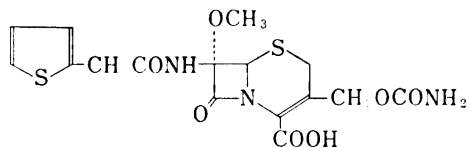


新セフェマイシン系抗生物質 Cefoxitin の細菌学的評価

宋 孟・中峰正行・長田恭明・小河秀正
第一製薬研究所

Cefoxitin は、米国 Merck 社研究所で発見され、開発された新しいセフェマイシン系抗生物質で、その化学式 (Fig. 1) から明らかなように、ラクタム環の 7 α 位にメトキシ基が結合しているのが、他の β -ラクタム系抗生物質にない特徴である。本物質は、グラム陰性菌および陽性菌にすぐれた殺菌的抗菌効果を示し、とくに、上述の 7 α -メトキシ結合が理由のひとつとなって、これら細菌の産生する β -ラクタマーゼに対して、他の β -ラクタム系抗生物質よりも抵抗性が高く、このことが活性面での特徴のひとつであると報告されている¹⁾⁴⁾。

Fig. 1 Chemical structure of cefoxitin



3-carbamoyloxymethyl-7 α -methoxy-7-[2-(2-thienyl)-acetamido]-3-cephem-4-carboxylic acid

近年、 β -ラクタム系抗生物質 (主としてペニシリン系、セファロスポリン系抗生物質) の発展はめざましく、数多くのすぐれた合成、半合成化合物が開発されてきており、従来この系統の抗生物質の弱点とされていた *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* および *Pseudomonas aeruginosa* などに対する抗菌活性も、現在では、ほぼ満足すべき力を発揮するものが次々と報告されている。反面、これらに対する耐性菌の出現も数多く報告され、これら耐性菌対策も重要な課題のひとつであるとされている。現在、 β -ラクタム系抗生物質に対する耐性機構については、多くの基礎検討がなされているが、そのうちでも耐性菌と β -ラクタマーゼとの関連については早くから議論され、現在では、本酵素は耐性機構の一部として、大きな役割を果していることが認められている。

この観点から、Cefoxitin は新しい型の β -ラクタム系抗生物質として、その有用性が期待されるが、今回はその有用性評価の一環として、*in vitro* および *in vivo* での抗菌力評価を行ない、すぐれた抗菌活性をみとめたので、以下にその成績を報告する。

なお、本研究は昭和 50 年 1 月から 12 月にかけて実施したものである。

I. 実験材料および方法

使用菌株：抗菌スペクトルの検討には、Table 1 および 2 に示す当研究室保存のグラム陰性菌 26 菌種 27 株およびグラム陽性菌 8 菌種 9 株の計 34 菌種 36 株を用いた。

臨床分離株の感受性測定には、*Escherichia coli* 126 株、*Citrobacter* spp. 30 株、*Shigella* spp. 75 株、*Klebsiella* spp. 147 株、*Proteus vulgaris* 74 株、*Pr. mirabilis* 29 株、*Pr. inconstans* 11 株、*Pr. mirabilis* 135 株、*Serratia marcescens* 105 株、*Enterobacter cloacae* 40 株、*Pseudomonas aeruginosa* 25 株、*Staphylococcus aureus* 141 株および *Staph. epidermidis* 41 株の計 942 株を用いた。

抗菌活性におよぼす諸因子の影響検討には、*E. coli*, NIH JC-2 および *Staph. aureus*, 209P JC を用いた。とくに、培地 pH の影響については *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Ser. marcescens* および *Staph. aureus* の臨床分離株各 25 株を用いて検討を加えた。

試験管内耐性獲得試験には、*E. coli*, NIHJ, *Pr. vulgaris*, 3167, *Pr. mirabilis*, 1287 および *Staph. aureus*, 209P を、マウス感染防禦試験には、*E. coli*, NIHJ, *Pr. vulgaris*, 4027, *Pr. mirabilis*, IFO-3849 および *Staph. aureus*, E-46 を用いた。

各菌株は、凍結乾燥アンブル、あるいは保存培地から再分離し、S 型集落であることを確認して実験に供した。

使用薬剤：Sodium cefoxitin (CFX; Merck Sharp and Dohme Research Laboratories), Sodium cefazolin (CEZ; 藤沢薬品), Sodium cephalothin, Cephaloglycin (CET, CEG; 塩野義製薬), Cephaloridine, Cephalixin (CER, CEX; 鳥居薬品), Aminobenzyl penicillin (AB-PC; 明治製薬) および Streptomycin sulfate (SM; 協和醗酵) を用いた。

各薬剤は、使用直前に滅菌蒸留水あるいはリン酸緩衝生理食塩水で溶解した。

薬剤感受性測定法：各菌株の薬剤感受性は、化学療法学会標準法⁵⁾に従い、ハートインフュージョン寒天培地 (栄研) を用いた平板希釈法により測定した。すなわち、各菌株のトリプトソイブイオン (TB; 栄研), 37°C, 1 夜培養菌液およびその 100 倍希釈菌液の 1 白金耳を各薬剤含有平板に接種し、37°C, 18 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC; $\mu\text{g/ml}$) を測定した。

抗菌活性におよぼす諸因子の検討法：抗菌力におよぼ

す培地の pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について, 被検菌の前培養に TB を, 感受性測定にハートインフュージョンブイヨン (HIB; 栄研) を用いた液体希釈法によって検討した。各薬剤の種々の条件下での MIC ($\mu\text{g/ml}$) は, 37°C , 18時間培養後, 肉眼的に発育濁度のみとめられない最小濃度とした。

培地 pH の抗菌力におよぼす影響は, pH を 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 および 9.0 に調整した培地での MIC の変動を, 馬血清添加の影響は, 馬血清を 50%, 25%, 10% の割合に含む培地での MIC 変動を, また, 接種菌量による影響については, 被検菌株の培地中での菌量を 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 および 5×10^8 cells/ml とした 10 倍希釈系列での MIC の変動をそれぞれ検討した。

血清タンパク結合率測定法: ヒト, ウマおよびラットの新鮮血清 4.5 ml に, 各薬剤の pH 7.0, 1/15 M リン

酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 ($250 \mu\text{g/ml}$) の 0.5 ml を添加混和し, 37°C , 1 時間静置後, ビスキングチューブを用いて限外濾過し, その濾液中の残存活性を被検菌に *Staph. aureus*, MB 2786 株を用いたカップ法⁶⁾ により測定した。タンパク結合率 (R) は, 同様の処理を行った PBS 溶液を対照として, その活性 (A) と各血清濾液中の残存活性 (B) から, 以下の式により求めた。

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100 (\%)$$

試験管内耐性獲得試験法: 各菌株を HIB で 37°C , 1 夜培養後, 同新鮮培地で 10 倍希釈菌液 ($10^7 \sim 10^8$ cells/ml) とし, その 2 ml を各薬剤の蒸留水溶液添加 HIB および無添加 HIB (対照) の 0.5 ml に接種して, 37°C , 18 時間培養した。各薬剤の MIC は, 肉眼的に発育濁度のみとめられない最小濃度とした。次次接種菌液

