204-207 (2017).
- 3) Nakamura I., Kanasaki R., Yoshikawa K., Furukawa S., Fujie A., Hamamoto H., Sekimizu K., *J Antibiot (Tokyo)*, **70**, 41-44 (2017).
- 4) Murai M., Kaji T., Kuranaga T., Hamamoto H., Sekimizu K., Inoue M., *Angew Chem Int Ed Engl*, **54**, 1556-1560 (2015).
- 5) Hamamoto H., Urai M., Ishii K., Yasukawa J., Paudel A., Murai M., Kaji T., Kuranaga T., Hamase K., Katsu T., Su J., Adachi T., Uchida R., Tomoda H., Yamada M., Souma M., Kurihara H., Inoue M., Sekimizu K., *Nature chemical biology*, **11**, 127-133 (2015).

AMED 支援課題紹介

AMED 支援課題名

新規抗生物質「ライソシン (カイクシン)」の開発-製造法確立及び導出パッケージデータ作成-

AMED 事業名

創薬支援推進事業

研究班構成

代表機関：帝京大学

研究開発課題の内容

本研究開発では、新規の作用機序解析により細菌に選択的なメカニズムより、バンコマイシンを初めとする既存の抗MRSA用抗生物質に対し多剤耐性菌に有効な新規抗生物質ライソシンEの開発を目指す。本研究では、ライソシンEの治療効果を示すメカニズムの解析と、創薬に向けた検討を実施する。メカニズム解析については、ライソシンEが宿主因子によって抗菌活性が活性化されるメカニズムの解析、及び、ライソシンEの殺菌に至らしめるメカニズムについて検討する。創薬に向けた検討については、生産株の化合物生産性の改良を行い、さらにその生産物を利用して薬効薬理試験を実施する。薬効薬理試験では、溶解性などの物性試験を行い、抗菌スペクトラムの確認、及び、臨床分離MRSAに対する抗菌活性、殺菌活性、及び治療効果の評価を

実施する。また、変異源試験、及び単回及び反復投与毒性試験などの安全性試験を行う。さらに、ライソシンEの動物個体における薬物動態試験を計画している。



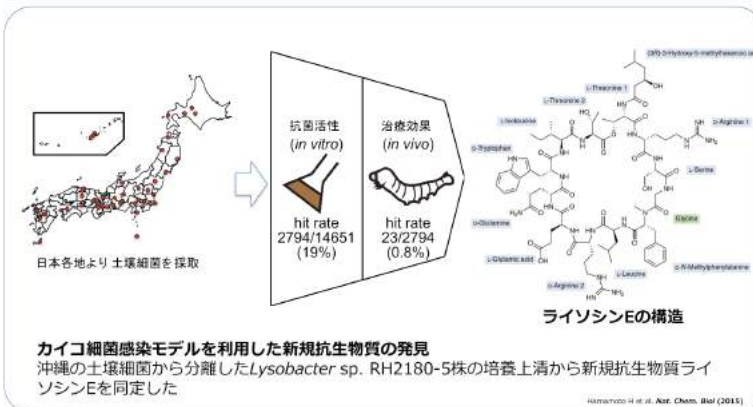
帝京大学医真菌研究センター 教授

関水 和久

1974年東京大学薬学部卒業、79年同大学院博士後期課程修了、薬学博士。84年米国スタンフォード大学医学部博士研究員、87年東京大学薬学部助教授、92年九州大学薬学部教授、99年東京大学大学院薬学系研究科教授。16年帝京大学医真菌研究センター教授。00年株式会社ゲノム創薬研究所を創立。現在同顧問。

