

【原著・基礎】

Haemophilus influenzae に対する cefcapene の抗菌作用について

西村 欣也・吉田 勇

塩野義製薬株式会社創薬第二研究所*

(平成9年11月7日受付・平成10年3月30日受理)

経口セフェム薬 cefcapene (CFPN) の *Haemophilus influenzae* に対する抗菌力と薬剤濃度をヒト血中濃度にシミュレートした場合の殺菌作用における接種菌量の影響について検討し以下の成績を得た。

1) CFPN の *H. influenzae* に対する抗菌力を同じ経口セフェム薬の cefpodoxime, ceftiam (CFTM), cefaclor, cefotiam を対照薬に選び MIC 測定を行ったところ 10⁶CFU/ml 接種で CFPN は CFTM に次いで優れた抗菌力を示した。しかし、10⁶CFU/ml 接種した場合は経口セフェム薬のすべてが薬剤高濃度まで菌苔が観察され判定困難であった。そこで、レプリカ法を用いた判定を行ったところ CFPN は 10⁶CFU/ml 接種時の MIC と近似した結果を示した。

2) CFPN MIC 測定における 10⁶CFU/ml 接種直後の平板上の生菌数に比べ、平板培養後の菌苔の生菌数は MIC (10⁶CFU/ml 接種) 濃度以上の平板では明らかに少なく、増殖を抑制していることが認められた。

3) CFPN 100 mg を 1 日 3 回投与時のヒト血中濃度動態にシミュレートして *H. influenzae* (β -ラクタマーゼ産生株を含む 4 株) 10⁶CFU/ml および 10⁷CFU/ml に作用させた際の殺菌効果を検討した。CFPN は優れた殺菌作用を示し、10⁶CFU/ml では約 10 時間までに、10⁷CFU/ml では約 18 時間までに菌は消失し、有用性が示唆された。

Key words: cefcapene, *Haemophilus influenzae*, replica-plating method, *in vitro* auto-simulation system, antibacterial activity

Cefcapene (CFPN) は塩野義製薬株式会社研究所で合成された新しいエステル型経口セフェム系抗生物質で吸収時に腸管壁のエステラーゼにより速やかに加水分解され抗菌活性を発揮し、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対してバランスのとれた広範囲の抗菌スペクトルと強い抗菌力を有する抗生物質である¹⁻⁶⁾。なかでも呼吸器感染症の起炎菌として臨床もっとも重要な菌種の 1 つである *Haemophilus influenzae* に対して優れた抗菌力を示す⁷⁾。一方、*H. influenzae* に関しては臨床の場では抗菌薬の良好な MIC 評価が必ずしもそのまま反映されない場合もあり、除菌効果が低いなどの治療上の問題も指摘されている⁸⁾。その原因の 1 つに *H. influenzae* に対する一部のセフェム系薬の MIC 評価において、接種菌量による大きな変動があげられている。今回、CFPN の *H. influenzae* に対する殺菌作用を検討するにあたって、接種菌量が CFPN の抗菌力におよぼす影響と CFPN 常用投与後のヒト血中濃度動態にシミュレートして作用させた時の殺菌効果について調べたので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Cefaclor (CCL, 塩野義製薬), ceftiam (CFTM, 富山化学), cefpodoxime (CPDX, 三共), cefotiam

(CTM, 武田薬品), cefcapene (CFPN, 塩野義製薬) の力価の明らかな抗菌薬を用いた。

2. 使用菌株

1994 年臨床分離 *H. influenzae* を使用した。

3. 薬剤感受性試験

1) MIC の測定は、日本化学療法学会標準法 (寒天平板希釈法)⁹⁾ に準じて行った。増殖用培地は 5% Bact fildes enrichment (FE, Difco) 添加 Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) を用い、37 °C, 18 時間培養後の培養液 (約 10⁶CFU/ml) とその 100 倍希釈菌液 (10⁶CFU/ml) に調整後、マイクロプランター (佐久間製作所) で感受性測定用平板に接種した。感受性測定用培地は 5% FE 添加 Mueller-Hinton medium (MHM, Difco) を用いた。MIC の判定は 37 °C, 18~20 時間培養後行った。*H. influenzae* 接種菌液 10⁶CFU/ml の場合の β -ラクタム系薬に対する感受性測定は、ほとんどの菌株が薬剤高濃度平板でも菌苔が消失せずに残るため目視判定で end point を求めることが困難であった。菌苔の盛り上がり程度が大きく変化した時点を判定することも試みたが不確かであった。そこで、接種菌液 10⁶CFU/ml の場合の感受性測定に限り、

