

## 肺炎球菌によるモルモット中耳炎モデルに対する 経口セフェム薬の治療効果

堀 りつ子・山本 誠士・北山理恵子・三善 隆広  
荒木 春美・南 新三郎・渡辺 泰雄・成田 弘和  
富山化学工業株式会社総合研究所\*

(平成8年4月10日受付・平成8年7月26日受理)

肺炎球菌を用いてモルモット急性中耳炎モデルを作製し、経口セフェム5薬剤の治療効果を比較検討した。ペニシリン感受性肺炎球菌(PSSP)による中耳炎モデルに対し、cefteram pivoxil (CFTM-PI) および cefpodoxime proxetil (CPDX-PR) は10 mg/kgの1日2回2日間投与で無治療群に比べ中耳骨包内生菌数を有意に減少させ( $p < 0.01$ )、cefdinir (CFDN), cefditoren pivoxil (CDTR-PI), cefaclor (CCL) より優れた効果を示した。この治療効果は各薬剤の *in vitro* 抗菌力および体内動態を反映したものと考えられた。ペニシリン低感受性肺炎球菌(PISP)による中耳炎モデルに対し、CFTM-PI は10 mg/kgの1日2回2日間投与で治療効果を示さなかったが、50 mg/kgに増量すると中耳骨包内生菌数を検出限界以下まで減少させた( $p < 0.01$ )。その効果はCPDX-PRと同等で、他剤より優れていた( $p < 0.01$ )。またCFTM-PIの20 mg/kg 1日2回5日間治療でも50 mg/kg 1日2回2日間治療と同等の治療効果が得られた。以上、PSSP および PISP によるモルモット中耳炎モデルに対しCFTM-PI および CPDX-PR はCFDN, CDTR-PI, CCL より優れた治療効果を示した。またPISPによる中耳炎に対してはPSSPの場合より投与量の増加や投与期間の延長が必要であった。

**Key words:** 経口セフェム, 肺炎球菌, モルモット, 中耳炎

急性化膿性中耳炎の主要な起炎菌は肺炎球菌とインフルエンザ菌であり、経口セフェム薬はこれらの菌種に有効性が高いことから治療に多く用いられている<sup>1,2)</sup>。しかし肺炎球菌では近年 penicillin G (PCG) のMICが0.1~1 µg/mlのペニシリン低感受性株 (penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*: PISP) および 1 µg/ml以上の高度耐性株 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*: PRSP) が出現し、その分離頻度は肺炎球菌全体の25~60%に達すると報告されている<sup>3-6)</sup>。PISP および PRSP は経口セフェム薬に対しても低感受性化しており、さらに7位側鎖にオキシイミノ基または2-カルボキシエチリデン基を持つセフェム薬に特異的な低感受性菌の存在も報告されている<sup>7)</sup>。

PISPによる中耳炎は1~4才の低年齢者に多く、ペニシリンの常用量投与で耳漏は停止するが、PISPが完全に除菌されないため投与を中止すると短時間で再発し、早急に治療薬剤とその投与方法を明確にすることが必要であると指摘されている<sup>4,6,8,9)</sup>。そこで、今回我々はPSSPおよびPISPによるモルモット中耳炎モデルを作製し、経口セフェム5薬剤の治療効果を検討したので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用菌株

当研究所保存の臨床分離 *Streptococcus pneumoniae* D-1481 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*: PSSP)

および *S. pneumoniae* D-1408 (PISP) を使用した。

#### 2. 使用薬剤

Cefteram pivoxil (CFTM-PI) は当社合成品, cefpodoxime proxetil (CPDX-PR; 三共), cefditoren pivoxil (CDTR-PI; 明治製薬), cefaclor (CCL; SIGMA), penicillin G (PCG; 萬有製薬) は市販品, cefdinir (CFDN; 藤沢薬品) は市販品から当社で抽出したものを使用した。また活性本体の cefteram (CFTM), cefpodoxime (CPDX), cefditoren (CDTR) は当社合成品を使用した。プロドラッグは活性本体に換算して投与した。

#### 3. 使用動物

Hartley系, 雄性, 体重250~300gのモルモットを使用した。

#### 4. 薬剤感受性の測定

日本化学療法学会標準法<sup>10)</sup>に準じ、寒天平板希釈法でMICを測定した。Brain heart infusion broth (BHIB; 栄研) で37℃, 6時間培養した菌液(約10<sup>6</sup>CFU/ml)をマイクロプランターを用いて、薬剤を含む5%脱繊維綿羊血加 heart infusion agar (HIA; 栄研)に接種した。MICの判定は37℃, 18時間培養後に行った。

