

β -Lactamase 産生菌によるマウス尿路感染症に対する tazobactam/piperacillin の効果

宇治 達哉・東谷 房広・西田 幸一

兵頭 昭夫・采見 憲男

大鵬薬品工業株式会社製薬センター化学療法剤研究所*

(平成6年7月14日受付・平成6年8月8日受理)

マウスにおいて β -lactamase 産生菌による尿路感染症モデルを作成し, tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) および sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) の治療効果を検討した。 *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* 感染に対し, TAZ/PIPC は SBT/CPZ と同等の優れた治療効果を示した。 β -Lactamase 産生性の *Staphylococcus aureus* と PIPC 感受性の *E. coli* による混合感染において, 単独投与の PIPC の腎内濃度は TAZ/PIPC 投与の PIPC 濃度より低く, PIPC 単独投与では *S. aureus* のみならず *E. coli* に対しても効力は認められなかった。それに対して, TAZ/PIPC と SBT/CPZ はいずれの菌に対しても除菌効果が認められた。これらの結果より, TAZ/PIPC は β -lactamase 産生菌による尿路感染症に対して SBT/CPZ と同等の効力を有するとともに, β -lactamase 産生菌の関与する複数菌感染症にも有効な薬剤と考えられた。

Key words: tazobactam/piperacillin, β -lactamase 産生菌, 尿路感染症

急性あるいは慢性の細菌性尿路感染症には多岐にわたる抗菌薬が使用されているが, その中でもっとも汎用されている薬剤のひとつに β -lactam 薬がある。尿路感染症患者より分離される菌種としては腸内細菌科の菌種をはじめとするグラム陰性菌が多くを占め, 分離菌の約半数が β -lactamase を産生することが報告されている^{1,2)}。これは尿路感染症の治療に β -lactam 薬を使用する際には十分留意すべきであることを示唆するものである。 β -lactam 薬の開発は, 抗菌力の増強とともに β -lactamase に対する安定性の改善にも注力されてきた。その結果, いわゆる第3, 4世代 cephalosporin 薬は β -lactamase に対する高い安定性と強い抗菌力を獲得した。しかし, 依然としてある種の β -lactamase には安定とはいえない³⁻⁵⁾。その一方で, clavulanic acid (CVA)⁶⁾の発見を契機に, 既存の β -lactam 薬に β -lactamase 阻害剤を配合する試みがなされ, 現在では CVA や sulbactam (SBT)⁷⁾ と penicillin, cephalosporin 系薬の配合薬が臨床応用されている。

Tazobactam (TAZ) は新しく創製された β -lactamase 阻害剤であり, 前述の CVA, SBT に比べてより広い β -lactamase 阻害スペクトルを有することが報告されている⁸⁻¹¹⁾。本剤と piperacillin (PIPC) の1:4配合剤である tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は現在, 尿路感染症をはじめとする臨床試験において有効性の確認が進め

られている。本研究では, 各種 β -lactamase 産生菌による単独および複数菌尿路感染症モデルにおける TAZ/PIPC の効力を明らかにするとともに, β -lactamase 産生菌と PIPC 感受性菌による複数菌尿路感染治療における作用メカニズムについて検討を行った。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

当研究所保存の β -lactamase 産生菌 *Staphylococcus aureus* 80 K, *Escherichia coli* 397, *Proteus vulgaris* 19, *Serratia marcescens* 200 L および PIPC 感受性 *Escherichia coli* KC-14 を使用した。

2. 使用動物

ddY 系, 雌, 4週齢のマウス(日本エスエルシー)を感染治療実験には1群5匹, また腎内濃度の測定には1群3匹を使用した。マウスは感染前日より絶水し実験に供した。

3. 使用薬剤

Tazobactam/piperacillin (大鵬薬品工業), piperacillin (富山化学工業), sulbactam/cefoperazone (ファイザー製薬)を使用した。薬剤は生理食塩水に溶解し, *E. coli* 397, *P. vulgaris* 19による単独感染および *S. aureus* 80 K と *E. coli* KC-14の混合感染では1 mg/mouse (TAZ/PIPCでは臨床投与量を

