

【短 報】

 β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* による
マウス気管支肺炎モデルにおける gatifloxacin の治療効果

宮崎 修一・小林 寅喆・山口 恵三

東邦大学医学部微生物学講座*

(平成 15 年 10 月 8 日受付・平成 15 年 10 月 27 日受理)

BLNAR 株に対する gatifloxacin (GFLX) の *in vitro*, *in vivo* 抗菌活性を検討した。アンピシリン耐性株を含む臨床分離 *Haemophilus influenzae* に gatifloxacin の抗菌活性は levofloxacin 同様強かった。一方、第三世代経口セフェム系 cefcapene や cefditoren はアンピシリン感性株に比べ、BLPAR 株さらに BLNAR 株に対する抗菌活性がやや弱くなる傾向を示した。BLNAR 株によるマウス気管支肺炎モデルにおいて、1 mg/kg の GFLX を 2 回/日、3 日間投与すると、感染組織の残存生菌数は検出限界以下となった。一方、cefcapene pivoxil 投与群では 10 mg/kg 投与群では無投与群に比べ、有意差をもって残存菌数の減少を認めた。これらの成績は、GFLX が *H. influenzae* 呼吸器感染症に有用であることが示唆された。

Key words: BLNAR, gatifloxacin, 感染モデル

市中呼吸器感染症の主要原因菌としては、*Streptococcus pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* が挙げられる。*S. pneumoniae* はペニシリン系やマクロライド系抗菌薬耐性菌、*H. influenzae* はペニシリン系抗菌薬耐性菌の増加が問題となっている^{1,2)}。このような耐性菌による感染症においては、適切な抗菌薬で治療しなければ病態の増悪を起す場合もある。

ペニシリン系抗菌薬耐性 *H. influenzae* にはペニシリナーゼ産生 (BLPAR) 株とペニシリナーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) 株の 2 つの耐性獲得機序がある³⁻⁵⁾。日本においては、BLNAR 株の分離頻度が高く、この BLNAR 株はペニシリン系抗菌薬ばかりでなく、セフェム系抗菌薬にも耐性化傾向を示すことが知られている^{2,6)}。

そこで、BLNAR 株感染患者に対するニューキノロン系抗菌薬の投与の有有用性について、マウス感染モデルを用いて検討したので、*in vitro* 成績とあわせて報告する。

菌株: 2002 年分離の新鮮分離 *H. influenzae* 173 株および動物実験用に -80°C に保存している東邦大学医学部附属大森病院で気管支肺炎患者から分離された BLNAR *H. influenzae* TUH 267 を用いた。なお、NCLLS に順じたアンピシリン耐性株について、ペニシリナーゼの産生の有無はニトロセフィン法で調べ、陽性株を BLPAR 群、陰性株を BLNAR 群とした⁷⁾。

抗菌薬: gatifloxacin (GFLX, 杏林製薬), levofloxacin (LVFX, 第一製薬), cefcapene (CFPN, 塩野義製薬), cefditoren (CDTR, 明治製薬) および ampicillin (ABPC, Shigma 社) の力価の明らかなものを使用した。

MIC 測定: MIC は NCLLS に順じ、微量液体希釈法にて測定した。

使用動物: マウスは ICR (3.5 週齢, 雄) を 1 群 7 匹用いた。

感染方法: 筆者らがすでに報告した CBO 法を用いた⁸⁾。すなわち、マウス胎児肺由来の MFL 細胞による単層培養細胞を作製する。X 因子, V 因子含有 Brain Heart Infusion (BHI) 培地に同じ培地で 1 夜培養した菌を 5% 接種, 35°C で 3 時間培養後集菌し, 滅菌生理食塩液にて 3 回緩やかに菌洗浄後, 元の液量になるように RPMI 1640 に懸濁した。この菌液を 3 回洗浄した単層培養細胞の入った容器に加え, 反転させながら付着・侵入実験を行った。1 時間後液を捨て, 付着・侵入していない菌を除くために 5 回滅菌生理食塩液にて激しく洗浄した。次に, スクレーパーにて菌の付着・侵入した細胞を剥ぎ取り 6 mL の RPMI 1640 に懸濁し, 感染菌液とした。

