ヒト培養細胞内侵入*Haemophilus influenzae*に対するトスフロキサシンの影響
―インフルエンザ菌による小児急性中耳炎反復メカニズムの視覚化と治療の可能性―

山中　昇
藤沢御所見病院

保富宗城
和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

（2016年8月10日受付）

急性中耳炎の二大起炎菌の1つであるnontypeable *Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）は，宿主細胞内に侵入することにより小児急性中耳炎の難治化（遷延化，反復化）に影響すると考えられる。本研究では，ヒト培養細胞に侵入したインフルエンザ菌の動態を視覚化するとともに，ヒト培養細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するニューキノロン系抗菌薬のトスフロキサシンおよびセフェム系抗菌薬のセフジトレンの影響を*in vitro*にて検討した。

その結果，①インフルエンザ菌はヒト細胞内に侵入すること，②セフジトレンはヒト細胞内のインフルエンザ菌に影響を与えないこと，③トスフロキサシンはヒト細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対し殺菌的に作用することの3点が示唆された。

以上の成績は，トスフロキサシンの小児難治性中耳炎に対する高い臨床効果を支持するものと考える。

急性中耳炎は，小児期に最も多くみられる感染症の1つである[1)]。近年，特に2歳未満の小児を中心に経口抗菌薬による治療にもかかわらず，容易に症状が改善しない遷延例や，感染を繰り返す反復例といった，いわゆる難治例が多くみられるようになっている[2)]。

急性中耳炎の二大起炎菌の1つであるnontypeable *Haemophilus influenzae*（以下，インフルエンザ菌）は，宿主細胞内に侵入することにより小児急性中耳炎の反復性に[3)]，バイオフィルムを形成することにより遷延性にそれぞれ関連すると考えられる[4)]。

トスフロキサシン（オゼックス®細粒小児用15%）は，小児急性中耳炎に対し，ニューキノロン系抗菌薬として初めて保険適用が認められた薬剤である。その背景として，ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）やβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性（BLNAR）インフルエンザ菌などの耐性菌が1990年以降に急増し，従来小児急性中耳炎の治療の中心であったβ-ラクタム系抗菌薬では効果不十分な症例が多く認められるようになったことがあ

げられる。小児急性中耳炎児からの検出菌に対する検討では，トスフロキサシンは*Streptococcus pneumoniae*（以下，肺炎球菌），インフルエンザ菌，*Moraxella catarrhalis*（以下，モラクセラ）の三大起炎菌に対し良好な抗菌力を有することが示された[5]。さらに，トスフロキサシンは，良好な細胞内移行性を示すことが報告されている[6]。

そこで，本研究では，ヒト培養細胞内に侵入したインフルエンザ菌の動態を視覚化するとともに，ヒト培養細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するトスフロキサシンの影響について*in vitro*にて検討した。

I. 材料と方法

1. 細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するトスフロキサシンの影響の視覚化

(1) 材料

本研究では，インフルエンザ菌として当施設で継代培養中のβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン感受性（BLNAS）であるIH202株を用い，感染細胞にはヒト咽頭癌由来細胞であるDetroit 562細胞（American Type Culture Collectionより購入）を用いた。抗菌薬はトシル酸トスフロキサシン（大正富山医薬品(株)より提供）およびセフジトレンナトリウム（ナミキ商事(株)より購入）を用いた。

(2) 方法

Detroit 562細胞は，10%ウシ胎児血清（FBS）を含む変法イーグル培地（MEM）で継代培養後，直径27 mmのガラスベースディッシュに播種し，37℃, 5% CO_2下で2～4日間培養した。IH202株は，Brain Heart Infusion寒天培地（BHIA）にヘミンおよびβNADを添加して培養した。インフルエンザ菌の蛍光標識には，AcidiFluor™ ORANGE-NHS（五稜化薬(株)）を用いた。

培養したDetroit 562細胞にIH202株を1×10^7個/mLとなるように加え，37℃, 5% CO_2下で4時間培養した。4時間培養後，浮遊菌を培地交換によって除去し，200 μg/mLのゲンタマイシンを含む1% FBS含有MEMを添加し，37℃, 5% CO_2下で2時間培養して，細胞外に存在するインフルエンザ菌を殺菌した。ゲンタマイシン含有培地除去後，トスフロキサシン（最終濃度0.96 μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）を含む1% FBS含有MEMを添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養した。3時間培養後，0.025% Triton X-100により培養細胞の細胞膜を破壊し，LIVE/DEAD®細胞生存率アッセイ法キット（ライフテクノロジーズジャパンより購入）により，細胞内のインフルエンザ菌の生死を判定した。今回用いたIH202株に対するトスフロキサシンおよびセフジトレンのMICは，それぞれ0.00375 μg/mL, 0.0075 μg/mLであった。

