β-ラクタム系薬耐性肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する経口抗菌薬作用後の形態変化

千葉菜穂子・諸角美由紀・生方公子

北里大学北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室

（2012年7月9日受付）

ペニシリン耐性肺炎球菌（penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: PRSP）とβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌（β-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*: BLNAR）に対する経口抗菌薬作用後の経時的形態変化について位相差顕微鏡下で観察した。また，BLNARに関しては，その形態変化を電子顕微鏡下でも観察した。使用菌株は，肺炎球菌がME19株（genotype: gPRSP，莢膜19F型），インフルエンザ菌がJPH002株（gBLNAR，莢膜b型）である。薬剤はamoxicillin（AMPC），cefditoren（CDTR），tebipenem（TBPM），tosufloxacin（TFLX）を対象とした。作用濃度はそれぞれの薬剤を通常投与量で小児に投与した際に得られるCmax到達から1時間後の血中濃度とした。gPRSPでは，TBPMを作用させた場合のみ20分後から溶菌像が認められ，2時間後には90%の細胞が溶菌した。溶菌までのスピードやその割合の高さから，本薬の殺菌性の強さが裏づけられた。AMPCとTBPMを作用させたgBLNARは，スフェロプラスト化（膨化）した菌からの溶菌細胞と，細胞内に空胞を形成した細胞が観察された。CDTRでは，著しくフィラメント化した細胞からの溶菌像，TFLXではややフィラメント化したまま死滅したと推定される細胞が観察された。それぞれの薬剤の殺菌性やすでに報告されているPBPに対する親和性の違いを反映する経時的形態変化は，抗菌薬選択の上で有益な情報と結論された。

肺炎球菌やインフルエンザ菌は，小児の呼吸器系感染症において最も重要な起炎菌であり，時に致命的な敗血症や化膿性髄膜炎等を惹起する。これらの菌の病原性発揮には，菌が産生する多様な病原因子とともに，宿主側の免疫学的未熟性も関わっていることが知られている[1,2]。

本邦においては，1990年代初めからペニシリン耐性肺炎球菌（penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: PRSP），1990年代後半からβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌（β-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*: BLNAR）が急速に増加し，治療上の問題となってきた[3]。以前は，経口抗菌薬の投与によって治療可能であった気管支炎等の呼吸器疾患の重症化や，急性中耳炎の難治化が挙げられる[4,5]。

肺炎球菌やインフルエンザ菌は，それらに対する抗体産生能が低い年齢層の乳幼児では上咽頭などに定着し，常在化しやすい[6]。このため，小児における両菌は，成人よりも抗菌薬に曝される機会が多いと推定され，*β*-ラクタム系薬耐性化が問題化したのも小児からである。耐性化の特徴として，肺炎球菌の*β*-ラクタム系薬に対する耐性化は，PBP2Xをコードする*pbp2x*遺伝子の変異による抗菌力のわずかな低下から始まっている。これら変異株に対する経口セフェム系薬のMIC値はそれぞれの薬剤の上咽頭や中耳病巣内濃度をわずかに上回る程度で，菌を完全に死滅させることはできない。そのような菌がさらに同系統の薬剤に触れると，PBP1AやPBP2Bをコードする*pbp1a*あるいは*pbp2b*遺伝子に変異が生じ，遺伝子変異が積み重なることになる。すなわち，遺伝子学的にはgenotypic（g）なgPRSPと表される耐性菌である[7]。

インフルエンザ菌の*β*-ラクタム系薬耐性化は，PBP3をコードする*ftsI*遺伝子の変異によるアミノ酸置換であるが，薬剤のPBP3への結合親和性に影響するアミノ酸置換が重なると感受性は低下，すなわち耐性化する[8]。これらも遺伝子学的にはgBLNARとして生物学的手法による耐性菌とは区別する。このような呼吸器系感染症由来のgPRSPやgBLNARの耐性レベルは，経口抗菌薬で得られる血中濃度あるいは病巣濃度よりもやや上まわった程度であることが特徴である。

これら耐性菌による小児の治療用抗菌薬として，2009年6月に承認され同年8月に発売されたのがTebipenem pivoxil（TBPM-PI）である[9]。また，2009年12月にはtosufloxacin（TFLX）[10]が承認され，翌年発売に至っている。前者は小児を対象とした世界初の経口カルバペネム系抗菌薬であり，その特徴は，耐性菌に対しペニシリン系薬やセフェム系薬よりも優れた抗菌活性と殺菌性を示す[11,12]こと，比較的高い血中濃度が得られる点にある。TFLXもTBPMと同様に小児のPRSPおよびBLNARを含む感染症に限定されているが，インフルエンザ菌に対する抗菌活性に優れる[10]。

本論文においては，amoxicillin（AMPC），cefditoren（CDTR），TBPMおよびTFLXの経時的殺菌効果の特徴を，主に薬剤作用後の形態変化の上から比較した成績について述べる。

