

動物局所感染モデルにおけるAzithromycinの 治療効果および組織移行性

松永敏幸・下平博仕・小川正俊・沢田安房・武藤秀弥・榎垣一憲・下岡新雄

ファイザー製薬株式会社新薬開発センター*

Azithromycin (AZM) の各種動物局所感染モデルにおける治療効果をclarithromycin (CAM), tosusfloxacina (TFLX) およびcefaclor (CCL) と比較すると共に、感染組織への薬剤の移行性についても検討した。

Staphylococcus aureus で作製したラットのポーチ内感染において、AZM (30mg/kg を感染0, 6 および24時間後に投与) は、ポーチ内生菌数を治療前の約1/100に減少させ、その効果は感染後4日まで持続した。AZMのMICはCAMより4倍、TFLXより16倍高かったが、治療効果は同じ投与法のCAMおよびTFLXより優れていた。また、CCLのMICはAZMより高く、その治療効果もAZMより著しく劣っていた。

Streptococcus pyogenes によるマウス皮下感染において、AZM (25mg/kg を感染後1日および2日目に1日2回、2日間投与) は、ディスク内の生菌数を無治療対照の約1/100に減少させた。AZMのMICはCAMより8倍高かったが、その治療効果はCAMより有意 ($p < 0.05$) に優れていた。

Haemophilus influenzae によるマウス呼吸器感染において、AZM (50mg/kg を感染4時間後に投与) は、同じ投与法のCAMおよび無治療対照より有意 ($p < 0.01$) に肺内生菌数を減少させた。AZMの肺内濃度は血中濃度の約40倍以上に達し、薬剤投与後48時間でも感染菌のMIC値を超える濃度が肺に維持されていた。これに対して、CAMでは投与後24時間に薬剤は検出されなかった。AZMの肺内濃度は非感染マウスより感染マウスで有意 ($p < 0.01$) に高く維持されていた。また、血中濃度も同様の傾向を示した。

これらの成績から、感染部位への良好な移行性と持続性を有するAZMは、臨床的にも各種局所感染に対して優れた治療効果を示すものと思われる。

Key words : azithromycin, 局所感染, *in vivo*, 抗菌力, 組織移行性

Azithromycin (AZM) は、erythromycin (EM) の14員環のラクトン部にメチル置換窒素を導入して15員環(アザライド系)とした新規なマクロライド系抗生物質である。本薬は*Escherichia coli* および*Haemophilus influenzae* 等のグラム陰性菌に対する抗菌力が、従来のマクロライド剤より数倍強くなっている¹⁾。また、本薬は酸に安定であり²⁾、食細胞内への移行性が高いため、特に感染組織で高濃度の薬剤が維持されるという特長を有している^{3,4)}。本報では、各種局所感染モデルを用いて、AZMの治療効果をclarithromycin (CAM), tosusfloxacina (TFLX) およびcefaclor (CCL) と比較すると共に、感染組織への薬剤の移行性についても合わせて検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

AZMは米国ファイザー社で合成した原末を用い、対照薬としてCAM(大正製薬), TFLX(富山化学)および

CCL(Sigma)を使用した。

2. MIC測定法

Streptococcus pyogenes PT-50 および *H. influenzae* PT-739のMICは日本化学療法学会標準法⁵⁾に従い、寒天平板希釈法(接種菌量: 10^6 CFU/ml)で測定した。測定培地として、*S. pyogenes*には5%馬脱線維血液加Mueller-Hinton agar (MHA, Difco), *H. influenzae*にはチョコレート寒天培地(基礎培地: MHA)を使用した。また、*Staphylococcus aureus* PT-724のMICは、日本化学療法学会の定めた微量液体希釈法^{6,7)}で測定した。

3. *S. aureus*ポーチ内感染実験

Selyeの方法⁸⁾に準じて、ラット(Wistar, 5週齢, 雄, 体重215g [平均], $n=5$)の背部皮下にクロトン油肉芽腫ポーチを作製した。ポーチ内に*S. aureus* PT-724の菌懸濁液を接種し、感染直後および感染から6時間ならびに24時間後に0.1% carboxymethylcellulose sodium (CMC,

*〒470-23 愛知県知多郡武豊町五号地2番地

和光純薬)に懸濁した30mg/kgのAZM, CAM, TFLXあるいはCCLを経口投与した。感染後2日, 3日および4日目にポーチ内から滲出液を採取し, 生菌数を測定した。感染4日後の滲出液については, AZMおよびCAMの薬剤濃度をHPLC法⁹⁾で測定した。

