

Cephalexin の基礎的臨床的検討

金 沢 裕・倉 又 利 夫

新潟鉄道病院

(昭和 44 年 6 月 12 日受付)

私ども¹⁾は、さきに合成 Cephalosporin C 製剤としての Cephaloridine(CER), Cephalothin(CET) に対する基礎的検討として、その抗菌力、体液中濃度測定法、血中・尿中濃度測定成績、細菌の不活化酵素に対する態度および臨床経験について報告した。

また臨床検査としての CER ならびに CET の感受性ディスク法^{2,3)}についても検討を加えた。今回は合成 Cephalosporin C 製剤の経口剤 Cephalexin(CEX)⁴⁻⁸⁾について若干の基礎的検討を行なつたので報告する。

ディスク法に関する検討

1. 実験材料

培地：つぎのような組成の培地（感受性ディスク用培地）を用いた。

Heart infusion	300 ml,	Starch	1.5 g
Casamino acid	16.5 g,	Glucose	2.0 g
L-Tryptophane	0.05 g,	Agar(Nissui)	15.0 g
L-Cystine	0.05 g,	Distilled water	1,000 ml
Biotin	0.005 mg		

pH 7.3~7.4, NaCl 濃度は 0.8% に調製

5% 綿羊血液添加または非添加。

供試菌株：Fig. 1 に示すように、臨床検査の対象となることの多いと考えられる 19 種 98 株を用いた。CEX の感受性もおそらく、CET, CER と同じく分解酵素 Cephalosporinase の影響を大きくうけることを予想して、

強い不活化酵素活性を示すブドウ球菌については、前報¹⁾の方法にしたがい、Cephalosporinase 産生ならびに非産生に分けて観察検討した。

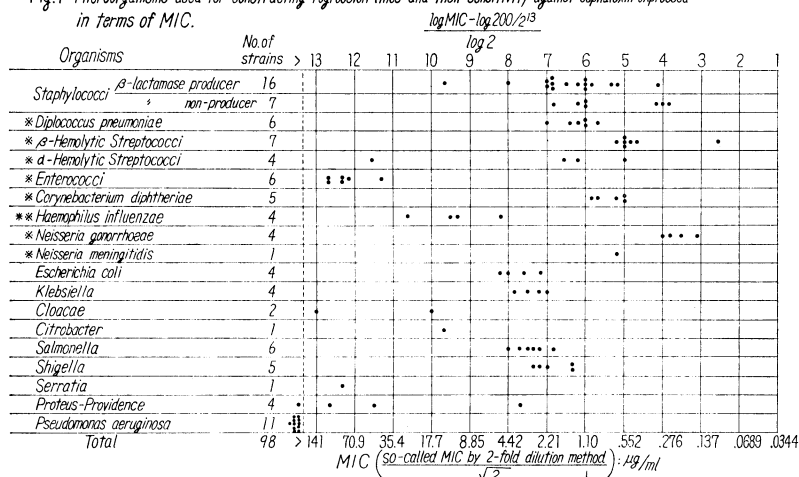
2. 実験方法ならびに実験成績

希釈法による MIC 値測定：100, 50, 25…… mcg/ml のように、CEX の 2 倍希釈系列濃度含有の寒天培地平板上に、発育がよく、コロニー形成の比較的早い菌は平板 cm² 当り 10⁸~10⁴ 程度、コロニー形成のややおそい菌は cm² 当り 10⁴~10⁵ 程度に接種した。37°C に 16~24 時間培養し、肉眼的に発育阻止濃度を測定し、6 回繰返して得た値の幾何平均の 1/√2 を最も信頼すべき MIC 値とした。

ディスク法の実施：内径 85~90 mm の規格型ペトリ皿に、培地を 20 ml づつ分注し、水平に固めた。供試菌コロニー 1~2 白金耳程度を 1 ml の滅菌水または Broth に懸濁し、ブドウ球菌、腸内細菌のばあいはその 1 白金耳を、淋菌、ヘモフィルス、レンサ球菌、肺炎球菌などはその 1 滴 (0.03 ml 程度) を 1 枚の寒天平板上におとし、20 コ程度の小ガラス玉を入れ、ゆりうごかして均等に拡げる。このさいの接種菌量は、前者では cm² 当り 10⁸~10⁴ 程度、後者では 10⁴~10⁵ 程度のことかたしかめられている。

血清添加の影響：Table 1 に示すような菌株を用いて、綿羊血液を 5% 添加、非添加の際の MIC 値の変動

Fig. 1 Microorganisms used for constructing regression lines and their sensitivity against cephalixin expressed in terms of MIC.



