

【原著・基礎】

Penicillin 耐性肺炎球菌に対する cefditoren と fosfomycin の
in vitro および *in vivo* 併用効果

高田 利彦・清水 敦之・小川 弘

明治製菓株式会社薬品総合研究所*

(平成 14 年 7 月 8 日受付・平成 14 年 7 月 29 日受理)

Penicillin 耐性肺炎球菌 (PRSP) に対する cefditoren (CDTR) と fosfomycin (FOM) との併用効果を抗菌力, 短時間殺菌効果, penicillin-binding proteins (PBPs) に対する結合親和性および *in vivo* 有効性を指標に検討した。その結果, PRSP に対する CDTR の抗菌力は FOM の併用により 2~4 倍増強された。また, 併用時における短時間殺菌効果は各単独作用時に比較して優れており, 強い殺菌効果が認められた。この現象を PBPs に対する CDTR の結合親和性から検討したところ, FOM の作用により PBPs 産生が抑制された結果, CDTR の抗菌力が増強されると推察された。一方, PRSP によるマウス肺感染モデルに対する併用治療効果の検討では, 各単剤では無効である投与量での併用投与により優れた治療効果が得られた。投与順序および投与間隔の違いによる治療効果に差は認められなかった。

Key words: penicillin 耐性肺炎球菌, cefditoren, fosfomycin, 併用効果

肺炎球菌は呼吸器感染症の主要な起炎菌のひとつである。1967 年にオーストラリアにおいて penicillin G (PCG) に対する低感受性株が報告され¹⁾, さらに, 1977 年には PCG の MIC が 2 µg/mL 以上を示す株が南アフリカで分離された²⁾。日本においても 1980 年代に小栗らにより PCG 耐性株が報告³⁾され, さらに, 西岡ら⁴⁾や紺野・生方ら⁵⁾により PCG 耐性肺炎球菌 (PRSP) の疫学的調査が全国規模で実施され, PCG 耐性菌の出現率や耐性メカニズムなどについて明らかにされてきた。その結果 PRSP の増加が臨床的に問題視されるようになった。特に, 小児および乳幼児の中耳炎, 下気道炎における PRSP 分離例の著しい増加を岩田ら⁶⁾, 高村ら⁷⁾が報告しており, 著者らはこれらの PRSP 感染症に対して経口抗菌薬による治療が難しいことを問題点として挙げている。

そこで今回われわれは, PRSP 感染症に対するひとつの治療法として経口抗菌薬の併用という観点からその有効性を基礎的に検討した。すなわち, 経口薬のなかで肺炎球菌に対する抗菌力が強い抗菌薬のひとつである cefditoren-pivoxil (CDTR-PI) と, 種々の抗菌薬, 特に β-lactam 薬との併用効果が基礎的に数多く検討されている fosfomycin (FOM) との併用^{16,17,20)}を考え, PRSP に対する *in vitro* および *in vivo* 併用効果を検討した。

I. 材料および方法

1. 試験菌株

臨床由来の PRSP (PCG の MIC が 0.78 µg/mL 以上) 26 株を試験菌株として MIC の測定に使用した。また, 併用殺菌効果, PBPs に対する結合親和性および実験的マウス肺感染モデルに対する併用治療効果の各試験には,

上記 26 株のなかからマウス肺感染性が認められた PRSP PRC 53 株を選択し, 使用した。

2. 使用抗菌薬

In vitro 試験では cefditoren (CDTR, Lot No.6 WS-24, 936 µg 力価/mg, 明治製菓) および fosfomycin (FOM, Lot No.FOSB 20224, 745 µg 力価/mg, 明治製菓) を使用した。また, *in vivo* 試験ではセフジトレンピボキシル散 (CDTR-PI, Lot No.CFP-Z 2, 100 µg 力価/mg, 明治製菓) およびシロップ用ホスホマイシンカルシウム (FOM-Ca, Lot No.FOMDFH 124, 400 µg 力価/mg, 明治製菓) の共に市販品を使用した。