ライソシンEの特長

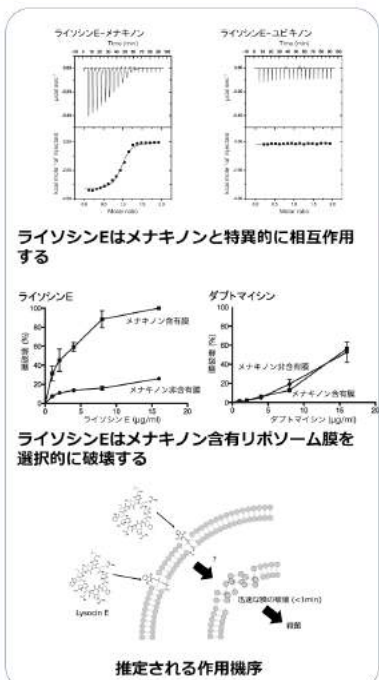
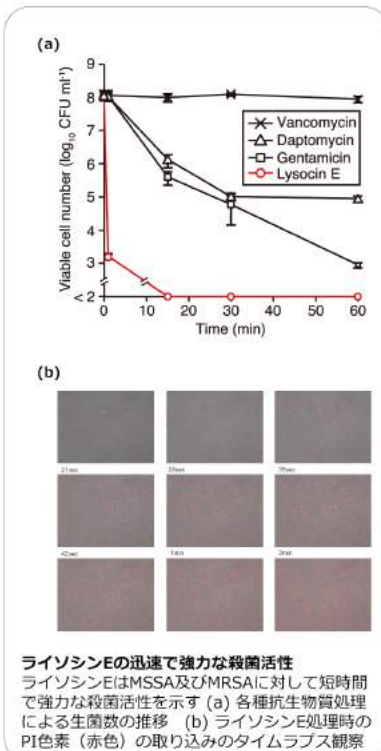
- ・ MRSA及びVRSAなどの多剤耐性菌を含むグラム陽性細菌の一部に有効
- ・ MRSAに対する良好な治療効果
- ・ メナキノンを経路とする新規作用機序
- ・ 膜障害性を伴う迅速で強力な殺菌活性
- ・ 宿主因子によって抗菌活性が亢進



菌名	MIC (μg/mL)	
	Lysocin E	Vancomycin
グラム陽性菌	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (JCM114)	0.5
グラム陰性菌	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>100

ライソシンEのスペクトラム
ライソシンEはグラム陽性細菌の一部、及び抗酸菌に対して抗菌活性を示す

Hamamoto H et al. *Ant. Chem. Biol.* (2015), *Int. J. Antib.* (2017)



	抗菌活性		治療効果	
	MIC (mg/L)	MH培地	ED ₅₀ (mg/Kg)	マウス/s.c.
ライソシンE	4	0.5	0.5	
バンコマイシン	1	5.8		

ライソシンEのマウス全身感染モデルにおける治療効果

(a) MIC (μg/mL)

	ライソシンE	ダフトマイシン	バンコマイシン
濃縮なし	2	0.5	0.5
10%ウシ血清	< 0.1	1	1
10%ウシ血清	< 0.1	0.5	0.5
10%マウス血清	< 0.1	1	1
10%マウス血清	< 0.1	1	1
10%ヒト血清	< 0.1	1	1
10%カイク血清	0.5	0.5	0.5

(b) MIC (μg/mL)

Microorganism	MH	MH+10% serum	Reducing fold
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA1	4	0.15	32
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA4	4	0.25	16
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	2	0.25	8
<i>Staphylococcus hemolyticus</i> JCM114	2	0.008	250
<i>Staphylococcus simulans</i> JCM2424	4	0.5	8
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> JCM17571	4	0.15	30
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2409	2	0.25	8
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037	2	0.5	4

血清添加によるライソシンEの抗菌活性の亢進
(a) 各種動物の血清の黄色ブドウ球菌に対する効果、(b) ウシ血清の各種菌種に対する効果

第三部 新たな動きについて

■ 座長紹介



国立感染症研究所 所長

倉根 一郎

昭和53年東北大学医学部を卒業し神経内科にて研修、昭和58年より平成7年5月まで米国マサチューセッツ大学医学部内科感染症免疫学部門において講師、助教授、准教授を務めた後、平成7年近畿大学医学部細菌学講座教授、平成10年国立感染症研究所ウイルス第一部長、平成22年同副所長、平成27年より同所長を務めている。現在、日本ウイルス学会理事長、厚生科学審議会感染症部会長等も務めている。

