

【原著・基礎】

Tebipenem pivoxil の *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対する
抗菌活性とマウス大腿感染モデルを用いた PK-PD 解析菅野 利恵・吉田 卓史・山田 恵子・清水 敦之
森田 順・木島 功嗣・前橋 一紀・芝崎 茂樹

明治製菓株式会社医薬総合研究所*

(平成 20 年 10 月 7 日受付・平成 21 年 2 月 17 日受理)

新規経口カルバペネム系抗菌薬 tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の活性本体である tebipenem (TBPM) は、*Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* などの呼吸器感染症の主たる起炎菌に対して優れた抗菌活性を示す。本検討では、この 2 菌種に対する TBPM の殺菌力、post-antibiotic effect (PAE) ならびに TBPM-PI の *in vivo* 治療効果を検討した。TBPM は、両菌種に対して殺菌的に作用し、*S. pneumoniae* に対してセフェム系抗菌薬より長い PAE、*H. influenzae* に対してセフェム系抗菌薬より長い post-antibiotic sub-MIC effect を示した。また、penicillin 耐性 *S. pneumoniae* (PRSP) および β -ラクタマーゼ非産生 ampicillin 耐性 *H. influenzae* によるマウス呼吸器感染モデルに対して、TBPM-PI は cefditoren pivoxil および faropenem と同等以上の高い治療効果を示した。さらに、Craig の PK-PD 理論に基づいて、TBPM を単回皮下投与した時の薬物動態と PRSP によるマウス大腿感染モデルを用いて、TBPM の薬効に最も相関する pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) パラメータを明らかにした。TBPM の各種用法用量における PK-PD パラメータと薬効との関係を sigmoidal E_{max} model を用いて解析した結果、3 つのパラメータ (AUCf/MIC、 C_{maxf}/MIC および Time above MIC ($T > MIC$)) はいずれも TBPM の薬効と相関し、AUCf/MIC ($R^2 : 88\%$) および C_{maxf}/MIC ($R^2 : 87\%$) が $T > MIC$ ($R^2 : 77\%$) に比べて高い相関を示した。

Key words: tebipenem pivoxil, antimicrobial activity, animal model, PK-PD

Tebipenem pivoxil (TBPM-PI, 開発コード: ME1211 または L-084) は、ワイス株式会社 (旧 日本ワイスレグリー株式会社) で発見され、明治製菓株式会社が開発中の世界で初めての経口カルバペネム系抗菌薬である¹⁾。TBPM-PI は、C3 位側鎖にチアゾリニルアゼチジン基をもつことが特徴であり、活性本体である tebipenem (TBPM, 開発コード: L-036 または LJC11,036) の C2 位カルボン酸をピボキシル基でエステル化することにより経口吸収性を向上させたプロドラッグである (Fig. 1)。TBPM は幅広い抗菌スペクトルを有し、*Enterococcus faecium* および *Pseudomonas aeruginosa* など一部の菌種を除く多くの臨床分離株に対し、ペニシリン系やセフェム系抗菌薬より強く、他の注射用カルバペネム系抗菌薬と同程度以上の強い抗菌力を示す^{1,2)}。

本検討では、小児の感染症治療上、近年特に問題となっている penicillin 耐性 *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) あるいは β -ラクタマーゼ非産生 ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* (BLNAR) に対する TBPM の *in vitro* ならびに *in vivo* 抗菌活性について検討した。さらに、Craig の PK-PD 理論³⁾ に基づいて、PRSP を用いたマウス大腿感染モデルを用いて

pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) 解析を実施したところ、従来の β -ラクタム系抗菌薬とは異なる解析結果を示すことが明らかとなったので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用抗菌薬

In vitro 試験およびマウス大腿感染モデルでの試験には TBPM (明治製菓 (株)) を、マウス呼吸器感染モデルでの試験には TBPM-PI (明治製菓 (株)) を用いた。また、対照薬として、力価の明らかな cefditoren (CDTR; 明治製菓 (株)) または cefditoren pivoxil (CDTR-PI; 明治製菓 (株))、faropenem (FRPM; サントリー (株))、市販錠剤からの抽出品 および levofloxacin (LVFX; Sequoia Research Products) を使用した。

2. 使用菌株

明治製菓 (株) 医薬総合研究所保存の臨床分離 *S. pneumoniae*、*H. influenzae* ならびに American Type Culture Collection (ATCC) 由来株を使用した。試験に用いた菌株とそれらの薬剤感受性を Table 1 に示した。なお、*S. pneumoniae* においては、penicillin G の薬剤感受性を基

*神奈川県横浜市港北区師岡町 760

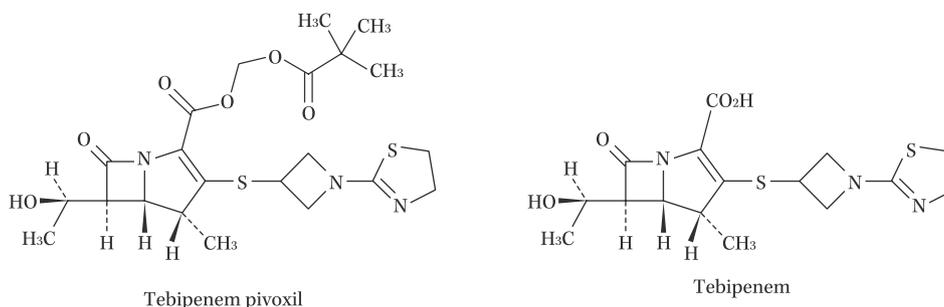


Fig. 1. Chemical structure of tebipenem pivoxil and tebipenem.