* 徳島市川内町平石夷野 224-2

Table 1. MICs of tazobactam/piperacillin, piperacillin and sulbactam/cefoperazone against test strains

| Strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|----------------------------|--------------------------|------|---------|
| | TAZ/PIPC* | PIPC | SBT/CPZ |
| <i>S. aureus</i> 80 K | 1.56 | 25 | 3.13 |
| <i>E. coli</i> KC-14 | 0.05 | 0.05 | 0.013 |
| <i>E. coli</i> 397 | 6.25 | >100 | 3.13 |
| <i>P. vulgaris</i> 19 | 0.78 | 50 | 3.13 |
| <i>S. marcescens</i> 200 L | 6.25 | >100 | 6.25 |

MICs were determined by the broth microdilution method.

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, PIPC: piperacillin,

SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone

*MICs of TAZ/PIPC are shown as $\mu\text{g/ml}$ of PIPC.

考慮し 1.25 mg/mouse) を, *S. marcescens* 200 L 感染では 2 mg/mouse (TAZ/PIPC では臨床投与量を考慮し 2.5 mg/mouse) を皮下投与した。使用した薬剤の各菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は, Sensitivity test broth (ニッスイ) を用いた微量液体希釈法で測定し, Table 1 に示した。

4. β -Lactamase 産生 *S. aureus* 80 K 共存下および非共存下における *E. coli* KC-14 に対する *in vitro* 殺菌力の測定

Sensitivity test broth で 37°C, 20 時間培養した *S. aureus* 80 K と *E. coli* KC-14 を同 broth で希釈し, 振盪培養を行った。対数増殖期の *E. coli* KC-14 10^4 cfu/ml の菌液またはこれに 10^4 cfu/ml の *S. aureus* 80 K を混合した菌液に $1 \mu\text{g/ml}$ (TAZ/PIPC は $1.25 \mu\text{g/ml}$) の濃度になるように薬剤を添加し, 1, 2, 4, 6 時間後の *E. coli* KC-14 の生菌数を測定した。なお, 生菌数の測定にはドリガルスキー改良培地 (栄研) を使用した。

5. 尿路感染モデルにおける治療実験

Brain heart infusion agar (Difco) 平板で 37°C, 一夜培養した菌を所定の菌数になるように生理食塩水に懸濁し, その 0.1 ml をマウスに経尿道的に接種した。接種には 25 G 注射針の先端を研磨したカテーテルを用いた。菌接種後 4 時間クリップで外尿道口を閉塞し, クリップ解除時より 1 日 2 回 5 日間, 計 10 回薬剤を皮下投与した。

治療効果の判定は腎内生菌数の測定により行い, 感染後 1, 2, 3 および 5 日に腎内生菌数を測定し, 生菌数は 5 匹の対数平均値で表した。各群の有意差検定は Bonferroni (Dunn) T test により行った。

6. 感染マウスにおける腎内薬剤濃度測定

治療実験と同じ方法で作成した *S. aureus* 80 K と

E. coli KC-14 による混合感染マウスにおいて, 薬剤初回投与時の腎内薬剤濃度を経時的に測定した。濃度は各薬剤の 1 mg/mouse (TAZ/PIPC は 1.25 mg/mouse) を皮下投与したマウスの腎を 15, 30 分, 1 時間および 2 時間後に採取し, 50% メタノール中でホモジナイズした後の遠心上清について *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする bioassay 法により測定した。なお TAZ/PIPC では PIPC, SBT/CPZ では CPZ の濃度を測定した。

II. 結 果

1. *E. coli* 397 感染マウスにおける効果 (Fig.1)