トスフロキサシンおよびセフジトレンの濃度は，成人の上顎洞粘膜・鼻茸の組織内への推定移行濃度から設定した。成人ではトスフロキサシンは上顎洞粘膜・鼻茸に血清中濃度の100～127%移行する[7]。これより，小児においても血清中濃度の100%が移行するものとして，小児の常用量1日12 mg/kg/分2を投与した時のCmax 0.96 μg/mL[8]を作用させた。セフジトレンは，成人では上顎洞粘膜，扁桃に約50%移行する[9]。そこで，小児の常用量の最大投与量1回6 mg/kgを投与した時のCmax 2.85 μg/mL[10]の50%である1.425 μg/mLを作用させた。これらの濃度を小児における推定副鼻腔組織移行濃度とした。

また，別検体を用いて，トスフロキサシンまたはセフジトレン処理後，1% FBS含有MEMにて両薬剤を除去した後，BHIAをDetroit 562細胞上に乗せて37℃で培養し，細胞内から増殖してくるインフルエンザ菌を撮影した。

細胞およびインフルエンザ菌は，ECLIPSE Ti-E倒立顕微鏡（Nikon Corporation）を用いて位相差像を観察し，EOS5Dデジタルカメラ（Canon Inc.）

で撮影した。AcidiFluor™ ORANGE-NHSおよびLIVE/DEAD®細胞生存率アッセイ法キットを使用した際には，LSM-700 Laser scanning confocal microscope（LSCM）および付属のソフトウェア（Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany）を用いて撮影した。また，インフルエンザ菌のコロニーはα7Sデジタルカメラ（Sony, Japan）で撮影した。

2. 細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するトスフロキサシンの殺菌作用の定量化

(1) 材料

材料は，上述の**1.**項に準じた。

(2) 方法

Detroit 562細胞は，10% FBSを含むMEMで継代培養後，直径35 mmのプラスチックディッシュに播種し，37℃, 5% CO_2下で4日間培養した後，IH202株を1×10^7個/mLとなるように加え，37℃, 5% CO_2下で4時間培養した。4時間培養後，浮遊菌を培地交換によって除去し，200 μg/mLのゲンタマイシンを含む1% FBS含有MEMを添加し，37℃, 5% CO_2下で2時間培養して，細胞外に存在するインフルエンザ菌を殺菌した。ゲンタマイシン含有培地除去後，トスフロキサシン（最終濃度0.96 μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）を含む1% FBS含有MEMを添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養した。3時間培養後，マグネシウム・カルシウム除去リン酸緩衝生理食塩水〔PBS（−）〕にて両薬剤を除去し，0.025% Triton X-100により培養細胞の細胞膜を破壊した後，スクレーパーにて細胞内のインフルエンザ菌を採取した。採取したインフルエンザ菌は，BHIAにて37℃で1晩培養後にコロニー数を計数し，トスフロキサシンまたはセフジトレンに曝露後も細胞内に存在していた生菌数を推定比較した。インフルエンザ菌のコロニーはEOS7Dデジタルカメラ（Canon Inc.）で撮影した。

統計解析は一元配置分散分析とBonferroni検定を用いた。異常値は，Grubbs-Smirnov棄却検定によって検定した。有意水準は$p<0.05$とした。

II. 結果

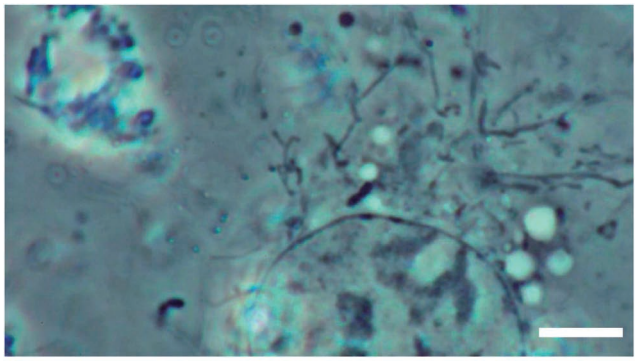
1. 細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するトスフロキサシンの効果の検討

