

## 【原著・基礎】

*Haemophilus influenzae* に対する levofloxacin および cefcapene の殺菌作用田中真由美<sup>1)</sup>・小野寺清美<sup>1)</sup>・西野 武志<sup>2)</sup><sup>1)</sup>第一製薬株式会社創薬第一研究所\*<sup>2)</sup>京都薬科大学微生物学教室

(平成 14 年 3 月 5 日受付・平成 14 年 5 月 15 日受理)

1998 年に臨床より分離された *Haemophilus influenzae* のなかでアンピシリン感受性株である 037077 株および  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性株 ( $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae*; BLNAR) である 033432 株に対する levofloxacin および cefcapene の殺菌作用を検討した。037077 株に対しては、両薬剤ともに殺菌作用を示したが、levofloxacin の方が cefcapene よりも強い殺菌作用を示した。033432 株に対しては、levofloxacin 1 MIC において殺菌作用が認められたが、cefcapene 1 MIC および 4 MIC 作用時にはまったく殺菌作用が見られなかった。両株において、薬剤作用時の形態変化を観察したところ、037077 株に levofloxacin を作用した時には、大きな形態学的変化は見られなかったが、cefcapene 作用時には菌体の伸長化が観察された。033432 株では薬剤非作用時においても伸長化した菌体が観察された。033432 株の菌体の伸長化には隔壁形成にかかわる PBP 3 の変異が示唆されたため、PBP 3 の塩基配列を解析したところ、セフェム系薬剤耐性変異が認められ、cefcapene が殺菌作用を示さないことを裏付けた。

**Key words:** levofloxacin, cefcapene, *Haemophilus influenzae*, 殺菌作用, PBP 3

呼吸器感染症において分離頻度の高い起炎菌のひとつとして *Haemophilus influenzae* が知られている。経口広域ペニシリンが第一選択薬とされていたが、1970 年代に  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の報告がなされ、現在では臨床分離株の 20% 前後が  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であることから、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤との合剤や本酵素に安定な第 3 世代セフェム系薬剤などに変更が必要とされた<sup>1)</sup>。さらに、1980 年代に  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性菌 ( $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae*; BLNAR) が確認され、最近ではその急激な増加が問題となっている<sup>2-4)</sup>。第 3 世代セフェム系薬剤はこのアンピシリン耐性菌にも有用であることが報告されている<sup>5,6)</sup>が臨床における治療効果は不十分との報告もある<sup>7)</sup>。一方、キノロン系抗菌薬は、*H. influenzae* に対し良好な抗菌力を有しており<sup>8)</sup>、 $\beta$ -ラクタム系薬とは作用機作が異なることからアンピシリン耐性菌に対しても交叉耐性は示さないと考えられる。そこで、キノロン系抗菌薬の代表として levofloxacin を、第 3 世代経口セフェム系薬剤の代表として cefcapene を用い、BLNAR に対す

る殺菌作用を検討した。

## I. 試験材料および方法

## 1. 菌株および薬剤

菌株は 1998 年度に臨床より分離された *H. influenzae* 037077 株および 033432 株を用いた<sup>9)</sup>。037077 株は ampicillin 感受性株、033432 株は BLNAR である。薬剤は第一製薬株式会社および塩野義製薬株式会社より分与された levofloxacin および cefcapene, Sigma Aldrich Japan (東京) より購入した ampicillin を用いた。両株に対する各薬剤の MIC 値を Table 1 に示した。

## 2. 殺菌作用の検討

*H. influenzae* を 5% Fildes enrichment 添加 Mueller Hinton broth (MHB: Difco laboratories, Sparks, MD, USA) にて 37°C・一夜培養した前培養菌液を、同培地に 5% 接種し、約 2 時間振盪培養して対数増殖期の菌液を得た。この菌液に各薬剤を最終濃度が 1 MIC および 4 MIC になるように添加後、再度振盪培養を開始し、

Table 1. MICs of antibacterial agents

Organism	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	levofloxacin	cefcapene	ampicillin
<i>H. influenzae</i> 037077	0.008	0.015	0.12
<i>H. influenzae</i> 033432 (BLNAR)	0.015	0.25	2

