

Cefditoren の臨床分離 *Haemophilus influenzae* に対する抗菌力, 殺菌力, β -ラクタマーゼ安定性およびペニシリン結合蛋白質への結合親和性

清水 正樹・高田 利彦・益吉 眞次・吉田 隆
明治製菓株式会社薬品総合研究所*

(平成7年7月10日受付・平成7年7月31日受理)

経口セフェム剤 cefditoren pivoxil (CDTR-PI) の抗菌活性体である cefditoren (CDTR) の臨床分離 *Haemophilus influenzae* に対する感受性分布, 増殖曲線におよぼす影響, 被験菌由来の β -lactamase に対する安定性およびペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性を対照薬のそれらと比較検討した。さらに PBPs に対する親和性と形態変化を電子顕微鏡観察し, 以下の成績を得た。

1. *H. influenzae* 46 株に対する CDTR の MIC₅₀ 値は 0.025 μ g/ml を示し, ほぼ ceftoram (CFTM) のそれと同等であり, cefdinir (CFDN), cefaclor (CCL) および cefpodoxime (CPDX) のそれらより優れていた。

2. CDTR による *H. influenzae* PRC 2 の増殖曲線におよぼす影響を検討した。作用させた CDTR, CFDN および CCL 各々の薬剤濃度をヒト血中濃度にシミュレートした場合, CDTR 添加 6 時間後の生菌数は, 対照薬剤の添加群より減少していた。この条件下における CDTR 添加 4 時間後の走査型電子顕微鏡像は, フィラメント化, バルジ形成および溶菌像が認められた。

3. CDTR は *H. influenzae* PRC 2 の PBP 4 および PBP 5 に対して CFDN および CCL よりも高い親和性を示した。

4. CDTR は *H. influenzae* 由来の β -lactamase に対して非常に安定であった。

Key words: CDTR, *H. influenzae*, PBPs, β -lactamase 安定性

最近, 西岡らは, 呼吸器感染症の主要な起因菌が *Haemophilus influenzae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* であり, これら 3 菌種が外来患者の喀痰から分離される菌のほぼ 80% を占めていることを報告している¹⁾。臨床におけるこれら 3 菌種のうち, 本邦において 1976 年 *H. influenzae* の ampicillin (ABPC) 耐性株が報告されて以来, 臨床材料より分離された *H. influenzae* の 25% が耐性菌であることを報告している²⁾。この耐性メカニズムはプラスミドに由来する β -lactamase 産生による ABPC 耐性であるが, 注射剤としては第二, 第三世代のセフェム剤が有効である。また, 経口剤としてはニューキノロン剤が有効である。

Cefditoren pivoxil (CDTR-PI) は明治製菓³⁾で開発されたプロドラッグ型の経口セフェム剤である。この CDTR-PI は経口投与により消化管で吸収されたのち, 腸管壁のエステラーゼにより加水分解され, cefditoren (CDTR) となり血液中に移行する。CDTR はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に強い抗菌力を発揮することがすでに報告されている³⁾。

この CDTR-PI は, *H. influenzae* 感染症に対しても優れた治療成績を示し, 内科系の臨床治験においても 90% 近くの高い除菌率を示している⁴⁾。今回, CDTR の臨床成績の裏付けとして, 臨床分離 *H. influenzae* に対するヒト血中濃度

にシミュレートした場合の殺菌作用とその作用メカニズム, 被験菌由来の β -lactamase に対する安定性およびペニシリン結合蛋白質に対する結合親和性を対照薬のそれらと比較検討したので報告する。

I. 実験材料と方法

1. 使用薬剤

Cefditoren, cefdinir (CFDN), cefaclor (CCL), cefpodoxime (CPDX) および ceftoram (CFTM) は明治製菓で合成した標品を用いた。結晶 penicillin G (PCG; 明治製菓) は市販品を用い, [¹⁴C]-PCG は AMER-SHAM 社より購入して用いた。いずれの薬剤も力価の明らかなものを用い, 使用直前に溶解した。

