

Haemophilus influenzae に対する Ceftriaxone (Ro 13-9904)の抗菌作用について

生方 公子・野々口 律子・山下 直子・後藤 朗・紺野 昌俊
帝京大学医学部臨床病理

要 約

臨床分離の *H. influenzae* に対する ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)の抗菌作用について検討し、以下に述べる成績を得た。

- 1) 被験菌36株の *H. influenzae* に対する CTRX の MIC は、 10^6 cells/ml の接種菌量で $0.003 \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$ と、極めて優れたものであった。
- 2) ABPC 耐性の TK-156 株に対しても、CTRX は $0.006 \mu\text{g/ml}$ と優れた MIC を示した。
- 3) ABPC 耐性および感性株に対する CTRX の作用は、殺菌的な作用であった。
- 4) 位相差顕微鏡による形態変化の観察では、MIC 附近からそれ以上の濃度において、著しい菌の filament 化が認められ、時間の経過とともに filament 化した細胞から溶菌していく像が観察された。
- 5) *H. influenzae* の PBP に対する CTRX の親和性は、PBP 3 に対して著しく高く、次いで 1 B、1 A の順に高かった。

緒 言

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)は Roche 社において開発されたセフェム系抗生物質であり、3位の側鎖にトリアジン環を有する化学構造上の特徴を有している。本薬はグラム陰性桿菌に対する抗菌力が優れているとされるが、その中でもいわゆる古典的なセフェム系抗生物質が無効であった *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)に対する抗菌力が極めて優れているとの報告が認められる¹⁾。

本邦においても、ampicillin (ABPC) に耐性を示す *H. influenzae* の分離は、私達²⁾が初めてその耐性機構を解析した頃から散見されるようになってきたが、それらの菌に対しては有効な抗生物質が少ないという隘路があった。本論文では、*H. influenzae* に対する CTRX の抗菌作用を調べるため、従来本菌に対する感染症に最もよく使用されている ABPC と、セフェム系抗生物質でも *H. influenzae* に優れた抗菌力を示すという点でその先駆けとなった cefotiam (CTM)ならびに本薬と化学構造が比較的類似している cefmenoxime (CMX)の3薬を対照薬とし、本薬の抗菌力や経時的殺菌効果並びに菌の形態におよぼす影響、さらには penicillin binding protein (PBP) に対する親和性についても検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

帝京大学医学部附属病院・中央検査部細菌検査室において、臨床検査材料より分離された *H. influenzae* 36株を MIC 測定の対象とした。CTRX ならびに比較の薬剤を *H. influenzae* に作用させた際の経時的殺菌効果あるいは菌の形態変化の観察のためには、化膿性髄膜炎の患児髄液中より分離された TK-447株 (type b) と、急性気道感染症の患児の咽頭より分離された ABPC 耐性の TK-156株 (型別不能)を用いた。

2. 培地

MIC 測定には、感受性測定用培地に hemin と nicotinic acid adenine dinucleotide (NAD)を最終濃度が各々 $20 \mu\text{g/ml}$ および $10 \mu\text{g/ml}$ になるように添加して使用した。経時的な殺菌効果ならびに菌の形態変化を観察するための培地には、感受性 broth に hemin と NAD を上記と同じ割合に加えて用いた。

3. 使用薬剤

対照薬として用いた ABPC は万有製薬株式会社、CTM と CMX は武田薬品工業株式会社より分与を受けた。

4. MIC の測定

Table 1 Antibacterial activity of CTRX, ABPC, CTM and CMX to *H. influenzae*

(No. of strain tested: 36 strains)

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
	0.003	0.006	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	
CTRX	5	28	3												
ABPC								12	19	4					
CTM								4	31	1					
CMX			17	11	7	1								1	

Medium: Sensitivity test agar + Hemin 20 $\mu\text{g/ml}$ + NAD 10 $\mu\text{g/ml}$ Inoculum size: One loopful of 10⁶/ml of overnight culture cells

チョコレート寒天培地に塗布した被験菌は、hemin と NAD を加えた 2 ml の感受性 broth に鈎菌し、37°C で一夜培養した。翌日被験菌はヘプトン水で 10⁶ cells/ml のレベルまで希釈し、薬剤を含有させた感受性測定用培地にその 1 白金耳を滴下した。そして、37°C、18 時間培養後にその MIC を判定した。

