

## Cephacetrile の基礎的研究

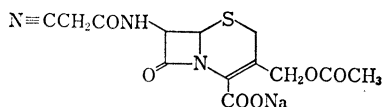
新井武利・井上 勇

昭和薬科大学微生物学研究室

## はじめに

Cephacetrile (CEC) はチバガイギー社研究室において開発された新しい半合成 cephalosporin 系抗生物質であり、つぎのような化学構造を有する。今回、CEC

## Structure of Cephacetrile



について基礎的、細菌学的研究を行い、2, 3 の知見を得たので報告する。

## 実験材料および実験方法

## 1) 感受性分布

*Staphylococcus aureus* FDA 209-P, *Staph. aureus* 寺島株, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* NIHJ JC-2 および病巣分離の *Staph. aureus* 33 株, *E. coli* 10 株, 健康人分離の *Klebsiella* 42 株, 同じく *Enterobacter cloacae* 37 株, 教室保存の *Proteus mirabilis* 5 株, *Proteus inconstans*, *Proteus rettgeri*, *Proteus morgani*, *Pseudomonas aeruginosa* 各 4 株, *Vibrio parahaemolyticus* 3 株について日本化学療法学会標準法により MIC を測定, 感受性分布の検討を行い, なお CET, CER との交叉耐性も検討した。

## 2) 抗菌力に影響をおよぼす因子

## i) 接種菌量の影響

*Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 のトリプトソイブイオン (栄研) の 18 時間培養液を原液とし (菌数約  $2 \times 10^8$  cells/ml), これを滅菌生理食塩液で 10 倍希釈し, HI agar (Difco) を用いて spot 法にて

MIC を測定して接種菌量の MIC 値におよぼす影響を検討した。

## ii) 測定用培地の pH の影響

HI agar の pH を 5, 6, 7, 8, 9 とし, トリプトソイブイオンで前培養した *Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 を用いて pH の MIC 値におよぼす影響を検討した。

## 3) 殺菌作用の検討

トリプトソイブイオンを用いて *Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 を振盪培養し, *Staph. aureus* の場合は約 6 時間後, *E. coli* の場合は約 3 時間後の対数期中にて CEC, CET の種々の濃度を加え, 増殖度を biophotometer (東洋科学産業 TN-112D) を用いて測定した。

## 4) CEC の安定性

CEC および CET を pH 3, 5, 7, 9, 11 の buffer (pH 3, 5 はクエン酸系, 7 はリン酸系, 9, 11 は炭酸系 buffer を使用) に  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度に溶解し,  $4^\circ\text{C}$  および  $37^\circ\text{C}$  に放置, 24 時間毎に一部を抜き取り中性にした後, *B. subtilis* ATCC 6633 の胞子液を供試菌として cylinder 法にて抗菌活性を比較した。

## 5) CEC の着色性試験

CEC および CET を種々の pH の buffer に溶解し,  $4^\circ\text{C}$  および  $37 \sim 40^\circ\text{C}$  に放置, 着色度を肉眼および光電比色計 (515nm) を用いて観察した。また着色物質の検討のため, spot film (東京化成, シリカゲル) を用いた薄層クロマトグラフィを行った。

## 実験成績

## 1) 抗菌スペクトラム

CEC, CET, CER, CEG および CEX の standard

Table 1 Antibacterial spectrum of cephalosporin derivatives

Species	CEC	CET	CER	CEG	CEX
<i>Staph. aureus</i> 209-P	0.39	$\leq 0.19$	$\leq 0.19$	1.56	3.13
<i>Staph. aureus</i> TERAJIMA	0.78	$\leq 0.19$	$\leq 0.19$	1.56	6.25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	$\leq 0.19$	$\leq 0.19$	$\leq 0.19$	$\leq 0.19$	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	12.5	25	6.25	12.5	25

MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )

strain に対する MIC は Table 1 に示す通りであった。すなわち *Staph. aureus*, *B. subtilis* に対しては CET, CER より CEC の抗菌力はやや弱く, CEG, CEX より強い。しかし *E. coli* に対してはその差は著明ではなかった。