判定後の平板から 5% FE 添加 Brain Heart Infusion agar (BHIA, Difco) の平板に滅菌したビロード布を使用しレプリカ法による転写をした後、この平板をさらに 37℃, 18~20 時間培養後、出現した colony 数を測定した。測定した colony 数が ≤ 19 個を (-), それ以上を (+) と判定基準にし、そのときのレプリカ平板に相当する元の感受性平板の薬剤濃度をもって MIC と判定した。この際のレプリカ平板の判定基準は元の感受性平板の菌苔の盛り上がり程度が大きく変化し、無理に読んだ MIC 値に適合させるとともに出現した colony を容易に数えることができる数字とした。

2) *H. influenzae* 接種菌液 10^6 CFU/ml の場合の感受性測定用平板は MIC 判定時に薬剤高濃度の平板でも菌苔が形成され目視判定が不可能であったが、この菌苔が単なる痕跡であるのか生菌であるのか見分けができないのでマイクロプランターで接種後に綿棒で掻き取り生菌数測定した。*H. influenzae* 5 株を用い、CFPN 0, 0.006~100 μ g/ml の感受性測定用平板に接種し、37℃, 18~20 時間培養後綿棒で掻き取り 5% FE 添加 MHB 2 ml に懸濁後 1 spot 当たりの生菌数測定を行い、無薬剤平板に接種直後の結果と比較検討した。生菌数測定用培地は 5% FE 添加 BHIA を用いた。

4. CFPN のヒト血中濃度動態下における殺菌作用

マイクロコンピューター制御により自動的に血中濃度推移を培養液中で再現できる装置 “Auto-simulator Shionogi (dilution type)” (AS 装置)¹⁰⁾ を用いて、CFPN の *in vitro* 殺菌作用を検討した。CFPN の投与方法および投与量は実際の投与を想定し、100 mg カプセルを 6 時間毎 1 日 3 回とした。CFPN の血中濃度は中島ら¹¹⁾ の成績を用いた。 β -ラクタマーゼ産生株を含む *H. influenzae* 4 株に、菌濃度としては対数増殖期の生菌数が薬剤作用時に 10^5 CFU/ml と 10^7 CFU/ml に達するよう調整し検討した。培地は Haemophilus testing medium (15 μ g/ml hematin, 15 μ g/ml β -NAD, 5 mg/ml Yeast extract の割合で MHB に添加) (HTM) を用い、生菌数測定用には 5% FE 添加 BHIA を用いた。

II. 結 果

1. *H. influenzae* に対する感受性測定

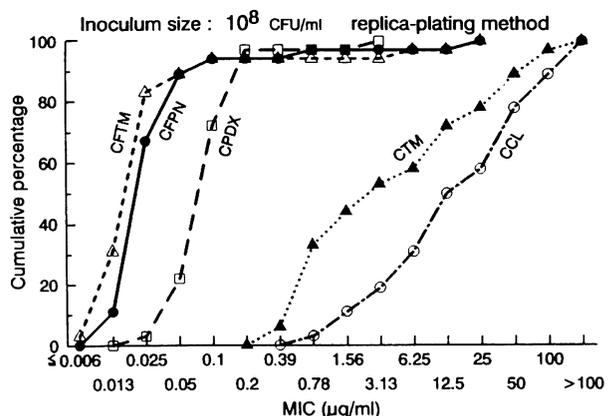
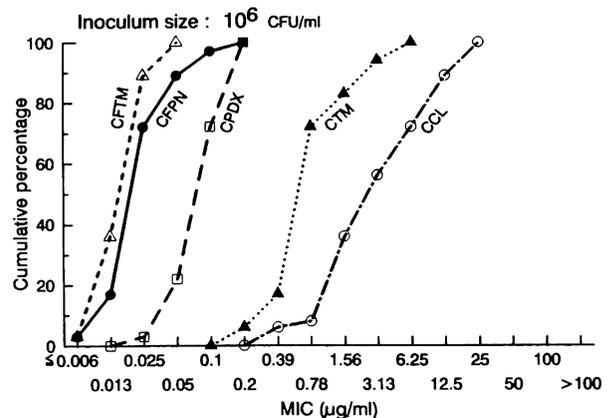
1) CFPN と対照薬として経口用セフェム薬の CPDX, CFTM, CCL, CTM を用い、1994 年臨床分離 *H. influenzae* 36 株を用いて日本化学療法学会標準法(寒天平板希釈法)に準じて感受性測定を行った。

