

【原著・基礎】

Biofilm を形成した non-typeable *Haemophilus influenzae* に対する tosufloxacin の殺菌作用

杉浦 陽子・高畑 正裕・福田 淑子・野村 伸彦

富山化学工業株式会社総合研究所*

(平成 23 年 8 月 31 日受付・平成 24 年 2 月 21 日受理)

キノロン系薬 tosufloxacin (TFLX) の小児中耳炎由来 non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) に対する MIC を amoxicillin (AMPC), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC, 1:14), cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN) および tebipenem (TBPM) と比較した。また, biofilm を形成した β -lactamase-negative, ampicillin (ABPC)-susceptible *H. influenzae* (BLNAS) および β -lactamase-negative, ABPC-resistant *H. influenzae* (BLNAR) に対する TFLX の殺菌的作用について CVA/AMPC, CDTR および TBPM を対照に検討し, 以下の成績を得た。

1. BLNAS 51 株および BLNAR 58 株に対する TFLX の MIC₉₀ はそれぞれ 0.0078 および 0.0156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で対照薬剤の 1/8~1/512 であった。 β -lactamase-positive, ABPC-resistant *H. influenzae* 5 株に対する TFLX の MIC はいずれも 0.0039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で, 対照薬剤の 1/2~<1/16,384 であった。TFLX は, β -ラクタム系薬耐性株を含む小児中耳炎由来 NTHi に対して強い抗菌活性を示した。
2. Biofilm を形成した BLNAS I-2716 株および BLNAR I-2580 株に対し, TFLX は小児血中 free-drug AUC₀₋₂₄ に相当する曝露量である 100 MIC およびその 1/10 に相当する 10 MIC の 24 時間曝露により, 生菌数を 3.03~>6.46 Log₁₀ CFU/mL 減少させ, 殺菌的作用を示した。また, 走査型電子顕微鏡を用いた観察では, biofilm を形成していた細菌層の減少が認められた。一方, β -ラクタム系薬は殺菌的作用を示さず, 細菌層の変化も認められなかった。

以上, TFLX は biofilm を形成した NTHi を原因菌とする難治性の小児中耳炎に対して有効性を示すことが期待された。

Key words: tosufloxacin, biofilm, non-typeable *H. influenzae*, *in vitro* bactericidal activity

Haemophilus influenzae は小児中耳炎における主要原因菌の一つであり¹⁾, その 96.9% が莢膜構造を有さない non-typeable *H. influenzae* (NTHi) であることが報告されている²⁾。小児中耳炎では経口抗菌薬の投与にもかかわらず改善しない遷延例や感染を繰り返す反復例などの難治化が問題となっている³⁾。本邦では耳鼻咽喉科領域において分離された *H. influenzae* の 58.7%¹⁾ が ampicillin (ABPC) に耐性であり, β -ラクタム系薬に対する薬剤耐性化が中耳炎における遷延化の一因と考えられている³⁾。また, amoxicillin (AMPC) 治療における非改善例から分離された NTHi は薬剤感受性に関係なく biofilm 形成能が有意に高いことが認められており⁴⁾, 中耳炎の難治化の一因として NTHi による biofilm の関与が示唆されている^{4,5)}。

Tosufloxacin (TFLX) はグラム陽性および陰性菌に対して強い抗菌活性および広い抗菌スペクトルを有し⁶⁾, 1990 年に本邦での上市以降, 各科感染症の治療に用いられてきた。2009 年に「オゼックス[®] 細粒小児用 15%」として小児における中耳炎および肺炎に対する適応を取得し, β -ラクタム系薬耐性菌

を含む, これら感染症の原因菌に対する治療選択肢の一つとなった。

今回, 小児中耳炎患者の耳漏より分離された臨床分離 NTHi に対する TFLX の MIC を測定した。また, 臨床分離 NTHi を用いて, biofilm を形成した β -lactamase-negative, ABPC-susceptible *H. influenzae* (BLNAS) および β -lactamase-negative, ABPC-resistant *H. influenzae* (BLNAR) に対する *in vitro* 殺菌作用について β -ラクタム系薬を対照に比較検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

MIC 測定には 2006 および 2007 年に本邦において分離された小児中耳炎由来の NTHi 114 株を使用した。

ABPC による耐性分類は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の判定基準⁷⁾を参考に以下のとおり分類した。 β -lactamase 非産生で ABPC の MIC が $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の株を BLNAS, $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の株を BLNAR とし, β -lactamase を産生し, ABPC に対する

*富山県富山市下奥井 2-4-1

MIC が $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ の株を β -lactamase-positive, ABPC-resistant *H. influenzae* (BLPAR) とした。

Biofilm 形成菌および planktonic 菌に対する殺菌作用の検討には、2007 年に本邦において小児中耳炎患者の耳漏より分離された BLNAS I-2716 株および BLNAR I-2580 株を用いた。なお、これらの株は小児中耳炎由来 NTHi の BLNAS および BLNAR それぞれ 9 および 10 株について crystal violet 法^{8,9)}を用いて biofilm 量を測定した際に、測定した株の中で最も高い biofilm 形成能が認められた株である (データ未提示)。