Agar medium used: Sensitivity disc agar (Modified Mueller Hinton)

Inoculum size: approximately 10³-10⁶/cm², *approximately 10⁴-10⁵/cm² on sheep blood (5%) agar * on chocolate agar

Table 1 Influence of adding sheep blood at the rate of 5% to the test medium on the MIC values by the agar dilution method

Medium used : Modified MUELLER-HINTON (Sensitivity disc) agar pH 7.4
 Bacterial strains employed : A total number of 71 strains
 (*Staphylococcus* 30, *E. coli* 12, *Klebsiella* 8, *Enterobacter* 5, *Shigella* 8, *Salmonella* 8)

Ratio of MIC $\left(\frac{\text{With blood}}{\text{Without blood}} \right)$	Number of data obtained
4	0
2	16
1	47
1/2	8
1/4	0

Geometrical mean = 1.1

を検討し、5% 血液添加で平均 1.1 倍程度 MIC 値に変動がみられた。したがって、5% 血液添加の影響は極めて軽微であると考えられた。

培養：ディスクをおいて直ちに培養し、16 時間後（簡易普通法）、ならびに 24 時間後（遅延法）に判定した。さらに、寒天平板 cm² 当り 10⁶~10⁷ 程度に濃厚に菌を接種して 4 時間後、6 時間後に判定した（迅速法）。

阻止円の計測：30 μg ディスクによつて現われた阻止円の直径を直角 2 方向から計測し、平均値を求めた。また、迅速法では 4 時間以内に肉眼的に充分な阻止円の現われたばあいと、6 時間以内のばあいの 2 つのグループに分けて阻止円の直径を計測した。

標準曲線の調製：普通法は 6 回、迅速法は 2 回に分けて実施し、それぞれの菌株の阻止円の直径の平均値を求めた。ついで、片対数方眼紙上に阻止円の直径を整数目盛で、MIC を対数目盛にとり、各々の実験条件下で MIC と阻止円直径の関係を示す標準曲線（回帰直線）を求めた (Fig. 2, Table 2)。

感受性測定法：普通法(1) 16 時間培養で測定に充分な阻止円が出現したばあい(簡易法)、(2) 16 時間で充分な阻止円が出現せず、24 時間で出現したばあいは遅延法の曲線を用いて MIC を推定できるわけである。迅速に感受性を知るために、0.1 ml の滅菌水に 2 白金耳程度に菌を濃厚に浮遊し、濃厚菌液をつくり、その 1 滴を平板上にガラス玉法で接種して 37°C、4 時間以内に阻止円の出現したばあいには、迅速 3~4 時間の曲線で 5~6 時間で阻止円の出現したばあいには、迅速 5~6 時間法の曲線で感受性をスクリーニングすることができるわけである。また、被検体（膿、尿など）を直接接種した平

Fig. 2 Standard curves representing the relationship between the MIC and the diameter of inhibition zone

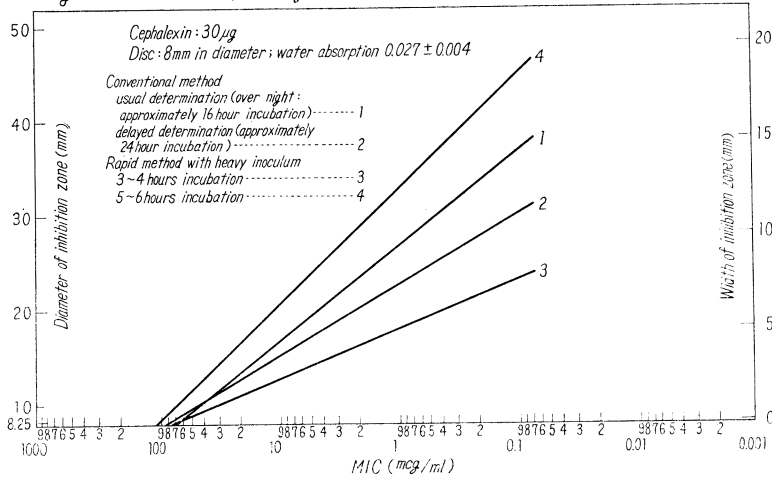


Table 2 Regression equation representing the relationship between MIC and diameter of inhibition zone