標準法の接種菌液 10^6 CFU/ml の場合と接種菌液 10^8 CFU/ml の場合について行い、接種菌量の影響について検討した。接種菌液 10^6 CFU/ml の場合では、CFTM > CFPN > CPDX > CTM > CCL の順に抗菌力が優れていた。

接種菌液 10^8 CFU/ml の場合では、薬剤高濃度平板で

も菌苔を形成する株がほとんどで目視判定では end point がきわめて判読し難いという現象が起こった。この問題に対処するため接種菌液 10^6 CFU/ml の場合の判定はすべてレプリカ法判定を採用した。接種菌液 10^6 CFU/ml の場合の成績を接種菌液 10^8 CFU/ml の場合の成績と比較すると CFPN, CPDX, CFTM は同じか 2 倍高い値であったが CCL, CTM は 8 倍あるいは 16 倍高い値を示した (Fig. 1)。

2) CFPN で、 10^6 CFU/ml 接種時に MIC 最頻値 (0.025 μ g/ml) を示す *H. influenzae* 5 株 (SR 13320, SR 13321, SR 13322, SR 13343, SR 13345) を用い、接種菌液 10^6 CFU/ml を無薬剤平板に接種直後に綿棒で掻き取った生菌数を control として、培養後の感受性測定用平板の 1 spot (約 5 μ l) 当たりの生菌数測定を行い比較検討した。Control の生菌数は $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/spot であった。培養後の薬剤含寒天平板の菌苔から掻き取った生菌数は、全株共 MIC 値 0.025 μ g/ml 以上の CFPN 濃度で control の生菌数よりも少ない 10^6 CFU/spot 以下を示し、菌の増殖を抑制していることが認められた。一部の濃度域で生菌数が逆転している株もみられたが control の生菌数以下の値であった



CFPN: cefcapene, CPDX: cefpodoxime, CFTM: ceftoram,

CCL: cefaclor, CTM: cefotiam

Fig. 1. Susceptibility distribution of clinical isolates *Haemophilus influenzae* (36 strains).

(Fig. 2)。

2. CFPN のヒト血中濃度動態下における殺菌作用

CFPN による MIC 最頻値 $0.025 \mu\text{g/ml}$ を示す *H. influenzae* SR 13320, SR 13321, ATCC 35891 および β -ラクタマーゼ産生株の SR 13336 の 4 株を用い、CFPN 100 mg, 6 時間毎 3 回/日投与時の血中濃度動態¹¹⁾ にシミュレートし作用させた時の殺菌作用を検討した。その際の CFPN の濃度推移を Fig. 3 に示した。CFPN 作用開始時の菌濃度が log phase の 10^6 CFU/ml

