

以上の研究で合成ならびに評価した種々の化合物は、環境生態系に存在する昆虫類のうち、害虫に属する小動物等を適切に制御することを可能にする有用な化合物であると考えられる。このことから、これらの新規化合物は、環境生態系をより適切なものにすることに少なからず貢献することが期待される。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認められる。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 20 年 2 月 8 日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	和田 智之 ^{わ た とも ゆき}
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農 第 1 2 4 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	The usefulness of topical application of a synthetic antibacterial agent, gatifloxacin (合成抗菌剤ガチフロキサシンの有用性に関する研究)

論文審査委員（主査）	教授	坂 上 吉 一
	（副主査）	教授 細 谷 和 海
	（副主査）	教授 岸 本 憲 明

論文内容の要旨

フルオロキノロン系合成抗菌剤はグラム陽性菌及び陰性菌に対して強い抗菌作用を有する。その抗菌メカニズムは他の抗菌剤とは異なり、細菌のDNA複製にかかわるⅡ型トポイソメラーゼ（DNAジャイレース及びトポイソメラーゼⅣ）の活性を阻害して殺菌的に作用する。このため、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) のような作用機序の異なる薬剤に対する耐性菌はキノロン剤に対して交叉耐性を示さない。また、合成化合物であるため、天然抽出物に比べて自然耐性を持つ細菌が少ないと期待される。このようにフルオロキノロンは他剤に比べ、その広範な抗菌スペクトルと比較的低い耐性率から非常に有用性の高い抗菌剤である。

ガチフロキサシン (GFLX) は杏林製薬で創製されたフルオロキノロン系抗菌薬であり、キノロン骨格の8位にメトキシ基を導入することにより従来のキノロン剤の弱点であった *Streptococcus pneumoniae* をはじめとしてグラム陽性菌や嫌気性菌に対する抗菌力を増強し、抗菌スペクトルをさらに拡大している点が特徴として挙げられる。同時に、フッ素基をメトキシ基に置換したことにより、細胞毒性や光毒性が軽減されている。また、標的酵素であるDNAジャイレース及びトポイソメラーゼⅣを同程度かつ強力に阻害するGFLXは、両酵素のうち一方に対して偏った親和性を示す他のキノロン剤より耐性菌を選択する確率が低いと考えられる。近年、MRSAに対する切り札であったバンコマイシンに対して耐性を獲得した *Vancomycin-resistant enterococci* (VRE) として話題となっている *Enterococcus faecalis* に対する有効性が従来のキノロン剤より改善されている点も特徴のひとつである。

さらにGFLXの抗菌作用を検討する中で我々はGFLXが消炎作用も有することを見出した。他の抗菌剤も消炎作用を有することがあり、特にマクロライドの消炎作用はよく知られ、実用化されている。一方、キノロン剤の消炎作用についても過去に報告があるが、その有効濃度は非常に高く、実用化できるレベルにないのが現状である。

本研究ではGFLXの局所投与による特徴的な抗菌作用を評価するとともに、その中で発見した消炎作用の実用性についても検討を行った。

GFLXの*in vitro*抗菌作用

目的：フルオロキノロン系合成抗菌剤は Postantibiotic effect (PAE) を有し、高濃度が暴露される点眼では全身投与に比べて長いPAEが期待される。そこで涙液中薬物動態を考慮した測定法により *S. aureus*、*S. pneumoniae* 及び *Pseudomonas aeruginosa* に対するGFLXのPAEをレボフロキサシン (LVFX) 及びオフロキサシン (OFLX) と比較した。方法：PAEは定法に従った2~8×MICの各薬物を1時間細菌に暴露させる方法に加えて1000 µg/mlに1~10分間または市販点眼液に1分間暴露させる方法にて測定した。結果：定法では濃度依存的なPAEの延長がみられたが、GFLXと他剤とのPAEの差はいずれも1時間未満であり、大きな差を認めなかった。各点眼液の1分間暴露の場合、GFLXとLVFXの差は約1~9時間、OFLXとは約2~17時間であった。結論：点眼投与におけるGFLXのPAEは既存薬より長いと期待される。