#### 5. モルモット中耳炎モデルに対する治療効果

エーテル麻酔下、先端を丸めた 1/5 皮下針をつけた注射筒を用いて、モルモット (1 群 3~7 匹, 6~14 耳) の中耳骨包内に BHIB で 6 時間培養した菌液 ( $10^7 \sim 10^8$  CFU/ml) 50  $\mu$ l を経鼓膜的に接種し感染させた。感染翌日から 0.5 % メチルセルロース (MC; 信越化学) に懸濁した薬剤を *S. pneumoniae* D-1481 では 10 mg/kg (CCL: 20 mg/kg) 1 日 2 回 2 日間, *S. pneumoniae* D-1408 では 10~50 mg/kg (CCL: 100 mg/kg) 1 日 2 回 2 日間または 5 日間経口投与した。モルモットを薬剤最終投与 24 時間後にエーテル麻酔下、腹部大動脈切断により脱血死させた後、中耳骨包を取り出した。骨を割り肉眼で観察した後、10 ml の生理食塩液を加えてよく攪拌し、平板塗抹法により中耳骨包内生菌数を測定した。

#### 6. 病理組織学的検討

モルモット (1 群 2 匹) を薬剤最終投与 24 時間後に脱血死させ、断頭、頭部皮膚の剥離後、頭蓋骨ごと 10 % 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。固定完了後、Plank & Rychlo 液により脱灰し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin-Eosin 染色後鏡検した。

#### 7. 中耳粘膜移行性の検討

*S. pneumoniae* D-1481 を感染させたモルモット (1 群 3 匹) に、翌日 0.5 % MC 懸濁した薬剤 200 mg/kg を経口投与した。投与 0.5, 1, 2, 4 時間後に血清および中耳粘膜を採取した。血液はエーテル麻酔下に腹部大静脈より採取し、遠心により血清を分離した。中耳粘膜は秤量後 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 10 倍希釈してホモジナイズし、遠心上清をサンプルとした。薬剤濃度の測定は CFTM では *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, CFDN, CPDX, CDTR では

*Escherichia coli* NIHJ, CCL では *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする bioassay 法 (ペーパーディスク法) で行った。

#### 8. 統計学的解析

治療効果の統計学的解析は Tukey の多重比較により行った。

## II. 実験結果

### 1. 薬剤感受性

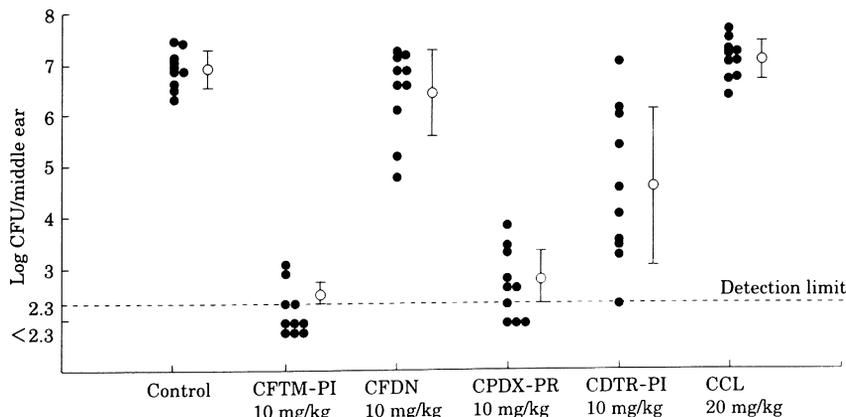
使用した菌株の薬剤感受性を Table 1 に示す。*S. pneumoniae* D-1481 に対する MIC は 0.0125~0.39  $\mu$ g/ml であり, CFTM および CDTR がもっとも低く, 次いで CPDX, CFDN, CCL の順であった。*S. pneumoniae* D-1408 に対する各薬剤の MIC は 0.2~12.5  $\mu$ g/ml であり, *S. pneumoniae* D-1481 に比べ感受性が 1/4~1/32 に低下していた。

### 2. モルモット中耳炎モデルに対する治療効果

PSSP である *S. pneumoniae* D-1481 による中耳炎モデルにおける経口セフェム 10 mg/kg (CCL: 20 mg/kg) 1 日 2 回 2 日間治療後の中耳骨包内生菌数を Fig. 1 に示す。中耳骨包内生菌数は無治療群では平均