0, 1, 2, 4 および 6 時間後にサンプリングを行った。サンプルは適宜希釈後, Whitley automatic spiral plater (WASP; グンゼ産業) により 5% Fildes enrichment 添加 Mueller Hinton agar (MHA: Difco laboratories, Sparks, MD, USA) に塗抹し, 37°C で一夜培養後のコロニー数を計測し, 生菌数を算出した。

### 3. 形態変化観察

上記と同様の方法で 2 時間振盪培養した対数増殖期の菌液を, スライドガラス上の各薬剤含有 5% Fildes enrichment 添加 MHA フィルム寒天上に接種し, パラフィンにて封入した。培養開始 0, 1, 2, 4 および 6 時間後に微分干渉顕微鏡にて観察, 写真撮影を行った。

### 4. pbp 3 の塩基配列の解析

*H. influenzae* を 5% Fildes enrichment 添加 MHB を用いて 37°C で一夜培養し, 集菌後, Tris-EDTA を加え, 熱変性させた。これを鋳型として, 5'-TGATG-CACAAGATGTTACCTTAAGTATC-3' および 5'-TGG-AGTTCTATATCATTTCTTTAATTCAGG-3' をプライマーとし, 94°C 30 秒, 60°C 1 分, 72°C 3 分を 35 サイクル行った。PCR 産物は 5' 末端をリン酸化後, *Hinc* II で切断・脱リン酸化した pUC 118 とライゲーションした。それを大腸菌に形質転換し, プラスミドを精製した。5' 末端を Cy5 標識したプライマー (5'-CGCCAGGG-TTTTCCAGTCACGAC-3', 5'-GAGCGATAACA-ATTTACACAGG-3') を用い, 精製したプラスミドを鋳型として R.O.B.DNA プロセッサー (Amersham pharmacia biotech, Sweden) によりシーケンス試料を調製した。ALF express II DNA Sequencer (Amersham) および GENETYX によりシーケンスを解析した。

## II. 成績

*H. influenzae* 037077 株に対する殺菌作用を検討した結果を Fig. 1 に示した。Levofloxacin は 1 MIC (0.008  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および 4 MIC とともに薬剤作用直後から殺菌的に作用し, 薬剤作用 2 時間後以降には検出限界 ( $1 \times 10^1$  CFU/mL) 以下と良好な殺菌作用を示した。Cefcapene 1 MIC (0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) においては薬剤作用 2 時間後まで菌数は緩やかに増加したが, その後は緩やかに減少し, 薬剤作用 6 時間後では約  $10^4$  CFU/mL の残菌数であった。4 MIC においては薬剤作用直後から 2 時間後にかけて約 1/100 に菌数は減少し, その後緩やかに減少した。一方, BLNAR である *H. influenzae* 033432 株に対しては, levofloxacin は 1 MIC (0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 4 MIC とともに作用直後から菌数が減少した。特に, levofloxacin 4 MIC 作用時には, 薬剤作用 2 時間後から菌数は検出限界以下であった (Fig. 2)。一方, cefcapene 作用時には 1 MIC (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 4 MIC とともにコントロールと同様に菌の増殖が見られ, 殺菌作用はまったく認められなかった。

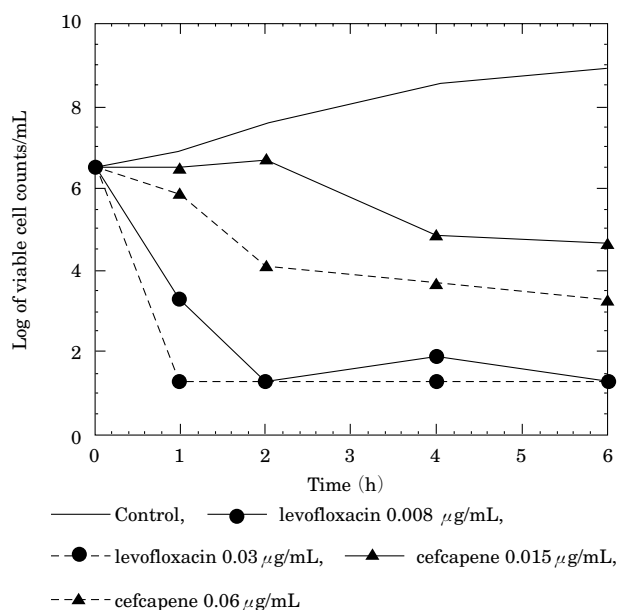


Fig. 1. Antibacterial activity of levofloxacin and cefcapene against *Haemophilus influenzae* 037077.