## 2) 感受性分布

病巣分離の *Staph. aureus* について MIC を測定した結果, Fig. 1 に示す通りであった。すなわち94%の菌株が  $0.78 \mu\text{g/ml}$  以下の MIC を示し, CET, CER と比較すると1~2管程度高く, CEG, CEX より2~

Fig. 1 Sensitivity distribution of *Staphylococcus aureus* to cephalosporin derivatives (35 strains)

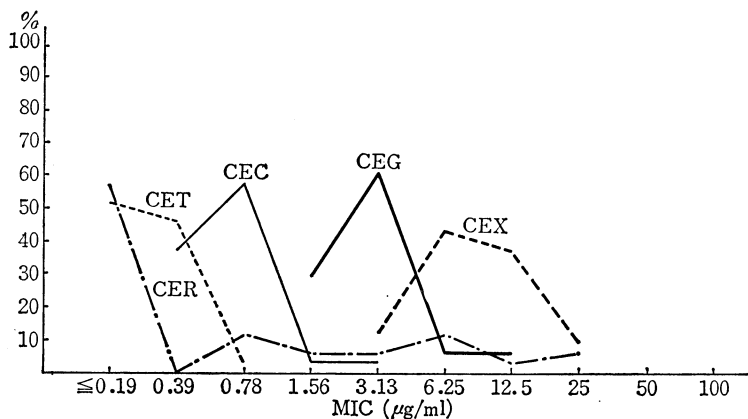


Fig. 2 Sensitivity distribution of *Escherichia coli* to cephalosporin derivatives (11 strains)

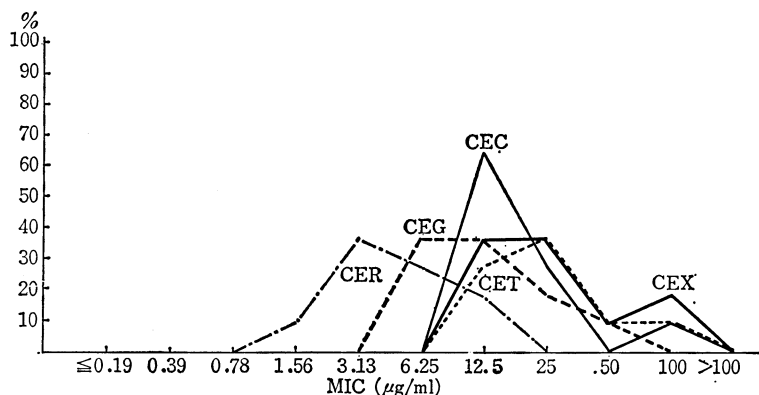
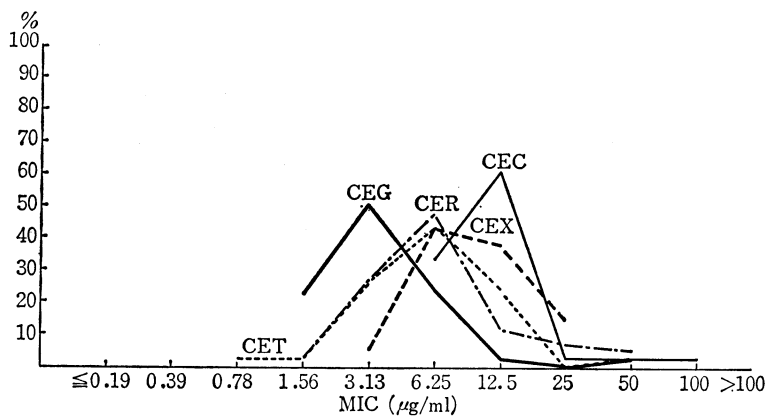


Fig. 3 Sensitivity distribution of *Klebsiella* sp. to cephalosporin derivatives (42 strains)



3管程度低い分布を示した。

*E. coli* においては Fig. 2 に示すように64%の菌株が12.5 µg/ml, 27%が25 µg/ml, 9%が100 µg/mlで発育が阻止され, CET, CEX とほぼ同じパターンを示し, CER より2管程度, CEG より1管程度高いパタ