Table 1 Antibacterial spectrum of CFX against gram-negative bacteria

Test strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*						
	Antibiotics						
	CFX	CEZ	CET	CER	CEX	CEG	ABPC
<i>E. coli</i> , NIHJ**	1.56	3.13	1.56	6.25	6.25	12.5	0.78
<i>C. freundii</i> , IID 976	100	50	25	100	100	50	12.5
<i>S. flexneri</i> 2 a, 5503	6.25	3.13	12.5	6.25	12.5	25	0.78
<i>S. sonnei</i> , I	3.13	1.56	6.25	3.13	6.25	25	3.13
<i>S. dysenteriae</i> 3, 87-3	25	3.13	25	6.25	12.5	25	6.25
<i>Sal. typhimurium</i> , W 118	3.13	1.56	6.25	3.13	6.25	12.5	6.25
<i>Sal. enteritidis</i> , IID 604	1.56	1.56	1.56	3.13	6.25	6.25	1.56
<i>Kleb. pneumoniae</i> , Type I	6.25	3.13	12.5	6.25	12.5	25	>100
<i>Kleb. pneumoniae</i> , Type II	12.5	3.13	25	6.25	12.5	50	6.25
<i>Pr. vulgaris</i> , 4027**	3.13	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pr. mirabilis</i> , IFO 3849**	6.25	6.25	12.5	6.25	50	25	6.25
<i>Ser. marcescens</i> , 13014	25	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ent. cloacae</i> , 12025**	6.25	>100	25	6.25	12.5	>100	3.13
<i>Ent. aerogenes</i> , ATCC 8329	>100	25	>100	>100	100	25	12.5
<i>H. alvei</i> , IID 978	6.25	>100	>100	>100	100	>100	25
<i>V. parahaemolyticus</i> , T 5533	6.25	>100	6.25	3.13	12.5	>100	12.5
<i>Y. enterocolitica</i> , Te 591	25	50	>100	25	>100	>100	50
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , PST-III	0.78	0.78	1.56	0.78	3.13	3.13	≤ 0.2
<i>Ps. multocida</i> , 212	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	0.39	1.56	1.56	≤ 0.2
<i>Ps. aeruginosa</i> , No. 15	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ps. cepacia</i> , IID 1340	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ps. putida</i> , IID 5121	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ps. maltophilia</i> , IID 1275	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ach. xylooxidans</i> , ATCC 27061	>100	100	50	>100	>100	>100	12.5
<i>Aci. anitratus</i> , ATCC 19606	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>A. faecalis</i> , ATCC 19108	0.39	12.5	0.78	3.13	3.13	6.25	0.39
<i>F. meningosepticum</i> , ATCC 13253	25	>100	>100	100	>100	>100	100

* Inoculum size: One loopful of 1/100 dilution of an overnight culture at 37°C

** These strains were used for protection test in mice.

Table 2 Antibacterial spectrum of CFX against gram-positive bacteria

Test strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*						
	Antibiotics						
	CFX	CEZ	CET	CER	CEX	CEG	ABPC
<i>Staph. aureus</i> , 209P	3.13	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	1.56	12.5	≤ 0.2
<i>Staph. aureus</i> , E-46**	1.56	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	1.56	12.5	≤ 0.2
<i>Staph. epidermidis</i> , 7035	1.56	0.39	≤ 0.2	≤ 0.2	0.39	12.5	0.39
<i>Str. pyogenes</i> , G-36	0.39	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2
<i>Str. faecalis</i> , ATCC 19433	>100	25	25	6.25	100	100	0.78
<i>Str. pneumoniae</i> , DP-1	0.78	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	3.13	0.78	≤ 0.2
<i>Cory. kutscheri</i> , ON-1	12.5	1.56	0.78	≤ 0.2	6.25	12.5	1.56
<i>Micra. luteus</i> , ATCC 9341	0.39	0.78	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	0.39	0.78
<i>B. subtilis</i> , ATCC 6633	≤ 0.2	0.39	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2	25	≤ 0.2

* Inoculum size: One loopful of 1/100 dilution of an overnight culture at 37°C

** This strain was used for protection test in mice.

は、対照と同等の発育を示した薬剤添加菌液を HIB で 100 倍希釈したものを用いた。以後同様に 10 代継代を行い、MIC の変動から被検菌の耐性獲得性を検討した。

マウス感染防禦試験法: 各菌株をペナセ寒天培地 (ペナセブイオン, Difco に寒天を 1.5% の割合に添加したもので、37°C, 18 時間培養して得た新鮮菌苔を、リン酸緩衝生理食塩水 (日本製薬) に平等浮遊し、それぞれ 100 LD₅₀ になるように希釈したものを接種菌液とした。

動物は、STD-ddY 系あるいは Slc-ICR 系マウス (静岡実験動物), 雄, 体重 19~22 g を 1 群 10 匹として用い、上記菌液の 0.2 ml を腹腔内接種した。感染直後および 6 時間後に、CFX, CEZ および CET の滅菌蒸留水溶液を、それぞれ尾静脈内投与した。各薬剤の感染防禦効果は、感染後 1 週間目の生存率から LITCHFIELD-WILCOXON 法あるいは BEHRES-KÄRBER 法により求めた ED₅₀ 値で示した。

II. 実験成績

抗菌スペクトル: グラム陰性および陽性菌の保存菌株に対する試験管内抗菌力は、Table 1 (13 頁) および Table 2 に示した。

CFX は他の既知セファロsporin 系抗生物質および ABPC と同様、グラム陰性菌および陽性菌に広い抗菌スペクトルを示した。とくに、CFX は他の薬剤に耐性の *Pr. vulgaris*, *Ser. marcescens*, *Hafnia alvei* および *Flavobacterium meningosepticum* に対して比較的高い抗菌力を示した。しかし、CFX は、CEZ, CEG および ABPC に感受性の *Ent. aerogenes*, および ABPC に高い感受性を示す *Achromobacter xylosoxydans* および *Streptococcus faecalis* に対しては抗菌力を示さなかった。また、CFX は他の β -ラクタム系抗生物質と同様

に、*Pseudomonas* 属および *Acinetobacter anitratus* に対しても抗菌力を示さなかった。

各薬剤の供試 36 菌株に対する抗菌力を、MIC; ≤ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ を 10 点, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ を 9 点, 0.78 $\mu\text{g/ml}$ を 8 点, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を 7 点, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を 6 点, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ を 5 点, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ を 4 点, 25 $\mu\text{g/ml}$ を 3 点, 50 $\mu\text{g/ml}$ を 2 点, 100 $\mu\text{g/ml}$ を 1 点, >100 $\mu\text{g/ml}$ を 0 点として点数化し、グラム陰性菌および陽性菌に対する総点数を Table 3 に示した。

Table 3 Antimicrobial scores of antibiotics for the laboratory strains

Antibiotics	Total scores ^{a)}	
	Gram-negatives (27 strains)	Gram-positives (9 strains)
CFX	107	60
CEZ	86	76
CET	80	81
CER	87	85
CEX	68	65
CEG	53	47
ABPC	105	82

a) The MICs shown in Table 1 were scored as 10 for 0.2 $\mu\text{g/ml}$ or less, 9 for 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 8 for 0.78 $\mu\text{g/ml}$, 7 for 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 6 for 3.13 $\mu\text{g/ml}$, 5 for 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 4 for 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 3 for 25 $\mu\text{g/ml}$, 2 for 50 $\mu\text{g/ml}$, 1 for 100 $\mu\text{g/ml}$, and 0 for more than 100 $\mu\text{g/ml}$.