5. 薬剤作用後の生菌数の測定

1,000 倍に希釈した被験菌 0.5 ml を、上述した感受性 broth 9 ml に植え継ぎ、2 時間の前培養を行った。菌数が 10⁶ cells/ml のレベルに達した時点で、被験抗生物質を MIC、2 倍の MIC、あるいは 4 倍の MIC になるように添加し、37°C の恒温中にて静置培養しながら、3、6、9 および 24 時間後に生菌数を測定した。

6. 菌の形態変化の観察

各々の被験薬を作用させた後の菌の形態変化は、位相差顕微鏡を用いて観察した。位相差顕微鏡用培養チャンパーに、2、項に記した感受性培地を無菌的にシートし、1 時間程室温に放置して寒天を完全に固化させた後、被験菌をシードして培養し、その経過を顕微鏡下で観察した。

7. Penicillin binding protein に対する親和性の検討

H. influenzae から抽出した PBP に対する CTRX の親和性の測定は、SPRATT⁹⁾の方法に準じて実施した。*H. influenzae* からの膜蛋白の分離方法あるいは Benzyl-(¹⁴C)-penicillin G (¹⁴C-PCG) と CTRX との競合に関しては、齊藤⁹⁾が既に報告している方法に従った。

II. 結 果

1. 薬剤感受性

H. influenzae 36 株に対する各種薬剤の MIC 分布は、Table 1 に示した。CTRX の MIC 分布は、表の最上段に示したように、被験菌株のすべてが 0.003~0.01 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示したか、その分布は ABPC や CTM の MIC

分布よりもはるかに優れ、さらに *H. influenzae* に対しては極めて優れた MIC 分布を示していた CMX よりも、試験管でさらに 2 本程度優れているという成績であった。しかも ABPC に 25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示す β -lactamase 産生株の TK-156 株に対しても、CTRX は 0.006 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示しており、ABPC 感受性菌のそれと変わらない優れたものであることが注目された。

2. Ampicillin 感性菌および耐性菌に対する殺菌効果

使用菌株の項で述べたように、被験菌株の中から ABPC 感性の TK-447 株と耐性の TK-156 株を選び、CTRX と対照とした ABPC、CTM および CMX の殺菌作用を比較した。Fig. 1 には TK-447 株の成績を示したが、CTRX の添加では図の下段に示したように、MIC である 0.006 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても、薬剤添加後生菌数は徐々に減少し、24 時間後には生菌はほとんど認められなくなった。一方、対照とした ABPC と CMX でも MIC 値は劣るものの、MIC の薬剤添加で CTRX とほぼ同等の生菌数の減少傾向を示したが、CTM では薬剤添加後の経時的な生菌数の減少は緩慢であった。

ABPC に耐性を示す TK-156 株に対する成績は Fig. 2 に示す。図の上段が比較の 3 薬剤、下段が CTRX の成績である。本菌は ABPC に耐性であることから、CTRX については特に種々の濃度での生菌数の変動を調べた。ABPC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (1 倍 MIC) の添加では、初期の 3 時間程は菌の発育が抑えられるものの、その頃より比較的急速に菌の増殖が認められた。CTM では、ABPC に較べては菌の発育は抑制されるものの、0.78 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 以上の薬剤添加でも非常に緩慢な生菌数の減少しかみられず、24 時間後にはむしろ菌数の増加傾向が認められた。これに比し、CTRX と CMX では、MIC 以上薬剤の添加で 24 時間後にも生菌数の上昇は認められず、10³ cells/ml 程度の残存生菌数であった。CTRX と CMX の比較では、殺菌効果はほぼ同等と推測されるが、CTRX

Fig. 1 Bactericidal activity of CTRX, CMX, CTM and ABPC to ABPC-sensitive *H. influenzae* TK-447 strain