4. *S. pyogenes*ディスク感染実験

約 10^6 CFU/diskの*S. pyogenes* PT-50を含ませたペーパーディスク(直径8mm, 東洋濾紙)2枚をペントバルビタールで麻酔したマウス(ICR, 4週齢, 雄, 体重25g[平均], n=5)の背部皮下に埋め込み, 菌接種から1日および2日目に0.1%CMCに懸濁したAZMならびにCAMを1回25mg/kgあるいは50mg/kg, 1日2回経口投与した。感染から5日後にマウスを屠殺して2枚のディスクを摘出し, 1枚目は生菌数の測定に, 2枚目は薬剤濃度の測定に供した。薬剤濃度の測定はHPLC法⁹⁾で行った。

5. *H. influenzae*呼吸器感染実験

Cashらの方法¹⁰⁾を応用して*H. influenzae* PT-739を5% Fildes enrichment添加Brain heart infusion agar(Difco)に包埋し, 寒天ビーズを作製した。この寒天ビーズの懸濁液をペントバルビタールで麻酔したマウス(ICR, 4週齢, 雄, 体重22g[平均])の気管内に接種して感染させた。感染から4時間後に0.1%CMCに懸濁した50mg/kgのAZMあるいはCAMを経口投与した。薬剤投与から4, 24および48時間後にマウス(n=5)を屠殺し, 肺を摘出してホモジネートし, 生菌数と薬剤濃度を測定した。同時に, 末梢血を採取してプール(n=5)し, 血清中の薬剤濃度も測定した。薬剤濃度はbioassay法⁹⁾で測定した。また, *H. influenzae* PT-739を感染させていない無処置マウス(n=5)に50mg/kgのAZMあるいはCAMを経口投与し, 投与後4, 24および48時間後に肺と血清中の薬剤濃度を前記と同じ方法で測定した。薬動力学的パラメーターとして, $T_{1/2}$ は終末相の実測値から線形最小2乗法で消失速度定数(kel)を算出し, $T_{1/2} = \ln 2 / kel$ の関係式で求めた。AUCは台形法で計算した。

6. 統計解析

有意差検定はコンピュータソフトウェア(Yukms統計ライブラリー)を用いてDunnett's multiple comparison testおよびStudent's *t* testにより行った。

II. 結 果

1. *S. aureus*ポーチ内感染

AZM投与群のポーチ内生菌数は, 感染2日後に治療前の約1/100に減少した。その効果は感染4日後まで持続し, 感染3日および4日後の比較ではCCL($p < 0.01$)およびTFLX($p < 0.05$)より有意に優れていた。また, AZM投与群の感染4日後の生菌数は, CAMの約1/10であった(Fig. 1)。感染4日後の滲出液中の薬剤濃度(平均±標準誤差)は, AZMが 277 ± 87 ng/mlであったのに対して, CAMでは検出限界(20ng/ml)以下であった。

2. *S. pyogenes*ディスク感染

AZMは50mg/kg/day投与でディスク内の生菌数を無治療対照の約1/100に, 100mg/kg/day投与で約1/10⁴に減少させた。その効果はCAMより有意(50mg/kg/day, $p < 0.05$; 100 mg/kg/day, $p < 0.01$)に優れていた(Fig. 2)。感染5日後(薬剤投与終了後3日目)にディスク内の薬剤濃度(平均±標準誤差)を測定した結果, AZM投与群では50mg/kg/dayで 24 ± 3 ng/disk, 100mg/kg/dayで 57 ± 6 ng/diskの薬剤が検出されたが, CAMはいずれの投与群でも検出されなかった(< 5 ng/disk)。

3. *H. influenzae*呼吸器感染

AZMはCAMおよび無治療対照と比較して肺内生菌数を著しく($p < 0.01$)減少させ, 感染52時間後におけるAZM投与群の生菌数はCAMの約1/10, 無治療対照群の約1/100であった(Fig. 3)。AZMの肺内濃度は血中濃度の約40倍以上に達し, 投与後48時間においても感染菌のMIC値を越える濃度が肺に維持されていた。一方, CAMは投与後24時間には検出されなくなった。感染時