材料と方法

1. 被験菌株

被験菌株とした肺炎球菌は，TBPM-PIの小児における治験時に急性中耳炎例より分離されたME19株である。本菌は莢膜型19F，耐性遺伝子型はgPRSP（*pbp1a*＋*2x*＋*2b*）である。寒天平板希釈法により測定した肺炎球菌の感受性測定の基準薬であるpenicillin G（PCG）に対する感受性は2μg/mL，また，主たる経口抗菌薬に対する感受性は，ampicillin（ABPC）: 2μg/mL, AMPC: 1μg/mL, CDTR: 1μg/mL, cefdinir（CFDN）: 8μg/mL, TBPM: 0.063μg/mL, TFLX：0.5μg/mL, erythromycin（EM）: 2μg/mLである[13]。

インフルエンザ菌は，化膿性髄膜炎由来の莢膜b型株で*ftsI*遺伝子のPCR解析によってgBLNARと判定されたJPH002株を用いた。寒天平板希釈法により測定した本菌の主たる経口抗菌薬に対する感受性は，ABPC: 2μg/mL，AMPC: 4μg/mL，CDTR: 0.25μg/mL，CFDN: 2μg/mL，TBPM: 0.5μg/mL，およびTFLX: 0.008μg/mLである。

2. 位相差顕微鏡観察

i）肺炎球菌

gPRSPのME19株は，Todd Hewitt（TH）Brothに接種し，37℃で60分間の静置培養後，film agarに接種した。薬剤フリーで30分間培養後，抗菌薬を灌流法で作用させた。薬剤の作用濃度は，小児の体内動態により近づけて評価したいと考え，小児に対してそれぞれの薬剤を投与した後のCmax

から約1時間後に得られる血中濃度に設定した。この濃度設定は，被験菌がそれぞれの薬剤の2×MIC以上に曝される時間が2.5時間以上保たれることを勘案，その時間の最も短いCDTRに合わせ一律に設定したものである。

すなわち，AMPCは45 mg/kg投与で得られる12.7 μg/mL（Cmax 15.7 μg/mL）[14]，CDTRは6 mg/kgで得られる2.1 μg/mL（Cmax 2.9 μg/mL）[15]，TBPMは4 mg/kg投与で得られる1.7 μg/mL（Cmax 3.5 μg/mL）（未発表データ）とした。

肺炎球菌細胞の形態学的変化の観察は，抗菌薬を作用させる30分前から開始し，薬剤作用2.5時間後まで10秒間隔で撮影した。使用した位相差顕微鏡は，DIAPHOT（Nikon）である。

ii）インフルエンザ菌

gBLNARのJPH002株は，0.5% yeast extract, 2%の加熱処理した馬脱繊維血液，および15 μg/mLのβ-NAD$^+$のsupplementを含むMH brothを用い，37℃で60分間の前培養を行った後film agarに接種した。灌流法で作用させる薬剤の作用濃度の設定は，肺炎球菌と同様である。TFLXは，小児に対し6 mg/kgの投与で得られるCmax到達濃度の1 μg/mLから1時間後の0.9 μg/mL[16]とした。

また，薬剤作用後の形態学的変化の観察についても，肺炎球菌と同様に実施し，3時間後まで10秒間隔で撮影した。本論文においてはその中から30分ごとの画像を抽出し，比較した。

3. 透過型電子顕微鏡による形態変化の観察

gBLNARのJPH002株は，まず0.5% yeast extract, 2%の加熱処理した馬脱繊維血液，および15 μg/mLのβ-NAD$^+$のsupplementを含むMH broth（50 mL）を用い，37℃で5%炭酸ガス培養を18時間実施した。培養後，その3 mLをsupplementが入った新たなMH broth（100 mL）中に接種し，37℃で180分間培養した。その後，それぞれの抗菌薬を加え，37℃で120分間培養した。それぞれの作用濃度は，動画撮影時と同一濃度である。

前固定は，0.1 Mリン酸バッファー（pH 6.8）でpH調整した0.5%グルタルアルデヒド液にて室温で20分間細胞を固定した。細胞表面を固定された菌細胞は，1,400×*g*，5分間の遠心を行い回収した。細胞ペレットは再び新しい2.5%グルタルアルデヒド液に入れ，さらに4℃で120分間固定した。続いて2%の四酸化オスミウム液に交換し，4℃で1夜，後固定した[17]。被験菌はエタノール/アセトンシリーズで脱水処理を行った後，Quetol 812に包埋，超薄切片を作成後，6%酢酸ウラニウムで染色して透過型電子顕微鏡（JEOL JEM-1200 EXS型，日本電子（株））で観察した。