E. coli 感染マウスに対して TAZ/PIPC 1.25 mg/mouse を投与したところ, 感染翌日の腎内生菌数は感染時の 1/100 の 10^8 CFU/kidney に減少し, その後 10^8 CFU/kidney の生菌数を維持した。この生菌数の減少は SBT/CPZ 投与マウスと同等で, 薬剤非投与マウスおよび PIPC 投与マウスに比べ有意に少なかった。PIPC 投与マウスでは, 薬剤非投与マウスに比べ 2 日目以後若干の生菌数の減少が認められたが, その治療効果は TAZ/PIPC, SBT/CPZ より劣っていた。

2. *P. vulgaris* 19 感染マウスにおける効果 (Fig.2)

薬剤非投与マウスにおける腎内生菌数は実験期間を通して $10^4 \sim 10^5$ CFU/kidney で推移した。PIPC 投与マウスでは, 2 日目以後薬剤非投与マウスに比べ生菌数の減少傾向が認められたが, その効果は TAZ/PIPC と SBT/CPZ に比べて弱かった。TAZ/PIPC と SBT/CPZ を投与したマウスでは, 感染翌日には 10^4 CFU/kidney, 5 日目には 10^1 CFU/kidney に減少し, 薬剤非投与マウス, PIPC 投与マウスに比べ有意に少ない生菌数であった。

3. *S. marcescens* 200 L 感染マウスにおける効果 (Fig.3)

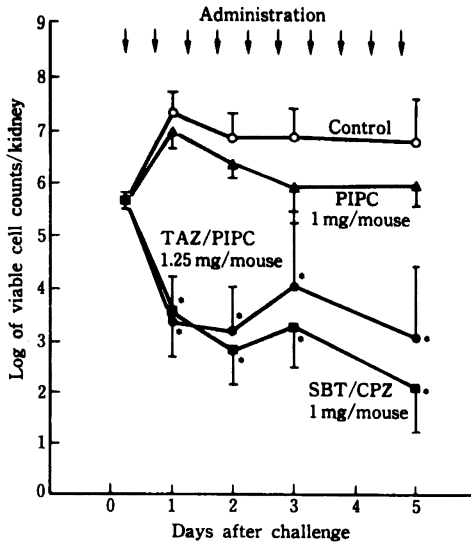


Fig. 1. Therapeutic effects of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) in urinary tract infection with *Escherichia coli* 397. Each point with bar shows the mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$ vs control and piperacillin.

本感染モデルにおいては、2 mg/mouse (TAZ/PIPC は 2.5 mg/mouse) を投与したが、それにもかかわらず PIPC 投与マウスでは薬剤非投与マウスと同様に腎内生菌数の増加がみられ、まったく治療効果は認められなかった。一方、TAZ/PIPC および SBT/CPZ 投与マウスでは接種直後の 10^4 CFU/kidney に比べ2日目より生菌数減少がみられ、3日目以後 SBT/CPZ では 10^3 CFU/kidney、TAZ/PIPC では 10^2 CFU/kidney にまで減少した。

4. *S. aureus* 80 K と *E. coli* KC-14 の混合感染における効果

Fig. 4 の左に *S. aureus* 80 K, 右に *E. coli* KC-14 の腎内生菌数変化をあらわした。

β -Lactamase 産生の *S. aureus* 80 K の腎内生菌数は、薬剤非投与マウスにおいて感染5日間 10^7 CFU/kidney で推移し、PIPC 投与マウスにおいてもほぼ同じであった。それに対して TAZ/PIPC、SBT/CPZ では感染翌日より生菌数は減少し、5日後には TAZ/PIPC で 10^3 CFU/kidney、SBT/CPZ では 10^4 CFU/kidney に減少した。

