

【原著・基礎】

マウス混合肺感染モデルに対する amoxicillin から cefditoren pivoxil への切り換え療法

武藤 祐子・清水 敦之・高田 利彦・渡部 宏臣・疋田 宗生

明治製菓株式会社感染症研究所*

(平成 16 年 3 月 1 日受付・平成 16 年 4 月 22 日受理)

Penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PSSP) と β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) によるマウス混合肺感染モデルを用いて, cefditoren pivoxil (CDTR-PI) または amoxicillin (AMPC) の治療効果を検討した。

その結果, PSSP に対して CDTR-PI では 30 mg/kg/day 以上で, また AMPC においては 18.8 mg/kg/day 以上の投与量においてそれぞれ治療効果がみられた。一方, BLNAR に対して CDTR-PI は 7.5 mg/kg/day 以上の投与量において治療効果を示したが, AMPC では 300 mg/kg/day の投与量においても効果がみられなかった。

さらに, BLNAR に対して AMPC から CDTR-PI へ切り換え治療を行うことで治療効果が認められた。しかし, cefcapene pivoxil および cefdinir への切り換えでは AMPC 単独での治療効果と差が認められなかった。これより, *S. pneumoniae* と *H. influenzae* の混合感染症の第一選択薬としてのみならず, たとえ AMPC からの第二選択薬としても CDTR-PI を選択することにより, 本症を根治させ得る可能性を示すものである。

Key words: cefditoren pivoxil, amoxicillin, mixed lung infection, β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae*, oral cepheems

市中呼吸器感染症における主な起因菌は *Streptococcus pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* であり, これらの菌種は特に小児科領域において混合感染として分離されることが多い¹⁻³⁾。Cefditoren pivoxil (CDTR-PI) はこれら 2 菌種に対して強い抗菌力を示し⁴⁻⁶⁾, バランスの良い治療効果を期待できる。これまでにわれわれは penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) と β -lactamase negative ampicillin resistant *H. influenzae* (BLNAR) との混合感染を想定したマウス肺感染モデルを用い, 他経口薬に比較して CDTR-PI のバランスの良い治療効果を明らかにした⁷⁾。今回は PSSP と BLNAR のマウス混合肺感染モデルを用いて AMPC による治療を行い, その後セフェム系抗菌薬である CDTR-PI, cefcapene pivoxil (CFPN-PI) または cefdinir (CFDN) への切り換え治療効果を比較検討した。

I. 材料と方法

1. 使用動物

4 週齢の雄性 CBA/J マウス (日本チャールス・リバー (株)) を用いた。易感染の目的で感染前日に cyclophosphamide (Sigma 社, Lot No. 91K1176, 含量 92.4%) を 200 mg/kg 腹腔内投与し, 免疫低下を惹起した。

2. 使用菌株

当研究所に保存されている臨床分離株, *S. pneumoniae* MSC-178 および *H. influenzae* TH-1562 を使用し

た。*S. pneumoniae* MSC-178 は penicillin G の MIC (0.016 μ g/mL) から PSSP とし, *H. influenzae* TH-1562 については, ニトロセフィン法による β -lactamase 産生の有無ならびに penicillin-binding protein (PBP) 3 コード遺伝子 (*fts I* 領域) のアミノ酸配列の解析⁸⁾により BLNAR と確認した。なお, *S. pneumoniae* MSC-178 に対する CDTR, AMPC, CFPN および CFDN の MIC はそれぞれ 0.008, 0.031, 0.008 および 0.063 μ g/mL であり, *H. influenzae* TH-1562 に対する MIC はそれぞれ 0.031, 1, 0.125 および 1 μ g/mL であった。

3. 使用抗菌薬

抗菌薬は力価の明らかな以下の市販製剤を使用した。CDTR-PI (明治製菓 (株)), AMPC (藤沢薬品工業 (株)), CFPN-PI (塩野義製薬 (株)) および CFDN (藤沢薬品工業 (株)) である。

