

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	水上 雄貴
主 論 文 題 名：新規肺炎マウスモデルを用いた抗菌薬併用療法における PK/PD 評価				
(内容の要旨) 【第一章】序論 肺炎は世界的に高い罹患率と死亡率を有する主要な感染症であり、2019 年には全世界で約 4 億 8,900 万件が発生し、249 万人以上が死亡した。とくに免疫機能が未熟または低下した乳幼児や高齢者では重篤化しやすいことが報告されている。日本においても肺炎は依然として主要な死因の一つであり、なかでも院内肺炎は致死率が高く、ICU で最も頻発する感染症である。院内肺炎では薬剤耐性菌が原因菌となる頻度が高く、治療困難性や医療費増大の大きな要因となっている。薬剤耐性菌の拡大は世界的な経済損失をもたらしており、国際社会では One Health の概念に基づく包括的対策が推進されている。 薬剤耐性菌の中でも、β ラクタム薬に対する耐性、特にカルバペネマーゼ産生菌によるカルバペネム耐性は臨床的影響が極めて大きい。これらの感染症では治療選択肢が著しく制限され、コリスチンやチゲサイクリンといった薬剤が使用されるものの、安全性や有効性に課題が残る。新規薬剤であるセフィデロコルも耐性出現が報告されており、新たな治療戦略の確立が急務である。 こうした背景から、β ラクタム薬/β ラクタマーゼ阻害薬併用療法、特に Diazabicyclooctane (DBO) 系 β ラクタマーゼ阻害薬の活用が注目されている。DBO 系阻害薬は Ser-β ラクタマーゼに対して持続的な阻害作用を示し、KPC 型カルバペネマーゼ産生菌にも有効性を示す。なかでも nacubactam は β ラクタマーゼ阻害作用に加え、ペニシリン結合タンパク質 (PBP) -2 結合による抗菌活性を併せ持ち、β ラクタム薬との併用で相乗効果が期待されている。 一方、併用療法では β ラクタマーゼ阻害薬濃度に応じて β ラクタム薬の MIC が変動するため、従来の Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) 指標では薬効を十分に説明できないという課題がある。この問題に対し、阻害薬濃度に依存して変化する最小発育阻止濃度 (MIC) を考慮した $T>MIC_i$ という新たな PK/PD 指標が提唱され、併用療法の評価に有用であることが示されている。 しかし、PK/PD 解析の妥当性は感染モデルの適切性に大きく依存する。従来広く用いられてきた好中球減少マウス大腿部感染モデルは全身性感染症の評価には有用である				

が、肺炎では感染局所である肺胞上皮被覆液 (ELF) 中の薬物動態や、肺胞マクロファージを含む特異的免疫環境を十分に反映できない可能性がある。肺炎治療法の構築には、これら肺特異的要因を考慮したモデルが不可欠であり、本研究では好中球に加えて肺胞マクロファージを枯渇させた新規肺炎モデルを用いて、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (CPE) に対する β ラクタム薬/ β ラクタマーゼ阻害薬併用療法の PK/PD 評価を行うことを目的とした。

【第二章】好中球減少肺炎モデルマウスを用いた cefepime/nacubactam 併用療法の評価
＜背景・目的＞

院内肺炎は、化学療法などにより免疫機能が低下した患者に多く発症し、重篤な経過をたどりやすい。こうした臨床状況を反映する非臨床モデルとして、好中球減少マウスは抗菌薬の有効性評価に広く用いられている。好中球減少状態では、感染時に生じる好中球の肺への遊走や貪食・殺菌機構が著しく低下するため、免疫による細菌排除が起こりにくく、薬物本来の抗菌効果を明確に評価できる重症感染モデルと位置づけられる。近年、 β ラクタム薬/ β ラクタマーゼ阻害薬併用療法の PK/PD 指標として $fT>MIC_i$ が提案され、大腿部感染モデルでは有効性評価が行われている。しかし、好中球減少マウス肺炎モデルを用いて目標 $fT>MIC_i$ を算出した報告はこれまでになく、肺炎では抗菌薬の組織中濃度を考慮すべきであるが、ELF 中濃度を加味した $fT>MIC_i$ 値は算出されたことがない。そこで本章では、同モデルを用いて CPE 肺炎に対する cefepime/nacubactam 併用療法における ELF 中濃度に基づいた目標 $fT>MIC_i$ を算出することを目的とした。

＜方法＞

本研究に関する動物実験計画は、慶應義塾動物実験委員会より承認されたものに従い実施した (#A2022-185)。実験にはそれぞれ KPC 型、OXA 型カルバペネマーゼを産生する *K. pneumoniae* (MSC 22182、MSC 22098 株) を用いた。Cefepime または nacubactam の併用時 MIC は checkerboard 法を用いて測定した。PK 実験では、好中球減少マウスに β ラクタマーゼ非産生 ATCC 43816 を肺感染させ、cefepime、nacubactam を単回皮下投与し、経時的血漿・肺胞洗浄液 (BALF) の採取を行い、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析器 (LC-MS/MS) を用いて血漿・BALF 中 cefepime、nacubactam 濃度を測定した。Urea assay kit を用いて血漿・BALF 中尿素濃度を測定し、ELF 中 cefepime、nacubactam 濃度を算出した。Phoenix® WinNonlin®を用いて PK パラメータを算出した。PD 実験では、好中球減少マウスに菌液を口腔咽頭吸引法により吸引させマウス肺炎モデルを作製した。菌接種 2 時間後、cefepime と nacubactam を様々な濃度で組み合わせ 2 時間ごとに 12 回皮下投与した。菌接種 26 時間後の肺中の生菌数を定量することで cefepime/nacubactam

