

【短 報】

セフェム耐性大腸菌に対する ceftoram pivoxil の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性

荒木 春美・西田 亨子・大懸 直子・南 新三郎

富山化学工業株式会社総合研究所*

(平成13年11月1日受付・平成13年11月28日受理)

臨床分離セフェム耐性 (ceftoram (CCL) MIC 12.5 µg/mL) *Escherichia coli* に対する ceftoram pivoxil (CFTM-PI) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を他の経口抗菌薬と比較した。セフェム耐性 *E. coli* 37 株に対する ceftoram (CFTM; CFTM-PI の活性体) の MIC₉₀ は 3.13 µg/mL で, cefditoren (CDTR; 6.25 µg/mL), cefpodoxime (CPDX; 25 µg/mL), cefdinir (CFDN; 25 µg/mL), cefixime (CFIX; 50 µg/mL), amoxicillin (AMPC; > 100 µg/mL), CCL (> 100 µg/mL) より小さくニューキノロン薬の norfloxacin (NFLX; 3.13 µg/mL) と同程度であった。セフェム感受性 *E. coli* 25 株に対する各薬剤の MIC₉₀ は, CDTR (0.2 µg/mL) < CFIX (0.39 µg/mL) < CFTM (0.78 µg/mL) < CPDX (3.13 µg/mL), CFDN (3.13 µg/mL), CCL (3.13 µg/mL), AMPC (3.13 µg/mL) の順であり, セフェム耐性株と感受性株の MIC₉₀ の差は CFTM においてもっとも小さかった。セフェム耐性 *E. coli* 37 株はいずれも CCL 分解活性を有していたが, CCL 以外のセフェム薬に対する分解活性は検出されなかった。また, セフェム耐性 *E. coli* TK-776 株によるマウス尿路感染モデルに対する CFTM-PI の治療効果は, その MIC をほぼ反映して cefditoren pivoxil, CFDN, CCL, CFIX よりも強かった。

Key words: ceftoram pivoxil, セフェム耐性, *Escherichia coli*, 抗菌活性, lactamase

Escherichia coli は尿路感染症をはじめとする各種感染症の重要な起炎菌である¹⁾。近年, cefaclor (CCL) を含むセフェム薬やニューキノロン薬に耐性を示す *E. coli* の増加が報告されている^{2,3)}。

Ceftoram pivoxil (CFTM-PI) はオキシミノタイプの経口セフェム薬で, 活性体である ceftoram (CFTM) を pivaloyloxymethyl ester 化したプロドラッグである⁴⁾。本剤は, *E. coli* に対して良好な活性を示すが, セフェム耐性 *E. coli* に対する抗菌活性を検討した報告が少ない^{4,5)}。今回, 臨床分離 *E. coli* におけるセフェム耐性株の検索で得られたセフェム耐性 (CCL; MIC 12.5 µg/mL) 37 株を用い, CFTM-PI の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を他の経口抗菌薬と比較したので報告する。

セフェム耐性 *E. coli* として, 1993 年以降に各種臨床材料より分離された *E. coli* のうち CCL の MIC が 12.5 µg/mL 以上の 37 株を用いた。対照にセフェム感受性 *E. coli* 25 株を用いた。なお, セフェム耐性を, 米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の MIC ブレイクポイントにもとづき^{6,7)}, CCL の MIC が 12.5 µg/mL 以上とした。