結果

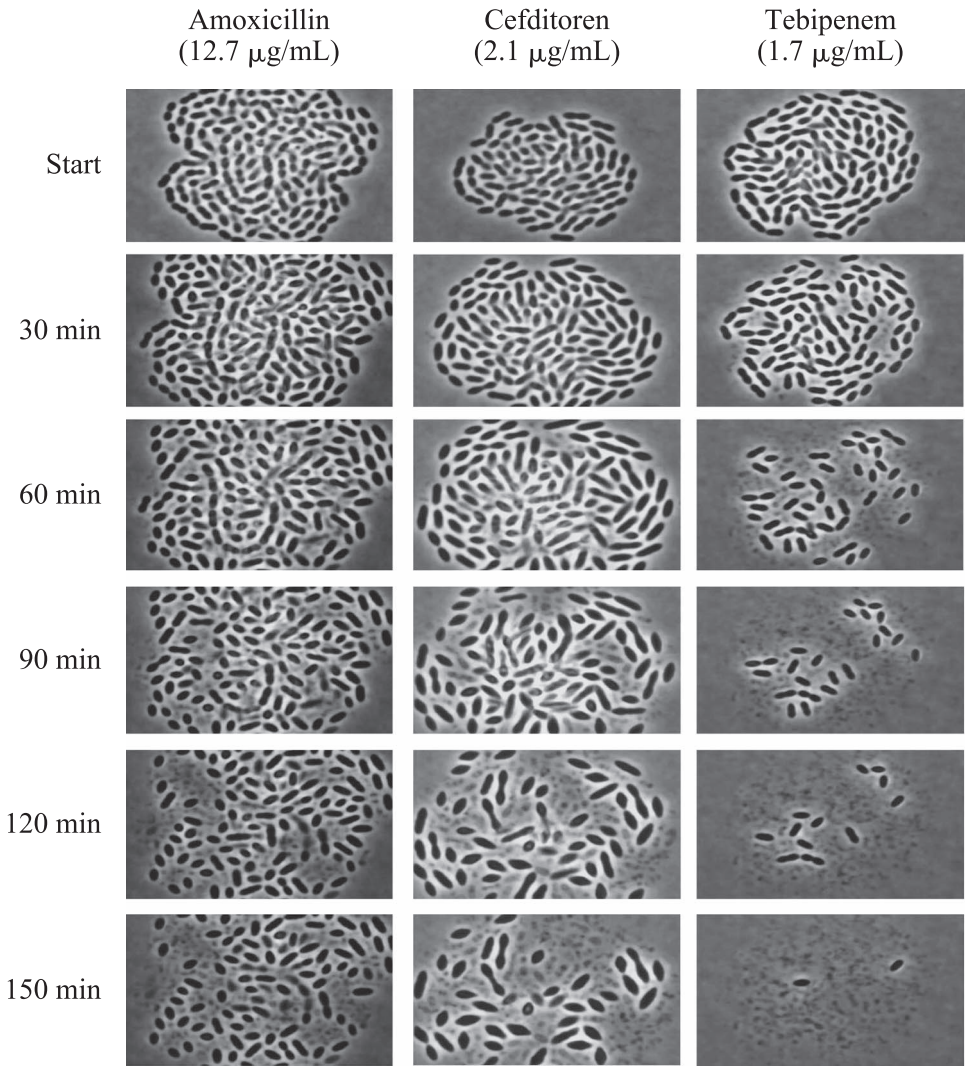
1. 肺炎球菌に対する薬剤作用時の形態学的変化

gPRSPのME19株に対してAMPC（12.7 μg/mL），CDTR（2.1 μg/mL）およびTBPM（1.7 μg/mL）を作用させた30分ごとの経時的な形態変化はFig. 1に示す。本菌に対する3薬剤の作用濃度とMICの比は，AMPCが作用濃度（12.7 μg/mL）/MIC（1.0 μg/mL）で12.7倍，CDTRのそれは作用濃度（2.1 μg/mL）/MIC（1.0 μg/mL）で2.1倍，TBPMが作用濃度（1.7 μg/mL）/MIC（0.063 μg/mL）で27.0倍である。また，Fig. 2には薬剤添加後の画面上の肺炎球菌細胞数を100として30分ごとの溶菌率を示した。

AMPC作用では，細胞は30分後までやや伸長化しながら膨化する像が確認され，40分後から徐々に溶菌像がみられ始めた。そして，60分後には14%，90分後には22%，120分後には32%の細胞が溶菌した。

Fig. 1の中央に示したCDTR作用では，薬剤作用30分後にはAMPCよりもさらに細胞の伸長化と増加が著明であった。菌数もむしろ一時的に増加していた。しかし，それ以降になると，そのよ

Fig. 1. Time series of morphological changes in *S. pneumoniae* strain ME19（gPRSP）.

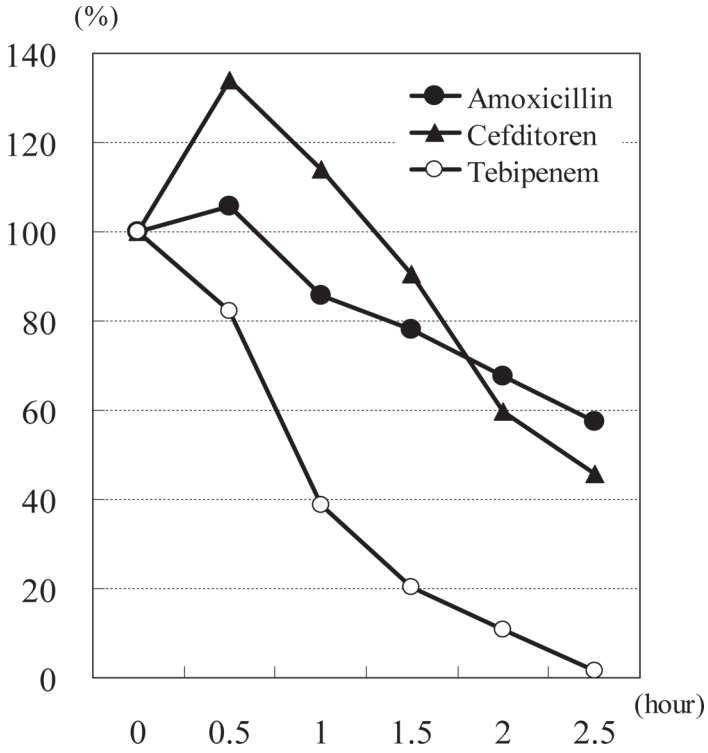


The bacterial cells were exposed to AMPC（12.7 μg/mL）, CDTR（2.1 μg/mL）and TBPM（1.7 μg/mL）, respectively. Observation was made with a phase-contrast microscope.