ーンであった。

*Klebsiella* においては Fig. 3 に示すように93%の菌株が12.5 µg/ml以下のMIC値を示し, 他の cephalosporin 誘導体より1~2管程度高い価であった。

*Ent. cloacae* においては Table 2 に示すように92%の

Table 2 Sensitivity distribution of Gram negative bacteria to cephalosporin derivatives

MIC (µg/ml)		3.13	6.25	12.5	25	50	100	<100
Drugs								
Species (No. of strains)								
<i>Entero. cloacae</i> (37)	CEC				3			34
	CET			1	1	1		34
	CER				2	1		34
	CEG		1	1	1			34
	CEX			2	1			34
<i>Proteus mirabilis</i> (5)	CEC				5			
	CET		3		2			
	CER			2	2	1		
	CEG	2		1	1	1		
	CEX				1	1	2	1
<i>Proteus inconstans</i> (4)	CEC						1	3
	CET							4
	CER						1	3
	CEG						1	3
	CEX						1	3
<i>Proteus rettgeri</i> (4)	CEC							4
	CET							4
	CER							4
	CEG							4
	CEX							4
<i>Proteus morgani</i> (2)	CEC							2
	CET							2
	CER							2
	CEG							2
	CEX							2
<i>Pseud. aeruginosa</i> (4)	CEC							4
	CET							4
	CER							4
	CEG							4
	CEX							4
<i>V. parahaemolyticus</i> (3)	CEC				1		2	
	CET						2	
	CER			1	1	1		1
	CEG					2	1	
	CEX							3



## 3) 相関関係

*Staph. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* について CEC と CET, CER との相関関係を検討した結果は Fig. 4, 5, 6 の通りであった。*Staph. aureus* において CER に対し MIC 値が高く, CEC に対し低い MIC 値を示した菌株が 2, 3 認められたが, その他は CEC と CET CER との間に交叉耐性が認められた。

## 4) 接種菌量の MIC 値におよぼす影響

*Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 を用いて接種菌量を変化させて MIC 値の変動を検討した結果は Table 3 に示す通りである。すなわち *Staph. aureus* の場合は接種菌量の影響はほとんど認められなかったが, *E. coli* では接種菌量が減少すると MIC 値が低下し, CEC の抗菌力の増加が認められた。

## 5) 測定用培地の pH の抗菌力におよぼす影響

*Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 を用いて培地 pH の影響を検討した結果, Table 4 に示すように両菌種に対する CEC の抗菌力は酸性側で高まり, アルカリ側で低下した。

## 6) CEC の殺菌作用

*Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ JC-2 に対する CEC の殺菌作用を検討した結果は Fig. 7, 8 に示す通りである。すなわち *E. coli* では MIC 値の約 3 倍濃度で殺菌作用が認められたが, 21時間後に再び菌が増殖しはじめた。*Staph. aureus* に対しても殺菌作用が認められ, この場合には24時間後も菌の増殖は認められなかった。

## 7) CEC の安定性

種々の pH の buffer に CEC, CET を溶解し, 4 および 37°C に放置して *B. subtilis* に対する抗菌力の変

Table 3 Effect of inoculum size on antibacterial activity of CEC

inoculum size		10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
MIC (μg/ml)	<i>Staph. aureus</i> 209-P	0.78	0.78	0.78	0.78	0.19
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	50.	12.5	12.5	6.25	6.25

Table 4 Effect of medium pH on antibacterial activity of CEC

pH	5	6	7	8	9
<i>Staph. aureus</i> 209-P	<0.19	0.39	0.78	0.78	1.56
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	12.5	25.0	25.0	50.0

MIC (μg/ml)