Table 1. Antibacterial activity of oral cephem antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* D-1481 (PSSP) and D-1408 (PISP)

| Strain                             | MIC ( $\mu$ g/ml) |      |      |        |      |        |
|------------------------------------|-------------------|------|------|--------|------|--------|
|                                    | CFTM              | CFDN | CPDX | CDTR   | CCL  | PCG    |
| <i>S. pneumoniae</i> D-1481 (PSSP) | 0.0125            | 0.1  | 0.05 | 0.0125 | 0.39 | 0.0125 |
| <i>S. pneumoniae</i> D-1408 (PISP) | 0.2               | 0.39 | 0.39 | 0.2    | 12.5 | 0.2    |



CFTM-PI: cefteram pivoxil, CFDN: cefdinir, CPDX-PR: cefpodoxime proxetil,  
 CDTR-PI: cefditoren pivoxil, CCL: cefaclor  
 Challenge dose:  $9.3 \times 10^6$  cells/middle ear  
 Therapy: P. O. administration twice daily for 2 days  
 Observation: at 24 hours after final administration of drug  
 Guinea pigs: Hartley male guinea pigs (250–300 g), n = 5 (10 ears)  
 —○—: Mean  $\pm$  SD

Fig. 1. Therapeutic effects of oral cephem antibiotics on experimental otitis media in guinea pigs caused by *Streptococcus pneumoniae* D-1481 (PSSP).





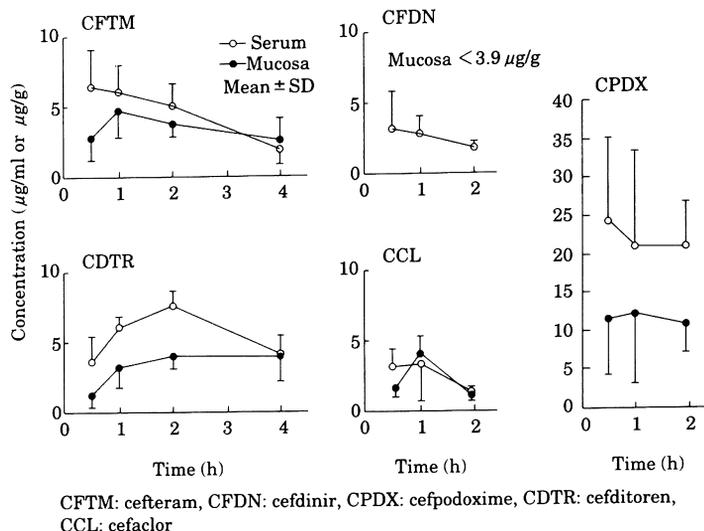


Fig. 6. Serum and middle ear mucosa levels of oral cephem antibiotics after oral administration of 200 mg/kg in guinea pigs with the otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* D-1481.

0.96, CCL で 0.48~1.17 であった。

### III. 考 察

急性化膿性中耳炎の主要な起炎菌の一つである肺炎球菌では、ペニシリンのみならず、セフェム、マクロライド、テトラサイクリンなどに耐性の多剤耐性菌や、オキシミノ基を有するセフェム薬に特異的な低感受性菌の出現が報告されている<sup>4-7,11,12)</sup>。ペニシリン低感受性の肺炎球菌 (PISP) による中耳炎では薬剤投与による完全な除菌が得られないため再燃することが多いとされ、臨床上問題となっている<sup>8,9)</sup>。そこで、今回 PSSP および PISP による中耳炎モデルを作製し、経口セフェム薬の治療効果を検討した。

実験的中耳炎モデルについてはモルモット、チンチラ、アレチネズミなどを用いて検討が行われている<sup>13-16)</sup>。今回このうち取扱いが容易であり、自然感染中耳炎の頻度が低いことからモルモットを選び<sup>13)</sup>、経鼓膜的に肺炎球菌を接種する簡便な方法で中耳炎を惹起させた。この中耳炎モデルにおいては一部外耳道の contamination と考えられる *S. pneumoniae* 以外の菌が認められたが、血液平板上で *S. pneumoniae* とは明らかに区別されたところから、感染させた *S. pneumoniae* の生菌数を測定することができた。その結果、感染翌日の *S. pneumoniae* D-1481 では  $10^6 \sim 10^7$  cells/middle ear, *S. pneumoniae* D-1408 では  $10^5 \sim 10^6$  cells/middle ear の生菌数が感染 6 日後までほぼ維持され、中耳への菌の良好な定着が認められた。また肉眼観察では *S. pneumoniae* D-1481 および D-1408 感染のいずれにおいても中耳骨包内に貯留液が認められ、*S. pneumoniae* D-1481 感染時の病理組織学的検討では中耳腔、鼓膜、外耳道で高度の炎症像が観察された。これに対しセフェム薬投与により生菌数が減少した例ではいずれも肉