4. 肺感染モデルの作製

肺感染モデルは, 既報^{7,9)}の方法を用いて作製した。

1) 接種菌液の調製

下記の方法で調製した *S. pneumoniae* と *H. influenzae* の各菌液を接種菌液とした。*S. pneumoniae*: 5% 馬無菌脱線維血液 (日本生物材料センター (株)) 加 brain heart infusion agar (BHIA, Difco 社) に増殖させた *S. pneumoniae* MSC-178 を brain heart infusion broth

* 神奈川県横浜市港北区師岡町 760

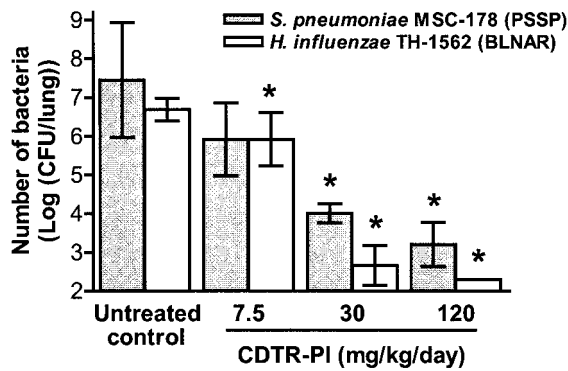


Fig. 1. Therapeutic effect of cefditoren pivoxil of 7.5, 30, and 120 mg/kg/day on the number of bacteria in the lungs of mice with pneumonia caused by penicillin-susceptible *S. pneumoniae* MSC-178 and β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* TH-1562. Mice were intranasally infected with 10^6 CFU/mice of PSSP and BLNAR, 1 day after intraperitoneal administration of cyclophosphamide (200 mg/kg). Cefditoren pivoxil was orally administered 3 times a day for 3 days. Columns show means \pm S.D., $n = 4-5$. *: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

CDTR-PI: cefditoren pivoxil

(BHIB, Difco社)に接種し, 37°Cで一晩培養した。培養後, 新鮮BHIBに接種し, 波長660 nm(分光光度計 日立U-2000A)での濁度が約0.8になるまで37°Cで数時間培養した。

H. influenzae: 5%馬脱線維血液加チヨコレートBHIAに増殖させた*H. influenzae* TH-1562をBHIBに懸濁し, 波長660 nmでの濁度が約0.75となるように調製した。

2) 感染実験

免疫低下マウスにケタミン(動物用50 mg/mL溶液, 三共(株))およびキシラジン(動物用2%注射液, パイエル薬品(株))の混合液(ケタミン:キシラジン:生理食塩液(大塚製薬(株))=2:1:2)50 μ Lを筋肉内投与して麻酔し, 上記接種菌液の30 μ Lを経鼻接種して感染を惹起した。

3) 抗菌薬投与

抗菌薬を0.5%メチルセルロースに懸濁し, 感染1日後より1日3回投与で3日間, 計9回経口投与した。各抗菌薬の投与量はすでに報告している基準⁷⁾に従い, 臨床投与量比で設定した。CDTR-PIおよびAMPCの用量検討における投与量は, それぞれ7.5, 30, 120 mg/kg/dayおよび18.8, 75, 300 mg/kg/dayとした。AMPC 300 mg/kg/dayからの切り換え治療検討では, CDTR-PIおよびCFPN-PIの投与量を120 mg/kg/dayとした。また, AMPC 75 mg/kg/dayからの切り換えでは, CDTR-PI,

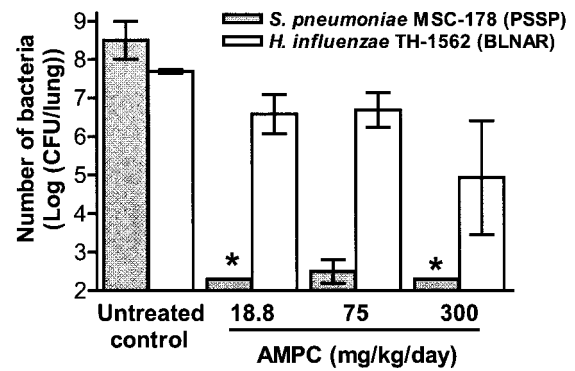


Fig. 2. Therapeutic effect of amoxicillin of 18.8, 75, or 300 mg/kg/day on the number of bacteria in the lungs of mice with pneumonia caused by *S. pneumoniae* MSC-178 and *H. influenzae* TH-1562. Mice were intranasally infected with 10^6 CFU/mice of PSSP and BLNAR, 1 day after intraperitoneal administration of cyclophosphamide (200 mg/kg). Amoxicillin was orally administered 3 times a day for 3 days. Columns show means \pm S.D., $n = 3-5$. *: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