一方、PIPC 感受性の *E. coli* KC-14 の腎内生菌数

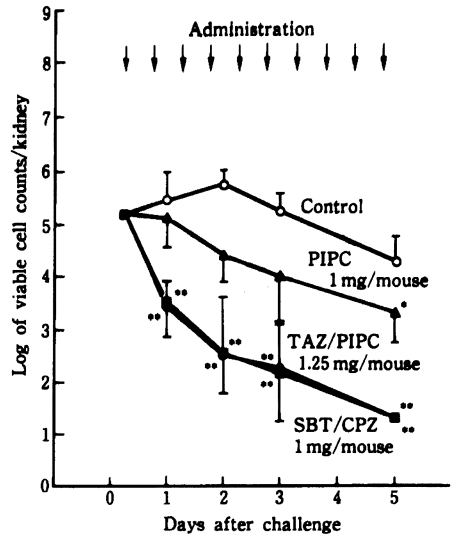


Fig. 2. Therapeutic effects of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) in urinary tract infection with *Proteus vulgaris* 19. Each point with bar shows the mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs control and piperacillin.

は薬剤非投与マウスにおいては感染翌日に 10^8 CFU/kidney に増加し、その後 10^7 CFU/kidney の菌数を維持した。TAZ/PIPC および SBT/CPZ 投与マウスの腎内生菌数は経日的に減少し、5日後には 10^2 CFU/kidney まで減少した。それに対して PIPC 投与マウスでは、腎内生菌数の減少はみられず、薬剤非投与マウスとほぼ同じ菌数であった。

5. *S. aureus* 80 K と *E. coli* KC-14 の混合培養時の *E. coli* KC-14 に対する *in vitro* 殺菌力

Fig. 5 の左には *E. coli* 単独培養時の各薬剤の殺菌力を、右には *S. aureus* 80 K 共存下での殺菌力を経時的な生菌数変化であらわした。

TAZ/PIPC と SBT/CPZ は β -lactamase 産生の *S. aureus* 80 K の存在の有無にかかわらず、*E. coli* KC-14 に対して殺菌的に作用し、培養6時間後においても再増殖は認められなかった。それに対して PIPC では *S. aureus* 非共存下では TAZ/PIPC、SBT/CPZ と同等の強い殺菌力を示したが、*S. aureus* 共存下では培養2時間以後急激な再増殖がみられ、 β -lactamase 産生菌共存下において殺菌力の著しい減少が認められた。

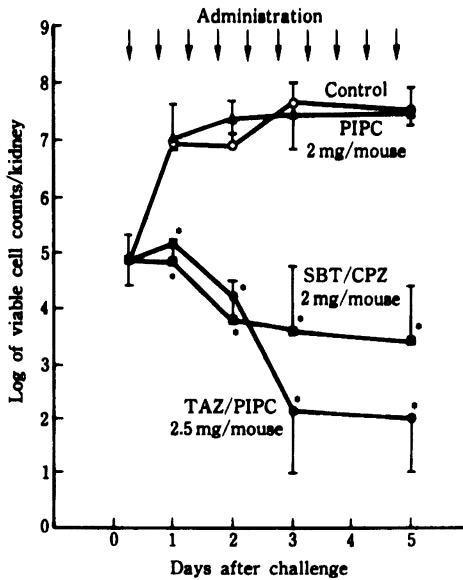


Fig. 3. Therapeutic effects of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) in urinary tract infection with *Serratia marcescens* 200 L. Each point with bar shows the mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$ vs control and piperacillin.

6. *S. aureus* 80 K と *E. coli* KC-14 の混合感染マウスにおける腎内濃度推移

両菌株による混合感染マウスに TAZ/PIPC 1.25 mg/mouse, PIPC および SBT/CPZ 1 mg/mouse を皮下投与したときの腎内薬剤濃度の経時的变化を各々 Fig. 6 に示した。

TAZ/PIPC 投与時の腎内 PIPC 濃度は PIPC 単独投与時の濃度に比べて常に高い値を示し, TAZ/PIPC 投与時の PIPC の AUC_{0-5} は, $79.1 \mu\text{g}\cdot\text{h/g}$, PIPC 単独投与では $23.8 \mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ であった。また, SBT/CPZ 投与時の CPZ 濃度は TAZ/PIPC の PIPC 濃度より低く, AUC_{0-5} は $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ であった。

