

Cephacetrile の β -ラクタマーゼ産生菌に対する *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用

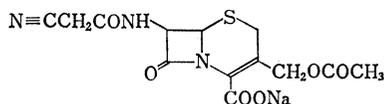
三橋 進・沢田洋介・倉茂達徳・田井 賢

群馬大学医学部微生物学教室

I 結 言

Cephacetrile (CEC) は CIBA-GEIGY 社研究所において開発された新しい半合成 Cephalosporin 系抗生物質であり、その抗菌スペクトル、抗菌力の特性および β -ラクタマーゼに対する安定性等から CEC は Cephalothin (CET) に比して優れている抗生物質として発表され^{1,2,3)}、現在諸外国では実用され始めている。

CEC は次に示したように、7-ACA の 7 位アミノ基にシアノアセチル基が結合した化学構造を有している。



Structure of CEC

現在臨床で多用されている Cephaloridine (CER), Cefazolin (CEZ), Cephalexin (CEX), Cephaloglycin (CEG) および CET などの cephalosporin 系薬剤に比し CEC が優れた抗菌作用を示すか否かを検討する目的で、 β -ラクタマーゼ産生代表株に対する *in vitro* および *in vivo* での抗菌作用および β -ラクタマーゼに対する安定性について、特に CEZ および CER との比較において検討したので報告する。

II 実験材料および方法

1) 使用菌株:

セファロsporinaゼ (CSase) 産生菌として *Pseudomonas aeruginosa* GN 918, *Proteus vulgaris* GN 76, *Citrobacter freundii* GN 346 それに *E. coli* GN 5482 を代表株として選び使用した。またペニシリナーゼ (PCase) 産生菌としては I 型 PCase 産生菌である *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺, II 型 PCase 産生菌として *E. coli* W 3630 RGN 238⁺ それに *Staph. aureus* 由来 PCase 産生菌として *Staph. aureus* MS 9407 を選び使用した。また β -ラクタマーゼ非産生菌として *E. coli* K-12 ML 1410 株を使用した。

2) 使用薬剤:

CEC は武田薬品工業株式会社および日本チバガイギ

一株式会社から提供された粉末 (Potency: 915 μ g/mg) を用い、CER はシオノギ製薬株式会社、CEZ は藤沢薬品工業株式会社から提供されたものを用い、他の penicillin および cephalosporin 誘導体は当教室保存の working standard sample を使用した。

3) 使用培地:

薬剤感受性測定には Heart infusion (HI) 寒天平板 (栄研) を使用した。菌の前培養は Brain heart infusion (BHI) broth (Difco) を用い、¹菌液の希釈はペプトン水 (1% ペプトン, 0.5% NaCl) を用いた。Biophotometer での溶菌作用には Tryptic-Soy broth (TSB, 栄研) を使用した。 β -ラクタマーゼ調整のためには nutrient broth を使用した。

4) 薬剤感受性測定:

HIA 培地を用いた平板希釈法により測定した。被検菌の BHI 培地, 18時間培養液 (約 10^8 /ml) およびペプトン水 100 倍希釈液の 1 白金耳を薬剤含有培地平板に接種し, 37°C 18時間後最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

5) β -ラクタマーゼ調製と酵素活性測定:

酵素源として供試された菌の BHI 培地, overnight culture 10 ml を nutrient broth 1L に加え, 37°C 4~5 時間振盪培養した後, 冷凍遠心により集菌した。pH7.0 のリン酸 buffer で洗滌した菌体に同じ buffer の適当量を加えて超音波破砕機で 20 kc, 5 分間, 氷冷下破砕した。得られた液を 15,000 \times g, 30分冷凍遠心した後上清を β -ラクタマーゼ sample とした。*Staph. aureus* は early log stage に inducer として Methicillin 2 μ g/ml, *Proteus vulgaris* それに *Pseud. aeruginosa* には Penicillin G (PC-G) をそれぞれ 0.5, 5 mg/ml を inducer として加えた。 β -ラクタマーゼ活性は 30°C, 30分反応した後ヨード法⁴⁾で測定し, CSase においては CER を 100, PCase においては PC-G を 100とした時の各基質に対する加水分解度を求めた。

6) β -ラクタマーゼを産生する菌に対する溶菌作用:

