

【原著・基礎】

ラット pouch 内混合感染モデルにおける注射用抗菌薬の殺菌効果

荒木 春美・大懸 直子・高畑 正裕・南 新三郎

富山化学工業株式会社総合研究所*

(平成 14 年 2 月 8 日受付・平成 14 年 3 月 19 日受理)

Enterobacter cloacae (誘導型 β -lactamase 産生菌) と *Escherichia coli* (ニューキノロン系薬および β -ラクタム系薬感受性菌) のラット pouch 内混合感染モデルを用いて *E. coli* に対する pazufloxacin (PZFX) 注射薬, ceftazidime (CAZ) および imipenem/cilastatin (IPM/CS) の殺菌効果を調べ、以下の結果を得た。

1) *E. coli* と *E. cloacae* 混合感染群における IPM/CS (5 mg/kg 静脈内投与) の殺菌効果および pouch 内薬剤濃度は、*E. coli* 単独感染群に比べて低下し、誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響がみられた。混合感染群における CAZ の pouch 内濃度の低下はわずかであったが殺菌効果は低下し、IPM より弱いながら誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響がみられた。一方、PZFX 注射薬では、混合感染群でも殺菌効果および pouch 内濃度は低下せず、 β -lactamase 産生菌共存の影響を受けなかった。

2) β -Lactamase 誘導能の高い cefmetazole (CMZ) を前投与 (100 mg/kg 筋肉内投与) して pouch 内 β -lactamase 活性を上昇させた混合感染モデルでは、*E. coli* に対する CAZ (5 mg/kg 静脈内投与) の殺菌効果および pouch 内薬剤濃度は、*E. coli* 単独感染群および CMZ 非前投与群に比べて低下し、pouch 内 β -lactamase 活性上昇の影響が認められた。CMZ 前投与群における IPM/CS の殺菌効果および pouch 内薬剤濃度は、*E. coli* 単独感染群より低下したが、CMZ 非前投与群と同様で、 β -lactamase 活性上昇の影響は認められなかった。一方、PZFX 注射薬では、混合感染群でも殺菌効果および pouch 内濃度は低下せず、 β -lactamase 活性上昇の影響は認められなかった。なお、CMZ のかわりに PIPC を前投与した場合は、pouch 内 β -lactamase 活性は上昇せず、CAZ の殺菌効果も変化しなかった。

Key words: pazufloxacin, β -lactamase, 混合感染, 注射用抗菌薬, ニューキノロン

本邦では、注射用抗菌薬として β -ラクタム系薬が汎用されている。しかし近年、 β -ラクタム系薬では β -lactamase を産生する耐性菌の出現や増加が問題となっている¹⁻³⁾。 β -lactamase は多種の病原細菌により産生され、*Enterobacter cloacae* などの各種グラム陰性菌では、 β -lactamase 産生が β -ラクタム系薬によって誘導される^{4,5)}。また、産生された β -lactamase は、感染巣内に長期にわたって残存する可能性があり^{6,7)}、 β -lactamase に対して安定とされる β -ラクタム系薬も感染巣内で不活化されることが示されている⁸⁻¹⁰⁾。さらに、感染巣内に複数の菌が存在する場合には、 β -lactamase 産生菌が indirect pathogen となり、 β -ラクタム系薬の治療効果を低下させる可能性も報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。

最近新しい系統の注射薬としてニューキノロン系抗菌薬の注射薬が本邦でも開発・臨床導入されている^{15,16)}。ニューキノロン系抗菌薬は、 β -lactamase による影響を受けず、 β -lactamase 産生菌を含む複数菌存在下や感染巣内に β -lactamase が残存する場合には、 β -ラクタム系薬よりも優れた有効性を発揮すると期待される。

そこで、今回、抗菌薬の治療効果におよぼす感染巣内に共存する誘導型 β -lactamase 産生菌の影響および β -ラクタム

系薬前投与の影響 (誘導された β -lactamase 残存の影響) を検討する目的で、誘導型 β -lactamase 産生 *E. cloacae* とニューキノロン系薬および β -ラクタム系薬感受性の *Escherichia coli* との混合感染モデルを用いて、注射用ニューキノロン系抗菌薬の pazufloxacin (PZFX) 注射薬、注射用 β -ラクタム系薬の ceftazidime (CAZ) および imipenem/cilastatin (IPM/CS) の *E. coli* に対する殺菌効果を比較検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

富山化学工業総合研究所で合成した PZFX 注射薬 (PZFX のメタン sulfon 酸塩; PZFX mesilate) および PZFX, ならびに市販品の CAZ (日本グラクソ) および IPM/CS (萬有製薬), cefmetazole (CMZ, 三共) および piperacillin (PIPC, 富山化学工業) を用いた。また、ampicillin (ABPC, 旭化成) を *E. cloacae* 選択用に、rifampicin (RFP, 第一製薬) を *E. coli* 選択用にそれぞれ用いた。