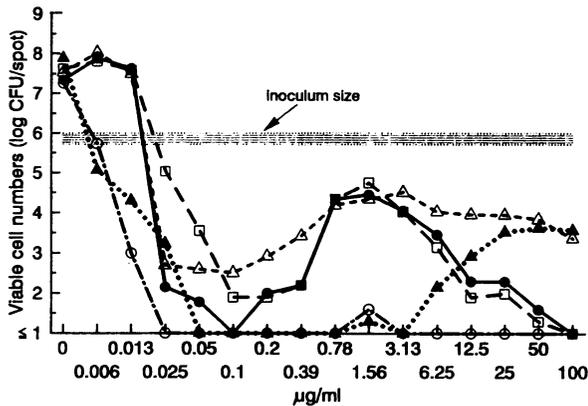


Fig. 2. Numbers of viable cell of *Haemophilus influenzae* versus the MIC of cefcapene. Symbols: ●, strain SR 13320; □, strain SR 13321; △, strain SR 13322; ○, strain SR 13343; ▲, strain SR 13345

および高濃度菌量の 10^6 CFU/ml になるよう調整し経時的に生菌数変化を調べた。CFPN は優れた殺菌作用を示し、 10^6 CFU/ml では 4 株とも生菌数は経時的に減少し、7.6~9.6 時間で菌は消失した。 10^7 CFU/ml においては 7.6 時間以後に殺菌力が少し鈍化する株もみられたが β -ラクタマーゼ産生株 (SR 13336) を含め 17.6 時間までに菌は消失した (Fig. 4)。

III. 考 察

CFPN の *H. influenzae* に対する抗菌力を接種菌量の影響について検討した。CFPN 他経口セフェム薬の CPDX, CFTM, CCL, CTM について感受性測定を行った。接種菌液 10^6 CFU/ml の場合には CFPN は CFTM に次いで優れた抗菌力を示した。接種菌液 10^6 CFU/ml の場合には、ほとんどの株で薬剤高濃度まで spot 接種

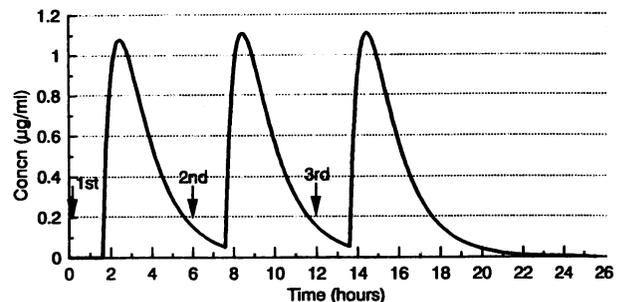


Fig. 3. Concentration time curve automatically simulated in serum of a human orally administered 100 mg of cefcapene 3 times/day.

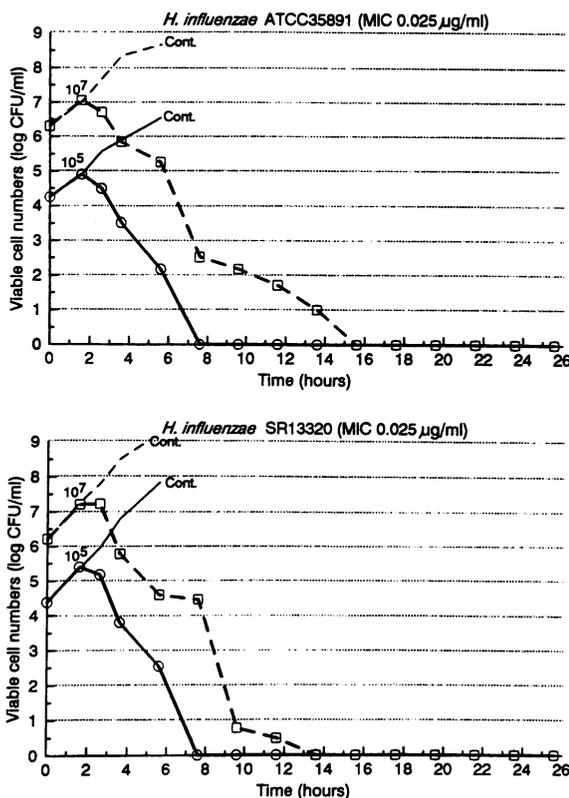


Fig. 4. Bactericidal activity of cefcapene against four *Haemophilus influenzae* strains in an *in vitro* model automatically simulated in human serum.

