

# *Clostridioides difficile*感染マウスモデルを用いた 糞中動態に基づく 治療薬の有効性評価法の構築

大分大学医学部附属病院 薬剤部

田代 渉

Sho Tashiro

## 【緒言】

2019年に米国疾病対策予防センターは薬剤耐性の現状、そして必要な対策を周知させるため、「Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019」を発刊した。そこで脅威レベルが最も高い切迫したレベルの脅威として報告された薬剤耐性菌は5種あり、その中で死者数が最も多かったのは *Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) であった。CDIは医療施設における抗菌薬関連下痢症の主な原因であり、広域抗菌薬の使用は腸内細菌叢の変化を引き起こし、CDI発症と関連している。原因菌は偏性嫌気性、芽胞形成性のグラム陽性桿菌である *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) であり、生育に不利な環境になると芽胞を形成することで、抗菌薬、熱、乾燥、および放射線などに高い抵抗性を示す。また増殖可能な栄養細胞として存在する *C. difficile* はトキシンを産生し、トキシンが腸管上皮細胞に取り込まれタイトジャンクションの破壊、細胞膜の脆弱化を生じさせる。この過程で腸管バリアが破壊され、非重症例から偽膜性大腸炎、中毒性巨大結腸症を含む重症、複雑性CDI例までの多岐にわたる臨床所見を引き起こす。

CDI標準治療薬として経口フィダキソマイシン (FDX)、経口バンコマイシン (VCM)、および経口・静注メトロニダゾール (MNZ) の3剤が使用されている。経口FDXおよび経口VCMは世界において初発例、再発例、非重症例、および重症

例にまで幅広く推奨されCDI治療のキードラッグとなっている。FDXおよびVCMは腸管からほとんど吸収されないため承認された用法用量での経口投与後、これら抗菌薬の糞中濃度は1,000 µg/gを超え、最小発育阻止濃度 (MIC) の100倍以上となることが報告されている。このような高い糞中濃度がCDIに対する治療成功に繋がっているのかもしれない。実際に複数のランダム化比較試験 (RCT) でCDI患者に対してFDXおよびVCMにおいて高い臨床治癒率が報告されている。一方で、MNZはFDXおよびVCMの代替薬として使用されている。これは、近年の米国、欧州、およびオーストラリアで行われたRCTでVCMに比べてMNZの有効性が低下していることが報告されたためである。MNZはFDXおよびVCMとは異なり経口投与後、上部消化管から速やかに吸収されるため、CDI患者では糞中濃度が低く約10 µg/gと報告されている。

複数の臨床試験でCDI患者における糞中抗菌薬濃度が測定され、CDI標準治療薬の薬物動態学的特性が明らかとなってきているが、臨床pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) 試験は実施されておらず未だ最適なPK/PDパラメータ値は明らかとなっていない。さらに、CDIに対する治療薬の *in vivo* PK/PD評価モデルは存在せず、非臨床PK/PD試験法が確立されていない。つまり、CDI標準治療薬はPK/PD理論に基づく至適投与法で

投与されていない。CDIに対しても適切な感染マウスモデルを使用することでCDI標準治療薬の最適な用法用量を決定することができると考えられるが、従来のマウス大腿部感染モデルを使用した非臨床PK/PD試験法は以下の2つの観点からCDI患者での抗菌薬治療に適用できない。1つ目は、血中濃度から計算したPKパラメータが細菌への抗菌薬曝露を反映する代替指標とならないこと、2つ目が、*C. difficile*は偏性嫌気性、芽胞形成菌であるために、単純な細菌数の変化がPDパラメータとして使用できないことである。

以上を踏まえ、本研究ではPK/PD理論に基づくCDI標準治療薬の適正使用および新規治療薬の開発促進に貢献することを目的として、以下3点を実施した。

- I. *C. difficile*に対するCDI標準治療薬の*in vitro*抗菌活性評価
- II. 重症CDIマウスモデルを使用した新規*in vivo*PK/PD評価モデルの構築
- III. CDIを治療するCDI標準治療薬3剤の最適な糞中PK/PDパラメータ値の決定

## [第1章：CDI標準治療薬の*C. difficile*に対する*in vitro*PD特性]

CDI標準治療薬の*C. difficile*に対する*in vitro*抗菌活性を評価し、(1)CDI標準治療薬の詳細なPD特性[MIC, time-kill curves, および post-antibiotic effect (PAE)], (2)CDI標準治療薬2剤の併用効果, および(3)芽胞発芽に対する1次胆汁酸曝露およびCDI標準治療薬曝露の影響, を明らかにした。

まず、Clinical and Laboratory Standards Instituteガイドラインに従い、*C. difficile*7株に対するFDX, VCM, およびMNZのMIC範囲をそれぞれ0.125–1.0 µg/mL, 0.63–2.0 µg/mL, および0.40–1.0 µg/mLと決定した。次に、抗菌活性の発現様式を評価するためtime-kill試験を実施すると、FDXおよびVCMは*C. difficile* ATCC® 43255に対して20時間まで0.5–32 µg/mLで緩やかかつ時間依存的な抗菌活性を発揮し、生菌数を約 $10^2$  colony-forming units (CFU)/mL減少させた。一方、MNZは0.5–2.0 µg/mLで速やかかつ濃度依存的な殺菌作用を示