2. 使用菌株

RFP 耐性 (MIC > 400 μ g/mL) の *E. coli* TK-16 R¹⁷⁾

*富山県富山市下奥井 2-4-1

Table 1. Susceptibility of *Escherichia coli* TK-16R and *Enterobacter cloacae* H-27 to antimicrobial agents

Agent	MICs ($\mu\text{g/mL}$; 10^6cfu/mL)	
	<i>E. coli</i> TK-16R	<i>E. cloacae</i> H-27
Pazufloxacin	0.025	0.0125
Ceftazidime	0.1	1.56
Imipenem/cilastatin	0.1	0.78
Cefmetazole	0.39	12.5
Piperacillin	0.1	12.5
Ampicillin	1.56	>400
Rifampicin	>400	25

MICs were determined by agar plate dilution.

および β -lactamase を誘導的に産生する *E. cloacae* H-27¹⁸⁾ を用いた。両株の抗菌薬感受性は Table 1 に示した通りである。

3. MIC 測定法

日本化学療法学会標準法¹⁹⁾ に準じ、寒天平板希釈法により MIC を測定した。前培養培地には Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) を、感受性測定用培地には Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) を用いた。なお、37°C で一夜培養した菌液を滅菌生理食塩液で 500 倍希釈したものを 10^6cfu/mL の菌液とし、それぞれ約 $5\mu\text{L/spot}$ をマイクロプランター (佐久間製作所) にて MHA 平板上に接種し、37°C で一夜培養後に MIC を判定した。

4. 使用動物および浸出性無菌炎症 pouch の作製

Wistar 系雄性ラット (日本エスエルシー, 体重約 130 g) を購入し、2 日間馴化した (設定温度: $22\pm 2^\circ\text{C}$, 設定湿度: $60\pm 10\%$)。馴化後, Selye²⁰⁾ の方法に準じ、浸出性無菌炎症 pouch を作製した。すなわち, ラットの背部皮下に 25 mL の空気を注入後, 1% のクロトン油 (ナカライテスク) を含有する綿実油 (ナカライテスク) 1 mL を注入し, 翌日空気を抜いて無菌的に浸出性炎症を惹起させた。

5. Pouch 内感染実験

E. cloacae H-27 を Heart infusion agar (HIA, 栄研化学) 平板で 37°C, 18~20 時間培養後, 滅菌生理食塩液に懸濁し, その菌懸濁液 1 容を 20% gastric mucin (ナカライテスク) 9 容に加えて約 10^6cfu/mL の菌液を調製した。この 2 mL をラット pouch 内 (pouch 作製 13~14 日後) に接種し (0 h), 2 および 8 時間後に 100 mg/kg の CMZ (CMZ 前投与群) あるいは PIPC (PIPC 前投与群) をそれぞれ筋肉内投与した。なお *E. cloacae* H-27 感染後に CMZ あるいは PIPC を前投与しないものを薬剤非前投与群とした。また, CMZ を β -lactamase 誘導剤として, PIPC を β -lactamase を誘導しない薬剤としてそれぞれ用いた。

E. cloacae H-27 の感染から 48 時間後に, *E. coli* TK-16R の菌液 (約 10^6cfu/mL) 1 mL を薬剤非前投与群, PIPC 前投与群および CMZ 前投与群の各 pouch 内に接種した。なお, *E. cloacae* H-27 を前感染させなかった

ラット (pouch 作製から 15~16 日目) にも同様に *E. coli* TK-16R を感染させ, *E. coli* TK-16R 単独感染群を作製した。

E. coli TK-16R の感染から 2 時間後 (*E. cloacae* H-27 前感染から 50 時間後) に生理食塩液に溶解した PZFX 注射薬, CAZ または IPM/CS のそれぞれ 5 mg/kg を静脈内投与し, 経時的に pouch 内浸出液を採取した。*E. coli* TK-16R の感染後に PZFX 注射薬, CAZ または IPM/CS を投与しないものを control 群とした。実験スケジュールを Fig. 1 に示す。

6. Pouch 内生菌数測定法

採取した pouch 内浸出液の 10 倍希釈系列を滅菌生理食塩液で作製した。その各 0.05 mL を薬剤含有および非含有 HIA 平板に塗布し, 一夜培養後に生じたコロニー数から pouch 内生菌数を算出した。なお薬剤含有平板として, *E. coli* TK-16R の分離用に RFP ($200\mu\text{g/mL}$) を含む HIA 平板を, *E. cloacae* H-27 の分離には ABPC ($50\mu\text{g/mL}$) を含む HIA 平板を用いた。また, 薬剤非含有 HIA 平板により全生菌数を測定した。