3. 使用動物

CBA/JNCrj 系マウス, 4 週齢, 雄, 体重 14~19 g のものを日本チャールスリバーより購入し, 1 群 5 匹で使用した。

4. CDTR の抗菌力におよぼす FOM の影響

FOM を臨床で得られる血漿中濃度内で併用した時の CDTR の抗菌力の変化を検討した。すなわち, FOM の作用濃度を 5.0, 2.5 および 1.25 µg/mL になるように設定して CDTR (0.05~6.25 µg/mL) と併用した時の CDTR の MIC を, 5% 馬脱繊維血液 (日本生物材料センター) 添加 Brain Heart Infusion agar (BHIA, Difco) を測定用培地とした寒天平板希釈法により測定した。5% 馬脱繊維血液添加 BHIA に増殖させた菌株を Brain Heart Infusion broth (BHIB, Difco) に懸濁し, 同 BHIB で 50~200 倍に希釈したものを接種菌液として, ミクロプランター (佐久間製作所) で接種した。その後, 37 °C で一夜培養して, 菌の発育を肉眼的に観察した。菌の

発育を認めない CDTR の最小濃度を MIC とし, FOM 併用時と CDTR 単独における MIC を比較した。

5. 併用殺菌効果

BHIB で一夜培養した菌を新鮮 BHIB で O.D. (optical density, A 660 nm) が約 0.3 になるように希釈した。さらに, この希釈液を同 BHIB で 1,000 倍希釈し, 37°C で 3 時間静置培養したものを接種菌液とした。所定濃度の 10 倍濃度に調整した抗菌薬液に 9 倍量の接種菌液を添加して 37°C で静置培養した。培養 1, 2 および 4 時間後にサンプリングおよび希釈して各培養液中の生菌数を 5% 馬脱繊維血液添加 BHIA にて測定し, 併用殺菌効果を検討した。

6. PBPs に対する結合親和性

BHIB で一夜培養した菌を新鮮 BHIB に 10% の割合で接種し, 37°C で静置培養した。O.D. が A 660 nm で 0.5–0.8 になった時点で FOM を添加し, さらに 2 時間培養した。その後遠心分離 (10, 200×g, 15 min) により集菌した。1/15 M リン酸緩衝液 (pH=7.0) で菌体を洗浄後ソニケータで破壊し, 遠心分離 (8, 200×g, 15 min) 後その上清をさらに超遠心 (40, 000 rpm, 30 min) した。この時の沈査を PBPs 画分とした。この PBPs 画分に対する CDTR の結合親和性については Spratt⁸⁾ の方法に準じて行った。

7. PRSP によるマウス肺感染モデルに対する併用治療効果

BHIB で一夜培養した菌を新鮮 BHIB で O.D. が A 660 nm で約 0.3 になるように希釈したものを接種菌液とした。この菌液の 20 μ L をペントバルビタール麻酔下でマウスの鼻に滴下し, 感染を惹起した。感染 24 および 30 時間後の 2 回各抗菌薬を単独または併用で経口

投与した。感染 48 時間後に肺を摘出し, 生理食塩液で肺ホモジネート液を作成した。この肺ホモジネート液中の生菌数を測定して治療効果を判定した。また, 投与順序の検討では, 同時併用群, CDTR-PI 先行投与群および FOM-Ca 先行投与群を設定した。投与間隔の検討では 1 および 2 時間の投与間隔群を設定した。

II. 実験結果

1. CDTR の抗菌力におよぼす FOM の影響

FOM の 5, 2.5 および 1.25 μ g/mL 併用時における PRSP の CDTR に対する感受性分布を Fig. 1 に示した。PRSP に対する CDTR の抗菌力は FOM の併用濃度に依存して増強された。臨床由来の PRSP 26 株に対する CDTR の MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.78 および 1.56 μ g/mL であるのに対し, FOM 5 μ g/mL 併用時における CDTR の MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.39 および 0.78 μ g/mL であり, CDTR の抗菌力は 2~4 倍増強された。

