LoracarbefのPostantibiotic Effectに関する研究

上野素子・佐藤　清
協和醗酵工業株式会社医薬研究所*

Loracarbef(LCBF)は協和醗酵工業(株)で創製された新しい経口カルバセフェム系抗生物質であり，その化学構造はcefaclor(CCL)と近似する。Postantibiotic effect(PAE)とは，細菌に抗菌薬を一定時間作用させたのちこれを除去し，抗菌薬の消失後も持続する増殖抑制効果のことである。今回，LCBFのグラム陽性菌に対する*in vitro*および*in vivo* PAEについてCCLと比較検討した。

In vitro PAE: LCBF, CCLの両薬剤は，*Staphylococcus aureus* 209-P，*Streptococcus pneumoniae* J673の2菌種に対して濃度依存的にPAEを示した。LCBFのPAEはCCLと大差がなく，ほぼ同程度であった。

In vivo PAE: *S. aureus* Smith, *S. pneumoniae* J673の実験的マウス感染症においてLCBFおよびCCLを経口投与し，腹腔内生菌数の抑制を指標に検討した。LCBFの腹腔内生菌数の増殖抑制作用はCCL投与群よりも長く持続し，LCBFの*in vivo* PAEはCCLより優れていた。

以上の結果，グラム陽性菌に対するLCBFのPAEは，CCLと比較し*in vitro*系ではほとんど差がみられなかったが，*in vivo*系においては高値を示した。

Key words：loracarbef, カルバセフェム，postantibiotic effect

Postantibiotic effect(PAE)は，細菌に抗菌薬を短時間作用させ除去した後，持続する細菌の増殖抑制効果と定義されている[1~3]。抗菌薬のPAEは，抗菌薬の新しい評価法あるいは抗菌薬の投与法について貴重な情報を提供するもの[2]としてここ数年来注目されている研究対象である。Loracarbef(LCBF)は協和醗酵工業(株)で創製された新しい経口カルバセフェム系抗生物質で，cefaclor(CCL)と近似した化学構造を有する。本剤は，グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対してCCLと同様の広域抗菌スペクトルを示す[4]。

本稿では，このLCBFとCCLのグラム陽性菌に対する*in vitro*および*in vivo*でのPAEを検討したので報告する。

Ⅰ．実験材料および実験方法

1．使用薬剤

LCBF(Lot.11927，協和醗酵工業株式会社，原末，力価99.4%)

CCL(ケフラール®，塩野義製薬株式会社，製剤，力価85.1%)

Cyclophosphamide(CPA，ENDOXAN®，塩野義製薬株式会社，製剤)

2．供試菌株

標準株および臨床分離株は当研究所保存の下記の株を用いた。

標準株

Staphylococcus aureus 209-P

Staphylococcus aureus Smith

Micrococcus luteus PCI 1001(bioassayの被検菌として)

臨床分離株

Streptococcus pneumoniae J673

3．培地

S. aureus 209-P，*S. aureus* Smithについては，増殖培地としてMueller Hinton Broth(MHB，Difco)，生菌数測定用平板としてHeart Infusion Agar(HIA，Difco)を用いた。

S. pneumoniae J673については，増殖培地として馬脱線維血液(日本バイオテスト)を5%となるようにBrain Heart Infusion(BHI，Difco)に添加し，生菌数測定用平板としてはBHI培地にBacto agar(Difco)を1.0%，馬脱線維血液を5%となるように添加して用いた。