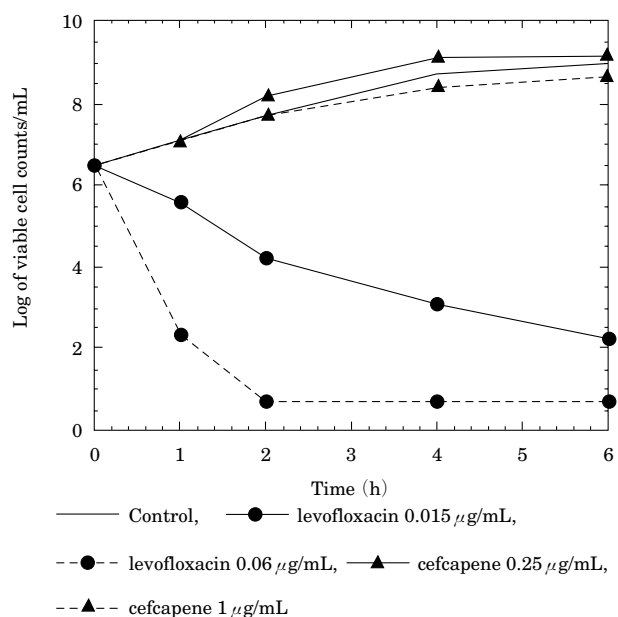


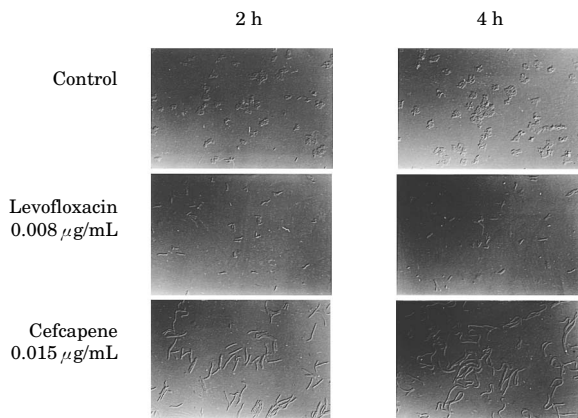
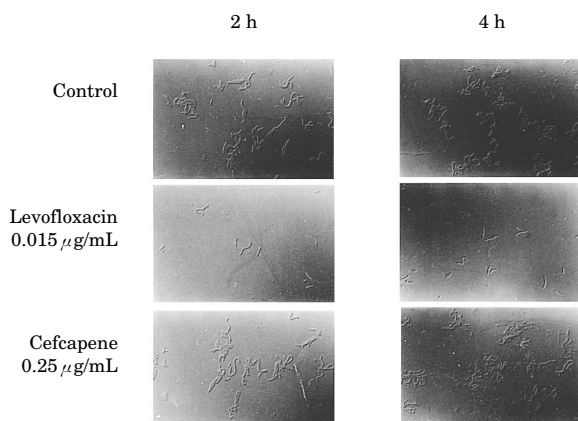
Fig. 2. Antibacterial activity of levofloxacin and cefcapene against *Haemophilus influenzae* 033432 (BLNAR).

次に薬剤作用時の形態変化を観察した (Figs. 3, 4)。*H. influenzae* 037077 株では, levofloxacin において, 薬剤作用時の形態は薬剤未添加時と比較して多少伸長化している傾向はあるものの, 顕著な変化は観察されなかった。Cefcapene 作用時には, 2 時間後から 1 MIC および 4 MIC とともに菌の伸長化が観察された。一方, *H. influenzae* 033432 株では, 薬剤未添加時においても菌の伸長化が観察され, 細胞分裂が正常に行われていない可能性が示唆された。

*H. influenzae* 033432 株の形態異常に関して, 隔壁合

Table 2. Deduced amino acid substitution in PBP 3 of *Haemophilus influenzae*

Organism	Amino acid at codon						
	350	357	377	385	389	517	526
<i>H. influenzae</i> 037077	Asp	Ser	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
<i>H. influenzae</i> 033432 (BLNAR)	Asn	Asn	Ile	Thr	Phe	Arg	Lys

Fig. 3. Phase-contrast micrographs of *Haemophilus influenzae* 037077.Fig. 4. Phase-contrast micrographs of *Haemophilus influenzae* 033432.