7. β -Lactamase 活性測定法

採取した pouch 内浸出液中の菌を Ultrasonic processor (VP-5, タイテック) によりそれぞれ氷冷下で超音波破碎した。この破碎液を遠心分離 ($10,000\times g$, 20 分, 4°C) し, cephaloridine (CER, 塩野義製薬) $100\mu\text{mol/L}$ を基質として上清中の β -lactamase 活性を UV 法²¹⁾ にて測定した。37°C, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 中で 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の基質を加水分解するのに必要な酵素量を 1 U と定義した。

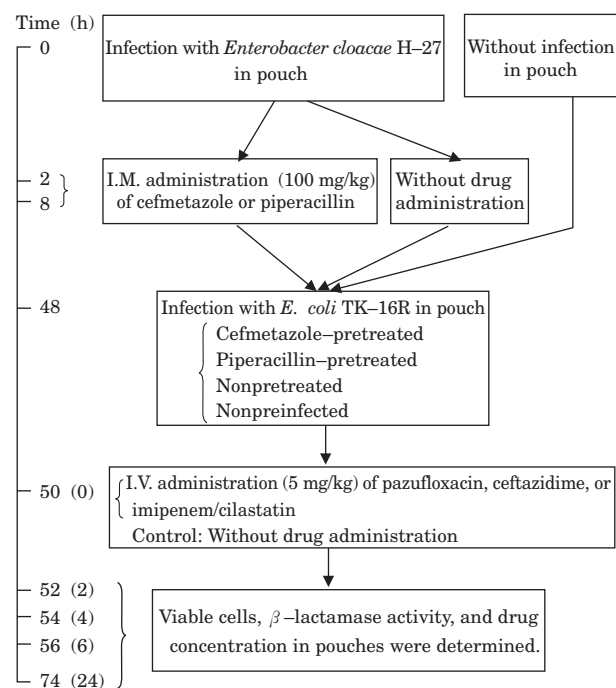


Fig. 1. Experimental schedule.

8. 薬剤濃度測定法

Pouch 内浸出液中の β -lactamase を失活させるために、濃度測定用のサンプルを採取後、ただちに同量の冷メタノール（和光純薬工業）を加えて混合し水冷した。これを遠心分離（1,000×g, 10分, 4℃）し、得られた上清をペーパーディスク（東洋濾紙, thick, 径8mm）に染み込ませて bioassay 法により pouch 内浸出液上清中の被験薬濃度を測定した。

検量線作製の標準液の作製には pouch 内浸出液を用い、適当な濃度からの2倍希釈系列を作製した。これに同量の冷メタノールを加えて混合後、遠心分離（1,000×g, 10分, 4℃）して得られた上清を、サンプルと同様に bioassay に供した。

濃度測定用の検定菌として、PZFX には *E. coli* Kp を、CAZ には *Proteus mirabilis* ATCC 21100 を、IPM/CS には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 をそれぞれ使用した。また濃度測定用の培地として、*E. coli* Kp には HIA を、その他の検定菌には下記のように調製したものを用いた。

P. mirabilis ATCC 21100 用: ポリペプトン（日本製薬, 微生物培養基用）5g, 肉エキス（Difco, Bacto）1.5g, 酵母エキス（Difco, Bacto）1.5g, 塩化ナトリウム（和光純薬工業）3.5g, グルコース（和光純薬工業）1g, リン酸二カリウム（和光純薬工業）3.68g, リン酸一カリウム（和光純薬工業）1.32g, 寒天（栄研化学, 細菌用）15g, 水 1L。

B. subtilis ATCC 6633 用: ポリペプトン（日本製薬, 微生物培養基用）5g, 肉エキス（Difco, Bacto）3g, 寒天（栄研化学, 細菌用）15g, 水 1L。

II. 結果

1. Pouch 内生菌数の変化

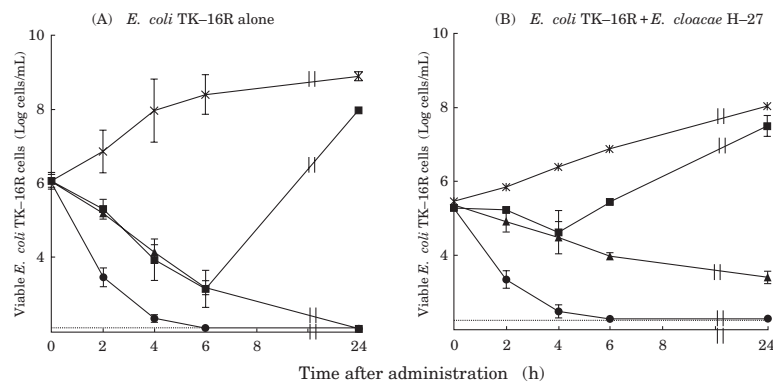
E. coli TK-16 R 単独感染群に、PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS を静脈内投与した時の pouch 内生菌数変化を Fig. 2 A に示す。3 剤共に投与 6 時間後まで殺菌