うな伸長化した細胞から次第に溶菌像が観察された。90分後にはスタート時の菌数から10%減少していた。減少率は120分後には40%となり，AMPCの溶菌率と逆転した。溶菌像を詳細に観察すると，伸長化した細胞の中央部分，すなわち隔壁形成部位に相当する部位からちぎれるように溶菌した。

Fig. 1の右に示したTBPM作用では，菌は膨化することなく薬剤作用20分後から溶菌像が観察され始めた。30分後には全体の18%が溶菌，60分後には61%，90分後には80%，120分後には89%の溶菌像が認められた。観察時間を通じ，TBPMではほぼ通常の大きさの細胞のままで，風船が弾けるように溶菌し，AMPCやCDTRに比較して，明らかに短時間殺菌性に優れていた。

Fig. 2. The half-hourly rate of lysis was measured defining the number of cells directly after exposure to the three antibacterial agents: AMPC（12.7μg/mL）(●), CDTR（2.1μg/mL）(▲) and TBPM（1.7μg/mL）(○) as 100.



2. インフルエンザ菌の薬剤作用時の形態学的変化

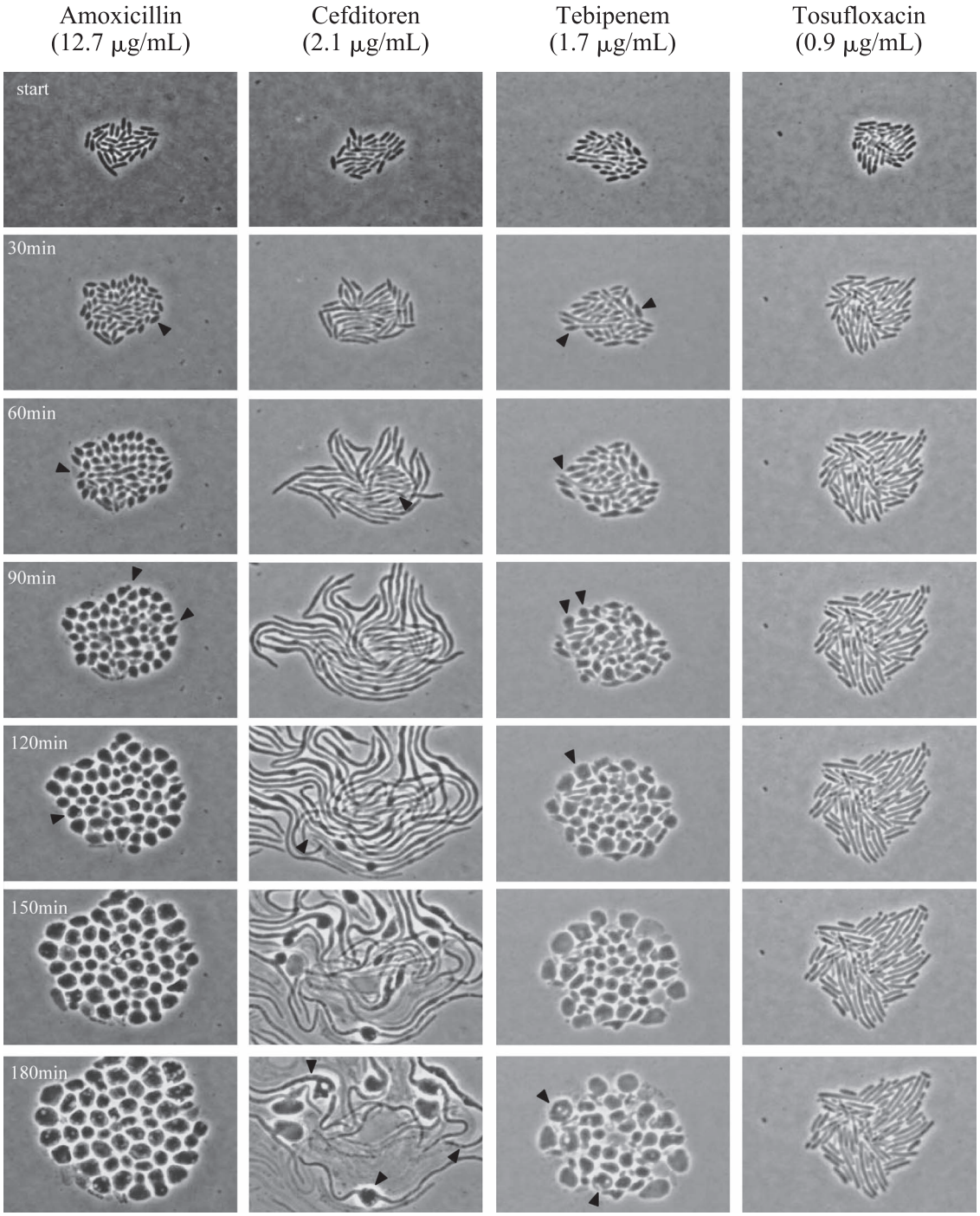
1）位相差顕微鏡による連続観察

gBLNARのJPH002株に対してAMPC（12.7μg/mL），CDTR（2.1μg/mL），TBPM（1.7μg/mL），およびTFLX（0.9μg/mL）をそれぞれ作用させた後の30分ごとの経時的形態変化をFig. 3に示す。本菌に対する4薬剤の作用濃度とMICの比は，AMPCが作用濃度（12.7μg/mL）/MIC（4.0μg/mL）で3.2倍，CDTRのそれは作用濃度（2.1μg/mL）/MIC（0.25μg/mL）で8.4倍，TBPMのそれは作用濃度（1.7μg/mL）/MIC（0.5μg/mL）で3.4倍，TFLXのそれは作用濃度（0.9μg/mL）/MIC（0.008μg/mL）で113倍である。

AMPC作用では30分後から細胞の膨化が始まり，スフェロプラスト状を呈した（▲部分）。60分に達する前には溶菌する細胞も認められた。その後，さらなるスフェロプラスト化と脆弱部位からの膨化が観察された。120分後になるとスフェロプラスト化した細胞内に空胞形成がみられ始めた。180分後，溶菌はほとんど認められなかったが，すべての細胞に空胞が形成されていた。