2. 使用菌株

1990~93 年までに全国の病院で分離され, 当研究所で -80°C に凍結保存された 46 株を用いた。

3. MIC 測定

日本化学療法学会により定められた MIC 測定法に従った⁵⁾。すなわち, 被験菌を 5% Fildes enrichment (Difco) 添加 Mueller Hinton broth (Difco) (以下 A-broth) で 37°C 一夜培養後, 約 10⁶ CFU/ml の菌濃度に希釈し, 菌浮遊液を調製した。2 倍希釈系列の薬剤を含有する 5% Fildes enrichment 添加 Mueller Hinton agar (Difco) にマイクロプランター (佐久間製作所) を

用いて菌液の約5 μ l を接種した。37°Cで18~20時間培養後、菌の発育が認められない最小の薬剤濃度をMICとした。

4. 増殖曲線におよぼす影響

H. influenzae PRC 2 を被験菌とし、新しく調整したA-brothに接種して37°Cで培養した。一夜培養した菌液を同新鮮培地に接種し37°C 2時間振盪培養し、菌数が 10^5 CFU/ml以上に達した時に、各薬剤 (CDTR⁶⁾, CFDN⁷⁾ およびCCL⁸⁾ を [臨床第I相試験の食後一回投与時における血中濃度にシミュレート] (以下、ヒト血中濃度にシミュレート) するように村川らの方法⁹⁾ で加えた。さらに振盪を続け、薬剤作用開始1, 2, 4および6時間後の生菌数を測定した。なおサンプリングした生菌数測定用試料には、あらかじめ *Proteus vulgaris* GN 7919 より抽出した β -lactamaseを加えて、それぞれの薬剤の抗菌作用を失活させた。また、薬剤減衰時に使用した培地による希釈を補正した値を生菌数とした。

5. 走査型顕微鏡による形態観察

H. influenzae PRC 2 を被験菌とし、ヘミンおよびNADをそれぞれ最終濃度が10および2 μ g/mlになるように添加したBrain heart infusion (Difco) (以下B-broth) で振盪培養し、生菌数が約 10^5 CFU/mlに達した時、各薬剤 (CDTR, CFDN およびCCL) をヒト血中濃度にシミュレートするように添加作用させた。作用4時間後にサンプリングを行い2.5%グルタルアルデヒド添加により固定処理し顕微鏡用試料とした。作製した試料は走査型電子顕微鏡 (SEM; 日本電子) により菌の形態変化を観察した。

6. β -Lactamase 安定性

β -Lactamase に対するCDTRの安定性は、セルホルダーを30°Cに保温した分光光度計 (SHIMADZU UV-260) を用い、UV法により検討した。使用した薬剤の差スペクトルは、粗精製した *Klebsiella pneumoniae* 379 由来の β -lactamaseにより、それぞれの薬剤を加水分解して求めた。*H. influenzae* 由来の β -lactamaseは、ABPC耐性菌をB-brothで培養し、集菌後sonicatorで菌体を破碎して粗酵素溶液を調製した。これら採取した粗酵素溶液 (β -lactamase) に対する各薬剤の安定性をUV法により測定し、PCGを100とした相対加水分解速度で表した。

7. ペニシリン結合蛋白 (PBPs) へ結合親和性測定

CDTR, CFDN およびCCLの *H. influenzae* PRC 2 のPBPsに対する結合親和性の測定は、Sprattの方法¹⁰⁾を改変し検討した。すなわち、それぞれの薬剤が、¹⁴C-PCGとPBPsとの結合に対する阻害の程度を測定する競合阻害で行った。

被験菌をB-brothで37°C、一夜培養後、5%接種菌量となるように同新鮮培地に接種し、さらに5時間振盪培養を続けた。対数増殖期後期の菌体を冷却遠心機で集

め、0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で一回洗浄し、氷冷した20 mlの10 mM MgCl₂加0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に浮遊した。