的に作用し、PZFX 注射薬投与群でもっとも速やかに pouch 内生菌数が減少した。PZFX 注射薬および CAZ では投与 24 時間後まで再増殖はみられず、pouch 内生菌数は検出限界以下となったが、IPM/CS 投与群では投与 24 時間後に再増殖が認められた。

E. coli TK-16 R の感染 48 時間前に *E. cloacae* H-27 を感染させ、上記と同様に PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS を静脈内投与した時の *E. coli* TK-16 R の pouch 内生菌数変化を Fig. 2 B に示す。混合感染群における IPM/CS 投与後の pouch 内生菌数は、*E. coli* TK-16 R 単独感染群より早く投与 6 時間後に再増殖し、殺菌効果の減弱が認められた。CAZ 投与群では *E. coli* TK-16 R 単独感染群より pouch 内生菌数の減少が抑制され、24 時間後でも約 10^3 cfu/mL の生菌数が pouch 内に認められた。一方、PZFX 注射薬は *E. coli* TK-16 R 単独感染群の場合と同様に殺菌的に作用し、24 時間後まで再増殖はみられなかった。

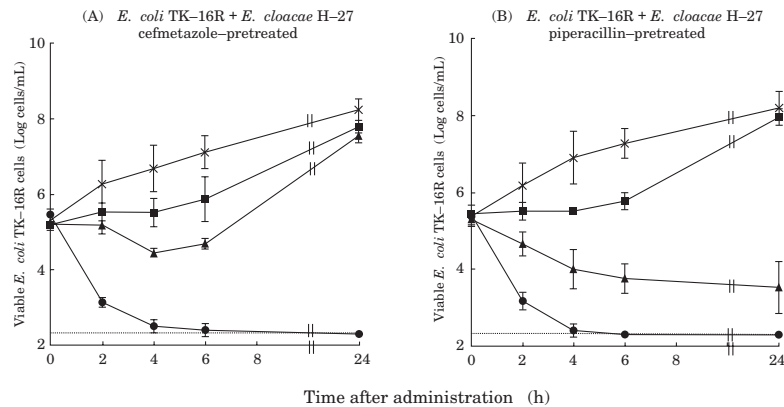
ラット pouch 内に *E. cloacae* H-27 を感染後、2 および 8 時間に CMZ または PIPC を筋肉内投与し、上記同様に *E. coli* TK-16 R を二次感染させ、PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS を静脈内投与した。その時の *E. coli* TK-16 R の pouch 内生菌数変化を Fig. 3 に示す。

CMZ 前投与群 (Fig. 3 A) における CAZ の殺菌効果は *E. coli* TK-16 R 単独感染群 (Fig. 2 A) ならびに CMZ および PIPC 非前投与混合感染群 (Fig. 2 B, 以下薬剤非前投与群) より明らかに低下し、投与 6 時間後に再増殖が認められた。IPM/CS では、CMZ 前投与群において明らかな pouch 内生菌数の減少は認められず、薬剤非前投与群 (Fig. 2 B) と同様に、*E. coli* TK-16 R 単独感染群 (Fig. 2 A) に比べて殺菌効果が減弱した。PZFX 注射薬は CMZ 前投与群 (Fig. 3 A) おいても投与 24 時間後まで殺菌的に作用し、*E. coli* TK-16 R 単独感染群 (Fig. 2 A) および薬剤非前投与群 (Fig. 2 B)



5 mg/kg of pazufloxacin mesilate (●), ceftazidime (▲), and imipenem/cilastatin (■) were administered intravenously to rats with pouches infected with *E. coli* TK-16R alone or *E. coli* TK-16R + *E. cloacae* H-27. Controls (×) did not undergo drug administration.

Fig. 2. Bactericidal activity of antimicrobial agents against *Escherichia coli* TK-16 R in rat pouches with and without preinfection of *Enterobacter cloacae* H-27.



5 mg/kg of pazufloracin mesilate (●), ceftazidime (▲), and imipenem/cilastatin (■) were administered intravenously to rats pretreated with cefmetazole or piperacillin and having pouches infected with *E. coli* TK-16R alone or *E. coli* TK-16R + *E. cloacae* H-27. Controls (×) did not undergo cefmetazole or piperacillin administration.