GFLXの*in vivo*抗菌作用

目的：ウサギ角膜を用いてGFLX(GFLX)の用量依存的な殺菌作用の検討、ならびにOFLXとの効力比較を行った。方法： 9.3×10^3 CFUのMRSAを角膜実質内に注入し、菌接種5及び24時間後の2回、薬剤を点眼投与した。接種48時間後まで前眼部の炎症所見を観察・採点し、観察終了後に角膜組織中生菌数の測定及び病理組織学的評価を行った。結果：生理食塩液群での眼感染症スコアは菌接種16~24時間後に最高値に達した。GFLX群は16時間後以降全ての観察時点において、それらの所見を用量依的に抑制し、スコアは0.1%以上で対照群に比べて有意に低値を示した。また0.3% OFLX群との比較では、0.1% GFLX群で同程度かそれ以上、0.3%及び0.5% GFLX群では明らかに優れた抑制効果を示した。角膜組織中生菌数に関しては、GFLX群は用量依存的な殺菌作用を示し、0.3%及び0.5% GFLX群の生菌数は0.3% OFLX群の1%以下であった。病理組織学的検討においては、生理食塩液群では角膜実質中の菌塊、膿瘍の形成及び実質層の膨潤、上皮層の脱落、炎症細胞の浸潤などの所見が認められた。GFLX点眼液群はこれらの病理所見を用量に応じて軽減させた。結論：GFLX点眼液はMRSA眼感染症において、0.3% OFLX点眼液より優れた治療効果を示す可能性が示唆された。

GFLX の in vivo 抗菌作用 2

目的：0.3% GFLX 及び 0.5% LVFX 点眼液の眼内炎抑制効果を検討した。
方法：正常ヒト結膜より分離した *E. faecalis* をウサギ前房内に接種し、眼内炎を惹起した。点眼液は接種 30 分前、直後及び 1 時間後、翌日から 4 時間間隔にて 1 日 3 回投与し、前房混濁スコア及び眼内の生菌数を評価した。結果：接種 6 時間後よりみられ始めた前房混濁を両点眼液は接種 24 時間後以降すべての時点で生理食塩液に比して有意に抑制し、0.3% GFLX 点眼液は 0.5% LVFX 点眼液より強い抑制傾向を示した。また生理食塩液群では 1 例を除く全例の房水及び硝子体から細菌が検出されたが、0.5% LVFX 点眼液群及び 0.3% GFLX 点眼液群ではそれぞれ 2 例及び 1 例にのみ認められた。結論：0.3% GFLX 点眼液は術後眼内炎のリスク低下に有効であると示唆された。

GFLX の消炎作用

目的：MRSA 感染モデルを用いた実験の中で見出された GFLX の抗炎症作用について、炎症性サイトカインのひとつである tumor necrosis factor- α (TNF- α) の関与を検討した。方法：以下の 3 つの実験を実施した。1) ウサギの角膜内に MRSA を接種し、GFLX 及び LVFX を投与した。感染の重症度及び角膜組織中の生菌数を評価した。2) チオグリコレートにより誘導したマウス腹腔マクロファージを GFLX、LVFX 及びモキシフロキサシン (MFLX) 存在下において緑膿菌由来のリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、産生される TNF- α を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。3) LPS をラットの結膜下に投与して誘導される TNF- α の産生に対する GFLX、LVFX 及び MFLX の効果を比較した。結果：GFLX は MRSA 0-271 株を接種したウサギ角膜において LVFX より有意に強い消炎効果を示した。一方、組織中の生菌数に関しては両薬剤間に有意差はみられなかった。GFLX はマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を用量依存的に抑制し、その効果は LVFX よりも有意に強かった。ラットを用いた in vivo の実験においては 3 剤のうち GFLX のみが LPS による組織中 TNF- α 量の増加を有意に抑制した。結論：GFLX は抗菌作用だけでなく、TNF- α の産生抑制による消炎作用も有することが明らかとなった。

まとめ conclusion

新規のフルオロキノロン系合成抗菌剤である GFLX の種々の病原細菌に対する抗菌作用を in vitro 及び in vivo の実験により検討した。PAE を指標とした検討では、GFLX を直接曝露することによりグラム陽性菌、グラム陰性菌のいずれに対しても、薬剤が有効濃度以下になった後も数時間に渡って増殖抑制作用がみられることが明らかとなった。また、MRSA 感染モデルを用いた実験では、角膜実質に侵入した細菌に対しても有効濃度が到達し、殺菌的に作用することが示された。GFLX はさらに組織の深部まで到達し、前房内に接種した細菌に対しても抗菌作用を示した。以上のように GFLX は良好な組織浸透性を示し、表在性の細菌だけでなく組織の深部に侵入した細菌に対しても局所投与により有効に作用することが確認できた。

一方、組織浅層に到達し得る濃度において GFLX は抗菌作用に加えて消炎効果も示した。フルオロキノロン系抗菌剤が、実際に生体において実用的な濃度で抗炎症作用を示した報告は我々の知る限りではこれまでにない。その作用の強さはまだまだ実用的なものとは言えないが、サイトカインの産生への影響は有効性だけでなく安全性にも関わることであり、構造活性相関の解明など今後の更なる検討が必要である。

