

【原著・基礎】

Streptococcus pneumoniae と *Haemophilus influenzae* によるマウス肺混合感染モデル
に対する cefditoren pivoxil の治療効果

金子 真紀・高田 利彦・清水 敦之・新井田昌志・武藤 祐子・渡部 宏臣

明治製薬株式会社薬品総合研究所*

(平成 15 年 7 月 11 日受付・平成 15 年 9 月 5 日受理)

Streptococcus pneumoniae と *Haemophilus influenzae* によるマウス肺混合感染モデルを構築し、cefditoren pivoxil (CDTR-PI) の治療効果と cefcapene pivoxil (CFPN-PI), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR), amoxicillin (AMPC), amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA) および levofloxacin (LVFX) の治療効果を比較した。CDTR-PI は、penicillin 感受性 *S. pneumoniae* (PSSP) と β -lactamase 非産生 ABPC 耐性 *H. influenzae* (BLNAR) による混合感染モデルに対し、投与量依存的に治療効果を示した。同モデルにおける PSSP に対する CDTR-PI の治療効果は他経口 β -lactam 系薬と同等であり、LVFX に比べて高かった。BLNAR に対する CDTR-PI の治療効果は LVFX と比較して低かったが、他の経口 β -lactam 系薬に比べて同等以上であり、CPDX-PR および AMPC に比べて高かった。PSSP と ABPC 感受性 *H. influenzae* による混合感染モデルでは、PSSP に対する CDTR-PI の治療効果は他経口セフェム系薬のそれと同等であり LVFX に比べ有意に高かった。ABPC 感受性 *H. influenzae* に対する CDTR-PI の治療効果は、他経口セフェム系薬に比べ同等以上であったが、LVFX より低かった。CDTR-PI は *S. pneumoniae* と *H. influenzae* による混合感染モデルに対して、両菌種に対する CDTR の強い *in vitro* 抗菌力を反映し、被験抗菌薬のなかでもっともバランスのよい治療効果を示すことから、両菌種による複数菌感染の頻度が高い呼吸器感染症の治療に有用な抗菌薬であることが示唆された。

Key words: cefditoren pivoxil, 複数菌感染, β -lactamase-negative ampicillin resistant, 経口抗菌薬, マウス感染モデル

Haemophilus influenzae および *Streptococcus pneumoniae* は、市中呼吸器感染症における主要病原菌である¹⁻³⁾。これらの菌は単独感染のみならず、両菌種同士あるいは *Moraxella catarrhalis* などとの複数感染菌として検出される場合もある⁴⁾。複数菌感染のなかでも、*H. influenzae* と *S. pneumoniae* の同時検出率の割合は、疾患により多少異なるが、*S. pneumoniae* と *M. catarrhalis* の同時検出率に次いで高く、4.2~19% と報告されている⁴⁾。

Cefditoren pivoxil (CDTR-PI) の活性体である cefditoren (CDTR) は、グラム陽性およびグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを有し⁵⁾、特に *H. influenzae* および *S. pneumoniae* に対する抗菌力が優れている⁶⁻⁸⁾。すでにわれわれは、 β -lactamase 非産生 ampicillin 耐性 *H. influenzae* (BLNAR) に対する CDTR および CDTR-PI の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性について検討し、CDTR の BLNAR に対する優れた *in vitro* 抗菌力が *in vivo* における治療効果に反映されることを報告した⁹⁾。

今回、臨床報告例⁴⁾がある *H. influenzae* と *S. pneumoniae* 両菌種による複数菌呼吸器感染症の治療を想定し、CDTR の両菌種に対する優れた *in vitro* 抗菌力が *in vivo* における

CDTR-PI の治療効果に反映されるかを明らかにするため、*H. influenzae* と *S. pneumoniae* によるマウス肺混合感染モデルを構築し、本モデルに対する CDTR-PI の治療効果を他経口抗菌薬と比較した。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

当研究所に保存されている *S. pneumoniae* MSC-178 および *H. influenzae* TH-1611 および TH-1562 を使用した。*S. pneumoniae* MSC-178 は penicillin G (PCG) の MIC (0.016 μ g/mL) から PCG 感受性 *S. pneumoniae* (PSSP) であることを確認した。また、*H. influenzae* TH-1611 および TH-1562 については、ニトロセフィン法による β -lactamase 産生の有無および penicillin-binding protein (PBP) 3 をコードする遺伝子 (*ftsI* 領域) のアミノ酸配列を生方らの方法¹⁰⁾ に準じて解析し、それぞれ ABPC 感受性株および BLNAR であることを確認した。