し、2.0 µg/mLで2時間以内に生菌数を $\geq 10^3$  CFU/mL減少させた。臨床分離株3株に対しても同様のtime-kill curvesを得た。さらに抗菌活性持続の評価として*C. difficile* ATCC® 43255に対するPAEを測定すると、FDX (19.2 h)で最も長く、次にMNZ (4.75 h), VCM (0.72 h)の順であった。CDI標準治療薬2剤の併用効果をチェッカーボード法で評価すると、*C. difficile* 7株に対してFDXおよびVCMで相加作用、FDXおよびMNZで相乗効果と相加作用、さらにVCMおよびMNZで相乗効果と相加作用が検出された。Time-kill試験法では、*C. difficile* ATCC® 43255に対してFDXとMNZ, VCMとMNZの組み合わせで単剤に比べ抗菌活性の増大が検出された。また、*C. difficile* ATCC® 43255の芽胞はタウロコール酸曝露によって、濃度依存的に発芽し生菌に変化した。その発芽はCDI標準治療薬によって阻害されなかった。

## [第2章：CDIに対する新規*in vivo*PK/PD評価モデルとFDXおよびVCMの最適な糞中PK/PDパラメータ値]

*C. difficile* ATCC® 43255を感染させたCDIマウスモデルを用いて、FDXまたはVCMの経口24時間治療における糞中PK/PDパラメータと24時間治療終了後の治療アウトカム [colonized *C. difficile* (*C. difficile* load, 糞中生菌数, および糞中芽胞数), 72時間生存率, および clinical sickness score (CSS) grading ( $\geq 6.0$ でCDI臨床所見の持続を示す)]の関係に基づきPK/PD解析を実施すると、3つの糞中PK/PDパラメータ [糞中初回投与後無限時間までの薬物濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-\infty}$ )/MIC, 糞中time above MIC (T > MIC), および糞中最高薬物濃度 ( $C_{max}$ )/MIC]の中で、FDXおよびVCMの糞中  $AUC_{0-\infty}$ /MICがcolonized *C. difficile*とそれぞれ最も相関した。加えて、FDXおよびVCMの糞中  $AUC_{0-\infty}$ /MICは、臨床治癒を反映する72時間生存率およびCSS gradingともそれぞれ相関した。Inhibitory Effect Sigmoid  $I_{max}$  model式から計算したFDXおよびVCMにおける*C. difficile* loadの3 log<sub>10</sub> reductionを達成する目標値は、FDXで13,173, VCMで8,308となった。3 log<sub>10</sub> reductionの目標値を達成したとき、CDIマウスモデルにおいて72時

間生存率はFDXで83.5%, VCMで85.6%であった。さらにCSS gradingはFDXで4.9, VCMで5.6であった。加えて、本研究で決定した目標値と報告されているCDI患者での糞中抗菌薬濃度を基に*C. difficile*に対するMIC breakpointを予測した。FDX (400 mg/day) およびVCM (500 mg/day) 投与時のCDI患者における糞中0時間から24時間までの薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>24</sub>) は24,000 µg·h/gになると仮定し、この糞中AUC<sub>24</sub>と3 log<sub>10</sub> reductionを達成する目標値の両方に基づき予測した*C. difficile*に対するMIC breakpointはそれぞれFDXで1.0 µg/mL, VCMで2.0 µg/mLであった。

### 【第3章：CDIにおけるMNZのPK特性と最適な糞中PK/PDパラメータ値】

CDIマウスモデルにMNZ (10–80 mg/kg) を皮下投与し、規定時間後に回収した血漿および糞中のMNZ濃度を測定した結果、血漿C<sub>max</sub> および血漿0時間から6時間までの薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>6</sub>) は10 mg/kg から80 mg/kgの範囲で投与量依存的に増加した。一方で、糞中C<sub>max</sub> および糞中AUC<sub>6</sub> は10 mg/kg から40 mg/kgの範囲で投与量依存的に増加したが、40 mg/kg と80 mg/kgでは変化がなかった。また、血漿中および糞中で最高薬物濃度到達時間、C<sub>max</sub>, およびAUC<sub>6</sub>が異なっていたことから、MNZもFDXおよびVCMと同様に糞中PK/PDパラメータと治療アウトカムの関係に基づきPK/PD解析を実施すると、糞中T > MIC および糞中C<sub>max</sub>/MICに比べ、糞中AUC<sub>24</sub>/MICが糞中生菌数と最も相関した。一方で、

全ての糞中PK/PDパラメータが糞中芽胞数と相関しなかった。さらに糞中AUC<sub>24</sub>/MICは72時間生存率およびCSS gradingとも相関した。Inhibitory Effect Sigmoid *I*<sub>max</sub> model式から計算した糞中生菌数の1 log<sub>10</sub> reductionを達成する目標値は188となった。この目標値を達成したときのCDIマウスモデルの生存率とCSS gradingはそれぞれ94.5%, 5.2であった。

### 【総括および展望】

本研究では、CDI標準治療薬の*C. difficile*に対する*in vitro* PD特性評価と、CDIに対する糞中動態に基づく新規*in vivo* PK/PD評価モデルの構築を実施した。さらに構築した評価モデルを用いて、CDI標準治療薬のCDIを治療するための最適な糞中PK/PDパラメータとその目標値を明らかにした。

今後は、本研究で明らかにしたCDI標準治療薬3剤の最適な糞中PK/PDパラメータ値を基盤として、(i) CDI患者での糞中CDI標準治療薬濃度を測定し、有効性および安全性の関連性を評価する臨床試験、および(ii) マウスおよびヒトでの生理学的パラメータおよびCDI標準治療薬の大腸内でのPK特性の違いを考慮した生理学的薬物速度論モデリング&シミュレーションを実施する予定である。

本研究で明らかとなったCDIに対する非臨床PK/PD試験の結果は、CDI標準治療薬のPK/PD理論に基づく適正使用の実践、さらには新規CDI治療薬の開発促進に貢献できると考えられた。