Fig. 3. Bactericidal activity of antimicrobial agents against *Escherichia coli* TK-16 R in rat pouches with preinfection of *Enterobacter cloacae* H-27 and pretreatment with cefmetazole or piperacillin.

と同様な殺菌効果を示した。PIPC 前投与の影響はいずれの薬剤投与群においても認められなかった (Fig. 3 B)。

なお *E. cloacae* H-27 の pouch 内生菌数はいずれも $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL の高菌量であり, PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS 投与後にもほとんど変化しなかった。また, *E. cloacae* H-27 混合感染群 (Fig. 2 B) および CMZ 前投与群 (Fig. 3 A) あるいは PIPC (Fig. 3 B) では *E. coli* TK-16 R 単独感染群 (Fig. 2 A) に比べ, *E. coli* TK-16 R の pouch 内生菌数は感染直後に若干減少し, control 群の増殖は遅延する傾向がみられた。

2. Pouch 内 β -lactamase 活性

E. cloacae H-27 と *E. coli* TK-16 R 混合感染ラットにおいて, PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS 投与前および投与 24 時間後に pouch 内浸出液を採取し, その β -lactamase 活性を測定した (Table 2)。

薬剤非前投与群および PIPC 前投与群における PZFX 注射薬, CAZ および IPM/CS 投与前の pouch 内 β -lactamase 活性は, いずれも 0.02 U/mL 以下であったが, CMZ 前投与群における pouch 内 β -lactamase 活性は高く, 0.12~0.15 U/mL であった。

Table 2. β -Lactamase activity in rat pouches infected with *Enterobacter cloacae* H-27 and *Escherichia coli* TK-16R

Group	Agent ^{a)}	β -Lactamase activity (U/mL) ^{b)}	
		0 h	24 h
Nonpretreated	control	<0.02	<0.02
	pazufloracin mesilate	<0.02	<0.02
	ceftazidime	<0.02	0.05 \pm 0.01
	imipenem/cilastatin	<0.02	0.13 \pm 0.06
Cefmetazole-pretreated	control	0.12 \pm 0.03 ^{c)}	0.14 \pm 0.06
	pazufloracin mesilate	0.12 \pm 0.06	0.09 \pm 0.05
	ceftazidime	0.15 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01
	imipenem/cilastatin	0.14 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02
Piperacillin-pretreated	control	<0.02	<0.02
	pazufloracin mesilate	<0.02	<0.02
	ceftazidime	<0.02	0.05 \pm 0.02
	imipenem/cilastatin	<0.02	0.13 \pm 0.07

^{a)}Rats were treated twice intramuscularly with 100 mg/kg of cefmetazole or piperacillin at 2 and 8 hours and infected with *E. coli* TK-16R at 48 hours *E. cloacae* H-27 postinfection. Pazufloracin, ceftazidime, and imipenem/cilastatin were administered at 2 hours *E. coli* TK-16R postinfection.

^{b)}Portions of pouch exudate were collected at 0 and 24 hours after agent administration to determine β -lactamase activity in rat pouches. β -Lactamase activity was determined by spectrophotometry using cephaloridine (100 μ mol/L) as a substrate.

^{c)}Mean \pm SD (n = 3-4)

Table 3. Levels of antibacterial agents in exudates of rat pouches infected with *Escherichia coli* TK-16R, preinfected with or without *Enterobacter cloacae* H-27, and pretreated with piperacillin and cefmetazole

Group	Agent ^{a)}	Levels ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of antibacterial agents at the following times (h) after administration			
		2 h	4 h	6 h	24 h
<i>E. coli</i> TK-16R alone	pazufloxacin mesilate	0.12 \pm 0.01 ^{b)}	0.16 \pm 0.04	0.09 \pm 0.01	<0.1
	ceftazidime	0.46 \pm 0.06	0.32 \pm 0.05	0.27 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01
	imipenem/cilastatin	0.55 \pm 0.08	0.31 \pm 0.09	<0.2	<0.2
Nonpretreated (<i>E. coli</i> TK-16R + <i>E. cloacae</i> H-27)	pazufloxacin mesilate	0.13 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02	<0.1
	ceftazidime	0.40 \pm 0.14	0.36 \pm 0.13	0.25 \pm 0.04	<0.05
	imipenem/cilastatin	0.30 \pm 0.04	<0.2	<0.2	<0.2
Cefmetazole-pretreated (<i>E. coli</i> TK-16R + <i>E. cloacae</i> H-27)	pazufloxacin mesilate	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	<0.1
	ceftazidime	0.21 \pm 0.07	0.05 \pm 0.01	<0.05	<0.05
	imipenem/cilastatin	0.20 \pm 0.02	<0.2	<0.2	<0.2
Piperacillin-pretreated (<i>E. coli</i> TK-16R + <i>E. cloacae</i> H-27)	pazufloxacin mesilate	0.12 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02	<0.1
	ceftazidime	0.41 \pm 0.09	0.30 \pm 0.09	0.22 \pm 0.04	<0.05
	imipenem/cilastatin	0.27 \pm 0.06	<0.2	<0.2	<0.2