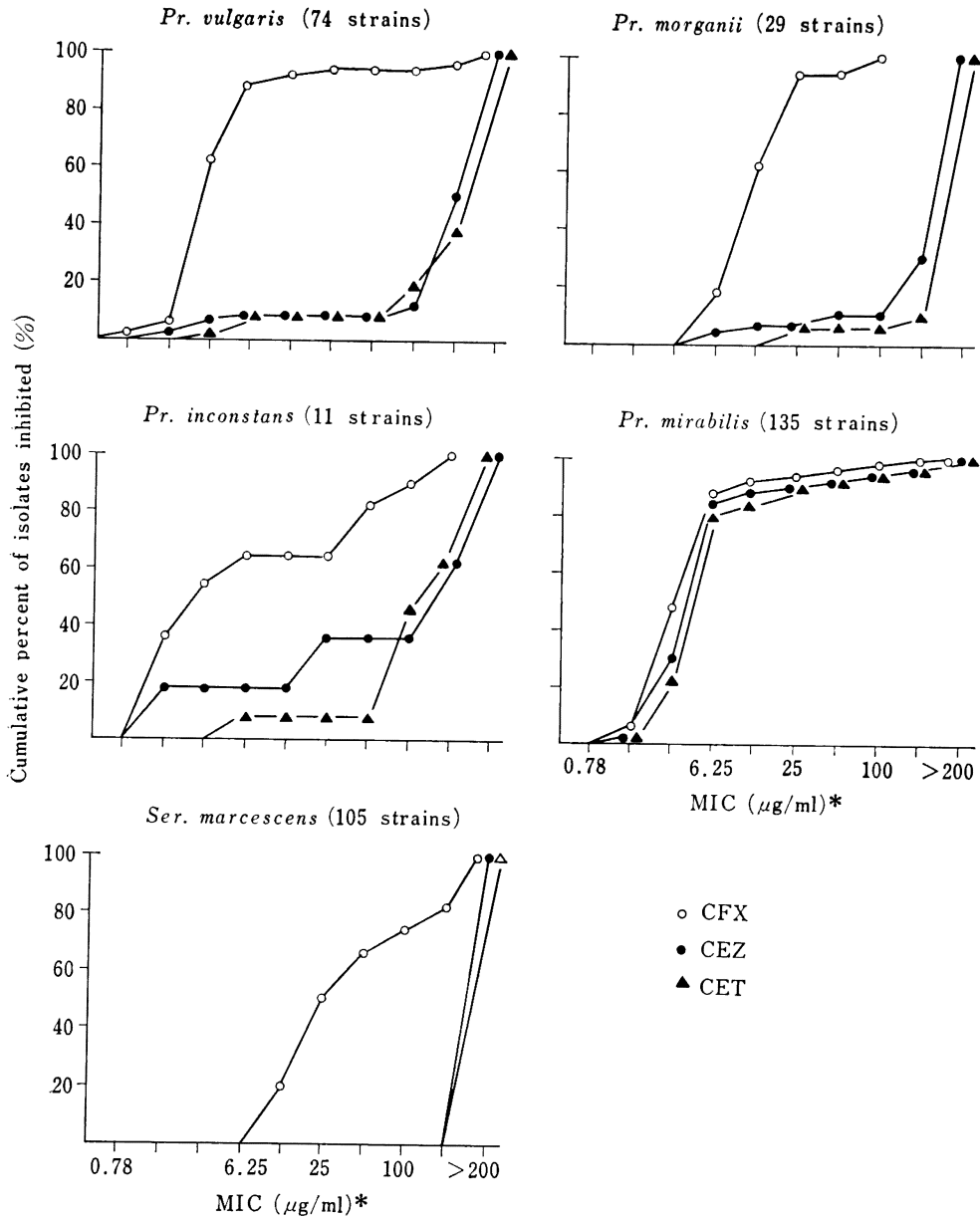
CFX のグラム陰性菌に対する抗菌力は ABPC とほぼ同等で、既知セファロsporin 系抗生物質よりも高いが、グラム陽性菌に対しては、CEG を除く他の薬剤のなかで最も低活性であった。

臨床分離株に対する抗菌力：各臨床分離株に対する CFX, CEZ および CET の抗菌力は、各 MIC を示す菌株数の累積百分率で示した (Figs. 2 ~ 7)。

CFX はインドール陽性 *Proteus* (*Pr. vulgaris*, *Pr. morganii*, *Pr. inconstans*) および *Ser. marcescens* に対し、接種菌量に関係なく、CEZ, CET にくらべすぐれた抗菌力を示した。すなわち、1 夜培養菌液の 1/100 希

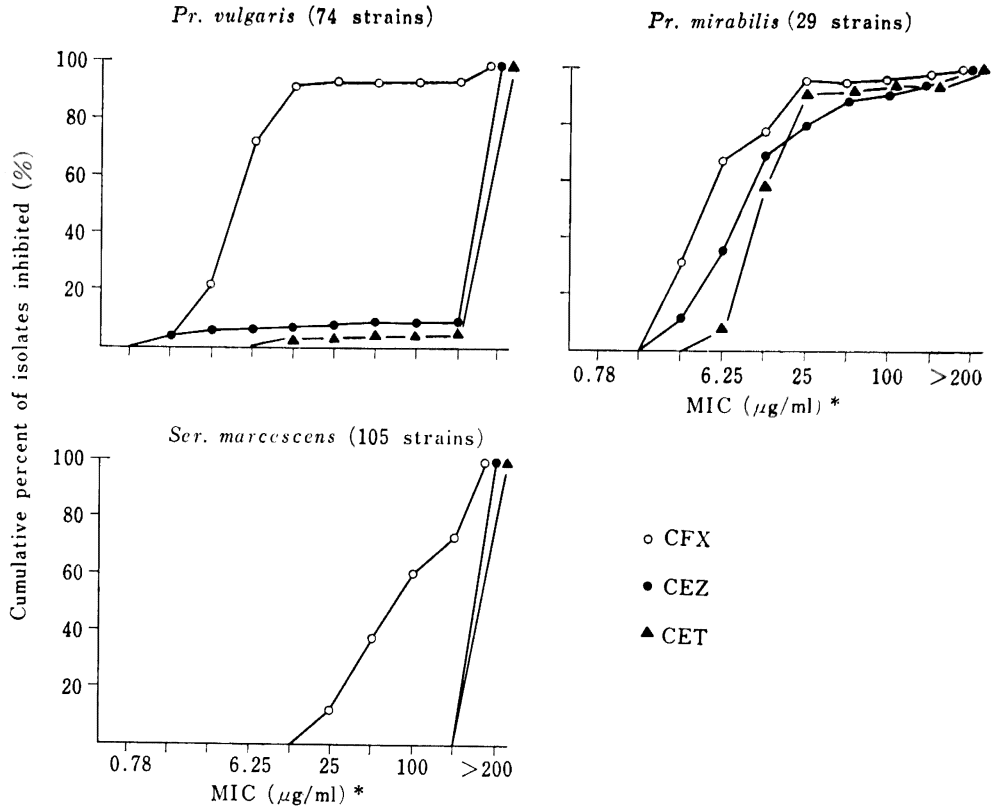
釈液 (低菌量) 接種の場合、CFX は 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、これら *Proteus* 菌株の 60~90% の発育を阻止したが、CEZ および CET は 200 $\mu\text{g/ml}$ でその 10~50% の発育を阻止したのみであった。非希釈液 (高菌量) 接種の場合、CFX の *Pr. vulgaris* に対する抗菌力は前者の場合とほとんど変らなかったが、CEZ および CET は著しく活性が低下し、ほとんどの菌株に対して MIC:

Fig. 2 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET



*Inoculum size: One loopful of 1/100 dilution of an overnight culture at 37°C

Fig. 3 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET



* Inoculum size: One loopful of an overnight culture at 37°C

>200 $\mu\text{g/ml}$ を示した。また、CFXはCEZおよびCETに高度耐性の *Ser. marcescens* に対しても、低菌量接種の場合、50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で約70%、高菌量接種の場合約40%の菌株の発育を阻止した。一方、インドール陰性 *Proteus* (*Pr. mirabilis*) に対しては、低菌量接種の場合、3薬剤ともきわめて高い抗菌活性を示し、薬剤間に差は認められなかった。しかし高菌量接種の場合には、CFXの抗菌力はほとんど変化しなかったが、CEZおよびCETのそれは著しく低下した。