平成28年2月、国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議より「国際的に脅威となる感染症対策の強化に関する基本計画」、また同年4月「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が発出されました。このような流れの中で、私が所属する国立感染症研究所においては、平成29年4月1日、薬剤耐性研究センターが設立されました。新センターの設立は、国立感染症研究所として薬剤耐性の研究をより重要なものにとらえ、これまで以上に薬剤耐性の研究・業務に力を注いでいく決意を強く内外に示すものであります。国立感染症研究所においては、それまでも薬剤耐性に関する研究、国の施策に対する貢献が行われてきており、特に、平成12年に開始され、国立感染症研究所が事務局を務めている厚生労働省院内感染サーベイランス事業(JANIS)は近年その評価が非常に高くなっています。JANIS事務局は今回設立された薬剤耐性センターに移動していますが、それに加え、薬剤耐性の解析や制御に関する研究、ゲノム研究等多面的な方向性をもった研究が行われます。国立感染症研究所は、今後もこれまで以上に薬剤耐性の研究を進め、国の薬剤耐性菌対策に大きな貢献を行うべく取り組んでいきます。

AMEDのAMR関係の創薬研究支援



AMEDでは、平成27年4月の発足以来、感染症実用化研究事業、感染症研究国際展開戦略プログラム、創薬基盤推進研究事業、創薬総合支援事業等を通じて、薬剤耐性(AMR)対策につながる数々の研究支援を行ってきました。平成28年4月、「国際的に脅威となる感染症対策閣僚会議」において「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン2016-2020」が策定され、AMEDにおいても、AMR対策につながるさらなる研究支援強化が叫ばれる状況となりました。

そうした中、平成29年度、AMEDは新規事業である「感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE)」や「医療研究開発革新基盤創成事業 (CiCLE)」においてAMR関連研究課題を複数採択し、アクションプラン推進の加速化をはかっています。また、抗菌薬開発は市場規模に比して臨床試験の負担が大きく企業のインセンティブにつながりにくいという現状があることから、臨床試験負担の軽減、ひいては当該領域の規制要件の緩和の根拠となるような科学的データ創出という新たな研究テーマでも支援を行っています。

本シンポジウム第三部では、AMEDにおけるAMR研究支援のこうした「新たな動き」に関わる最新の情報を紹介します。

細菌の酸化ストレス耐性を標的とした新規治療戦略の開発

熊本大学 大学院生命科学研究部(医) 教授
澤 智裕

近年、薬剤耐性菌の世界規模での蔓延が大きな問題となり、新しい抗菌剤の開発が益々重要となってきた。活性酸素は、その化学的な反応性の高さから、生体内に過剰に生成すると、DNA 損傷やタンパク質や脂質の酸化をもたらす、生体に酸化ストレスが誘導される。細菌感染の場合においては、マクロファージなどの免疫担当細胞が活性酸素を殺菌作用に利用している。また、殺菌作用のある抗菌剤で処理した菌体内では、活性酸素が生成され、それが菌の酸化ストレスを誘導して抗菌薬の作用を相乗的に高めていることが明らかとなってきた。そのため、細菌のもつ酸化ストレス耐性を選択的に減弱させることができれば、免疫システムあるいは抗菌剤による殺菌作用の増強が期待される。しかしながら、これまでに細菌の酸化ストレス耐性に特異的な阻害剤は知られていない。本研究は、細菌の酸化ストレス耐性を標的とするこれまでにない抗菌戦略の開発を目的としている。具体的には、菌体内のシステインを選択的に欠乏させることにより、抗酸化分子であるグルタチオンの枯渇を誘導し、細菌を活性酸素に脆弱にさせる。

興味深いことに、グラム陰性・陽性を問わず多くの細菌は、哺乳細胞とは異なるシステイン合成経路を利用してシステインを合成している(図1)。細菌はセリンからアセチルセリンを経て、システインを合成している。実際、この経路の2段目を触媒す