Table 1. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains

Organism ^{a)}		MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
		Tebipenem	Cefditoren	Faropenem	Levofloxacin	Penicillin G	Ampicillin
PSSP	ATCC10813 ^{b)}	0.002	0.015	0.015	1	0.015	NT ^{f)}
	SP00253 ^{b)}	0.002	0.06	0.008	1	0.03	NT
	SP00285 ^{b)}	0.002	0.25	0.015	1	0.06	NT
	SP00306 ^{b)}	0.002	0.03	0.008	2	0.03	NT
	SP00328 ^{b)}	0.002	0.12	0.015	1	0.06	NT
PISP	ATCC49619 ^{c)}	0.015	0.06	0.12	1	0.5	NT
PRSP	SP00084 ^{b)}	0.12	4	2	1	4	NT
	SP00214 ^{b)}	0.06	1	0.5	1	2	NT
	SP00218 ^{b)}	0.03	0.5	0.5	1	2	NT
	SP00324 ^{b)}	0.03	0.5	0.5	1	2	NT
	SP00366 ^{e)}	0.06	0.5	0.5	1	2	NT
	SP00337 ^{b)}	0.06	1	0.5	1	2	NT
BLNAS	ATCC49766 ^{b), c)}	0.12	0.015	0.5	0.03	NT	0.25
<i>H. influenzae</i>	HI00545 ^{b), d)}	0.12	0.015	0.5	0.015	NT	0.5
	HI00549 ^{b)}	0.12	0.015	0.5	0.015	NT	0.5
	HI00572 ^{b)}	0.06	0.015	1	0.015	NT	0.5
	HI00586 ^{b), d)}	0.25	0.015	0.5	0.03	NT	0.5
	HI00726 ^{d)}	0.06	0.03	0.5	0.03	NT	0.25
	HI00759 ^{b), d)}	0.5	0.03	8	0.015	NT	1
BLNAR	HI00542 ^{b), d)}	0.5	0.5	4	0.03	NT	16
<i>H. influenzae</i>	HI00547 ^{b), d), e)}	0.5	0.25	4	0.03	NT	16
	HI00565 ^{d)}	4	0.12	16	0.03	NT	32
	HI00676 ^{b), d)}	4	0.12	8	0.03	NT	16
	HI00713 ^{b), d)}	1	0.06	8	0.03	NT	2

^{a)}PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$)

PISP: penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $0.12 - 1 \mu\text{g/mL}$)

PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)

BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible strains (MIC of ampicillin: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$)

BLNAR: β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant strains (MIC of ampicillin: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)

^{b)}applied to the examination for bactericidal activity

^{c)}applied to the examination for post-antibiotic effect

^{d)}applied to the examination for post-antibiotic sub-MIC effect

^{e)}applied to the examination for mouse respiratory infection model

^{f)}NT: not tested

に、penicillin G の MIC が $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ である penicillin 感性株を PSSP と、 $0.12 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ である penicillin 中等度耐性株を PISP と、 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ である penicillin 耐性株を PRSP と表記した。また、*H. influenzae* においては、ampicillin の感受性を基に、ampicillin の MIC が $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ である β -ラクタマーゼ非産生株を BLNAS と、ampicillin の MIC が $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ である β -ラクタマー

ゼ非産生株を BLNAR と表記した。

3. 使用動物

PRSP による呼吸器感染モデルには CBA/JN マウス (雌性, 5 週齢, 日本チャールスリバー) を、BLNAR *H. influenzae* による呼吸器感染モデルには感染 2 日前に cyclophosphamide (200 mg/kg) の腹腔内投与により白血球を減少させた CBA/JN マウス (雌性, 5 週齢, 日本

Table 2. Bactericidal activity of tebipenem against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

Organism ^{a)}	Antimicrobial agent	Concentration	No. of strains demonstrating -1, -2 or -3 log ₁₀ killing ^{b)}					
			exposure: 2 h			exposure: 4 h		
			- 1	- 2	- 3	- 1	- 2	- 3
PSSP (5 strains)	Tebipenem	4 × MIC	5	5	4 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
		2 × MIC	4	4	3 ^{c)}	5	5	3 ^{c)}
	Cefditoren	4 × MIC	5	3	1 ^{c)}	5	5	2 ^{c)}
		2 × MIC	4	3	2 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
	Faropenem	4 × MIC	5	5	4 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
		2 × MIC	5	4	4 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
	Levofloxacin	4 × MIC	5	4	4 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
		2 × MIC	5	4	1 ^{c)}	5	5	4 ^{c)}
PRSP (5 strains)	Tebipenem	4 × MIC	5	5	2	5	5	4
		2 × MIC	5	4	2	5	4	1
	Cefditoren	4 × MIC	5	2	0	5	5	2
		2 × MIC	4	2	0	5	4	2
	Faropenem	4 × MIC	5	4	3	5	5	3
		2 × MIC	5	5	3	5	5	4
	Levofloxacin	4 × MIC	5	5	2	5	5	5
		2 × MIC	5	5	2	5	5	2
BLNAS <i>H. influenzae</i> (6 strains)	Tebipenem	4 × MIC	3	0	0	4	2	0
		2 × MIC	2	0	0	5	1	0
	Cefditoren	4 × MIC	1	0	0	6	4	0
		2 × MIC	2	0	0	6	4	0
	Faropenem	4 × MIC	1	0	0	5	0	0
		2 × MIC	3	0	0	5	0	0
	Levofloxacin	4 × MIC	6	6	4	6	6	6
		2 × MIC	4	4	1	6	4	4
BLNAR <i>H. influenzae</i> (4 strains)	Tebipenem	4 × MIC	0	0	0	3	1	0
		2 × MIC	1	0	0	1	1	0
	Cefditoren	4 × MIC	1	0	0	3	1	1
		2 × MIC	1	0	0	3	2	1
	Faropenem	4 × MIC	0	0	0	3	0	0
		2 × MIC	0	0	0	1	0	0
	Levofloxacin	4 × MIC	4	4	4	4	4	4
		2 × MIC	4	3	0	4	4	4

^{a)}see Table 1

PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$)

PISP: penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $0.12-1 \mu\text{g/mL}$)

PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)

BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible strains (MIC of ampicillin: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$)

BLNAR: β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant strains (MIC of ampicillin: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)

^{b)} $\angle \log_{10}$ CFU/mL lower than at 0 h:

-1 log₁₀ CFU/mL = 90% killing; -2 log₁₀ CFU/mL = 99% killing; -3 log₁₀ CFU/mL = 99.9% killing

^{c)}99.9% killing was calculated for 4 strains.

チャールスリバー)を使用した。マウス大腿感染モデルおよび薬物動態試験には、感染4日前に cyclophosphamide (200 mg/kg) の腹腔内投与により白血球を減少させた ICR マウス(雄性, 4 週齢, 日本チャールスリバー)を使用した。動物実験は、いずれも明治製菓(株)の動物実験管理に関する指針に基づいて実施された。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

MIC は、日本化学療法学会標準法の寒天平板希釈法⁴⁾に準じ、CLSI の標準法⁵⁾を参考に測定した。すなわち、

S. pneumoniae の測定には 5% 綿羊無菌脱繊維血液(日本バイオテスト)加 Mueller-Hinton agar (MHA, Becton Dickinson), *H. influenzae* の測定には 15 mg/L hematin, 15 mg/L NAD, 5 g/L yeast extract 加 MHA を使用して 35°C, 5~6%CO₂条件下で 20~24 時間培養した。精度管理には、CLSI 標準法の精度管理株を用いた。PK-PD 解析においては、通常の 1 $\mu\text{g/mL}$ を基準とした 2 倍希釈系列に加えて、1.2 および 1.6 $\mu\text{g/mL}$ を基準とした 2 倍希釈系列を作製し、これら 3 系列において得られた最