インフルエンザ菌およびDetroit 562細胞を4時間共培養後，Detroit 562細胞内にインフルエンザ菌が認められた（図1）。ここで，あらかじめ蛍光イメージングプローブであるAcidiFluor™ ORANGE-NHSにて標識したインフルエンザ菌を用いたところ，Detroit 562細胞内で蛍光を発するインフルエンザ菌が認められた（図2）。AcidiFluor™ ORANGEは，エンドソームなどの酸性環境下で蛍光を発するプローブであるため，インフルエンザ菌がDetroit 562細胞のエンドソームに取り込まれていることが示唆された。

次に，トスフロキサシン（最終濃度0.96 μg/mL），セフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）または，コントロール（vehicle）をそれぞれ含有するMEMにて3時間培養後のDetroit 562細胞内のインフルエンザ菌を顕微鏡にて観察したが，各実験におけるインフルエンザ菌の形態変化の差は明確ではなかった（図3）。そこで，3時間培養後のDetroit 562細胞にLIVE/DEAD®染色を行った。LIVE/DEAD®染色では，生菌は緑色蛍光を発し，死菌は黄色蛍光を発する。コントロールおよびセフジトレンでは，緑色蛍光を発するインフルエンザ菌が認められたが，トスフロキサシンでは，黄色蛍光を発するインフルエンザ菌が認められ，細胞内のインフルエンザ菌がトスフロキサシンにより殺菌されたものと考えられた（図4）。

さらに，上述の検討と同じ処理をした別検体を用いて，抗菌薬除去後にインフルエンザ菌培養用培地BHIAを細胞に添加したところ，コントロールおよび，セフジトレン処理後（図5）のDetroit

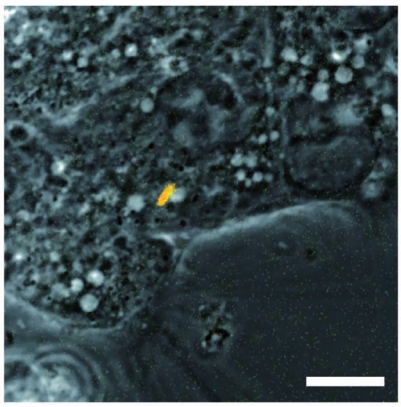
図1. インフルエンザ菌およびDetroit 562細胞の共培養後の顕微鏡像



bar=10μm

Detroit 562細胞内にインフルエンザ菌が認められる。

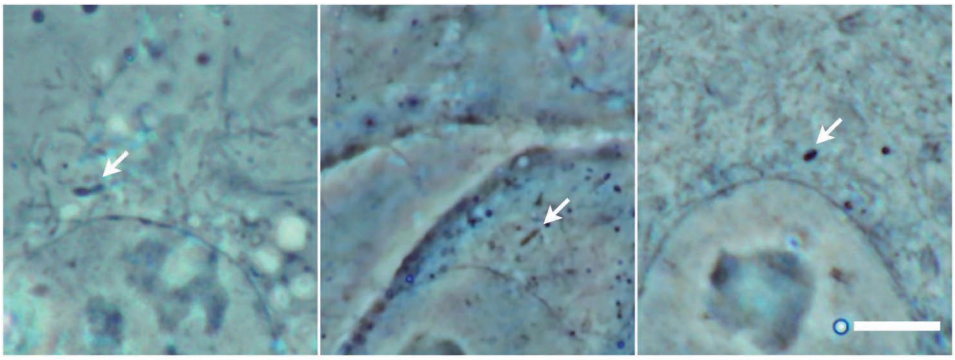
図2. AcidiFluor™ ORANGE-NHS標識インフルエンザ菌のDetroit 562細胞内への侵入