4．使用動物

ddY系雄マウス(体重17～19g)は，日本エスエルシーより購入した。

5．*In vitro* PAE測定法

実験前日，供試菌株をそれぞれの培地に植菌し

*〒411　静岡県駿東郡長泉町下土狩1188

37℃，18時間静置培養する。実験当日，その培養液の一部を新鮮同培地に植菌し，37℃，1時間(ただし，*S. pneumoniae* J673については2時間)，振盪培養したものを試験菌液(約10^7CFU/ml)とした。薬剤は，それぞれの培地で所定濃度の10倍濃厚液を調製し，ミリポアフィルター(日本ミリポアリミテッド，0.22 μm)で濾過を行った。得られた薬剤溶解液1mlを9mlの菌液が入った50ml容遠沈チューブに加え，薬剤濃度を*S. aureus* Smithでは0.2～6.25 μg/ml，*S. pneumoniae* J673では0.78～25μg/mlになるように作用させた(薬剤溶解液の代わりに培地1mlを加えたものを対照群とした)。薬剤作用2時間後，薬剤除去のため菌液を遠心(3000回転/分，10分)洗浄し，最終的には1000倍に希釈した(対照群も同様の操作を行う)。その後37℃で振盪培養を続け経時的に生菌数を寒天平板培養法より測定した。

In vitro PAEは，次式によって求めた[2]。

PAE＝T－C

T：薬剤処理群の菌数が薬剤除去後10倍になるまでの時間

C：対照群の菌数が薬剤除去後10倍になるまでの時間

6. *In vivo* PAEの測定

*In vivo*でのPAEの測定は，正常マウスおよび好中球減少症マウスの腹腔内感染症モデルを用いて行った。好中球減少症マウスの作製は，感染4日前のマウスにCPAを250mg/kg腹腔内投与して作製した。

正常マウスおよび好中球減少症マウス(各々n=3)の腹腔内に*S. aureus* Smithあるいは*S. pneumoniae* J673(5%Mucin混合)約10^5CFU/ml 0.5mlを接種し，2時間後に1回，0.3% carboxymethyl cellurose(CMC)に懸濁した各薬剤を1および2mg/kg(投与液量0.2ml/マウス)経口投与した。菌接種9時間後まで経時的にマウスを断頭放血死させ，生理食塩水3mlをマウス腹腔に注入しマッサージ後，腹腔浸出液を回収した(約2ml)。採取した腹腔浸出液中の生菌数を寒天平板法より測定した(対照群については，薬剤投与以外の操作を同様に行った)。

In vivo PAE値は，次式によって求めた[2]。

PAE＝T－M－C

T：薬剤投与群マウスにおいてM期終了時の生菌数が10倍になるまでの薬剤投与後の時間

M：薬剤投与後，マウスの血漿中濃度がMICを越えている時間

C：対照群マウスにおいて0.3%CMC投与時の生菌数が10倍になるまでの時間

7. 血漿中濃度測定

正常マウスおよび好中球減少症マウス(各々n=5)に対し，0.3%CMCに懸濁したLCBFおよびCCLを1および2mg/kgマウスに経口投与し，5，15，30，60，120，180分後に断頭採血を行った。血液は5匹分プールし，3000回転/分，10分遠心分離後上清を試料とした。

M. luteus PCI 1001を用いたカップ法によるbio assayで血漿中濃度を測定した。

Ⅱ. 実験結果

1. *In vitro* PAE

①*S. aureus* 209-Pに対するPAE

LCBFおよびCCLの薬剤濃度0.2μg/mlから6.25μg/ml(1～32 MIC)における*S. aureus* 209-Pに対するPAEの測定を行った。LCBFおよびCCLともに1.56μg/ml以上の作用濃度で1h以上のPAEが認められ濃度依存的にPAEが大きくなる傾向がみられた(Table 1)。

②*S. pneumoniae* J673に対するPAE

LCBFおよびCCLの*S. pneumoniae* J673に対するPAEの測定をLCBF 0.78～25 μg/ml(1～32MIC)，CCL 0.39～12.5μg/ml(1～32MIC)の薬剤濃度の範囲で比較し，結果をTable 2に示した。LCBFは濃度依存的にPAEが長くなる傾向を示し，CCLもほぼ同様な成績を示した。

2. 正常および好中球減少症マウスでの血漿中濃度とM期の算出

In vivo PAEの算出に先立ち，使用抗菌剤の血漿中濃度を測定し(Fig. 1)，これを基にM期を算出した。*S. aureus* Smithおよび*S. pneumoniae* J673に対するLCBFのMICは0.78μg/mlであり，正常マウスにおける

Table 1. *In vitro* postantibiotic effect of loracarbef and cefaclor against *Staphylococcus aureus* 209-P