E. coli, *Shigella* および *Klebsiella* に対しては、低菌量接種の場合、CEZが最も高活性で、次いでCFX, CETの順で、これら3菌種に対しては、CEZは1.56~6.25, CFXは1.56~12.5, CETは6.3~12.5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で約80%の菌株の発育を阻止した。しかし、高菌量接種の場合、CEZおよびCETの抗菌力は著しく減弱し、とくに *Shigella* および *Klebsiella* に対する抗菌力は、CFXの方がCEZよりもすぐれていた。

Citrobacter に対しては、低菌量接種の場合CFXが3

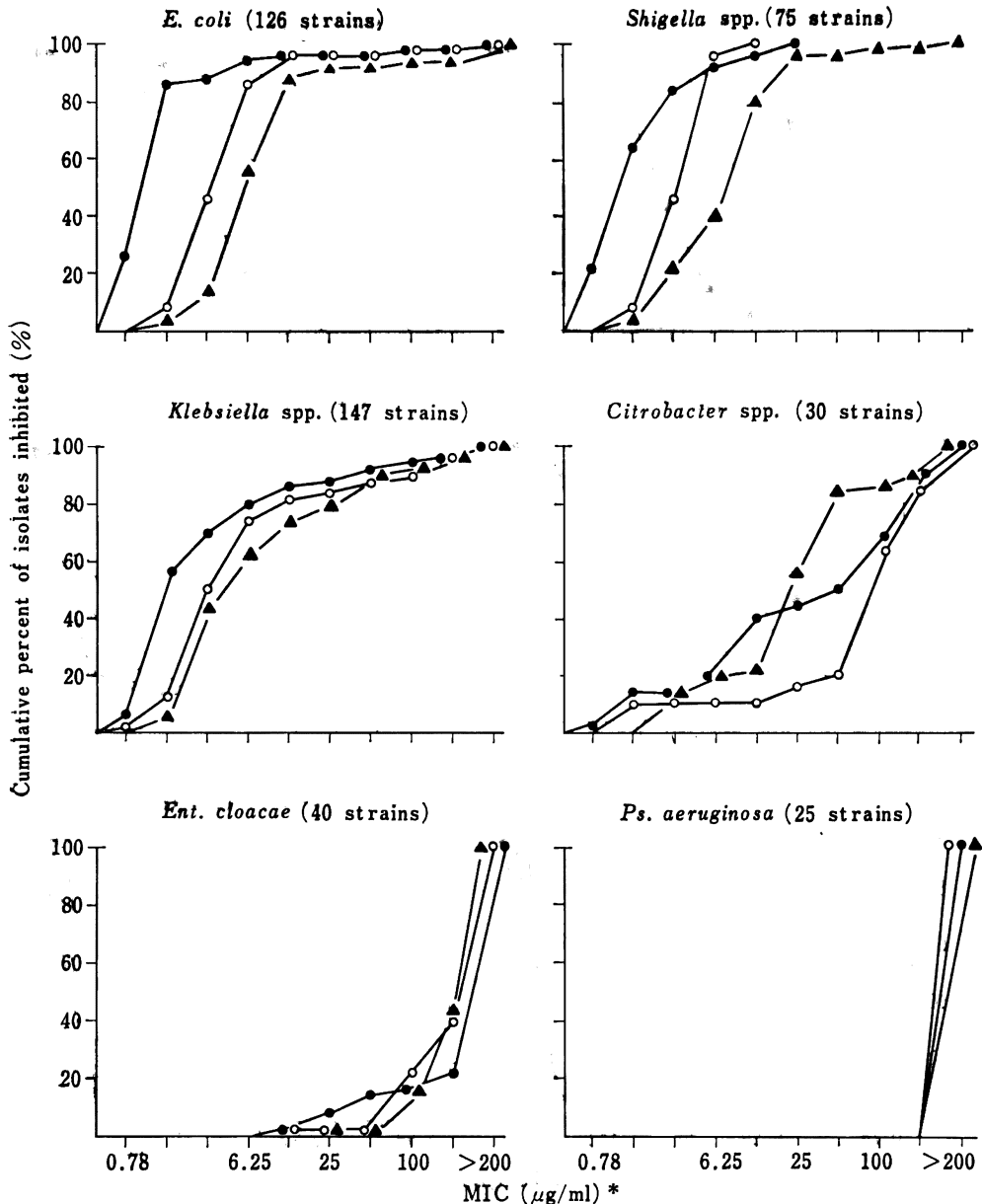
薬剤のうちで最も低活性で、各薬剤の発育阻止率は50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、CFXが20%、CEZは50%およびCETは90%であったが、高菌量接種の場合には、3薬剤の抗菌力にほとんど差はみとめられなかった。

Ent. cloacae は、低菌量接種の場合、ごく少数の菌株が3薬剤に対し感受性を示したが、そのほとんど(約80%)は各薬剤の100 $\mu\text{g/ml}$ に耐性を示した。高菌量接種の場合には、各薬剤ともさらに低活性となり、ほとんど全株が200 $\mu\text{g/ml}$ に耐性を示した。

Ps. aeruginosa に対しては、接種菌量に関係なくいずれの薬剤もまったく抗菌力を示さなかった。

Staph. aureus および *Staph. epidermidis* に対するCFXの抗菌力は接種菌量に関係なく3薬剤のうちで最も低かった。すなわち、低菌量接種の場合、CEZおよびCETが0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で約80~100%の株の発育を阻止したのに対し、CFXの阻止率は10%以下であり、100%阻止には6.25 $\mu\text{g/ml}$ を要した。一方、高菌量接種の場合、各薬剤の抗菌力は低菌量接種時にくらべ、