bar=10μm

Detroit 562細胞内にAcidiFluor™ ORANGE-NHSで標識したインフルエンザ菌の蛍光が認められる。

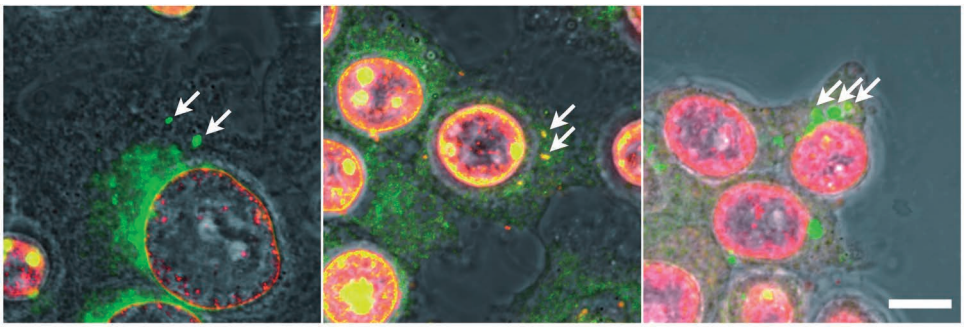
図3. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のインフルエンザ菌の形態変化



コントロール　トスフロキサシン　セフジトレン

bar=10μm

図4. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のインフルエンザ菌のLIVE/DEAD®染色像

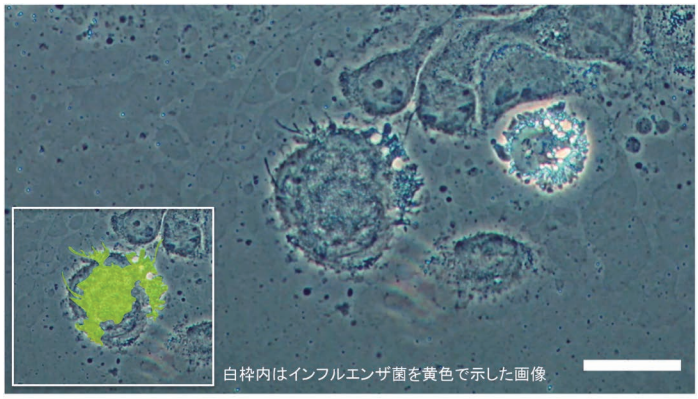


コントロール　トスフロキサシン　セフジトレン

bar=10μm

コントロールおよびセフジトレン処理後のインフルエンザ菌では緑色の蛍光が認められたが、
トスフロキサシン処理後では黄色蛍光が認められた。（緑色蛍光は生菌、黄色蛍光は死菌を示す）

図5. BHIA培地におけるセフジトレン処理後のDetroit 562細胞からのインフルエンザ菌の増殖



bar=20μm

セフジトレン処理後のDetroit 562 細胞からインフルエンザ菌の増殖が認められた。

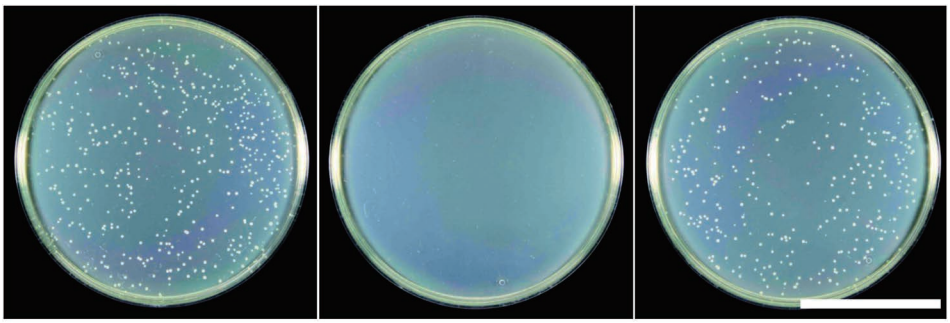
図6. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のDetroit 562細胞からのインフルエンザ菌コロニー形成

コントロール　トスフロキサシン　セフジトレン

bar=5mm

コントロールおよびセフジトレン処理では、ほぼ同程度のコロニー形成が認められたが、
トスフロキサシン処理の場合ではコロニー形成は殆ど認められない。

図7. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のDetroit 562細胞から採取したインフルエンザ菌コロニー形成能の定量的検討