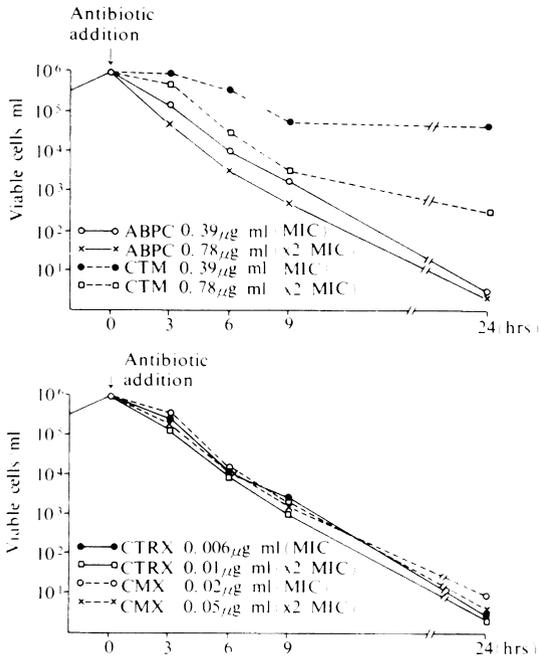
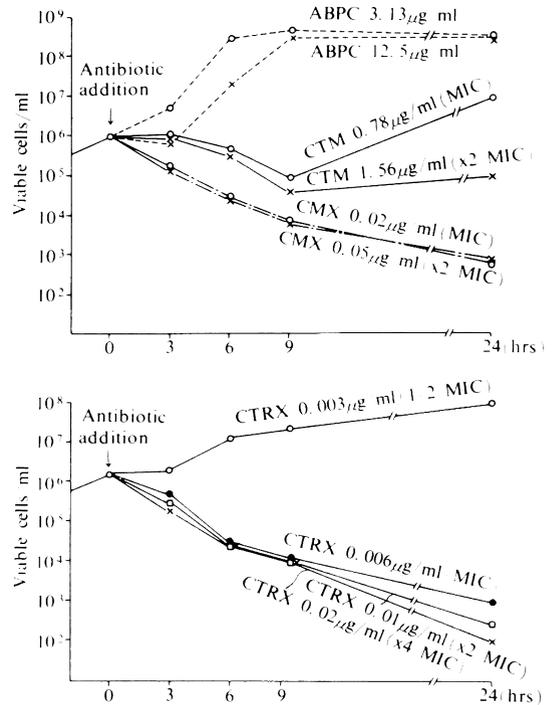


Fig. 2 Bactericidal activity of CTRX, CMX, CTM and ABPC to ABPC-resistant *H. influenzae* TK-156 strain



の方が MIC の優れている分だけ低い薬剤濃度でも生菌数の減少が認められるという結果であった。なお、Fig. 1 に示した ABPC 感性菌との比較では、CTRX を作用させた場合でも ABPC に耐性である TK-156 株の方が 24 時間後における残存生菌数は 10~100 倍多かった。

3. 各種薬剤を作用させた際の菌の形態変化

ABPC 感性の TK-447 株に CTRX, CMX および ABPC のそれぞれを、種々の薬剤濃度で作用させた際の菌の形態変化は、位相差顕微鏡下で 3 時間および 6 時間後に観察した。結果は Fig. 3 に示す。CTRX を作用させると、3 時間後には薬剤無添加のコントロール (Fig. 5) に比べ、1/2 MIC 以上で菌の著しい filament 像が観察され、同時にまたそれらの filament 化した菌から既に溶菌している細胞も観察された (Fig. 6)。薬剤作用後 6 時間になると、MIC 以上の濃度では視野の大部分の細胞が溶菌し (Fig. 7)、filament 化した細胞で溶菌していない像は、1/2 MIC 付近でみられるのみであった。なお、薬剤添加 3 時間後の MIC 付近における溶菌像は、CMX よりも CTRX の方が若干多く認められたが、ABPC との比較では、MIC 以上の ABPC を作用させた場合の方があまり filament 化せずに溶菌し、ABPC の方がやや殺菌作