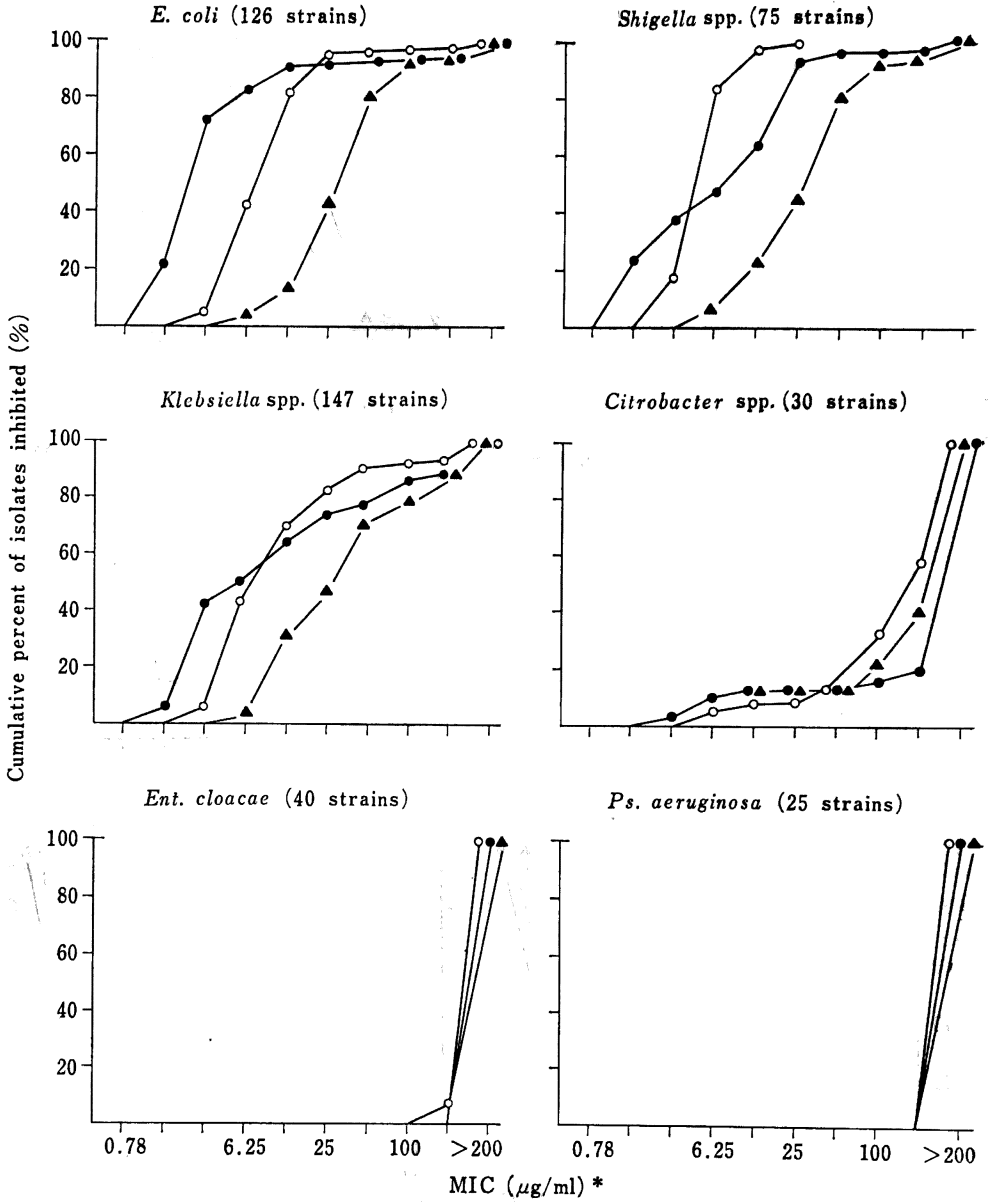
Fig. 4 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET



*Inoculum size: One loopful of 1/100 dilution of an overnight culture at 37°C

○CFX, ●CEZ, ▲CET

Fig. 5 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET



*Inoculum size: One loopful of an overnight culture at 37°C

○CFX, ●CEZ, ▲CET

Fig. 6 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET

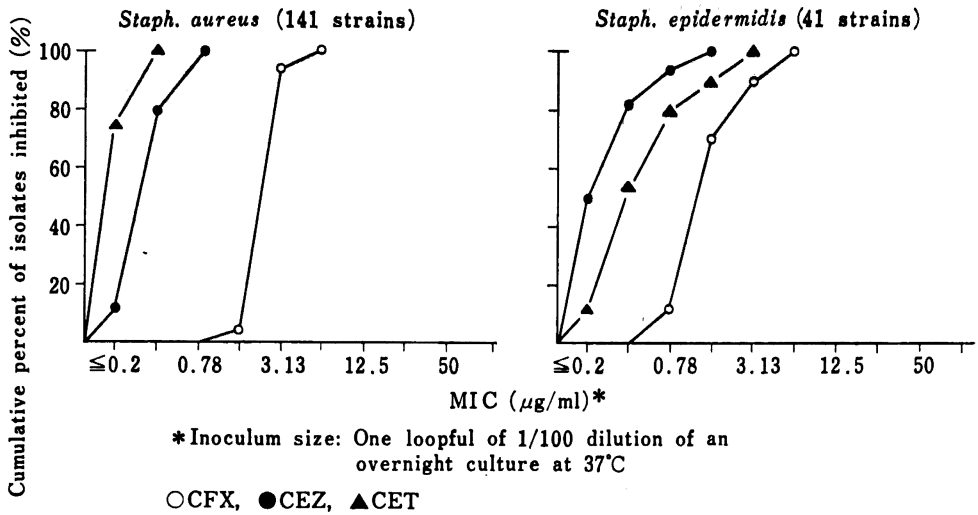
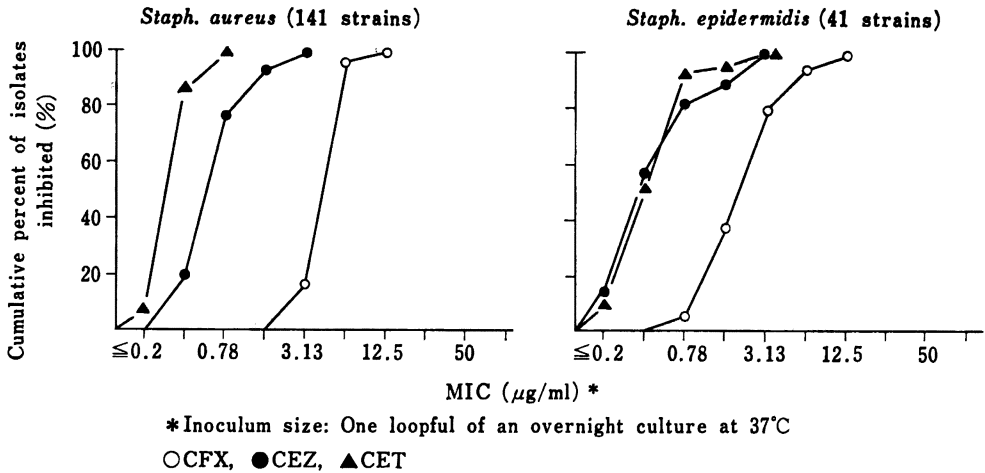


Fig. 7 Comparative susceptibility of clinical isolates to CFX, CEZ and CET



やや減弱する傾向がみられたが、その抗菌パターンにはほとんど変化がみられなかった。

抗菌力におよぼす諸因子の影響：CFX, CEZ および CET の試験管内抗菌力におよぼす培地 pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について検討した (Table 4)。

培地 pH の影響についての検討では、CFX は *E. coli* に対し、CEZ および CET と異なり、アルカリ側で抗菌力の増強を示し、*Staph. aureus* に対しては、他の 2 薬剤と同様に酸性側で抗菌力の増強を示した。加えて、培地 pH が CFX の抗菌力におよぼす影響について、*E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Ser. marcescens* および *Staph. aureus* の臨床分離株各 25 株を用いて詳細に検討した結

果、Fig. 8 に示すように、CFX はグラム陰性菌群に対してはアルカリ側で抗菌力の増強を、また *Staph. aureus* に対しては酸性側で抗菌力の増強を示すことが確認された。