^{a)}Rats were treated twice intramuscularly with 100 mg/kg of cefmetazole or piperacillin at 2 and 8 hours after infection with *E. cloacae* H-27 and were infected with *E. coli* TK-16R at 48 hours *E. cloacae* H-27 postinfection. Each agent was administered at 2 hours *E. coli* TK-16R postinfection.

^{b)}Mean \pm SD (n = 3-4)

CAZ および IPM/CS 投与後では、薬剤非前投与群および PIPC 前投与群における pouch 内 β -lactamase 活性が上昇し、上昇程度は IPM/CS 投与後の方が大きく、pouch 内 β -lactamase 活性は 0.13 U/mL であった。CMZ 前投与群における両剤投与後の pouch 内 β -lactamase 活性に変化はみられず、0.12~0.16 U/mL であった。一方、control 群および PZFX 注射薬投与 24 時間後では、いずれの前投与群でも pouch 内 β -lactamase 活性に変化はなかった。なお、*E. coli* TK-16 R 単独感染群の pouch 内 β -lactamase 活性は、すべて 0.02 U/mL 以下であった。

3. Pouch 内薬剤濃度

E. coli TK-16 R 単独感染群、薬剤非前投与群、CMZ 前投与群および PIPC 前投与群における PZFX 注射薬、CAZ、および IPM/CS の pouch 内濃度を Table 3 に示す。なお、前投与薬剤の CMZ および PIPC は pouch 内浸出液中に検出されなかった。

CMZ 前投与群における CAZ の pouch 内濃度は、2 時間で 0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 時間で 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり、*E. coli* TK-16 R 単独感染群、薬剤非前投与群および PIPC 前投与群における 2 時間値の 0.40~0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 時間値の 0.22~0.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より低かった。また、CAZ 与群の 24 時間値は、*E. coli* TK-16 R 単独感染群で 0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、いずれの混合感染群でも 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり、混合感染群で CAZ の pouch 内濃度が若干低下した。

E. coli TK-16 R 単独感染群における IPM/CS の pouch 内濃度は 2 時間後に他剤よりも高い 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示し、その後速やかに pouch 内から消失した。混合感染群における IPM/CS の 2 時間値はいずれも *E. coli*

TK-16 R 単独感染群 (0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりも低く、0.20~0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、単独感染群よりも速やかに pouch 内より消失した。

PZFX の pouch 内濃度は、*E. coli* TK-16 R 単独感染群、薬剤非前投与群、PIPC 前投与群および CMZ 前投与群のいずれにおいても近似しており、4 時間後に最高値 (0.14~0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示し、24 時間後では 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。

III. 考 察

誘導型 β -lactamase 産生菌の *E. cloacae* H-27 とニューキノロン系薬および β -ラクタム系薬感受性菌の *E. coli* TK-16 R との pouch 内混合感染モデルを作製し、PZFX 注射薬、CAZ および IPM/CS の *E. coli* TK-16 R に対する殺菌効果を調べ、抗菌薬の治療効果におよぼす感染巣内に共存する誘導型 β -lactamase 産生菌の影響および β -ラクタム系薬前投与により誘導された β -lactamase の影響を検討した。

PZFX 注射薬の殺菌効果および pouch 内濃度は、*E. cloacae* H-27 の共存および誘導 β -lactamase の影響を受けなかった。一方、CAZ および IPM/CS の pouch 内殺菌効果および pouch 内濃度は、*E. cloacae* H-27 の共存および誘導 β -lactamase の影響を受け、CAZ では誘導 β -lactamase の影響が、また、IPM/CS では *E. cloacae* H-27 の共存の影響がそれぞれ強く認められた。この CAZ と IPM/CS の違いは、両剤の β -lactamase 誘導能の違い²²⁾にもとづいていると考えられた。すなわち、両剤投与 24 時間後の pouch 内 β -lactamase 活性はいずれも上昇していたが、IPM/CS 投与群の方が CAZ 投与群より約 3 倍高く、IPM/CS の方が強く β -lactamase を誘導した。IPM/CS は *E. cloacae* に対し