用の強い印象を受けた。

ABPC 耐性の TK-156 株における成績は Fig. 4 に示した。図の上段には CTRX, 下段には CMX を作用させた際の成績を示したが、本菌に対して ABPC を作用させた際の形態変化については既に詳細に報告⁵⁾しているため、ここでは省略した。CTRX を作用させた後 3 時間目の観察では、本菌の MIC である 0.006 $\mu\text{g/ml}$ から 1.56 $\mu\text{g/ml}$ までの幅広い薬剤濃度において、著しく長い filament 像が観察された (Fig. 8, 9)。このような filament 像は CMX の 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 以上でも同じように観察された。なお、本菌では ABPC 感性菌に比べると薬剤作用後 3 時間目においては一視野あたりの溶菌像がやや少なかったが、6 時間後には CTRX, CMX の両薬剤ともに、MIC 以上で filament 化した細胞からの溶菌像が多数観察された (Fig. 10)。

4. Penicillin binding protein に対する親和性

TK-447 株から分離した PBP に対する CTRX の親和性を、¹⁴C-PCG との競合実験により測定した。得られた結果は Fig. 11 に示したが、*H. influenzae* の PBP は既に斎藤⁹⁾が報告しているように、分子量の大きい方から

Fig. 3 Morphological changes of *H. influenzae* TK-447 strain (ABPC-sensitive strain)

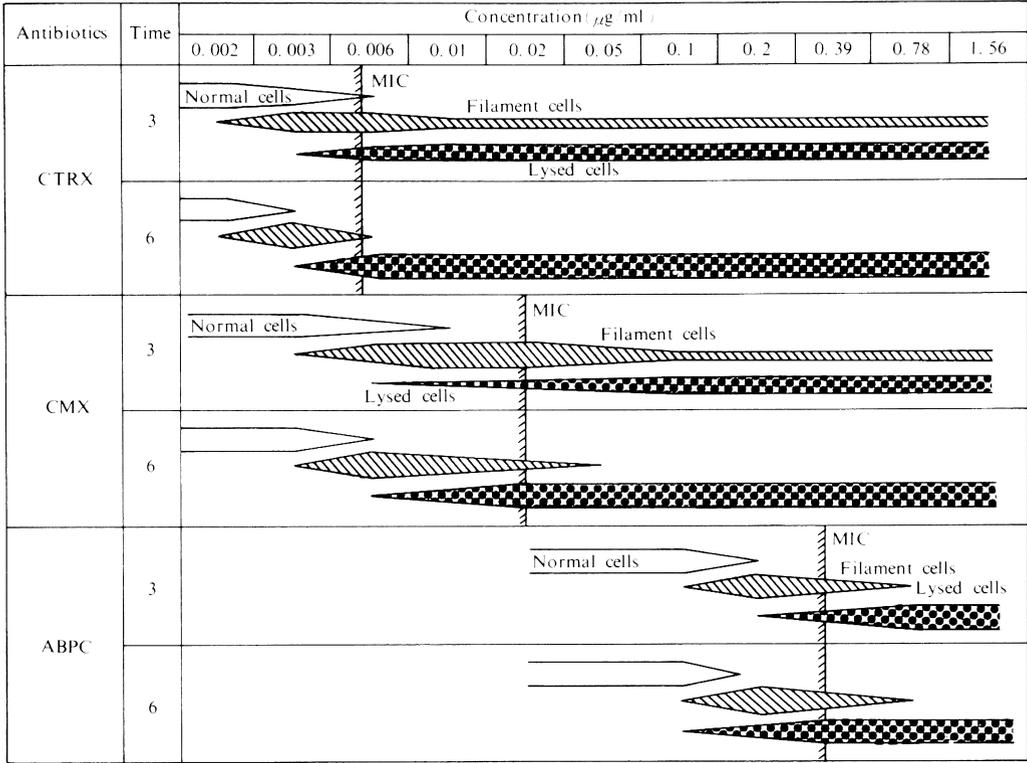
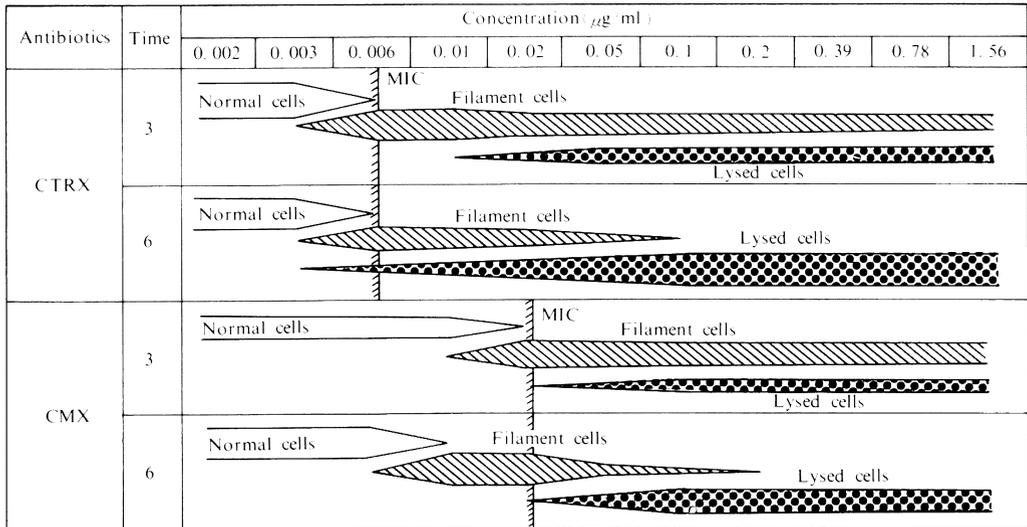