Table 3. Postantibiotic effect of tebipenem against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

Organism	Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PAE (h) ^{b)}	
			1 \times MIC	4 \times MIC
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	Tebipenem	0.015	0.79 \pm 0.43 ^{a)}	1.60 \pm 0.19
	Cefditoren	0.06	0.07 \pm 0.05	1.03 \pm 0.10
	Faropenem	0.12	0.68 \pm 0.22	1.76 \pm 0.04
	Levofloxacin	1	0.48 \pm 0.30	0.93 \pm 0.50
<i>H. influenzae</i> ATCC49766	Tebipenem	0.12	- 0.31 \pm 0.13	- 0.12 \pm 0.05
	Cefditoren	0.015	- 0.48 \pm 0.10	- 0.54 \pm 0.08
	Faropenem	0.5	- 0.33 \pm 0.10	- 0.44 \pm 0.13
	Levofloxacin	0.03	1.02 \pm 0.07	NM ^{c)}

^{a)}Values are mean \pm standard deviation for three experiments

^{b)}Exposure for 1 h at 1 or 4 \times MIC

^{c)}NM: not measurable

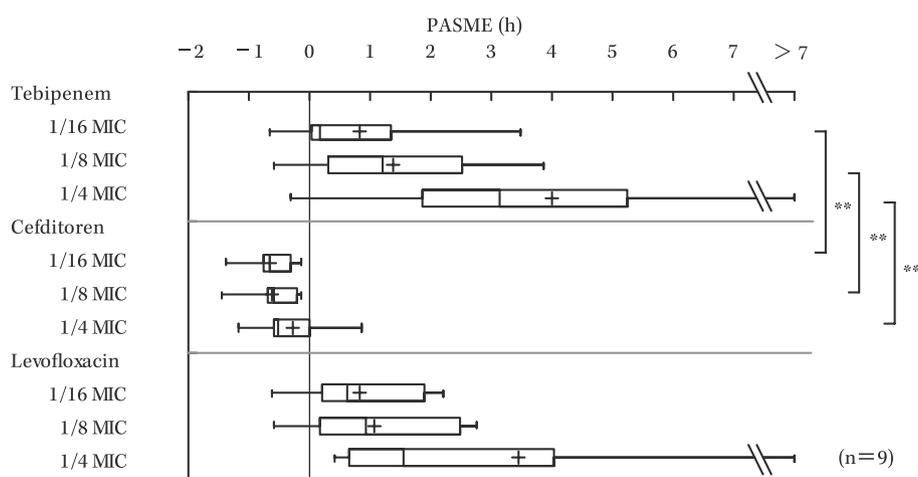


Fig. 2. Postantibiotic sub-MIC effect of tebipenem on 9 *Haemophilus influenzae* strains.

Data is shown as box plots in which 50% of values lie within the box. Horizontal lines drawn through the middle of boxes represent median values. Both ends of whiskers are the smallest and largest values, plus (+) shows the mean.

** : $p < 0.01$, significant differences from the tebipenem-exposed group (Steel's multiple test)

Test strains: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible and β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* (See Table 1).

Exposure: 1 \times MIC, 1 h

小発育阻止濃度を MIC とした。

5. *In vitro* 殺菌力

5% 馬脱纖維血液加 brain heart infusion agar (BHIA, Difco) 平板または同チョコレート平板で培養した *S. pneumoniae* または *H. influenzae* を、それぞれ 2% 馬溶血液 (LHB) 加 cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB), または 15 mg/L hematin, 15 mg/L NAD および 5 g/L yeast extract 加 CAMHB (*Haemophilus* test medium : HTM) で 35°C, 2 時間培養した。その後, 2 または 4 \times MIC となるよう抗菌薬を添加し (薬物作用時の *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の菌量は、それぞれ約 $10^5 \sim 10^6$ および $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL), 0, 2 および 4 時間後の生菌数を測定した。*S. pneumoniae* は 5% 馬脱纖維血液加 BHIA 平板に, *H. influenzae* は 5% 馬脱纖維血液

加 BHIA チョコレート平板に塗抹し, 35°C, 5~6% CO₂ 条件下で 22~26 時間培養後, 発育したコロニー数を測定した。

6. Post-antibiotic effect (PAE) および post-antibiotic sub-MIC effect (PASME)

S. pneumoniae ATCC49619 および *H. influenzae* ATCC 49766 を用いて PAE を, BLNAS *H. influenzae* および BLNAR *H. influenzae* 計 9 株を用いて PASME を検討した。*S. pneumoniae* は 2% LHB 加 CAMHB で, *H. influenzae* は HTM で 35°C, 2 時間培養後, 1 および 4 \times MIC (PASME 試験では 1 \times MIC のみ) となるよう抗菌薬を添加し (薬物作用時の菌量は約 $2 \sim 7 \times 10^6$ CFU/mL), 35°C で 1 時間培養した。その後, 希釈 (1/1,000) により薬物の影響を除去し, PAE 試験では薬物非含有培地, PASME

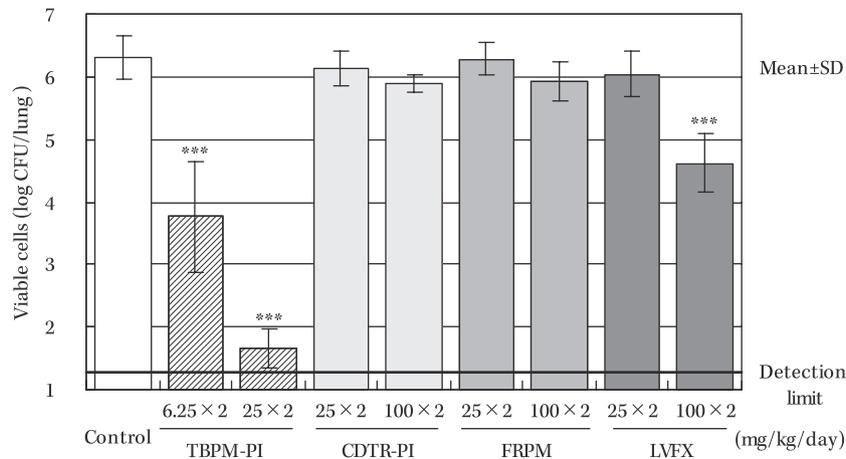


Fig. 3. Therapeutic efficacy of tebipenem pivoxil against respiratory infection by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in mice.