CDTRを作用させた細胞は，作用後すぐに隔壁合成が阻害されフィラメント化が始まった。そして60分後には溶菌像がわずかに観察された（▲部分）。溶菌の際には，細胞は伸長化により脆弱した部分が膨化し，破裂崩壊していた。作用90分後，細胞はさらにフィラメント化しながらわずかに溶菌，120分後になると細胞が次々と溶菌していく像が観察された。作用180分後には，大部分のフィラメント化した細胞は溶菌したが，中には薬剤作用前の小桿菌から分裂する時の隔壁形成部位

Fig. 3. Time series of morphological changes in *H. influenzae* strain JPH002 (gBLNAR).



The bacteria were exposed to each of AMPC (12.7 μg/mL), CDTR (2.1 μg/mL), TBPM (1.7 μg/mL) and TFLX (0.9 μg/mL).

が膨化し，溶菌しないまま残存した細胞もわずかながら観察された。

TBPM作用では30分後，細胞は膨化し始め，その後，AMPCと同様に，徐々に大きなスフェロプラスト細胞が形成された。60分を経過する頃から溶菌像が出現し始め，90分後になると脆弱部位からの膨化が観察された。120分後，細胞はさらに大きく膨化し，細胞内に空胞が観察され始めた。時間を追うごとに膨化しつつ，溶菌する細胞が増加したが，溶菌しない細胞内には空胞が形成されていた。180分後，TBPMを作用させた細胞の95%に空胞が観察された（▲部分）。

一方，TFLXを作用させた細胞は，90分後まで分裂増殖しながら伸長化した。しかし，それ以降での細胞の伸長化は停止，溶菌像も認められなかった。

2）透過型電子顕微鏡による観察

位相差顕微鏡下で観察された薬剤作用後のインフルエンザ菌について菌体内と細胞壁の変化を観察するため，同一条件で作製したサンプルを透過型電子顕微鏡で観察した像をFig. 4に示す。

コントロールの抗菌薬を作用させていないインフルエンザ菌は，長軸が0.5 μm前後の短桿菌である（Fig. 4A）。同菌にAMPCを2時間作用させると，菌体は膨化し，最外層の細胞壁部分が脆弱化し剥離した像が観察された（Fig. 4B）。CDTRを同じ2時間作用させると，細胞はフィラメント状に伸長化し，脆弱化した細胞壁部位から菌体内容物が飛び出してスフェロプラスト状となり破裂した像が観察された（Fig. 4C）。

TBPMを120分間作用させたインフルエンザ菌の低倍率の像はFig. 4Dに示す。AMPCよりもさらに球状化し，一部内容物が飛び出している像が観察された。また，Fig. 4Eにみられるようにスフェロプラストがかなり変形した像も観察された。さらに180分後には細胞内に多数の大きな空胞が観察され，位相差顕微鏡で観察された像と一致していた（Fig. 4F）。