III. 考 察

尿路感染症における β -lactamase 産生菌の意義については基礎的・臨床的にその重要性が説かれてきた。ヒトの尿路感染症患者より分離される菌種としては腸内細菌科の菌種をはじめとするグラム陰性菌がその多くを占めることが知られており¹⁾, また横田²⁾による全国的な調査結果において尿路感染症患者より分離される菌の 48.8% が β -lactamase 産生菌であったと報告されている。これは尿路感染症の治療に β -lactam 薬を使用する際に十分留意すべき点であることを示している。さらに, 近年汎用されている, いわゆる第 3, 第 4 世代 cephalosporin 薬は一般に β -

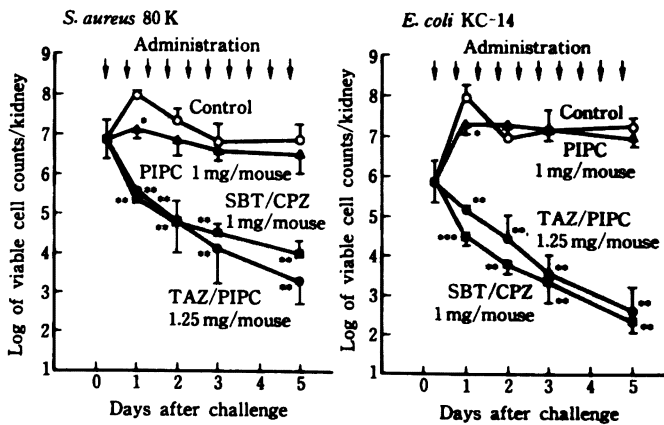


Fig. 4. Therapeutic effects of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) in urinary tract mixed infection with β -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* 80 K and piperacillin-sensitive *Escherichia coli* KC-14. Each point with bar shows the mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs control and piperacillin, *** $P < 0.05$ vs control, piperacillin and tazobactam/piperacillin.

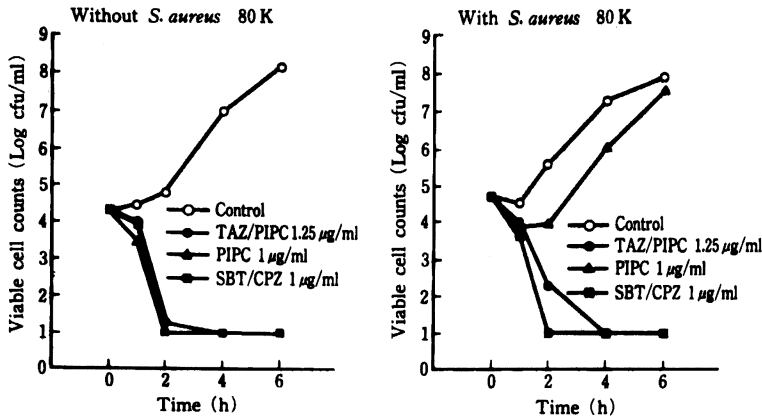


Fig. 5. Bactericidal activities of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) against piperacillin-sensitive *Escherichia coli* KC-14 incubated with or without β -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* 80 K.

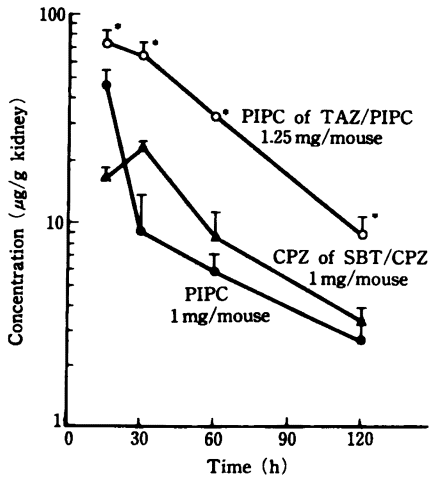


Fig. 6. Kidney concentrations of piperacillin (PIPC) of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), piperacillin (PIPC) and cefoperazone (CPZ) of sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) in mice intraurethrally infected with β -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* 80 K and piperacillin-sensitive *Escherichia coli* KC-14. * $P < 0.05$ vs piperacillin

