

【原著・基礎】

Haemophilus influenzae による気管支肺炎モデルにおける
カルバペネム系薬の治療効果

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 12 月 19 日受付・平成 13 年 1 月 23 日受理)

最近分離されたアンピシリン感性、 β -ラクタマーゼ産生および β -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) *Haemophilus influenzae* に対する meropenem (MEPM) と比較抗菌薬である ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), panipenem, imipenem (IPM), biapenem (BIPM) の抗菌力を調べた結果、特に BLNAR 菌において IPM 耐性菌 (MIC: $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) が 50% であった。また、BLNAR 菌に対する MEPM と CTX の抗菌活性 (MIC₉₀) はアンピシリン感性菌に対する抗菌活性のそれぞれ 1/4 と 1/64 であった。アンピシリン感性および BLNAR *H. influenzae* による気管支肺炎マウスに、meropenem/cilastatin (MEPM/CS) および比較抗菌薬を 1 日 2 回 3 日間 20 mg/kg (ABPC, CTX では 40 mg/kg) を連続投与し治療効果を比較評価した。アンピシリン感性菌を用いた場合、CTX 投与群が有意差 ($p < 0.05$) をもってもっとも優れた治療効果を示し、次いで BIPM, ABPC, MEPM/CS 投与群の順であった。一方、BLNAR 菌を感染した群では、MEPM/CS, imipenem/cilastatin (IPM/CS) および CTX 投与群のみ無治療群に比ベ有意差 ($p < 0.05$) をもって感染組織の生菌数が減少していた。

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

Meropenem (MEPM) はカルバペネム系抗菌薬の 1 つであり、グラム陽性、陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を示す¹⁾。本剤の特長の 1 つは、グラム陰性桿菌に対して imipenem (IPM) よりも強い抗菌活性を示すことである。呼吸器感染症の主な原因菌の 1 つである *Haemophilus influenzae* に対し MEPM の抗菌活性は第 3 世代セフェム系薬と同等と報告されている¹⁾。

近年、 β -ラクタマーゼ産生菌および β -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性菌 (BLNAR 菌) の増加が問題となっている²⁾。これらによる気管支肺炎において、重症化した患者や経口薬の服用が困難な患者では注射薬の投与となる。そこで、本論文では、最近分離された株に対するカルバペネム系薬 (MEPM, IPM, panipenem (PAPM), biapenem (BIPM)) および第 3 世代セフェム系薬として cefotaxime (CTX) の MIC 測定および *H. influenzae* 感染モデルでの治療効果を比較検討したので、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 1999 年 4 月～2000 年 3 月までに臨床材料から分離されたアンピシリン感性 *H. influenzae* 31 株、 β -ラクタマーゼ産生 *H. influenzae* 34 株および BLNAR *H. influenzae* 38 株および動物実験用に呼吸器感染症患者由来のアンピシリン感性 *H. influenzae* TUM 8 株 と BLNAR *H. influenzae* TUH 267 株を用いた。

2. 使用抗菌薬

MEPM (住友製薬), imipenem/cilastatin (IPM/CS, 萬有製薬), panipenem/betamipron (PAPM/BP, 三共), BIPM (日本ワイスレダリー), CTX (アベンチスファーマ) および ampicillin (ABPC, 明治製薬) は力価の明らかなものの分与を受けた。

3. 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³⁾。

4. マウスは Slc/ICR (3.5 週齢, 雄) を 1 群 8 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。

5. 感染方法

すでに報告した方法に従い感染菌を作製し、その 50 μL を経鼻滴下した⁴⁾。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, 反転させながら附着・侵入実験を行う。1 時間後液を捨て, 附着・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附着・侵入した細胞を剥ぎ

Table 1. Antibacterial activity of meropenem and other intravenous drugs against clinical isolates of *Haemophilus influenzae*

Organism (number of test strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		range		MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillin-susceptible isolates (31)	meropenem	0.0313–	0.0625	0.0625	0.125
	imipenem	0.125 –	2	0.5	1
	panipenem	0.125 –	1	0.25	0.5
	biapenem	0.125 –	2	0.5	1
	ampicillin	0.125 –	0.5	0.25	0.5
	cefotaxime	0.008 –	0.0313	0.016	0.016
β -lactamase-producing isolates (34)	meropenem	0.0313–	0.5	0.0625	0.5
	imipenem	0.25 –	32	2	4
	panipenem	0.125 –	8	1	2
	biapenem	0.125 –	16	0.5	8
	ampicillin	2 –	>128	8	64
	cefotaxime	\leq 0.016	1	\leq 0.016	0.5
β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant isolates (38)	meropenem	0.0313–	0.5	0.25	0.5
	imipenem	0.5 –	64	4	8
	panipenem	1 –	16	4	8
	biapenem	0.5 –	32	8	8
	ampicillin	1	16	2	8
	cefotaxime	\leq 0.016	2	0.125	1