論文審査結果の要旨

ガチフロキサシン (GFLX) は、杏林製薬で創製されたフルオロキノロン系の新規抗菌薬であり、キノロン骨格の 8 位にメトキシ基を導入することにより従来のキノロン剤の弱点であった *Streptococcus pneumoniae* (肺炎桿菌) をはじめとするグラム陽性菌および嫌気性菌に対する抗菌力を増強し、抗菌スペクトルをさらに拡大している点が特徴的な化合物である。学位申請者は、「合成抗菌剤ガチフロキサシンの有用性に関する研究」を精力的に実施し、以下に示す有用な成果を得た。

① GFLX の *in vitro* における抗菌作用の検討として、Postantibiotic effect (PAE) を、涙液中薬物動態を考慮した測定法により *Staphylococcus aureus*、*S. pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する効果を検討した。その結果、現在感染症の予防分野に汎用されているレボフロキサシン (LVFX) およびオフロキサシン (OFLX) と比較したとき、定法では濃度依存的な PAE の延長がみられたが、GFLX と他剤との PAE の差はいずれも 1 時間未満であり、大きな差ではなかった。しかし、各点眼液の 1 分間暴露の場合、GFLX と LVFX の差は約 1~9 時間、OFLX とは約 2~17 時間であり、点眼投与における GFLX の PAE は既存薬 (LVFX および OFLX) より持続することが期待された。

② GFLX の *in vivo* における抗菌作用を、比較薬剤として OFLX を使用し、ウサギ角膜を用いる GFLX の用量依存的な殺菌作用を指標として、その効力比較で評価検討した。その結果、生理食塩液群での眼感染症スコアは菌接種 16~24 時間後に最高値に達した。一方、GFLX 群は 16 時間後以降全ての観察時点において、これらの所見を用量依存的に抑制し、スコアは 0.1% 以上で対照群に比べて有意に低値を示した。また 0.3% OFLX との比較検討では、0.1% GFLX で同程度以上、0.3% および 0.5% GFLX では顕著に優れた抑制効果を示した。角膜組織中の生菌数に関しては、GFLX は用量依存的な殺菌作用を示し、0.3% および 0.5% GFLX での生菌数は 0.3% OFLX の場合の 1/100 以下に低下した。病理組織学的検討においては、生理食塩液群では角膜実質中の菌塊、膿瘍の形成および実質層の膨潤、上皮層の脱落、炎症細胞の浸潤などの所見が認められた。一方、GFLX 点眼液ではこれらの病理所見を用量に応じて軽減させた。これらのことより、GFLX 点眼液は MRSA 眼感染症において、0.3% OFLX 点眼液より優れた治療効果を示す可能性が示唆された。

③ GFLX の *in vivo* における抗菌作用の続きとして、0.3% GFLX および 0.5% LVFX 点眼液の眼内炎抑制効果を検討した。その結果、接種 6 時間後より観察され始めた前房混濁を両点眼液は接種 24 時間後以降すべての時点で、生理食塩液に比して有意に抑制し、0.3% GFLX 点眼液は 0.5% LVFX 点眼液より強い抑制傾向を示した。また、生理食塩液群では 1 例を除く全例の房水および硝子体から細菌が検出されたが、0.5% LVFX 点眼液群および 0.3% GFLX 点眼液群ではそれぞれ 2 例および 1 例のみで、極めて少ない検出割合であった。これらのことより、0.3% GFLX 点眼液は術後眼内炎のリスク低下に有効であることが示唆された。

④ GFLX の消炎作用について、炎症性サイトカインのひとつである tumor necrosis factor- α (TNF- α) の関与について検討した。その結果、GFLX はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 0-271 株を接種したウサギ角膜において LVFX よりも有意に強い消炎効果を示した。一方、組織中の生菌数に関しては両薬剤間に有意差はみられなかった。また、GFLX はマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を用量依存的に抑制し、その効果は LVFX よりも有意に強かった。一方、ラットを用いた *in vivo* における実験においては、3 剤 (GFLX、LVFX および OFLX) のうち GFLX のみがリポポリサッカライド (LPS) による組織中 TNF- α 量の増加を有意に抑制した。このことより、GFLX は抗菌作用だけでなく、TNF- α の産生抑制に基づく消炎作用をも有することが明らかとなった。

以上述べた合成抗菌剤ガチフロキサシンの有用な効果については、現時点では主として眼科領域の感染症を極めて少量でかつ有効な手段により制御することを可能にする。このことは抗菌剤の使用量の減少、延いては耐性菌の発生予防に繋がることが十二分に期待される。

なお、今後は有用性を有するガチフロキサシンを使用し、例えば水生生物のように薬物との接触が困難な動物に対する新たな投与方法を積極的に提案ならびに展開していく予定とのことである。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認められる。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 20 年 2 月 8 日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。