lactamase に安定といわれているが、腸内細菌科の菌種に広く分布する cephalosporinase や *P. vulgaris* の産生する oxyiminocephalosporinase 等の酵素には

安定とはいえない。 β -lactamase 阻害剤は、このような臨床的背景をふまえて開発されてきた化合物であり CVA, SBT はすでに臨床応用され、主剤である ticarcillin, ampicillin のような penicillin 薬のみならず、cephalosporin 薬である CPZ の活性をも蘇らせてきた^{6,7)}。

新規 β -lactamase 阻害剤である TAZ は既存の CVA, SBT に比べてより広い酵素阻害スペクトルを有し、これまで阻害能の弱かった cephalosporinase に対しても比較的強い阻害力を有する。本化合物と PIPC の配合剤である TAZ/PIPC は、PIPC の弱点である β -lactamase に対する不安定な点を改善する目的で開発された新しい抗菌剤である。

今回の我々の検討において、 β -lactamase 産生菌である *E. coli*, *P. vulgaris* および *S. marcescens* を感染菌として作成したマウス尿路感染症に対して、TAZ/PIPC は PIPC に比べ優れた治療効果を有することが明らかになった。

また、TAZ/PIPC の治療効果が cephalosporin 系薬剤に β -lactamase 阻害剤を配合した SBT/CPZ とほぼ同等であったことは、一般に腸内細菌科の菌種に対する抗菌力が cephalosporin 系薬剤にやや劣る TAZ/PIPC の効力が、尿路感染症においてはその良好な組織移行性から十分に発揮されることを示している。

近年、複数菌感染あるいは感染部位における常在細菌叢が関与する indirect pathogen の問題が感染症の分野に新たな問題を提起している。 β -lactamase に

関与する indirect pathogenicity を考えると、感染症の主たる起因菌と考えられない、あるいはきわめて病原性の弱い β -lactamase 産生菌が感染部位に存在する場合、 β -lactam 薬が感染部位に到達しても産生された β -lactamase により分解を受け、目的とする除菌効果が得られない可能性がある。

荒木ら^{12,13)}はグラム陰性菌の産生する β -lactamase のヒト体液中での安定性を検討し、胆汁を除く体液中においては8日後でも60%以上の活性が残存していること、さらにラットポーチ内感染で誘導されたグラム陰性菌の β -lactamase により、薬剤の不活化が起こることを報告している。また出口ら¹⁴⁾は、上気道感染症における常在菌の産生する β -lactamase が indirect pathogenicity を構成する可能性を示唆している。今回、*S. aureus* と *E. coli* の混合感染モデルにおいて、PIPC の治療効果が β -lactamase 産生 *S. aureus* のみならず感受性の *E. coli* に対しても認められず、*in vitro* においても混合培養時に PIPC の *E. coli* に対する殺菌力が単独培養時に比べ著しく低下した。また、混合感染時の腎内薬剤濃度が TAZ を配合したときに比べ著しく低く、 $AUC_{0-\infty}$ では約 1/3 であった。これらのことは、*S. aureus* の産生した β -lactamase によって PIPC が分解され、感受性の *E. coli* に対する殺菌力が低下したことを示しており、尿路感染症においても産生された β -lactamase が indirect pathogen として働く可能性を示唆するものである。