AMPC: amoxicillin

CFPN-PIおよびCFDNの投与量を30 mg/kg/dayとした。

5. 感染後の肺内生菌数測定

感染4日後にマウスの肺を無菌的に摘出し, 1.8 mLの生理食塩液の入ったガラスホモジナイザーで肺ホモジネート液を作製した。それぞれのホモジネート液の10倍希釈系列を作製し, 選択培地に希釈液の100 μ Lを塗抹した。なお, PSSPの選択培地として0.25 μ g/mLのnorfloxacin (Sigma社)含有5%馬脱線維血液加BHIAを, BLNARの選択培地には5 μ g/mLのvancomycin (Sigma社)含有5%馬脱線維血液加isovitalex-enrichment (BBL社)加チヨコレートBHIAをそれぞれ用いた。37°Cで一晩培養後, 発育したコロニー数を測定し, 希釈率とコロニー数から肺内生菌数を算出した。本方法による生菌数の検出限界は 2.0×10^2 CFU/lungであった。

6. データ処理

肺内生菌数は常用対数平均値 \pm 標準偏差(mean of \log_{10} CFU \pm S.D.)で表した。統計処理には薬効データ解析システムSAS ver. 1を用い, 抗菌薬非投与群を対照としてnonparametricなSteelの多重検定を行った。有意水準を5%とし, 抗菌薬非投与群と有意差が認められた群に関しては, さらにAMPC投与群を対照としてnonparametricなSteelの多重比較検定を行った。

II. 結果

1. CDTR-PIおよびAMPCの用量検討

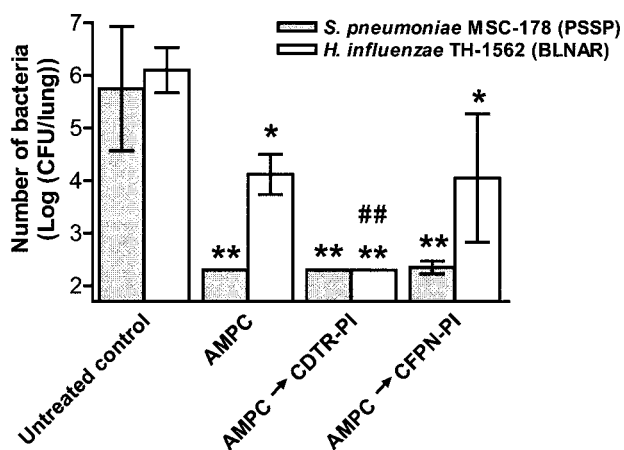


Fig. 3. Comparative therapeutic effect of amoxicillin alone when switching from amoxicillin to cefditoren pivoxil or cefcapene pivoxil on the number of bacteria in the lungs of mice with pneumonia caused by *S. pneumoniae* MSC-178 and *H. influenzae* TH-1562. Mice were intranasally infected with 10^6 CFU/mice of PSSP and of BLNAR, 1 day after intraperitoneal administration of cyclophosphamide (200 mg/kg). Amoxicillin was orally administered 3 times a day at a dose of 300 mg/kg/day. Cefditoren pivoxil and cefcapene pivoxil were orally administered 3 times a day at a dose of 120 mg/kg/day for 2 days following oral administration of amoxicillin at a dose of 300 mg/kg/day for 1 day. Columns show means \pm S. D., n = 6. *: P < 0.05, **: P < 0.01 versus untreated control by Steel's multiple comparison test. ##: P < 0.01 versus amoxicillin by Steel's multiple comparison test. AMPC: amoxicillin, CDTR-PI: cefditoren pivoxil, CFPN-PI: cefcapene pivoxil