成を担っているペニシリン結合蛋白質 (PBP) 3 領域内の塩基配列を解析し、 $\beta$ -ラクタム系薬耐性に関与するといわれている部位のアミノ酸置換について検討した結果を Table 2 に示した。感受性株である *H. influenzae* 037077 株では、いずれの部位にも変異は認められなかった。一方 BLNAR である *H. influenzae* 033432 株では、Asp-350, Ser-357, Met-377, Ser-385, Leu-389 および Asn-526 の 6 か所にアミノ酸置換があることが明らかになった。

### III. 考察および結論

Levofloxacin は 1 MIC 以上の濃度で BLNAR に対しても殺菌作用を示し、cefcapeine より強い殺菌力を有していた。一方、BLNAR に対して  $\beta$ -ラクタム系薬である cefcapeine が殺菌作用を示さないという結果は、セフ

テム系薬剤は MIC 値が低くても臨床効果を有さない一因である可能性が示唆された。今回用いた 033432 株の PBP 3 のアミノ酸配列を解析したところ、すでに報告されている 7 か所の変異<sup>10,11)</sup>のうち 6 か所にアミノ酸置換が存在した。これらの変異をもつ株は、PBP 3 に対して親和性の高い cefotaxime をはじめとするセフェム系薬剤全般に対する MIC が感受性菌に対する値よりも上昇しているグループ III<sup>11)</sup>に属すると考えられた。Cefcapeine においても、BLNAR に対する MIC 値は 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、感受性菌での値 (0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に比して上昇していたものの MIC 値自体は低かった。しかしながら、PBP 3 変異による殺菌力の低下が、臨床で良好な治療効果が認められない原因と考えられた。

### 文 献

- 1) 池田 徹, 大石和徳, 永武 毅, 他: 呼吸器病原性 BLNAR 感染症の臨床的検討。日本臨床 59: 745~749, 2001
- 2) 西岡きよ, 萩原央子, 大野 勲, 他: 呼吸器感染症起炎菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* の抗生物質感受性: 1994-1995 年の検討。Jap J Antibiotics 50: 768~775, 1997
- 3) 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
- 4) Rikitomi N, Sow P S, Watanabe K, et al.: Rapid increase of pneumococcal resistance to  $\beta$ -lactam and other antibiotics in isolates from the respiratory tract (Nagasaki, Japan: 1975-1994). Microbial. Immunol. 40: 899~905, 1996
- 5) Deberna H, Aril J L, Boussougant Y: *In-vitro* activity of cefpodoxime against pathogens 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) Matsuzaki K, Koyama H, Omika K, et al.: Antibacterial activities of piperacillin for several resistant strains from respiratory infections. Jpn J Antibiotics 53: 566~572, 2000
- 8) Tanaka M, Yamazaki E, Chiba M, et al.: *In vitro* antibacterial activity of DQ-113, a potent quinolone, against clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 46: 904~908, 2002

- 9) 山口恵三, 宮崎修一, 檜谷総子, 他: 1998年に全国26施設から分離された臨床分離株5,180株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiotics 53: 387~408, 2000
- 10) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 45: 1693~1699, 2001
- 11) 山本憲太郎, 生方公子:  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生 ABPC耐性インフルエンザ菌 (BLNAR)。日本臨床 59: 688~693, 2001

### Bactericidal activity of levofloxacin and cefcapene against *Haemophilus influenzae*

Mayumi Tanaka<sup>1)</sup>, Kiyomi Onodera<sup>1)</sup> and Takeshi Nishino<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>New Product Research Laboratories I, Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., 16-13 Kitakasai 1-Chome, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

Bactericidal activity of levofloxacin was compared to that of cefcapene against *Haemophilus influenzae* isolated in 1998. Levofloxacin and cefcapene were bactericidal against ampicillin-susceptible strain at a concentration of 1 and 4 times the MIC, but only levofloxacin was bactericidal against  $\beta$ -lactamase-negative and ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR). Significant morphological alteration was not observed after levofloxacin treatment, while filamentous cells appeared after cefcapene treatment of the ampicillin-susceptible strain. BLNAR changed to filamentous without drug exposure, so we analyzed the amino acid sequence of the gene encoding penicillin-binding protein (PBP) 3. We found 6 substitutions in PBP 3, suggesting that PBP 3 alteration was a cause of the lack of bactericidal activity of cefcapene.