併用時の抗菌活性を評価した。PK パラメータおよび併用時 MIC から $fT > MIC_i$ を算出し、PD 実験の結果と組み合わせ、目標 PK/PD パラメータ値を算出した。さらに、PK/PD 目標値が臨床で達成できるかを検証するため、cefepime、nacubactam のヒト PK データを用いたシミュレーションを実施した。

<結果>

MSC 22182 株に対する cefepime、nacubactam の単独時 MIC はそれぞれ 32.0、2.52 mg/L、MSC 22098 株に対する cefepime、nacubactam の単独時 MIC はそれぞれ 128、2.0 mg/L と算出された。一方、MSC 22182、MSC 22098 株に対する cefepime/nacubactam の併用時 MIC はそれぞれ 0.50/0.50、1.00/1.00 mg/L と算出された。ELF における cefepime の吸収速度定数 (k_a)、消失速度定数 (k_e)、中心→末梢コンパートメントへの分配速度定数 (k_{cp})、末梢→中心コンパートメントへの分配速度定数 (k_{pc})、中心コンパートメント分布容積 (V_c/F)、末梢コンパートメント分布容積 (V_p/F)、総クリアランス (CL_{tot}/F) はそれぞれ 6.17 ± 2.22 /h、 3.16 ± 0.21 /h、 1.97 ± 1.69 /h、 2.35 ± 1.36 /h、 0.97 ± 0.08 L/kg、 0.66 ± 0.28 L/kg、 3.08 ± 0.36 L/h/kg であった。また、nacubactam の k_a 、 k_e 、 k_{cp} 、 k_{pc} 、 V_c/F 、 V_p/F 、 CL_{tot}/F はそれぞれ 9.87 ± 0.19 /h、 1.26 ± 0.61 /h、 5.71 ± 4.20 /h、 4.99 ± 2.06 /h、 0.16 ± 0.07 L/kg、 0.27 ± 0.19 L/kg、 0.23 ± 0.19 L/h/kg であった。これらと PD 実験の結果をもとに解析を実施し、MSC 22182 株において、 $fT > MIC_i$ と生菌数変化は強い相関関係を示し ($R^2=0.967$)、最大殺菌効果を達成するための目標 $fT > MIC_i$ は 33.5% であった。MSC 22098 株において、 $R^2=0.950$ であり、目標 $fT > MIC_i$ は 22.6% であった。両株の結果を統合し解析したところ、 $R^2=0.862$ であり、最大殺菌効果を達成する目標 $fT > MIC_i$ は 29.3% と算出された。目標 PK/PD パラメータ値に基づいた臨床用量シミュレーションでは、ヒト PK データ (ELF) を用いてシミュレーションした投与量のうち最低用量の組み合わせである cefepime/nacubactam の 0.5/0.05 g を 1 時間点滴で 8 時間ごとに投与した場合、MSC 22182 または 22098 株に対してそれぞれ 41.7% および 37.1% の $fT > MIC_i$ を達成すると予測された。

<結論>

本章では、好中球減少マウス肺炎モデルを用いて cefepime/nacubactam 併用療法の ELF における PK パラメータに基づいた目標 $fT > MIC_i$ 値を算出し、 $fT > MIC_i$ を用いた解析が肺炎に対する β ラクタム薬 β ラクタマーゼ阻害薬併用療法の効果の予測に有用である可能性を示した。

【第三章】肺胞マクロファージ・好中球減少新規肺炎モデルマウスの作製と PK/PD 評価
<背景・目的>

第二章では、好中球減少マウス肺炎モデルを用いて抗菌薬併用療法の PK/PD 解析を行

い、従来の好中球減少マウス大腿部感染モデルで算出された PK/PD 目標値とは大きく異なる結果が得られた。この乖離は、肺特有の免疫環境、特に肺胞マクロファージの関与による可能性が考えられた。非臨床肺炎モデルとして好中球減少マウスは標準的に用いられており、免疫の影響を排除して薬剤本来の効果を評価できる点で国際的にも受容されている。一方、肺免疫には好中球に加えて肺胞マクロファージが重要な役割を果たし、これらを枯渇させると肺内菌量増加や生存率低下が生じることが報告されている。したがって、好中球のみを枯渇させた従来モデルでは肺の免疫環境を十分に制御できていない可能性がある。本章では、好中球と肺胞マクロファージを同時に枯渇させた新規肺炎モデルを構築し、CPE 肺炎に対する cefepime/nacubactam 併用療法の PK/PD 解析と目標 $fT>MIC_i$ の算出することを目的とした。さらに、従来の好中球減少モデルと $fT>MIC_i$ 値を比較した。