る CysK を欠損した大腸菌では、野生型に比べてその増殖が著しく抑制される(図1)。本研究では、この細菌に固有のシステイン合成経路に対する阻害剤を、化合物ライブラリーからのスクリーニングにより探索する。

細菌は自身でシステインを合成する他に、環境からシスチン(システインの酸化体)を取り込み、増殖に利用できる。そこで、本研究ではこのシスチントランスポーターの阻害剤も合わせて化合物ライブラリーから探索する。システイン合成と取り込みの両者を阻害することで、システインを完全に枯渇させるアプローチの確立を目指す。本研究ではさらに、このようにして細菌に酸化ストレス耐性の脆弱をもたらすことにより、従来の抗菌剤の活性も高められるかどうかの検証も行う。本研究により、細菌のシステイン欠乏をもたらす阻害剤の抗菌作用が明らかにされれば、既存の薬剤に耐性となった細菌に対しても展開できる切れ味の鋭い抗菌剤の開発へと繋がることが期待される。さらに既存の抗菌剤の作用を高めるブースター効果が証明できれば、新たなコンビネーション療法の提案へと展開でき、既存抗菌薬を再活用することによる医療経済的な貢献も期待される。

本シンポジウムでは、AMED J-PRIDE 研究にて支援を受けている我々の取り組みについて、これまでに得られた予備的な知見を合わせて報告する。

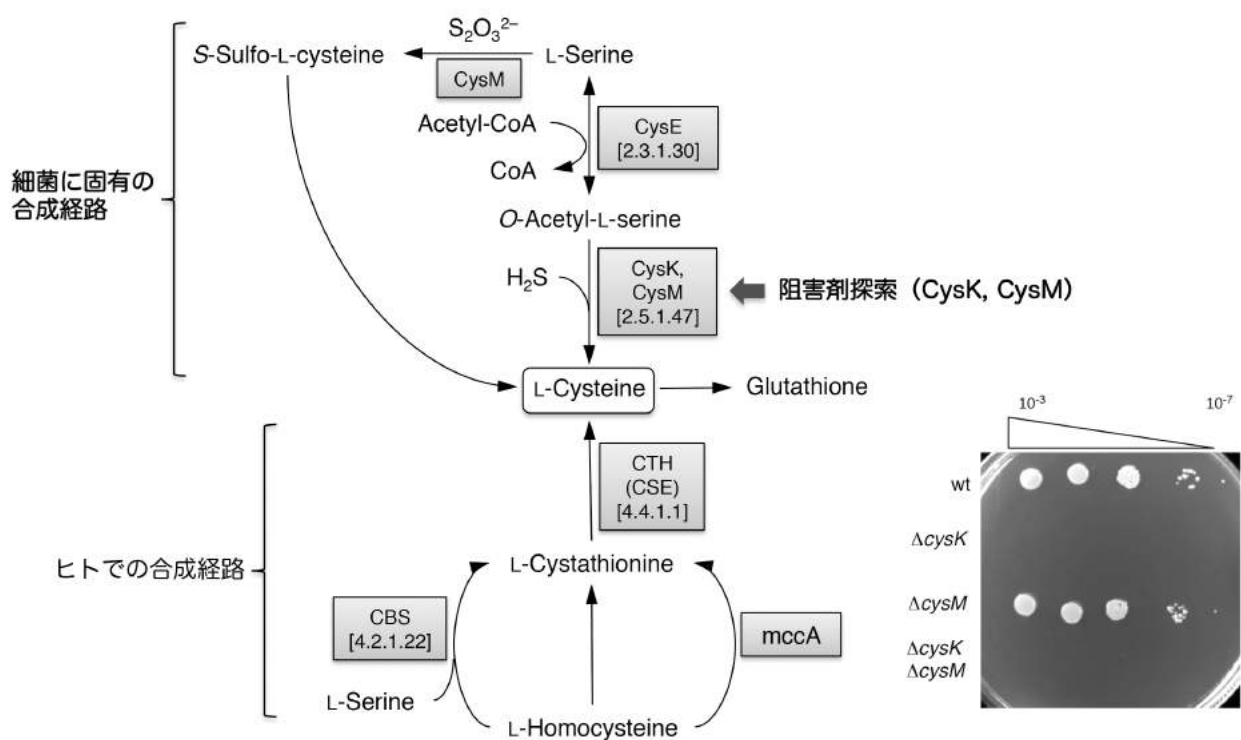


図1. 細菌とヒトでのシステイン合成経路の違い. インセットは、大腸菌の野生型 (wt) およびシステイン合成酵素欠損株 (CysK, CysMおよび両欠損株) のM9培地上での増殖. CysK欠損株では野生型株に比べて増殖が著しく抑制される.



熊本大学 大学院生命科学研究部(医) 教授

澤 智裕

1991年鹿児島大学工学部応用化学科卒業、1996年京都大学大学院工学研究科博士課程単位取得退学、博士(工学)。1996年熊本大学医学部助手、2000年文部省在外研究(米国NCI)、2002年WHO国際癌研究機関(IARC)科学官。2007年熊本大学大学院医学薬学研究部准教授。2011年JSTさきがけ「慢性炎症」兼任研究員。2015年東北大学大学院医学系研究科准教授。2016年9月より現職。

薬剤耐性(AMR) 菌感染症治療薬を目的とした創薬研究