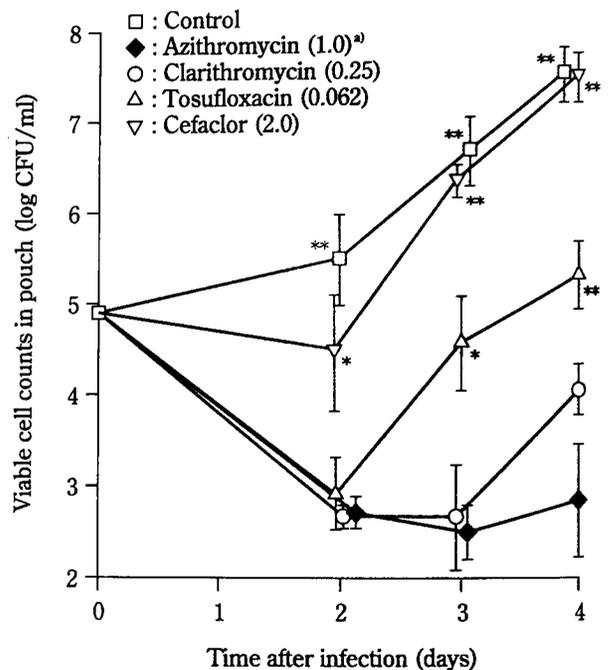


Fig. 1. Therapeutic activities of azithromycin and control antibiotics against a *Staphylococcus aureus* PT-724 pouch infection in rats.

Treatment: Rats were given antibiotics (30 mg/kg) orally 0, 6 and 24 h post-challenge.

*: Significantly different from the value for azithromycin ($p < 0.05$, Dunnett's multiple comparison test).

** : Significantly different from the value for azithromycin ($p < 0.01$, Dunnett's multiple comparison test).

a) : MICs (μ g/ml) for the pathogen were determined by the broth microdilution method.

All values are means \pm standard errors.

と非感染時の比較で、AZMは非感染マウスより感染マウスでの肺内濃度(有意差, $p < 0.01$)ならびに血清中濃度が高く、かつ $T_{1/2}$ は長くAUCも大きかった(Fig. 4, Table 1)。

III. 考 察

*S. aureus*のポーチ内感染において、MICの比較ではAZMがCAMより4倍、TFLXより16倍劣っていたが、治療効果ではAZMがこれらの薬剤より明らかに優れていた。*S. pyogenes*の皮下ディスク感染においても同様の成績が得られた。また、これらの感染モデルにおいてAZMは、薬剤投与後3日目でも感染部位から薬剤が検出されており、本試験での治療効果の差は薬剤の組織移行性と持続性に因るものと思われる。

*H. influenzae*呼吸器感染モデルにおいて、AZMはCAMより良好な肺組織への移行性と優れた治療効果を示し

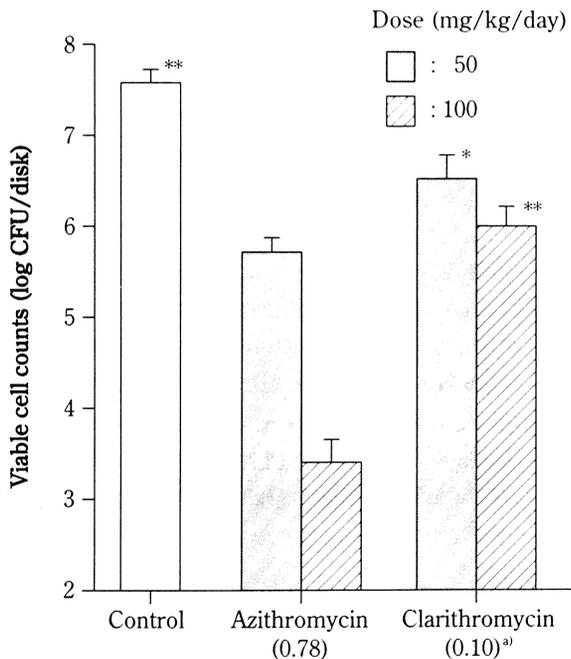


Fig. 2. Therapeutic activities of azithromycin and clarithromycin against a *Streptococcus pyogenes* PT-50 subcutaneous infection in mice.

Challenge: Paper disks containing *S. pyogenes* (2.4×10^6 CFU/disk) were implanted on the mid back of anesthetized mice.

Treatment: Mice were given antibiotics orally twice a day, 1 and 2 days post-challenge.

Evaluation: Therapeutic effects were evaluated by removing the disks from mice 5 days post-challenge, and determining CFU/disk of the pathogen.

*: Significantly different from the value for azithromycin ($p < 0.05$, Dunnett's multiple comparison test).

** : Significantly different from the value for azithromycin ($p < 0.01$, Dunnett's multiple comparison test).

a): MICs ($\mu\text{g/ml}$) for the pathogen.

All values are means \pm standard errors.