Determination method	Incubation time in hour	Number of data employed	Regression equation
Conventional method	approx. 16	498	D* = 26.6 - 10.0 log MIC
	approx. 24 (delayed assay)	300	D = 32.4 - 12.3 log MIC
Rapid method	3~4	294	D = 17.9 - 5.3 log MIC
	5~6	368	D = 22.5 - 8.6 log MIC

D* : Diameter of inhibition zone

Table 3 Range of deviation of MIC obtained by the disc method from the MIC by the dilution method expressed in terms of rejection limit.

Determination method	Incubation time in hours	Range of deviation of MIC expressed in terms of rejection limit ($\alpha=0.05$)*,**									
		Diameter of inhibition zone in mm									
		8	~	20	~	30	~	40	~	50	
Conventional method	approx. 16	3.0	~	0.33	~	3.0	~	0.33			
	approx. 24(delayed assay)	3.3	~	0.30	~	3.3	~	0.30			
Rapid method	3 ~ 4	3.8	~	0.26	~	3.8	~	0.26	3.9	~	0.26
	5 ~ 6	4.6	~	0.22	~	4.6	~	0.22			

* Rejection limit was obtained by the formula

$$\pm t_{0.05} \sqrt{S^2_{yx} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{Sx^2} \right)}$$

where, y=diameter of inhibition zone

$$x = \frac{\log \text{MIC} - \log 100/2^{18}}{\log 2} - 0.5$$

S²=variance from regression line

** Where MIC obtained by the agar dilution method is taken as 1.0

Table 4 Range of MIC values obtained by the 2-fold agar dilution method

No. of organisms employed (n)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)	No. of data obtained
86	2.0~0.5	516

* Where sample mean is taken as 1, 0 rejection limit:

$$\pm St_{0.05} \sqrt{\frac{n+1}{n}}$$

S : for sample standard deviation $\sqrt{\frac{\sum R^2}{n}}$

$$R^2 : \frac{\sum (x-\bar{x})^2}{5} \text{ (sample mean deviation in 6}$$

times repeated experiment for each organism)

板にディスクをおいて感受性試験をおこなう Primary culture sensitivity disc 法のさいは、接種菌量を規定することが時に困難なことがあるので、測定に充分な阻止円の出現した時間に応じて、3~4 時間迅速法、5~6 時間迅速法、簡易法 (16 時間培養)、遅延法 (24 時間培養) のいずれかを適用して感受性の推定が可能であろう。

実験誤差について：本ディスク法の実験誤差を検討するために簡易法についておこなったすべての成績の標準曲線からのへだたりの存在範囲を棄却限界の式 ($\alpha=0.05$) を適用して計算し、Table 3 の値がえられた。いっぽう、参考としての寒天平板 2 倍稀釈法の実験誤差を検討する意味で、すべての寒天平板 2 倍稀釈法による MIC 値を同一菌株について at random に 2 つづつとり、重複検査とみなして COPELAND⁹⁾ の式を適用して、

Table 5 Assay method for drug-inactivating ability of bacteria

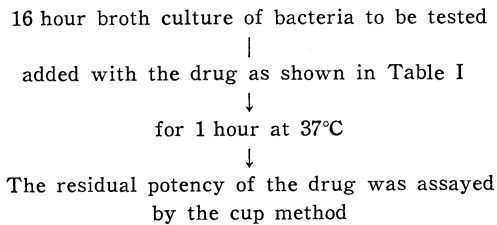


Table I

Concentrations of the drugs added (u or $\mu\text{g/ml}$)						
drugs	PC-G	CER	CET	MCI-PC	CEX	CEG
high	10	10	10	10	40	40
low	1	1	1	1	1	1

Assessment

Concentration	Residual rate	Inactivating ability
high	0%	3+
low	0%	2+
low	<50%	1+
low	>50%	-