なお、今回用いた *S. pneumoniae* MSC-178 に対する CDTR, cefcapene (CFPN), cefpodoxime (CPDX), amoxicillin (AMPC), amoxicillin/clavulanic acid

*神奈川県横浜市港北区師岡町 760

(AMPC/CVA) および LVFX の MIC はそれぞれ 0.008, 0.008, 0.031, 0.031, 0.031 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*H. influenzae* TH-1611 に対する上記 6 薬剤の MIC はそれぞれ 0.031, 0.031, 0.063, 0.25, 0.25 および 0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, *H. influenzae* TH-1562 に対する MIC はそれぞれ 0.063, 0.25, 0.5, 1, 1 および 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

2. 被験抗菌薬

CDTR-PI (Lot No. CFTH 1090, 100 mg 力価/錠, 明治製菓株式会社), cefcapene pivoxil (CFPN-PI; Lot No. 3052, 100 mg 力価/錠, 塩野義製薬株式会社), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR; Lot No. ME 033, 100 mg 力価/錠, 三共株式会社), CVA/AMPC (Lot No. C 2283 D, CVA 125 mg 力価・AMPC 250 mg 力価/錠, グラクソ・スミスクライン株式会社), AMPC (250 mg 力価/錠, Lot No. 2610, 藤沢薬品工業株式会社) および LVFX (Lot No. HY 131, 100 mg 力価/錠, 第一製薬株式会社) を使用した。

3. 使用動物

ICR 系マウス, 4 週齢, 雄性 (日本チャールス・リバー株式会社) を 1 群 7 匹で使用した。なお前処置として, 松本らの報告¹¹⁾ に準じて感染 4 日前および前日に cyclophosphamide (Sigma) を 200 mg/kg 腹腔内投与し免疫低下を惹起した。

4. 肺炎モデルの作成

5% 馬脱繊維血加 brain heart infusion agar (BHIA, Difco) に増殖させた *S. pneumoniae* MSC-178 を brain heart infusion broth (BHIB, Difco) に接種し, 37°C で一夜前培養した。培養後, 新鮮 BHIB に接種し波長 660 nm での吸光度が約 0.8 になるまで 37°C で数時間培養した。*H. influenzae* TH-1611 および TH-1562 は 5% 馬脱繊維血加チョコレート BHIA に増殖させたものを BHIB に懸濁し, 波長 660 nm での吸光度が約 0.7 となるように菌液を調製した。このようにして調製した *S. pneumoniae* MSC-178 の菌液と *H. influenzae* TH-1611 または TH-1562 の菌液を等量混合したものを接種菌液とした。Pentobarbital sodium (sompentyl®, Schering-Plough Animal Health) 投与による麻酔下で, マウスに上記接種菌液を 30 μL 経鼻接種することにより感染を惹起させた。

5. 治療スケジュールおよび治療効果

被験抗菌薬を 0.5% メチルセルロースに懸濁し, 感染後 3, 20, 24 および 28 時間後の計 4 回経口投与した。なお, 各抗菌薬の投与量は, CDTR-PI の *S. pneumoniae* MSC-178 に対する治療効果を基準に, 臨床投与量比で設定した。すなわち, CDTR-PI, CFPN-PI, CPDX-PR および LVFX は同一投与量 (6.25 mg/kg), AMPC および AMPC/CVA は CDTR-PI の 2.5 倍量 (15.6 mg/kg) を 1 回の投与量とした。

感染 48 時間後にマウスの肺を無菌的に摘出し, 1.8 mL の生理食塩液 (大塚製薬) で肺ホモジネート液を作製した。この肺ホモジネート液中における両菌の生菌数を測定し, 各データをそれぞれ平均値 \pm 標準偏差 (log CFU/lung \pm SD) 示した。*S. pneumoniae* の選択培地には 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の norfloxacin (NFLX, Lot No. 18 F 6428, 1,000 μg 力価/mg, Sigma) 含有 5% 馬脱繊維血加 BHIA を, *H. influenzae* の選択培地には 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の vancomycin (VCM, Lot No. 57 H 0894, 1,079 μg 力価/mg, Sigma) 含有 5% 馬脱繊維血加 isovitalex-enrichment 加チョコレート BHIA を用いた。なお, 本方法による生菌数の検出限界は 2×10^2 CFU/lung であった。