Antibiotic (μg/ml)		Postantibiotic effect (h)
Loracarbef	0.2 (1 MIC)	0.2
	0.39	0.6
	0.78	0.8
	1.56	1.0
	3.13	1.2
	6.25	1.4
Cefaclor	0.2 (1 MIC)	0.1
	0.39	0.2
	0.78	0.6
	1.56	1.1
	3.13	1.1
	6.25	1.2

LCBF 1および2mg/kg経口投与時のM期はそれぞれ0.56および0.91h，好中球減少症マウスにおいてM期はそれぞれ0.25および0.42hを示した。また，CCLの*S. aureus* Smithに対するMICは0.78μg/mlであり，正常マウスおよび好中球減少症マウスに1mg/kgを経口投与したときは血漿中薬剤濃度がMICに達せず，2mg/kgでM期はそれぞれ0.74および0.28hを示した。*S. pneumoniae* J673に対するCCLのMICは0.39μg/mlであり，正常マウスにおける1および2mg/kg経口投与時のM期はそれぞれ0.42および1.61hを示した。好中球減少症マウスにおいては1mg/kg経口投与時では血漿中薬剤濃度がMICに達せず，2mg/kgでのM期は0.91hを示し，これらの数値を*in vivo* PAEの算出に用いた。

3. *In vivo* PAE

正常マウスにおけるLCBFおよびCCL 1および2mg/kg経口投与時の生菌変化曲線をFig. 2(A)，(B)に，*in vivo* PAEをFig. 3に示した。

LCBFは腹腔内生菌数変化曲線においてCCLより長い再増殖抑制効果を示し，Fig. 2(A)から求めた*S. aureus* Smithに対するLCBF 1および2mg/kg経口投与時のPAEはそれぞれ4.9h，5.0h以上であった。一方，CCLの場合1mg/kg経口投与時ではPAEが測定できず，2mg/kgで3.1hを示した。また，Fig. 2(B)から*S. pneumoniae* J673に対するLCBF 1および2mg/kg経口投与時のPAEはそれぞれ4.2h，4.9h以上，CCL 1および2mg/kg経口投与時のPAEは0.8および2.3hの値を示した。次に，好中球減少症マウスにおけるLCBFおよびCCL経口投与時の生菌数変化曲線をFig. 4に，*in vivo* PAEをFig. 5に示した。*S. aureus* Smithに対するLCBF 1および2mg/kg経口投与時のPAEはそれぞれ4:1および4.3hであった。CCLの場合1mg/kg経口投与時ではPAEが測定できず，2mg/kgで2.4h値を示した。また，*S. pneumoniae* J673に対するLCBF 1および2mg/kg経口投与時のPAEはそれぞれ2.8および3.9hであり，CCLの場合1mg/kgではPAEが測定できず，2mg/kgで1.2hを示した。

LCBFの*in vivo* PAEは，正常マウスおよび好中球減少症マウスの腹腔内感染において，CCLと比較し明らかに高値を示した。

Ⅲ. 考　　察

近年，抗菌薬の新しい評価法としてまた抗菌剤の用法設定の立場からPAEの重要性が再認識されている[5~8]。PAEは，抗菌薬を細菌に短時間接触してその後薬剤が消失しても菌の再増殖抑制が残る作用と定義されている[2, 9]。PAEのメカニズムは解明されてはいないが，清水らは抗菌薬が作用部位にとどまり，非致

Table 2. *In vitro* postantibiotic effect of loracarbef and cefaclor against *Streptococcus pneumoniae* J673

Antibiotic (μg/ml)		Postantibiotic effect (h)
Loracarbef	0.78 (1 MIC)	0.1
	1.56	1.0
	3.13	1.7
	6.25	2.7
	12.5	3.1
	25.0	3.0
Cefaclor	0.39 (1 MIC)	0.7
	0.78	0.9
	1.56	0.9
	3.13	1.7
	6.25	1.8
	12.5	2.3