Fig. 4 Morphological changes of *H. influenzae* TK-156 strain (ABPC-resistant strain)



Medium : Sensitivity test agar + Hemin $20\mu\text{g/ml}$ + NAD $10\mu\text{g/ml}$

Inoculum size : One loopful of 10^8 ml

Fig. 5 Untreated *H. influenzae* (Control)

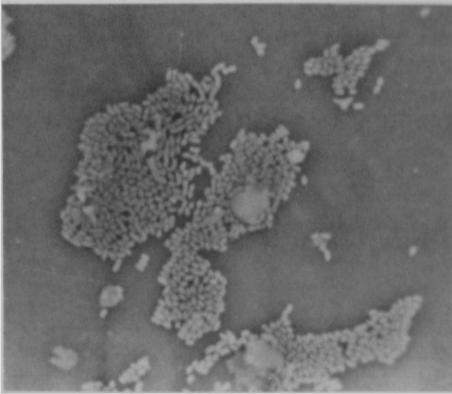


Fig. 8 TK-156 strain, CTRX 0.006 $\mu\text{g/ml}$, 3 hr

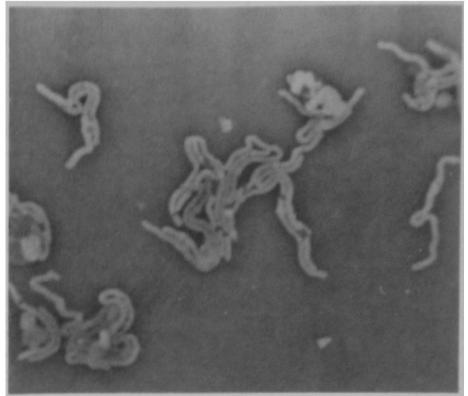


Fig. 6 TK-447 strain, CTRX 0.006 $\mu\text{g/ml}$, 3 hr

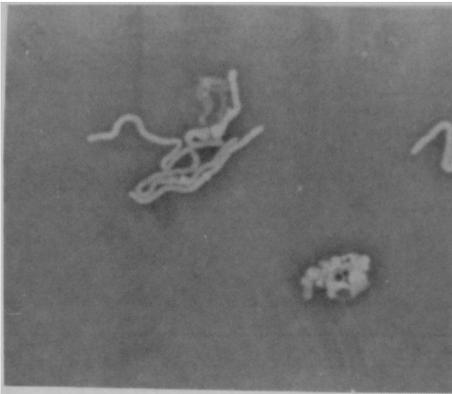


Fig. 9 TK-156 strain, CTRX 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 3 hr

