

Haemophilus influenzae による気管支肺炎モデルにおける 経口抗菌薬の治療効果

宮崎 修一・藤川 利彦・山口 恵三

東邦大学医学部微生物学教室*

(平成 12 年 6 月 27 日受付・平成 12 年 7 月 26 日受理)

最近分離された *Haemophilus influenzae* に対する azithromycin の抗菌力 (MIC₉₀: 2 µg/mL) は clarithromycin, ampicillin より 4 倍以上強かったが, cefdinir, cefcapene の 1/2 であった。マウス気管支肺炎モデルにおいて, 1 日 2 回 3 日間 50 mg/kg を連続投与した場合, azithromycin と cefcapene pivoxil の治療効果は他の抗菌薬投与群に比べ有意差をもって優れていた。一方, 100 mg/kg を 1 回のみ投与した場合, 抗菌薬投与 24 時間後までは azithromycin と cefcapene pivoxil 投与群の治療効果は clarithromycin, ampicillin および cefdinir 投与群に比べ有意差をもって優れていた。48 時間後の場合, azithromycin 投与群の治療効果はその他の抗菌薬投与群に比べ, 有意差をもって優れていた。感染菌に対する cefcapene, cefdinir, ampicillin の抗菌力は azithromycin より 4 倍以上強かった。これら成績は, azithromycin の良好な組織移行性が治療効果に反映していることを示している。

Key words: *Haemophilus influenzae*, MIC, 感染モデル, 治療効果

Erythromycin は約 40 年間マクロライド系抗菌薬の代表として広く用いられてきた。この間, 種々新しい抗菌薬が開発されているが, その主な改良点は体内動態や副作用の減少である¹⁾。特に近年開発・市販された clarithromycin の半減期は 4.2 時間, azithromycin のそれは 53 時間と体内動態の面で著しい改良がみられている^{2,3)}。さらに, azithromycin は細胞内移行性が優れており (高い細胞内濃度), 食細胞内に取り込まれて感染症部位に到達するという経路もあるので, 炎症部位での濃度がより一層高い⁴⁾。

また, azithromycin は構造的な特長もあり, 従来の 14 員環や 16 員環と違い 15 員環という化学構造をもち, アザライド系抗菌薬と呼ばれている。この azithromycin は構造的な特長を反映して, グラム陽性球菌以外に *Haemophilus influenzae* などグラム陰性菌にも高い抗菌活性を示す特徴がある⁵⁻⁷⁾。そこで, 本論文では, azithromycin の *H. influenzae* に対する *in vitro*, *in vivo* 抗菌活性を clarithromycin, cefdinir, cefcapene pivoxil, および ampicillin と比較評価したので, その成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株: 東邦大学医学部付属大森病院で臨床材料から分離された *H. influenzae* 株は各種抗菌薬に対する感受性測定に, 小児肺炎患者より分離された *H. influenzae* TUM 8 はマウス気管支肺炎モデルに用いた。