馬血清添加による影響については、CFX の抗菌力はまったく影響を受けなかったが、CEZ および CET では血清添加率の増大に伴う抗菌力の減弱がみられた。

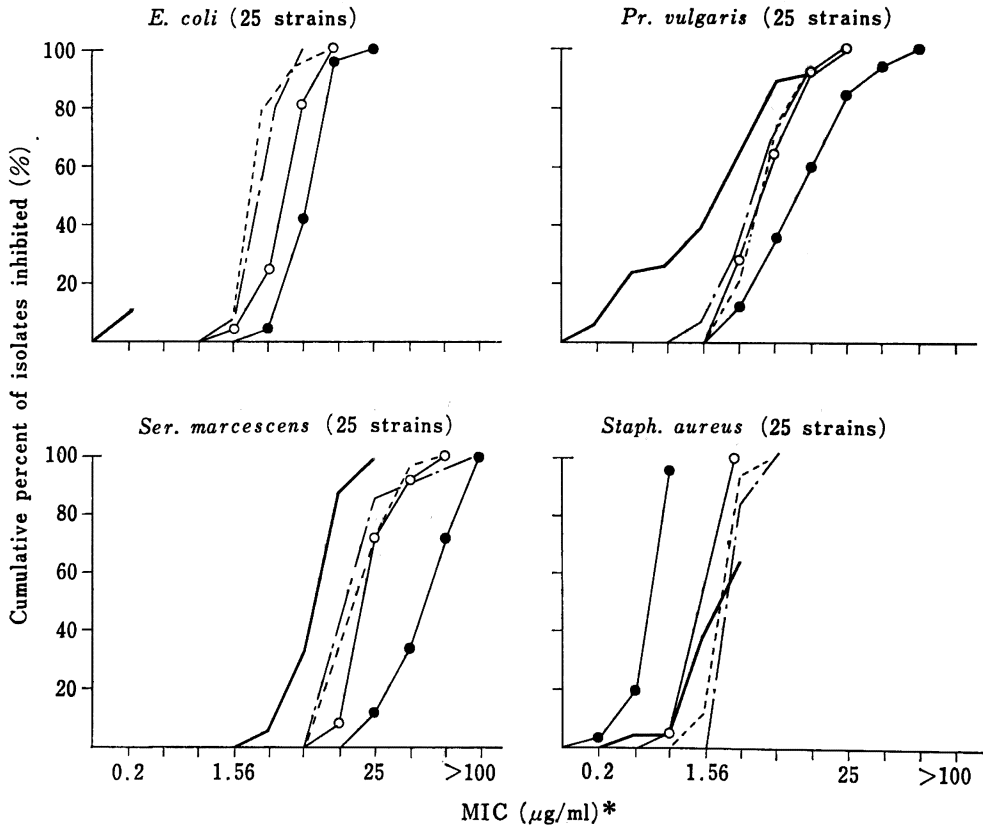
また、接種菌量の影響については、各薬剤の *E. coli* に対する抗菌力は、菌量の増大に伴って減弱する傾向がみられたが、その傾向は、CEZ および CET が CFX よりも大であった。一方、*Staph. aureus* に対する抗菌力は、各薬剤とも接種菌量による影響を受けなかった。

Table 4 Effect of various factors on the antibacterial activity of CFX, CEZ and CET

Factors	<i>E. coli</i> , NIH JC-2			<i>Staph. aureus</i> , 209P JC			
	CFX	CEZ	CET	CFX	CEZ	CET	
pH	5.0	12.5	1.56	6.25	—	—	—
	6.0	6.25	3.13	6.25	0.78	0.05	0.05
	7.0	6.25	3.13	12.5	1.56	0.1	0.1
	8.0	3.13	6.25	25	1.56	0.1	0.1
	9.0	0.78	12.5	50	1.56	0.1	0.2
Horse serum (%)	0	6.25	3.13	12.5	1.56	0.1	0.1
	10	6.25	3.13	25	1.56	0.2	0.2
	25	6.25	3.13	25	1.56	0.2	0.39
	50	6.25	6.25	50	1.56	0.39	0.78
Inoculum size (cells/ml)	5×10^4	3.13	1.56	6.25	1.56	0.2	0.2
	5×10^5	6.25	3.13	12.5	1.56	0.2	0.2
	5×10^6	6.25	3.13	25	1.56	0.2	0.2
	5×10^7	6.25	6.25	25	1.56	0.2	0.2
	5×10^8	12.5	50	50	1.56	0.2	0.2

Test medium: Heart infusion broth; MIC: $\mu\text{g/ml}$

Fig. 8 Effect of pH on antimicrobial activity of CFX



*Inoculum size: One loopful of 1/100 dilution of an overnight culture at 37°C

—●— pH 5, —○— pH 6, —●— pH 7, —○— pH 8, —●— pH 9

血清タンパク結合率: CFX, CEZ および CET のヒト, ウマおよびラット血清タンパク結合率は, Table 5 に示すように, 各薬剤ともヒト血清タンパク結合率が最も大で, 次いでラット血清, ウマ血清の順であったが, いずれの血清タンパクに対しても, CFX の結合率は, CEZ および CET のそれよりも小であった。

Table 5 Serum protein-binding rate of CFX, CEZ and CET

Antibiotics	Serum sources		
	Human	Horse	Rat
CFX	69.4	23.0	35.0
CEZ	94.4	43.5	70.0
CET	80.4	36.5	82.0

Protein-binding (%)

The test was performed by centrifugal ultrafiltration technique.

試験管内耐性獲得: 被検菌株の CFX, CEZ, CET, ABPC および SM に対する試験管内耐性獲得性は, 薬剤含有培地で 10 代増量継代し, その間の MIC の上昇を指標として検討し, その成績を Fig. 9 に一括して図示した。

E. coli, NIHJ は, SM および CET に対して急速な耐性上昇を示したが, CFX, CEZ および ABPC に対しては 10 代継代中にほとんど耐性獲得を示さないか, 獲得しても, 前述の 2 薬剤にくらべると, その程度はわず

かであった, すなわち, SM および CET に対する MIC は継代ごとに直線的に上昇し, SM は 6 代目で初代の 512 倍以上, CET は 10 代目で初代の 128 倍の耐性度の上昇がみとめられたのに対し, CFX の MIC は 2 代目で 1.56 $\mu\text{g/ml}$ から 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に上昇したものの, その後の耐性上昇はみられなかった。この傾向は, CEZ および ABPC でも同様であった。

Pr. vulgaris, 3167 は, CEZ, CET および ABPC に対して初代からそれぞれ MIC; 800, 200, 800 $\mu\text{g/ml}$ の高度耐性を示したが, 薬剤増量継代によって更に耐性が上昇し, 2~4 代目で MIC; 3,200 $\mu\text{g/ml}$, あるいはそれ以上の高度耐性を獲得した。しかし, CFX に対しては, 10 代継代の範囲ではほとんど耐性獲得がみられなかった。

Pr. mirabilis, 1287 は, いずれの薬剤に対しても著明な耐性獲得を示さず, CFX, CEZ, CET および ABPC に対しては, むしろ 2~3 代目で感受性の上昇を示した。

Staph. aureus, 209 P は, SM に対して継代ごとに耐性を獲得し, 9 代目には MIC; 800 $\mu\text{g/ml}$ に達した。しかし, CFX および CET に対しては, 継代期間中まったく耐性上昇がみられず, また, CEZ および ABPC に対する耐性獲得も 1~2 管であり, これら薬剤に対する本菌の耐性獲得性は低かった。

マウス感染防禦効果: CFX, CEZ および CET のマウス感染防禦効果を Table 6 に示した。

CFX は *E. coli* 感染に対して使用したマウスの系統

Table 6 Protective effect of CFX, CEZ and CET on experimental i.p.^{a)} infection in mice