大日本住友製薬株式会社 創薬開発研究所 スペシャリティ医薬グループ グループマネージャー
日高 淳

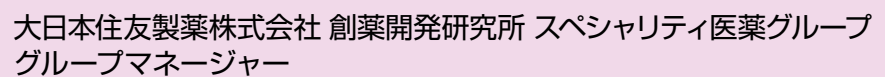
抗菌薬に対する耐性菌の出現と蔓延は世界的な問題であり、何も対策をとらなければ2050年に耐性菌感染症で死者1千万人/年、経済損失100兆ドルが予測され、WHOを中心として国家・国際レベルでの対策が必要とされている。しかしながら、新薬開発は停滞しAMRに対する対抗手段が枯渇している状況である。

当社の感染症領域の研究としては、エノキサシンやスパルフロキサシンなどのキノロン系抗菌薬、アパルシリン、セフピラミドやメロペネム、SMP-601(Razupenem)などの β -ラクタム系抗菌薬の創薬研究を実施してきた。その後、治療満足度の高まりと国内市場の縮小に伴い、リポソーム化アムホテリシンBやセフトロリンといった海外承認済みの導入品の国内開発へシフトしたものの、メロペネムやアムビゾームの製品支援を中心とした研究は継続してきた。

2016年5月に開催された伊勢志摩サミットにおいて薬剤耐性(AMR)の対策を強化する「伊勢志摩首脳宣言」が発表され、AMR対策アクションプランの1つにAMEDを中心とした研究開発促進が盛り込まれた。また、AMEDでは550億円の補正予

算を利用した新たな産学官提携:医療研究開発革新基盤創成事業(Cyclic Innovation for Clinical Empowerment; CiCLE)を公募し(本年3月)、感染症治療薬に関する応募も期待していると推察された。米国では優先審査や独占販売期間延長といった抗生物質開発インセンティブ法(GAIN act法)が2012年に制定され、創薬促進検討委員会の新薬促進に向けた8学会提言において日本版GAIN act法の制定を提案していただいている状況である。このような環境変化によって、薬剤耐性菌感染症治療薬の創薬研究を再度実施できると捉え、「薬剤耐性(AMR) 菌感染症治療薬を目的とした創薬研究」という課題名でCiCLEに応募し、本年7月に採択された。産官学オールジャパン体制による本取り組みによって画期的な治療薬を提供し、我が国のAMR対策アクションプランの達成、グローバルヘルスの向上や経済損失の防止に寄与することを目指している。