したリング状の菌苔の盛り上がりが観察された。盛り上がりの程度、たとえば (3+) から (2+) または (+) に変化した時点で判定することも考えられたが菌苔の形成は必ずしも薬剤の濃度順に薄くなるのではなく様々に変化するため目視による end point の判定は困難でその結果ほとんどの株は高度耐性を示すことになり、 10^6 CFU/ml 菌液接種とはきわめて大きな差が生じた。CFPN のみならず、このとき用いた他の経口セフェム 4 薬剤でも同様に観察された。*H. influenzae* 接種菌液 10^6 CFU/ml の場合と接種菌液 10^8 CFU/ml の場合との差についてはすでに生方ら^{12,15,16)}、斎藤ら¹³⁾、柳瀬ら¹⁴⁾、の詳細な報告があり、接種菌液 10^6 CFU/ml の場合ではペニシリン系薬剤やセファロスポリン系薬剤で判定困難であり、chloramphenicol (CP) やアミノグリコシド系薬ではその差はわずかであることを報告している。その原因として、ampicillin (ABPC) 作用 8 MIC で *H. influenzae* はスフェロプラスト化したのが 6 時間でも容易に溶菌に至らず、CP や kanamycin では 1 MIC 濃度で 2~3 時間で溶菌像がみられることを電子顕微鏡を用いた菌の形態変化を検討している。そして、これらの観察結果が寒天平板法による感受性測定の際に結びつき、接種菌量が多い場合の ABPC 含有培地上では単にフィラメント化やスフェロプラストを形成するだけで体積が増大し、それが肉眼で菌膜となって見いだされ、接種菌量が少なければ菌は同様に変化しても体積増大が肉眼で判定できず、その点を MIC と判定していると考えたと報告している。

我々の実験でも成績は示していないが接種菌液 10^6 CFU/ml の場合の MIC 判定が困難な現象は他の β -ラクタム系薬 (ABPC, cefpirome, latamoxef, imipenem, aztreonam) すべてと fosfomycin において確認され、lomefloxacin, tobramycin, minocycline, CP は目視判定が可能であり、同じ傾向を示した。我々は CFPN その他の抗菌力を検討するに際し、接種菌液 10^8 CFU/ml の場合の問題に対処するためレプリカ法を用い判定することを試みた。判定基準として spot 当たり colony を数えることができる数値として ≤ 19 colony/spot を (-) としたが、これが適当かどうか議論があると考えられる。しかし、その判定基準で判定した結果を接種菌液 10^6 CFU/ml の場合の MIC と比較すると CFPN, CFTM, CPDX は同じか 2 倍高い値を示し、CCL, CTM は 8 倍あるいは 16 倍高い値を示しており、これらの薬剤の殺菌効果について比較する必要があると考えられる。

MIC 判定の際、CFPN 平板上で菌苔を形成し目視判定困難であったがその菌苔の生菌数を無薬剤平板と比較し、平板上における増殖抑制程度を調べた。CFPN による MIC 最頻値 ($0.025 \mu\text{g/ml}$) を示す *H. influenzae* 5 株の接種菌液 10^8 CFU/ml をマイクロプランターで

接種直後の無薬剤平板の control から掻き取った生菌数は $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/spot であり、20 時間培養後で $1.8 \times 10^7 \sim 7.6 \times 10^7$ CFU/spot であった。MIC $0.025 \mu\text{g/ml}$ 平板からの菌苔は 5 株とも 1.1×10^5 CFU/spot 以下を示し、接種時の菌量と比較しても少ない値であった。一部の濃度域で逆転している株がみられたが 10^4 CFU/spot 以下であり、接種時菌量と比べて増殖を抑制していることが認められた。

以上のように暫定的に設けた判定基準によるレプリカ法の結果は、1 spot 当たりの生菌測定による増殖抑制効果とあわせ考えると接種菌液 10^8 CFU/ml の MIC に相当し、レプリカ法による判定が有用であると考えられる。