感染 3 日前に 1% ホルマリンを 40 μ L 経鼻滴下して気道障害を生じたマウスにケタラール・セラクター麻酔下で感染菌液を 50 μ L 経鼻滴下した。感染 2 日後のマウスに抗菌薬を 1 日 2 回 3 日間経口投与し, 最終投与の翌日にマウスから気管および肺を可能な限り無菌的に摘出し, 5 mL の生理食塩液の入った滅菌スプツに入れ, ホモジナイザーでホモジナイズした。次に, 10 倍階段希釈して, チョコレート寒天培地平板に 100 μ L 塗抹し, 35°C で 2 夜培養後, 生菌数を算出した。この残存生菌数から抗菌薬の *in vivo* 活性を評価した。

1. *H. influenzae* に対する各種抗菌薬の抗菌活性

*東京都大田区大森西 5-21-16

Table 1. Antibacterial activity of gatifloxacin and other antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*

Organisms (no. of test strains)	Drug	MIC (mg/L)		
		range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
β-lactamase non-producing ampicillin-resistant isolates (67)	gatifloxacin	≤0.015–0.03	≤0.015	0.03
	levofloxacin	≤0.015–0.06	0.03	0.03
	cefcape	≤0.015–8	0.5	4
	cefditoren	≤0.015–0.5	0.12	0.5
	ampicillin	1–8	2	4
β-lactamase producing isolates (13)	gatifloxacin	≤0.015–0.03	≤0.015	0.03
	levofloxacin	≤0.015–0.06	0.03	0.03
	cefcape	≤0.015–2	0.03	1
	cefditoren	≤0.015–0.25	0.03	0.12
	ampicillin	8–>128	32	64
Ampicillin-susceptible isolates (93)	gatifloxacin	≤0.015–0.25	≤0.015	0.03
	levofloxacin	≤0.015–0.25	0.03	0.03
	cefcape	≤0.015–2	0.03	0.06
	cefditoren	≤0.015–0.5	≤0.015	0.06
	ampicillin	≤0.06–0.5	0.25	0.5

H. influenzae に対する GFLX および対照抗菌薬の抗菌活性を測定した。GFLX の BLNAR 株, BLPAR 株およびアンピシリン感性株に対する抗菌力は MIC₅₀ と MIC₉₀ で比較しても同じであった (Table 1)。同じ系統の LVFX でも同様の結果が得られた。しかし第三世代経口セフェム系 CFPN と CDTR の抗菌力はアンピシリン感性株に比べ, BLPAR 株に対しやや弱くなり, BLNAR 株に対してはさらに弱くなった。一方, BLPAR 株に対する ABPC の抗菌力は, BLNAR 株よりも弱かった。

感染に用いた BLNAR TUH 267 株に対する GFLX, LVFX, CFPN, CDTR および ABPC の MIC はそれぞれ 0.03 mg/L, 0.03 mg/L, 1 mg/L, 0.25 mg/L および 8 mg/L であった。

2. マウス気管支肺炎モデルでの治療効果

感染 6 日後, 無投与群マウスの呼吸器系組織中から平均 $7.17 \times \log_{10}$ の生菌が検出された (Table 2)。しかし, 1 回投与量 1 mg/kg と 10 mg/kg の GFLX を投与した両群マウスの呼吸器系組織中の残存生菌数はすべて検出限界以下であった。一方, 1 回投与量 1 mg/kg の

cefcape pivoxil (CFPN-PI) を投与した群マウスからは平均 $6.89 \times \log_{10}$ 生菌が検出され, 無投与群と有意差がみられなかった。CFPN-PI の 1 回投与量を 10 mg/kg とした群では, 平均 $5.23 \times \log_{10}$ 生菌が検出されたが, 無投与群に比べ有意差をもって減少していた。

H. influenzae におけるアンピシリン耐性株は BLPAR と BLNAR に分けられる。わが国では, BLPAR 株に比べ BLNAR 株の分離頻度が約 3 倍高い²⁾。一方, 欧米では逆に BLNAR 株に比べ BLPAR 株の分離頻度が高い⁴⁾。この原因のひとつとして, 欧米では amoxicillin-clavulanic acid の合剤などペニシリン系抗菌薬が, わが国ではセフェム系抗菌薬の使用頻度が高いことが考えられる。これらアンピシリン耐性株を含む *H. influenzae* に対し, GFLX は LVFX 同様他の比較抗菌薬に比べ明らかに強い抗菌活性を示した。また, わが国でもニューキノロン系抗菌薬耐性菌が 1995 年分離株から検出されているにもかかわらず, その後このタイプの耐性株の報告がみられず, 本検討においても合計 173 株について GFLX と LVFX の MIC を測定したが, 低感受性や耐性株は検出されなかった⁹⁾。これは, 本菌種による感染症の頻度の高い小児ではこの系統の抗菌薬が使用されないことが, ひとつの要因と推察される。