<方法>

好中球と肺胞マクロファージを同時に枯渇させた新規モデルは試験 4 日前と 1 日前にシクロホスファミドをそれぞれ 150、100 mg/kg 投与し、さらに試験 2 日前にクロドロン酸内包リポソームを 50 μ L 吸入させることにより作製した。作製したマウスにリポポリサッカリド (LPS) を吸入させ、吸入の 24 時間後に BALF を採取し、蛍光色素で標識した後、フローサイトメトリー解析を実施し好中球、肺胞マクロファージ数を計測した。新規モデルを用いて、第二章と同様の方法で PK 実験を実施し、ELF 中 cefepime と nacubactam の PK パラメータを算出した。新規モデルを用いて第二章と同様に PD 実験を実施し、MSC 22812 または MSC 22098 株感染マウスに対する cefepime/nacubactam 併用時の抗菌活性を評価した。最後に、 $fT>MIC_i$ を用いた PK/PD 解析を実施した。

<結果>

シクロホスファミドとクロドロン酸内包リポソームを投与することで、投与しない群と比較し、好中球と肺胞マクロファージは有意に減少した。Cefepime の k_a 、 k_e 、分布容積 (V/F)、 CL_{tot}/F はそれぞれ 13.1 ± 3.28 /h、 0.98 ± 0.13 /h、 2.06 ± 0.42 L/kg、 1.96 ± 0.15 L/h/kg であった。また、nacubactam の k_a 、 k_e 、 V/F 、 CL_{tot}/F はそれぞれ 9.04 ± 7.57 /h、 0.91 ± 0.57 /h、 1.16 ± 0.65 L/kg、 0.69 ± 0.07 L/h/kg であった。これらと第 1 章で求めた併用時 MIC、PD 実験の結果をもとに PK/PD 解析を実施し、MSC 22182 株において $fT>MIC_i$ と生菌数変化は強い相関関係を示し ($R^2=0.912$)、最大殺菌効果を達成するための目標 $fT>MIC_i$ は 60.9%であった。MSC 22098 株において、 $R^2=0.895$ であり、目標 $fT>MIC_i$ は 68.1%であった。

＜結論＞

シクロホスファミドとクロドロン酸内包リポソームを投与することで好中球と肺胞マクロファージの両方を枯渇させたマウスモデルは、肺免疫の影響を排除したモデルであり、抗菌薬本来の薬効を評価する上で、より有用な PK/PD 解析モデルであると考えられる。

【第四章】総括

本研究は、CPE による肺炎に対する cefepime/nacubactam 併用療法の薬効を適切に評価することを目的として、肺特異的な免疫環境を考慮した PK/PD 解析体系の最適化を試みたものである。段階的に動物モデルを構築し、免疫要因と薬効評価の関係を包括的に検討した点に特徴がある。

第二章では、好中球減少マウス肺炎モデルを用い、*in vitro* および *in vivo* PD 実験と ELF 中薬物濃度に基づく PK/PD 解析を実施した。その結果、ELF 中 PK パラメータから算出した $fT > MIC_i$ は、従来の PK/PD 指標と比較して抗菌効果との相関性が明確に改善された。さらに、KPC および OXA 産生菌による肺炎モデルにおいて組織 (ELF) 中濃度に基づいた目標 $fT > MIC_i$ を世界で初めて推定し、臨床標準用量投与レジメンに基づくシミュレーションでは十分な抗菌曝露が達成された。これらの結果は、cefepime/nacubactam 併用療法が CPE 性肺炎に対して有望であること、ならびに $fT > MIC_i$ が β ラクタム薬/ β ラクタマーゼ阻害薬併用療法に特化した PK/PD 指標として有用であることを示している。

第三章では、肺炎モデルにおける免疫学的交絡を最小化するため、好中球と肺胞マクロファージを同時に枯渇させた新規マウスモデルを構築した。本モデルでは、LPS 刺激後も両細胞の動員が起こらないことが確認され、肺自然免疫応答が機能的に抑制されていることが示された。さらに本モデルを用いた PK/PD 解析では、ELF 中薬物動態は従来モデルと同等であった一方、PK/PD 目標値は好中球減少モデルと比較して高値を示し、さらに菌株依存的に変動することが明らかとなった。これは、肺胞マクロファージによる初期貪食能が菌株ごとの性状に左右され、薬効評価に影響を与える可能性を示唆している。

以上より、本研究は、 $fT > MIC_i$ の有用性を肺炎モデルで実証するとともに、肺胞マクロファージを含む肺特異的な免疫環境が PK/PD 解析に与える影響を明確化し、免疫交絡を最小化した新規肺炎モデルを提示した点で重要な学術的意義を有する。本研究の知見は、今後の β ラクタム薬/ β ラクタマーゼ阻害薬併用療法の肺炎治療戦略および PK/PD 評価体系の発展に貢献するものと期待される。