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 (*H. influenzae* TUM 8; 7.1×10^4 cfu/animal, *H. influenzae* TUH 267; 9.9×10^4 cfu/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 MEPM (本実験では cilastatin と 1:1 の割合とした合剤として使用)、IPM/CS、PAPM/BP および BIPM は 20 mg/kg、CTX および ABPC は 40 mg/kg を 1 日 2 回 3 日間連続投与した群について、治療効果を気管支肺内残存生菌数で判定した。

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. MEPM および比較 β -ラクタム系薬の *H. influenzae* に対する抗菌力アンピシリン感性 *H. influenzae* に対する MEPM の MIC₉₀ は 0.125 $\mu\text{g/mL}$ であった (Table 1)。この MEPM の抗菌力 (MIC₉₀) は cefotaxime の 1/8 であるが、他の比較抗菌薬の 4 倍以上であった。

β -ラクタマーゼ産生菌および BLNAR 菌に対する MEPM の抗菌力 (MIC₉₀; 0.5 $\mu\text{g/mL}$) は共にアンピシリン感性株に対する抗菌力の 1/2 であった。また、この MEPM の抗菌力は、CTX と同等かやや強く、他のカルバペネム系薬および ABPC の 16 倍以上であった。

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

Table 2. Antimicrobial agent MICs vs. *Haemophilus influenzae*

Drug	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	TUM 8	TUH 267 (BLNAR)
Meropenem	0.015	0.25
Panipenem	0.06	4
Imipenem	0.12	2
Biapenem	0.06	8
Cefotaxime	0.008	1
Ampicillin	0.25	4

TUM 8 および TUH 267 に対する MEPM の *in vitro* 抗菌力 (Table 2) を比較すると、TUM 8 に対する CTX の抗菌力より弱い、他の抗菌力より 2 倍~100 倍以上であった。

アンピシリン感性 TUM 8 株感染マウスに 1 日 2 回 3 日間各抗菌薬を連続投与した場合、いずれの抗菌薬で治療した群においても無治療群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって菌数が減少していた (Fig. 1)。治療群の中では CTX 投与群が有意差をもって優れた治療効果を示し、8 匹中 6 匹のマウス気管・肺内生菌数は検出限界以下であった。次いで、BIPM と ABPC 投与群では PAPM/BP と IPM/CS 投与群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって優れた治療効果を示した。Meropenem/cilastatin (MEPM/CS) 投与群は PAPM/BP 投与群より有意差 ($p < 0.05$) を持って生菌数が減少していた。なお、検出菌が検出限界以下であったマウスは MEPM/CS と BIPM 投与群で各 1 匹、ABPC 投与群で 2 匹認められた。

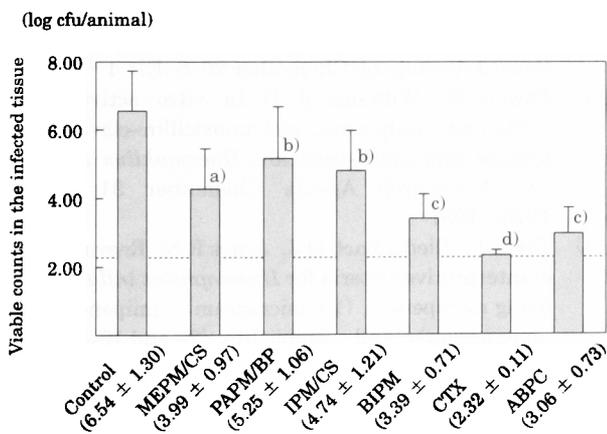
次に、BLNAR *H. influenzae* TUH 267 を感染菌とした場合の治療成績を Fig. 2 に示した。MEPM/CS、

IPM/CS および CTX 投与群は、無投与群に比べ有意差 ($p < 0.05$) をもって減少していた。なお、PAPM/BP、BIPM および ABPC 投与群の残存平均生菌数は、無投与群に比べ有意差はないが、やや減少していた。

III. 考 察

H. influenzae は呼吸器感染症の主要原因菌である⁶⁾。近年、本菌種はβ-ラクタム系薬耐性菌の増加が問題となっており、この耐性機序にはペニシラーゼ産生と BLNAR の 2 種類の H. influenzae がある^{6,7)}。さらに、最近フルオロキノロン系薬に耐性を示す臨床分離株も報告されている^{8,9)}。

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。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、最近市販された azithromycin や第 3 世代経口セフェム系薬が経口抗菌薬として優れた治療効果を示すことを報告した^{10,11)}。一方、H. influenzae による呼吸器感染症患者のなかには経口薬を服用できない、あるいは急性増悪した患者に対しては注射薬を投与する必要性の高い症例も多い。したがって、今回注射用β-ラクタム系薬の有用性について比較検討した。