MIC 値の存在範囲の棄却限界を求め、Table 4 の成績がえられた。

両者は実験条件がすべて同一ではなく、またディスク法評価の基準となる MIC 値が寒天平板 2 倍稀釈法の実

Table 7 Clinical experiences on cephalixin-Lilly

Case	Sex	Age	Diagnosis	Isolated organisms and drug-sensitivity		Symptoms	
				(before treatment)	→ (after treatment)	(before treatment)	→ (after treatment)
1	F	36	Acute urinary tract infection	<i>E. coli</i> 6 × 10 ⁵ /ml → (-) (<10 ² /ml)		Urinary frequency → (-) Sub fever → (-) Cloudy urine → (-)	
				AB-PC	10(+)		
				TC	>60(-)		
				CP	>100(-)		
				SM	>100(-)		
				KM	4(卅)		
				Col.	12(卅)		
				NA	10(+)		
				CEX	5.2		
Sulf	>400(-)						
2	M	42	Urinary tract infections complicated with nephro-lithiasis	<i>α</i> -Hemolytic <i>streptococcus</i> 7 × 10 ⁴ /ml → (-) (<10 ² /ml)		Fever 37.8°C(max.) → (-) Cloudy urine(+) → (+) Sediment R.B.C.(卅) → (卅)	
				AB-PC	10(+)		
				TC	12(+)		
				CP	20(+)		
				SM	>100(-)		
				PC-G	16(+)		
				Sulf	60(+)		
				EM	12(+)		
				CEX	8.2		

* by single-disc method : figures indicate MIC (μg or u/ml)

Table 6 Abilities of Staphylococci to inactivate penicillins and cephalosporin C derivatives assayed by the above mentioned method

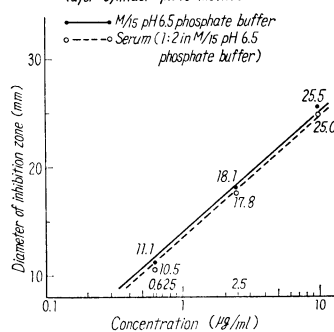
Strains of Staphylococci tested	PC-G	MCI-PC	CER	CET	CEX	CEG
<i>S. aureus</i> 209 P*	-	-	-	-	-	-
" FS 77**	3+	-	2+	2+	-	-
" SB*	3+	-	2+	1+	-	-
" S 1*	3+	-	2+	1+	-	-
" S 14 N*	3+	-	1+	1+	-	-

* β -Lactamase non-producer

** " producer

験誤差を必然的に含んでいるので、厳密な比較はやや困難と思われるが、測定値の存在範囲の幅から推定すると、本ディスク法の精度は、寒天平板2倍稀釈法のそれにかかなり近く、且つ、MIC値と阻止円の大きさが明らかに不一致を示す菌株には遭遇せず、ある程度の実験誤差を見込めばディスク法で60~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度のMIC値の推定値が可能と考えられた。この結果、本ディスク法は臨床的感染性測定法として充分用いられると考えら

Fig. 3 Relation between concentration of cephalixin and diameter of inhibition zone in the thin-layer cylinder-plate method

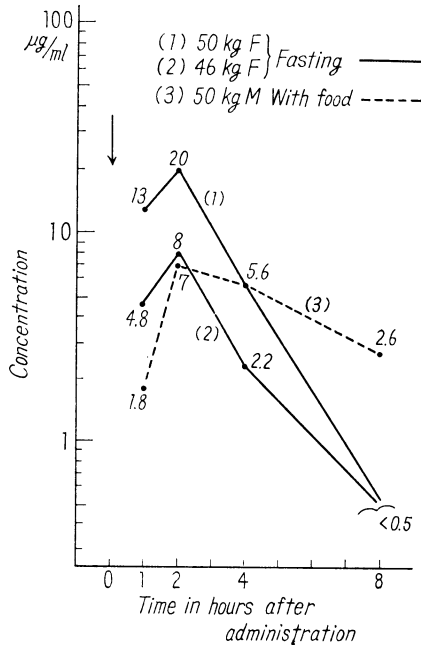


れた。

ブドウ球菌による不活性化：Table 5 に示すような方法で Penicillin 系薬剤および Cephalosporin 系薬剤の Penicillin 耐性ブドウ球菌 (β -lactamase producer) による不活性化を検討したところ、CEX は CET, CER よりも不活性化されにくいことが明らかとなった。この成績からみて、CEX は適応酵素としての Cephalosporinase 産生の誘発が極めて軽度であると考えられる。