2. MIC は化学療法学会標準法に準じた微量液体希釈法により測定した⁸⁾。

3. マウスは Slc/ICR (3.5 週齢, 雄) を 1 群 6 匹用いた。なお, 気道障害を惹起するため, 感染 3 日前に 1

%ホルマリンを 40 µL 経鼻滴下した。

4. 感染方法: すでに報告した方法にしたがい感染菌を作製し, その 50 µL を経鼻滴下した⁹⁾。感染菌の調製方法について簡単に記述する。あらかじめすでに報告したマウス胎児肺由来の MFL cell による単層培養細胞を作製する¹⁰⁾。X 因子, V 因子含有 Brain Heart Infusion (BHI) 培地に同じ培地で 1 夜培養した菌を 5% 接種, 35°C で 3 時間培養 (対数増殖期中期) 後, 集菌した。滅菌生理食塩液にて 3 回ゆるやかに菌洗浄後, 元の液量になるよう RPMI 1640 に懸濁した。この菌液を 3 回洗浄した単層培養細胞の入った容器に加え, 反転させながら付着・侵入実験を行う。1 時間後液を捨て, 付着・侵入していない菌を除くために 5 回滅菌生理食塩液にて激しく洗浄する。次に, スクレーパーにて菌の付着・侵入した細胞を剥ぎ取り 6 mL の RPMI 1640 に懸濁し, 接種菌液とした。この菌液を cell-bound organisms (CBO) と呼ぶ。この菌液 50 µL (4.2×10⁴cfu/animal) 経鼻滴下し, マウス気管支肺炎を惹起した。感染 2 日後より各抗菌薬 (50 mg/kg) を 1 日 2 回 3 日間連続投与した群と各抗菌薬 (100 mg/kg) を 1 回投与した群の 2 群について, 治療効果を気管支肺内残存生菌数で判定した。すなわち, 所定の時間にケタラール®(三共)・セラクター®(バイエル)(割合: 2: 1) 麻酔下で, 脱血後無菌的に下気道組織 (気管・肺) を摘出し, 滅菌生理食塩液 2 mL の入ったホモジナイザーにてホモジナイズ後, 滅菌生理食塩液で 10 倍階段希釈した。各希釈液 0.1 mL を IsoVitalax® (BBL, Cockeysville, MD, USA)

添加チョコレート寒天培地に塗布し、35℃で1日培養後生菌数を測定した。

5. 使用抗菌薬: Azithromycin (ファイザー製薬), cefcapene (cefcape pivoxil) (塩野義製薬), clarithromycin (大正製薬), cefdinir (藤沢薬品工業), および ampicillin (明治製薬) は力価の明らかなもの分与を受けた。

6. 有意差検定: 本実験での検出限界が200 CFU/lung であるので、菌が検出されなかった検体の菌数を190 CFU/lungとして検定した。検定はマン・ホイットニ法により検討した。

II. 結 果

1. Azithromycin および他の経口抗菌薬の *H. influenzae* に対する抗菌力

Azithromycin の MIC の分布域および MIC₉₀ はそれぞれ 0.5~2 μg/mL, 2 μg/mL であった (Table 1)。Azithromycin の抗菌力 (MIC₉₀) は clarithromycin の4倍, ampicillin の8倍であった。しかし、本剤の抗菌力は cefdinir の1/2, cefcapene の1/10以下であった。

2. *H. influenzae* による気管支肺炎モデルにおける治療効果

感染菌に対する治療実験に用いた抗菌薬の MIC (Table 2) を比較すると、azithromycin の抗菌力は clarithromycin の4倍であるが、他の使用抗菌薬の1/4以下であった。

1日2回3日間50 mg/kg を連続投与した場合、もっとも優れた治療効果を示した抗菌薬は azithromycin と cefcapene pivoxil で、平均残存生菌数はそれぞれ 2.50±0.55 log CFU と 2.41±0.33 log CFU で、clarithromycin, cefdinir, ampicillin 投与群およびコントロール群

に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少していた (Fig. 1)。なお、菌が検出されたのは2群とも1匹のみであり、それぞれ 3.62 CFU と 3.08 log CFU であった。次いで、ampicillin, cefdinir 投与群の平均残存生菌数は約 4 log CFU であり、clarithromycin 投与群およびコントロール群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少していた。

次に、azithromycin の体内動態の特長の1つは半減期が長いことである。この特長が治療効果に反映するかどうかを知るために、50 mg/kg と 100 mg/kg 投与で予備検討をした結果、50 mg/kg 投与群では著明な菌数減少が認められなかった。さらに、100 mg/kg 投与は1日投与量としては前実験と同じである。そこで、本実験ではこれら抗菌薬 100 mg/kg を1回投与で比較評価した。6時間後の肺内残存生菌数を Fig. 2 に示した。コントロール群の平均菌数は 6.19±0.71 log CFU (5.36~7.18 log CFU に分布) であり、clarithromycin 投与群の残存平均生菌数は 6.17±0.76 log CFU であった。もっとも菌数減少が著明であったのは azithromycin 投与群 (残存平均生菌数: 2.58±0.72 log CFU) であり、他の抗菌薬投与群およびコントロール群との間に有意差 ($p < 0.05$) を認め、4匹のマウスからは菌が検出されなかった。Cefdinir, cefcapene pivoxil, ampicillin 投与群の平均残存平均生菌数は 3.97~4.74 log CFU であり、clarithromycin 投与群およびコントロール群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少していた。