PSSP と BLNAR を肺感染させ、CDTR-PI を 7.5, 30 および 120 mg/kg/day 投与すると、投与量依存的に両菌種の肺内生菌数の増殖抑制がみられ、特に PSSP に対しては 30 mg/kg/day 以上の、BLNAR に対してはいずれの投与量においても、抗菌薬非投与群に対し有意な抑制効果を示した (Fig. 1)。AMPC では、PSSP に対していずれの投与量 (18.8, 75 および 300 mg/kg/day) でも肺内生菌数を検出限界まで抑制したが、BLNAR に対しては 300 mg/kg/day においてのみ抑制効果がみられ、特に PSSP に対して 18.8 および 300 mg/kg/day において抗菌薬非投与群に対し有意な抑制効果を示した (Fig. 2)。

2. AMPC 300 mg/kg/day からの切り換え治療検討

AMPC 300 mg/kg/day の 3 日間投与により、PSSP の肺内生菌数は検出限界まで抑制され、一方、BLNAR の肺内生菌数は抗菌薬非投与群に対して有意に約 1.5 log CFU 抑制された (Fig. 3)。

AMPC を 1 日投与後 CDTR-PI 120 mg/kg/day に切り換えて 2 日間投与すると、BLNAR の肺内生菌数を検出限

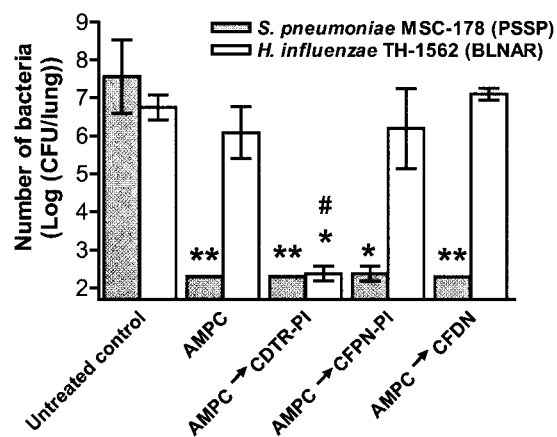


Fig. 4. Comparative therapeutic effect of amoxicillin alone when switching from amoxicillin to cefditoren pivoxil, cefcapene pivoxil, or cefdinir on the number of bacteria in the lungs of mice with pneumonia caused by *S. pneumoniae* MSC-178 and *H. influenzae* TH-1562. Mice were intranasally infected with 10^6 CFU/mice of PSSP and BLNAR, 1 day after intraperitoneal administration of cyclophosphamide (200 mg/kg). Amoxicillin was orally administered 3 times a day at a dose of 75 mg/kg/day. Cefditoren pivoxil, cefcapene pivoxil, and cefdinir were orally administered 3 times a day at a dose of 30 mg/kg/day for 2 days following oral administration of amoxicillin at a dose of 75 mg/kg/day for 1 day. Columns show means \pm S. D., n = 6. *: P < 0.05, **: P < 0.01 versus untreated control by Steel's multiple comparison test. #: P < 0.05 versus amoxicillin by Steel's multiple comparison test.

AMPC: amoxicillin, CDTR-PI: cefditoren pivoxil, CFPN-PI: cefcapene pivoxil, CFDN: cefdinir

界まで抑制し、その効果は抗菌薬非投与群および AMPC 3 日間投与群に対して有意であった (Fig. 3)。しかし、AMPC を 1 日投与後 CFPN-PI 120 mg/kg/day に切り換えて 2 日間投与すると、BLNAR の肺内生菌数を抗菌薬非投与群に対して有意に抑制するものの、AMPC 3 日間投与群とは有意な差を示さなかった。