2. CDTR と FOM の併用殺菌効果

CDTR-PI の臨床投与 (100 mg/man) 時の血漿中濃度を考慮して, CDTR と FOM の併用殺菌効果を検討した。その結果を Fig. 2 に示した。なお, 本試験に使用した PRSP PRC 53 株に対する CDTR および FOM の MIC は, それぞれ 1.56 および 25 μ g/mL であった。いずれの併用条件においても併用殺菌効果が認められた。特に, 0.39 μ g/mL の CDTR と 12.5 μ g/mL または 6.25 μ g/mL の FOM の併用により顕著な併用殺菌効果が認められた (Fig. 2 (A), (B))。0.1 μ g/mL の CDTR と 6.25 μ g/mL の FOM との併用時での併用効果は弱かった (Fig. 2 (C))。

3. Penicillin-binding proteins (PBPs) に対する

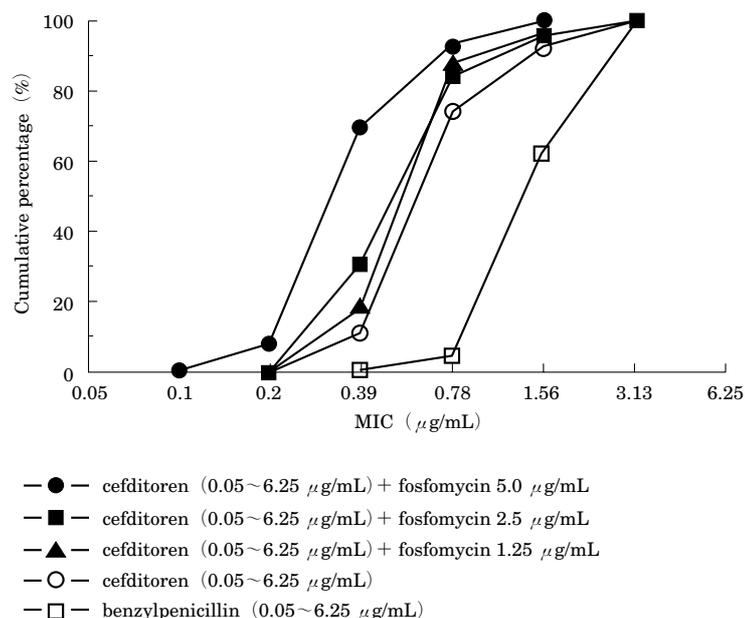


Fig. 1. Influence of fosfomicin on the antibacterial activity of cefditoren against PRSP.

