

【原著・基礎】

アンピシリン耐性 *Haemophilus influenzae* 感染モデルにおける
経口セフェム系薬の治療効果と MIC との関係

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 9 月 25 日受付・平成 12 年 10 月 18 日受理)

最近日本において、アンピシリン耐性 *Haemophilus influenzae*、特に β -lactamase 非産性アンピシリン耐性 (BLNAR) 株の増加が問題になっている。本菌種は市中呼吸器感染症の主要原因菌の 1 つであり、使用頻度の高い経口第 3 セフェム系薬のアンピシリン耐性株に対する有用性を比較検討した。アンピシリン感受性株、 β -lactamase 産生株、BLNAR 株によるマウス気管支肺炎モデルを用いて、各薬剤を 20 mg/kg 1 日 2 回 3 日間投与し、残存生菌数を測定した。Cefditoren pivoxil, cefcapene pivoxil, cefpodoxime proxetil 投与群がいずれの菌株感染モデルにおいても他の比較抗菌薬に比べ優れた治療効果を示した。これら 3 つの抗菌薬のなかで、3 株の感染菌に対する *in vitro* 抗菌力がもっとも強かったのは cefditoren であり、次いで cefcapene であった。Cefpodoxime の抗菌力はこれら抗菌薬の約 1/4 以下であった。以上の成績から、治療効果には *in vitro* 抗菌活性の他に感染部位での抗菌薬の体内動態や蛋白結合率など他の要因の関与も示唆された。

Key words: BLNAR, ペニシリンナーゼ産生 *Haemophilus influenzae*, 治療効果, MIC, 感染モデル

現在、市中呼吸器感染症の治療薬としてさまざまな経口抗菌薬が用いられている。そのなかでも日本で多く使用されている抗菌薬にセフェム系薬がある。セフェム系薬は開発の進展に伴い、抗菌スペクトラムの拡大や抗菌力の増強が認められる。このような抗菌薬の改良および使用量の増加に伴い、感染症原因菌にも変化が生じている。市中呼吸器感染症の主要原因菌である *Haemophilus influenzae* の場合、1970 年代に β -lactamase 産生 *H. influenzae* が出現し、1980 年代になると β -lactamase 非産性アンピシリン耐性 (beta-lactamase nonproducing ampicillin resistant; BLNAR) *H. influenzae* が出現した^{1,2)}。これらアンピシリン耐性 *H. influenzae* に対しても、第 3 世代経口セフェム系薬は *in vitro* で強い抗菌活性を示すと報告されている^{3,4)}。

このような現状を考慮し、現在本菌種による呼吸器感染症患者に使用頻度の高い経口 β -ラクタム系薬である cefpodoxime proxetil, cefditoren pivoxil, cefcapene pivoxil, cefdinir, cefaclor, ampicillin, ペネム系薬である faropenem の *Haemophilus influenzae* 感染マウスでの治療効果について検討を行った。菌株はアンピシリン感受性株だけでなく、現在臨床で問題になっている β -lactamase 産生および非産性アンピシリン耐性臨床分離株の計 3 株を用いた。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

感受性試験およびマウス感染実験では、東邦大学医学部付属大森病院で分離された臨床分離株 *H. influenzae* TUM 8, TUH 36, TUH 267 の 3 株を用いた。*H. influ-*

enzae TUM 8 はアンピシリン感受性株、*H. influenzae* TUH 36 は β -lactamase 産生アンピシリン耐性株、*H. influenzae* TUH 267 は β -lactamase 非産性アンピシリン耐性株 (BLNAR) であった。

2. 抗菌薬の抗菌力測定

MIC は NCCLS に準じ、微量液体希釈法にて測定した⁵⁾。

3. 使用動物

マウスは Slc/ICR (3.5 週齢, 雄) を 1 群 7 匹用いた。

4. 感染方法

著者らがすでに報告した CBO 法を用いた⁶⁾。すなわち、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。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、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・侵入実験を行った。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した。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、感染菌液とした。