Sonicatorで処理した菌破砕液を3,000 g, 20分間冷却遠心し、その上清をさらに100,000 g, 30分間遠心して膜画分を得た。緩衝液で1回洗浄後、同緩衝液で蛋白質20 mg/mlになるように調製した。膜画分30 μ lと精製水またはCDTR, CFDNおよびCCLを各々1/5, 1, 5, 25 MIC値の11倍になるように3 μ l加え、30°C 10分間反応させた。この反応液に3 μ lの [¹⁴C]-PCG (2.18 GBq/nmol/ml) を加え、30°C 10分間反応させた。反応後3 μ lの20% sarkosyl[®] 含有60 mg/ml PCG (W/V) を加え反応を止めた。可溶性膜画分30 μ lと20 μ lのSDS緩衝液および β -mercaptoethanolを加え沸騰水中で2分間加熱し、電気泳動用サンプルとした。

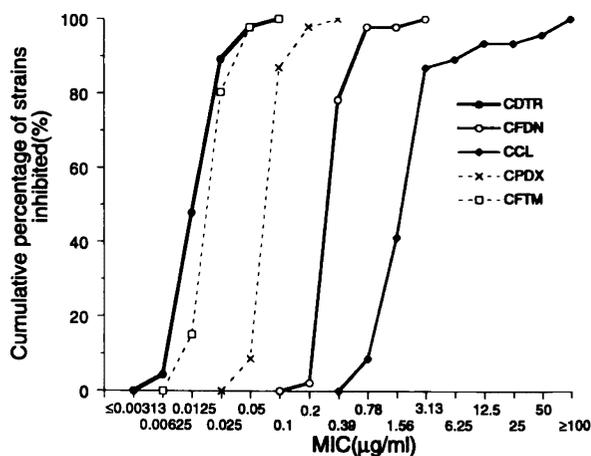
その全量を10%acrylamide gelにのせ、60 Vで1時間、90 Vで4時間の定電圧電気泳動を行った。泳動後取り出したgelを7%酢酸-50%methanol液で1時間、7%酢酸-15%methanol液で処理した。

フルオログラフィーは、gelをDMSOで脱水後2,5-diphenyloxazoleを染み込ませて乾燥し、KODAK[®] XR-5 filmに密着して-80°C 14日間感光させた。感光後、被験薬剤のPBPsに対する結合親和性は、 [¹⁴C]-PCGのPBPsへの結合親和性の阻害率として表した。

II. 結 果

1. 感受性分布

H. influenzae 46株に対する感受性分布はFig. 1に示した。CDTRのMIC₉₀値は0.025 μ g/mlであり、対照薬のCFDN, CCL, CPDXおよびCFTMはそれぞれ0.78, 3.13, 0.1, 0.025 μ g/mlを示した。CDTRの抗菌力はCFTMと同等であったが、他の対照薬剤より



CDTR: cefditoren, CFDN: cefdinir, CCL: cefaclor, CPDX: cefpodoxime, CFTM: ceftetam

Fig. 1. Cumulative sensitivities of 46 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* to cefditoren and other antibiotics.

強かった。

2. 増殖曲線におよぼす影響

H. influenzae PRC 2 の増殖曲線におよぼす各薬剤の影響を Fig. 2 に示した。CDTR を、ヒト血中濃度推移に作用させた場合、生菌数は薬剤添加 6 時間後に接種菌量から約 3 log 減少した。しかし、CFDN および CCL ではともに約 1 log の減少しか認められなかった。

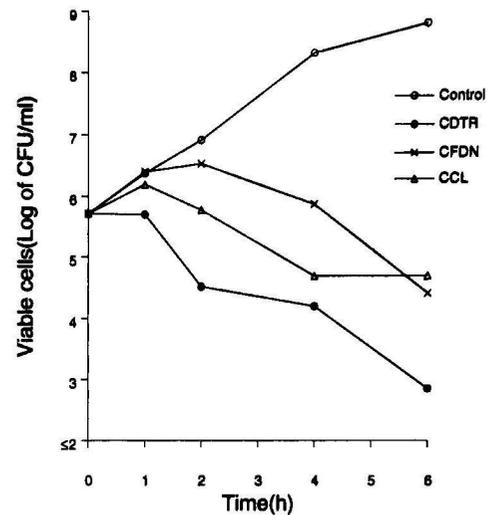
3. 走査型顕微鏡による形態観察

CDTR と他の薬剤をヒト血中濃度にシミュレートして作用させた場合の走査型顕微鏡像を Fig. 3 に示した。ヒト血中濃度にシミュレートして作用させた場合、4 時間後に使用した被験薬剤すべてにおいてフィラメント化、バルジ形成および溶菌像が観察された。