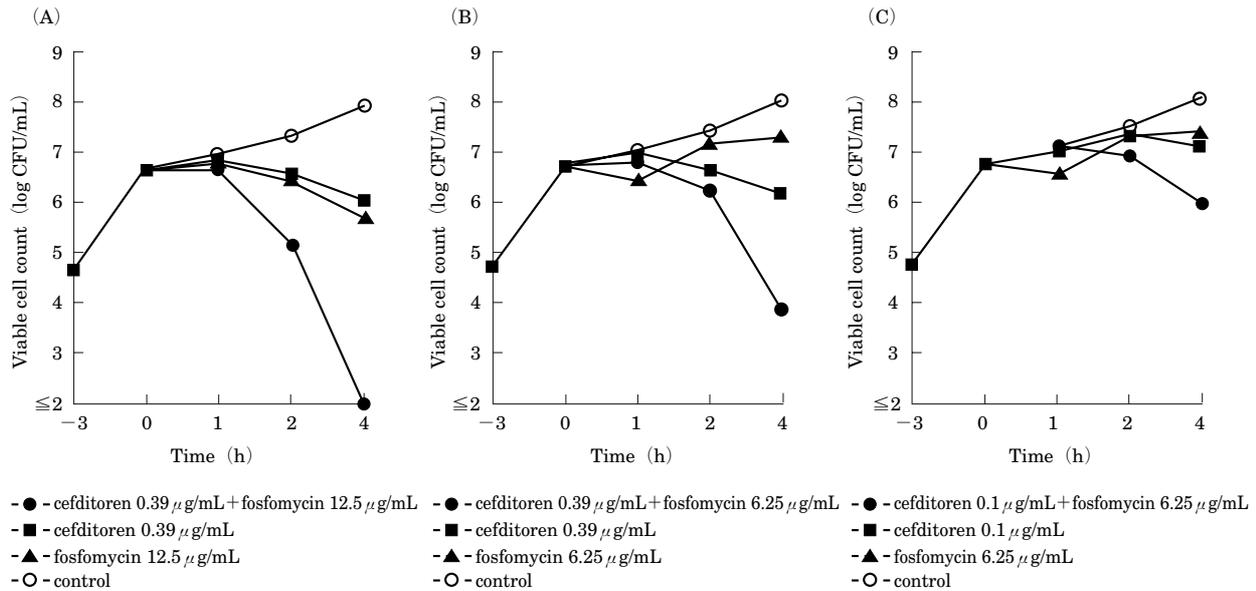


Fig. 2. Combined effects of fosfomycin on the bactericidal activity of cefditoren against *Streptococcus pneumoniae* PRC 53.

CDTR の結合親和性におよぼす FOM の影響

併用効果のメカニズムを CDTR の PBPs 結合親和性に及ぼす FOM の影響を検討し、その結果を Fig. 3 に示した。6.25 および 3.13 µg/mL の FOM を作用させた菌体から調製した PBPs プロフィールから FOM の作用により全体的に PBPs の産生抑制が認められた (lane 2, 3)。特に 6.25 µg/mL の FOM を作用させた菌から調製した PBPs 画分に対する CDTR の結合親和性 (lane 2,

5, 8, 11) と FOM を作用させない菌から調製した PBPs 画分に対する親和性 (lane 1, 4, 7, 10) を比較すると、CDTR の作用濃度が同じであるにもかかわらず、FOM を作用させた菌から調製した PBPs に対する阻害が強い傾向にあった。