6. データ解析

統計学的解析は薬効データ解析システム (SAS) を使用し, 抗菌薬非投与群に対する各抗菌薬投与群の比較は Steel の多重比較検定を, 各薬剤群同士の比較は Steel-Dwass の多重比較検定を行った。

II. 結 果

1. PSSP と BLNAR による混合感染モデルに対する CDTR-PI の治療効果

S. pneumoniae MSC-178 (PSSP) と *H. influenzae* TH-1562 (BLNAR) による混合感染モデルに対する CDTR-PI の治療効果 (0.39~25 mg/kg) を検討した (Fig. 1)。その結果, いずれの菌種に対しても投与量依存的に肺内生菌数を減少させた。感染 48 時間後における抗菌薬非投与群の *S. pneumoniae* MSC-178 および *H. influenzae* TH-1562 の肺内生菌数は, それぞれ 7.67 ± 0.51 および 6.00 ± 0.45 であった (Fig. 1)。CDTR-PI

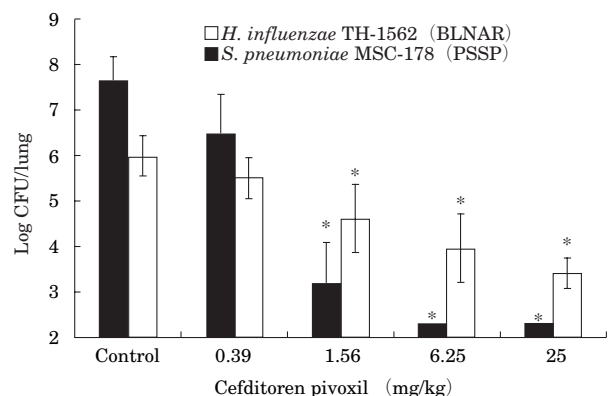


Fig. 1. Cefditoren pivoxil efficacy in a mouse pneumonia model by penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae* MSC-178) and β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae* TH-1562).

Mice underwent four oral administrations (0.39~25 mg/kg) at 3, 20, 24 and 28 h postinfection, then were sacrificed at 48 h postinfection and bacterial titers in the lungs counted as detailed in the text.

* $P < 0.05$

の0.39および1.56 mg/kg投与群における *S. pneumoniae* MSC-178の肺内生菌数はそれぞれ 6.46 ± 0.88 および 3.18 ± 0.93 であり、6.25および25 mg/kg投与群ではいずれも検出限界以下であった。一方、*H. influenzae* TH-1562の肺内生菌数はそれぞれ 5.51 ± 0.46 , 4.61 ± 0.77 , 3.89 ± 0.81 および 3.42 ± 0.33 であり (Fig. 1), 肺内生菌数は検出限界以下までは減少しなかったが、抗菌薬非投与群に比べ有意 ($P < 0.05$) に減少が認められた。

2. PSSPとBLNARによる混合感染モデルに対する各種経口抗菌薬の治療効果

抗菌薬非投与群における感染48時間後の *S. pneumoniae* MSC-178および *H. influenzae* TH-1562の肺内生菌数はそれぞれ 7.63 ± 0.32 および 6.47 ± 0.60 であったのに対し、CDTR-PI投与群 (6.25 mg/kg) の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178で検出限界以下、*H. influenzae* TH-1562で 3.69 ± 0.85 であった (Fig. 2; A)。一方、CFPN-PI (6.25 mg/kg), CPDX-PR (6.25 mg/kg) およびLVFX (6.25 mg/kg) 投与群の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178でそれぞれ 2.79 ± 0.91 , 検出限界以下および 6.60 ± 0.81 であり、*H. influenzae* TH-1562ではそれぞれ 4.86 ± 0.64 , 5.15 ± 0.66 および 2.34 ± 0.11 であった。すなわち *S. pneumoniae* MSC-178に対するCDTR-PIの治療効果は他経