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 μ L 経鼻滴下したマウスに麻酔下で感染菌液を 50 μ L 経鼻滴下した。感染 2 日後のマウスに、抗菌

薬を1日2回3日間経口投与し、最終投与の翌日にマウスから気管および肺を無菌的に摘出し、2 mLの生理食塩液の入ったガラス製のホモジナイザーを用いてホモジナイズした。それぞれのホモジネートの10倍階段希釈液を作製し、X因子、V因子を含むチョコレート寒天培地に100 μ L塗抹・培養を行い、残存生菌数によって評価を行った。

5. 使用抗菌薬

Cefpodoxime (cefpodoxime proxetil) (三共), cefditoren (cefditoren pivoxil) (明治製薬), cefdinir (藤沢薬品工業), cefcapene (cefcapene pivoxil) (塩野義製薬), faropenem (サントリー) および cefaclor (塩野義製薬) は力価の明らかなものの分与を受けた。また ampicillin は Sigma 社のものを使用した。

6. 有意差検定

本実験の検出限界は200 cfu/mouseより、検出限界以下のものはすべて190 cfu/mouseとして、有意差検定を行った。検定はマン・ホイットニ法で行った。

II. 結 果

1. *H. influenzae* に対する抗菌力測定

H. influenzae 3株についての各薬剤の *in vitro* 抗菌力を測定した (Table 1)。アンピシリン感受性株の TUM 8 に対しては、いずれの抗菌薬も強い抗菌力を示した。特に, cefditoren, cefcapene の抗菌力がもっとも強く、次いで cefpodoxime であった。Ampicillin を除くすべての抗菌薬の β -lactamase 産生アンピシリン耐性 TUH 36 株に対する抗菌活性は、 β -lactamase 非産生 TUM 8 株に対する場合とほぼ同じであった。 β -lactamase 非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) TUH 267 株に対してセフェム系薬の抗菌力は、TUM 8 株の場合に比べ32倍から256倍減弱していた。

2. マウス感染実験における抗菌薬投与量の検討

H. influenzae TUM 8 感染マウスに cefpodoxime proxetil の1回投与量を4 mg/kg, 20 mg/kg, 100 mg/kg の3群に分け、1日2回3日間経口投与した (Fig. 1)。その結果、100 mg/kg 投与群ではすべてのマウス

の感染組織 (気管支・肺) から菌は検出されなかった。20 mg/kg 投与群は平均 $3.03 \pm 0.76 \log \text{ cfu/tissue}$ (3匹では現出限界以下) であり、4 mg/kg 投与群、無投与群に比べ有意差 ($p < 0.01$) をもって菌数が減少していた。4 mg/kg 投与群における平均残存生菌数は $5.27 \pm 0.90 \log \text{ cfu/tissue}$ で、無投与群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって菌数が減少していた。この結果をもとに、*H. influenzae* 感染モデルに対する抗菌薬の治療効果を比較評価する際、1回投与量を20 mg/kgと設定した。

3. アンピシリン感受性 *H. influenzae* TUM 8 感染マウスに対する治療効果

H. influenzae TUM 8 感染マウスに対し、それぞれの薬剤を20 mg/kg 1日2回3日間投与し、感染組織内残存生菌数を測定した (Fig. 2)。その結果、もっとも治療効果が優れていたのは、cefditoren pivoxil の平均 $2.38 \pm 0.27 \log \text{ cfu}$ で7匹中6匹が検出限界以下であった。次いで cefcapene pivoxil, cefpodoxime proxetil の順に治療効果が優れていた (それぞれの平均 $2.91 \pm 0.69 \log \text{ cfu}$, $3.21 \pm 0.72 \log \text{ cfu}$)。これら3薬剤は、control 群, cefaclor, faropenem 投与群に比べ有意に生菌数が減少していた ($p < 0.05$)。