た。Valleeら⁴⁾は、*H. influenzae*下気道感染モデルにおいて、AZMを含んだ好中球が気管支肺胞内へ浸潤することにより、感染部位で有効な薬剤濃度が維持されると報告している。また、AZMの食細胞内への移行性はEMより約10倍高く、かつ食細胞と菌の接触によって、細胞内のAZMは速やかに細胞外に放出されることが知られている¹⁾。本報でも、AZMの肺内濃度は非感染マウスより感染マウスのほうが有意に高く、前記のような機序

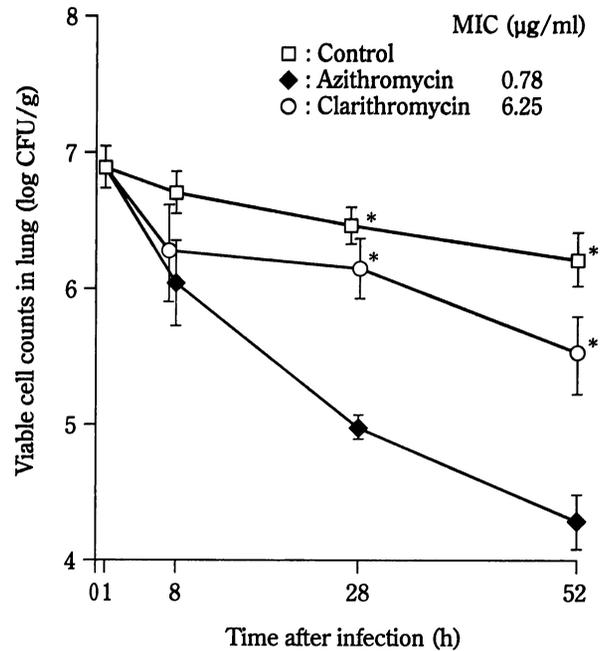


Fig. 3. Therapeutic activities of azithromycin and clarithromycin against a *Haemophilus influenzae* PT-739 lung infection in mice.

Challenge: Lung infection was produced by intratracheal inoculation with *H. influenzae* (2.3×10^6 CFU/mouse).

Treatment: Mice were given antibiotics (50 mg/kg) orally 4 h post-challenge.

Evaluation: Therapeutic effects were evaluated by removing the lungs 8, 28 and 52 h post-challenge, and determining CFU/lung of the pathogen.

*: Significantly different from the value for azithromycin ($p < 0.01$, Dunnett's multiple comparison test).

All values are means \pm standard errors.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of azithromycin in *Haemophilus influenzae* infected and non-infected mice after a single oral dose of 50 mg/kg

Mice		$T_{1/2}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ or g)	
			0~48 h	0~ ∞
Infected	lung	18.8	322	388
	serum	9.9	5.3	5.5
Non-infected	lung	12.6	252	272
	serum	9.8	3.2	3.4

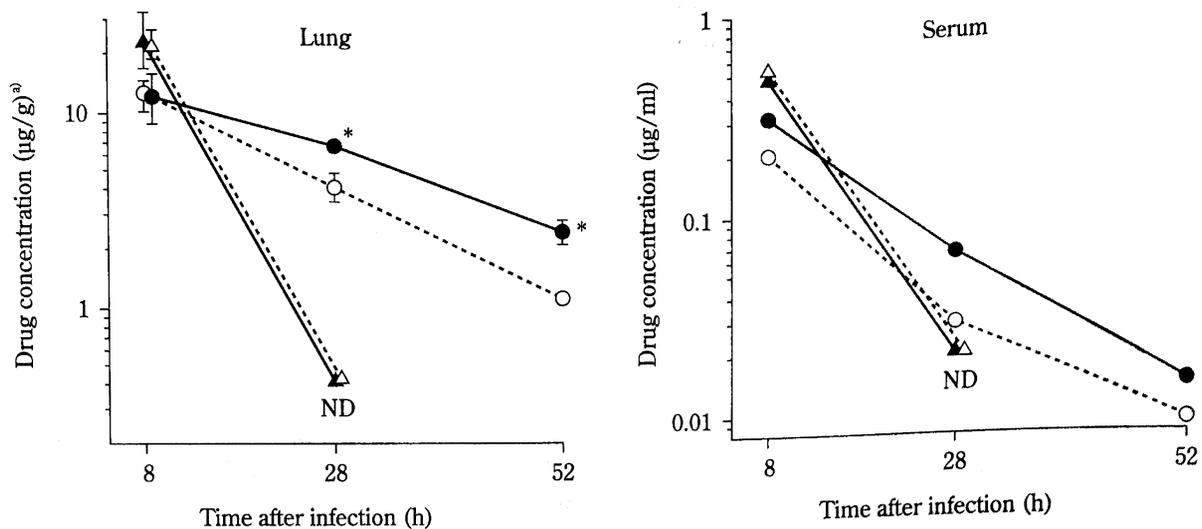


Fig. 4. Concentrations of azithromycin and clarithromycin in lung and serum samples from *Haemophilus influenzae* infected and non-infected mice.