口セフェム薬と同等であり、LVFXに比べ有意 ($P < 0.01$) に高く、*H. influenzae* TH-1562に対するCDTR-PIの治療効果はCPDX-PRに比べ有意 ($P < 0.05$) に高かったが、LVFXの治療効果に比較すると有意 ($P < 0.05$) に低かった (Fig. 2; A)。

さらに、経口ペニシリン系薬の治療効果と比較した (Fig. 2; B)。抗菌薬非投与群における感染48時間後の *S. pneumoniae* MSC-178および *H. influenzae* TH-1562の肺内生菌数は、それぞれ 7.48 ± 0.75 および 6.16 ± 0.32 であったのに対し、CDTR-PI投与群 (6.25 mg/kg) の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178で検出限界以下、*H. influenzae* TH-1562で 4.13 ± 0.54 であった (Fig. 2; B)。一方、AMPC/CVA (15.6/15.6 mg/kg) およびAMPC投与群 (15.6 mg/kg) の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178でそれぞれ 2.62 ± 0.35 および検出限界以下であり、*H. influenzae* TH-1562ではそれぞれ 4.99 ± 0.42 および 5.26 ± 0.51 であった。すなわち、*S. pneumoniae* MSC-178に対するCDTR-PIの治療効果はAMPC/CVAおよびAMPCと同等であり、*H. influenzae* TH-1562に対するCDTR-PIの治療効果はAMPCに比較して有意 ($P < 0.05$) に高かった。

3. PSSPとABPC感受性 *H. influenzae*による混合感染モデルに対する各種経口抗菌薬の治療効果

抗菌薬非投与群における感染48時間後の *S. pneumo-*

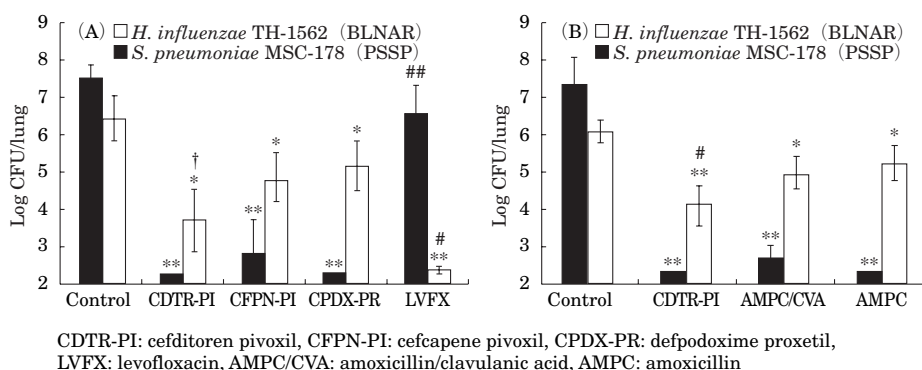


Fig. 2. Efficacy of cefditoren pivoxil and other oral antibiotics in a mouse of mixed infection pneumonia with penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae* MSC-178) and β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae* TH-1562).

Mice underwent four oral administrations at 3, 20, 24, and 28 h postinfection as follows: cefditoren pivoxil (CDTR-PI: 6.25 mg/kg), cefcapene pivoxil (CFPN-PI: 6.25 mg/kg), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR: 6.25 mg/kg) amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA: 15.6/15.6 mg/kg), amoxicillin (AMPC: 15.6 mg/kg) or levofloxacin (LVFX: 6.25 mg/kg). Mice were sacrificed at 48 h postinfection and bacterial titers in the lungs counted as detailed in the text.

(A) Therapeutic efficacy of CDTR-PI, CFPN-PI, CPDX-PR and LVFX.

** $P < 0.01$ (vs control), * $P < 0.05$ (vs control), ## $P < 0.01$ (vs CDTR-PI, CFPN-PI, CPDX-PR), # $P < 0.01$ (vs CFPN-PI, CPDX-PR) and $P < 0.05$ (vs CDTR-PI), † $P < 0.05$ (vs CPDX-PR)

(B) Therapeutic efficacy of CDTR-PI, AMPC/CVA and AMPC.