本講演では、AMRに関する医療現場からの期待、創薬研究に関する企業から見た問題点と決意、AMEDや政府への要望を中心に紹介させて頂く。



1994年3月に大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻を卒業し、大日本住友製薬株式会社に入社しました。2012年より薬理研究グループのグループマネージャーとして現職にあります。熊本大学およびNational Heart and Lung Institute(インペリアル・カレッジ・ロンドン)への派遣研究を経験し、主に免疫領域をバックグラウンドとした創薬研究に従事しています。

新規治療薬開発のためのモデル構築

東邦大学微生物・感染症学講座 教授
石井 良和

抗菌薬の開発に多大な費用を要することは周知のとおりである。特に開発のための費用が嵩む原因の一つが、有用性と安全性を確認するための臨床試験にある。抗菌薬は、数日から長くても数か月間で投与が完了するという特性を有する薬である。したがって、新規抗菌薬を開発しても、開発経費が回収されるまでに特許の存続期間が切れてしまう可能性があり、他の医薬品と比較すると採算性が高くない事業である。したがって、抗菌薬開発から撤退した製薬企業が少なくない。これは日本のみの問題ではなく、諸外国においても同様の問題を抱えていた。しかし、欧米では、法整備や抗菌薬開発の支援など国レベルでの対応が進められてきた。その結果、米国では2020年までに10種類の新たな抗菌薬を開発するという、“10×20”の目標が達成されようとしている。

米国ではそれに加えて、ヒトの薬物動態パラメータをもとに*in vitro*の試験でヒトに対する薬剤の投与量や投与間隔を設定するための新たなモデルを構築し、実際に抗菌薬開発に応用している。このモデルは*in vitro*と*in vivo*を繋ぐことが期待される。Hollow-Fiber Infection Model (HFIM)と呼ばれているこのシステムは、これまでに使われてきたChemostat Model(CM)にHollow-Fiber Cartridge(透析カートリッジ)を接続したシステムである。HFIMがCMと比較して優れている点は、2週間程度の期間、繰り返し抗菌薬が投与された状況を再現することができることである。そして、HFIMは、無菌的且つ継続的に抗菌薬

に暴露された供試菌株を採取して供試菌の消長を観察することができる。さらに、Cmax/MICやAUC/MIC、time above MICと言った薬動学的(pharmacodynamics: PD)パラメータの何れと相関が認められるのかについて解析することが可能である。その結果、供試菌株の再増殖が認められない、適切な抗菌薬の投与量と投与法を提案することが可能である。

抗菌薬を阻害剤や他の抗菌薬との併用療法の多剤耐性菌などに対する有用性が議論されている。これまで抗菌薬の併用効果の評価は、チェッカーボード法やブレイクポイントチェッカーボード法、継続的な菌量の推移の観察などによって行われてきた。しかし、これらの方法は、供試菌株を一定濃度が組み合わせられた薬剤含有培地に16から20時間、暴露した後に菌の発育の有無を確認するものである。長時間にわたる点滴投与を除けば、生体内で一定濃度の抗菌薬が長時間持続することはない。しかし、HFIMを使えば、複数の抗菌薬の併用効果も生体内における抗菌薬の血中濃度推移をシュミレーションした環境下における菌の消長を観察することが可能となる。

HFIMは、欧米では抗菌薬開発の際にこのモデルが活用されている。残念ながら、現時点まで本邦でこのシステムを導入した施設はない。今回、私たちは、欧米と同様、よりコンパクトな抗菌薬の開発の支援の目的および感染症治療時の抗菌薬選択のために使われる臨床的ブレイクポイント(BP)の提案を支援するために、HFIMを導入するに至った。こ

れまでに私たちの教室は、国内外の臨床材料から分離された菌株を約20,000株収集している。このうちの約半数が何らかの耐性因子保有株である。これらの菌株とHFIMを組み合わせれば、抗菌薬の開発はもとより、既存の抗菌薬の効果的な使用法の提案あるいはより臨床に適したBPを提案などが可能となる。その結果、耐性菌治療法の構築や耐性菌を生み出しにくい抗菌薬の投与設計を推進することが可能となると考えている。これらは薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン(2016-2020)の理念にも合致すると考えている。