Animal: CBA/JN mice (5 weeks old, female), n = 8

Infection: penicillin-resistant *S. pneumoniae* SP00366 ($4.8-5.3 \times 10^6$ CFU/mouse)

Therapy: orally administered with tebipenem pivoxil (TBPM-PI), cefditoren pivoxil (CDTR-PI), faropenem sodium (FRPM) and levofloxacin (LVFX) 24 h and 36 h after infection

Viable cell counts: CFU/lung determined 48 h after infection

Detection limit: $1.28 \log_{10}$ CFU/lung

***: $p < 0.001$, significant difference from control (Dunnett's multiple test)

試験では $1/16$, $1/8$ または $1/4 \times \text{MIC}$ の抗菌薬含有培地にて 35°C でさらに培養し, 0, 2, 4, 6, 8 および 12 時間後の生菌数を測定した。薬剤除去後の菌数が 1 log 増殖する時間から, 薬物非作用群の菌数が 1 log 増殖する時間を引くことによって, PAE および PASME を算出した。

7. マウス呼吸器感染モデルに対する治療効果

PRSP SP00366 は brain heart infusion broth (BHIB, Difco) にて 35°C , 一夜培養後, 濁度 ($\text{OD}_{625\text{nm}}$) を約 0.5 に調整したものを接種菌液とし, BLNAR *H. influenzae* HI00547 は 15 mg/L hematin および 15 mg/L NAD 加 BHIB にて 35°C , 一夜培養後, 濁度 ($\text{OD}_{580\text{nm}}$) を約 0.4 に調整し, 同培地を用いて 10 倍に希釈したものを接種菌液とした。塩酸ケタミン/キシラジン塩酸塩の混合液の腹腔内投与により麻酔したマウスに, 接種菌液の $20 \mu\text{L}$ を経鼻接種し, 感染を惹起させた。

感染 24 および 36 時間後に, 0.5% カルボキシメチルセルロースに懸濁した薬物溶液または溶媒を経口投与した (投与容量: 10 mL/kg , $n=8$)。感染 48 時間後に, マウスの肺を無菌的に摘出し, 1.8 mL の生理食塩液を加え, ガラスホモジナイザーを用いてホモジネート液を調製した。それぞれのホモジネート液の 10 倍希釈系列を作製し, その $100 \mu\text{L}$ を PRSP は 5% 馬脱繊維血液加 BHIA 平板に, BLNAR *H. influenzae* は 5% 馬脱繊維血液加 BHIA チョコレート平板に塗抹した。 35°C , $5-6\% \text{CO}_2$ 条件下で 22~23 時間培養後, 発育したコロニー数を測定

した。肺重量は 1 g を 1 mL として換算し, 各個体の肺内生菌数 ($\log \text{CFU/lung}$) を算出した。溶媒投与群と各薬物投与群の肺内生菌数の差は, Dunnett または Steel の多重比較にて検定した (有意水準: 5%)。

8. マウス大腿感染モデルを用いた PK-PD 解析

1) PRSP によるマウス大腿感染モデルに対する治療効果

白血球減少マウスに PRSP TH-1230 ($5-7 \times 10^5 \text{ CFU/thigh}$) を大腿筋肉内接種し, 感染を惹起させた。感染 2 時間後より, TBPM $0.06-32 \text{ mg/kg/24 h}$ (36 通りの用量) を皮下投与し, 投与開始 24 時間後に, 大腿内生菌数を測定した。また, PRSP 5 菌株によるマウス大腿感染モデルにおいて, 12 時間ごとに 2 回 TBPM $0.5-8 \text{ mg/kg/24 h}$ (7 通りの用量) を皮下投与し, 投与開始 24 時間後の大腿内生菌数より bacteriostatic dose (24 時間後の菌量が薬物投与開始時と等しくなる用量) を算出した。

2) 薬物動態

白血球減少マウスに TBPM ($0.125-32 \text{ mg/kg}$) を単回皮下投与 (10 mL/kg) し, 投与 5 分~6 時間後に採血し, 血漿を得た。各時点の平均血漿中濃度推移 ($n=3$) をモデル非依存的に解析し, T_{max} , C_{max} , $t_{1/2}$, AUC_{inf} を求めた。血漿中の TBPM 濃度は, 移動相に酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}5.0$) / アセトニトリルを用い, 分離に強陽イオン交換カラム (Partisil-10 SCX, GL サイエンス) を用いた, HPLC 法により測定した。すなわち, 採取した血漿に, 等量の 1 mol/L MOPS 緩衝液 ($\text{pH}7.0$) および 2 倍量の内標

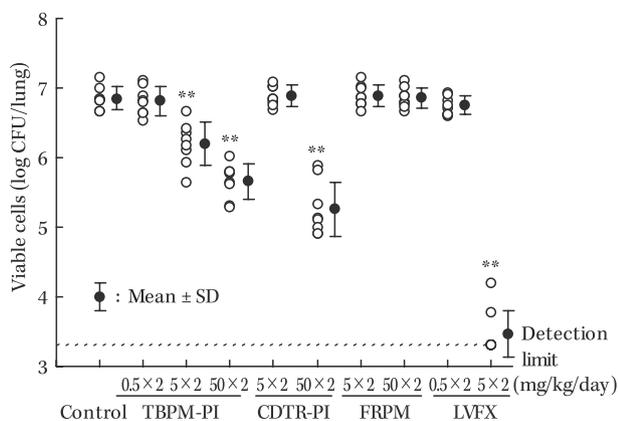


Fig. 4. Therapeutic efficacy of tebipenem pivoxil against respiratory infection by β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in neutropenic mice.
 Animal: CBA/JN mice (5 weeks old, female), n = 8
 Infection: β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* HI00547 ($1.7-1.9 \times 10^6$ CFU/mouse)
 Therapy: orally administered with tebipenem pivoxil (TBPM-PI), cefditoren pivoxil (CDTR-PI), faropenem sodium (FRPM) and levofloxacin (LVFX) 24 h and 36 h after infection
 Viable cell counts: CFU/lung determined 48 h after infection
 Detection limit: 3.31 log CFU/lung
 **: p < 0.01, significant differences from control (Steel's multiple test)