抗菌薬の *in vitro* における殺菌作用の評価は、通常薬剤の一定濃度を細菌に作用し続けた場合の抗菌力の強さを測定したものである。しかしヒトの体内において、抗菌薬は投与後吸収、代謝および排泄等によりその濃度は刻々変化し、同一濃度で維持されているわけではない。そこで我々は *in vitro* での殺菌作用を検討する際、抗菌薬のヒト血中での濃度推移を培地中でシミュレートする方法としてマイクロコンピューター制御により自動的に血中濃度推移を培養中で再現できる装置 "Auto-simulator Shionogi (dilution type)" (AS 装置) を用い報告^{17,18)}してきている。今回、CFPN 投与量は 100 mg カプセルを 6 時間毎、1 日 3 回投与時の血中濃度動態にシミュレートし、CFPN による MIC 最頻値 $0.025 \mu\text{g/ml}$ を示す *H. influenzae* SR 13320, SR 13321, ATCC 35891 および β -ラクタマーゼ産生株の SR 13336 の 4 株を用い作用させた。CFPN は投与後 1.6 時間で血中に移行し、濃度上昇をはじめ 51 分後に最高濃度 $1.08 \mu\text{g/ml}$ に到達し、以後徐々に下降するが 6 時間毎 3 回投与により増減を繰り返し、投与後 20.7 時間目まで MIC 濃度の $0.025 \mu\text{g/ml}$ 以上で菌に作用し続ける。その結果、CFPN は *H. influenzae* に殺菌的に作用し 10^6 CFU/ml では 4 株とも 7.6~9.6 時間で菌は消失した。高濃度菌量の 10^7 CFU/ml においては、7.6 時間以後に殺菌力が少し鈍化する株もみられたが β -ラクタマーゼ産生株 (SR 13336) を含み 17.6 時間までに生菌数は消失し、CFPN の *H. influenzae* に対する優れた殺菌効果が認められた。清水ら^{19,20)} は *H. influenzae* を用い、cefditoren (CDTR MIC $0.025 \mu\text{g/ml}$) をヒトに経口投与して得られた血中濃度にステップワイズでシミュレート²¹⁾した場合の殺菌作用、口蓋扁桃内濃度にシミュレートした場合の殺菌作用を 6 時間にわたって検討し、生菌数は各々菌接種時 (10^8 CFU/ml) から 3 log および 2 log 減少したことを報告している。今回我々が行った CFPN 血中濃度にシミュレートした場合の殺菌作用では、*H. influenzae* (10^8 CFU/ml) は 4 株中 3 株が CFPN 作用後 6 時間 (投与後 7.6 時間) で、

1 株は 8 時間 (投与後 9.6 時間) で菌は検出限界以下となり, CFPN は *H. influenzae* に対して短時間でも優れた殺菌力を有していると考えられた。高濃度菌量の 10^7 CFU/ml に作用させた場合でも CFPN は殺菌的に作用し, 菌量の影響は受けてもわずかであると考えられ, また β -lactamase 産生株においても同様の殺菌性を示すことより *H. influenzae* 感染症に対する臨床的有用性が示唆された。