て十分な β -lactamase 誘導活性を示し、 β -lactamase 誘導能の高い CMZ の前投与と同程度の β -lactamase が誘導され、*E. cloacae* の共存のみで殺菌効果および pouch 内薬剤濃度が低下し、CMZ 前投与による β -lactamase 活性の上昇が影響しなかったと考えられる。CAZ では、*E. cloacae* に対する β -lactamase 誘導が不十分であり、CMZ の前投与による β -lactamase 活性上昇が CAZ の殺菌効果および pouch 内濃度に影響したものと考えられた。

今回、pouch 内の β -lactamase 活性を上昇させるために CMZ を用い、前投与の対照群として、*E. cloacae* H-27 に CMZ と類似した抗菌活性を示すが β -lactamase をほとんど誘導しない PIPC⁴⁾ を用いた。CMZ 前投与では CAZ の抗菌活性および pouch 内濃度が低下したが、PIPC 前投与は、CAZ に影響を与えなかった。この結果は、誘導型 β -lactamase 産生菌が関与する感染に対して、PIPC のような β -lactamase 誘導能の低い抗菌薬を第一選択薬とすることも β -lactamase の影響を小さくする方策のひとつとなりうることを示していると考えられた。

β -Lactamase は細菌に対して直接的な耐性を付与し、 β -ラクタム系薬による化学療法に抵抗性をもたらす¹⁾。また、非病原性の β -lactamase 産生菌が病原菌とともに感染巣に存在することで、 β -ラクタム系薬の活性を低下させ、間接的に β -ラクタム系薬の化学療法に対する抵抗性をもたらすことも知られている¹¹⁻¹⁴⁾。さらに、われわれが報告したように、菌によって産生放出された β -lactamase が菌消失後も感染巣内に蓄積残存して、 β -ラクタム系薬の活性を低下させ、間接的に β -ラクタム系薬の化学療法に対する抵抗性をもたらす可能性もある⁸⁻¹⁰⁾。CAZ および IPM/CS は第一世代セフェム系薬やペニシリン系薬に比べて β -lactamase の影響を受け難い抗菌薬として開発され、上記のような場合でも有効性が期待される抗菌薬である^{23,24)}。しかし、*E. cloacae* の産生する β -lactamase がこれらの抗菌薬を不活化し、耐性化に関与していることが報告されている^{25,26)}。今回、 β -lactamase 産生菌が高菌量で共存した場合や多量の β -lactamase が感染巣内に存在する場合は、CAZ や IPM/CS のような抗菌薬でも β -lactamase の影響を受けることが示された。これは、直接的な耐性菌の出現に加えて、 β -ラクタム系薬による化学療法の限界の一面を示しているものと考えられる。

ニューキノロン系薬は β -ラクタム系薬と作用機構ならびに耐性機序が異なることから β -lactamase の影響を受けることはなく、 β -lactamase が直接あるいは間接に関与する感染症の化学療法において、 β -ラクタム系薬にかわる選択肢になりうる。今回の検討では、注射用ニューキノロン系薬の PZFX 注射薬は β -lactamase の影響を受けず、これが実証された。

以上、 β -lactamase に対する安定性が改善された第三世代セフェム系薬やカルバペネム系薬の治療効果が β -lactamase によって直接あるいは間接的に低下させられる可能性が示され、その対応としてニューキノロン系薬の選択が可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 井上松久: 医学微生物学の新しい展開 (加藤延夫 編), 第4章 薬剤耐性機構研究の新しい展望. p. 288~298, 薬根出版, 東京, 1993
- 2) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 他: 近年に検出した臨床分離株の β -ラクタマーゼ産生性. Jap. J. Antibiotics 48: 421~426, 1995
- 3) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211~1233, 1995
- 4) 南新三郎: *Enterobacter cloacae* における β -lactamase 誘導と β -ラクタム剤耐性. 北関東医学 36 (1): 59~70, 1986
- 5) Sanders C C, Sanders Jr. W E: Type I β -lactamase of gram negative bacteria: Interaction with β -lactam antibiotics. J. Infect. Dis. 154: 792~800, 1986
- 6) 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 他: *Enterobacter cloacae* の菌体外 β -lactamase とその安定性. Chemotherapy 36: 725~731, 1988
- 7) 荒木春美, 南新三郎, 保田 隆, 他: グラム陰性菌の産生する各種 β -lactamase のヒト体液中安定性. Chemotherapy 41: 1262~1267, 1993
- 8) Minami S, Araki H, Watanabe Y, et al.: Reduction of cephamycin concentrations at the infection site in mice with experimental peritoneal infection caused by cephalosporinase-producing bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 376~378, 1986
- 9) Araki H, Minami S, Watanabe Y, et al.: Significance of inducible cephalosporinase remaining in the experimentally infected rat granuloma pouch after β -lactam therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1131~1136, 1991
- 10) 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 他: β -lactam 剤の治療に及ぼす残存誘導型 β -lactamase の影響—ラット pouch 内二次感染モデルを用いた検討—. Chemotherapy 40: 183~190, 1992
- 11) Maddocks J L, May J R: "Indirect pathogenicity" of penicillinase-producing entero-bacteria in chronic bronchial infections. Lancet 1: 793~795, 1969
- 12) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 他: 下気道感染症における喀痰中の β -ラクタマーゼの検出とその動向に関する検討. Chemotherapy 42 (S-2): 126~134, 1994
- 13) 出口浩一, 豊永義清, 石原俊秀, 他: 小児細菌性上気道感染症における indirect pathogenicity の細菌学的検討. 日治療会誌 46: 139~147, 1998
- 14) 豊永義清, 石原俊秀, 出口浩一, 他: 小児細菌性上気道感染症における indirect pathogenicity の臨床的検討. 日治療会誌 46: 148~155, 1998
- 15) 高畑正裕, 山城芳子, 島倉雅子, 他: Pazufloxacin の細菌学的評価. 日治療会誌 43 (S-2): 72~89, 1995
- 16) 和田康平, 田仲真由美, 佐藤謙一: 注射用キノロン。