市販品の CCL (Sigma), amoxicillin (AMPC, Sigma) および norfloxacin (NFLX, Sigma) を使用した。また市販品から当研究所にて抽出した cefdinir (CFDN, 藤沢薬品), cefixime (CFIX, 藤沢薬品), cefpodoxime

proxetil (CPDX-PR), cefditoren pivoxil (CDTR-PI) を用いた。CFTM, CFTM-PI, cefpodoxime (CPDX), cefditoren (CDTR) は当研究所合成品を使用した。なお, プロドラッグ型の経口セフェム薬の *in vitro* 試験にはそれぞれ活性体を用いた。日本化学療法学会標準法⁸⁾に準じ, 寒天平板希釈法にて 10⁶CFU/mL 接種時の MIC を測定した。既報⁹⁾にしたがって -lactamase 粗酵素液を調製し, 各薬剤 (100 µM) に対する分解活性を UV 法⁹⁾にて測定した。30 °C, 0.05 M PB (pH 7.0) 中で 1 時間に 1 µmol の基質を加水分解する酵素活性を 1 unit とした。また, 牛血清アルブミンを標準蛋白とする Lowry 法¹⁰⁾により粗酵素液中の蛋白濃度を測定し, -lactamase 活性を比活性 (unit/mg of protein) で表した。既報¹¹⁾にしたがって, 37 株中 11 株の粗酵素液を用いて, 等電点電気泳動を行った。

セフェム耐性 *E. coli* TK-776 (慢性尿路感染症患者由来株) によるマウス尿路感染モデルを既報⁴⁾にしたがって作成した。感染 2 時間後から 0.5% methyl cellulose (MC) に懸濁した各薬剤 1 mg/mouse を 1 日 2 回 4 日間経口投与した。薬剤最終投与の 24 時間後に放血させたマウスの両方の腎臓を無菌的に摘出し, 4 mL の滅菌生理食塩水を加えてホモジネート後, 腎内生菌数を測定した。治療効果の統計学的解析を Tukey の多重比較で行った。

Table 1 にセフェム耐性 *E. coli* 37 株およびセフェム

*富山県富山市下奥井 2-4-1

感受性 *E. coli* 25 株に対する CFTM と対照薬剤の MIC 分布, MIC₅₀ および MIC₉₀ を示す。

セフェム耐性株に対する CFTM の MIC 分布 (Table 1: A) は 0.2 ~ 6.25 µg/mL で, セフェム感受性株 (Table 1: B) より 2 管程度高い MIC 域に分布したが, 分布の広さ (6 管) は感受性株と同程度であった。セフェム耐性株に対する CDTR の MIC 分布 (0.39 ~ 6.25 µg/mL) の広さは CFTM と同様感受性株と同程度であったが, 他のオキシミノセフェム薬の MIC 分布域 (CPDX; 0.2 ~ 50 µg/mL, CFDN; 0.39 ~ 50 µg/mL, CFIX; 0.2 ~ 100 µg/mL) は感受性株よりも広がった。CCL および AMPC の MIC はそれぞれ 12.5 ~ > 100 µg/mL, 100 µg/mL で他剤より高値に分布した。NFLX の MIC は 0.0125 ~ 50 µg/mL で広範囲に分布し, 耐性株もみられた。

セフェム耐性株に対する CFTM の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 1.56 µg/mL および 3.13 µg/mL であり, 他の β -ラクタム薬に比べ低値であった。一方, セフェム感受性株に対する CFTM の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 0.2 および 0.78 µg/mL であり, CDTR, CPDX, CFDN, CFIX と同程度であった。CCL および AMPC の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 1.56 µg/mL および 6.25 µg/mL, 6.25 µg/mL および > 100 µg/mL であり,

両剤の抗菌力は他剤に比べ劣った。NFLX の MIC₅₀ および MIC₉₀ は 0.05 および 6.25 µg/mL で他剤に比べ MIC₅₀ と MIC₉₀ の差が大きかった。

セフェム耐性株に対する CFTM の MIC₅₀ および MIC₉₀ はセフェム感受性株より 4 および 8 倍高い値であったが, 他の経口 β -ラクタム薬 (16 ~ 128 倍の開き) に比べ感受性株と耐性株の間での開きは小さかった。