** $P < 0.01$ (vs control), * $P < 0.05$ (vs control), # $P < 0.05$ (vs AMPC)

niae MSC-178 および *H. influenzae* TH-1611 (ampicillin (ABPC) 感受性) の肺内生菌数は、それぞれ 7.85 ± 0.50 および 5.64 ± 0.57 であったのに対し、CDTR-PI 投与群 (6.25 mg/kg) の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178 では検出限界以下であり、*H. influenzae* TH-1611 では 3.43 ± 0.78 であった (Fig. 3)。一方、CFPN-PI (6.25 mg/kg)、CPDX-PR (6.25 mg/kg) および LVFX (6.25 mg/kg) 投与群の肺内生菌数は、*S. pneumoniae* MSC-178 ではそれぞれ 2.58 ± 0.74 、検出限界以下および 7.92 ± 0.64 であり、*H. influenzae* TH-1611 では、それぞれ 3.99 ± 1.10 、 4.44 ± 1.12 および検出限界以下であった (Fig. 3)。すなわち、*S. pneumoniae* MSC-178 に対する CDTR-PI の治療効果は他経口セフェム系薬と同等であり、LVFX に比較して有意 ($P < 0.01$) に高かった。*H. influenzae* TH-1611 に対する CDTR-PI の治療効果は他経口セフェム系薬と同等以上であったが、LVFX に比較して有意 ($P < 0.05$) に低かった。

III. 考 察

経口薬 CDTR-PI の活性体である CDTR は *H. influenzae* および *S. pneumoniae* に対して強い抗菌力を有する⁶⁻⁸⁾。そこで今回われわれは、PCG 感受性 *S. pneumoniae* (PSSP) と ABPC 感受性の *H. influenzae* または BLNAR との複数菌感染症の治療を想定し、両

菌種に対する CDTR の *in vitro* 抗菌力の強さが *in vivo* においても反映されるかどうかを明らかにするために、両菌種によるマウス肺混合感染モデルを用いて CDTR-PI の治療効果を CFPN-PI、CPDX-PR、LVFX、AMPC/CVA および AMPC を対照薬として検討した。その結果、いずれのモデルにおいても PSSP に対する CDTR-PI の治療効果は CFPN-PI、CPDX-PR、AMPC/CVA および AMPC と同等であり、LVFX に比べ有意に高かった。BLNAR に対する CDTR-PI の治療効果は、LVFX より低かったが、他の被験経口 β -lactam 系薬に比べて同等以上であり、CPDX-PR および AMPC に比べて有意に高かった。一方、ABPC 感受性 *H. influenzae* に対する CDTR-PI の治療効果は、他の被験経口セフェム系薬に比べて同等以上であった。

今回の実験結果から、CDTR-PI は、両菌種に対する強い *in vitro* 抗菌力を反映して、両菌種に対してもっともバランスのよい治療効果を示すことが明らかになった。すなわち、PSSP に対しては LVFX より高い治療効果を示し、特に BLNAR に対しては他経口セフェム系薬およびペニシリン系薬より高い治療効果を示した。

以上のことから、*H. influenzae* と *S. pneumoniae* との複数菌感染症に対して、両菌種に対して抗菌力が強い CDTR を活性体とする CDTR-PI は今回評価した他の経口抗菌薬に比べてバランスのよい治療効果が期待できる。市中感染症の主要な病原菌である *H. influenzae* または *S. pneumoniae* による単独あるいは複数菌感染症に対して、CDTR-PI は幅広く治療効果が期待できることから、市中呼吸器感染症に対する第一選択薬としての有用性が示唆された。

文 献

- 1) 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. Antibiot.* 50: 768~775, 1997
- 2) 生方公子: 各研究会員より送られてきた検体からの検出菌と薬剤感受性について. *Jpn. J. Antibiot.* 52 (Suppl. B): 48~56, 1999
- 3) 黒崎知道: 臨床における今日の問題と対応~小児領域~。化学療法の領域 18(8): 1123~1130, 2002
- 4) 生方公子: 再検討が迫られる市中感染症—PRSP, BLNAR を中心に—。細菌検査の立場から. *Jpn. J. Antibiot.* 52 (Suppl. B): 4~13, 1999
- 5) 西野武志, 高田利彦, 大槻雅子, 他: ME 1207 の *in vitro* 及び *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 40 (S-2): 37~50, 1992
- 6) Clark C L, Nagai K, Dewasse B E, et al.: Activity of cefditoren against respiratory pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 33~41, 2002
- 7) Seki H, Kasahara Y, Ohta K, et al.: Antimicrobial activities of cefditoren against respiratory pathogens isolated from children in Japan. *J. Infect. Chemother.* 5: 16~20, 1999