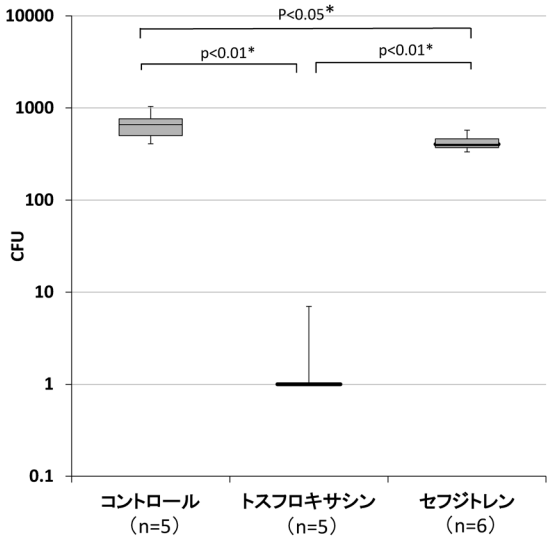


コントロール　トスフロキサシン　セフジトレン

bar=5cm

562細胞内からインフルエンザ菌の増殖が認められ，その後コロニー形成が認められた。そこで，BHIA培地におけるコロニー形成を比較したところ，コントロールおよびセフジトレンでは，ほぼ同程度のコロニー形成が認められたが，トスフロキサシンではコロニー形成はほとんど認められな

図8. トスフロキサシン，セフジトレン処理後の生菌数



*Bonferroni検定

かった（図6）。

2. 細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対するトスフロキサシンの殺菌作用の定量化

細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対する各薬剤の殺菌作用を定量化するため，各薬剤処理後のDetroit 562細胞内から採取したインフルエンザ菌をBHIAにて培養し，コロニー形成を比較した。各薬剤処理後のコロニー形成の状況を図7に示した。各検体のコロニー数を計数し，異常値をGrubbs-Smirnov棄却検定により棄却後に比較したところ，コントロール，トスフロキサシン処理，セフジトレン処理後に形成したコロニー数は，それぞれ，673.0±244.9, 2.0±2.8, 425.0±87.3（Mean±SD）であった。すなわち，セフジトレン処理ではコントロールに比べ有意なコロニー数の減少が認められ（図8, $p<0.05$），トスフロキサシン処理では，コントロールおよびセフジトレン処理に比べ有意にコロニー数の減少が認められた（図8, $p<0.01$）。

III. 考察

本研究では，ヒト培養細胞に侵入したインフルエンザ菌の動態と，ヒト細胞侵入インフルエンザ菌に対するニューキノロン系抗菌薬であるトスフロキサシンおよびセフェム系抗菌薬のセフジトレンの影響を検討した。検討の結果，①インフルエンザ菌はヒト細胞内に侵入すること，②セフジトレンはヒト細胞内のインフルエンザ菌に影響を与えないこと，③トスフロキサシンはヒト細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対し殺菌的に作用することの3点が示唆された。

一般に，β-ラクタム系抗菌薬は細胞内移行性が低いことが知られており，我々の研究においても細胞内へ侵入したインフルエンザ菌に対しては抗菌作用が低下する[11, 12]ことを報告している。

本研究において，トスフロキサシンとセフジトレンは，インフルエンザ菌IH202株に対して，通常の液体培地におけるMICは，それぞれ0.00375, 0.0075 μg/mLとほぼ同程度であるが，ヒト培養上皮細胞内に侵入したインフルエンザ菌IH202株に対して，トスフロキサシンは殺菌的に作用したが，セフジトレンはほとんど影響を与えなかった。以上のことから，トスフロキサシンは，細胞内に移行して抗菌活性を発揮するのに対して，セフジトレンは細胞内移行性が低いために殺菌作用を示さなかった可能性が示唆された。

わが国の「小児急性中耳炎診療ガイドライン2013年版」では，過去6ヵ月以内に3回以上，12ヵ月以内に4回以上の急性中耳炎に罹患した状態を反復性中耳炎，耳痛，発熱などの急性期症状が顕在化していない状態で急性中耳炎にみられる鼓膜所見を呈している状態が3週間以上持続している状態を遷延性中耳炎としている[13]。我々は，これに加え，免疫学的に未熟な2歳未満児の中耳炎も難治性と考えている。小児急性中耳炎の病態

を検討すると，2歳未満児では1ヵ月以内に罹患のある既往症例，反復例，遷延例が2歳以上児と比較して有意に高い。すなわち，難治例は2歳未満児に多く認められる[2]。2歳未満児の中耳炎の起炎菌は，インフルエンザ菌が主であるが[2]，インフルエンザ菌はヒト気道上皮細胞内への侵入を介して再燃を招いて反復化に[11]，急速なバイオフィルム形成を介して遷延化に[14]，それぞれ関与することが示唆されている。