2. 使用薬剤

TFLX (富山化学工業株式会社), AMPC (和光純薬工業株式会社), clavulanic acid (CVA: 和光純薬工業株式会社), cefditoren [CDTR: メイアクト[®]錠 (Meiji Seika ファルマ株式会社)より富山化学工業で抽出], cefcapene [CFPN: フロモックス[®]錠 (塩野義製薬株式会社)より富山化学工業で抽出] および tebipenem [TBPM: オラペネム[®]細粒 (Meiji Seika ファルマ株式会社)より富山化学工業で抽出] を用いた。また、耐性分類の指標薬剤として、ABPC (Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用ビクシリン[®])を用いた。なお、CDTR, CFPN および TBPM の純度は HPLC 測定におけるピーク面積百分率より 92% 以上であることを確認した。その他の薬剤についても純度あるいは含量が明らかなものを使用し、濃度は活性本体の値として表示した。

3. MIC の測定

MIC は CLSI の微量液体希釈法¹⁰⁾に準じて測定した。前培養培地には *Haemophilus test medium agar* (HTMA: Becton, and Dickinson Company, alfa aesar, Sigma-Aldrich), 測定培地には *Haemophilus test medium broth* (HTMB: Becton, and Dickinson Company, alfa aesar, Sigma-Aldrich) を用いた。

4. 殺菌作用

1) Planktonic 菌に対する殺菌作用

HTMB を用いて、37°C で一夜振盪培養した菌を用いた。この菌液を HTMB で 8 倍希釈した菌液 4 mL と、HTMB で MIC の 5, 50 および 500 倍濃度に調製した各薬液 1 mL を L 字管に加え、37°C で振盪培養した (終濃度 1, 10 および 100 MIC)。培養開始時を 0 時間とし、4, 8 および 24 時間後に生菌数測定を行った。対照 (control) として薬剤不含 HTMB 5 mL を用い、同様の操作にて薬剤非添加時の生菌数を測定した。National Committee for Clinical Laboratory Standards (現 CLSI)¹¹⁾の判定基準を参考に、生菌数が培養開始時から 24 時間後までに $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ (99.9%) 以上減少した場合を殺菌的作用とした。

2) Biofilm 形成菌に対する殺菌作用

Webster⁸⁾の方法を参考に biofilm を作製した。HTMA 平板上に滅菌したメンブランフィルター (デュ

ラポア[®], 日本ミリオア株式会社, 0.45 μm HV) を置き、その上に HTMB で 5% CO_2 下, 37°C で一夜培養した菌液を 25 μL 滴下し、浸潤させた。5% CO_2 下, 37°C で 48 時間培養し、biofilm を形成させた後、さらに 24 ウェルマイクロプレートに分注した薬剤含有 HTMB 1 mL 中で 5% CO_2 下, 37°C で培養した。薬剤濃度は、MIC の 1, 10 および 100 倍の濃度となるよう調製した。培養開始時を 0 時間とし、4, 8 および 24 時間後に各ウェルのメンブランフィルターを培地とともにホモジナイズ (マルチビーズ ショッカー[®], 2,500 rpm, 30 秒, 4°C, 安井器械株式会社) し、生菌数測定を行った。ホモジナイズによる NTHi 生菌数の減少は認められず、一宮ら¹²⁾ および Ishida ら¹³⁾ の測定法と同様の結果が得られることを確認した。また、対照 (control) として薬剤不含 HTMB 1 mL を用い、同様の操作を行った。3 例の生菌数の平均と標準偏差を算出し、平均生菌数が培養開始時から 24 時間後までに $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ (99.9%) 以上減少した場合を殺菌的作用¹¹⁾ とした。

5. *H. influenzae* による biofilm の走査型電子顕微鏡像の観察

メンブランフィルター上で形成させた biofilm 像ならびに HTMB または各薬剤曝露 24 時間後の菌体像を走査型電子顕微鏡で観察した。メンブランフィルター上の biofilm 菌体を 1.5% グルタルアルデヒド (和光純薬工業株式会社) で 1 時間固定し、次いで 1% 四酸化オスミウム (TAAB Laboratories) で約 18 時間固定後、エタノール (和光純薬工業株式会社) 脱水、酢酸イソアミル (和光純薬工業株式会社) 置換した。本試料を液化炭酸ガスによる臨界点乾燥後、白金-パラジウム蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (日立 S-4500) で観察を行った。

II. 結 果

1. 小児中耳炎由来の臨床分離 NTHi に対する抗菌活性

小児中耳炎由来の臨床分離 NTHi に対する TFLX および対照薬剤の MIC range, MIC₅₀ および MIC₉₀ を Table 1 に示す。

NTHi 114 株に対する TFLX の MIC range は 0.001 ~ 0.0313 $\mu\text{g/mL}$ であった。BLNAS 51 株に対する TFLX の MIC₉₀ は 0.0078 $\mu\text{g/mL}$ で、CDTR の 1/8, CFPN および TBPM の 1/32, AMPC および CVA/AMPC の 1/128 であった。BLNAR 58 株に対する TFLX の MIC₉₀ は 0.0156 $\mu\text{g/mL}$ で、CDTR の 1/32, TBPM の 1/64, CFPN の 1/256, AMPC および CVA/AMPC の 1/512 であった。また、BLPAR 5 株に対する TFLX の MIC はいずれも 0.0039 $\mu\text{g/mL}$ で、CDTR の 1/2 ~ 1/64, CFPN の 1/4 ~ 1/1,024, TBPM の 1/32 ~ 1/128, CVA/AMPC の 1/512 ~ 1/4,096, AMPC の 1/16,384 又は < 1/16,384 であった。