4. β -Lactamase に対する安定性

粗精製した *K. pneumoniae* 379 由来の β -lactamase を用いて、CDTR、CFDN および CCL を加水分解した。被験物質それぞれの活性体と加水分解物の差スペクトルを求めることで、測定波長と 1 mM 分解時の吸光度値 (ΔE) を測定した。CDTR、CFDN および CCL の測定波長および ΔE はそれぞれ 265 nm, $4.19 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 285 nm, $15.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ および 265 nm, $4.78 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ であった。これら求めた値を用いて、*H. influenzae* 由来の β -lactamase に対する CDTR の安定性を CFDN および CCL と比較した成績を Fig. 4 に示

した。CDTR は *H. influenzae* 由来の β -lactamase に対して CFDN 同様非常に安定であったが、CCL は若干加水分解された。



CDTR: cefditoren, CFDN: cefdinir, CCL: cefaclor

Fig. 2. Bactericidal activity of cefditoren, cefdinir and cefaclor against *Haemophilus influenzae* PRC 2 simulating human blood level concentrations by the stepwise *in vitro* model.

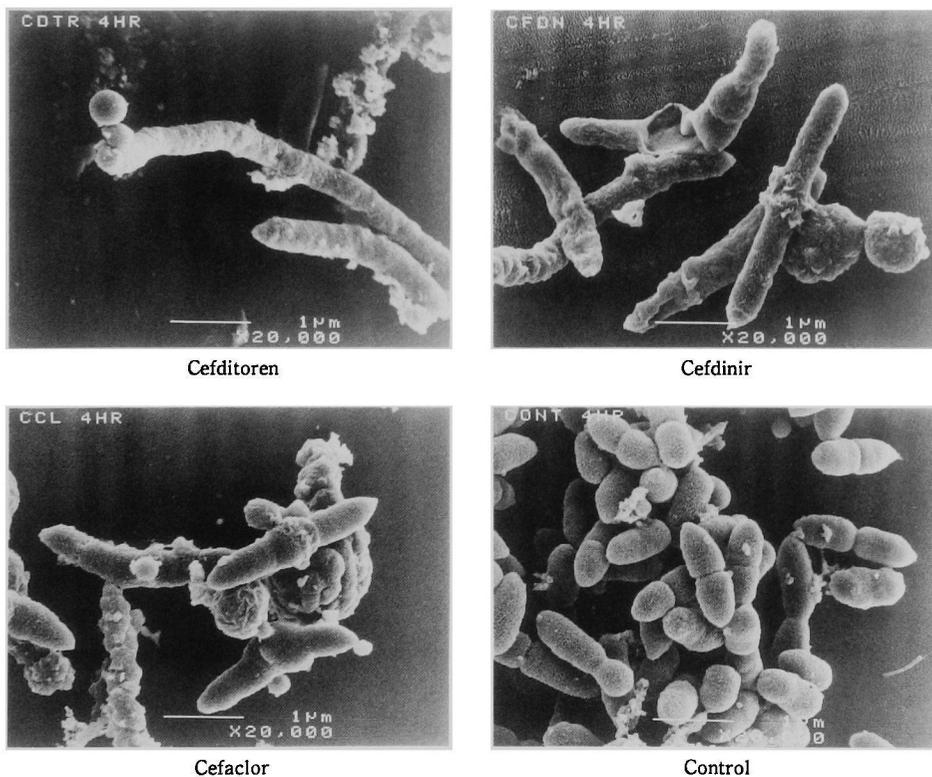


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Haemophilus influenzae* PRC 2 exposed to drug concentrations of cefditoren, cefdinir and cefaclor [4 h] simulated by the stepwise method. ($\times 20,000$)