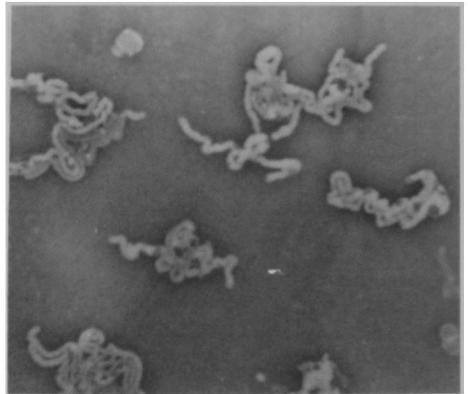


Fig. 7 TK-447 strain, CTRX 0.006 $\mu\text{g/ml}$, 6 hr

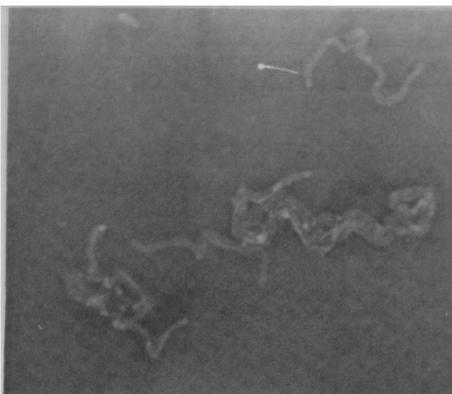


Fig. 10 TK-156 strain, CTRX 0.006 $\mu\text{g/ml}$, 6 hr

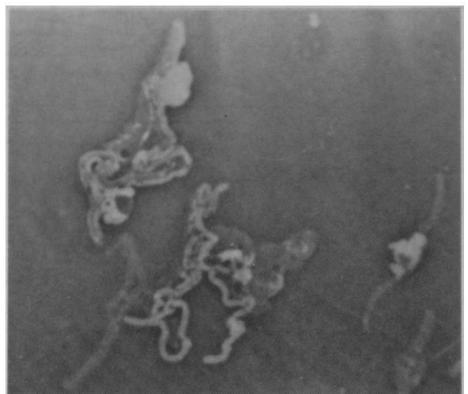
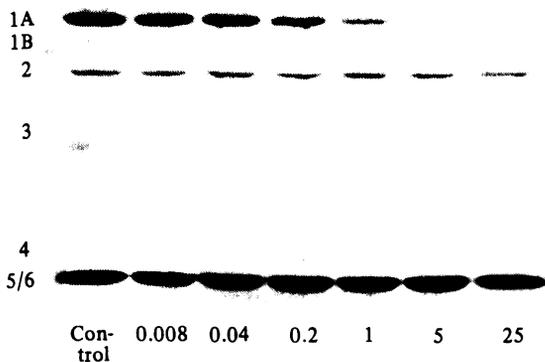


Fig. 11 Competition of CTRX with 14 C-penicillin G for penicillin binding proteins from *H. influenzae* TK-447 strain



E. coli の 1 A, 1 B, 2, 3 に相当するバンドが存在し、分子量の小さい部分の薄いバンドと濃いバンドが *E. coli* の 4, 5, 6 に相当する。CTRX は写真からも明らかなように、PBP 3 (複数のバンドと推定) に対して最も強い親和性を有し、次いで 1 B, 1 A の順に親和性が強かった。PBP 2 および *E. coli* の 4, 5, 6 のいずれかに相当すると思われる 2 本のバンドにはほとんど親和性のないことが観察された。

III. 考 察

ABPC に耐性を示す *H. influenzae* は、本邦においても私達の報告²⁾を始めとして、その後いくつか散見される。従来、*H. influenzae* 感染症に対しては、ABPC が第 1 選択の薬剤として専ら使用されてきたが、耐性菌が出現するに及び、それらの耐性菌に対しては chloramphenicol (CP) しか適応抗生剤がないという隘路が生じてきた。加えて、最近では CP にも耐性を示す菌の出現が報告⁶⁾され始めてきているという現実もある。一方、ABPC に感受性を有する *H. influenzae* でさえも、本菌そのものの特性として、ABPC を始めとするペニシリン系抗生物質を作用させると、MIC 以上の濃度で細胞は filament 化あるいは spheroplast 化するものの、容易には溶菌し難いという現象があることも明らかにされてきた^{7,8)}。

そうした中で、従来 *H. influenzae* に対する抗菌力が劣るとされていたセフェム系薬剤の中に、*H. influenzae* に対しても優れた抗菌力を示す薬剤が開発されてきた。その端緒となったのは CTM であったが、ABPC 耐性菌にも良好な抗菌力を示すようになったとはいえ、私達がかつて行った検討ではその作用はむしろ静菌的であっ