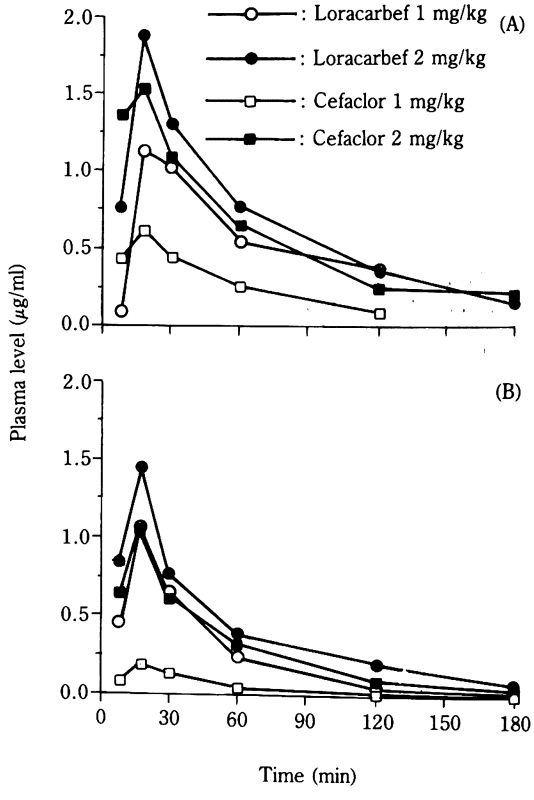


Fig. 1. Plasma levels of loracarbef and cefaclor after oral administration in normal (A) and cyclophosphamide-treated (B) mice.

死的な障害を与えることにより，一時的に増殖を抑えることであると述べている[1]。臨床的には，抗菌薬がある菌に対してPAEを有していればMIC以上で接触していなくても，薬剤を間欠的に投与するだけでも効くことになる。PAEがないとMIC以上の作用濃度の持続が必要となってくる。細胞壁合成阻害剤であるβ-ラクタム剤は，グラム陽性菌にPAEを示すが，グラム陰性菌にはほとんど示さないこと，また蛋白合成阻害を示すアミノグリコシド系抗生物質はグラム陽性菌および陰性菌の両方にPAEを示すことが既に文献[8, 10]で報告されている。β-ラクタム剤がグラム陰性菌にPAEを示さないのは，薬剤除去後に細胞壁合成酵素であるpenicillin結合蛋白質が急速に再合成され，再増殖を起こすものと考えられている[1]。本稿で報告した*in vitro* PAEの実験では，LCBFおよびCCLの両薬剤は，*S. aureus* 209-Pおよび*S. pneumoniae* J673に対して明らかにPAEを示し，その程度は両薬剤ほぼ同等であった。グラム陰性菌に対しては*Escherichia coli* NIHJ JC-2および*Haemophilus influenzae* F4276を用いて検討したが両薬剤ともPAEを示さなかった。

In vivo PAEの測定では，感染病巣部位の菌の増殖とその部位での薬剤動態が必要である。腹腔内感染モ

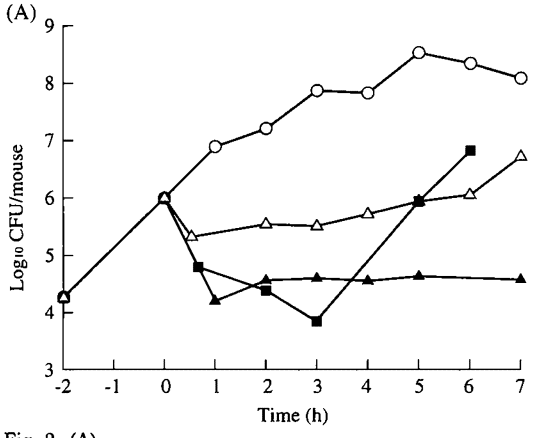


Fig. 2. (A).
Growth curve of *Staphylococcus aureus* Smith in normal mice after a single dose oral administration of loracarbef at 1 (△) and 2 (▲) mg/kg and cefaclor at 2 (■) mg/kg and untreated control (○).