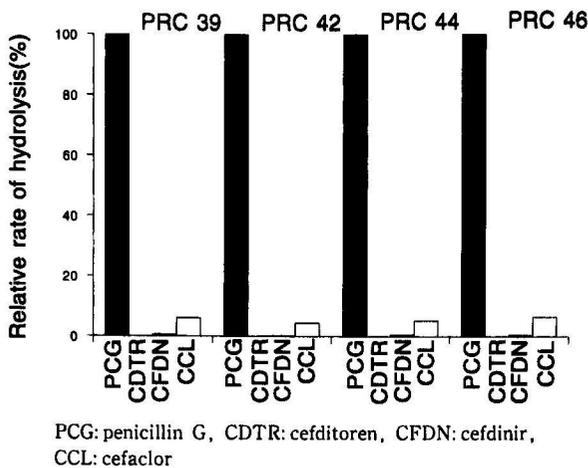


Fig. 4. Stability of cefditoren, cefdinir and cefaclor against β -lactamase derived from *Haemophilus influenzae*.

5. PBP_s に対する親和性

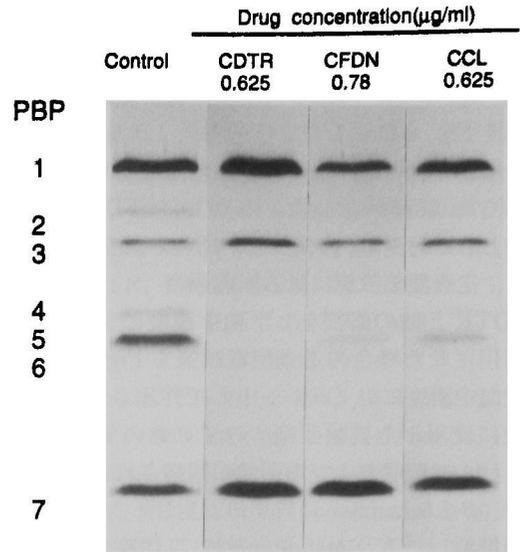
CDTR, CFDN および CCL の *H. influenzae* PRC 2 の PBP_s に対する結合親和性のフルオログラフィーの結果の一部を Fig. 5 に、各バンドの 50% 競合阻害濃度 (I_{50} 値) を Table 1 に示した。Makover らの報告¹¹⁾ のように *H. influenzae* の PBP_s を 7 つに分類すると、CDTR は CFDN および CCL に比べ PBP 4 と PBP 5 に強い結合親和性を示した。また、CDTR の PBP 2 に対する親和性は CFDN よりも劣っているが、CCL のそれとほぼ同等であった。さらに [¹⁴C]-PCG のみが結合した各バンド PBP 1~PBP 7 に対する各薬剤の添加により結合阻害した I_{50} 値を算出すると、CDTR の PBP 4, 5 に対する I_{50} 値は、ほぼ MIC 値に近似した値を示し、CFDN, CCL のそれよりも小さい値であった。PBP 2 に対する CDTR の I_{50} 値は、MIC 値の 10 倍を要した。

III. 考 察

H. influenzae は呼吸器感染症の起因菌として *M. (B.) catarrhalis* および *S. pneumoniae* と同様に高い分離頻度¹⁾ を示しており、CDTR の本菌に対する細菌学的研究は重要であると考えられる。

我々は今回、被験菌に臨床分離 *H. influenzae* を使用し、CDTR のヒト血中濃度にシミュレートした条件下での殺菌作用とこの条件下における細菌の形態変化の観察、*H. influenzae* 由来の β -lactamase に対する安定性、さらに PBP_s に対する結合親和性を検討した。

CDTR は臨床分離された *H. influenzae* に対して、CFDN および CCL よりも優れた抗菌力を示し、耐性菌も検出されなかった。これは *H. influenzae* 由来の β -lactamase に対して非常に安定なこと、さらに PBP_s への高い結合親和性を示したことから示唆される。また、*H. influenzae* 由来の β -lactamase は TEM 型 peni-



CDTR: cefditoren, CFDN: cefdinir, CCL: cefaclor

Fig. 5. Competition of cefditoren, cefdinir and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Haemophilus influenzae* PRC 2.