眼観察において貯留液の明らかな減少が認められ、病理組織学的検討においても中耳腔、鼓膜、外耳道とも炎症は軽度であり、生菌数と相関するものと考えられた。

まず PSSP である *S. pneumoniae* D-1481 による中耳炎モデルにおいて経口セフェム 5 薬剤の治療効果を比較したところ、CFTM-PI および CPDX-PR は 10 mg/kg の 1 日 2 回 2 日間投与で検出限界付近まで中耳骨包内生菌数を減少させ、優れた治療効果を示した。*In vitro* の活性で劣る CPDX-PR が CFTM-PI と同等の効果を示し、CFTM-PI と同等の *in vitro* 活性を示す CDTR-PI の治療効果が劣っていたことから、中耳粘膜中薬剤濃度の測定を行った。投与量は濃度測定感度の問題から 200 mg/kg とした。その結果、CPDX の中耳粘膜中濃度は CFTM の約 3 倍であり、このため CFTM-PI と同等の治療効果を示したものと考えられた。CDTR は CFTM とほぼ同等の中耳粘膜中濃度および中耳への移行性を示したが、モルモットでの血清蛋白結合率 (遠心限外濾過法) は 97% であり、CFTM の 87% に比べ高かった (未発表データ)。したがって中耳粘膜において活性を示すフリー体が CFTM より少ないことが CDTR-PI の治療効果が CFTM-PI より劣った一因であると推察された。なお、ヒトにおける血清蛋白結合率は CFTM が 74.6%, CDTR が 91.5% であると報告されている<sup>17,18)</sup>。また CFDN および臨床使用量を考慮して 2 倍量投与した CCL では、中耳粘膜中濃度が MIC に達せず治療効果がみられなかったものと思われ、実験的中耳炎に対する経口セフェム薬の治療効果はおおむね *in vitro* 抗菌力および体内動態 (中耳粘膜中濃度、血清蛋白結合率) を反映したものと考えられた。

次に PISP である *S. pneumoniae* D-1408 による中耳炎モデルにおいても治療効果を検討した。この株は *S. pneumoniae* D-1481 に比べ試験したいずれの薬剤に対する感受性も低下していることから、*S. pneumoniae* D-1481 と同じ投与量では治療効果が得られないことが考えられ、まず *S. pneumoniae* D-1481 による中耳炎でもっとも治療効果の優れていた CFTM-PI で投与量の検討を行った。その結果、10 mg/kg の 1 日 2 回 2 日間投与では治療効果は認められなかったが、20、50 mg/kg 投与では投与量に応じて中耳骨包内生菌数が減少した。

投与量を CFTM-PI で十分な治療効果が認められた 50 mg/kg として 5 薬剤の治療効果を比較したところ、*S. pneumoniae* D-1408 においても CFTM-PI および CPDX-PR は他剤より優れ、その治療効果は *S. pneumoniae* D-1481 による中耳炎における 10 mg/kg 治療とほぼ同等であった。また CFTM-PI 20 mg/kg の 1 日 2 回 2 日間投与では治療効果が不十分であったことから治療期間を延長した場合についても検討した。その結果、CFTM-PI の 20 mg/kg 5 日間治療では 2 日間治療より優れた治療効果が認められ、50 mg/kg 2 日間治療と同程度の除菌効果が得られた。中耳骨包内生菌数、貯留液の性状および量から *S. pneumoniae* D-1481 と D-1408 による中耳炎で感染状態に若干の差異があると考えられるものの、これらの結果から PISP による中耳炎は投与量の増加や投与期間の延長によって治療可能であることが示唆された。

以上、PSSP および PISP によるモルモット中耳炎モデルに対し CFTM-PI および CPDX-PR は CFDN、CDTR-PI、CCL より優れた治療効果を示した。また CFTM-PI での検討から、PISP による急性中耳炎に対しては PSSP の場合より投与量の増加や治療期間の延長が必要であった。