Challenge dose : 7.1×10^4 cfu/animal

□ : Mean ± SD

----- : Detectable limit

() : mean ± SD

MEPM/CS : meropenem/cilastatin, PAPM/BP : panipenem/betamipron,

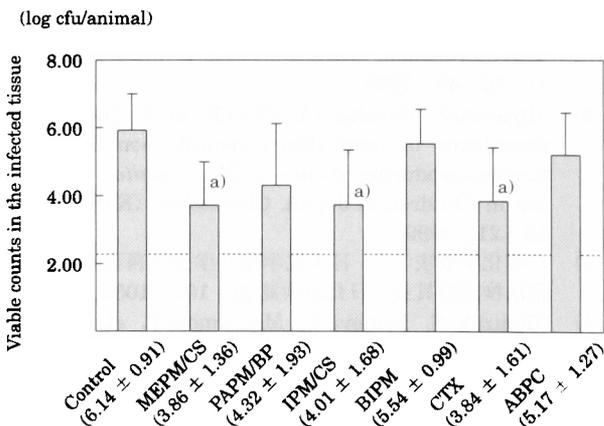
IPM/CS : imipenem/cilastatin, BIPM : biapenem, CTX : cefotaxime,

ABPC : ampicillin

Fig. 1. 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 control mice and mice treated panipenem/betamipron (PAPM/BP)
 b) $P < 0.05$ versus control mice
 c) $P < 0.05$ versus control mice and mice treated PAPM/BP and imipenem/cilastatin (IPM/CS)
 d) $P < 0.05$ versus control mice and mice treated meropenem/cilastatin, PAPM/BP, IPM/CS, biapenem and ampicillin

In vitro 抗菌力において、β-ラクタマーゼ産生菌および BLNAR 菌に対してもっとも強い抗菌力を示した抗菌薬は MEPM, CTX であった。カルバペネム系薬間における本菌種に対する抗菌力では、MEPM がもっとも強い抗菌力を示し、この成績は既存の報告と一致している¹²⁻¹⁶⁾。特に BLNAR 菌に対する抗菌力において、MEPM の特長が表われている。NCCLS のブレイクポイントによると、H. influenzae に対する MEPM と IPM の MIC がそれぞれ $0.5 \mu\text{g/mL}$, $4 \mu\text{g/mL}$ 以下を感性としている¹⁶⁾。本実験において、β-ラクタマーゼ産生菌および BLNAR 菌に対して MEPM の MIC が $1 \mu\text{g/mL}$ 以上の耐性株は認められなかった。しかし、IPM の MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ 以上のβ-ラクタマーゼ産生菌および BLNAR 菌はそれぞれ 0.9% (3/34) と 50% (19/38) 認められた。この IPM 耐性菌に対し MEPM が抗菌力を示す理由について、Kanazawa ら¹⁷⁾が MEPM は H. influenzae の PBP 4 と PBP 5 への親和性が増加したことにより抗菌活性が増強していると報告している。また、β-ラクタマーゼ産生株と BLNAR 株に対する CTX の抗菌力 (MIC_{90}) はアンピシリン感性株に比べ約 1/32 から 1/64 であり、MEPM の 1/2 に比べ明らかな抗菌力の減少であった。Jorgensen ら¹⁸⁾も cefuroxime, CTX で同様の現象のあることを報告している。これら in vitro 抗菌力成績は、今後 CTX の使用量や使用頻度の増加に伴い、アンピシリン感性菌に比べアンピシリン耐性 H. influenzae に対する本剤の抗菌力の減少割合がよ



Challenge dose : 9.9×10^4 cfu/animal

□ : Mean ± SD

----- : Detectable limit

() : mean ± SD

MEPM/CS : meropenem/cilastatin, PAPM/BP : panipenem/betamipron,

IPM/CS : imipenem/cilastatin, BIPM : biapenem, CTX : cefotaxime,

ABPC : ampicillin

Fig. 2. Reduction in viable bacteria in infected tissues after administration of different drugs for 3 days to murine bronchopneumoniae due to *Haemophilus influenzae* TUH 267 (BLNAR).