準物質溶液を添加した後ろ過し、ろ液を測定サンプルとした。検量線は $0.1-100 \mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性を示し (相関係数 $R=0.9995-0.9999$)、定量限界 $0.1 \mu\text{g/mL}$ における同時再現性試験での精度は 11.4%、真度は -6.7% 、日差再現性試験での精度は 12.1%、真度は 0.7% であり、再現性が確認された。また、マウスおよびヒト血清に TBPM ($0.1-100 \mu\text{g/mL}$) を添加し、*in vitro* における血清蛋白結合率を限外ろ過法により測定した (n=3)。限外ろ過液中の TBPM 濃度は、移動相に酢酸アンモニウム/アセトニトリルを用い、分離に ODS 系カラムを用いた LC-MS/MS 法により測定した。採取した血清ろ液は、disk タイプ (Empore disk cartridge SDB-XC, 3M) の固相抽出法により前処理を行った。検量線は $0.5-200 \text{ ng/mL}$ の範囲で直線性を示し (相関係数; マウス: $R=0.9979-1.000$, ヒト: $R=0.9974-0.9998$)、定量限界 0.5 ng/mL におけるマウスおよびヒトの同時再現性試験での精度は 7.1% および 5.5%、真度は 12.0% および 10.0% であり、再現性が確認された。

3) PK-PD 解析

PK-PD パラメータ算出のため、TBPM 単回皮下投与後の各経過時間 (T) における血漿中濃度 (C (T)) 推移より一次吸収のある 1-compartment model を用いて PK パラメータ、すなわち見かけの分布容積 (Vd/F)、吸収速度定数 (k01)、消失速度定数 (k10) を算出した。

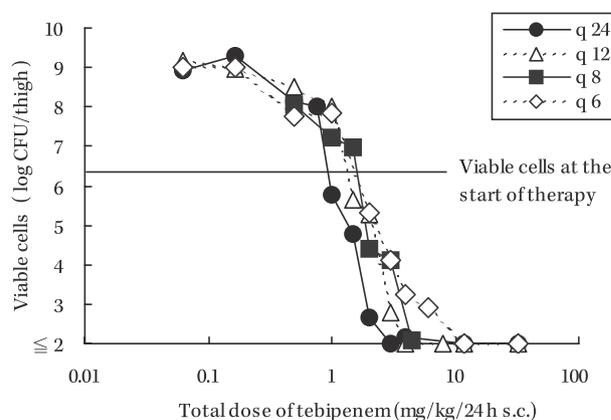


Fig. 5. Effect of tebipenem on thigh infection model with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in neutropenic mice.
 Animal: ICR mice (4 weeks old, male), n = 1-3
 Pretreatment: intraperitoneal injection of cyclophosphamide (200 mg/kg) 4 days before infection
 Infection: *S. pneumoniae* TH-1230 ($3.6-7.0 \times 10^5$ CFU/thigh) 2 h before the start of therapy
 Therapy: subcutaneously administered with tebipenem (q24: 0 h, q12: 0, 12 h, q8: 0, 8, 16 h, q6: 0, 6, 12, 18 h)
 Viable cell counts: CFU/thigh determined 24 h after the start of therapy
 Each point: the mean for 2-6 thighs per 1-3 mice
 Number of bacteria at the start and 24 h of therapy: 6.38 and 9.56 log CFU/thigh respectively

$$C(T) = \text{Dose} \times k01 / (Vd/F) / (k01 - k10) \times (\text{EXP}(-k10 \times T) - \text{EXP}(-k01 \times T))$$

この PK パラメータを用いて、治療効果検討における種々の用法用量での血漿中濃度をシミュレートし、マウス血清蛋白結合率から血漿中非結合型 TBPM 濃度を算出した。TBPM の各用法用量における 3 つの PK-PD パラメータ、すなわち、血漿中非結合型 TBPM の AUC と MIC の比 (AUCf/MIC)、血漿中非結合型 TBPM の C_{max} と MIC の比 (C_{max}/MIC) および血漿中非結合型 TBPM 濃度が MIC 以上となる時間の 24 時間に対する割合 (time above MIC: T>MIC) を算出した。TBPM の効果は、投与開始時の大腿内生菌数に対する 24 時間後の大腿内生菌数変化で示した。PK-PD パラメータと 1) で得られた PRSP TH-1230 の大腿内生菌数より、sigmoidal E_{max} model を用いて TBPM の薬効とそれぞれの PK-PD パラメータの寄与率 (R^2) を非線形最小二乗法により算出した (使用したソフトウェア: WinNonlin (Pharsight Co.))。また、PRSP 5 菌株に対する bacteriostatic dose における PK-PD パラメータもあわせて算出した。

Sigmoidal E_{max} model

$$E_0 - E = (E_{\text{max}} \times D^N) / (ED_{50}^N + D^N)$$

すなわち、 $E = E_0 - (E_{\text{max}} \times D^N) / (ED_{50}^N + D^N)$ の式を用いた。

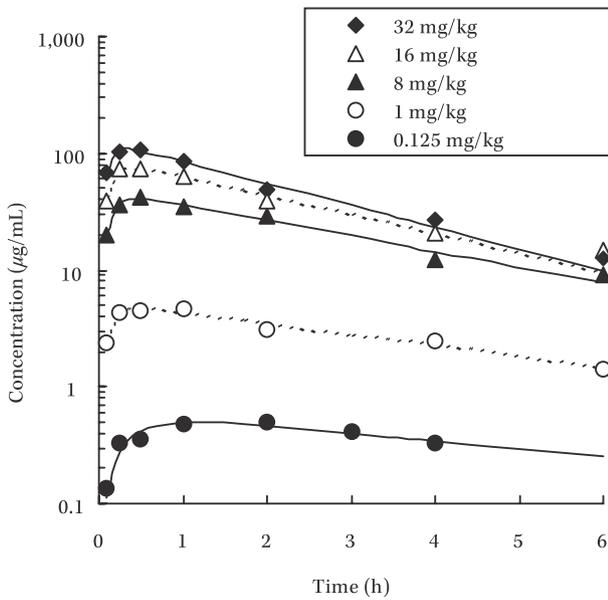


Fig. 6. Plasma concentration of tebipenem in neutropenic mice following subcutaneous administration of tebipenem. Pharmacokinetic analysis: one-compartment model with first-order absorption

E : observed effect ($\Delta \log_{10}$ of CFU/thigh on TBPM group at 24 h)

E₀ : effect ($\Delta \log_{10}$ of CFU/thigh on control group at 24 h)