セフェム耐性 *E. coli* 37 株から β -lactamase 粗酵素液を調製し, 各種セフェム薬に対する加水分解活性を UV 法にて測定した。いずれの粗酵素液にも, CCL に対する加水分解活性が認められたが, CFTM, CFIX, CPDX, CFDN, CDTR に対する加水分解活性は検出されなかった (< 0.01 unit/mg of protein)。CCL に対する加水分解活性は 0.026 ~ 1.14 unit/mg of protein であり, 平均活性は 0.27 unit/mg of protein であった。CCL 分解活性の強い菌株は, いずれの薬剤に対しても大きな MIC を示す傾向が見られた。

CCL 耐性株 37 株中 11 株の粗酵素液を用いて, β -lactamase の等電点を調べた。11 株中 5 株では, pI = 約 9.8 に泳動される 1 種類の酵素が, 6 株では pI = 約 5.4 に泳動される 1 種類の酵素が検出された。pI = 約 9.8 の酵素は染色体性の cephalosporinase タイプと考えられ, PCG と CER を同程度に分解し, CCL の分解活性

Table 1. Antibacterial activity of ceftoram against cephem-resistant and susceptible *Escherichia coli*

Drug		MICs (µg/mL)															MIC ₅₀	MIC ₉₀	
		0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100			(µg/mL)
CCL	A												2	3	7	5	20	>100	>100
	B						1	9	9	3	3							1.56	6.25
CFTM	A					2	2	11	12	8	2							1.56	3.13
	B		1		4	10	6	3	1									0.2	0.78
CDTR	A						4	2	8	17	6							3.13	6.25
	B			1	1	21	2											0.2	0.2
CPDX	A						1	2	2	2	6	13	8	3				12.5	25
	B				1	8	11	3	2									0.39	0.78
CFDN	A						2	1	3	6	8	12	4	1				6.25	25
	B				2	12	7	2	2									0.2	0.78
CFIX	A					1	1	2	2	1	2	11	9	7	1			12.5	50
	B	1			5	11	7	1										0.2	0.39
AMPC	A														5	32		>100	>100
	B							1	1	8	6	1					8	6.25	>100
NFLX	A	1	6	5	15	2	2	2		1						3		0.1	3.13
	B		2	11	7		1	1				2				1		0.05	6.25

A: cephem-resistant *E. coli* clinically isolated (37 strains)

B: cephem susceptible *E. coli* clinically isolated (25 strains)

CCL: cefaclor, CFTM: ceftoram, CDTR: cefditoren, CPDX: cefpodoxime, CFDN: cefdinir, CFIX: cefixime, AMPC: amoxicillin, NFLX: norfloxacin

Table 2 . Therapeutic effect of ceftoram pivoxil against mouse urinary tract infection caused by cephem-resistant *Escherichia coli* TK-776

Drug	CFU/kidney	Range of CFU/kidney	Rate of organism-negative	MIC (µg/mL) for pathogen
Ceftoram-pivoxil	2.41 ± 1.17 ^{ab)}	<1.6 ~ 4.38	4/8	0.78
Cefaclor	7.62 ± 0.43	7.02 ~ 8.29	0/7	100
Cefixime	5.81 ± 1.35 ^{c)}	2.20 ~ 6.75	0/7	50
Cefdinir	2.50 ± 0.91 ^{ab)}	<1.6 ~ 6.29	2/8	6.25
Cefditoren-pivoxil	3.58 ± 1.18 ^{ab)}	<1.6 ~ 4.20	1/7	3.13
Control	7.54 ± 0.35	7.10 ~ 8.12	0/8	

CFU/Kidney is expressed as Log₁₀.

Challenge dose: 9.0 × 10⁴ CFU/mouse. Mice: ICR female 18–22 g.

Therapy: 1 mg/mouse PO administration twice a day for 4 days.

^{a)}p < 0.01 vs control, ^{b)}p < 0.01 vs CFIX, ^{c)}p < 0.05 vs control.