当教室の特徴の一つとして、次世代シーケンサーを用いた細菌の全ゲノム解析の経験が豊富であることが挙げられる。抗菌薬を暴露したにも拘らず、再増殖した菌株と最初に接種した菌株の全ゲノム解析を実施すれば、突然変異が生じた遺伝子を特定することができる。突然変異が生じることで生存に不利になる変異と不利にならない変異があり、それぞれフィットネスクストが高い変異と低い変異と呼ばれている。このフィットネスクストを類推することで、抗菌薬の使用に伴って突然変異株の増加を予測することが可能である。当教室では、突然変異により出現した耐性菌の解析はもとより、耐性菌の出現と今後の予測をすることが可能である。

抗菌薬の種類により、バイオフィルム内濃度が低いことが知られており、感染症の難治化に関係してい

る。当然のことながら、Hollow-Fiber Cartridge 中にもバイオフィルムは形成されるが、現時点においてCartridge内に形成されたバイオフィルムを継続的に観察するためのデバイスは存在しない。当教室は、菌を固定することなく、生きたままの菌を継続的にバイオフィルムの形成過程を観察するための共焦点レーザー顕微鏡システムを保有している。当初は観察終了時にCartridge中のバイオフィルムを観察するが、将来的にはバイオフィルム観察用のデバイスを開発して、バイオフィルムの細菌再増殖への関与について検討したいと考えている。

今回はHFIM導入前であるため、当教室のデータを示すことはできないが、HFIMの概要とその可能性、今後の展望に関して述べてみたい。



東邦大学微生物・感染症学講座 教授

石井 良和

1981年3月に日本大学理工学部薬学科を卒業し(専攻は薬剤学)、長崎大学医学部附属病院薬剤部に薬剤師として約10年間在籍しました。1991年に東邦大学医学部微生物学教室に異動し、2013年1月より現職にあります。研究分野はグラム陰性菌の薬剤耐性機構に関する研究で、特に β ラクタマーゼの機能解析を得意にしています。

多剤耐性菌に対する臨床試験の課題

Meiji Seika ファルマ株式会社 臨床開発推進部 部長
高橋 義三郎

我が国を始め、WHO や主要 7 か国にて「薬剤耐性(antimicrobial resistance, AMR) 対策アクションプラン」が策定され、世界的な脅威となっている耐性菌感染症に対しては新規抗菌薬の「研究開発・創薬」の促進が求められている。しかし、抗菌薬は度重なる薬価改定を受け、生産コストも増大し、一般に市場性が見込めない領域となっている。AMR に有効な抗菌薬の国内創薬はシーズ探索が停滞するとともに、従来通りの臨床試験を実施すれば長期間と大きな費用負担を要することとなり、製薬企業としては予見性、採算性が見込まれないために、AMR 対策アクションプランに掲げられた新規抗菌薬の「研究開発・創薬」はあまり進んでいないのが現状である。

一方、海外では耐性菌の脅威に対抗すべく、IDSA が掲げた 2020 年までに 10 薬剤を創出するという目標(Bad Bugs, Need Drugs, 10 × 20: Ten New Antibiotics by 2020)をかわきりに、GAIN 法やファンディング支援など、抗菌薬の「研究開発・創薬」における入口から出口まで様々なインセンティブ促進策が実行に移されている。時系列で示される開発・創薬の予見性・採算性において、いわゆる Push ならびに Pull インセンティブが充実されてきた結果、欧米では抗菌薬の開発回帰も散見されてきている。臨床開発試験においても、薬剤耐性菌に対する非臨床データを充実させ活用することで、限定的な臨床試験にて効率的で確実な開発戦略を志向し、従来よりも開発コストを削減し短期間の開発を目指す様になってきている。