Table 1. Competition of cefditoren, cefdinir and cefaclor with [¹⁴C]-labelled penicillin G to PBP_s in the cytoplasmic membrane of *Haemophilus influenzae* PRC 2

Antibiotic	MIC (μ g/ml)	I_{50} (μ g/ml)						
		PBP 1	2	3	4	5	6	7
Cefditoren	0.025	>3.13	0.283	>3.13	0.0249	0.0328	-	>3.13
Cefdinir	0.78	2.26	0.0877	>19.5	0.126	0.121	-	>19.5
Cefaclor	3.13	9.49	0.368	42.7	2.33	1.83	-	>78.3

-: Not detected

cillinase であり¹²⁾、CDTR がこの PCase に安定であることが確認された。

CDTR の増殖曲線におよぼす影響については、ヒト血中濃度にシミュレートし検討した。経口投与された薬剤の血中濃度は、時間とともに変化しているため、一定濃度にセットした系における細菌への作用は生体内での作用を忠実に再現しているとは考えられない。したがって、CDTR のヒト血中濃度にシミュレートさせた系における殺菌作用では、CFDN および CCL よりも優れており、電顕の観察においてもバルジ形成および溶菌像が主な像であった。*In vitro* における抗菌剤の細菌学的な評価研究には、抗菌剤のヒト組織中濃度変化にシミュレートした model system を応用することが妥当であろうと考えられる。また、最近オートシミュレーションによるヒト血中濃度推移における殺菌作用の報告がある^{13,14)}。

各々の薬剤と *H. influenzae* 由来の PBP_s との結合親和性の測定濃度を I_{50} 値で比較した場合、CDTR は PBP 4, 5 に高い親和性を示し、CFDN および CCL のそれらよりも高い親和性を示すことを認めた。*H.*

influenzae PRC 2 に対する CDTR の PBP_s 結合親和性を検討したところ, Malouin と Bryan¹⁶⁾, Thomas ら¹⁶⁾ の報告による隔壁形成をつかさどるとされている PBP 4, 5 に結合親和性を示し, 電子顕微鏡観察のフィラメント像と一致する結果であった。CFDN および CCL の PBP_s 結合親和性は, PBP 4, 5 さらに細胞の分裂に関与するとされている PBP 2 に強い結合親和性を示した。この結果もまた電子顕微鏡観察のバルジ形成および溶菌像と一致するものであった。PBP_s 結合親和性および電子顕微鏡像から, CDTR は隔壁形成阻害と細胞分裂阻害に作用する薬剤濃度に差があることが明らかとなった。CDTR が添加 2 時間後まで静菌的に作用するのはこれが理由と推察される。

以上の結果から CDTR の *H. influenzae* に対する強い抗菌作用は, 高い β -lactamase 安定性と低濃度での PBP_s への高い結合親和性に起因していることが示唆された。さらに血中濃度にシミュレートした場合にも CDTR は強い殺菌作用を示していることから, これらが cefditoren pivoxil の臨床治験におこる良好な成績(効果)を反映した要因と推察される。

文 献

- 1) 西岡きよ, 荻原央子, 丹野恭夫, 滝島 任: 近年の呼吸器感染原因菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* 及び *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* の抗生剤感受性—1987~1989 の 3 年間の検討—. *Chemotherapy* 39: 443~451, 1991
- 2) 宇塚良夫: 各領域感染症と Empiric Therapy 呼吸器感染症。化学療法の領域 6: 18~24, 1990
- 3) Tamura A, Okamoto R, Yoshida T, Yamamoto H, Kondo S, Inoue M, Mitsunashi S: *In vitro* and *In vivo* antibacterial activities of ME 1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1421~1426, 1988
- 4) 柴 孝也: 新薬シンポジウム (II) ME 1207, IV. 臨床, 1. 内科。109~127, 1991
- 5) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 6) 島田 馨, 松元 隆, 小宮 泉, 新開祥彦: 新経口セ