E_{max} : maximum effect

D : PK-PD parameter

ED₅₀ : PK-PD parameter required to achieve 50% of E_{max}

N : slope of PK-PD parameter-effect curve

II. 結 果

1. *In vitro* 殺菌力

S. pneumoniae および *H. influenzae* に対して、2 または 4×MIC の TBPM および対照薬物を作用させ、2 および 4 時間後の菌数を測定した (Table 2)。PSSP の 1 株は薬物作用時における菌量が少なく、最も殺菌された場合でも生菌数変化は -2.8 log であったため、99.9% (-3 log) の殺菌のみ 4 株で算出した。*S. pneumoniae* に対する TBPM の抗菌作用は殺菌的であり、TBPM の 4×MIC、2 時間作用により PSSP の 4 株中 4 株、PRSP の 5 株中 2 株で 99.9% の殺菌が認められ、TBPM は FRPM および LVFX と同程度のきわめて強い短時間殺菌力を示した。一方、*H. influenzae* において、TBPM は、4×MIC、4 時間作用により BLNAS の 6 株中 4 株、BLNAR の 4 株中 3 株で 90% の殺菌を示し、TBPM の短時間殺菌力は LVFX より弱いものの CDTR および FRPM と同程度であった。

2. PAE および PASME

S. pneumoniae および *H. influenzae* に対して 1 または

Table 4. Pharmacokinetic parameters of tebipenem in neutropenic mice following subcutaneous administration of tebipenem

Dose (mg/kg)	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (µg · h/mL)
0.125	0.5019	2.0	3.2	3.165
1.00	4.575	1.0	3.2	23.98
8.00	41.43	0.50	2.4	159.8
16.0	74.90	0.25	2.3	259.9
32.0	107.6	0.50	2.1	314.4

Calculated from the mean plasma concentration of 3 animals
Pharmacokinetic analysis: non-compartment model

C_{max}: maximal plasma concentration

T_{max}: time of maximal plasma concentration

t_{1/2}: elimination half-life

AUC_{inf}: area under concentration-time curve from time zero to infinity

Table 5. *In vitro* serum protein binding of tebipenem in mouse and human

Species	Serum protein binding (%) of tebipenem			
	0.1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
mouse	96.6	98.1	98.3	90.4
human	73.9	67.0	67.0	59.7

Ultrafiltration method, mean (n = 3)

4×MIC の薬剤を 1 時間作用させ、薬物の影響を除去した後の PAE を Table 3 に示した。*S. pneumoniae* に対して、TBPM は 1 または 4×MIC 作用でそれぞれ平均 0.79 時間、1.60 時間の PAE を示したが、*H. influenzae* に対しては PAE を示さなかった。一方、9 菌株の *H. influenzae* を用いて、1×MIC を 1 時間作用後、薬物の影響を除去し、1/16~1/4×MIC の薬物存在下で PASME を測定した結果、TBPM の PASME は 1/4×MIC 作用時に平均 4 時間であり、LVFX と同程度の長い PASME を示した (Fig. 2)。

3. *In vivo* 抗菌力

1) PRSP によるマウス呼吸器感染モデルに対する治療効果

PRSP SP00366 感染 48 時間後の肺内生菌数は、TBPM-PI の 6.25 mg/kg×2 および 25 mg/kg×2 投与群でそれぞれ 3.76±0.87 および 1.67±0.31 (log CFU/lung, 平均±標準偏差) であり、溶媒投与群と比較して有意な肺内生菌数の減少が認められた (p<0.001, Fig. 3)。また、LVFX 100 mg/kg×2 投与群においても有意な生菌数の減少が認められたが、その他の群においては有意な差は認められなかった。

2) *H. influenzae* によるマウス呼吸器感染モデルに対する治療効果

BLNAR *H. influenzae* HI00547 感染 48 時間後の肺内生菌数は、TBPM-PI の 0.5 mg/kg×2、5 mg/kg×2 および 50 mg/kg×2 投与群でそれぞれ 6.81±0.20、6.20±0.31

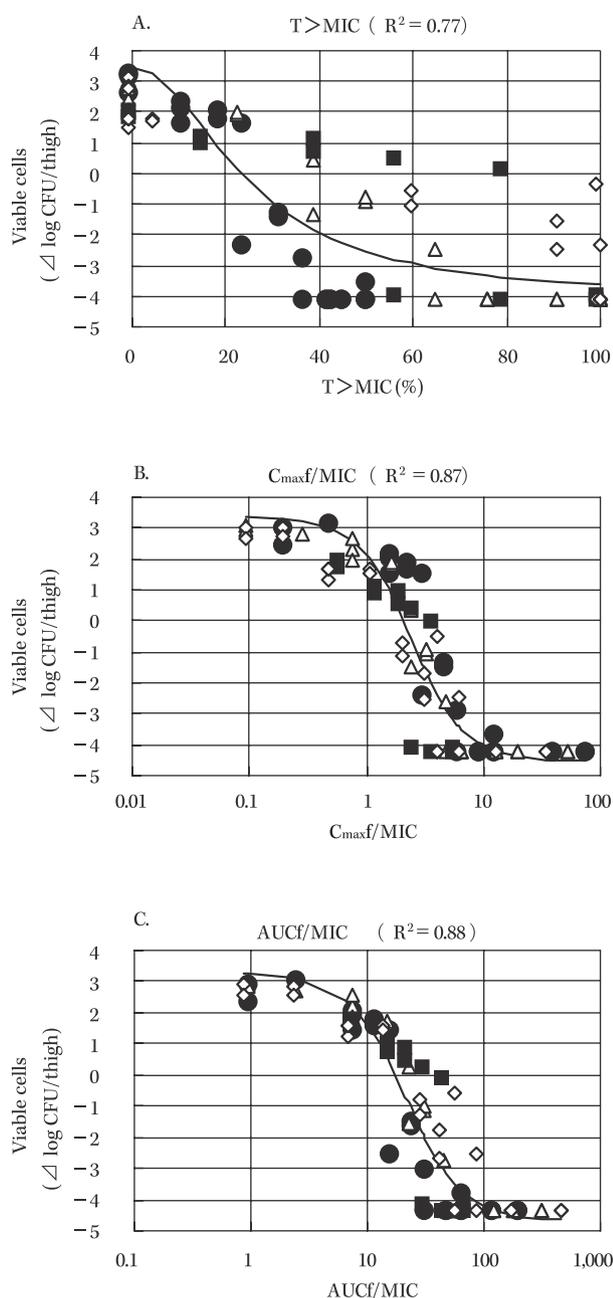


Fig. 7. Relationship between three pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and viable cells of *Streptococcus pneumoniae* TH-1230 in thigh of neutropenic mice after 24 hours of therapy with tebipenem.