TFLX は BLNAR および BLPAR に対して交叉耐性

Table 1. Antibacterial activity of TFLX and reference agents against clinical isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae* from pediatric patients with otitis media

Organism (No. of strains)	Antibacterial Agent	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>β-lactamase-negative, ampicillin-susceptible^{a)}</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (BLNAS) (51)	TFLX	0.001–0.0156	0.0078	0.0078
	AMPC	0.25–4	0.5	1
	CVA/AMPC ^{c)}	0.25–4	0.5	1
	CDTR	0.0078–0.5	0.0156	0.0625
	CFPN	0.0078–2	0.0156	0.25
<i>β-lactamase-negative, ampicillin-resistant^{b)}</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (BLNAR) (58)	TFLX	0.001–0.0313	0.0078	0.0156
	AMPC	1–16	4	8
	CVA/AMPC ^{c)}	1–16	4	8
	CDTR	0.0313–1	0.25	0.5
	CFPN	0.125–4	2	4
<i>β-lactamase-positive, ampicillin-resistant^{b)}</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (BLPAR) (5)	TFLX	0.0039	—	—
	AMPC	64–>64	—	—
	CVA/AMPC ^{c)}	2–16	—	—
	CDTR	0.0078–0.25	—	—
	CFPN	0.0156–4	—	—
TBPM		0.125–0.5	—	—

^{a)}ABPC MIC: $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$, ^{b)}ABPC MIC: $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$, ^{c)}CVA/AMPC (1 : 14) is equivalent to AMPC.

を示すことなく良好な抗菌活性を示し、キノロン低感受性株は認められなかった。

2. Planktonic 菌および biofilm 形成菌に対する殺菌作用

1) BLNAS I-2716 株に対する殺菌作用

TFLX, CVA/AMPC, CDTR および TBPM 作用時の planktonic および biofilm 形成 BLNAS I-2716 株の生菌数推移を Fig. 1 に示す。

Planktonic 菌の薬剤非添加時の生菌数は 8 時間後までに 9.66 Log₁₀ CFU/mL まで増加し、24 時間後では 6.38 Log₁₀ CFU/mL であった。TFLX 1, 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時よりそれぞれ 2.09, >6.20 および >6.20 Log₁₀ CFU/mL 減少し、TFLX は 10 および 100 MIC で殺菌的作用を示した。CVA/AMPC および TBPM の 1, 10 および 100 MIC 作用、CDTR の 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 3.20 ~ >6.20 Log₁₀ CFU/mL 減少し、殺菌的作用を示した。

Biofilm 形成菌の薬剤非添加時の生菌数は培養開始から 24 時間後までおおよそ 8~9 Log₁₀ CFU/mL で推移した。TFLX 1 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時とほぼ同程度であった。TFLX 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 3.52 および >6.46 Log₁₀ CFU/mL 減少し、殺菌的作用を示した。CVA/AMPC, CDTR および TBPM の 1, 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 1.07~2.22 Log₁₀ CFU/mL 減少したが、殺菌的作用は認められなかった。

2) BLNAR I-2580 株に対する殺菌作用

TFLX, CVA/AMPC, CDTR および TBPM 作用時の planktonic および biofilm 形成 BLNAR I-2580 株の生菌数推移を Fig. 2 に示す。

Planktonic 菌の薬剤非添加時の生菌数は 8 時間後までに 9.23 Log₁₀ CFU/mL まで増加し、24 時間後では 7.30 Log₁₀ CFU/mL であった。TFLX 1, 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時よりそれぞれ 1.84, >7.18 および >7.18 Log₁₀ CFU/mL 減少し、10 および 100 MIC で殺菌的作用を示した。CVA/AMPC, CDTR および TBPM の 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 3.49~5.71 Log₁₀ CFU/mL 減少し、殺菌的作用を示した。

Biofilm 形成菌の薬剤非添加時の生菌数は培養開始から 24 時間後までおおよそ 7.5~9 Log₁₀ CFU/mL で推移した。TFLX 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 3.03 および >6.37 Log₁₀ CFU/mL 減少し、殺菌的作用を示した。CVA/AMPC, CDTR および TBPM の 1, 10 および 100 MIC 作用 24 時間後の生菌数は接種時より 0.496~1.55 Log₁₀ CFU/mL 減少したが、殺菌的作用は認められなかった。

3. Biofilm 形成 NTHi の走査型電子顕微鏡像

BLNAS I-2716 株 および BLNAR I-2580 株 による biofilm に HTMB, TFLX の 10 および 100 MIC, ならびに CVA/AMPC, CDTR および TBPM の 100 MIC を 24 時間作用させた後の走査型電子顕微鏡像を Fig. 3 および Fig. 4 に示す。