AMPC を 2 日間投与後 CDTR-PI 120 mg/kg/day に切り換えて 1 日投与すると、BLNAR の肺内生菌数を抑制し、その効果は抗菌薬非投与群および AMPC 3 日間投与群に対しても有意であった (データ未掲載)。しかし、AMPC を 2 日間投与後 CFPN-PI 120 mg/kg/day に切り換えて 1 日投与すると、BLNAR の肺内生菌数に対し抑制傾向を示すものの、抗菌薬非投与群および AMPC 3 日間投与群とは有意な差を示さなかった。

3. AMPC 75 mg/kg/day からの切り換え治療検討

AMPC 75 mg/kg/day の 3 日間投与により、PSSP の肺内生菌数は検出限界まで抑制されたが、BLNAR の肺内

生菌数は抑制されなかった (Fig. 4)。

AMPC を 1 日投与後 CDTR-PI 30 mg/kg/day に切り換えて 2 日間投与すると, BLNAR の肺内生菌数を抑制し, その効果は抗菌薬非投与群および AMPC 3 日間投与群に対して有意であった (Fig. 4)。しかし, AMPC を 1 日投与後 CFPN-PI 30 mg/kg/day に切り換えて 2 日間投与すると, BLNAR の肺内生菌数を抗菌薬非投与群に対して有意に抑制するものの, AMPC 3 日間投与群とは有意な差を示さなかった。また, AMPC を 1 日投与後 CFDN 30 mg/kg/day に切り換えて 2 日間投与すると, BLNAR の肺内生菌数抑制効果は認められなかった。

AMPC を 2 日間投与後 CDTR-PI 30 mg/kg/day に切り換えて 1 日投与すると, BLNAR の肺内生菌数抑制効果は認められなかった (データ未掲載)。AMPC を 2 日間投与後 CFPN-PI または CFDN 30 mg/kg/day に切り換えて 1 日投与しても, BLNAR の肺内生菌数抑制効果は認められなかった。

III. 考 察

今回われわれは, PSSP と BLNAR のマウス混合肺感染モデルにおける, AMPC からセフェム系抗菌薬である CDTR-PI, CFPN-PI または CFDN への切り換え治療効果を検討した。その結果, AMPC は PSSP に対して治療効果を示すが BLNAR には治療効果を示さず, AMPC から CDTR-PI への切り換え治療により, PSSP および BLNAR どちらの菌種に対しても治療有効の可能性を示した。その一方, CFPN-PI または CFDN に切り換えるメリットは見出せなかった。これらの結果は CDTR の BLNAR に対する優れた抗菌力を反映したものである^{6,10)}。

CDTR は他経口セフェム系抗菌薬に比べて *H. influenzae* 特に BLNAR に対し優れた抗菌力を有する^{6,9,11,12)}。本邦における BLNAR の分離頻度は増加の一途をたどっており, 疾患領域による差はあるが, 1998 年では 3.2 ~ 24.4% であったのに対し 2000 年では 13.5 ~ 37% と顕著である^{6,10)}。このような状況において, BLNAR への優れた抗菌力を示す CDTR は特にキノロン系抗菌薬が使用できない小児科領域での市中呼吸器感染症の治療薬に推奨される。

Yamaguchi らは PSSP によるマウス肺感染モデルにおいて各種 β ラクタム系抗菌薬の治療効果を検討し, CDTR-PI では MIC から予想されるより弱い *in vivo* 効果が認められると報告した¹³⁾。この理由として, CDTR は他 β ラクタム系薬に比べてタンパク結合率が高いためと考えられる¹⁴⁾。Pharmacokinetics/pharmacodynamics を考慮した場合, 各種 β ラクタム系薬の治療効果は time above MIC ($T > MIC$) に依存し, CDTR-PI も同様のパラメータに依存することが明らかになっている¹⁵⁾。よって今回の結果は, マウスにおいて CDTR-PI 10 mg/kg 投与で治療効果を示すのに必要な $T > MIC$ が得られたためと考えられるが, 詳細な解析は未実施であり, AMPC

の前投与による効果も考えられる。また, 最近われわれが報告した PSSP と BLNAR とのマウス混合肺感染モデルにおいても, 両菌種に対して CDTR-PI の治療効果は認められている⁷⁾。よって, Yamaguchi らの結果との相違は, モデル, 使用菌株および抗菌薬の投与法の相違によるものと考えられるが, 今後さらなる検討が必要であろう。