A: percentage of time that plasma unbound tebipenem levels exceed the MIC, B: peak of unbound tebipenem/MIC ratio, C: 24-hour AUC of unbound tebipenem/MIC ratio MIC of tebipenem against *S. pneumoniae* TH-1230: 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Each point: the mean for two thighs per mouse (●: q24, △: q12, ■: q8, ◇: q6)

R²: contribution ratio

Zero of viable cells: number of bacteria at the start of therapy

および 5.66 ± 0.25 (log CFU/lung: 平均 \pm 標準偏差) であり, TBPM-PI は用量依存的にマウス肺内生菌数を減少させた (Fig. 4)。溶媒投与群に比較し, TBPM-PI の 5 mg/kg \times 2, 50 mg/kg \times 2, CDTR-PI の 50 mg/kg \times 2 および LVFX の 5 mg/kg \times 2 投与群において, 肺内生菌数の有意な減少が認められた ($p < 0.01$)。

4. PRSP によるマウス大腿感染モデルを用いた PK-PD 解析

PRSP TH-1230 によるマウス大腿感染モデルにおいて, TBPM は総投与用量依存的に大腿内の生菌数を減少させた (Fig. 5)。同じ総投与量においては, 一括および 2~4 回の分割投与による薬効に顕著な差は認められなかった。TBPM を単回皮下投与したときの血漿中 TBPM 濃度推移より, 薬物動態パラメータを算出した結果, TBPM の 0.125~8 mg/kg において線形性が認められた (Fig. 6 および Table 4)。また, マウスおよびヒトにおける血清蛋白結合率は, それぞれ 90~98% および 60~74% であり, 種差が認められた (Table 5)。PK-PD パラメータを計算するために, TBPM を単回皮下投与した時の血漿中 TBPM 濃度推移を一次吸収のある 1-compartment model で解析した。その結果, $k_{01} 5.572 \text{ h}^{-1}$, $K_{10} 0.2229 \text{ h}^{-1}$, $V_d/F 191.2 \text{ mL}/\text{kg}$ が得られ, PK-PD パラメータを計算した。TBPM の PK-PD パラメータとマウス大腿感染モデルに対する治療効果との関係を sigmoidal E_{max} model を用いて解析した結果, 非結合型 TBPM の T > MIC, $C_{\text{max}f}/\text{MIC}$ および AUCf/MIC の薬効への寄与率 (R^2) は, それぞれ 77, 87 および 88% であった (Fig. 7)。また, PRSP 5 菌株に対する bacteriostatic dose は 1.4~3.4 mg/kg/24 h となり, bacteriostatic dose において TBPM の薬効と相関の高い PK-PD パラメータである AUCf/MIC は 22~92 (平均値 39, 中央値 26) であった (Table 6)。

III. 考 察

本邦においては, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性化が進行し, 特に治療の選択肢の少ない小児においては, 深刻な問題となっている⁶⁾。そこで, 今回 *S. pneumoniae* と *H. influenzae* に焦点を当て, 世界で初めての経口カルバペネム系抗菌薬である TBPM-PI の特長を明確にする目的で種々の検討を加えた。

TBPM は, 両菌種に対して殺菌的に作用し, *S. pneumoniae* に対してセフェム系抗菌薬より長い PAE, *H. influenzae* に対してキノロン系抗菌薬と同程度でセフェム系抗菌薬より長い PASME を示した。一般に, *in vitro* において, β -ラクタム系抗菌薬は *S. pneumoniae* に対して PAE を示すが, *H. influenzae* に対してほとんど PAE を示さないことが知られている^{7~10)}。一方, カルバペネム系抗菌薬である imipenem (IPM) は, *H. influenzae* に対して PASME を示すことが報告されており, TBPM が

Table 6. Bacteriostatic dose and PK-PD parameters of tebipenem in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* thigh infection model

PRSP Strain No.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Bacteriostatic dose (mg/kg/24 h)	T > MIC (%)	$C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$	AUCf/MIC
TH-1230	0.025	1.4	36	2.3	22
MSC-33	0.03	2.1	43	2.8	26
MSC-118	0.03	2.6	51	3.4	31
MSC-139	0.05	3.4	43	2.8	26
MSC-158	0.008	1.9	91	10.0	92
Mean		2.3	53	4.3	39
Median		2.1	43	2.8	26

MIC was determined by agar dilution method using 1.2–1.33 fold serial dilutions.

The bacteriostatic dose was calculated in the group administered tebipenem twice with a 12-h interval for thigh infection caused by 5 strains of PRSP.

PASME を示したという今回の結果はカルバペネム系抗菌薬に共通する性質を反映したものと推察される⁹⁾。また、TBPM-PI は PRSP によるマウス呼吸器感染モデルに対して、CDTR-PI, FRPM および LVFX に比べて高い治療効果を示し、BLNAR *H. influenzae* による呼吸器感染モデルに対しても、LVFX には劣るものの、CDTR-PI と同程度の優れた治療効果を示した。以上の結果から、経口抗菌薬の適応菌種として重要でかつ近年耐性化が問題となっている *S. pneumoniae* および *H. influenzae* を起炎菌とする呼吸器感染症において治療効果が期待できるものと考えられた。

近年、抗菌薬の領域においては、ヒトにおいて十分な薬効が期待できる薬物動態を推定するために、マウスにおける薬物動態と薬効の関連を解析する手法が用いられている³⁾。Craig らは amoxicillin, gatifloxacin などの経口抗菌薬についても皮下投与で試験を実施しており^{11,12)}、この時の血漿中濃度推移と菌数の変化から、経口抗菌薬であっても薬効に相関する PK-PD パラメータを考察することは可能であると考えられている。今回われわれもこれらの報告に準じて、TBPM-PI の活性本体である TBPM を皮下投与し、gPRSP によるマウス大腿感染モデルにおける薬効と PK-PD パラメータとの関係を解析した。その結果、3つの PK-PD パラメータ (AUCf/MIC, $C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$ および T>MIC) はいずれも TBPM の薬効と相関し、AUCf/MIC および $C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$ が T>MIC に比べて高い相関を示した (寄与率; T>MIC : 77%, $C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$: 87%, AUCf/MIC : 88%)。また、データは示していないが、BLNAR *H. influenzae* マウス呼吸器感染モデルにおいて TBPM を皮下投与した時も、*S. pneumoniae* マウス大腿感染モデルと同様に、3つの PK-PD パラメータは TBPM の薬効に相関を示した (寄与率; T>MIC : 72%, $C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$: 77%, AUCf/MIC : 82%, 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005 : F-1448, Washington, D.C.)。