一方、国内では多剤耐性菌感染症に対する学会や感染症専門医を中心にした感染対策の成果もあり、海外からの持ち込みリスクはあるものの、諸外国で問題になっている KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) や NDM-1 (New Delhi metallo- β -Lactamase) を産生する耐性菌の報告は少なく、現時点でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem-resistant enterobacteriaceae, CRE)等の多剤耐性菌による感染症は低く抑え込まれている。感染症法に基づく 5 類全数把握対象疾患として、NIID 国立感染症研究所の報告によれば、2016 年の CRE 感染症は全国合計で届出数 1,581 例、死亡例 53 例(3.4%)となっている。臨床開発試験の実施上の観点として、CRE 感染症を対象とする臨床試験を国内で実施するには、症例が散発的であり、臓器別の症例集積は困難である。また、仮に治験薬の候補症例が、限定された治験契約施設に入院されていたとしても、既に抗菌薬が前投与されていることが想定され、比較試験は倫理上も含めて実施困難な課題が多い。AMR を対象とする新規抗菌薬の開発は国際共同治験で実施される事があるが、日米欧で臨床試験のレギュレーションの違いもある。PMDA (医薬品医療機器総合機構)、EMA (欧州医薬品庁)、FDA (アメリカ食品医薬品局)の三局で対面会合が行われているが、AMR 感染症に対する新規抗菌薬の開発が促進される様なレギュレーションの近似や策定を期待したい。

抗菌薬の臨床試験において、その用法用量

の設定にはPK/PD(Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics)理論が応用されてきた。従来は非臨床のPK/PD試験として短時間の評価となるChemostat Modelが汎用されてきたが、最近では臨床をより反映すると思われる長時間の評価が可能なHollow Fiber Infection Model (HFIM)が注目されている。HFIMは薬剤耐性菌に対する抗菌薬の有効性を担保する投与設計をするとともに、耐性菌抑制の評価にも供することが期待でき、言わば、AMR対策アクションプランに明示された「研究開発・創薬」と「適正使用」の両面で活用可能な非臨床モデルである。海外の抗菌薬開発ガイドラインにはHFIMの活用について記載があり、非臨床であるHFIMの結果を用いて臨床データを予測し、新規抗菌薬の臨床結果や治療達成の可能性を評価している。抗菌薬とターゲットとする耐性菌に関する精度の高いHFIMのモデル構築を行い、条件を整え、HFIMの結果に基づいて抗菌薬の開発ステップが短縮されることを期待したい。また、国内の承認制度として、「先駆け審査指定制度」に続き「条件付き早期承認制度」が検討されているが、コンパクトな臨床試験と市販後のデータ集積を組み合わせたAMR用抗菌薬の開発促進が進展される環境が整いつつあると解釈したい。

本講演では、AMR感染症に対する新規抗菌薬の臨床試験に関する課題を示した上で、PK/PDを

活用した臨床試験の実例、HFIMを含めた非臨床試験、効率的な臨床試験などについて述べ、関連する抗菌薬開発の予見性や採算性についても触れたいと思う。



Meiji Seikaファルマ株式会社 臨床開発推進部 部長
高橋 義三郎

1983年、筑波大学第二学群生物学類を卒業し、同年、明治製菓株式会社(現、Meiji Seika ファルマ)に入社しました。承認後のプロダクト・マネジメント業務から、現在は臨床試験の実施を含む開発業務に携わっています。関連社外活動としては三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス実務委員会、7学会合同感染症治療・創薬促進検討委員会、日本化学療法学会の薬剤耐性菌感染症を対象とした抗菌薬ガイドライン作成合同委員会に参画しています。



国立研究開発法人 **日本医療研究開発機構**
Japan Agency for Medical Research and Development

戦略推進部 感染症研究課
創薬戦略部 創薬企画・評価課、創薬支援室
創薬戦略部 医薬品研究課

掲載されている全ての文章の無断転用・転載を禁止します。

平成29年9月28日発行