- a) $P < 0.05$ versus control mice and mice treated biapenem

り著明になる可能性を示唆している。

MEPM はヒト由来のデヒドロペプチダーゼ-I (DHP-I) に対しては IPM や PAMP に比べ明らかに安定なことから、これら2つの抗菌薬と異なり単剤で使用されている。しかし、マウス由来の DHP-I に対しては、MEPM も IPM, PAMP 同様に不安定であることが報告されている¹⁾。IPM を投与する場合、ヒト由来 DHP-I に対し IPM を安定化させる目的で cilastatin との合剤として投与する。そこで、MEPM をマウスに投与する場合にも、IPM 投与の場合と同じ考え方で MEPM と cilastatin を 1:1 の割合とした合剤を投与した。その結果、明らかに MEPM のマウス体内動態は改善した¹⁾。また、カルバペネム系抗菌薬の投与量を CTX, ABPC の投与量の半分とした理由は、これら抗菌薬の臨床投与量にもとづいた量比とした。

このような条件下でアンピシリン感性株および BLNAR 株感染モデルでの治療効果を比較すると、*in vitro* 抗菌活性を反映した成績が得られ、CTX がもっとも優れた治療効果を示した。次いで、MEPM が優れた治療効果を示し、特に BLNAR 感染モデルでは CTX 治療群と同等であったことは興味をもたれる。現在注目されている BLNAR 菌の他、従来から問題となっているペニシリンナーゼ産生菌、さらには今後増加の可能性があるフルオロキノロン系薬耐性菌、IPM 耐性菌に対し、MEPM は CTX と同等かそれ以上の効果が期待される。

文 献

- 1) 五島瑳智子, 宮崎修一, 金子康子: 新カルバペネム系薬剤 Meropenem の細菌学的評価。日治療会誌 40 (S-1): 16~40, 1992
- 2) Miyazaki S, Kasahara Y, Ohta K, et al.: Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in Children in Japan. *Chemother (Kargel)* 45: 15~21, 1999
- 3) 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検討委員会。日治療会誌 38: 102~105, 1990
- 4) Miyazaki S, Nunoya T, Matsumoto T, et al.: New murine model of bronchopneumoniae due to cell-bound *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 175: 205~209, 1997
- 5) Miyazaki S, Matsunaga T, Kobayashi I, et al.: The other mediator for adherence of *Haemophilus influenzae* organisms without involvement of fibribrillae. *Microbiol Immunol* 62: 673~679, 1992
- 6) 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* 及び *Moraxella catarrhalis* の抗生

- 物質感受性: 1994~1995年の検討。Jpn J Antibiotic 50: 768~775, 1997
- 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 宮崎修一, 藤川利彦, 山口恵三: *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。日治療会誌 48: 763~767, 2000
 - 10) 宮崎修一, 藤川利彦, 山口恵三: 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抗菌薬の治療効果と MIC との関係。日治療会誌 48: 903~907, 2000
 - 11) 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
 - 12) Dabernat H, Avril 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
 - 13) Powell M, Williams J D: In vitro activities of aztreonam, imipenem, and amoxicillin-clavulanate against ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1871~1873, 1987
 - 14) Zerva L, Biedenbach D J, Jones R N: Reevaluation of interpretive criteria for *Haemophilus influenzae* by using meropenem (10-microgram), imipenem (10-microgram), and Ampicillin (2- and 10-microgram) disks. *J Clin Microbiol* 34: 1970~1974, 1996
 - 15) Yourassowsky E, Van der Linden M P, Crokaert F: Antibacterial effects of meropenem and imipenem against *Haemophilus influenzae*. *Chemother (Kargel)* 37: 38~42, 1991
 - 16) Jorgensen J H, Maher L A, Howell A W: Activity of a 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
 - 17) Kanazawa K, Nouda H, Sunagawa M: Structure-activity relationships of carbapenem compounds to anti-*Haemophilus influenzae* activity and affinity for penicillin-binding proteins. Effect of 1 beta-methyl group and C-2 side chain. *J Antibiot (Tokyo)* 50: 162~168, 1997

In vitro and *in vivo* activities of meropenem and comparative β -lactams
against *Haemophilus influenzae*

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

When the *in vitro* activity of ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), meropenem (MEPM), panipenem, imipenem (IPM) and biapenem was assayed using ABPC-susceptible, β -lactamase-producing, and β -lactamase-nonproducing ABPC-resistant (BLNAR) *Haemophilus influenzae* isolated recently, the ratio of IPM-resistant BLNAR isolates (MIC: 8 μ g/mL) was 50% due to following to the NCCLS breakpoint. Against these organisms the MIC₉₀ of MEPM was 1/4 and that of CTX was 1/64 of ABPC-susceptible organisms. The *in vivo* activity of ABPC, CTX, meropenem/cilastatin (MEPM/CS) panipenem/betamipron, imipenem/cilastatin and BIPM was evaluated using murine respiratory infection models due to ABPC-susceptible *H. influenzae* and β -lactamase-nonproducing ABPC-resistant *H. influenzae*. On intravenous injection of each drug at 20 mg/kg (ABPC and CTX; 40 mg/kg) twice a day for 3 days in mice infected with *H. influenzae*, MEPM/CS and CTX showed the best efficacy among test drugs. MEPM is thus a representative intravenous drug of potential use in fighting *H. influenzae* infection.