フェム剤, ME 1207 の臨床第 I 相試験。 *Chemotherapy* 40 (S-2): 105~119, 1992

- 7) 島田 馨, 岡 慎一: Cefdinir の吸収に及ぼす食事の影響。 *Chemotherapy* 37 (S-2): 246~256, 1989
- 8) 大友正明, 伊藤昌男, 飯田政明, 安田正俊, 園山高康, 松田繁雄: S 6427 (Cefaclor 持続性製剤) の臨床第 I 相試験。 *Jap. J. Antibiotics* 38-3: 822~833, 1985
- 9) 村川武雄, 上村利明, 岡田直彦, 坂本 博, 横田好子, 西田 実: 生体内濃度に simulate した *in vitro* model system における cephalosporin 類の殺菌作用。 *Chemotherapy* 25: 585~590, 1977
- 10) Spratt R G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72: 2999~3003, 1975
- 11) Makover S D, Wright R, Telep E: Penicillin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 584~588, 1981
- 12) Daum R S, Murphey-Corb M, Shapira E, Dipp S: Epidemiology of *rob* β -lactamase among ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in the United States. *J. Inf. Dis.* 157: 450~455, 1988
- 13) 後藤 元, 岡 慎一, 後藤美江子, 島田 馨, 深谷一太, 佐野靖之, 宮本康文, 稲松孝思: ME 1207 の基礎的, 臨床的検討。 *Chemotherapy* 40 (S-2): 333~343, 1992
- 14) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 浦山京子, 木村哲, 島田 馨: *In vitro* pharmacokinetic system を用いた sparfloxacin 抗菌活性の検討。 *Chemotherapy* 39 (S-4): 54~58, 1991
- 15) Malouin F, Bryan L E: *Haemophilus influenzae* penicillin-binding proteins 1a and 3 possess distinct and opposite temperature-modulated penicillin-binding activities. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 498~502, 1988
- 16) Thomas R, Parr T R, Bryan L E: Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, β -lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 747~753, 1984

Antibacterial activity, bactericidal effect and β -lactamase stability of CDTR, and its binding affinity to PBPs against clinical isolate of *Haemophilus influenzae*

Masaki Shimizu, Toshihiko Takata, Shinji Masuyoshi
and Takashi Yoshida

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

The MIC distribution, bactericidal activity and β -lactamase stability of cefditoren (CDTR), the active form of an oral cephalosporin cefditoren pivoxil (CDTR-PI), against a clinical isolate of *Haemophilus influenzae*, as well as its affinity for penicillin-binding proteins (PBPs) were compared with those of other reference compounds. The results were as follows.

1. The MIC₉₀ value of CDTR against 46 strains of *H. influenzae* was 0.025 μ g/ml, which was almost the same as that of ceftamandole (CFTM) but superior to that of cefdinir (CFDN), cefaclor (CCL), and cefpodoxime (CPDX).

2. The *in vitro* bactericidal activity of CDTR against *H. influenzae* PRC 2 was superior to that of CFDN and CCL at concentrations simulating human blood levels after 6 hours. Under these conditions, after 4 hours *H. influenzae* treated with CDTR in this model simulating the human blood level showed filaments, bulges and bacteriolysis by scanning electron microscopic observation.

3. The affinity of CDTR for PBP 4 and PBP 5 among the PBPs of *H. influenzae* PRC 2 was higher than that of CFDN and CCL. Its high affinity was paralleled by its strong antibacterial activity.

4. The relative rate of hydrolysis of CDTR by β -lactamase was determined. CDTR as well as CFDN was very stable to β -lactamase derived from *H. influenzae*.