4. β -lactamase 産生 *H. influenzae* TUH 36 感染マウスに対する治療効果

H. influenzae TUH 36 感染マウスに対して TUM 8 と同様の治療を行い残存生菌数を測定した (Fig. 3)。治療効果の優れた抗菌薬は TUM 8 感染の場合同様に cefcapene pivoxil, cefditoren pivoxil, cefpodoxime proxetil でそれぞれ平均残存生菌数は $2.62 \pm 0.71 \log \text{ cfu}$, $2.63 \pm 0.29 \log \text{ cfu}$, $3.68 \pm 1.07 \log \text{ cfu}$ であった。それら3薬剤間では有意差は認められなかったが、cefdinir, cefaclor, faropenem, ampicillin 投与群および無投与群

Table 1. MICs of antimicrobial agents for 3 *Haemophilus influenzae* strains

	MICs ($\mu\text{g/mL}$)		
	TUM 8	TUH 36 (β -lac +)	TUH 267 (BLNAR)
Cefpodoxime	0.03	0.06	4
Cefditoren	0.008	0.008	0.25
Cefcapene	0.008	0.008	2
Cefdinir	0.25	0.25	8
Cefaclor	1	2	32
Faropenem	0.12	0.25	0.25
Ampicillin	0.25	64	8

By microdilution broth method

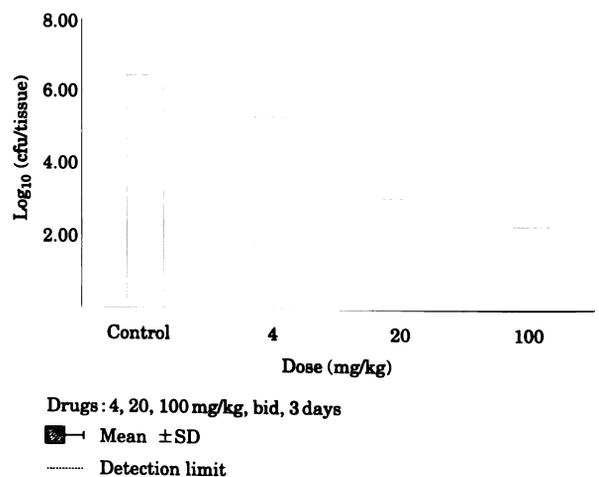


Fig. 1. Effects of dosage of cefpodoxime proxetil on murine bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

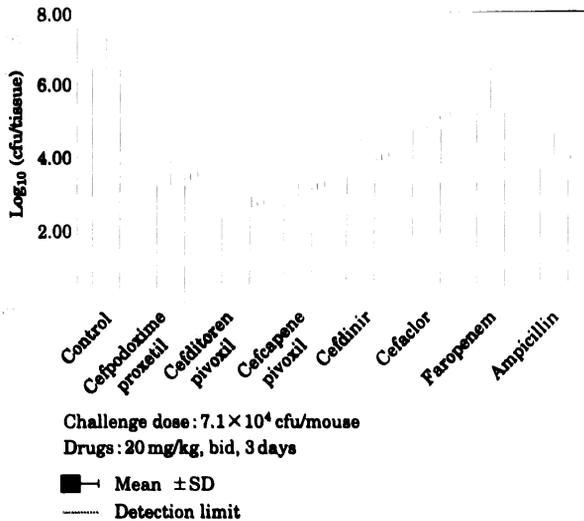


Fig. 2. Reduction in viable bacteria in infected tissues after administration of different drugs for 3 days to murine bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUM 8.