#### 文 献

- 1) 杉田麟也: 耳鼻咽喉科領域の主要な原因菌の変遷。化学療法の領域 11: 26~33, 1995
- 2) 新川 敦: 耳鼻咽喉科一般感染症の全身的化学療法。化学療法の領域 11: 57~61, 1995
- 3) 渡辺貴和雄, 力富直人, 松本慶蔵: 肺炎球菌の薬剤感受性の推移。— $\beta$ -ラクタム剤を中心に—。化学療法の領域 10: 615~622, 1994
- 4) ペニシリン耐性肺炎球菌研究会: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症学雑誌 68: 1338~1351, 1994
- 5) 小栗豊子, 三澤成毅, 猪狩 淳: 臨床材料から分離した肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対する経口  $\beta$ -ラクタム系薬の抗菌力について。日本化学療法学会雑誌 43: 531~538, 1995
- 6) Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, Konno M, and the working group for penicillin-resistant *S. pneumoniae*: Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993~1995. J. Infect. Chemotherapy 1: 177~184, 1996
- 7) 北山理恵子, 南新三郎, 堀井妙子, 前花淳子, 保田隆, 渡辺泰雄, 成田弘和, 出口浩一: 臨床検査材料から分離された肺炎球菌の経口抗菌薬に対する感受性。Chemotherapy 42: 592~598, 1994
- 8) 杉田麟也, 他: 小児化膿性中耳炎に対する sultamicillin 細粒の臨床効果と細菌学的検討。Chemotherapy 41: 1018~1025, 1993
- 9) 杉田麟也: 耳鼻咽喉科感染症におけるペニシリン低感受性肺炎球菌の問題点。臨床と微生物 22: 193~202, 1995
- 10) 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
- 11) Yoshida R, et al.: Trends in antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1196~1198, 1995
- 12) Linda K M, Rasheed J K, Biddle J W, Tenover F C: Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2282~2288, 1995
- 13) 藤巻 豊, 河村正三, 市川銀一郎, 杉田麟也, 堀川治久, 出口浩一: モルモットによる実験的急性化膿性中耳炎の病理学的所見。日耳鼻感染症学会誌 1: 53~56, 1983
- 14) 山本佑二郎, 入江久子: CMX 耳用液のモルモット急性中耳炎に対する効果。薬理と治療 14: 245~251, 1986
- 15) Fulghum R S, Brinn J E, Smith A M, Danile III H J, Loesche P J: Experimental otitis media in gerbilis and chinchillas with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and other aerobic and anaerobic bacteria. Infect. Immun. 36: 802~810, 1982
- 16) 奥野 哲, 佐久間由光, 岩崎 仁, 山口東太郎: 実験的化膿性中耳炎モルモットにおける aspoxicillin の薬効評価。Chemotherapy 37: 909~914, 1989
- 17) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 高橋礼子, 貞木 浩: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 34: 112~133, 1986
- 18) 松本 隆, 岡本淳一, 齊藤光一, 相沢一雅, 小宮泉: 新経口セフェム剤, ME 1207 の実験動物における体内動態。Chemotherapy 40: 120~130, 1992

Therapeutic effects of oral cephem antibiotics on experimental otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* in guinea pigs

Ritsuko Hori, Seiji Yamamoto, Rieko Kitayama, Takahiro Sanzen, Harumi Araki, Shinzaburo Minami, Yasuo Watanabe and Hirokazu Narita

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1, Shimookui,  
Toyama city, Toyama 930, Japan

The therapeutic effects of oral cephem antibiotics on experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* were evaluated in guinea pigs. In the otitis media caused by penicillin susceptible *S. pneumoniae* (PSSP), cefteram pivoxil (CFTM-PI) and cefpodoxime proxetil (CPDX-PR) significantly reduced viable cell counts in the middle ear at a dose of 10 mg/kg twice daily for 2 days ( $p < 0.01$  compared with control). The therapeutic effects of CFTM-PI and CPDX-PR were superior to those of cefdinir (CFDN), cefditoren pivoxil (CDTR-PI) and cefaclor (CCL). These therapeutic effects were reflected in both in vitro activities and pharmacokinetic properties of the drugs. In the otitis media caused by penicillin intermediate *S. pneumoniae* (PISP), CFTM-PI showed no effect on viable cell counts in the middle ear at a dose of 10 mg/kg twice daily for 2 days, but the higher dose (50 mg/kg) did produce a therapeutic effect ( $p < 0.01$ ). The therapeutic effects of CFTM-PI and CPDX-PR at a dose of 50 mg/kg twice daily for 2 days were superior to those of other drugs ( $p < 0.01$ ). CFTM-PI was also effective at a dose of 20 mg/kg twice daily for 5 days ( $p < 0.01$ ). In conclusion, the therapeutic effects of CFTM-PI and CPDX-PR on otitis media caused by PSSP or PISP in guinea pigs were superior to those of CFDN, CDTR-PR and CCL, and an increased dose and prolonged treatment period were required to cure the otitis media caused by PISP.