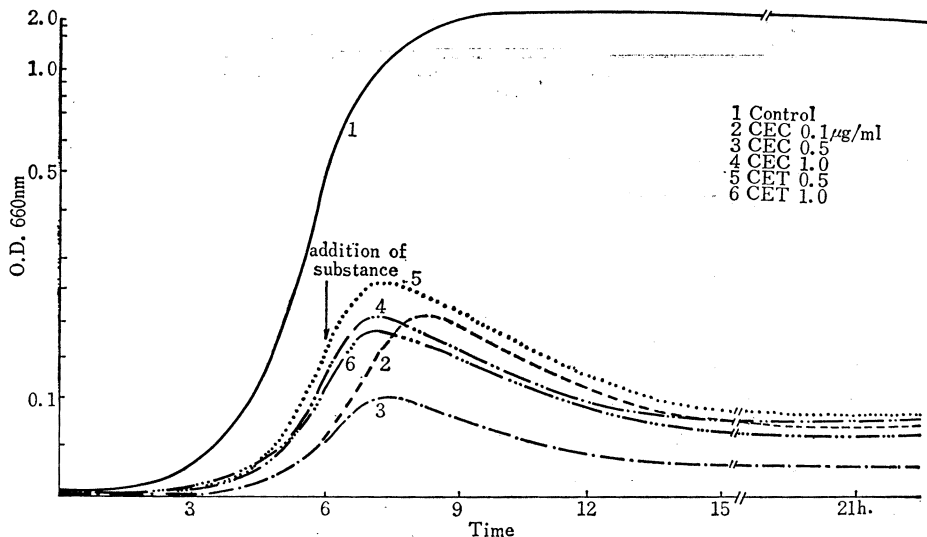
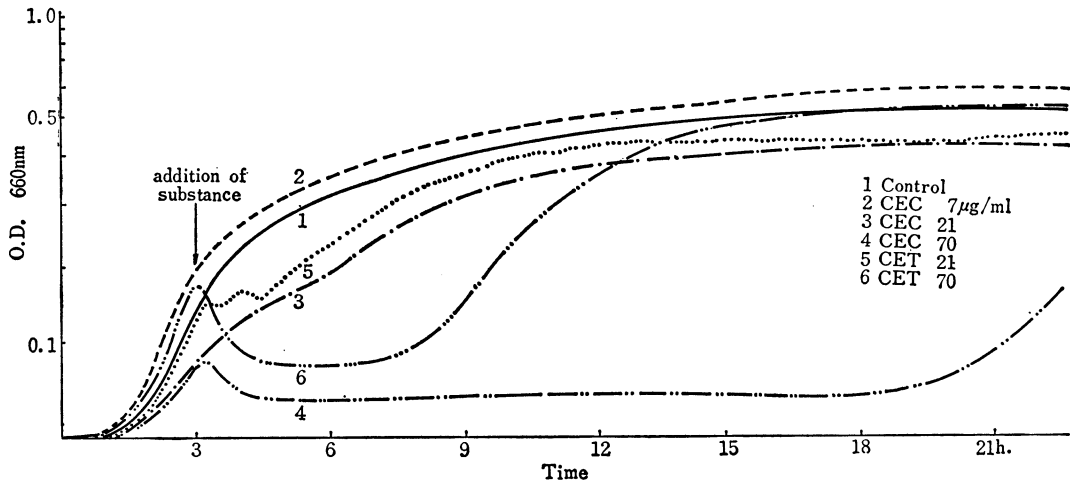
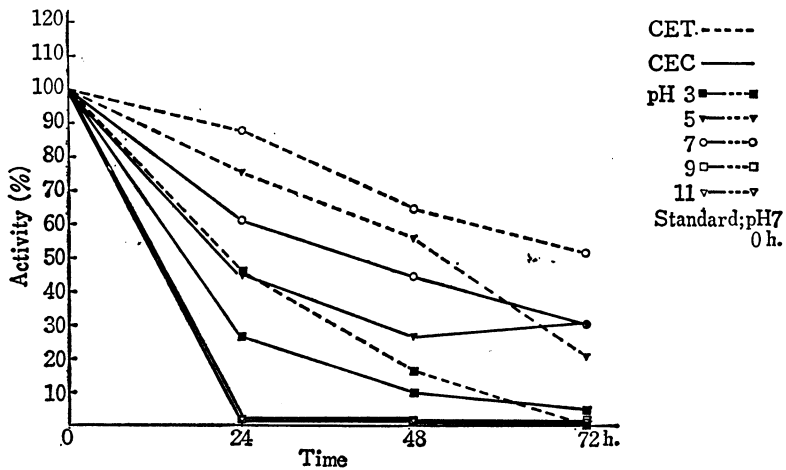
Fig. 7 Bacteriolytic effect of CEC to *Staph. aureus*  
*Staph. aureus* F. D. A. 209-P 37°C