- a) $P < 0.05$ versus controls and mice treated with cefaclor and faropenem
 b) $P < 0.05$ versus controls and mice treated with cefpodoxime proxetil, cefdinir, cefaclor, or faropenem
 c) $P < 0.05$ versus controls

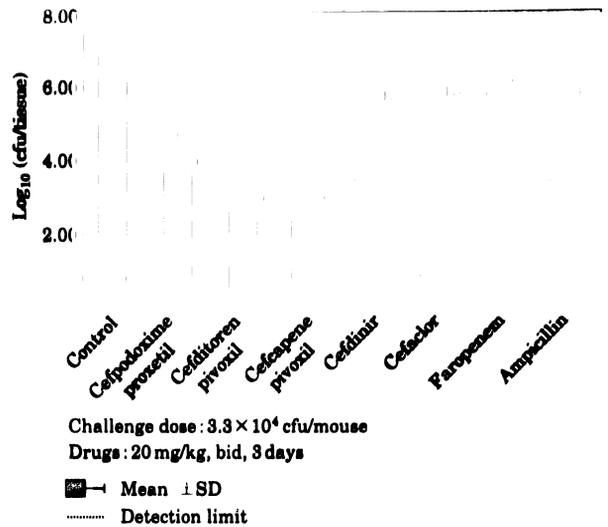


Fig. 3. Reduction in viable bacteria in infected tissues after administration of different drugs for 3 days to murine bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUH 36.

- a) $P < 0.05$ versus controls and mice treated with cefdinir, cefaclor, faropenem, or ampicillin
 b) $P < 0.05$ versus mice treated with cefdinir
 c) $P < 0.05$ versus controls and mice treated with cefdinir

に対し有意に生菌数が減少していた ($p < 0.05$)。

5. β -lactamase 非産生アンピシリン耐性 *H. influenzae* TUH 267 感染マウスに対する治療効果

本菌感染マウスに対する各抗菌薬の治療効果は β -lactamase 産生および非産生株感染群に比べ劣っていた。しかし, cefditoren pivoxil (平均残存生菌数: 4.18 ± 1.08 log cfu), cefpodoxime proxetil (4.67 ± 0.76 log cfu) および cefcapene pivoxil (5.06 ± 0.67 log cfu) は cefdinir, cefaclor, ampicillin 投与群および無投与群と比較し有意 ($p < 0.05$) に生菌数が減少した。

III. 考 察

市中呼吸器感染症の代表的な原因菌である *Haemophilus influenzae* は, β -lactam 系薬に対して2つの耐性獲得機序が知られている。1つはペニシリン系薬を不活化する β -lactamase を産生して耐性を獲得する場合, もう1つは β -lactam 系薬の作用点である PBP (penicillin binding proteins) の変異 (特に PBPA の変異) により, 抗菌薬との親和性を低下させ耐性を獲得する (BLNAR) 場合である^{1,2,9,10}。日本では, β -lactamase 産生株の分離割合は 10~15% を維持し, この頻度は欧米の 30% に比べ低い^{10~12}。一方 BLNAR 株の分離割合は約 40% と, 欧米の 5% 以下に比べ明らかに高い^{11~13}。また, 日本および欧米においてもフルオロキノロン系抗菌薬に耐性を示す *H. influenzae* が報告されている^{14,15}。さらに, 市中呼吸器感染症の原因菌としてもっとも多い *Streptococcus pneumoniae* の場合, 日本にお

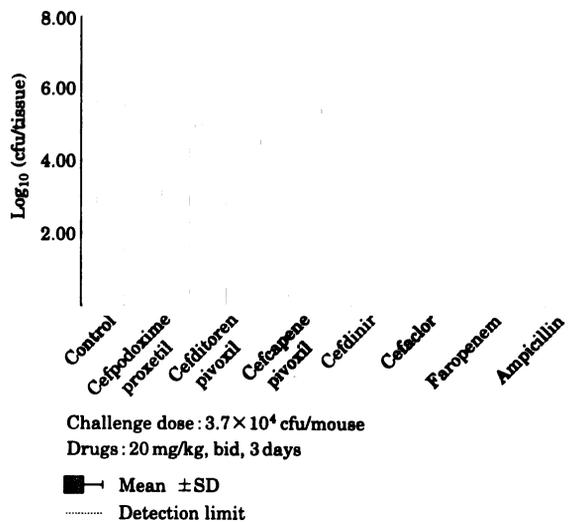


Fig. 4. Reduction in viable bacteria in infected tissues after administration of different drugs for 3 days to murine bronchopneumonia due to *Haemophilus influenzae* TUH 267