抗菌薬投与24時間後の治療効果を比較した場合も、もっとも優れた治療効果を示した抗菌薬は azithromycin 投与群であり、検討したすべてのマウスの感染組織内から菌は検出されなかった (Fig. 3)。次いで、cefcape pivoxil, ampicillin 投与群の平均残存生菌数はとも

Table 1. Antibacterial activities of azithromycin and other oral drugs against 48 clinical isolates of *Haemophilus influenzae*

Drug	MIC (μg/mL)		
	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Azithromycin	0.5 - 2	2	2
Clarithromycin	4 - 16	8	8
Cefcapene	0.008 - 2	0.063	0.125
Cefdinir	0.032 - 2	0.5	1
Ampicillin	0.12 - 128	1	16

Table 2. MICs of antimicrobial agents for *Haemophilus influenzae* TUM 8

Drugs	MIC (μg/mL)
Azithromycin	1
Clarithromycin	4
Cefdinir	0.25
Cefcapene	0.008
Ampicillin	0.25

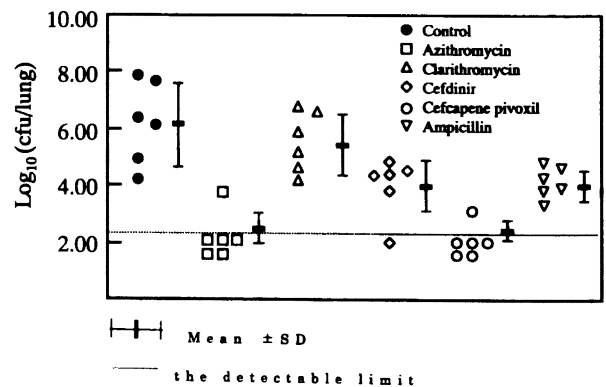


Fig. 1. Number of bacteria in lower respiratory organs of mice treated with antimicrobial agents in bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

に約 4.4 log CFU であり, clarithromycin, cefdinir 投与群およびコントロール群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少していた。

抗菌薬投与 48 時間後の各抗菌薬投与群における肺内残存生菌数を検討した結果を Fig. 4 に示している。各群における残存生菌数には個体差がやや認められ, azithromycin 投与群では $< 2.28 \log \text{CFU} \sim 5.49 \log \text{CFU}$, cefdinir 投与群では $4.15 \log \text{CFU} \sim 7.48 \log \text{CFU}$, cefcapen pivoxil 投与群では $3.08 \log \text{CFU} \sim 6.47 \log \text{CFU}$ の範囲に分布した。しかし, azithromycin 投与群の平均残存生菌数は $2.98 \pm 1.29 \log \text{CFU}$ であり, 他の抗菌薬投与群およびコントロール群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少し, 優れた治療効果を得た。また, この群では 6 匹中 4 匹のマウス肺から菌は検出されなかった。

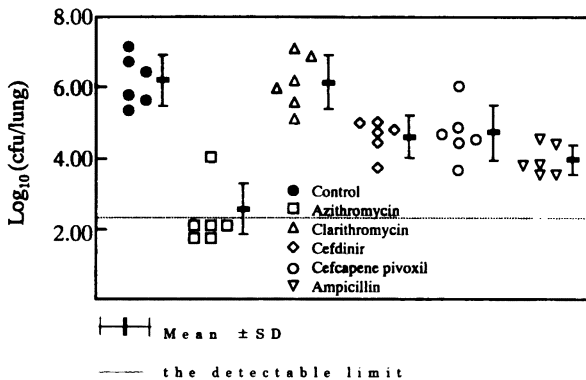


Fig. 2. Number of bacteria in lower respiratory organs of mice 6 h after administration of antimicrobial agents in bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

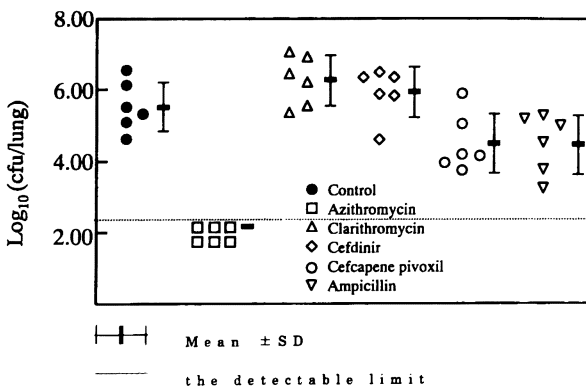


Fig. 3. Number of bacteria in lower respiratory organs of mice 24 h after administration of antimicrobial agents in bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