考察

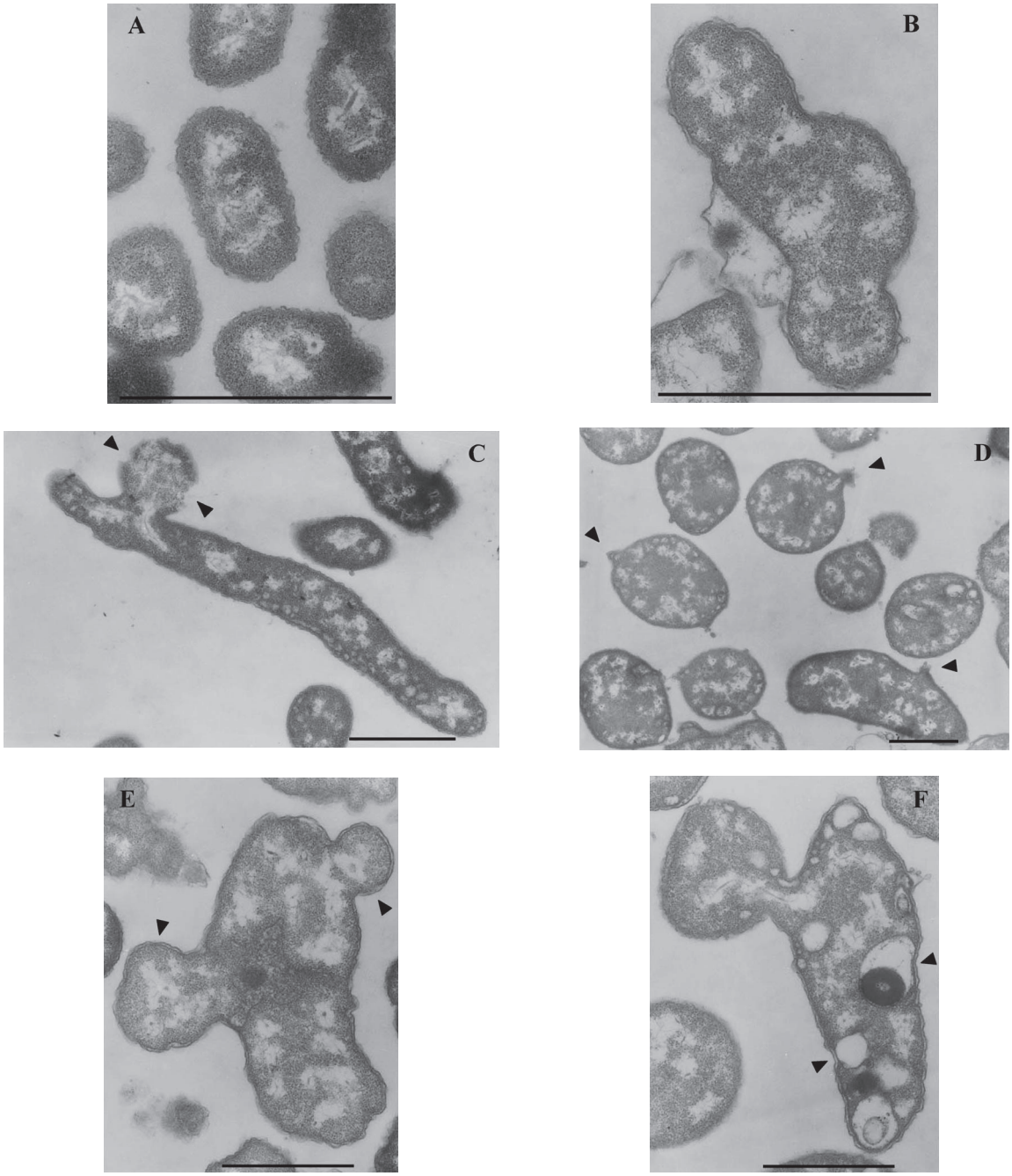
呼吸器感染症における最も主要な病原細菌の肺炎球菌におけるgPRSPの増加は，外来診療における経口抗菌薬の選択の幅を狭めている。特に，小児に対しては，ニューキノロン系薬はほとんど使用不可能なことから，β-ラクタム系薬あるいはマクロライド系薬の中から選択しなければならない。しかし，本邦における小児の肺炎例由来の肺炎球菌は52.3%がgPRSP，マクロライド系薬にも*erm*Bを保持する高度耐性菌が48.5%，*mef*A保持の軽度耐性菌が30.6%，*erm*Bと*mef*Aの両方の保持菌が7.7%と極めて高い割合となっている[18]。侵襲性感染症由来株でもほぼ同様の耐性率となっている[19]。

一方，成人における侵襲性感染症由来の肺炎球菌においては，gPRSPの割合は32.0%とやや低いが，経口セフェム系薬に対する感受性を低下させるgPISP（*pbp2x*）の割合が35.3%と高い[19]。

他方，インフルエンザ菌においても2000年以降，日本においてはgBLNARが急速に増加している。インフルエンザ菌b型（*Haemophilus influenzae* type b: Hib）ワクチンが最近まで導入されなかったことや，呼吸器系感染症のみならず化膿性髄膜炎の原因菌としてその耐性率が45%を上回ることから治療上の問題となってきた[20]。

インフルエンザ菌の中の病原性の明らかなHibは，2007年1月にHibワクチンが承認されたことにより，Hib侵襲性感染症は減少しつつある[21]。しかし，急性中耳炎や肺炎を惹起する無莢膜型のインフルエンザ菌（Nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi）の問題が依然として残っている。NTHiにもBLNARは60%以上認められ，しかもAMPCの抗菌力が劣ることが問題である[22]。このような背景から，耐性菌による小児の呼吸器

Fig. 4. Morphological changes in *H. influenzae* JPH002 cells.



