

FUNDAMENTAL STUDIES ON COMBINATION EFFECT OF CEFBUPERAZONE AND PRONASE

Hitoshi Ogino, Toru Matsunaga

(Osaka University Medical School)

Hisato Senda, Keiji Sekine, Shigeru Sanai

(Tokyo Research Laboratories, Kaken

Pharmaceutical Co., LTD.)

Fundamental studies were performed on combination effect of cefbuperazone and pronase. The results were summarized as follows.

1. Antibacterial activities of cefbuperazone were increased against the high level resistant strains of MRSA by the addition of pronase.

2. The binding rate of cefbuperazone to human serum protein were reduced by the addition of pronase.

3. In the treatment of experimental pneumoniae in mice, the combination therapy of cefbuperazone and pronase significantly decreased viable bacterial cells in lung.

Cefbuperazone と Pronase の併用効果について

荻野 仁、松永 亨

(大阪大学耳鼻咽喉科)

千田尚人、関根敬治、讃井 蕃

(科研製薬東京研究所)

はじめに

Cefbuperazone (CBPZ) は、幅広い抗菌スペクトルを有する第3世代セフェム系抗生剤であり、耳鼻咽喉科領域感染症に対し高い有効性が報告されている。¹⁾²⁾ 一方 pronase は代表的な消炎酵素剤であり、従来から耳鼻咽喉科領域の炎症性疾患に広く用いられてきた。³⁾⁴⁾ 我々は昨年の本研究会において、CBPZと、pronase の併用により上顎洞粘膜へのCBPZの移行が有意に増強することを報告したが、⁵⁾ 今回はCBPZとpronaseの併用効果についての基礎的研究を行い、併用により、より高い

臨床効果が得られる可能性を示唆する結果が得られたので報告する。

対象および方法

以下の各項目についての検討を行った。

①抗菌力に及ぼす影響

日本化学療法学会標準法に準拠した寒天平板希釈法により、pronase 存在下の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。被験菌は標準菌株、およびβ-ラクタマーゼ産生株、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) を使用した。

②蛋白結合率に及ぼす影響

健康成人血清にCBPZ 25μg/ml、pronase

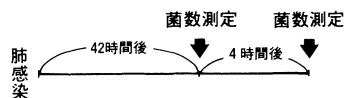
0, 0.01, 0.1, 1, 10および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (80%血清)を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 3時間インキュベート後、遠心限外濾過法により蛋白結合率を求めた。なお*K. pneumoniae* AICC 10031を検定菌とした。

③実験の感染症に及ぼす影響

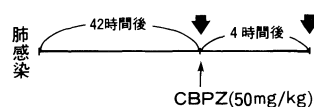
5週令のICR系雄性マウス(体重23~27g)に実験の感染症(肺炎)を作製した。

松本ら⁶⁾が考案した噴霧感染装置にマウスを入れ、*K. pneumoniae* B-54 4.4×10^9 CFU/mlの菌液10mlをネビュライザーにより噴霧し、マウス肺あたり 1×10^5 CFUの生菌を感染させた。

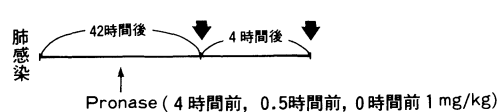
1) コントロール



2) CBPZ単独投与の影響



3) Pronase単独投与の影響



4) CBPZ, Pronaseの併用効果

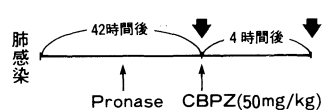


図1

Pronase投与は、CBPZ投与の4時間前、0.5時間前、0時間前(同時投与)に0.1mg/kg, 1mg/kg投与

感染成立後、図1に示した各条件下で42時間および46時間後に肺を剔出し、寒天平板を用いたコロニーカウント法で肺内生菌数を測定した。実験には各時点で5匹のマウスを用いた。

結 果

①抗菌力に及ぼす影響

標準菌株3株、臨床分離株(β -ラクタマーゼ産生株)11株、およびMRSA 15株に対す

るCBPZとpronaseの併用効果は表1、表2に示す如くで、臨床分離株の*S. aureus* JS-1、*P. aeruginosa* JY8、およびMRSA 10株に併用効果を認めた。

表1

標準菌株、及び臨床分離株(β -ラクタマーゼ産生株)に対するCBPZとプロナーゼの併用効果 (接種菌量 10^6 CFU/ml)

試験菌	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	CBPZ + プロナーゼ 0	CBPZ + プロナーゼ 200	CBPZ + プロナーゼ 400	CBPZ + プロナーゼ 800	CBPZ + プロナーゼ 1600
<i>S. aureus</i> 209-P	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> JS-1	100	100	50	50	25
<i>E. faecalis</i> 1373	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. pyogenes</i> Cook	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
<i>E. coli</i> CSH2/RK1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> 42	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>P. vulgaris</i> 33	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>P. mirabilis</i> JY10	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>S. marcescens</i> 16-2	25	25	25	25	25
<i>E. cloacae</i> Nek39	25	25	25	25	25
<i>C. freundii</i> 7	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>A. calcoaceticus</i> 4	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> JY8	100	100	100	50	50