TBPM の薬効が AUCf/MIC と相関が高いという結果

は、総投与量が同じであれば投与回数の影響は小さいという Miyazaki らの報告を支持するものである²⁾。すなわち、Miyazaki らは PRSP によるマウス呼吸器感染モデルにおいて、総投与量 15 mg/kg の TBPM-PI を 1日1回、12時間ごとに1日2回に分割、あるいは6時間ごとに1日3回に分割し、それぞれ3日間投与した場合、いずれの用法においても薬効に有意な差がないことを示している。 β -ラクタム系抗菌薬の薬効が T>MIC に相関が高いということは広く認められており、それ以外の PK-PD パラメータと薬効との相関を算出した報告は少ない。

Leggett らは、*Klebsiella pneumoniae* に対する cefazolin および IPM の薬効に最も相関する PK-PD パラメータは T>MIC (R^2 : それぞれ 79.6~68.1% および 76.8~76.4%) と結論しているものの、IPM では同時に T>MIC と log AUC>MIC にも相関する (R^2 : 81.9%) ことを報告している¹³⁾。Leggett らの報告は、セフェム系抗菌薬に比べて殺菌力が強く、PAE あるいは PASME が認められるカルバペネム系抗菌薬では、T>MIC だけでなく AUC も薬効に関与する可能性を示唆するものと考えられる。

また、TBPM は短時間殺菌力が強く、各種菌株に対してセフェム系抗菌薬よりもニューキノロン系抗菌薬に近い濃度依存的な初期殺菌作用を示すこと (山田恵子ほか, 日本化学療法学会雑誌特集号), その殺菌作用が時間と濃度の両方に依存すること¹⁴⁾が報告されている。Craig の提唱する PK-PD 理論³⁾では、濃度依存的な殺菌作用と長い PAE を示すアミノ配糖体系およびニューキノロン系抗菌薬の薬効は $C_{\text{max}}/\text{MIC}$, AUC/MIC に相関が高いとされており、TBPM が AUC/MIC と $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ に相関が高かったという本検討結果は、TBPM の *in vitro* 抗菌活性の特徴を反映したものと考えられた。

今回 Craig の提唱する T>MIC, $C_{\text{maxf}}/\text{MIC}$, AUCf/MIC の3つの PK-PD パラメータについて解析したが、例えば T>4×MIC も TBPM の薬効に相関を示すことから (寄与率; T>4×MIC : 73%, T>8×MIC : 37%), 最大殺菌作用を示すような濃度を上回る時間も関与する

可能性があると考えられる。抗菌薬の薬効と薬物動態の関係をより明らかにするためには、さらなる検討が必要と考える。

本検討から、TBPM は、 β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対して殺菌的に作用し、これらの菌を用いたマウス呼吸器感染モデルに対し高い治療効果を示すことが明らかとなった。また、TBPM は抗菌力ならびに短時間殺菌力が強く、良好な薬物動態を示すことから、血漿中濃度が C_{max} を得た後に減衰し MIC を下回っても、PAE あるいは PASME によって、生体内の菌に対する増殖抑制効果が持続することが期待された。Craig の PK-PD 理論に基づいてマウス大腿感染モデルにおける薬効に最も相関する PK-PD パラメータを解析した結果、いずれの PK-PD パラメータも TBPM の薬効と相関し、AUCf/MIC、 $C_{max}f/MIC$ 、 $T > MIC$ の順で相関を示した。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、明治製菓株式会社医薬総合研究所 板橋孝壽氏、福島崇恵氏、高山吉弘氏、館林智子氏、大橋直子氏に、多大なご協力をいただいたことを深謝いたします。

文 献

- Hikida M, Itahashi K, Igarashi A, Shiba T, Kitamura M: *In vitro* antibacterial activity of LJC11,036, an active metabolite of L-084, a new oral carbapenem antibiotic with potent antipneumococcal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2010-6
- Miyazaki S, Hosoyama T, Furuya N, Ishii Y, Matsumoto T, Ohno A, et al: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of L-084, a novel oral carbapenem, against causative organisms of respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 203-7
- Craig W A: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-10
- 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 1981; 29: 76-9
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-fifth edition, M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2000
- 生方公子：呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化。 *日化療会誌* 2006; 54: 69-94
- Zhanel G G, Hoban D J, Harding G K M: The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP Ann Pharmacother* 1991; 25: 153-63
- Boswell F J, Andrews J M, Wise R: Pharmacodynamic properties of faropenem demonstrated by studies of time-kill kinetics and postantibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 415-8
- Odenholt I, Löwdin E, Cars O: *In vitro* pharmacodynamic studies of L-749,345 in comparison with imipenem and ceftriaxone against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2365-70
- Neuhauser M M, Prause J L, Danziger L H, Pendland S L: Postantibiotic effects of ABT-773 and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3613-5
- Andes D, Craig W A: *In vivo* activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2375-9
- Andes D, Craig W A: Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1665-70
- Leggett J E, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Vogelmann B, Calame W, et al. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J Infect Dis* 1989; 159: 281-92
- Sato N, Suzuki H, Hayashi H, Shibasaki S, Sugano T, Maebashi K, et al: A new concept and a theoretical consideration of the mechanism-based pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) modeling for antimicrobial agents. *Jpn J Antibiot* 2008; 61: 314-38

Antimicrobial activity of tebipenem pivoxil against *Streptococcus Pneumoniae* and *Haemophilus Influenzae*, and its pharmacokinetic-pharmacodynamic profile in mice

Toshie Sugano, Takuji Yoshida, Keiko Yamada, Atsuyuki Shimizu,
Jun Morita, Koji Kijima, Kazunori Maebashi and Shigeki Shibasaki

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

Tebipenem (TBPM, formerly L-036 or LJC11,036), an active form of the oral carbapenem tebipenem pivoxil (TBPM-PI, formerly ME1211 or L-084), shows potent activity against respiratory pathogens such as *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. We evaluated the *in vitro* antibacterial property of TBPM and *in vivo* activity of TBPM-PI against these organisms. TBPM showed strong bactericidal activity against both pathogens, longer post-antibiotic effect against *S. pneumoniae* and longer post-antibiotic sub-MIC effect against *H. influenzae* compared to cephem antibiotics. In murine respiratory infection models with penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) and β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*, TBPM-PI showed higher therapeutic efficacy than cefditoren pivoxil or faropenem. Using the pharmacokinetics (PK) parameter of TBPM after subcutaneous administration and the pharmacodynamics (PD) data of TBPM in a murine thigh infection model with PRSP, we defined PK-PD parameters correlating with TBPM efficacy. Analysis using the sigmoidal E_{\max} model showed that three PK-PD parameters (AUCf/MIC, C_{\max} f/MIC and time above MIC) all correlated well with TBPM efficacy, AUCf/MIC (R^2 : 88%) and C_{\max} f/MIC (R^2 : 87%) showed a higher correlation compared to time above MIC (R^2 : 77%).