4. PRSP によるマウス肺感染モデルに対する CDTR-PI と FOM-Ca の併用治療効果

FOM-Ca の投与量を固定にして CDTR-PI との併用

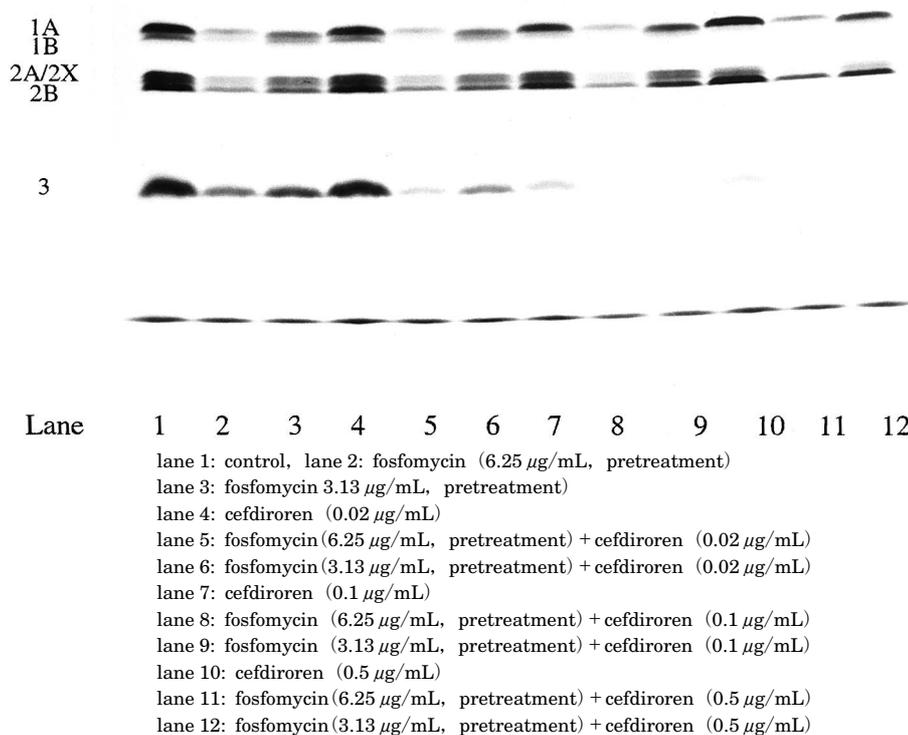


Fig. 3. Influence of fosfomycin on the binding affinity of cefditoren to penicillin-binding proteins.

治療効果を検討した。FOM-Caの投与量をそれぞれ1.0および2.0 mg/mouse/dayに設定した時のCDTR-PIとの併用治療効果をFig. 4に示した。いずれの併用条件においてもCDTR-PIの投与量に依存した併用治療効果が認められた。すなわち、CDTR-PIの4.0 mg/mouse/dayおよびFOM-Caの1.0 mg/mouse/day単独治療時における肺内生菌数(Log of CFU/lung±SD)は、無処置対照群の肺内生菌数が6.13±0.27であったのに対し、それぞれ5.76±0.35および5.87±0.19でありほとんど治療効果は認められなかったが、両者の併用治療時における肺内生菌数は3.66±0.46 (CDTR-PI単独治療群に対しP<0.01で有意差あり)であった (Fig. 4 (1))。また、CDTR-PIの2.0 mg/mouse/dayおよびFOM-Caの2.0 mg/mouse/day単独治療時における肺内生菌数は、無処置対照群の肺内生菌数が6.26±0.58であったのに対し、それぞれ6.40±0.40および6.06±0.15であり治療効果は認められなかったが、両者の併用治療時における肺内生菌数は2.97±0.74 (CDTR-PI単独治療群に対しP<0.01で有意差あり)であった (Fig. 4 (2))。このように、CDTR-PIとFOM-Caの併用治療群では顕著な肺内生菌数の減少が認められ、優れた治療効果を示した。

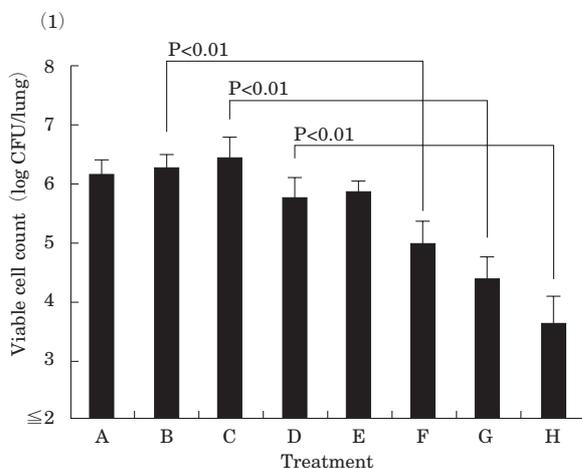
さらに、投与順序および投与間隔の違いによる併用治療効果を検討した (Fig. 5)。その結果、いずれの併用

条件においても併用治療効果 (CDTR-PI単独治療群に対しP<0.01で有意差あり)が認められ、治療効果に有意差はなかった。すなわち、CDTR-PIの1.0 mg/mouse/day単独治療時における肺内生菌数は、無処置対照群の肺内生菌数が6.92±0.42であったのに対し、6.74±0.28であり治療効果は認められなかったが、FOM-Caの2.0 mg/mouse/dayを併用することにより、いずれの投与条件においてもその肺内生菌数は3.37±1.01~4.32±0.81の範囲であり、併用治療効果が認められた。