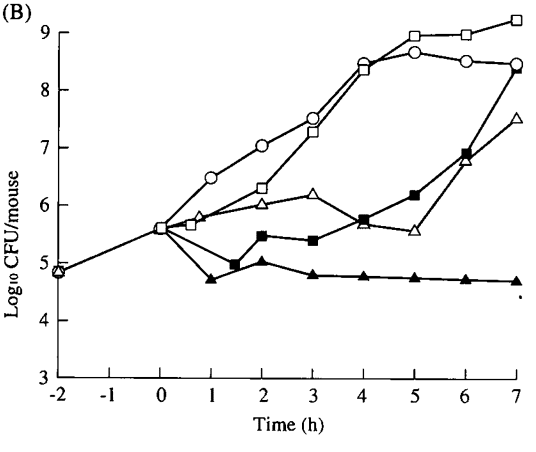
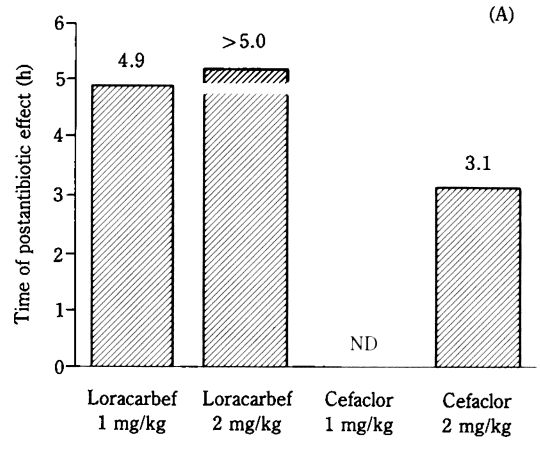


Fig. 2 (B).
Growth curve of *Streptococcus pneumoniae* J673 in normal mice after a single dose oral administration of loracarbef at 1 (△) and 2 (▲) mg/kg and cefaclor at 1 (□) and 2 (■) mg/kg and untreated control (○).



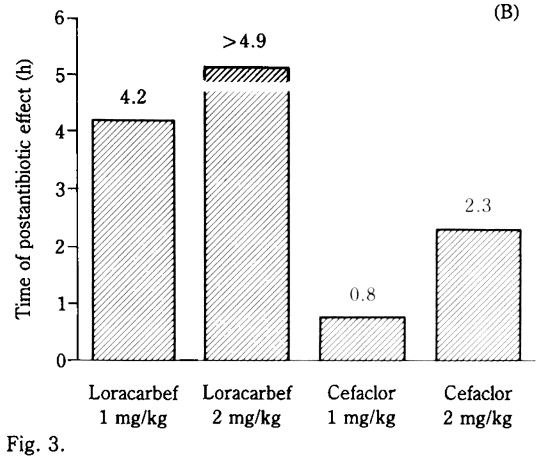


Fig. 3.
In vivo postantibiotic effect of loracarbef and cefaclor against *Staphylococcus aureus* Smith (A) and *Streptococcus pneumoniae* J673 (B) infection in normal mice. ND = not determined.

デルではM期の算出に腹腔内薬剤濃度を指標にしなければならないが，今回の薬剤投与量(1，2mg/kg p.o.)では回収操作による希釈のためM期の測定が不可能だった。そのため腹腔内薬剤濃度と比較的よい相関性を示す血漿中濃度に基づいてPAEを求めた。その結果，*S. aureus* Smithおよび*S. pneumoniae* J673両菌株に対してLCBFはCCLより長いPAE値を示した。*In vivo* PAEにおいては完全に薬剤を除去することは困難である。M期以降もマウス生体内にsub-MICの薬剤が残存していると考えられる。LCBFとCCLの*in vivo* PAEにみられる顕著な差は，両薬剤のマウス生体内濃度のちがいに起因するものと考えられる。Compromised hostにおける感染は難治化しやすく，抗菌剤の投与法が臨床上問題となっており，本稿でもcompromised hostを反映させた系としてCPA投与マウスを用いて検討した。CPAを投与したマウスにおけるLCBF，CCLの*in vivo* PAEは，正常マウスの場合と比較し短くなる傾向がみられた。この原因は，CPA投与によって好中球が減少し菌に対する貪食殺菌効果が低下すること，薬剤の吸収性が減少すること等の可能性が考えられる。