が高い酵素であった。pI = 約 5.4 の酵素は TEM タイプの penicillinase と考えられ、PCG を CER の約 5 倍速く分解し、CCL に対する分解活性も示した。37 株から得られた粗酵素液の CER、PCG および CCL に対する分解プロファイルはおおよそ上記の 2 つのパターンに分類できた。

セフェム耐性 *E. coli* TK-776 で惹起したマウス尿路感染モデルに対する経口セフェム薬 5 剤の 1 mg/mouse 1 日 2 回 4 日間投与後の治療効果を Table 2 に示す。感染 5 日後の腎内生菌数は、control 群（無治療群）では平均 7.54 (Log CFU/kidney) であった。CCL 投与群の腎内生菌数は 7.62 (Log CFU/kidney) であり、control 群に比較して有意な生菌数の減少は認められなかった。一方、CFTM-PI、CDTR-PI、CFDN、CFIX 投与群では control 群に比較して有意に生菌数が減少した。また、CFTM-PI 投与群の腎内生菌数は CFIX 投与群に比べ有意に少なかった (p < 0.01)。

今回検討したセフェム耐性 *E. coli* は調べたいずれのオキシミノセファロスポリンに対しても低感受性化していたが、セフェム耐性株にはこれらの薬剤に対する加水分解活性は検出されなかった。いずれの株からも CCL 分解活性が検出され、CCL 分解活性が高い株では各薬剤の MIC 値が大きい傾向が見られた。井上¹²⁾の報告によれば、*E. coli* の産生する cephalosporinase や penicillinase に対して CFTM は CCL や CFIX よりも安定である。CFTM では、セフェム耐性株での MIC 上昇が他の薬剤より小さかったことから、オキシミノセファロスポリン低感受性化に β -lactamase が関与している可能性が示唆された。なお、一部の菌株から得た粗酵素液の等電点電気泳動では、pI = 約 5.4 の penicillinase タイプおよび pI = 約 9.8 の cephalosporinase タイプの酵素が確認された。pI = 約 5.4 の酵素は典型的な TEM タイプ penicillinase よりも CCL を強く分解した。したがって、今回検討した菌株には、いわゆる Extended spectrum β -lactamase に類する酵素を産生する菌株が含まれている可能性が考えられた。

今回検討した第三世代セフェム系経口薬のセフェム耐

性株に対する抗菌活性は感受性株より劣ったが、いずれの薬剤の MIC₅₀ も 12.5 µg/mL 以下であった。この濃度は、各薬剤の臨床用量における尿中濃度よりも低値であり¹³⁻¹⁷⁾、セフェム耐性 *E. coli* による尿路感染症に対しては依然効果は期待できると考えられた。しかし、CFTM-PI および CDTR-PI を除く薬剤では、MIC が 50 µg/mL 以上の耐性株が少なからず認められたことから、これらの薬剤を尿路感染症に用いる際には、耐性菌の存在を念頭におく必要がある。また、セフェム耐性株中に ノルフロキサシン耐性株が存在したことを考え合わせると、成人に比べ選択薬の限られる小児尿路感染症では、治療薬選択において感受性結果への配慮がより一層望まれる。

以上、CFTM-PI は *in vitro* および *in vivo* においてセフェム耐性大腸菌に対し良好な抗菌活性を示し、セフェム耐性菌を含む *E. coli* による尿路感染症に対して、開発時と同様の有用性が期待できるものと考えられた。