Fig. 8 Bacteriolytic effect of CEC to *E. coli* NIHJ JC-2 37°CFig. 9 Antibacterial activities of CET & CEC cylinder method. *B. subtilis*. ATCC 6633 37°C

化を検し、Fig. 9, 10に示すような結果が得られた。すなわち CEC は CET に比してアルカリ性溶液で不安定であり、4°C にも急速に抗菌活性が低下した。酸性溶液では CET よりやや不安定ではあるがアルカリ性溶液より安定であり、72時間後も50%程度の活性が認められた。中性では4°C ではほぼ安定であり、CET と同様な態度を示した。37°C に放置した場合は酸性、アルカリ性ともに不安定であり、ことにアルカリ性溶液では24時間で失活した。中性でも72時間後に30%の活性を示したにすぎず、37°C では pH の如何にかかわらず CET より不安定であった。

#### 8) CEC 溶液の着色

CEC 溶液を 37~40°C に放置した場合に溶液が赤紫色に変化することが認められた。すなわち CEC 溶液を 40°C に放置して 515nm にて吸光度を測定した場合、Fig. 11 に示すように1日目ではほとんど着色しないが、それ以後直線的に吸光度が増加し、肉眼的にも明瞭な赤紫色を呈した。一方 CET, CER, CEG, CEX について検討したが、明確な着色は認められなかった。なお 4°C においては 8 日後も CEC 溶液の着色は認められなかった。

CEC 溶液の着色は pH により異り、Table 5 に示すように強酸性では無色、pH 5, 8 で淡紅色、pH 6, 7 で赤色、pH 9 以上で淡黄褐色~黄褐色を呈した。これ

Fig.10 Antibacterial activities of CET & CEC  
cylinder method. *B.subtilis*. ATCC 6633 4°C

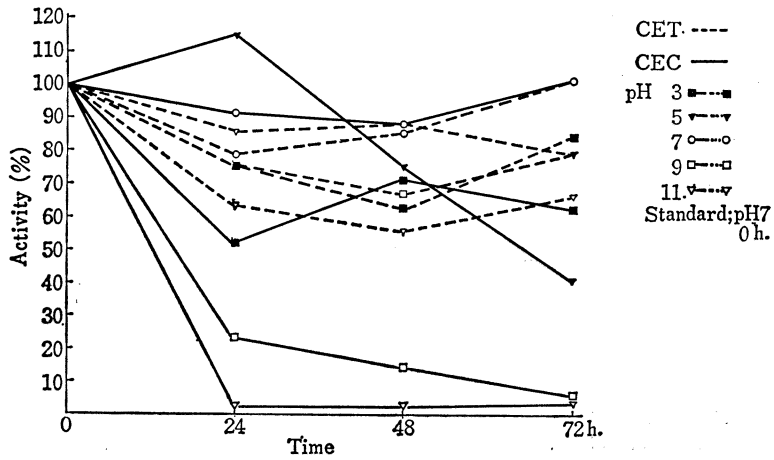
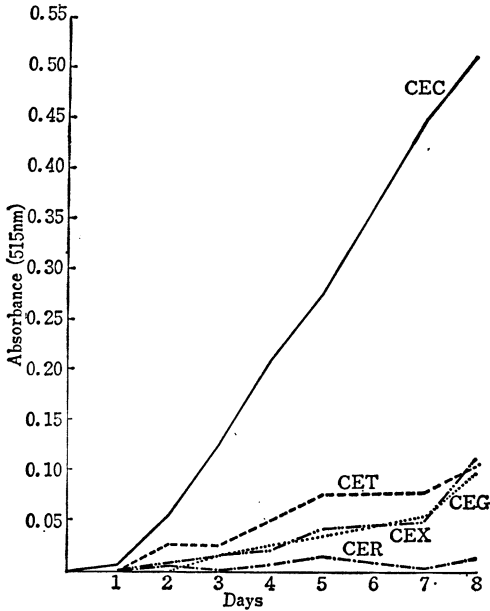