試験菌の BHI 培地前培養液を TSB 培地に約 10^6 /ml 接種し, 37°C で振盪培養を行い, 増殖 early log stage に薬剤 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml を加えて biophotometer (Jouan, Paris) で濁度を記録した。一

方, 薬剤添加時, 1, 2, 4, 8, 18時間のそれぞれのセルより 0.1ml の培養液を採り, 生理食塩 (生食) 水で適当に希釈して普通寒天培地にまき, 生菌数を測定した。ただし CEZ の場合の生菌数は求めなかった。

7) 感染動物の治療効果の判定:

HIA 平板で 37°C, 20時間培養した菌を生食水に浮遊させ, その 0.2ml を ICR 系のマウスの尾静脈より注射した。ICR 系マウスは日本クレアより購入した雌雄で, 生後 4週, 体重 20±1g のものを用いた。菌量は OD₅₃₀ で測定し, 0.2ml 中に 3LD₅₀ が入るように生食水で調製した。治療効果は 0.02M リン酸 buffer—0.15M NaCl に溶解した薬剤を感染直後, 4, 20時間後の 3回マウスの皮下に投与, 1週間後の生死で判断した。ED₅₀ 値は回帰直線法により求めた。

III 実験成績

1) *in vitro* 抗菌作用:

β-ラクタマーゼを産生する菌 4 株および感受性株 *E. coli* ML 1410 に対する CEC, CER および CEZ の MIC を Table 1 に示した。すなわち I 型 PCase を産

生する *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺において CEC が CEZ および CER よりやや優れた抗菌力を示しているが, 他の菌に対しては抗菌作用が同じかやや低い結果であった。

一方, TSB 培地に 10⁸/ml の菌を接種後, CEC, CEZ をそれぞれ, 種々の濃度で添加し biophotometer および生菌数測定で溶菌作用を検討した結果では, *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ においては CEZ より CEC がやや強い溶菌作用を示しているように思われ, これは上記の抗菌力の結果と一致した。しかしながら, CEC は添加後 2時間ぐらいで急速な再増殖がみられた。一方, 高い CSase 活性を有する *Cit. freundii* GN 346 に対しては, CEC, CEZ 共に 200μg/ml で溶菌作用が認められなかった。その他の試験菌に対しては, CEC より CEZ の方がやや強い抗菌作用を示す結果を得た。

なお, この溶菌実験において数時間後より薬剤を添加したセル中の broth が赤色をおびた。これは CEC が β-ラクタマーゼで分解された後生じる赤色物質に起因する^{1,3)}と思われる。

Table 1 MIC levels of CEC toward bacterial strains with β-lactamase activity

Strain	MIC (μg/ml)					
	CEC		CER		CEZ	
	10 ⁶	10 ⁴ a)	10 ⁶	10 ⁴ a)	10 ⁶	10 ⁴ a)
<i>Cit. freundii</i> GN 346	>1600	1600	>1600	800	>1600	1600
<i>E. coli</i> GN 5482	100	100	800	50	200	25
<i>E. coli</i> GN 5499 Rms 192 ⁺	100	25	1600	100	100	50
<i>E. coli</i> W 3630 RGN 238 ⁺	12.5	12.5	12.5	3.2	3.2	1.6
<i>E. coli</i> ML 1410	25	12.5	12.5	3.2	6.3	1.6

a) The inoculum size on agar plate

Fig. 1 Survival curve of *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ by CEC (37°C)

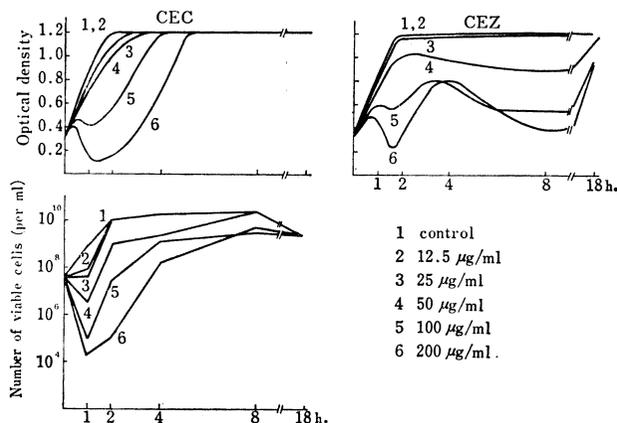


Fig. 2 Survival curve of *Cit. freundii* GN 346 by CEC (37°C)