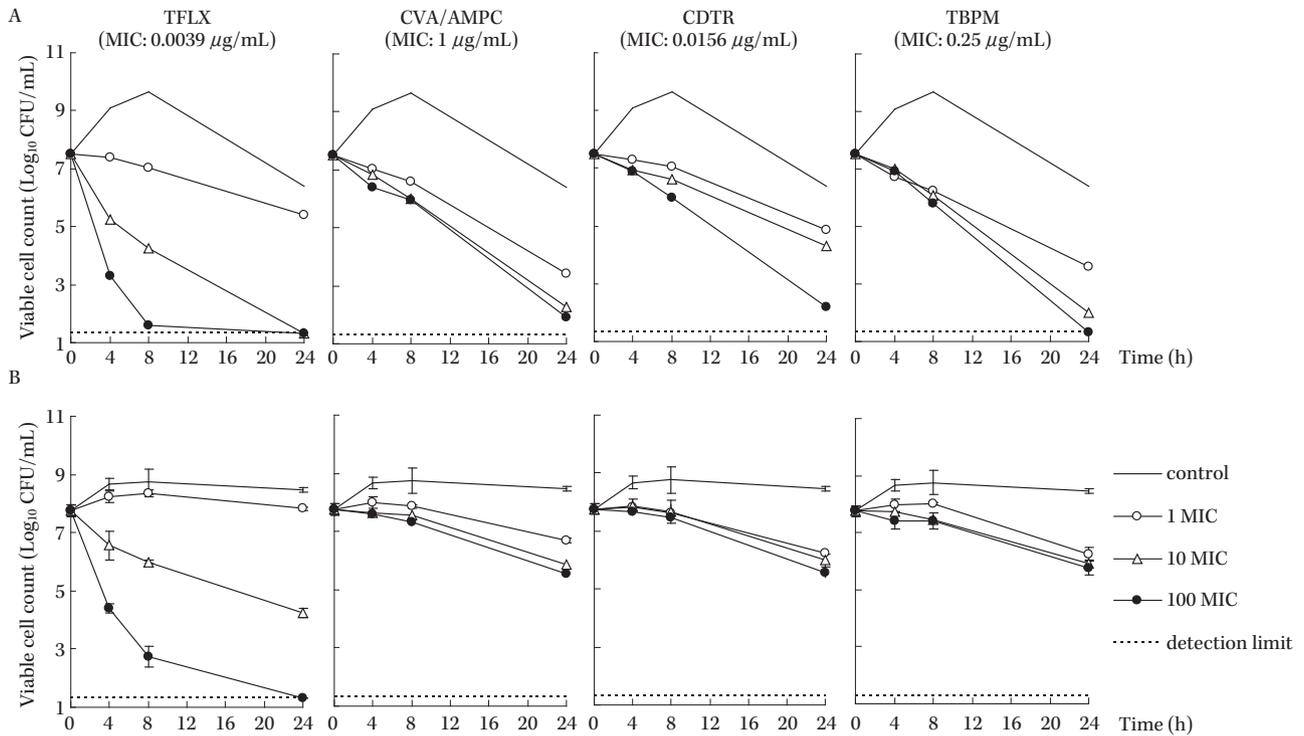


Fig. 1. *In vitro* bactericidal activity of tosylloxacin and reference agents against BLNAS I-2716. A, Against planktonic cell (n = 1); B, against cell in biofilm (mean ± S.D., n = 3)