Fig.11 The coloring of cephalosporin derivatives  
(40°C, dissolved 5mg of sample in 3ml of H<sub>2</sub>O)



に対し CET, CER では中性〜アルカリ側でわずかに淡黄褐色を呈したにすぎず、赤変は認められなかった。着色した CEC 溶液のスペクトラムは Fig.12 に示す通りであり、pH 7 では 445nm および 550nm 付近に peak をもつ曲線が得られ、pH 5 では 2つの peak とも低く、pH 9 では 550nm 付近の peak は消失し、pH 3, 11 では可視部の吸収は認められなかった。着色した CEC の薄層クロマトグラムは Fig.13 の通りであった。すなわち 37°C に放置した CEC 溶液から solvent A にて 5種の spot が検出され、そのうち 1つは CEC 原体と思われる、また solvent front 付近に近接して pink と violet の spot が認められた。着色した CEC 溶液の n-butanol 抽出物を solvent B で展開したところ、7種の spot が検出され、うち 1つは CEC 原体と思われる、solvent A では分離できなかった pink と violet の spot が明確に分離確認された。

考 察

新しい cephalosporin 誘導体である CEC の抗菌力 は *Staph. aureus* に対し CET, CER よりやや劣り、

Table 5 Coloration of CEC

Drugs \ pH	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CEC	N	N	P	R	R	P	BY	LBY	LBY
CET	N	N	LBY	LBY	LBY	LBY	LBY	LBY	LBY
CER	N	N	N	N	N	N	LBY	LBY	LBY

N : colorless P : pink R : red BY : brownish yellow LBY : light brownish yellow  
Drugs : 5 μg/ml, at 37°C, for 48 h.

Fig. 12 Spectrum of CEC

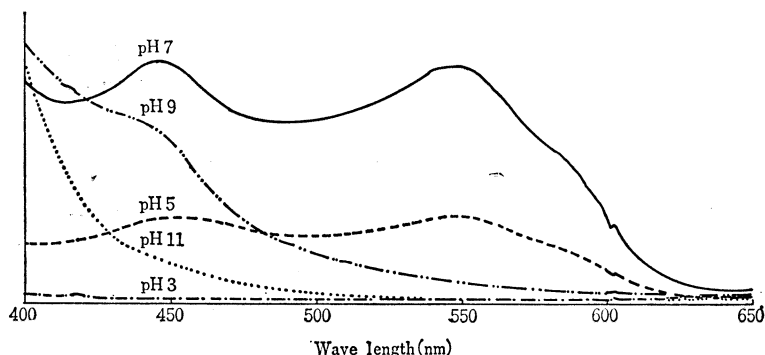
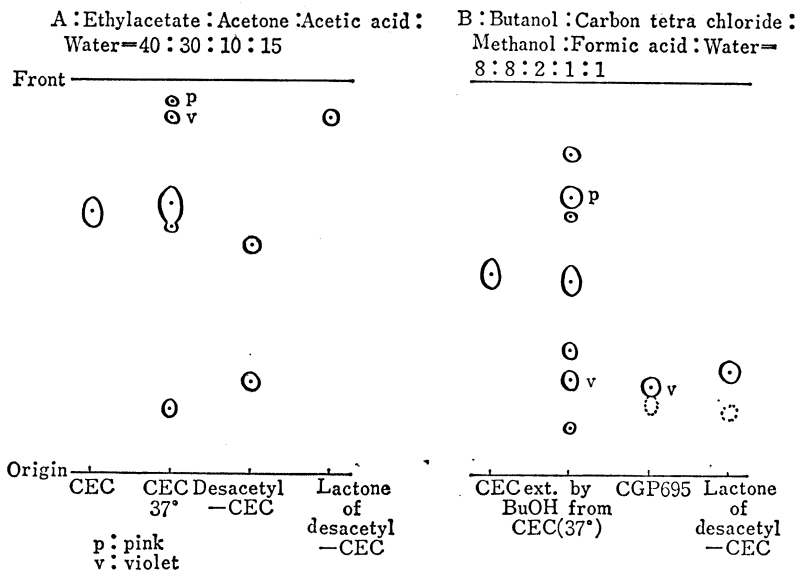