文 献

- 岡野 学, 兼松 稔, 川田幸道: 泌尿器科領域感染症。化学療法の領域 6: 465 ~ 473, 1990
- 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 他: 新鮮臨床分離株に対する New Quinolones の抗菌活性。Jpn J Antibiotics 47: 1379 ~ 1399, 1994
- Yagi T, Kurokawa H, Senda K, et al.: Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1 like β -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 41: 2606 ~ 2611, 1997
- 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 他: 新しいエステル型経口セフェム剤 T-2588 の抗菌作用について。Chemotherapy 34 (S-2): 66 ~ 91, 1986
- 山口恵三, 大野 章, 高橋俊司, 他: Ceftoram および他 β -ラクタム薬の新鮮臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌活性。Jpn J Antibiotics 51: 11 ~ 25, 1998
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved Standards M 7-A 2, NCCLS, Villanova, 1990
- 辻 明良, 山口恵三, 五島瑳智子: 感受性検査についての調査研究 薬剤感受性検査の標準化と今後の問題点。化学療法の領域 8: 1724 ~ 1730, 1992
- 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
- 9) Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of a cephalosporinase from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 18: 77~80, 1980
- 10) Waley S G: A spectrophotometric assay of lactamase action on penicillins. Biochem J 139: 780~781, 1974
- 11) 南新三郎, 赤間美德, 伊予部志津子, 他: 同一病棟より継続的に分離されたプラスミド性 Class B lactamase 産生緑膿菌に関する研究。日化療会誌 44: 199~212, 1996
- 12) 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) 1~11, 1993
- 13) 島田 馨, 松本 隆, 小宮 泉 他: 新経口セフェム剤, ME 1207 の臨床第 相試験。Chemotherapy 40 (S-2) 105~119, 1992
- 14) 小林真一, 小口勝司, 内田英二, 他: 新しい経口用セファロsporin系抗生剤 CS 807 の臨床第 相試験。Chemotherapy 36 (S-1) 200~213, 1988
- 15) 島田 馨, 穴戸 亮, 角尾道夫: Cefdinir の第 相臨床試験。Chemotherapy 37 (S-2) 208~245, 1989
- 16) 斎藤 玲: Cefixime (CFIX) の体内動態に関する検討。Chemotherapy 33 (S-6) 190~203, 1985
- 17) 中村はるひ, 岩井直一: 小児期における経口抗生物質についての薬動学的検討 (第 2 報) 小児期における Cefteram pivoxil についての薬動学的検討。Jpn J Antibiotics 42: 1981~2003, 1989

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of cefteteram pivoxil against cephem-resistant *Escherichia coli*

Harumi Araki, Nagako Nishida, Naoko Ogake and Shinzaburo Minami

Research Laboratories, Toyama Chemical Co. Ltd, 2-4-1 Shiomokui, Toyama 930-8508, Japan

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of cefteteram pivoxil was studied using 37 clinical isolates of cephem-resistant *Escherichia coli* (cefaclor; MIC > 12.5 µg/mL) and compared to those of other oral antibacterial agents. MIC₉₀ of cefteteram (the active form of cefteteram pivoxil) against cephem-resistant *E. coli* (37 strains) was 3.13 µg/mL and less than those of cefditoren (6.25 µg/mL), cefpodoxime (25 µg/mL), cefdinir (25 µg/mL), cefixime (50 µg/mL), amoxicillin (> 100 µg/mL), and cefaclor (> 100 µg/mL) and comparable to that of norfloxacin (3.13 µg/mL). MIC_{90S} of tested drugs against 25 strains of cephem-susceptible *E. coli* were as follows: cefditoren (0.2 µg/mL), cefixime (0.39 µg/mL), cefteteram (0.78 µg/mL), cefpodoxime (3.13 µg/mL), cefdinir (3.13 µg/mL), cefaclor (3.13 µg/mL), and amoxicillin (3.13 µg/mL). The difference between MIC_{90S} against cephem-resistant and susceptible *E. coli* was lowest for cefteteram. No cephem-resistant strains showed hydrolytic activity against the cepheims tested except for cefaclor. The therapeutic effect of cefteteram pivoxil against an experimental mouse urinary tract infection caused by cephem-resistant *E. coli* TK-776 was superior to that of cefdinir, cefditoren, cefixime, and cefaclor, reflecting its *in vitro* activity.