III. 考 察

市中呼吸器感染症の主要原因菌として, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* などがあげられる。これらグラム陽性および陰性菌に対し, 幅広い抗菌活性を示す β -ラクタム系薬やフルオロキノロン系薬の使用頻度は高い。その結果, penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP) の割合は 40% 以上となり, ほとんどの *M. catarrhalis* はペニシリナーゼを産生する^{10,11}。また *H. influenzae* においても β -ラクタム系薬耐性菌が増加し, penicillinase producing *H. influenzae* と beta-lactamase nonproducing ampicillin resistant *H. influenzae* の 2 つのタイプが知られている¹²。さらに, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ではフルオロキノロン系薬耐性菌も出現しており, 今後の増加が危惧される^{13,14}。

このような現状を考慮すると, これら耐性菌にも有効な抗菌薬の出現が期待されている。マクロライド系薬のなかで, clarithromycin はグラム陽性菌の他に *H. influenzae* にも有効な抗菌薬として市販されている。最近市販された azithromycin は clarithromycin よりも *H. influenzae* に対する抗菌活性が強いことはすでに報告されており, 本実験結果でも同様の成績を得た^{6,6}。そこで, 著者らが確立した CBO 法による *H. influenzae* による気管支肺炎モデルを用いて, azithromycin および他の経口抗菌薬を 1 日 2 回 3 日間投与後の感染部位 (気管支・肺) での残存生菌数を比較評価した。その結果, azithromycin と cefcapene pivoxil がもっとも優れた治療効果を示した。

次に azithromycin は前述したように細胞内移行性が良好であり, 肺内濃度は血清中の 100 倍以上であると報告されている^{15,16}。さらに, 食細胞内にも高濃度に取り込まれ, この細胞が感染部位へ移行すると考えられて

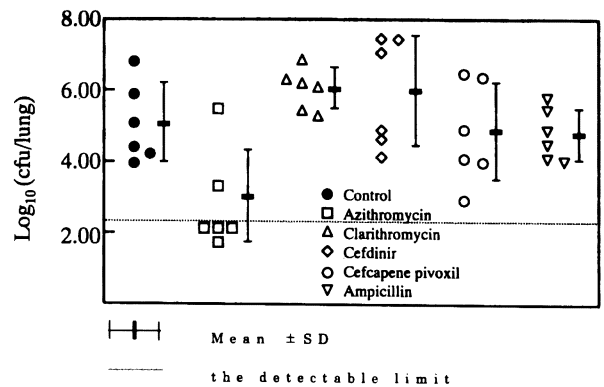


Fig. 4. Number of bacteria in lower respiratory organs of mice 48 h after administration of antimicrobial agents in bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

いる⁹⁾。そこで、この azithromycin の体内動態の特長を考慮して、1 回投与後の感染部位（気管支・肺内）の感染菌の残存生菌数を検討したところ、azithromycin 投与群のみ抗菌薬投与 48 時間後にも 67% のマウスからは菌が検出されなかった。Cefdinir, cefcapene, ampicillin の *in vitro* 抗菌活性は azithromycin より 4 倍から 125 倍強いにもかかわらず、この投与条件下では、他の抗菌薬群に比べ有意差をもって azithromycin 投与群の治療効果が優れていた。その主要な理由として、azithromycin は組織移行や細胞内移行が優れているという特長な体内動態が反映していると推測される。

以上の成績から、*H. influenzae* に対し azithromycin は既存の β -ラクタム系薬と同等かやや優れた治療効果が得られ、従来の抗菌薬に比べ臨床での投与期間や回数を少なくしていることが基礎的に明らかにされたと考えられる。