プロナーゼ $\mu\text{g}/\text{ml}$

表2

MRSAに対するCBPZとプロナーゼの併用効果 (接種菌量, 10^6 CFU/ml)

試験菌	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	CBPZ + プロナーゼ 0	CBPZ + プロナーゼ 200	CBPZ + プロナーゼ 400	CBPZ + プロナーゼ 800	CBPZ + プロナーゼ 1600
MRSA JS-1	100	100	50	50	25
~ KAWASAKI	200	100	100	100	50
~ 1	25	25	25	25	25
~ 2	25	25	25	25	25
~ 3	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
~ 4	25	25	25	25	12.5
~ 5	25	25	25	25	25
~ 6	>400	>400	>400	400	100
~ 7	200	200	100	100	50
~ 8	>400	100	100	50	25
~ 9	100	50	50	50	25
~ 10	100	50	50	50	25
~ 11	25	25	25	25	25
~ 12	>400	>400	>400	400	100
~ 13	25	25	25	25	12.5

プロナーゼ $\mu\text{g}/\text{ml}$

②蛋白結合率に及ぼす影響

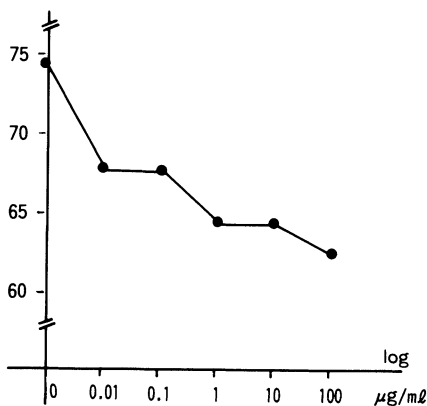
CBPZ 単独のヒト血清蛋白への結合率は74.6%であったが、pronase を0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 併用することにより結合率は徐々に低下し、pronase 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下では62.7%の結合率を示した (図2)。

図2

CBPZ のヒト血清蛋白への結合に及ぼすプロナーゼの影響

CBPZ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	プロナーゼ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	蛋白結合率 (%)
25	0	74.6
	0.01	68.0
	0.1	67.8
	1	64.6
	10	64.2
	100	62.7

100 %



③実験的感染症に及ぼす影響 (表3)

表3

Bactericidal effect of cefbuperazone with pronase in experimental in experimental pneumoniae

Pronase dose (mg/kg)	Pronase inj. time (hour)	CBPZ (mg/kg)	Viable counts in lungs (log of CFU/lung, mean \pm SD)	
			0 hour	4 hour
0	0	0	7.96 \pm 0.53	8.26 \pm 0.60
		50	N.D.	7.34 \pm 0.28
		0	8.00 \pm 0.53	8.24 \pm 0.31
1	-4	0	N.D.	8.42 \pm 0.55
		0	N.D.	8.49 \pm 0.49
		0	N.D.	6.39 \pm 0.65
0.1	-4	50	N.D.	6.74 \pm 1.00
		0	7.96 \pm 0.53	6.99 \pm 0.80
		0	8.00 \pm 0.53	7.34 \pm 0.86
1	-4	50	N.D.	6.73 \pm 0.75
		0	7.96 \pm 0.53	7.28 \pm 0.77

コントロール (無処置) では、感染42時間後の肺内生菌数の平均は $10^{7.96}$ (9.12×10^7) C

FUで、46時間後では $10^{8.26}$ (1.82×10^8) CFUであった。一方CBPZ 50mg/kgの単独投与群では、CBPZ 投与4時間後 (感染46時間後) の肺内生菌数は $10^{7.34}$ (2.19×10^7) CFUであり、コントロールの $10^{8.26}$ と比較し有意の差 ($P < 0.05$) を認めた。またpronase 単独投与群ではコントロールとの間に有意差は認めなかった。

CBPZとpronaseの併用群では、感染46時間後の肺内生菌数はいずれも低値であり、特にpronase 0.1mg/kgをCBPZ投与の4時間前に投与した時の感染46時間後の肺内生菌数 $10^{6.39}$ (2.45×10^6) は、CBPZ単独投与時よりも有意 ($P < 0.05$) に低値であり、CBPZとpronaseの併用効果を認めた。なお有意差検定はt検定を用いた。

考 察

蛋白分解酵素は抗炎症作用以外に抗生剤との併用により抗生剤の病巣への移行を高めることが、基礎的、臨床的に報告されており、我々も抗生剤としてCBPZ、蛋白分解酵素としてpronaseを用い、両者の併用により上顎洞粘膜へのCBPZの移行が有意に増強されることを報告した。⁵⁾

今回我々はCBPZとpronaseの併用効果について、基礎的に確認するためにin vitroにおける抗菌力、血清蛋白結合率、肺炎マウスの肺内生菌数に及ぼす影響を検討した。