文 献

- 1) 井上邦雄, 井上栄子, 浜名洋子, 他: 新しい経口セフェム剤 S-1108 の細菌学的検討。Chemotherapy 41 (S-1): 1~12, 1993
- 2) 辻 明良, 松田早人, 五島嵯智子: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 に関する細菌学的研究。Chemotherapy 41 (S-1): 13~29, 1993
- 3) 桑原 (新井) 京子, 横田 健: S-1108 の基礎的抗菌力の検討。Chemotherapy 41 (S-1): 30~39, 1993
- 4) 加藤直樹, 加藤はる, 田中保知, 他: 新エステル型経口セファロsporin系抗菌薬 S-1108 の活性体 S-1006 の嫌気性菌に対する抗菌力。Chemotherapy 41 (S-1): 40~49, 1993
- 5) 西野武志, 渡辺芳浩, 大槻雅子: 新規エステル型抗菌薬 S-1108 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 41 (S-1): 50~76, 1993
- 6) 小松良英, 永田 弘, 元川 清, 他: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 41 (S-1): 77~93, 1993
- 7) 長野 馨, 木村美司, 東山伊佐夫, 他: 種々の臨床分離株に対する感受性サーベイランス。Chemotherapy 44: 610~625, 1996
- 8) 紺野昌俊: 薬剤感受性の評価の仕方。第 44 回日本化学療法学会総会特別講演: 1996
- 9) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 10) 佐々木緊, 西村欣也, 吉田 勇, 他: ヒト血中濃度動態下における抗菌薬の殺菌作用評価のための auto-simulation 装置についての検討。Chemotherapy 41: 1056~1063, 1993
- 11) 中島光好, 上松俊彦, 尾熊隆喜, 他: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の第 I 相臨床試験。Chemotherapy 41: 109~125, 1993
- 12) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: 本邦で分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について。Chemotherapy 26: 491~498, 1978
- 13) 斎藤洪太, 柳瀬義男, 生方公子, 他: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第 1 編)。Chemotherapy 26: 499~507, 1978
- 14) 柳瀬義男, 高橋洋子, 生方公子, 他: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第 2 編)。Chemotherapy 26: 508~516, 1978
- 15) 生方公子, 沢井 稔, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第 3 編)。Chemotherapy 26: 656~665, 1978
- 16) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第 4 編)。Chemotherapy 26: 666~675, 1978
- 17) 園山高康, 西村欣也, 今村信彦, 他: *in vitro* における抗生物質の殺菌効果。基礎と臨床 18: 4405~4414, 1984
- 18) 坂本照男, 河合定雄, 土居義男, 他: Cefaclor 持続性製剤の設計。Jap. J. Antibiotics 38: 813~821, 1985
- 19) 清水正樹, 高田利彦, 益吉真次, 他: 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。Chemotherapy 43: 815~820, 1995
- 20) 清水正樹, 高田利彦, 益吉真次, 他: Cefditoren の口蓋扁桃内濃度シミュレートにおける臨床分離 *Haemophilus influenzae* に対する殺菌作用。Chemotherapy 44: 818~820, 1996
- 21) 村川武雄, 上村利明, 岡田直彦, 他: 生体内に simulate した *in vitro* model system における cephalosporin 類の殺菌作用。Chemotherapy 25: 585~590, 1977

Antibacterial activity of cefcapene against *Haemophilus influenzae*

Kinya Nishimura and Isamu Yoshida

Discovery Research Laboratories II, Shionogi Research Laboratories, Shionogi and Co., Ltd.,
3-1-1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561, Japan

We determined the effects of the inoculum size of cefcapene (CFPN), a new oral cephalosporin, on its antibacterial and bactericidal activities against *Haemophilus influenzae* by simulation of human serum concentrations. The results were as follows. First, we compared the antibacterial activity of CFPN against *H. influenzae* with those of cefpodoxime, ceftamandole (CFM), cefaclor and cefotiam. CFPN showed good activity, second to that of CFM, at an inoculum size of 10^6 CFU/ml. But for an inoculum of 10^8 CFU/ml, the end-points of bacterial activity on high-dose plates of all experimental oral cephalosporines were difficult to judge. In the replica-plating method, the antibacterial activity of CFPN was close to the MICs for an inoculum of 10^6 CFU/ml. We next counted the viable cells on plates containing CFPN with an inoculum of 10^6 CFU/ml. On plates of over MIC with an inoculum of 10^6 CFU/ml, there were clearly fewer colonies than just after inoculation. Thus, CFPN showed an antibacterial effect against *H. influenzae*. We finally determined the bactericidal activity of CFPN against inocula of 10^5 CFU/ml and 10^7 CFU/ml of 4 *H. influenzae* strains (including β -lactamase-producing strain) by simulation of human serum concentrations after oral administration of 100 mg of the drug 3 times/day. CFPN showed good bactericidal activity against *H. influenzae*. The viable cell number remained below detection levels for 10 hours after CFPN administration with 10^5 CFU/ml and 18 hours with 10^7 CFU/ml against all *H. influenzae* strains. We concluded that CFPN can be a highly useful antibiotic against *H. influenzae* infections.