Dosage of CEX		Clinical results	Side effects	Comments
Daily dose	Duration days			
500 mg × 3	6	Good	None	No relapse within 2 months
500 mg × 4	7	Good (tentatively)	None	No colic, but, 2 kidney stones were demonstrated by X-ray examination

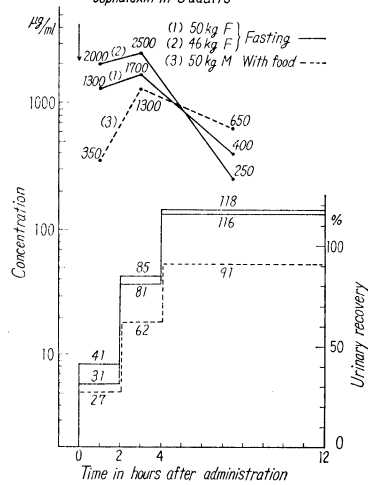
Fig. 4 Serum levels following single oral administration of 500mg cephalixin in 3 adults



体液中濃度測定成績

成人3名について CEX 500 mg 内服後の血中・尿中

Fig. 5 Urinary level and urinary recovery following single oral administration of 500mg cephalixin in 3 adults



濃度を *B. subtilis* PCI 219 芽胞を用いる薄層平板カップ法を用いて測定した。本法において稀釈液に M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.5) を用いた際と同緩衝液にて2倍稀釈した血清を用いた際の CEX 濃度と阻止帯直径の関係を示す標準曲線は Fig. 3 のとおりで、両者に大差はみとめられなかった。

血清中濃度のピークはいずれも2時間後で 7~20 µg/ml を示し、8時間後には <0.5~2.6 µg/ml となり、空腹時投与のほうがピーク値はやや高いが、持続はむしろ食後投与のほうがすぐれているように思われる (Fig. 4)。

尿中濃度は投与後2~4時間尿で最高値 1,300~2,500 µg/ml を示し、12時間回収率は 91~118% であった (Fig. 5)。

臨床使用経験

つぎに CEX を2例の尿路感染症に使用したので、その概要を Table 7 に示す。2例とも分離菌が CEX に感受性を有する本剤適応患者で、第1例は再発もなく良好な経過を示したが、第2例は腎結石を合併する症例であったため一時的な効果を取めるにとどまった。なお2例とも特記すべき副作用を認めなかった。

総括

CEX の臨床検査としてのディスク法、ならびに成人に経口投与した場合の体内濃度について検討し、つぎの結果がえられた。

(1) 1濃度ディスク法式が適用されることが確かめられ、寒天平板2倍稀釈法にある程度近い精度で MIC 値の推定が可能であると考えられた。

(2) 他の Cephalosporin 剤である CET, CER に比し、Penicillin 耐性ブドウ球菌 (β-lactamase producer)

による不活性化を受けにくく、したがって Cephalosporinase 産生能も低いことがうかがえた。

(3) 成人3例に経口投与後、高い血中濃度がえられ、2時間目にピーク値を示し、8時間後にはほぼ血中から消失する。尿中には投与後2~4時間で1,300~2,500 $\mu\text{g/ml}$ の最高濃度を示し、12時間内に91~118%が回収された。

(4) 本剤の感受性菌による2例の尿路感染症に本剤を使用して有効であった。

本研究に使用した CEX 標準品は塩野義製薬株式会社ならびに鳥居薬品株式会社から提供を受けた。なお体液中濃度測定および臨床には CEX-Lilly の 250 mg カプセルを用いた。