- 日本臨床 59: 790~794, 2001
- 17) 荒木春美, 大懸直子, 南新三郎, 他: 誘導型 β -lactamase 産生菌共存時における Cephem 系薬剤の大腸菌に対する殺菌効果について。Chemotherapy 41: 755~764, 1993
- 18) 南新三郎, 松原信之, 四辻 彰, 他: *Enterobacter cloacae* に対する β -lactam 剤の抗菌作用, 第一報 Cephem 系薬剤の抗菌活性と β -lactamase 誘導。Chemotherapy 31: 909~952, 1983
- 19) 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
- 20) Selye H: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82: 328~333, 1953
- 21) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139: 780~781, 1974
- 22) 茗原由紀, 藤巻一雄, 荒木春美, 他: 各種 β -lactam 薬の β -lactamase 誘導作用の比較—*Enterobacter cloacae* H-27 株における検討一。Chemotherapy 42: 1074~1078, 1994
- 23) 小柏美恵子, 井上松久, 三橋 進: Ceftazidime (SN 401) に関する細菌学的検討。Chemotherapy 31 (S-3): 1~16, 1983
- 24) 布施愛索, 小柏美恵子, 井上松久, 他: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) に関する細菌学的検討。Chemotherapy 33 (S-4): 1~13, 1985
- 25) Livermore D M: Permeation of β -lactam antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Env. Infect. Dis. 10: 691~698, 1988
- 26) Lee E H, Nicolas N H, Kitzis M D, et al.: Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1093~1098, 1991

Evaluation of bactericidal effect of injectable antibacterial agents in polymicrobial infection using a rat granuloma pouch infection model

Harumi Araki, Naoko Ogake, Masahiro Takahata
and Shinzaburo Minami

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

We studied the bactericidal activity of an injectable quinolone, pazufloxacin (PZFX) mesilate, and injectable β -lactams, ceftazidime (CAZ), and imipenem/cilastatin (IPM/CS) against quinolone- and β -lactam-susceptible *Escherichia coli* (a non- β -lactamase producer) in mixed infection caused by *Enterobacter cloacae* H-27 (an inducible β -lactamase producer) and *E. coli* using a rat pouch infection model, with the following results:

1) The bactericidal activity of IPM/CS against *E. coli* and its concentration in pouches after intravenous administration of 5 mg/kg to rats with the mixed infection were reduced compared to those in single infection with *E. coli*. Coexistence of the inducible β -lactamase producer affected IPM/CS activity. CAZ concentrations in pouches in the mixed infection model decreased slightly but its activity was reduced compared to those in single infection with *E. coli*. The coexistence of the inducible β -lactamase producer also affected CAZ activity. No effects were observed in PZFX mesilate.

2) The bactericidal activity of CAZ against *E. coli* and its concentration in pouches of rats with the mixed infection and with cefmetazole (CMZ) pretreatment to increase β -lactamase activity in pouches were reduced compared to those in single infection by *E. coli* and in mixed infection without CMZ pretreatment. β -Lactamase induction affected CAZ activity. IPM/CS bactericidal activity decreased compared to that in single infection by *E. coli* but was similar to that in mixed infection without CMZ pretreatment. β -Lactamase induction did not affect IPM/CS activity. No effects were observed in PZFX mesilate. Piperacillin pretreatment in place of CMZ did not affect CAZ activity.