トスフロキサシンが，ヒト培養咽頭上皮細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対して抗菌力を示す機序としては，細胞内濃度が他のキノロン系抗菌薬に比べて高いこと[6]，およびトスフロキサシンの細胞内への浸透経路が，細胞のポーリン経路ではなくリン脂質二重層を介する可能性があることが報告されている[15]。

今回の検討では，*in vitro*においてセフェム系抗菌薬であるセフジトレンは，ヒト細胞内に侵入したインフルエンザ菌には影響を与えなかった。一方，トスフロキサシンは，ヒト細胞内に侵入したインフルエンザ菌に対しても殺菌的に作用することが示唆された。また，トスフロキサシンは*in vitro*において，バイオフィルムを形成したBLNASおよびBLNARインフルエンザ菌に対し，高い抗菌力を示すことが報告されている[16]。さらに，臨床においても，我々の検討では，トスフロキサシンは小児の反復性中耳炎に対し，83.3%の優れた治癒率を示すとともに，その再燃を90%以上抑制した[5]。

以上から，トスフロキサシンは，小児急性中耳炎の反復化や遷延化などの難治化を抑制することが期待できる薬剤であると考えられた。

〈補足／図の説明〉

図1.　インフルエンザ菌およびDetroit 562細胞の共培養後の顕微鏡像

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞を37℃, 5% CO_2下で4時間共培養後，ECLIPSE Ti-E倒立顕微鏡を用いて位相差像を観察し，EOS5Dデジタルカメラで撮影。

図2.　AcidiFluor™ ORANGE-NHS標識インフルエンザ菌のDetroit 562細胞内への侵入

AcidiFluor™ ORANGE-NHSで標識したインフルエンザ菌とDetroit 562細胞を37℃, 5% CO_2下で4時間培養後，LSM-700 Laser scanning confocal microscopeおよび付属のソフトウェアを用いて撮影。

図3.　トスフロキサシン，セフジトレン処理後のインフルエンザ菌の形態変化

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，トスフロキサシン（最終濃度0.96 μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後，ECLIPSE Ti-E倒立顕微鏡を用いて位相差像を観察し，細胞内のインフルエンザ菌（矢印）をEOS5Dデジタルカメラで撮影。

図4.　トスフロキサシン，セフジトレン処理後のインフルエンザ菌のLIVE/DEAD® 染色像

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，トスフロキサシン（最終濃度0.96 μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後に，0.025%Triton X-100によって培養細胞の細胞膜を破壊した後，LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit を用いて，細胞内のインフルエンザ菌のLIVE/DEAD® 染色を行った。LIVE/DEAD® 染色による蛍光はLSM-700 Laser scanning confocal microscopeおよび付属のソフトウェアを用いて撮影。

図5.　BHIA培地におけるセフジトレン処理後のDetroit 562細胞からのインフルエンザ菌の増殖

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，セフジトレン（最終濃度1.425 μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後に，MEM

（1% FBS）で細胞を洗浄して薬剤を除去し，BHIAをDetroit 562細胞上に乗せて37℃, 10時間培養後に，細胞内から増殖してくるインフルエンザ菌をECLIPSE Ti-E倒立顕微鏡を用いて位相差像を観察し，EOS5Dデジタルカメラで撮影。

図6. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のDetroit 562細胞からのインフルエンザ菌コロニー形成

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，トスフロキサシン（最終濃度0.96μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後に，MEM（1% FBS）で細胞を洗浄して薬剤を除去し，BHIAを細胞上に乗せて37℃, 18時間培養し，増殖したインフルエンザ菌のコロニーをα7Sデジタルカメラで撮影。

図7. トスフロキサシン，セフジトレン処理後のDetroit 562細胞から採取したインフルエンザ菌コロニー形成能の定量的検討

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，トスフロキサシン（最終濃度0.96μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後に，0.025%Triton X-100で細胞膜を破壊して，スクレーパーで細胞内のインフルエンザ菌を採取。このインフルエンザ菌をBHIAに播種し，37℃で一晩培養後に形成されたコロニーをEOS7Dデジタルカメラで撮影。