以上より, PSSP および BLNAR のマウス混合肺感染モデルにおいて, CDTR-PI が BLNAR 治療効果において AMPC に比べて優れていること, さらに AMPC から CDTR-PI への治療切り換えにより BLNAR 治療効果が認められることが明らかになった。これは, *S. pneumoniae* と *H. influenzae* の混合感染症の第一選択薬としてのみならず, たとえ AMPC からの第二選択薬としても CDTR-PI を選択することにより, 本症を根治させ得る可能性を示すものである。

謝 辞

本報告に際し, 実験に協力いただきました明治製薬 (株) 感染症研究所 山上陽子氏に対し, この紙面をお借りして深謝いたします。

文 献

- 1) 山中 昇: 耳鼻咽喉科感染症におけるガイドライン (1)。化学療法の領域 18: 62 ~ 68, 2002
- 2) 杉田麟也: 上気道感染症, 特に急性中耳炎。化学療法の領域 19: 1918 ~ 1925, 2003
- 3) 宮下修行, 深野浩史, 松島敏春: 市中肺炎。医薬ジャーナル 39: 2763 ~ 2770, 2003
- 4) Clark C L, Nagai K, Dewasse B E, et al: Activity of cefditoren against respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother 50: 33 ~ 41, 2002
- 5) 吉田 勇, 木村美司, 東山伊佐夫, 他: 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス 2000 年分離グラム陽性球菌および嫌気性菌に対する抗菌力。日化療会誌 51: 179 ~ 208, 2003
- 6) 吉田 勇, 杉森義一, 東山伊佐夫, 他: 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス 2000 年分離グラム陰性菌に対する抗菌力。日化療会誌 51: 209 ~ 232, 2003
- 7) 金子真紀, 高田利彦, 清水敦之, 他: *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。日化療会誌 51: 626 ~ 630, 2003
- 8) 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
- 9) 清水敦之, 金子真紀, 石川みどり, 他: β -lactamase 非産生 *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 ~ 166, 2003
- 10) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他: 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析 肺炎球菌等による市中

- 感染症研究会収集株のまとめ。日化療会誌 50: 794 ~ 804, 2002
- 11) 黒崎知道: 臨床における今日の問題と対応~小児科領域~。化学療法の領域 18: 1123 ~ 1130, 2002
- 12) 菊地 暢, 渡辺 彰: BLNAR 感染症。化学療法の領域 19: 1265 ~ 1268, 2003
- 13) 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
- 14) 松元 隆, 岡本淳一, 斉藤光一, 他: 新経口セフェム剤, ME1207 の実験動物における体内動態。Chemotherapy 40 (Suppl 2) 120 ~ 129, 1992
- 15) Darkes M J M, Plosker G L: Cefditoren pivoxil. Drugs 62: 319 ~ 336, 2002

Efficacy of a therapy switching from amoxicillin to cefditoren pivoxil against a mixed pneumonia model in mice

Yuko Muto, Atsuyuki Shimizu, Toshihiko Takata,
Hiroomi Watabe and Muneo Hikida

Infectious Disease Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

We studied the therapeutic efficacy of cefditoren pivoxil (CDTR-PI) and amoxicillin (AMPC) against a mixed pneumonia model of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PSSP) and β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) in mice. The efficacy of CDTR-PI against PSSP was observed at doses of 30 mg/kg/day or higher, and of AMPC at doses of 7.5 mg/kg/day or higher. CDTR-PI treatment against BLNAR also showed therapeutic efficacy at doses of 18.8 mg/kg/day or higher, unlike AMPC. Moreover, the efficacy of a therapy switching from AMPC to CDTR-PI was superior to that of AMPC monotherapy against BLNAR. The effect of switching from AMPC to CFPN-PI and CFDN was approximately equal to that of AMPC monotherapy. This suggests that CDTR-PI is likely to become the drug of choice due to its balanced activity against mixed infection caused by *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. CDTR-PI is likely to become the drug of second choice in failure of AMPC therapy as the first choice.