尿路感染症においては、複数菌感染が多いことを考慮すれば、 β -lactamase 産生菌が関与している場合には β -lactamase 阻害剤の意義がことさら重要になると考えられる。この点については、臨床データをより詳細に検討するほか、疾患モデルにおいて今後さらに検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) 猪狩 淳: 感染細菌分離状況と薬剤耐性の時代変遷。日本臨床 52: 297~302, 1994
- 2) 横田 健: 臨床分離菌の β -lactamase 産生率と各種薬剤に対する感受性の変化。Chemotherapy 39: 941~951, 1991
- 3) 中根たみ子, 三橋 進: Cefzopran の細菌学的評価。Chemotherapy 41 (S-4): 1~10, 1993
- 4) 井上栄子, 三橋 進, 井上松久: Cefclidin の細菌学

的評価。Chemotherapy 40 (S-4): 1~12, 1992

- 5) 小柏美恵子, 井上松久, 三橋 進: Cefazidime (SN 401) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 31 (S-3): 1~16, 1983
- 6) 中沢 久, 井上松久, 三橋 進: BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌作用およびクラバン酸の生菌中 β -lactamase に対する阻害作用について。Chemotherapy 34 (S-4): 1~18, 1986
- 7) 横田 健, 東 映子, 鈴木 映子: Sulbactam と Cefoperazone 合剤の各種細菌臨床分離株に対する抗菌力。Chemotherapy 32 (S-4): 1~10, 1984
- 8) Gutmann L, Kitzis M D, Yamabe S, Acar J F: Comparative evaluation of a new β -lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different β -lactam antibiotics against bacteria harboring known β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 29: 955~957, 1986
- 9) Jacobs M R, Aronoff S C, Johanning S, Sheleas D M, Yamabe S: Comparative activities of β -lactamase inhibitors YTR 830, clavulanate and sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined β -lactamase-producing aerobic gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 29: 980~985, 1986
- 10) Higashitani F, Hyodo A, Ishida N, Inoue M, Mitsuhashi S: Inhibition of β -lactamases by tazobactam and *in vitro* antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. J Antimicrob Chemother 25: 567~574, 1990
- 11) Kuck N A, Petersen P J, Weiss W J, Testa R T: *In vitro* and *in vivo* efficacy of YTR-830H and piperacillin combinations versus β -lactamase-producing bacteria. J Chemother 1: 155~161, 1989
- 12) 荒木晴美, 大懸直子, 南新三郎, 保田 隆, 渡辺泰雄, 荻野 茂, 広野禎介: グラム陰性菌の産生する各種 β -lactamase のヒト体液中安定性。Chemotherapy 41: 1262~1267, 1993
- 13) 荒木晴美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆: β -lactam 剤の治療におよぼす残存誘導型 β -lactamase の影響—ラット pouch 内二次感染モデルを用いた検討—。Chemotherapy 40: 183~190, 1992
- 14) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 中根 豊, 鈴木由美子, 深山成美, 石原理加, 小田清次: 気道の常在細菌叢が産生する β -ラクタマーゼに関する検討第1報 上気道。Chemotherapy 39: 961~967, 1991

Therapeutic efficacy of tazobactam/piperacillin in experimental urinary tract infections with β -lactamase-producing bacteria in mice

Tatsuya Uji, Fusahiro Higashitani, Kouichi Nishida,
Akio Hyodo and Norio Unemi

Anticancer & Antimicrobial Research Lab. Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.,
224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

The efficacy of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) in mice urinary tract infections with β -lactamase-producing bacteria were compared with those of piperacillin (PIPC) and sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ). TAZ/PIPC administration decreased the viable cell counts in kidney as effectively as SBT/CPZ, and their activities were superior to PIPC in infections with β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and *Serratia marcescens*. In mixed infection with β -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* and PIPC-sensitive *E. coli*, concentration of PIPC following PIPC administration in kidney was lower than that following TAZ/PIPC administration. This result reflected the different efficacies of PIPC and TAZ/PIPC. From these results, it was suggested that TAZ/PIPC possessed as potent activity as SBT/CPZ against urinary tract infection, including polymicrobial infection.