以上の結果，*S. aureus* 209-P, *S. pneumoniae* J673のグラム陽性菌に対し，LCBFはCCLと同等の*in vitro*

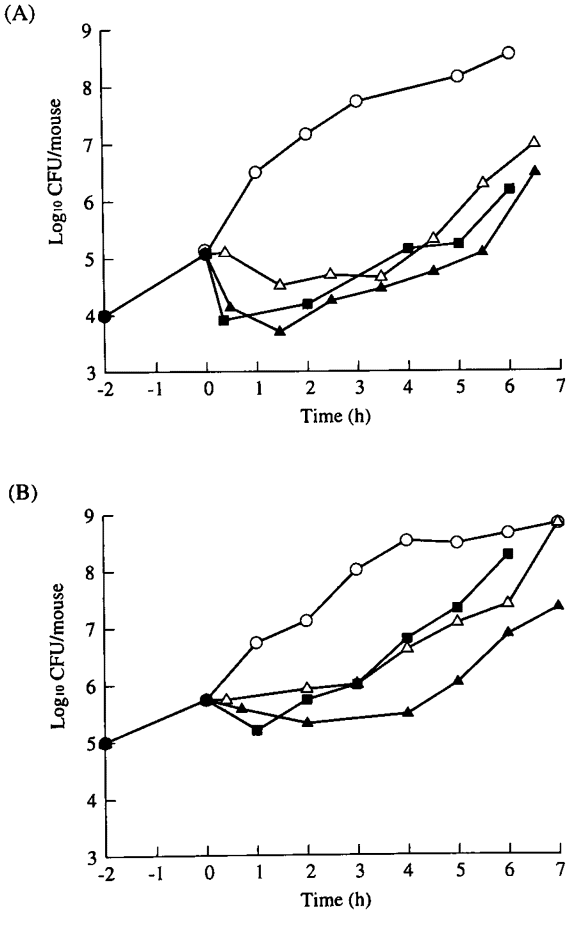


Fig. 4.

Growth curve of *Staphylococcus aureus* Smith (A) and *Streptococcus pneumoniae* J673 (B) in cyclophosphamide-treated mice after a single dose oral administration of loracarbef at 1 (△) and 2 (▲) mg/kg and cefaclor at 2 (■) mg/kg and untreated control (○).

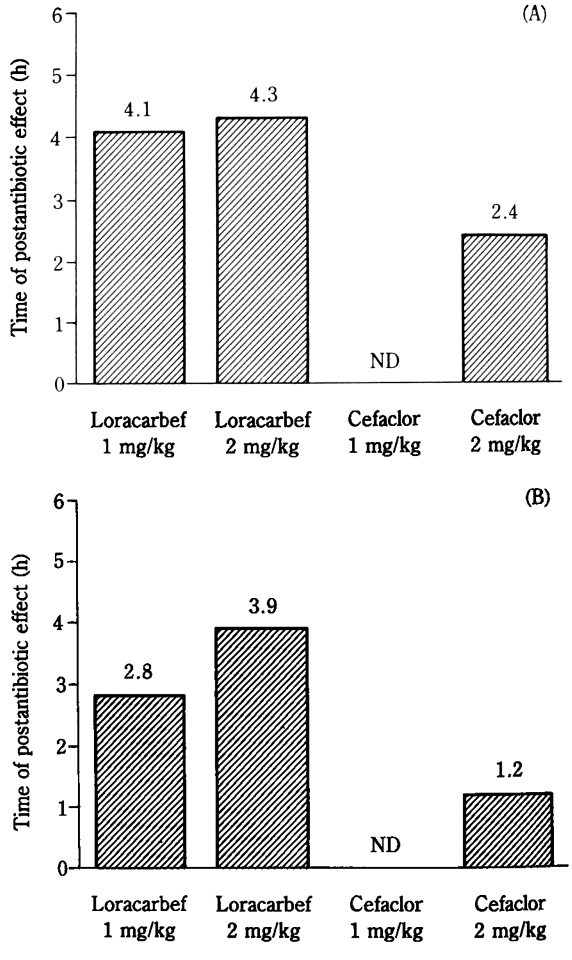


Fig. 5.