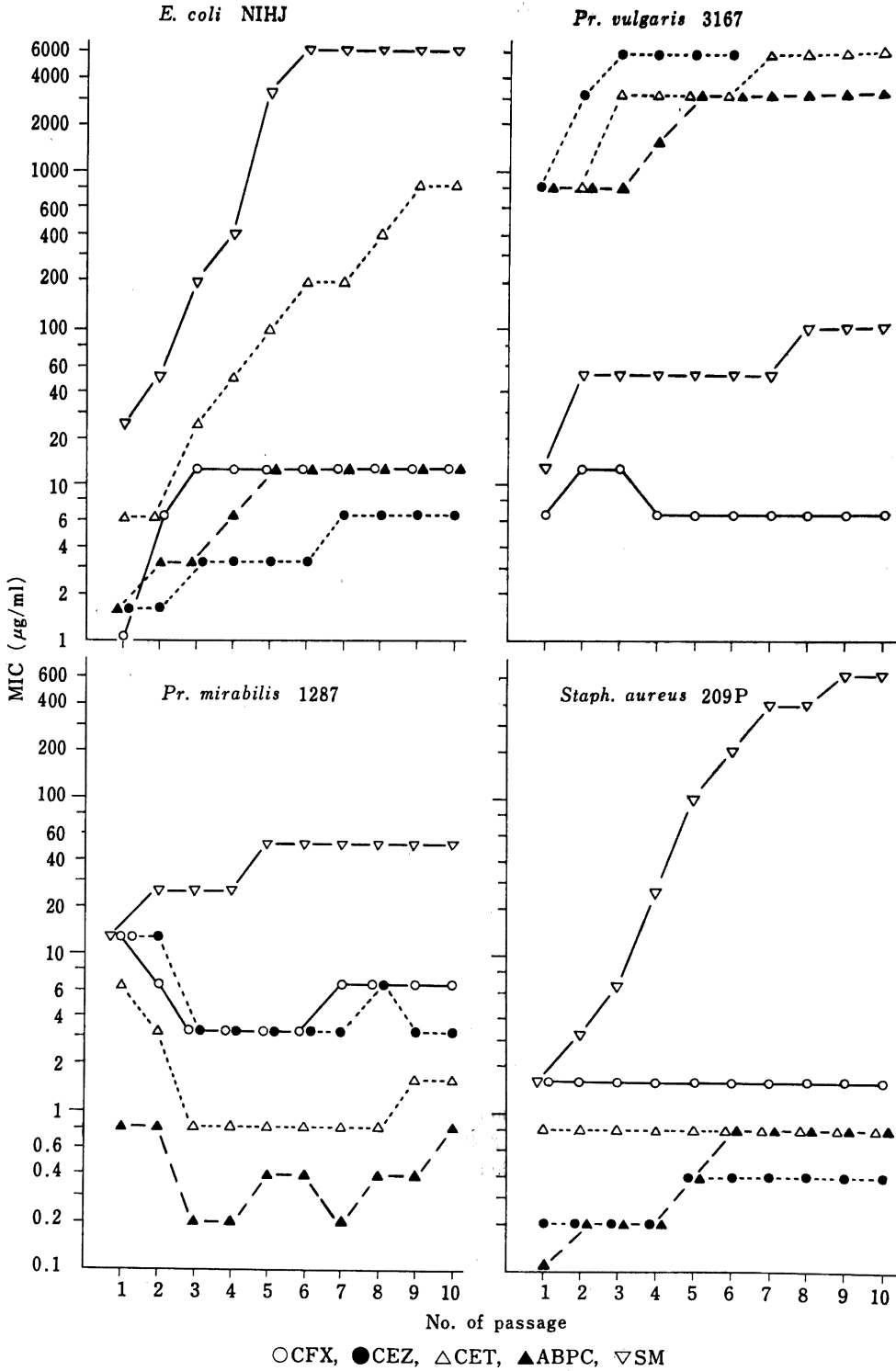
Mice strains	Test organisms	Inoculum size (log/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse) × 2 i.v. doses ^{b)} of		
			CFX	CEZ	CET
Std-ddY	<i>E. coli</i> , NIHJ	8.55 (100 LD ₅₀)	0.71 (0.51-0.99)	1.02 (0.70-1.49)	3.16 (1.71-5.85)
		8.59 (100 LD ₅₀)	2.08*	3.90 (2.89-5.27)	6.05 (4.81-8.78)
	<i>Pr. mirabilis</i> , IFO 3849	8.38 (100 LD ₅₀)	0.45 (0.25-0.81)	>4.00	>4.00
		<i>Pr. vulgaris</i> , 4027	8.49 (100 LD ₅₀)	1.59 (0.84-3.02)	>4.00
Slc-ICR	<i>E. coli</i> , NIHJ	8.60 (100 LD ₅₀)	1.82 (1.54-2.15)	1.52 (1.07-2.16)	3.74 (2.78-4.34)
		8.00 (100 LD ₅₀)	0.48 (0.37-0.71)	0.04 (0.03-0.06)	1.35 (0.92-1.98)
	<i>Staph. aureus</i> , E-46				

a) i.p., intraperitoneal

b) Zero and 6 hr after infection, i.v., intravenous

ED₅₀ values were calculated by the method of Litchfield-Wilcoxon, except the value* calculated by the method of Behrens-Kärber.

Fig. 9 Effect of passage through antibiotic-containing broth on susceptibility of organisms



にかかわらず CEZ と同等の、また、CET よりもすぐれた防禦効果を示した。

Pr. mirabilis, *Pr. vulgaris* および *Ent. cloacae* の各感染に対しては、CFX は他の 2 剤にくらべて高い防禦効果を発揮した。とくに、CFX の *Pr. vulgaris* および *Ent. cloacae* 感染防禦効果は著しく高く、CEZ および CET の両菌株感染に対する ED₅₀ はいずれも >4mg/mouse であったのに対し、CFX の ED₅₀ は、それぞれ、0.45 および 1.59 mg/mouse であった。一方、*Staph. aureus* 感染に対する防禦効果は CEZ が最も高く、次いで CFX, CET の順で、ED₅₀ はそれぞれ、0.04, 0.48, 1.35 mg/mouse であった。

考 察

新規半合成セフェマイシン系抗生物質 CFX の抗菌スペクトル、*in vitro*, *in vivo* 抗菌力、その抗菌力におよぼす pH、血清添加、接種菌量の影響および本剤に対する試験管内耐性獲得性について検討した。

CFX はグラム陰性菌および陽性菌に広い抗菌スペクトルを示したが、*Ent. cloacae* および *Ps. aeruginosa* に対しては、他の β -ラクタム系抗生物質と同様、ほとんど抗菌力を示さなかった。グラム陰性菌に対する CFX の試験管内抗菌力は、総じて、CEZ と同等であり、CET よりもすぐれていた。グラム陽性菌に対しては、CFX の抗菌力は CEZ および CET よりも劣っていた。

とくに、CFX は CEZ および CET に耐性のインドール陽性 *Proteus* および *Ser. marcescens* に対してもすぐれた抗菌力を示した。このように、CFX の試験管内抗菌力の特徴のひとつは、これら菌種に対するすぐれた抗菌力と思われる。*Ser. marcescens* は、近年、臨床材料からしばしば分離されるようになり、その上、常用抗生物質に耐性であることから、臨床問題視されつつある⁷⁾⁸⁾⁹⁾。したがって、CFX が本菌に対して比較的高い抗菌活性を示したことは、インドール陽性 *Proteus* に対する抗菌力とともに、臨床的にも意義深いと思われるが、この点については今後臨床評価の積み重ねが必要であろう。

とくに、本実験で臨床分離株に対する抗菌力が接種菌量の影響をうけにくかったことから類推されるように、本剤の作用様式は殺菌的であること⁴⁾、投与量の大部分がそのままの形で腎に移行し、排泄されること¹⁰⁾¹¹⁾、さらに、試験管内ではあるが、本剤に対する顕著な耐性上昇がみとめられなかったことから、*Proteus*, *Serratia* のみでなく、*E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* などに起因する腎尿路感染症に対する臨床治療効果は注目されることである。