Fig. 13 TLC of CEC



CEG, CEX より優れており、他の菌種に対しては特に他の cephalosporin 誘導体と差異は認められなかった。

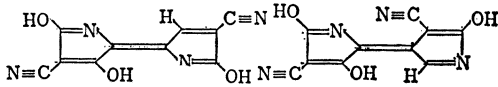
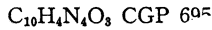
CEC は *Staph. aureus* に対しほぼ完全な殺菌作用を示し、CET と同様に24時間後にも菌の増殖は認められなかったが、*E. coli* の場合は添加後十数時間後に再び菌の増殖が認められた。しかし CET では数時間後からすでに増殖が認められるので、CET より CEC の方が殺菌力は優れているものと思われる。

CEC は CEG<sup>1)</sup>などと同様に酸性側で抗菌力が増加し、アルカリ側では抗菌力が低下した。これはアルカリ側で不安定であるためと思われる、事実 CEC のアルカリ性溶液では抗菌力の低下は著しかった。37°C に放置した場合、pH の如何にかかわらず CET より抗菌力の低下が著しく、CEC 溶液は CET 溶液に比して、温度、pH に敏感であると思われる。しかし 4°C、pH7 の条

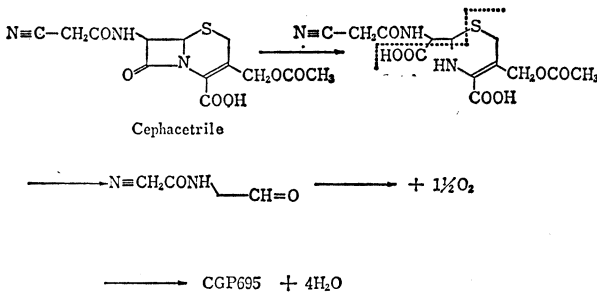
件下では CEC、CET の間に大差なく、むしろやや CEC の方が安定であった。

CEC 溶液は抗菌活性の低下のみならず、37~40°C に放置すると赤紫色に着色するが、これは温度、pH に左右され、4°C、中性ならば1週間後も無色であり、抗菌力の点と合わせて CEC 溶液は冷蔵庫中に保存すべきものとする。cephalosporin 誘導体の着色については MARRELLI<sup>2)</sup>が CEX などがアルカリ性でアセトン存在下にて 100°C に加熱すると赤色を呈すると報告しており、CEC の着色については MEYER-BRUNOT ら<sup>3)</sup>は酸素の存在下で尿中や buffer 中で赤紫色となり、中性、加温、 $\beta$ -lactamase の添加などによって促進され、その着色物質は次式のような化学構造を有すると報告している。著者らはこれを確認するため TLC による分離を試みた。その結果、CEC の着色溶液中に MEYER-BRUNOT





らのいう CGP 695 の Rf とほぼ一致する紫色の spot を見出したが、それ以外にもう 1 つ明らかに Rf が異なり、別の物質と思われる pink の spot を認めた。こうしたことから著者らは CEC に由来する着色物質は CGP 695 1 種ではなく、少なくとも 2 種存在し、したがって次図の CGP 695 生成経路以外の経路も存在するものと思われ、これについては今後さらに検討する予定である。



## 結 論

著者らは新しい cephalosporin 誘導体である CEC について基礎的、細菌学的検討を行い、つぎのような成績を得た。

1) *Staph. aureus* の CEC に対する MIC 分布は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  に peak があり、CET, CER より 1~2 管高く、CEG, CEX より 2~3 管低いパターンを示した。*E. coli* の MIC 分布は  $12.5 \mu\text{g/ml}$  に peak があり、CET, CEX とほぼ同じパターンを示した。*Klebsiella* の場合は  $12.5 \mu\text{g/ml}$  に peak があり、CET など他の cephalosporin 誘導体より 1~2 管高い感受性を示し、*Enterobacter*, *Proteus inconstans*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*, *V. parahaemolyticus* の MIC 分布は CET とほぼ同じパターンを示し、前 4 者