In vivo postantibiotic effect of loracarbef and cefaclor against *Staphylococcus aureus* Smith (A) and *Streptococcus pneumoniae* J673 (B) infection in cyclophosphamide-treated mice. ND = not determined.

PAEを示し，*in vivo* PAEにおいてはCCLより高値のPAEを示した。

文　献

1) 清水喜八郎, 戸塚恭一, 熊田徹平, 片平潤一, 深田智子: 化学療法の今後への展望。臨床と研究756:1～9, 1988

2) Craig W A and Gudmundsson S: The Postantibiotic Effect. In Antibiotics in Laboratory Medicine(Lorian, V, ed), pp.515～536, Baltimore: Williams and Wilkins, New York, 1985

3) Drabu Y J and Blakemore P H: The Post-antibiotic effect of teicoplanin: monotherapy and combination studies. J Antimicrob Chemother 27: 1～7, 1991

4) Sato K, Okachi R, Matsukuma I, Mochida K and Hirata T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of KT3777, a new orally active carbacephem. J Antibiotics 42:1844 ～ 1853, 1989

5) Oshida T, Onta T, Nakanishi N, Matsushita T and Yamaguchi T: Activity of sub-minimal inhibitory concentrations of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 26: 29～38, 1990

6) 戸塚恭一, 清水喜八郎, 石井孝弘, 渡辺　宏, 五井　仁, 真山武志: マウス実験的肺炎桿菌症に対するcefminoxの投与方法と感染治療効果。Chemotherapy 39: 9～19, 1991

7) 菊池　賢: 緑膿菌実験感染症に対するアミノ配糖体とβ-ラクタムの投与方法と併用療法の検討。感染症学雑誌65: 216～225, 1990

8) 波多野和男, 東　康之, 峯　靖弘: *Serratia marcescens*に対するceftizoximeとgentamicin併用時のpostantibiotic effectおよび殺菌作用について。Chemotherapy 38: 889～896, 1990

9) Kuenzi B, Segessenmann C and Gerber A U: Postantibiotic effect of roxithromycin, erythromycin, and clindamycin against selected Gram-positive bacteria and *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 20: 39～46, 1987

10) Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J, Leggett J and Craig W A: *In Vivo* Postantibiotic Effect in a Thigh Infection in Neutropenic Mice. J Infect Dis 157: 287～298, 1988

In vitro and *in vivo* postantibiotic effect of loracarbef, a new orally active carbacephem

Motoko Ueno and Kiyoshi Sato
Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
1188 Shimotogari, Nagaizumicho, Suntogun, Shizuoka 411, Japan

Loracarbef (LCBF) is a novel oral β-lactam antibiotic in the carbacephem class. It was synthesized by Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. The chemical structure is similar to that of cefaclor (CCL). Post-antibiotic effect (PAE) means the suppression of bacterial growth that persists after limited exposure to an antibiotic. In this paper, we describe the PAE of LCBF against gram-positive cocci in comparison with that of CCL *in vitro* and *in vivo*.

In vitro PAE: The test organisms used were *Staphylococcus aureus* 209-P and *Streptococcus pneumoniae* J673. LCBF and CCL had PAE against gram-positive cocci of *S. aureus* 209-P and *S. pneumoniae* J673. The PAE of LCBF was almost the same as that of CCL *in vitro*.

In vivo PAE: The *in vivo* PAE of LCBF and CCL were evaluated on systemic infection in mice caused by *S. aureus* Smith and *S. pneumoniae* J673. *In vivo* PAE is the suppression of bacterial growth after the plasma levels of drug fall below the MIC. The PAE of LCBF was clearly longer than that of CCL *in vivo*.

The results showed that LCBF as well as CCL had PAE against gram-positive cocci *in vitro*. The PAE produced by LCBF was longer than that of CCL against *S. aureus* Smith and *S. pneumoniae* J673 *in vivo*.