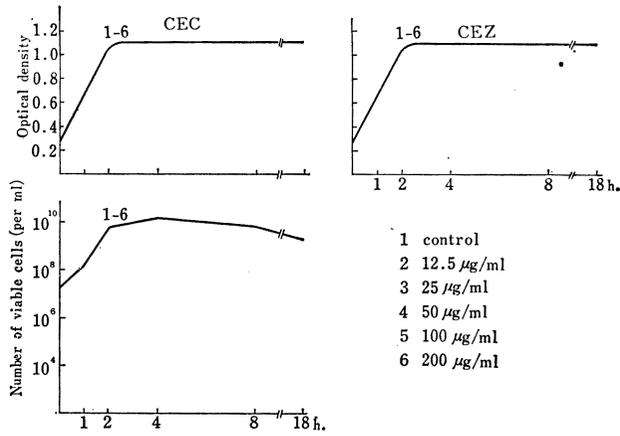


Fig. 3 Survival curve of *E. coli* GN 5482 by CEC (37°C)

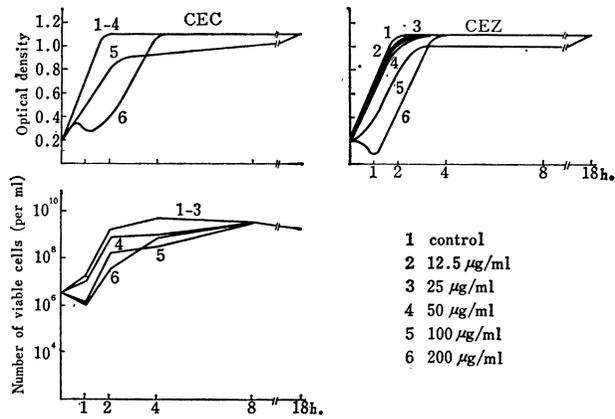


Fig. 4 Survival curve of *E. coli* W 3630 RGN 238+ by CEC (37°C)

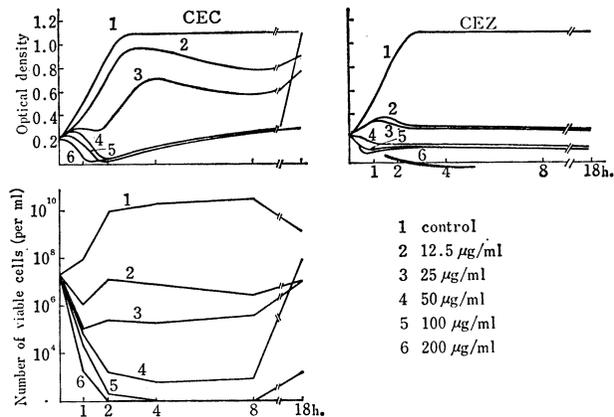


Table 2 Relative hydrolysis of CEC by β -lactamases

Enzyme from	Specific activity U/mg of protein		Substrate									
	PCase	CSase	CER	CEX	CEZ	CEG	CET	CEC	PC-G	AB- PC	PE- PC	MCI- PC
CSase												
<i>Pseud. aeruginosa</i> GN 918		253	100	16	368	1.6	93	117	18	0.9	0.09	0.02
<i>Proteus vulgaris</i> GN 76		189	100	198	793	1278	105	282	6.7	6.8	5.5	0.4
<i>Cit. freundii</i> GN 346		1177	100	38	205	0.3	17	11	1.7	0.08	0.05	0.05
<i>E. coli</i> GN 5482		46	100	18	236	1	99	89	20	0.6	0.3	0.1
PCase												
<i>E. coli</i> GN 5499 Rms 192*	1400		136	2	40	20	11	29	100	105	28	1
<i>E. coli</i> W 3630 RGN 238*	11		118	17	238	15	18	78	100	505	176	142
<i>Staph. aureus</i> MS 9407	343		0.3	0.7	0.6	0.1	0.2	0.2	100	247	91	0.4

Rate of hydrolysis of cephalosporins and penicillins were expressed in per cent of hydrolysis of CER and PC-G, respectively.