(A) Control cells, (B) after exposure to AMPC (12.7 μg/mL) for 2 h, (C) after exposure to CDTR (2.1 μg/mL) for 2 h, (D) and (E) after exposure to TBPM (1.7 μg/mL) for 2 h, (F) after exposure to TBPM (1.7 μg/mL) for 3 h, respectively.
Cells were observed with a transmission electron microscope (model JEOL JEM-1200 EXS, JEOL Ltd).
Each bar indicates 1 μm.

感染症用治療抗菌薬として開発されたのがTBPMである。

TBPMの肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する抗菌活性と経時的殺菌効果は，小林ら[11]，岸井ら[12]によって，報告されているが，その特徴は殺菌性が優れていることにある。特徴は臨床にも反映され，特にgPRSPが原因菌であった症例において，投与3日目で菌の消失が認められている[23]。本薬が優れた殺菌性を発揮するのは，肺炎球菌のPBP1AとPBP2Bに高い親和性を有しているためである[24]。前者は細胞壁を長軸方向へ合成する酵素，後者は本菌特有の菌体先端のランセット型を形成する酵素である。このため，TBPMでは菌が伸長化しないで溶菌するのに対し，隔壁合成酵素が第一標的のセフェム系薬は伸長化した後，溶菌するといった違いがみられる[11]。

肺炎球菌に対するセフェム系薬の作用では，菌は隔壁合成が阻害されて著しく伸長化した後，脆弱化した隔壁部分から溶菌するのに対し，TBPMでは作用後分裂が起こらず2.5時間で速やかにほぼ完全に溶菌する像が観察された。TBPMのgPRSPに対するMICは0.031–0.063 μg/mLであるが，4 mg/kg投与時の約30分後に得られる最高血中濃度は平均3.5 μg/mL，その1時間後の血中濃度は，1.7 μg/mLとされている。投与2時間後の血中濃度も約1.4 μg/mLあるとされ，gPRSPのMICの約10倍の薬剤濃度が保たれていると推測できる。つまり，TBPMで明らかに優れた臨床効果が得られているのは，gPRSPのMICを大きく上回る血中濃度が長く保たれていること，短時間殺菌性に優れていることによると考えられる。

一方，インフルエンザ菌に対するTBPMの殺菌性は，結果に示したように作用後1時間から溶菌像が観察され始めるが，その多くは巨大なスフェロプラストのまま，次第に細胞内に空胞を形成し，死滅していく。そのため，肺炎球菌よりも溶菌に時間を要すると考えられる。しかし，岸井ら[12]の殺菌効果の成績によると，ヒト血清を10%の割合で加えた場合，MIC濃度のTBPMを作用させた2時間後に3-$\log_{10}$の生菌数の減少が認められたと報告しており，臨床での短時間殺菌性を示唆している。

AMPCやTBPMを作用させたインフルエンザ菌は，細胞壁を長軸方向へ新たに伸長化する合成酵素阻害によってスフェロプラスト化し，細胞壁の脆弱部位から破裂崩壊に至る。これらの薬剤はインフルエンザ菌の細胞壁合成酵素のPBP1B，2および4に対して結合親和性を有しているためである[24]。つまり，セフェム系薬のCDTR等がPBP3に高い親和性を有し，著しく伸長化した後に溶菌するのとは明らかに異なる。

電子顕微鏡によって観察されたように，インフルエンザ菌の細胞壁部分はβ-ラクタム系薬の作用によりスフェロプラスト化しても，細胞内圧と外圧の差に比較的耐えるような構造をしているため，肺炎球菌に比していずれの薬剤であっても溶菌に時間を要すると考えられた。また，この細胞壁構造により，溶菌するまでは菌は死滅していないと考えられる。生方ら[25]は，β-ラクタム系薬作用後のスフェロプラスト化した菌を薬剤フリーの環境へ戻すと，再増殖する能力を保持していることをすでに報告している。

一方，DNA合成阻害薬であるTFLXは，一定時間作用させるとDNA合成が阻害され，次いでタンパク合成が二次的に阻害されて溶菌せずに死滅していると考えられる。このため，Fig. 3に示したように基本的に溶菌しないままに死滅していくと推定されるが，今後はアクリジンオレンジ等の生体染色でそのことを確認する必要があると考えている。