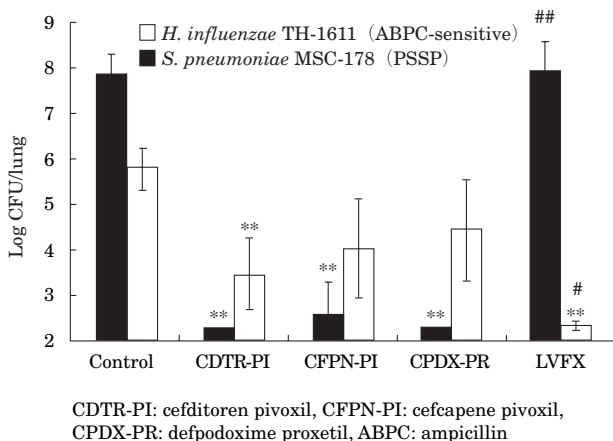


Fig. 3. Efficacy of cefditoren pivoxil and other oral antibiotics in a mouse model of mixed infection pneumonia with penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae* MSC-178) and ampicillin-sensitive *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae* TH-1611). Mice underwent four oral administrations at 3, 20, 24, and 28 h postinfection as follows: cefditoren pivoxil (CDTR-PI: 6.25 mg/kg), cefcapene pivoxil (CFPN-PI: 6.25 mg/kg), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR: 6.25 mg/kg) or levofloxacin (LVFX: 6.25 mg/kg). Mice were sacrificed at 48 h postinfection and bacterial titers in the lungs counted as detailed in the text. ** $P < 0.01$ (vs control), ## $P < 0.01$ (vs CDTR-PI, CFPN-PI, CPDX-PR), # $P < 0.01$ (vs CFPN-PI) and $P < 0.05$ (vs CDTR-PI, CPDX-PR)

- 8) Fernandez-Roblas R, Lopez J C, Ramos J. M, et al.: In-vitro activity of cefditoren against clinical isolates of penicillin-susceptible and resistant strains of resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitides*. J. Antimicrob. Chemother. 37: 1038~1039, 1996
- 9) 清水敦之, 金子真紀, 石川みどり, 他: β -lactamase 非産生 ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* に対する cefditoren の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性。日化療会誌 51: 161~167, 2003
- 10) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1693~1699, 2001
- 11) 松本佳巳, 塩川晶子, 若井芳美, 他: *Streptococcus pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* の混合培養系における cefoselis の抗菌力。日化療会誌 48: 516~523, 2000

Therapeutic efficacy of cefditoren pivoxil in a mouse model of mixed infection pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

Maki Kaneko, Toshihiko Takata, Atsuyuki Shimizu, Masasi Niida,
Yuko Muto and Hiroomi Watabe

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Japan

We compared the efficacy of cefditoren pivoxil (CDTR-PI) to that of cefcapene pivoxil (CFPN-PI), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR), amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA), amoxicillin (AMPC), and levofloxacin (LVFX) in a mouse model of mixed infection pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. The efficacy of CDTR-PI was dose-dependent in the model of pneumonia caused by mixed infection with penicillin-sensitive *S. pneumoniae* and β -lactamase negative ampicillin (ABPC)-resistant *H. influenzae* (BLNAR). The efficacy of CDTR-PI against PSSP in the model was comparable to that of other β -lactam antibiotics tested and superior to that of LVFX. The efficacy of CDTR-PI against BLNAR was superior to that of CPDX-PR and AMPC and comparable to that of CFPN-PI and AMPC/CVA. The efficacy of CDTR-PI against ABPC-sensitive *H. influenzae* was comparable to that of CFPN-PI and CPDX-PR but inferior to that of LVFX. CDTR-PI has showed balanced therapeutic efficacy against both *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. This suggests that CDTR-PI has the potential for clinical use against mixed infections with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* including BLNAR.