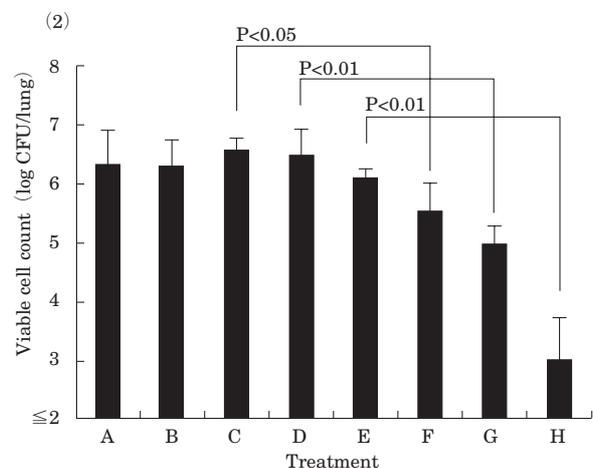
III. 考 察

PRSPの分離頻度の増加については数多くの報告があり、本菌による感染症に対する治療が懸念されている^{9,10}。PRSPに対する各種経口セフェム薬の抗菌力の報告でも、それらのMIC₉₀値はすべて1 μg/mL以上である¹¹。また、β-lactam薬のみならず、経口マクロライド薬およびキノロン薬耐性肺炎球菌の分離についても報告があり、肺炎球菌における多剤耐性化が進んでいると考えられている^{12,13}。

そこで今回われわれは、PRSP感染症の治療について、既存の経口抗菌薬を用いた併用療法の観点から基礎的に検討し、抗菌薬治療法のひとつの選択肢として期待できるかどうかを考察した。PRSPに対する経口薬の*in vitro*における併用効果については、戸塚などの報告がある¹⁴。今回はPRSPに対して経口セフェム薬のなかでは優れ



- A: control
 B: cefditoren-pivoxil (1.0 mg/mouse/day)
 C: cefditoren-pivoxil (2.0 mg/mouse/day)
 D: cefditoren-pivoxil (4.0 mg/mouse/day)
 E: fosfomycin-calcium (1.0 mg/mouse/day)
 F: cefditoren-pivoxil (1.0 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (1.0 mg/mouse/day)
 G: cefditoren-pivoxil (2.0 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (1.0 mg/mouse/day)
 H: cefditoren-pivoxil (4.0 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (1.0 mg/mouse/day)



- A: control
 B: cefditoren-pivoxil (0.5 mg/mouse/day)
 C: cefditoren-pivoxil (1.0 mg/mouse/day)
 D: cefditoren-pivoxil (2.0 mg/mouse/day)
 E: fosfomycin-calcium (2.0 mg/mouse/day)
 F: cefditoren-pivoxil (0.5 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (2.0 mg/mouse/day)
 G: cefditoren-pivoxil (1.0 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (2.0 mg/mouse/day)
 H: cefditoren-pivoxil (2.0 mg/mouse/day)+fosfomycin-calcium (2.0 mg/mouse/day)

Fig. 4. Combined therapeutic efficacy of cefditoren-pivoxil with fosfomycin-calcium against respiratory tracts infection caused by *Streptococcus pneumoniae* PRC 53.