Fig. 5 Therapeutic effect of CEC, CEZ and CER on *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ infection in mice

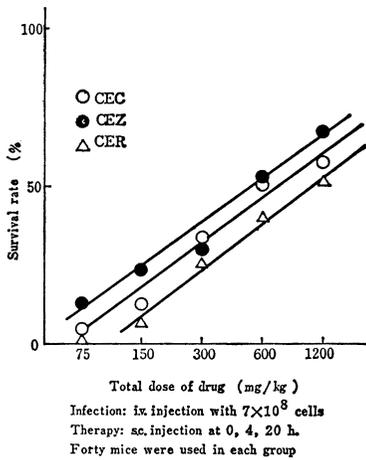


Fig. 6 Therapeutic effect of CEC, CEZ and CER on *Cit. freundii* GN 346 infection in mice

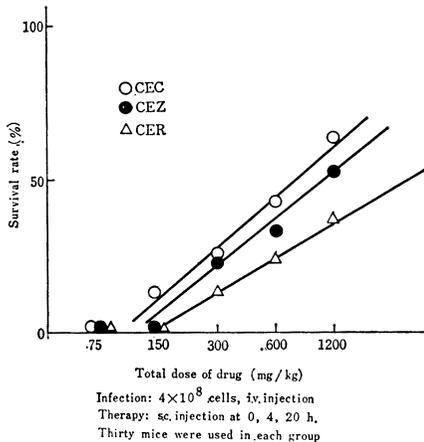
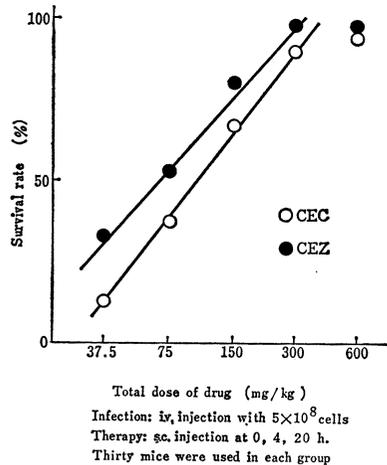


Fig. 7 Therapeutic effect of CEC and CEZ on *E. coli* ML 1410 infection in mice



2) β -ラクタマーゼに対する安定性:

CSase を産生する 4 株および PCase を産生する 3 株からそれぞれ調製した β -ラクタマーゼを用いて、CEC および種々の cephalosporin および penicillin 系薬剤の加水分解度を測定した。Table 2 に示したように、*Cit. freundii* GN 346 の CSase に対して CEC は CER の約 10 倍、CEZ の約 20 倍加水分解され難いこと、*E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ の PCase に対し CEZ とほぼ同程度分解されるが、CER より約 5 倍分解され難いこと、他の菌の CSase および PCase に対し CER とほぼ同程度分解されるが、CEZ より約 3 倍分解され難いことが判った。また CEC の加水分解度は CET のそれと比較してほとんど同程度であった。

3) *in vivo* 抗菌作用:

PCase を産生する *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺, CSase

を産生する *Cit. freundii* GN 346 および *E. coli* ML 1410 を ICR 系マウスに感染させ、CEC, CER および CEZ の治療効果を比較し、その結果を Fig 5, 6, 7 に示し、また Table 3 に要約した。*E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ 感染では3薬剤間に有意の治療効果の差は認められなかった。*Cit. freundii* に対する CEC, CEZ および CER の ED₅₀ 値はそれぞれ 237 mg/kg×3 回, 370 mg/kg×3 回それぞれに 945 mg/kg×3 回であり CEC と CEZ の間には有意の差は認められなかったが、両薬剤と CER との間には統計学的にも有意の差が認められた。*E. coli* ML 1410 に対する CEZ および CEC の ED₅₀ 値はそれぞれ 22 mg/kg×3 回および 35 mg/kg×3 回で CEC より CEZ がやや大きい治療効果を示す傾向がみられたが、95%信頼限度においては両薬剤間には治療の有意差があるとはいえない。

Table 3 Therapeutic effect of CEC, CEZ and CER on *Escherichia* and *Citrobacter* infection in mice

Strain of bacteria	Drug	ED ₅₀ (mg/Kg)	
<i>E. coli</i> GN 5482	CEZ	204	P>0.05
	CEC	361	
	CER	249	
<i>E. coli</i> GN 5499 Rms 192 ⁺	CEZ	175	P>0.05
	CEC	238	
	CER	334	
<i>E. coli</i> ML 1410	CEZ	22	P>0.05
	CEC	35	
<i>Cit. freundii</i> GN 346	CEZ	370	P>0.05
	CEC	237	
	CER	945	

ICR strain mice were infected with each micro-organism and administered with each drug at 0, 4 and 20 h. Dose of drug shown in the table is that of single injection.