た。その理由は、CTM は *H. influenzae* の β -lactamase に対して比較的抵抗性を有しているとはいうものの、恐らく菌体内に取り込まれた CTM が細胞間隙に存在する β -lactamase によって徐々に分解されるためであると推測された。その後、次々と開発されたいわゆる第三世代のセフェム系薬剤と呼ばれるものの多くは、多少の相違はあるものの、 β -lactamase に対する強い抵抗性と、優れた外膜透過性を有し、腸内細菌のみならず、ブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌から *H. influenzae* に至るまで、幅広い菌種に対して抗菌力を示すという特徴を有するようになった。

CTRX もそのような第三世代のセフェム系薬剤のひとつであるが、ここで述べたように *H. influenzae* に対して $0.003 \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$ という優れた抗菌力を示し、しかも ABPC 耐性菌に対しても感性菌の場合と同様の抗菌力を示すという特徴が認められた。この事実は、ABPC 耐性の *H. influenzae* に対して CTRX が MIC 以上の濃度で殺菌的な作用を示したこと、位相差顕微鏡下での菌の形態変化の観察で溶菌像が多数認められたことでも裏付けられた。なお、被験菌に CTRX を作用させると、MIC 附近からそれ以上の薬剤濃度で、菌は filament 化してから溶菌に至るが、その原因のひとつに先に述べた PBP 3 に対する親和性の強さが考えられた。この現象は CTRX のみならず第三世代のセフェム系薬剤のひとつの特質であると考えられるが、いずれにしても上述したような薬剤の特徴を考慮して、*H. influenzae* 感染症に使用すれば、ABPC 耐性の菌に対しても十分にその効力を発揮するものと思われる。

文 献

- 1) ANGEHRN, P.; P. J. PROBST, R. REINER & R. L. THEN: Ro 13-9904, a long acting broad-spectrum cephalosporin: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 913-921, 1980
- 2) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: 本邦で分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について. *Chemotherapy* 26: 491-498, 1978
- 3) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2999-3003, 1975
- 4) 齊藤洪太: *Haemophilus influenzae* におけるペニシリン結合蛋白について. *日医大誌* 47: 236-244, 1980
- 5) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について. 第 4 編 Ampicillin により誘導された *Haemophilus influenzae* のスフェロプラストからの再増殖について. *Chemotherapy* 26: 666-675, 1978
- 6) 黒崎知道, 中村 明, 上原すす子, 寺島 周, 沖本

- 由理, 菅谷直子: Ampicillin 及び Chloramphenicol 両剤耐性 *Haemophilus influenzae*。第29回日本化学療法学会, 長崎, 1981
- 7) 斎藤洪太, 柳瀬義男, 生方公子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。第1編 Pulmonary cyst を基礎とし, 本菌による膿胸を合併した1症例のペニシリン系抗生物質による治療経過とその考察。Chemotherapy 26: 499~507, 1978
- 8) 柳瀬義男, 高橋洋子, 生方公子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。第2編 最近臨床から分離された *Haemophilus influenzae* に対する各種抗生物質の抗菌作用についての検討。Chemotherapy 26: 508~516, 1978

THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFTRIAXONE (Ro 13-9904) AGAINST *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

KIMIKO UBUKATA, RITSUKO NONOGUCHI, NAOKO YAMASHITA,
AKIRA GOTOH and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pharmacology, Teikyo University, School of Medicine

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) was investigated about its antibacterial activity against clinical isolates of *H. influenzae* and the following results were obtained.

1. CTRX showed an excellent activity against 36 strains of *H. influenzae* with an MIC value ranging between 0.003 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$. The inoculum size was 10^6 bacterial cells/ml.
2. CTRX showed an excellent MIC of 0.006 $\mu\text{g/ml}$ against TK-156 strain, which is resistant to ABPC.
3. The activity of CTRX was proved to be bactericidal whether the strains were resistant or sensitive to ABPC.
4. Morphological observation by phasecontrast microscopy indicated a marked filamentation of bacterial cells at a concentration of CTRX around the MIC level and above. It was noted that filamented cells lysed gradually.
5. The affinity of CTRX to PBPs of *H. influenzae* was by far highest affinity to PBP3, secondly to 1B and last to 1A.