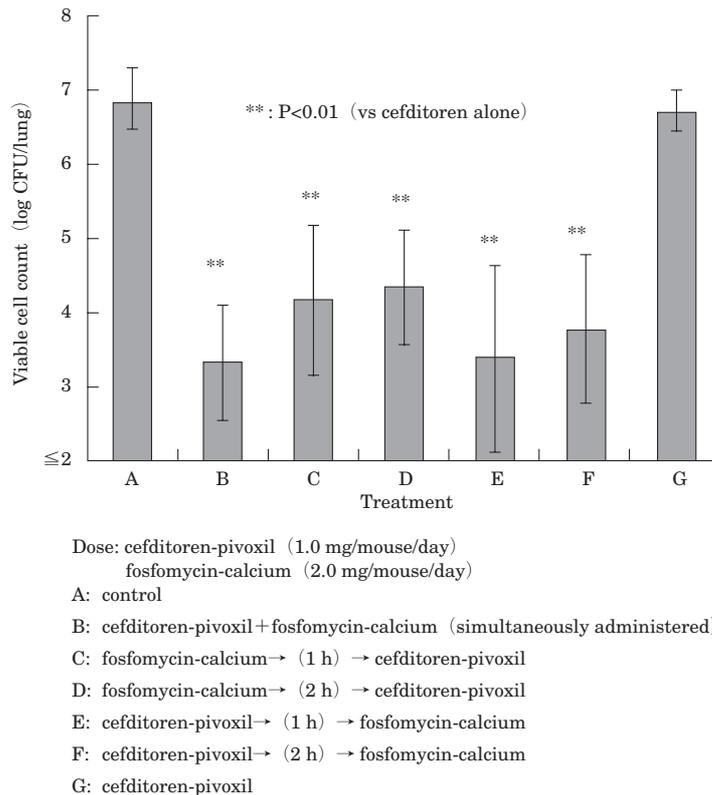


Fig. 5. Combined therapeutic efficacy of cefditoren-pivoxil with fosfomycin-calcium against respiratory tracts infection caused by *Streptococcus pneumoniae* PRC 53 depending on the medication order and interval.

た抗菌力を示す薬剤のひとつである CDTR¹⁵⁾と、種々の菌種に対し各種抗菌薬との併用効果が基礎的に数多く検討されている FOM^{16,17)}の併用効果を *in vitro* および *in vivo* で基礎的に検討した。

今回検討した *in vitro* での CDTR と FOM の併用実験の結果、FOM 存在下で CDTR の PRSP に対する抗菌力が増強されることおよび殺菌効果についても併用効果が認められることを確認した。

肺炎球菌の β -lactam 薬に対する耐性メカニズムは PBPs の変異であり、特にセフェム系薬については、PBP 2X の変異により耐性化することが知られている¹⁸⁾。PRSP は、さらに PBP 1A および 2B にも変異を有しており各種 β -lactam 薬に高度耐性化している¹⁹⁾。これらの耐性メカニズムを考慮し、PRSP に対する CDTR と FOM の併用効果のメカニズムを PBPs に対する CDTR の結合親和性におよぼす FOM の影響という観点から検討した。肺炎球菌の PBPs 産生におよぼす FOM の影響については、すでに菊池らにより報告されており²⁰⁾、今回われわれが得た結果も同様であった。すなわち、FOM の作用による PBPs の産生抑制、特に CDTR の抗菌力 (MIC, 殺菌効果) と関連が強い PBP 2X および 1A の産生抑制が CDTR の抗菌力を増強させる要因であると考えられた。

マウス肺感染モデルを用いた *in vivo* 試験では各単独治療では無効である投与量を併用した場合に優れた併用

治療効果を認めた。また、投与順序および投与間隔の違いによる併用治療効果の差は認められず投与方法においても幅広く応用できると考えられた。

今回、PRSP に対する CDTR と FOM の併用効果を *in vitro* および *in vivo* で基礎的立場から検討した。その結果、抗菌力、殺菌作用および感染治療効果の面で優れた併用効果が認められた。これらのことから、PRSP 感染症に対して CDTR-PI と FOM (FOM-Ca) の併用治療は、臨床においてもその有効性が期待できる。

文 献

- 1) Hansman D, Bullen M M: A resistant pneumococcus. *Lancet* 2: 264~265, 1967
- 2) Appelbaum P C, Bhamjee A, Scragg J N, et al.: *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 2: 995~997, 1977
- 3) 小栗豊子, 小酒井望: 臨床材料から分離した肺炎球菌の血清型別と抗生物質感受性. *Jpn. J. Antibiotics*. 34: 95~101, 1981
- 4) 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* 及び *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* の抗生物質感受性—1994~1995 の検討. *Jpn. J. Antibiotics*. 50: 768~775, 1997
- 5) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al.: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 3: 190~197, 1997