IV 結論および考察

Cephalosporin 誘導体 CEC の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用、β-ラクタマーゼに対する分解度について CEZ および CER と比較した。

CEC は CET および CER と比較すると、CET よりやや強いが、CER よりやや弱い抗菌活性を示すことが報告されている¹⁾が、β-ラクタマーゼ産生菌に対する私どもの結果も CEZ および CER に比し *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ 株以外はやや弱い抗菌活性を示した。

また CEC の溶菌作用も CEZ に比しやや弱い結果となった。

CEC は CEZ および CER に比し *Cit. freundii* の産生する CSase で加水分解され難く、I 型 PCase 産生菌 *E. coli* GN 5499 Rms 192⁺ の酵素による加水分解度は CEZ および CER に比し低かった。一方、*E. coli* GN 5482, *E. coli* W 3630 RGN 238⁺ の産生する酵素により CEC は CEZ および CER より分解され難いにもかかわらず抗菌力は弱かった。このように抽出された酵素での加水分解速度 (Vmax) とその酵素を産生する菌に対する抗菌力 (MIC) が並行しない例は他薬剤においても多くあり、これは酵素と基質の親和性 (km), 場合によっては薬剤の菌体内への透過性のちがいで説明可能なものもあると考えられ、この方面は今後検討を要するであろう。

in vivo での治療効果は CSase 産生の高い *Cit. freundii* に対してのみ CER よりわずかに優れた効果を示した。しかし *Cit. freundii* は一般に高い CSase を誘導的に産生する菌であり、GN 346 の場合 CEC の ED₅₀ 値は 237 mg/kg×3 回となり、CEC そのものの治療効果を考えた時、決して優れているとはいえない。

以上のように、臨床で数多く分離されているような cephalosporin および penicillin 系薬剤高度耐性菌の代表株に対する CEC の特性を検討したが、CEC および CEZ と比較し抗菌作用の特に優れている結果は得られなかった。

文 献

- KNÜSEL, F.; E. A. KONOPKA, J. GELZER & A. ROSSELET: Antimicrobial studies *in vitro* with Ciba 36, 278-Ba, a new cephalosporin derivative. *Antimicrob. Agents & Chemoth.*—1970: 140~149, 1971
- NEU, H. C. & E. B. WINSHELL: *In vitro* evaluation of Cephacetrile, a new cephalosporin antibiotic. *J. Antibiotics* 25: 400~404, 1972
- RUSSELL, A. D.: Interaction of a new cephalosporin, 7-cyanacetamidocephalosporanic acid, with some gram-negative and gram-positive β-lactamase producing bacteria. *Antimicrob. Agents & Chemoth.*—1972: 255~260, 1972
- PERRET, C. T.: Iodometric assay of penicillinase. *Nature* 174: 1012~1013, 1954

ANTIMICROBIAL STUDIES *IN VITRO* AND *IN VIVO* WITH CEPHACETRILE
AGAINST β -LACTAMASE PRODUCING BACTERIA

SUSUMU MITSUHASHI, YOSUKE SAWADA, SATONORI KURASHIGE and MASARU TAI
Department of Microbiology, School of Medicine, Gumma University

Cephacetrile (CEC), 7-cyanoacetamido-cephalosporanic acid, is a new cepharosporin active against many gram-positive and gram-negative bacteria. The antimicrobial evaluation and stability against β -lactamases were performed on CEC using Cefazolin (CEZ) and Cephaloridine (CER) as reference samples.

In *in vitro* experiments, antimicrobial and bactericidal activity of CEC were found to be of the same order or slightly less to CEZ and CER against β -lactamase producing strains except *Escherichia coli* GN 5499 possessing Rms 192*.

CEC showed approximately 20 and 10 times higher resistance than CEZ and CER against the β -lactamase legradation produced by *Citrobacter freundii* GN 346, however, no distinguish differences of hydrolysis rate in other β -lactamases were observed.

In the experiments *in vivo*, the chemotherapeutic trials of experimental infections of *Cit. freundii* in mice revealed the superiority of CEC to CER, however, the therapeutic effect of CEC against three strains of *E. coli* was not effective comparing with those of both drug.