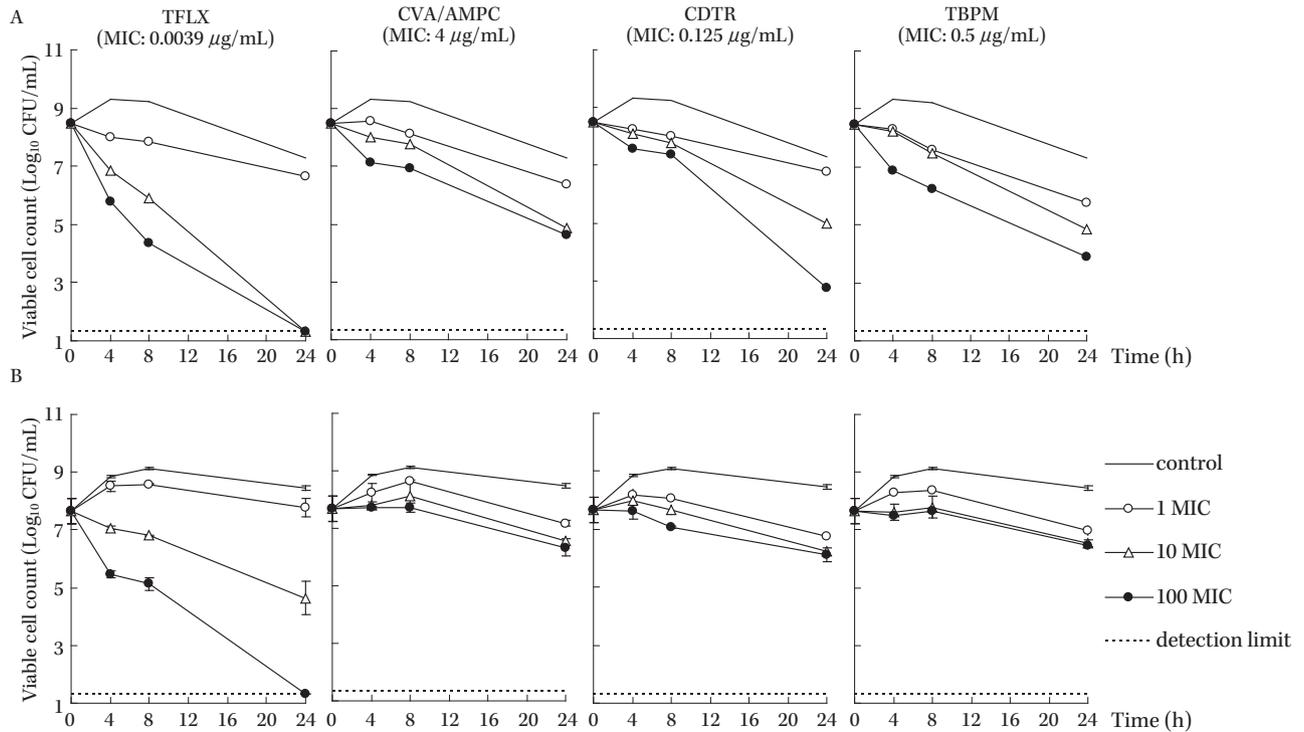


Fig. 2. *In vitro* bactericidal activity of tosylloxacin and reference agents against BLNAR I-2580. A, Against planktonic cell (n = 1); B, against cell in biofilm (mean ± S.D., n = 3)

薬剤作用前の biofilm 形成 BLNAS 株の像には菌体の形態が区別できない細菌層の形成が認められた (Fig. 3A)。HTMB 中 24 時間培養後の像には細菌層が認められ

たが (Fig. 3B), TFLX 10 および 100 MIC の 24 時間作用後には細菌層は認められず, メンブランフィルター上に個々の形態が確認できる菌体のみがみられた (Fig. 3C, D)。

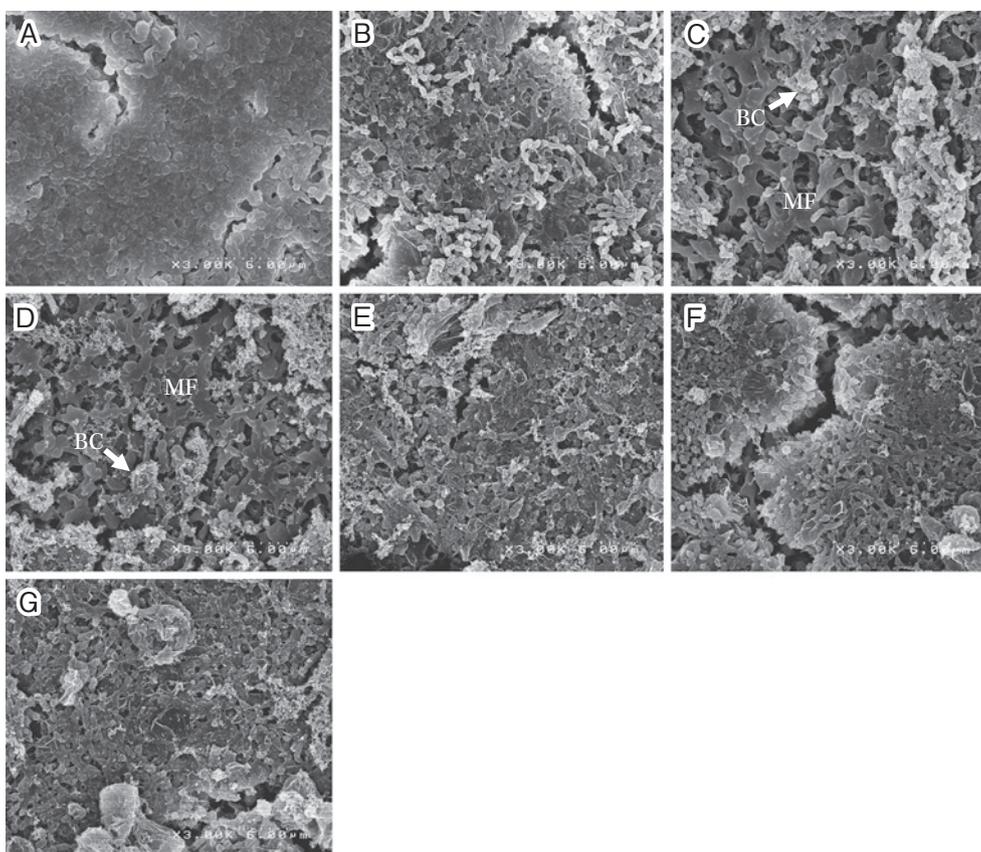


Fig. 3. Scanning electron micrograph of BLNAS I-2716 biofilm grown on membrane filters after exposure to the antimicrobial agents for 24 hours.

Samples are as follows: A, BLNAS grown on the membrane filter; B, HTMB; C, 10 MIC of TFLX; D, 100 MIC of TFLX; E, 100 MIC of CVA/AMPC; F, 100 MIC of CDTR; G, 100 MIC of TBPM. MF, membrane filter; BC, bacterial cell (Magnification, $\times 3,000$)

CVA/AMPC, CDTR および TBPM の 100 MIC, 24 時間作用後には厚い細菌層が認められた (Fig. 3E, F, G)。また, biofilm 形成 BLNAR 株においても, BLNAS 株と同様の走査型電子顕微鏡像が認められた (Fig. 4A~G)。