図8. トスフロキサシン，セフジトレン処理後の生菌数

インフルエンザ菌とDetroit 562細胞の共培養系に，トスフロキサシン（最終濃度0.96μg/mL）またはセフジトレン（最終濃度1.425μg/mL）を添加し，37℃, 5% CO_2下で3時間培養後に，0.025%Triton X-100で細胞膜を破壊して，スクレーパーで細胞内のインフルエンザ菌を採取。このインフルエンザ菌をBHIAに播種し，37℃で一晩培養後に形成されたコロニー数を計数し，トスフロキサシンまたはセフジトレン処理後の細胞内生菌数を算出。

謝辞

画像撮影に協力いただいた，（株）タイムラプスビジョンに感謝します。

利益相反

本研究は，大正富山医薬品株式会社の支援を得た。著者　山中　昇は大正富山医薬品株式会社から講演料を受けている。保富宗城は申告すべきものはなし。

文献

1）Berman, S.: Otitis media in children. N. Engl. J. Med. 332: 1560～1565, 1995
2）山中　昇，杉田麟也，宇野芳史，他：2歳未満の急性中耳炎の病態とトスフロキサシンの有効性。耳鼻咽喉科臨床106: 659～667, 2013
3）Forsgren, J.; A. Samuelson, A. Ahlin, *et al.*: *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by in situ hybridization and bacterial viability assay. Infect. Immun. 62: 673～679, 1994
4）Greiner, L. L.; H. Watanabe, N. J. Phillips, *et al.*: Nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing *N*-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. Infect. Immun. 72: 4249～4260, 2004
5）山中　昇，杉田麟也，宇野芳文，他：小児急性中耳炎に対するTosufloxacin細粒15%の有効性の検討。耳鼻咽喉科臨床105: 381～392, 2012
6）Noumi, T.; N. Nishida, S. Minami, *et al.*: Intracellular activity of tosufloxacin（T-3262）against *Salmonella enteritidis* and ability to penetrate into tissue culture cells of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 949～953, 1990
7）大西信治郎，宗永　浩，手塚克彦：トシル酸トスフロキサシン（TFLX）の食後単回・連続投与時の副鼻腔粘膜・組織内濃度の検討。耳

鼻と臨床40: 204～209, 1994
8）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
9）新川　敦，木村栄成，橘田　豊，他：耳鼻咽喉科領域におけるME1207の基礎的・臨床的検討。日本化学療法学会雑誌40（S-2）：627～635, 1992
10）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
11）Hotomi, M.; J. Arai, D. S. Billal, *et al.*: Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from intractable acute otitis media internalized into cultured human epithelial cells. Auris Nasus Larynx 37: 137～144, 2010
12）小上真史，鈴木正樹，保富宗城，他：インフルエンザ菌の細胞接着および細胞内侵入による抗菌薬感受性の変化。日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌24: 34～36, 2006
13）日本耳鼻科学会，日本小児耳鼻咽喉科学会，日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会編：小児急性中耳炎診療ガイドライン2013年版。金原出版，東京，2013
14）Moriyama, S.; M. Hotomi, J. Shimada, *et al.*: Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. Auris Nasus Larynx 36: 525～531, 2009
15）Mitsuyama, J.; Y. Itoh, M. Takahata, *et al.*: *In vitro* antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2030～2036, 1992
16）杉浦陽子，高畑正裕，福田淑子，他：Biofilmを形成したnon-typeable *Haemophilus influenzae*に対するtosufloxacinの殺菌作用。日本化学療法学会雑誌60: 327～334, 2012

Bactericidal effect of tosufloxacin on *Haemophilus influenzae* internalized in cultured human cells

Noboru Yamanaka
Fujisawa Goshomi Hospital

Muneki Hotomi
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
Wakayama Medical University

Nontypeable *Haemophilus influenzae*, one of the major causative bacteria for acute otitis media（AOM）, is also considered to cause intractable otitis media including prolonged AOM and recurrent AOM in children by the mechanism of internalization of the bacteria into epithelial cells of middle ear mucosa. In this study, we visualized the dynamics of *H. influenzae* internalization in cultured human cells. We also examined the effects of antimicrobials, including a novel quinolone, tosufloxacin, and a cephem antibacterial agent, cefditoren, on *H. influenzae* internalized in cultured human cells.

The results indicated that（1）*H. influenzae* were internalized into human cells,（2）cefditoren has no effect on internalized *H. influenzae*, and（3）tosufloxacin has a bactericidal action on *H. influenzae* invading human cells. These data strongly support high clinical efficacy of tosufloxacin on intractable otitis media in children.