Challenge : See footnote of Fig. 3.

Drug administration : See footnote of Fig. 3.

ND : Not detected, below the detection limits.

a) : Values are means \pm standard errors.

* : Significantly different from the value for non-infected mice ($p < 0.01$, Student's *t* test).

●, azithromycin in infected mice ; ○, azithromycin in non-infected mice ;

▲, clarithromycin in infected mice ; △, clarithromycin in non-infected mice.

によって薬剤が感染組織に集積するということから、AZMは薬剤本体にいわゆるTarget delivery機能が備わっているとも言えよう。

以上の成績から、感染局所への良好な移行性を特長とするAZMは、臨床においても、呼吸器感染ならびに皮膚軟部組織感染等の局所感染に対して少量、短期間の投与で優れた治療効果を示すものと思われる。

文 献

- 1) Retsema J, Girard A, Schelkly W, Manousos M, Anderson M, Bright G, Borovoy R, Brennan L, Mason R: Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62, 993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1939~1947, 1987
- 2) Fiese E F, Steffen S H: Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A. *J Antimicrob Chemother* 25 (Suppl. A) : 39 ~ 47, 1990
- 3) Foulds G, Shepard R M, Johnson R B: The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother* 25 (Suppl. A) : 73~82, 1990
- 4) Vallée E, Azoulay-Dupuis E, Pocardalo J J, Bergogne-Bérèzin E: Activity and local delivery of azithromycin in a mouse model of *Haemophilus influenzae* lung infection. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1412~1417, 1992
- 5) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 6) 日本化学療法学会：微量液体希釈法によるMIC測定法。 *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 7) 日本化学療法学会：微量液体希釈法によるMIC測定法の一部修正。 *Chemotherapy* 41: 183~189, 1993
- 8) Selye H: Use of granuloma pouch technic in the study of antiphroglitic corticoid. *Proc Soc Exp Biol & Med* 82: 328~333, 1953
- 9) 沢田安房, 武藤秀弥, 榎垣一憲, 下岡新雄: Azithromycinの体液内濃度測定法に関する研究。 *日本化学療法学会雑誌* 43 (S-6): 100~109, 1995
- 10) Cash H A, Woods D E, McCullough B, Johanson W G, Bass J A: A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis* 119: 453~459, 1979

- 11) Gladue R P, Bright G M, Isaacson R E, Newborg M F: *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62, 993) by phagocytic cells: Possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 277~282, 1989

Therapeutic activity and local delivery of azithromycin in animal models of local infection

Toshiyuki Matsunaga, Hiroshi Shimohira, Masatoshi Ogawa, Yasufusa Sawada, Hideya Muto, Kazunori Enogaki and Kino Shimooka

New Product Development Center, Pfizer Pharmaceuticals Inc.

5-gochi, Taketoyo-cho, Chitagun, Aichi 470-23, Japan

We compared the therapeutic efficacy of azithromycin (AZM), in several localized infection models, with those of clarithromycin (CAM), tosufloxacin (TFLX) and cefaclor (CCL). Local delivery of AZM and CAM to infection sites was also studied.

In a rat pouch infection with *Staphylococcus aureus*, 30 mg/kg doses of AZM at 0, 6 and 24 h post-challenge reduced the CFU by approximately 99% from the initial inoculum. Although the MIC of AZM was 4 and 16 fold higher than that of CAM and TFLX, respectively, AZM demonstrated greater therapeutic efficacy than CAM and TFLX.

In a murine model of subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes*, 25 mg/kg (twice a day) doses of AZM at 1 and 2 days post-challenge produced a 99% reduction of CFU as compared to an untreated control. These effects of AZM were much greater than those of CAM, even though CAM exhibited greater *in vitro* potency.

In a murine respiratory infection model with *Haemophilus influenzae*, a single dose of AZM (50 mg/kg) at 4 h post-challenge significantly ($p < 0.01$) reduced the CFU as compared with CAM and the untreated control. AZM produced more than 40 times higher concentrations in lungs than in serum, and the lung concentrations exceeded the MIC for the pathogen until at least 48 h post-dosing. Lung concentrations of AZM in infected mice were significantly ($p < 0.01$) higher than in non-infected mice.

These results suggest that AZM may have good clinical efficacy in localized human infections because of its high, and prolonged, levels in tissues.