最後に，gPRSPやgBLNARによる感染症の治療抗菌薬を選択する際には，使用抗菌薬の特徴をよく把握して選択することが必要不可欠であることを強調しておきたい。

謝辞

本研究に際し，画像撮影に御協力いただきましたヨネ・ヨネプロダクションに感謝申し上げます。

引用文献

1）紺野昌俊，生方公子：改定ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画，東京，1999
2）紺野昌俊：インフルエンザとインフルエンザ菌。新日本印刷，東京，2010
3）Ubukata, K.: Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. J. Infect. Chemother. 9: 285～291, 2003
4）末武光子：急性中耳炎病態の変貌―変貌する急性中耳炎：ペニシリン耐性肺炎球菌性中耳炎の現状と対策―。山中　昇（編）金原出版，東京，pp. 40～52, 2000
5）山中　昇，保富宗城：難治化する急性中耳炎―難治化の要因とその対策―。日本感染症学雑誌77: 595～605, 2003
6）Konno, M.; S. Baba, H. Mikawa, *et al.*: Study of upper respiratory tract bacterial flora: first report. Variations in upper respiratory tract bacterial flora in patients with acute upper respiratory tract infection and healthy subjects and variations by subject age. J. Infect. Chemother. 12: 83～96, 2006
7）Ubukata, K.; T. Muraki, A. Igarashi, *et al.*: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J. Infect. Chemother. 3: 190～197, 1997
8）Ubukata, K.; Y. Shibasaki, K. Yamamoto, *et al.*: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1693～1699, 2001
9）Hikida, M.; K. Itahashi, A. Igarashi, *et al.*: *In vitro* antibacterial activity of LJC 11,036, an active metabolite of L-084, a new oral carbapenem antibiotic with potent antipneumococcal activity. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2010～2016, 1999
10）岩田　敏，岩井直一，尾内一信，他：Tosufloxacin細粒10%の小児細菌性肺炎を対象とした非盲検非対照臨床試験。日本化学療法学会雑誌58（S-2）: 32～49, 2010
11）Kobayashi, R.; M. Konomi, K. Hasegawa, *et al.*: *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 889～894, 2005
12）Kishii, K.; N. Chiba, M. Morozumi, *et al.*: *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 3970～3973, 2010
13）生方公子，千葉菜穂子，諸角美由紀，他：Tebipenem pivoxilの小児臨床試験における肺炎球菌のPCR法による耐性遺伝子解析と抗菌薬感受性。日本化学療法学会雑誌57（S-1）: 58～66, 2009
14）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。新薬と臨牀54: 1056～1072, 2005
15）藤井良知，吉岡　一，奥野晃正，他：小児科領域におけるCefditoren pivoxil粒剤の総合評価。Jpn. J. Antibiotics 46: 95～114, 1993
16）砂川慶介，岩井直一，岩田　敏，他：母集団薬物動態―薬力学的解析に基づくtosufloxacin小児用細粒の臨床推奨用量。日本化学療法学会雑誌58（S-2）: 69～77, 2010
17）生方公子，沢井　稔，紺野昌俊：*Haemophilus influenzae*感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について（第3編）。Chemotherapy 26: 656～665, 1978
18）Chiba, N.; R. Kobayashi, K. Hasegawa, *et al.*: Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. J. Antimicrob. Chemother. 56: 756～760, 2005
19）生方公子：重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析その診断・治療に関する研究（H22-新興-

一般-013）。新日本印刷，東京，2012
20）Hasegawa, K.; R. Kobayashi, E. Takada, *et al.*: High prevalence of type b beta-lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. J. Antimicrob. Chemother. 57: 1077～1082, 2006
21）Ubukata, K.; N. Chiba, M. Morozumi, *et al.*: Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. J. Infect. Chemother. 2012 Jul 18. [Epub ahead of print]
22）Kishii, K.; N. Chiba, M. Morozumi, *et al.*: Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. J. Infect. Chemother. 16: 87～93, 2010
23）馬場俊吉，鈴木憲二，戸塚恭一，他：Tebipenem pivoxil細粒の小児急性中耳炎および急性副鼻腔炎を対象とした非盲検非対照臨床試験（第III相試験）。日本化学療法学会雑誌57（S-1）: 151～166, 2009
24）菅野利恵，山田恵子，馬場信吉，他：Tebipenemの*Streptococcus pneumoniae*および*Haemophilus influenzae*に対する作用機序。日本化学療法学会雑誌57（S-1）: 15～29, 2009
25）生方公子，高橋洋子，紺野昌俊：*Haemophilus influenzae*感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について（第4編）。Chemotherapy 26: 666～675, 1978

Morphological changes in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *β*-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* after exposure to oral antibacterial agents

Naoko Chiba, Miyuki Morozumi and Kimiko Ubukata

Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University,
5–9–1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108–8641, Japan

Morphological changes in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*（PRSP）and *β*-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*（BLNAR）after exposure to oral antibacterial agents could be observed over time under a phase-contrast microscope. Morphological changes in BLNAR were also observed using a scanning electron microscope. The organisms used in this study were ME19F strain identified as genotypic（g）gPRSP（serotype: 19F）and JPH002 strain identified as gBLNAR（serotype: b）. The antibacterial agents used were amoxicillin（AMPC）, cefditoren（CDTR）, tebipenem（TBPM）, and tosufloxacin（TFLX）. The concentration of each antibacterial agent to which the bacteria were exposed was set at the blood level one hour after Cmax when administered to children at the usual dose.

Bacteriolysis of gPRSP cells started after exposure of only 20 minutes to TBPM, and 90% of

the cells were lysed within 2 hours. A high bactericidal action of TBPM on gPRSP was supported by these findings.

When gBLNAR was exposed to AMPC and TBPM, lysis from spheroplasts and cells with vacuoles were sometimes observed. In contrast, after gBLNAR was exposed to CDTR, lysis occurred after marked filamentation in the cells, but after exposure to TFLX, cells deduced to be killed after mild filamentation without lysis.

Time-dependent morphological changes that reflect the differences in bactericidal activity and PBP affinity among β-lactams provide beneficial information to select antibacterial agents.