III. 考 察

小児における難治性中耳炎では NTHi が検出され¹⁴⁾, 本菌による biofilm 形成がその一因と考えられている^{4,5)}。また, 本邦では 2000 年頃より BLNAR の分離頻度が増加しており^{15,16)}, 中耳炎における遷延化の一因と考えられている³⁾。BLNAR などの薬剤耐性菌は, 十分な体内動態が得られない経口セフェム薬が汎用されてきたため, 増加したと考えられており¹⁷⁾, その対策の一つとして適切な抗菌薬の選択方法が示された小児急性中耳炎診療ガイドライン¹⁸⁾が制定されている。本ガイドラインでは中等症以上の症例に対する内服薬として, AMPC の常用量若しくは高用量, CVA/AMPC (1:14 製剤) または CDTR の高用量での治療が推奨されている。

今回われわれはこれらの薬剤とともに, 小児中耳炎の主要原因菌の一つである NTHi に対する TFLX の MIC を測定し, biofilm を形成した NTHi に対する TFLX の

殺菌作用を検討した。

近年, 抗菌薬の効果は薬物動態と薬力学の観点から検討されている。TFLX および TBPM では free-drug AUC_{0-24}/MIC ($fAUC_{0-24}/MIC$) 比が, CVA/AMPC および CDTR では time above MIC が治療効果を示す指標と考えられており^{19,20)}, キノロン系薬が治療効果を示すためには AUC_{0-24}/MIC 比が 100 以上 (肺炎球菌以外) であることが必要と報告されている¹⁹⁾。TFLX の小児における臨床用量服用時の $fAUC_{0-24}$ は $9.49 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ ²¹⁾ であることから, MIC が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の細菌に対して, 94.9 以上の $fAUC_{0-24}/MIC$ 比を得ることができる。さらに, 小児急性化膿性中耳炎を対象とした本薬剤の臨床試験において, 分離された *H. influenzae* に対する TFLX の MIC_{90} は $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で, これら原因菌に対する消失率は 100% であったことが報告されている²²⁾。鈴木らの耳鼻咽喉科領域におけるサーベイランス¹⁾では, TFLX の *H. influenzae* に対する MIC_{90} 値は $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり, 今回測定した NTHi 114 株に対する TFLX の MIC range は $0.001 \sim 0.0313 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの値はいずれも $fAUC_{0-24}/MIC$ 比が 100 を満たす MIC 値および臨床試

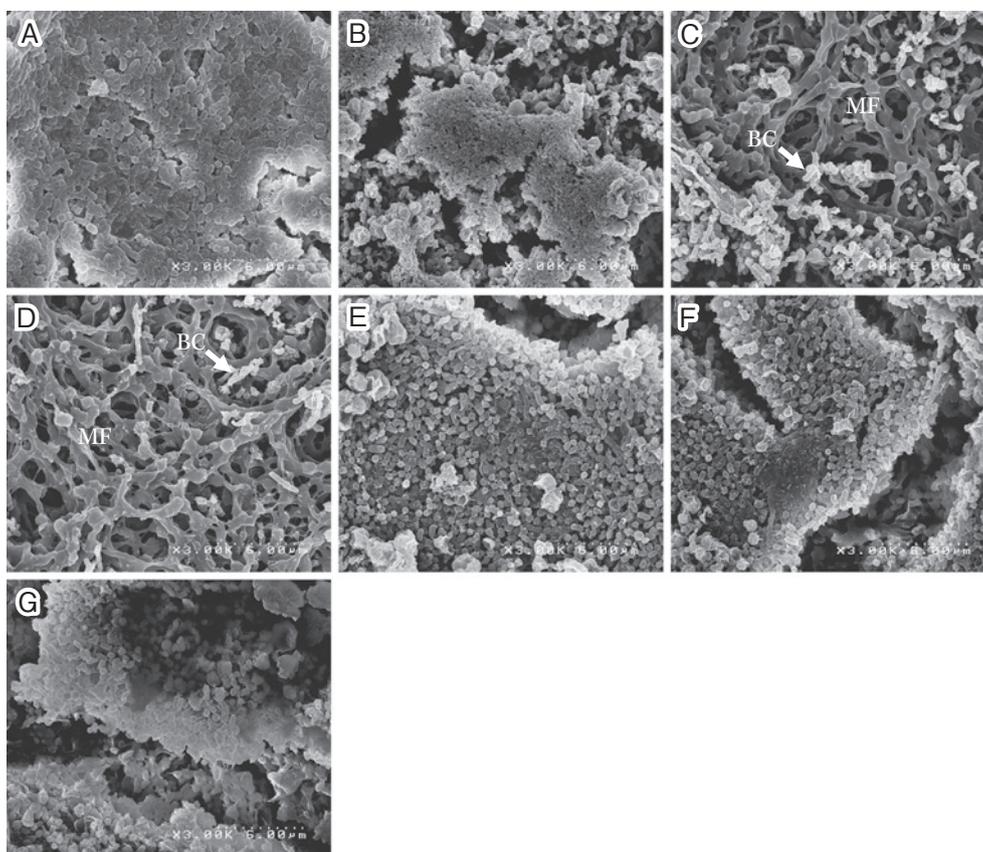


Fig. 4. Scanning electron micrograph of BLNAR I-2580 biofilm grown on membrane filters after exposure to the antimicrobial agents for 24 hours.