文 献

- 1) Bauernfeind A, Jungwirth R, Eberlein E: Comparative pharmacodynamics of clarithromycin and azithromycin against respiratory pathogens. *Infection* 23: 316~321, 1995
- 2) Kees F, Wellenhofer M, Grobecker H: Serum and cellular pharmacokinetics of clarithromycin 500 mg o.d. and 250 mg b.i.d in volunteers. *Infection* 23: 108~172, 1995
- 3) Mazzei T, Surrenti C, Novelli A, et al.: Pharmacokinetics of azithromycin in patients with impaired hepatic function. *J Antimicrob Chemother* 31 (S-E): 57~63, 1993
- 4) Ballou C H, Amsden G W, Highet V S et al.: Concentration of azithromycin (A) in polymorphonuclear leukocytes (OMNs): role in tissue delivery. *Can J Infect Dis* 6 (S-C): 255, 1995
- 5) 宮崎修一, 山口恵三: Azithromycin の抗菌力・生体内効果。 *Jpn J Antibiotic* 53: 251~268, 2000
- 6) Maskell J P, Sefton A M, Williams J D: Comparative *in-vitro* activity of azithromycin an derythromycin against Gram-positive cocci, *Haemophilus influenzae* and anaerobes. *J Antimicrob Chemother* 25 (S-A): 19~24, 1990
- 7) Dunkin K T, Jones S, Howard A J: The *in-vitro* activity of CP-62, 993 against *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, staphylococci and streptococci. *J Antimicrob Chemother* 21: 405~411, 1988
- 8) 日本化学療法学会: 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法委員会報告。 *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 9) Miyazaki S, Nunoya T, Matsumoto T, et al.: New murine model of bronchopneumonia due to cell-bound *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 175: 205~209, 1997
- 10) Miyazaki S, Matsunaga T, Kobayashi I, et al.: The other mediator for adherence of *Haemophilus influenzae* organisms without involvement of fimbriae. *Microbiol Immunol* 62: 673~679, 1992
- 11) Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, et al.: Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993-1995. *J Infect Chemother* 1: 177~184, 1996
- 12) Yourassowsky E, van der Linden M P, Lismont M J, et al.: Rate of bactericidal activity for *Branhamella catarrhalis* of a new macrolide, CP-62,993, compared with that of amoxicillin-clavulanic acid. *Chemotherapy* 34: 191~194, 1988
- 13) 生方公子: 最近話題の耐性菌とその耐性機序—PRSP と BLNAR。 *臨床病理 (S-111)*: 17~25, 2000
- 14) Taba H, Kusano N: Sparfloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: involvement of multiple mutations in *gyrA* and *parC* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2193~2196, 1999
- 15) Vila J, Ruiz J, Sanchez F, et al: Increase in quinolone resistance in a *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 161~162, 1999
- 16) Retsema J A, Bergeron J M, Girard D, et al.: Preferential concentration of azithromycin in an infected mouse thigh model. *J Antimicrob Chemother* 31 (S-E): 5~16, 1993
- 17) Foulds G, Johnson R B: Selection of dose regimens of azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 31 (S-E): 39~50, 1993

Efficacy of oral antimicrobial agents against bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* in mice

Shuichi Miyazaki, Toshihiko Fujikawa and Keizo Yamaguchi

Department of Microbiology Toho University School of Medicine,
5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

The antibacterial activity of azithromycin (MIC_{90} : 2 μ g/mL) against *Haemophilus influenzae* was 4 times stronger than that of clarithromycin and ampicillin, but was weaker than cefdinir and cefcapene. On the administration of a drug twice daily for 3 days at a dose of 50 mg/kg in murine bronchopneumonia, efficacy in mice treated with azithromycin and cefcapene pivoxil was significantly superior to that in mice treated with clarithromycin, ampicillin, and cefdinir. In contract, on the administration of 1 dose of 100 mg/kg, the efficacy of azithromycin and cefcapene pivoxil was significantly superior to that in mice treated other drugs until 24 h after administration. However, at 48 h after administration, the efficacy of azithromycin was significantly superior to all other drugs containing cefcapene pivoxil. The antibacterial activity of cefcapene, cefdinir, and ampicillin was 4 times or more stronger than azithromycin. Since the concentration of azithromycin in lung tissue was 100 times or more than that in serum, this high distribution in tissue reflected the good efficacy of azithromycin.