- 6) 岩田 敏: 耐性肺炎球菌感染症にいかに対処するか。3. 小児科の立場から。化学療法の領域 16 (8): 1285~1293, 2000
- 7) 高村博光, 矢野寿一, 末武光子, 他: 耐性肺炎球菌感染症にいかに対処するか。6. 耳鼻咽喉科の立場から。化学療法の領域 16 (8): 1311~1318, 2000
- 8) Spratt B G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 2999~3003, 1975
- 9) 紺野昌俊: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症学雑誌 68: 1338~1351, 1994
- 10) 遠藤廣子, 末武光子, 入間田美保子: 入院加療を必要とした乳幼児急性中耳炎, 下気道炎の検討。—1994~1997年, ペニシリン耐性肺炎球菌感染の増加—。日化療会誌 47: 30~34, 1999
- 11) 紺野昌俊, 荒川宜親: 薬剤耐性菌の動向とそれらに起因する感染症をめぐる国内外の状況。日化療会誌 48: 251~277, 2000
- 12) 小原康治: 今日のマクロライド系抗菌薬の耐性化の傾向。日化療会誌 48: 169~190, 2000
- 13) 福田秀行: *Streptococcus pneumoniae* におけるキノロン系薬の作用機序に関する遺伝子学解析。日化療会誌 48: 243~250, 2000
- 14) 戸塚恭一: 肺炎球菌に対する経口薬の *in vitro* における併用効果。Jpn. J. Antibiotics. 52 (Suppl. B): 66~69, 1999
- 15) 佐野和三, 池野廣幸, 横澤光博: 臨床分離株の cefditoren に対する感受性サーベイランス。日化療会誌 48: 383~395, 2000
- 16) 林 泉, 桜井雅紀, 一木昌郎, 他: MRSA と *P. aeruginosa* 複数菌感染症に対する Fosfomycin+Sulbactam/Cefoperazone 併用療法の基礎的・臨床的検討—I. Jpn. J. Antibiotics 47: 29~39, 1994
- 17) 菅野由美子, 高田利彦, 菅野利恵, 他: *Pseudomonas aeruginosa* に対する各種抗菌薬の殺菌力におよぼす fosfomycin の影響。日化療会誌 43: 735~741, 1995
- 18) Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K: Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrob. Agents and Chemother. 43: 1252~1255, 1999
- 19) Tracey J C, Maggie D, Linda K M, et al.: Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents and Chemother. 39: 1306~1313, 1995
- 20) Kikuchi K, Totsuka K, Shimizu K, et al.: Effects of combination of benzylpenicillin and fosfomycin on penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb. Drug. Resist. 1: 185~189, 1995

In vitro and *in vivo* combination effects of cefditoren and fosfomycin against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

Toshihiko Takata, Atsuyuki Shimizu and Hiroshi Ogawa

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,

760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222-8567, Japan

We studied the combined effects of cefditoren (CDTR) and fosfomycin (FOM) against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) in antibacterial and bactericidal activity, affinity to penicillin-binding proteins, and *in vivo* efficacy. The antibacterial activity of CDTR against PRSP was increased 2- to 4-fold when FOM alone was used. The bactericidal activity of CDTR and FOM used concomitantly, was superior to that of either one used alone. Regarding the mechanism of combination effects, we concluded that FOM inhibited production of PBPs, which increased CDTR antibacterial. The therapeutic efficacy of CDTR-PI and FOM-Ca combination against PRSP-induced respiratory tract infection in mice was superior to that of either applied alone. Therapeutic efficacy was not influenced by the administration sequence or CDTR-PI and FOM-Ca interval.