文 献

- 1) 金沢 裕, 他: 合成 Cephalosporin C 製剤 (Cephaloridine, Cephalothin) の基礎的 (*In vitro* 抗菌力, 併用効果, 体液中濃度, 不活化酵素) 検討ならびに臨床経験. J. Antibiotics, Ser. B 19(2): 122, 1966
- 2) 金沢 裕, 他: 合成 Cephalosporin C 製剤の基礎的臨床的検討, 第2報, とくに Cephaloridine のディスクによる感受性測定について. J. Antibiotics, Ser. B 20(5): 338, 1967
- 3) 金沢 裕, 他: Cephalosporin C 製剤の基礎的臨床的検討, 第3報, とくに Cephalothin の Disc 法による感受性測定ならびに静注療法について. J. Antibiotics, Ser. B 21(1): 1, 1968
- 4) W. E. WICK: Cephalixin, a new orally absorbed cephalosporin antibiotic. Applied Microbiol. 15: 4, 765, 1967
- 5) P. BRAUN, *et al.*: Cephalixin and cephaloglycin activity *in vitro* and absorption and urinary excretion of single oral doses in normal young adults. Applied Microbiol. 16: 11, 1684, 1968
- 6) S. SASLAW, *et al.*: Studies on therapy of staphylococcal infections in monkeys. III. Comparison of cephalothin, cephaloridine and cephalixin. Am. J. Med. Sci. 256: 136, 1968
- 7) R. S. GRIFFITH, *et al.*: Cephalixin: A new antibiotic. Clin. Med. 75: 14, 1968
- 8) R. L. PERKINS, *et al.*: Cephalixin: *In vitro* bacterial susceptibility, absorption in volunteers, and antibacterial activity of sera and urine. Am. J. Med. Sci. 256: 122, 1968
- 9) B. E. COPELAND: Standard deviation, a practical means for the measurement and control of the precision of clinical laboratory determination. Am. J. Clin. Path. 27: 551, 1957

LABORATORY AND CLINICAL STUDIES ON CEPHALEXIN

YUTAKA KANAZAWA and TOSHIO KURAMATA

Niigata Railway Hospital

An oral preparation of synthetic cephalosporin C, cephalixin was studied bacteriologically and clinically, with the results which may be summarized as follows:

1) In a study by the agar plate dilution method on a total of 98 strains of 19 bacterial species, *Staphylococci*, *Pneumococci*, β -Hemolytic *streptococci*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Neisseria gonorrhoeae* were found to be markedly susceptible to the agent, showing their MICs almost less than 4.4 $\mu\text{g/ml}$. Gram-negative rods including *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* and *Shigella* were fairly susceptible with the MIC values ranging from 1.1 to 8.8 $\mu\text{g/ml}$. While, *Enterococci*, *Proteus* group and *Pseudomonas* displayed a rather poor susceptibility to the agent ranging in MIC values over 35 $\mu\text{g/ml}$.

2) With the view of preparing grounds for application of the single-disc method to the sensitivity test in clinical laboratory, graphic analysis of the dose-response data concerning the interrelations between MIC value and diameter of inhibition zone were conducted on each of i) conventional (overnight: about 16 hours) assay, ii) 4-hour rapid assay with heavy inoculum, iii) 6-hour rapid assay with heavy inoculum and iv) delayed (about 24 hours) assay for slowly growing bacteria. Experimental errors of single-disc method inherent was also discussed in comparison with the ones in the dilution method.

3) By the thin-layer cylinder-plate technique using *B. subtilis* PCI 219 as a test organism, cephalixin was found to be assayable to the lower limit of 0.3 $\mu\text{g/ml}$ in serum (1:2 in phosphate buffer).

Following a single oral administration of 500 mg cephalixin, peak serum levels of 7~20 $\mu\text{g/ml}$ were obtained at 2 hours, with persistence of serum levels of at least 0.5 $\mu\text{g/ml}$ over ensuing 8 hours. And the agent was recovered for the most part from the urine in the microbiologically active form.

4) In comparison with other cephalosporin C derivatives as cephalothin and cephaloridine, cephalixin is hardly inactivated by penicillin-resistant *Staphylococci* (β -lactamase producer) and consequently

cephalosporinase producing ability of *Staphylococci* would be lower with cephalixin.

- 5) Treatment with cephalixin was effective in two cases of urinary tract infection caused by the organisms whose sensitivities to the agent were determined as very sensitive by the above mentioned single-disc method.
- 6) No any side effects were observed in these 2 cases.