Samples are as follows: A, BLNAR grown on the membrane filter; B, HTMB; C, 10 MIC of TFLX; D, 100 MIC of TFLX; E, 100 MIC of CVA/AMPC; F, 100 MIC of CDTR; G, 100 MIC of TBPM. MF, membrane filter; BC, bacterial cell (Magnification, $\times 3,000$)

験で菌消失率 100% が得られた MIC 値と同値または下回っていた。

また、TFLX は biofilm 形成 BLNAS 株および BLNAR 株に対して臨床用量における $fAUC_{0-24}$ の約 1/10 の曝露量に相当する 10 MIC ($0.039 \mu\text{g}/\text{mL}$) の 24 時間曝露 ($0.936 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$) で殺菌的作用を示し、曝露後の走査型電子顕微鏡像には biofilm を形成していた細菌層の減少が観察された。しかし、TBPM は biofilm 形成 BLNAS 株および BLNAR 株に対して臨床用量における $fAUC_{0-24}$ ($3.62 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)^{23,24)} の約 160 または 330 倍の曝露量に相当する 100 MIC の 24 時間曝露で殺菌作用を示さなかった。また、CVA/AMPC は free-drug C_{max} (fC_{max} , $11.7 \mu\text{g}/\text{mL}$, 小児における CVA/AMPC 臨床用量服用時の AMPC 濃度)^{25,26)} の約 9 および 34 倍、CDTR では fC_{max} ($0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$, 小児における高用量服用時)^{27,28)} の 7 および 52 倍高い濃度に相当する 100 MIC 濃度の 24 時間曝露においても殺菌的作用を示さなかった。

Biofilm を形成した細菌が planktonic 菌に比べ高い抗菌薬抵抗性を示すこと、ならびにその抵抗性には薬剤系統差があることが知られている²⁹⁾。BLNAR を用いた検

討では、キノロン系薬は有意に biofilm 量および biofilm 中の生菌数を減少させたが、 β -ラクタム系薬はいずれも減少させなかったことが報告されている⁹⁾。今回のわれわれの検討においても、 β -ラクタム系薬は planktonic 菌に対して、 $3 \text{Log}_{10} \text{CFU}/\text{mL}$ 以上の生菌数を減少させ、殺菌的作用¹¹⁾を示したが、biofilm 形成菌に対しては殺菌的作用を示さなかった。一方、キノロン系薬である TFLX は planktonic 菌および biofilm 形成菌のいずれに対しても $3 \text{Log}_{10} \text{CFU}/\text{mL}$ 以上の生菌数を減少させ、殺菌的作用¹¹⁾を示した。さらに、他の耳漏由来の NTHi を用いた検討においても、キノロン系薬は biofilm 形成菌に対して殺菌性を示しており、今回と同様の結果が得られている³⁰⁾。この機序については、緑膿菌を用いた検討において、biofilm を形成する細胞外多糖類への薬剤の浸透性や生育状態の停止した細菌に対する殺菌作用の違いなどが示唆されているが¹³⁾、*H. influenzae* については今後の検討が必要である。

以上、TFLX は耳鼻咽喉科領域由来 *H. influenzae* に対して良好な抗菌活性を示し、また、biofilm 形成 NTHi に対しても、臨床において得られる薬剤濃度で殺菌的作