抗菌力に及ぼす影響では、一部の細菌 (特に高度耐性のMRSA) に対し、抗菌力の増強作用を認めた。このメカニズムは不明であるが、PBP変異による高度耐性MRSAに対し何らかの影響 (例えばPBP1⁺の誘導に対する影響) を及ぼすのではないかと考えられる。

CBPZのヒト血清蛋白への結合に及ぼすpronaseの影響を検討したところ、pronaseの濃度の増加に伴い血清蛋白結合率は徐々に低下した。なお本実験におけるCBPZの蛋白結合率は37 $^{\circ}\text{C}$ 3時間インキュベート後に測

定したために、才川らの報告⁹⁾した結合率よりも高値であった。

K.pneumoniae によるマウス肺炎モデルは極めて難治な肺炎モデルとして知られている。¹⁰⁾この肺炎モデルに対してCBPZとpronaseの併用効果を検討したが、併用により肺内生菌数は減少し、特にpronase 0.1mg/kgをCBPZ投与の4時間前に投与した群では、CBPZ単独投与群に比し有意の菌数減少を示した。

この菌数減少効果は、どのように考えたら良いのであろうか。in vitroでは、*K.pneumoniae*に対してCBPZとpronaseの抗菌力の増強作用は認めなかったため、やはりCBPZが炎症局所に移行しやすくなったためと考えられる。前述した如くCBPZとpronaseの併用により、CBPZの血清蛋白結合率は減少した。一般的に蛋白結合率の低い β -ラクタム剤は組織への移行が良いとされており、この蛋白結合率の減少もCBPZの組織移行を助長させた一因と考えられるが、その他pronaseが病巣組織の壊死産物や膿汁等を融解させることにより、CBPZの病巣中への移行が向上したものと推測される。

以上CBPZとpronaseの併用効果についての基礎的な検討の結果を述べたが、少数例で短期的な実験結果ではあるが、CBPZとpronaseの併用の有用性を示唆する結果と考える。

結 語

CBPZとpronaseの併用効果について基礎的な検討を行い以下の結果を得た。

- 1.併用により、特に高度耐性のMRSAに対して抗菌力の増強を認めた。
- 2.pronaseの併用により、CBPZのヒト血清蛋白への結合は低下した。
- 3.肺炎マウスにおいて、CBPZとpronaseの併用は肺内生菌数の有意の減少効果を示した。

(謝辞)

本研究の抗菌力に及ぼす影響の項の被験菌は順天堂大学横田健教授、実験的感染症に及ぼす影響の項の*K.pneumoniae* B-54は長崎大学松本慶蔵教授より分与いただきました。

両教授に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1)岩沢武彦：耳鼻咽喉科領域におけるT-1982に関する基礎的、臨床的研究。Chemotherapy 30(S-3)：922~935, 1982.
- 2)村井兼孝 他：T-1982の耳鼻咽喉科領域における基礎的ならびに臨床的検討。Chemotherapy 30(S-3)：943~948, 1982.
- 3)藤崎茂巳 他：二重盲検法による慢性副鼻腔炎に対するKPCの薬効検定。耳鼻臨床 67(6)：617~631, 1974.
- 4)水越 治 他：慢性副鼻腔炎に対する蛋白分解酵素エンピナスP(KPC)の臨床評価。耳鼻展18(6)：619~641, 1975.
- 5)荻野 仁 他：Cefbuperazoneの耳鼻科領域組織移行—pronaseの併用効果について。日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌5(1)：64~68, 1987.
- 6)松本慶蔵 他：噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日胸疾会誌 6(8)：581~587, 1978.
- 7)大木稔文 他：慢性副鼻腔炎に対する抗生物質と酵素製剤の併用療法について。交通医学 24：538~540, 1970.
- 8)長岡 滋 他：抗生物質と蛋白分解酵素の併用療法について。現在の診療25(4)：621~624, 1983.
- 9)才川 勇他：T-1982の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 30(S-3)：190~197, 1982.
- 10)松本慶蔵 他：肺炎桿菌性マウス実験肺炎を場とするCefazolinによる化学療法の解析。Chemotherapy 27(1)：109~114, 1979.
- 11)Wise R: Protein binding of β -lactams: the

effects on activity and pharmacology particularly tissue penetration. I. J. Antimicrob. Chemother. 12: 1~18, 1983.

質 疑 応 答

質問 佐藤喜一（金沢医大）

- (1) 感染動物実験における pronase の作用は、どのように理解するか
- (2) pronase の菌体細胞膜に対する作用はどうか？

応答 荻野 仁（阪大）

- (1) pronase 単独投与では、感染には直接の影響は与えないが、併用により抗生剤の病巣への移行が高まったと考える。
- (2) 細菌の細胞膜に対する作用は認めない。

質問 内藤雅夫（保衛大）

in vitroでの併用効果の強弱が in vivo のでもあらわれるのでしょうか。

応答 荻野 仁（阪大）

in vitro で認められた併用効果は、高度耐性な一部の細菌に対して認められたにすぎず、in vivo の併用効果とは無関係であると考ええる。