前述したようにわが国においては, 本菌種による感染症患者にセフェム系の経口抗菌薬の投与がしばしば行われている。しかし, この系統抗菌薬に対し, 本実験でも確認されたように BLNAR 株に対する抗菌活性は低下する。したがって, このような BLNAR 株にも有効な抗菌薬として, ニューキノロン系抗菌薬が挙げられるので, マウス気管支肺炎モデルで検討した。その結果, 1 mg/kg の GFLX を 2 回/日, 3 日間投与することにより検出限界以下まで菌を除菌した。一方, 10 mg/kg の CFPN-PI を投与した群でも, 無投与群に比べ有意差を

Table 2. Efficacy of gatifloxacin and cefcape pivoxil treatment in murine bronchopneumonia caused by BLNAR TUH 267

Infection	Treatment* (at a dose)	On 6-day post-infection
		Viable organisms (log ₁₀ cfu/tissues)
–	–	ND
+	–	7.17 ± 0.25
+	gatifloxacin (1 mg/kg)	<1
+	gatifloxacin (10 mg/kg)	<1
+	cefcape pivoxil (1 mg/kg)	6.89 ± 0.52
+	cefcape pivoxil (10 mg/kg)	5.23 ± 1.08**

ND: Not tasted

*twice a day for three days, **<0.05 vs untreated group

もって菌数減少が認められたが、1 mg/kg の GFLX 投与群に比べ治療効果は劣っていた。

本実験成績は、*H. influenzae* による呼吸器系感染症患者に対し GFLX での治療が有効であることを示唆している。

文 献

- 1) 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 小林玲子, 他: 化膿性髄膜炎から分離された *Streptococcus pneumoniae* の疫学調査。日化療会誌 51: 551~560, 2003
- 2) 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
- 3) Bell S M, Plowman D: Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from respiratory tract. *Lancet* i: 279~280, 1980
- 4) Markowitz S M: Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 80~83, 1980
- 5) 生方公子, 千葉菜穂子, 中山信子, 他: 薬剤耐性機構からみた β -lactamase 非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 (BLNAR) の特徴。日臨微生物会誌 9: 22~29, 1999
- 6) Miyazaki S, Fujikawa T, Kanazawa K, et al.: In vitro and in vivo activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *J Antimicrob Chemother* 48: 723~726, 2001
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods of dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—Third edition: Approved standard. NCLLS document M7-A3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA., 1993
- 8) Miyazaki S, Nunoya T, Matsumoto T, et al.: New murine model of bronchopneumonia due to cell-bound *Haemophilus influenzae*. *J. Infect Dis* 175: 205~209, 1997
- 9) 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* および *Moraxella catarrhalis* の抗生物質感受性: 1994~1995 年の検討。 *Jpn J Antibio* 50: 768~775, 1997

Efficacy of gatifloxacin in murine bronchopneumonia caused by β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

Shuichi Miyazaki, Intetsu Kobayashi and Keizo Yamaguchi

Department of Microbiology Toho University School of Medicine, Omori-nishi
5-21-16, Ota-ku, Tokyo, Japan

The *in vitro* and *in vivo* activity of gatifloxacin against clinical isolated BLNAR strains was examined. The *in vitro* activity of gatifloxacin against *Haemophilus influenzae* including ampicillin-resistant isolates was high potent as well as levofloxacin. Those of cefcapene and cefditoren as the third generation cephem against BLPAR isolates and BLNAR isolates became gradually weaker than against ampicillin-susceptible isolates. In the BLNAR TUH 267 bronchopneumonia mice treated with a drug twice a day for three days, the number of bacteria in the infected tissues of mice treated with gatifloxacin at a dose of 1 mg/kg was less than the detectable limit. In the group of mice treated with cefcapene pivoxil at a dose of 10 mg/kg, the viable counts decreased significantly, compared with those in untreated mice. The present data indicate that gatifloxacin may directly decrease the rectal temperature.