- a) $P < 0.05$ versus controls and mice treated with cefdinir, cefaclor, or ampicillin

けるペニシリン系薬に低感受性または耐性を示す株の分離頻度は約 40% である^{14,16}。しかも, *S. pneumoniae* に強い抗菌活性を示していたマクロライド系薬に耐性を示す分離株割合はさらに多い¹⁶。このような状況下では, 市中呼吸器感染症に対する経口第3世代セフェム系薬の有用性が重要である。

β -lactamase 産生および非産生 *H. influenzae* に対する第3世代セフェム系薬の抗菌力は強いが、BLNAR株に対する抗菌力は β -lactamase産生株を含む他の *H. influenzae* に比べ弱いと報告されている^{17,18)}。本実験に用いた3つの感染株に対するセフェム系薬の抗菌力成績も同様であった。BLNAR株に対する faropenem の抗菌力は *H. influenzae* の場合同様に強かった。これら3つの菌株を用いたマウス感染モデルにおける抗菌薬投与後の残存生菌数を指標とした治療効果は cefpodoxime proxetil, cefcapene pivoxil および cefditoren pivoxil が他の比較抗菌薬に比べ優れていた。*In vitro* 抗菌力で比較すると、cefditoren 次いで cefcapene が強い抗菌活性を示し、cefpodoxime の抗菌活性はこれら抗菌薬の約 1/4 以下であった。マウスに 50 mg/kg 経口投与後の肺組織中の cefpodoxime と cefcapene の C_{max} はそれぞれ 9.1 μ g/g と 4.1 μ g/g, $T_{1/2}$ はそれぞれ 1.90 h と 0.78 h, AUC は 17.1 μ g · h/g と 6.6 μ g · h/g である¹⁹⁾。この体内動態成績は cefpodoxime のパラメーターの方が cefcapene より優れていることを示している。一方、cefpodoxime proxetil と cefditoren pivoxil をマウスに 100 mg/kg 経口投与後の肺内の体内動態はほぼ同じであったと報告されている²⁰⁾。川田ら²⁰⁾ は cefpodoxime のマウスの血清蛋白結合率が cefditoren の約 1/2 であり、cefditoren の遊離体の割合が少ないことが治療効果に影響すると報告している。Craig WA²¹⁾ は β -lactam 系薬の治療効果には感染部位での MIC 以上の維持時間が影響すると報告している。以上の成績から、治療効果には抗菌薬の MIC の他に感染部位での体内動態および蛋白結合率などが総合的に反映すると考えられる。本実験においても、cefpodoxime proxetil の治療効果が cefditoren pivoxil や cefcapene pivoxil とほぼ同等であった理由は、本抗菌薬の優れた肺内動態と低い蛋白結合率(活性体の割合が多い)などがあげられよう。

Faropenem は動物種によって違うが、げっ歯類の DHP-I によって不活化されると報告されている²²⁾。この事実が、マウスを用いた本実験で *in vitro* 抗菌活性から期待される治療効果が得られなかった原因と考えられる。

本実験成績から、cefpodoxime proxetil, cefditoren pivoxil および cefcapene pivoxil はアンピシリン感受性株はもちろん BLNAR を含むアンピシリン耐性株に対しても有効な治療効果が期待される。

文 献

- 1) Medeiros A, O'Brien T F: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type β -lactamase, but little permeability barrier to ampicillin. *Lancet* i: 716~719, 1975
- 2) Thornsberry C, Kirven L A: Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for beta-lactamase production. *Antimicrob*