用を示したことから, biofilm を形成した NTHi を原因菌とする難治性の小児中耳炎に対して有効性を示すことが期待された。

文 献

- 1) 鈴木賢二, 黒野祐一, 小林俊光, 西村忠郎, 馬場駿吉, 原淵保明, 他: 第4回耳鼻咽喉科領域感染症臨床分離菌全国サーベイランス結果報告。日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌 2008; 26: 15-26
- 2) Kishi K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Kurokawa I, Masaki J, et al: Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J Infect Chemother* 2010; 16: 87-93
- 3) 藤原啓次, 保富宗城, 山中 昇: 中耳炎に対する抗菌薬投与方法の基本的な考え方。日化療会誌 2007; 55: 201-10
- 4) Moriyama S, Hotomi M, Shimada J, Billal D S, Fujihara K, Yamanaka N: Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx* 2009; 36: 525-31
- 5) Hall-Stoodley L, Hu F Z, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al: Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006; 296: 202-11
- 6) 保田 隆, 渡辺泰雄, 四辻 彰, 林 敏雄, 南新三郎, 岡本世紀, 他: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の細菌学的評価。Chemotherapy 1988; 36 (S-9): 95-109
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S20. Wayne, Pa, 2010
- 8) Webster P, Wu S, Gomez G, Apicella M, Plaut A G, St Geme III J W: Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 829-42
- 9) Kaji C, Watanabe K, Apicella M A, Watanabe H: Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214: 121-8
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Seventh Edition. M07-A8. Wayne, Pa, 2010
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. M26-A19. Wayne, Pa, 1999
- 12) 一宮朋来, 大濱 稔, 中野哲治, 平田範夫, 時松一成, 平松和史, 他: *Bacteroides fragilis* と MRSA 混合バイオフィルムに対するエリスロマイシンの影響。Bacterial Adherence & Biofilm 2002; 16: 49-52
- 13) Ishida H, Ishida Y, Kurosaka Y, Otani T, Sato K, Kobayashi H: *In vitro* and *in vivo* activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1641-5
- 14) Thanavala Y, Lugade A A: Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media and chronic obstructive pulmonary disease. *Adv Otorhinolaryngol* 2011; 72: 170-5
- 15) 山口恵三, 大野 章, 樫谷総子, 岩田守弘, 神田 誠, 辻尾芳子, 他: 2002年に全国52施設から分離された臨床分離株11,475株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiot 2005; 58: 17-44
- 16) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 館田一博, 岩田守弘, 神田 誠, 他: 2007年に全国72施設から分離された臨床分離株12,919株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiot 2009; 62: 346-70
- 17) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 長谷川恵子, 紺野昌俊: 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 2002; 50: 794-804
- 18) 日本耳科学会, 日本小児耳鼻咽喉科学会, 日本耳鼻咽喉科感染症研究会 編: 小児急性中耳炎診療ガイドライン 2009年版, 金原出版, 東京, 2008
- 19) Craig W A: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-10
- 20) 戸塚恭一, 相澤一雅, 森田 順, 堀 誠治, 岩田 敏, 砂川慶介: 小児患者における tebipenem pivoxil 細粒の PK-PD 解析。日化療会誌 2009; 57 (S-1): 186-91
- 21) 砂川慶介, 岩井直一, 岩田 敏, 尾内一信, 坂田 宏, 鈴木賢二, 他: 母集団薬物動態-薬力学的解析に基づく tosofloxacin 小児用細粒の臨床推奨用量。日化療会誌 2010; 58 (S-2): 69-77
- 22) 鈴木賢二, 飯野ゆき子, 工藤典代, 泰地秀信, 砂川慶介: Tosofloxacin 細粒 10% の小児急性化膿性中耳炎を対象とした非盲検非対照臨床試験。日化療会誌 2010; 58 (S-2): 50-68
- 23) 堀 誠治, 砂川慶介: Tebipenem pivoxil 細粒の小児臨床試験における安全性の検討。日化療会誌 2009; 57 (S-1): 192-204
- 24) 菅野利恵, 吉田卓史, 山田恵子, 清水敦之, 森田 順, 木島功嗣, 他: 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。日化療会誌 2009; 57 (S-1): 38-48
- 25) 杉田麟也, 岩田 敏, 馬場駿吉: 高用量アモキシシリン/クラブラン酸製剤の有用性—小児中耳炎を対象とした多施設共同臨床試験—。新薬と臨床 2005; 54: 1056-72
- 26) 大槻俊治, 三次孝一, 牛沢幸司, 江角凱夫, 南保俊雄, 横島徹熹, 他: BRL25000 の体内動態 第3報 ラットおよびイヌにおける BRL25000 投与時の BRL14151, AMPC の挙動。Chemotherapy 1983; 31 (S-2): 321-9
- 27) 藤井良知, 吉岡 一, 奥野晃正, 藤田晃三, 室野晃一, 丸山静男, 他: 小児科領域における Cefditoren pivoxil 剤の総合評価。Jpn J Antibiot 1993; 46: 95-114
- 28) 松元 隆, 岡本淳一, 斉藤光一, 相沢一雅, 小宮 泉: 新経口セフェム剤, ME1207 の実験動物における体内動態。Chemotherapy 1992; 40 (S-2): 120-9
- 29) Stewart P S, Costerton J W: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-8
- 30) Takahata M, Sugiura Y, Fukuda Y, Mitsuyama J: Bactericidal activity of garenoxacin against *in vitro* biofilm formed by nontypeable *Haemophilus influenzae*. 50th ICAAC 2010; (Abstract B-713)

In vitro antibactericidal activity of tosufloxacin against non-typeable *Haemophilus influenzae* forming biofilm

Yoko Sugiura, Masahiro Takahata, Yoshiko Fukuda and Nobuhiko Nomura

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

The minimum inhibitory concentration (MIC) of tosufloxacin (TFLX) against non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) isolated from pediatric otitis media was determined, and was compared to those of amoxicillin (AMPC), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC, 1 : 14), cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN) and tebipenem (TBPM). The *in vitro* antibactericidal activity of TFLX against β -lactamase-negative, ampicillin (ABPC)-susceptible *H. influenzae* (BLNAS) and β -lactamase-negative, ABPC-resistant *H. influenzae* (BLNAR) forming biofilm was also compared to those of CVA/AMPC, CDTR and TBPM. The results are summarized as follows:

1. The MIC_{90S} of TFLX against 51 strains of BLNAS and 58 strains of BLNAR were 0.0078 and 0.0156 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, and were 1/8 to 1/512 of those of reference agents. MICs of TFLX against all 5 strains of β -lactamase-positive, ABPC-resistant *H. influenzae* were 0.0039 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and were 1/2 to <1/16,384 of those of reference agents. TFLX has potent antibacterial activities against NTHi including β -lactam-resistant strains isolated from pediatric otitis media.
2. In BLNAS I-2716 and BLNAR I-2580 forming biofilm, TFLX reduced 3.03–>6.46 Log₁₀ CFU/mL in viable cell counts from the initial inoculum, after exposure to 100 times the MIC, which is equivalent to the free-drug AUC_{0–24} (*f*AUC_{0–24}) at a clinical dosage in pediatric patients for 24 hours or 10 times the MIC (1/10 of *f*AUC_{0–24}). Scanning electron microscopy demonstrated a reduction of bacterial layer forming biofilm after exposure to TFLX. In contrast, β -lactam antibacterial agents showed little bactericidal activity and almost no alteration of the shape of bacterial layer.

In conclusion, TFLX can be expected to be a valuable agent in the treatment of persistent otitis media in pediatrics caused by NTHi forming biofilm.