は使用菌株すべてが  $100 \mu\text{g/ml}$  以上であった。*Proteus mirabilis* の MIC は CET よりやや高く、CER, CEG とほぼ同じ  $25 \mu\text{g/ml}$  であった。

2) CEC と他の cephalosporin 誘導体との間に交叉耐性が認められた。

3) CEC の *Staph. aureus* に対する抗菌力は接種菌量の影響を受けないが、*E. coli* の場合は接種菌量が減少すると抗菌力が増大した。

4) CEC の抗菌力は培地 pH が酸性側で増加し、アルカリ側で低下した。

5) CEC は *Staph. aureus* および *E. coli* に対し殺菌的に作用したが、*E. coli* では 20 時間後から生存菌の増殖が認められた。

6) CEC 溶液はアルカリおよび温度に対し不安定であり、また  $4^\circ\text{C}$  に放置した場合は着色は認められなかったが、 $37^\circ\text{C}$  中性付近で赤紫色の着色がみられた。したがって CEC 溶液の保存は  $4^\circ\text{C}$ 、中性付近で行うべきであると考ええる。なお、CEC 溶液の着色物質には 2 種類あるものと推定された。

この実験に用いた CEC は武田薬品工業株式会社および日本タバコガイギー株式会社から提供されたものである。

最後に常に御助言下さった東邦大学医学部 桑原章吾教授、および実験に協力して下さいました昭和薬科大学 平瀬都子氏に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) 中沢昭三, 他: 経口用合成 cephalosporin "Cephaloglycin" に関する細菌学的研究. *Chemotherapy* 18: 9~14, 1970
- 2) MARRELLI L. P.: Colorimetric estimation of Cephalexin, Cephaloglycin and related compounds. *J. Pharm. Sci.* 61: 1647~1648, 1972
- 3) MEYER-BRUNOT H. G. *et al.*: Studies of the formation of a violet-reddish pigment from the cephalosporin derivative Celospor (C 36, 278-Ba). *Chemotherapy (Basel)* 20: 6~17, 1974

## BASIC STUDIES ON CEPHACETRILE

TAKETOSHI ARAI and ISAMU INOUE

Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences

The basic and bacteriological studies on Cephacetrile (CEC) were performed in comparison with the other cephalosporin derivatives, and the following results were obtained.

1) The sensitivities of 94% of test strains of *Staph. aureus* were below 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mean MIC of CEC tends to be greater than that of CET, CER, smaller than CEG and CEX.

The MIC of 64% of test strains of *E. coli* was 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 27% was 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 9% was 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and these sensitivity pattern were similar to that of CET.

The sensitivities of 93% of test strains of *Klebsiella* were below 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The sensitivities of 92% of test strains of *Enterobacter cloacae* were above 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and nearly the same as CET, CER, CEG and CEX.

The sensitivities of 5 strains of *Proteus mirabilis* were 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mean MIC of CEC tends to be greater than CET, and nearly the same as CER and CEG.

The sensitivity distribution curve of *Vibrio parahaemolyticus* showed similar pattern as that of CET, CER and CEG. The sensitivities of *Proteus inconstans*, *Proteus rettgeri*, *Proteus morgani* and *Pseud. aeruginosa* were above 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and the same as other cephalosporin derivatives.

2) Cross resistance was observed between CEC and other cephalosporin derivatives.

3) The changes in inoculum size of *Staph. aureus* did not show any influence on antibacterial activity of CEC. The antibacterial activity of CEC to *E. coli* showed definite increase with the decrease in inoculum size.

4) The antibacterial activity of CEC to *Staph. aureus* and *E. coli* showed to be more potent at the acid side, and to be less potent at the alkaline side of culture medium pH.

5) CEC showed a considerably high bactericidal action against *Staph. aureus* and *E. coli*.

6) The antibacterial activity of CEC showed a remarkably decrease in the alkaline solution.

7) CEC solution showed red colorization in the neutral, and yellow in the alkaline side, but none in the acid at 37~40°C.

8) In the colored substance which was extracted by butanol from the colored solution of CEC, two spots of pink and violet color were observed on the plate of TLC.