- Agents Chemother 6: 653~654, 1974
- 3) Bell S M, Plowman D: Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from respiratory tract. *Lancet* i: 279~280, 1980
- 4) Markowitz S M: Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 80~83, 1980
- 5) Daberna H, Aril J L, Boussougant Y: *In-vitro* activity of cefpodoxime against pathogens responsible for community-acquired respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 26 (S-E): 1~6, 1990
- 6) Yamaguchi K, Domon H, Miyazaki S, et al.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of CS-834, a new oral carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 555~563, 1998
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods of dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—Third edition; Approved standard. NCCLS document M7-A3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA., 1993
- 8) Miyazaki S, Nuoya T, Matsumoto T, et al.: New murine model of bronchopneumonia due to cell-bound *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 175: 205~209, 1997
- 9) Mendelman P M, Chaffin D O, Stull T L, et al.: Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 235~244, 1984
- 10) 生方公子, 千葉穂子, 中山信子, 他: 薬剤耐性機構からみた β -lactamase 非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 (BLNAR) の特徴。日臨微生物会誌 9: 22~29, 1999
- 11) Doern G V, Bruggemann A B, Pierce G, et al.: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to ampicillin-clavulanate: Results on a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 292~297, 1997
- 12) Yeo S F, Akalin E, Arikian S, et al.: Susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: An international collaborative study in quality assessment. *J Antimicrob Chemother* 38: 363~386, 1996
- 13) Seki H, Kasahara Y, Ohta K, et al.: Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan. *Chemother* 45: 15~21, 1999
- 14) 西岡きよ, 荻原央子, 大野 勲, 他: 呼吸器感染症起炎菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* および *Moraxella catarrhalis* の抗生物質感受性: 1994~1995年の検討。Jpn J Antibio 50: 768~775, 1997
- 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) 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
- 17) Powell M, Seetulsingh P, Williams J D: *In-vitro* susceptibility of *Haemophilus influenzae* to meropenem compared with imipenem, five other β -lactams, chloramphenicol and ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 24(S-A): 175~181, 1989
- 18) Jorgensen J H, Maher L A, Howell A W: Activity of new carbapenem antibiotic, meropenem, against *Haemophilus influenzae* strains with β -lactamase- and non-enzyme-mediated resistance to ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 35: 600~602, 1991
- 19) 辻 明良, 松田早人, 五島達智子: 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. 日化療会誌, 41 (S-1): 13~29, 1993
- 20) 川田晴美, 北山暁子, 福岡 隆, 他: ペニシリン耐性肺炎球菌に対する cefpodoxime proxetil の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力. Jpn J Antibiot 52: 533~540, 1999
- 21) Craig W A: Antimicrobial resistance issues of the future. Diagn Microbiol Infect Dis 25: 213~217, 1996
- 22) 金井 靖, 諸住なおみ, 米本儀之, 他: SY 5555 の実験動物における体内動態. 日化療会誌 42 (S-1): 243~252, 1994

Relationship between MICs and efficacy of oral cephems against ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* infections

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 increase in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates, especially β -lactamase nonproducing ampicillin-resistant (BLNAR) strains, is a growing problem in Japan. This species is a cause of community-acquired respiratory infection. We compared the activity of oral third-generation cephems, which are frequently administered to patients with respiratory infection against ampicillin-resistant *H. influenzae* organisms using murine bronchopneumonia caused by ampicillin-susceptible, β -lactamase-producing and BLNAR strains. After each drug was administered at 20 mg/kg twice a day for 3 days, we compared degrees to which viable bacteria in infected tissues was reduced using 7 β -lactams. In general, the efficacy in mice treated with cefpodoxime proxetil, cefditoren pivoxil, and cefcapene pivoxil was better than that of those treated with cefdinir, cefaclor, faropenem and ampicillin. The *in vitro* activity of cefditoren against the 3 infectious organisms was strongest among these drugs and that of cefcapene was the same or a slightly less than cefditoren, while that of cefpodoxime was one-quarter or less than these 2 drugs. These results suggest that the drug efficacy in a murine infection model may depend upon MIC and protein binding percent and drug pharmacokinetics in the infected tissues.