CFX は β -ラクタム系抗生物質への耐性機作に重要な

役割を果たすといわれている β -ラクタマーゼに対してきわめて安定である³⁾⁴⁾。このことが、活性の高い β -ラクタマーゼを産生するインドール陽性 *Proteus* および *Ser. marcescens*¹²⁾¹³⁾ に対して、既知 β -ラクタム系抗生物質よりも高い抗菌活性を示した一因と考えられる。しかし、UNE & MITSUHASHI⁴⁾ は、CFX といえども活性度の高い β -ラクタマーゼによって加水分解されること、さらに、少数ではあるが、これら CFX 耐性菌の耐性機作は、 β -ラクタマーゼによる加水分解のみでなく、薬剤透過性障害などが関与していると思われることを報告している。また、本剤は、日和見感染に関与する菌として臨床注目されつつあるブドウ糖非酵性グラム陰性桿菌¹⁴⁾¹⁵⁾ に対して *A. faecalis* および *F. meningosepticum* を除き、抗菌力を示さなかった。以上のように、今後、本剤の使用により選択される耐性菌への対応が重要と思われる。

CEZ および CET は、総じて、培地 pH が酸性側の場合、抗菌力が増強することは周知のとおりである¹⁶⁾。本実験では、CFX はグラム陰性菌群に対しては、これらの薬剤と異なり、アルカリ側で抗菌力の増強を示した。この現象については、菌の生理学また CFX の作用機作などに立脚した多面的な解析が必要であろう。また、CFX は CEZ および CET にくらべ、馬血清添加の影響あるいは接種菌量の影響を受けなかったことは、それぞれ、血清タンパクとの結合率が CEZ および CET よりも低いこと、および、CFX の作用が他の 2 薬剤よりも殺菌的であること⁴⁾ が反映したものと考えられる。CFX のこれら薬物性状としての特徴が臨床にその有効性にどのように反映するか興味深い。

CFX, CEZ および CET の試験管内抗菌力は、マウス感染防禦効果と必ずしも相関していなかった。すなわち、CFX, CEZ および CET は *E. coli*, NIHJ および *Pr. mirabilis*, IFO 3849 に対してほぼ同等の試験管内抗菌力を示したにもかかわらず、感染防禦効果は CET のみが著しく劣っていた。また、*Staph. aureus*, 209 P に対する試験管内抗菌力は CET が CFX よりも高活性であるにもかかわらず、感染防禦効果は CFX の方がすぐれていた。非感染正常マウスでの検討では、各薬剤静脈内投与後の血中濃度および主要臓器内濃度は、いずれも CFX の方が CET よりも大であること⁶⁾、また、本実験成績から明らかなように、動物種にかかわらず、CFX の血清タンパク結合率は CET のそれよりも小さいことなどが、両薬剤の *in vivo* 抗菌力の差の一因をなすものと考えられる。

結 論

新規半合成セフェマイシン系抗生物質 CFX の *in vi-*

tro および *in vivo* での細菌学的評価を, CEZ および CET を主な対照薬剤として検討し, 以下の成績を得た。

1. CFX は, グラム陰性菌および陽性菌に広い抗菌スペクトルを示す。グラム陰性菌に対しては, CFX は CEZ とほぼ同等で, CET よりもすぐれた抗菌力を示した。とくに, CFX は CEZ および CET に耐性のインドール陽性 *Proteus* および *Ser. marcescens* に対してすぐれた抗菌力を示した。しかし, *Ps. aeruginosa* および *Ent. cloacae* に対しては, CFX は他の2薬剤と同様, ほとんど無効であった。また, *Staphylococcus* に対する CFX の抗菌力は CEZ および CET のそれよりも劣っていた。

2. CFX のグラム陰性菌群に対する抗菌力は, 培地 pH がアルカリ側で増強する傾向がみられた。

3. CFX の抗菌力は, 培地への馬血清添加の影響あるいは接種菌量の影響をほとんど受けなかった。

4. CFX の各種動物由来血清タンパク結合率は, CEZ および CET のそれよりも低率であった。

5. CFX に対し, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis* および *Staph. aureus* は試験管内でほとんど耐性を獲得しなかった。

6. CFX および CEZ の *E. coli* あるいは *Pr. mirabilis* 感染に対する防禦効果は, CET のそれよりもすぐれていた。*Pr. vulgaris* および *Ent. cloacae* 感染に対する CFX の防禦効果は, 他の2薬剤のそれよりも大であった。一方, *Staph. aureus* 感染に対する防禦効果は, CEZ が最も大で, 次いで CFX, CET の順であった。

本研究を遂行するに当り, 貴重な菌株を多数分与下さった東京大学・清水先生, 慈恵会医科大学・松本先生, 日本大学・中山先生および帝京大学・紺野先生に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) WALLICK, H. & D. HENDLIN: Cefoxitin, a new semisynthetic cephamycin antibiotic: susceptibility studies. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 5: 25~32, 1974
- 2) MILLER, A. K.; E. CELOZZI, Y. KONG, B. A. PELAK, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: *in vivo* evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 5: 33~37, 1974
- 3) ONISHI, H. R.; D. R. DAOUST, S. B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: resistance to beta-lactamase inactivation. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 5: 38~48, 1974
- 4) UNE, T. & S. MITSUHASHI: Antimicrobial

evaluation of cefoxitin: a new semisynthetic cephamycin. Comparative study with cefazolin and cephalothin. *Arzneim.-Forsch.* 27: 89~93, 1977

- 5) 小酒井望, 五島颯智子, 中沢昭三, 紺野昌俊, 三橋進, 松本文夫, 中山一誠, 清水喜八郎, 岡本綾子: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 6) 藤元輝男, 池内澄, 長崎泉吉, 河野守宏, 半田光, 長田恭明, 小河秀正: 新 cephamycin 系抗生物質 cefoxitin の生体内分布に関する研究. 実験動物における cefoxitin の体液内および臓器内濃度の検討. *Chemotherapy* 26, 1978
- 7) JOLLIK, J. D.; E. M. SCHERVISH-SWIERKOSZ & W. J. BROWN: Nalidixic acid susceptibility testing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 4: 532~537, 1973
- 8) MAGNUSON, E. W. & H. R. ELSTON: Infections caused by nonpigmented *Serratia marcescens*. *Ann. Intern. Med.* 65: 409~418, 1966
- 9) WILFERT, J. N.; F. F. BARRETT, W. H. EWING, M. FINLAND & E. H. KASS: *Serratia marcescens*: Biochemical, serological, and epidemiological characteristics and antibiotic susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital. *Appl. Microbiol.* 19: 345~352, 1970
- 10) BRUMFITT, W.; J. KOSMIDIS, J. M. T. HAMILTON-MILLER & J. N. G. GILCHRIST: Cefoxitin and cephalothin: antimicrobial activity, human pharmacokinetics and toxicology. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 6: 290~299, 1974
- 11) GOODWIN, C. S.; E. B. RAFTERY, A. D. GOLDBERG, H. SKEGGS, A. E. TILL & C. M. MARTIN: Effect of rate of infusion and probenecid on serum levels, renal excretion, and tolerance of intravenous doses of cefoxitin in humans: comparison with cephalothin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 6: 338~346, 1974
- 12) FRANKLIN, T. J.; & G. A. SNOW: "Biochemistry of Antimicrobial Action", 135~150, Chapman and Hall, London
- 13) SAWAI, T.; S. MITSUHASHI & S. YAMAGISHI: Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of β -lactamases in Gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. *Japan. J. Microbiol.* 12: 423~434, 1968
- 14) 清水喜八郎: 病原菌の最近の推移: グラム陰性菌. *最新医学* 31: 1300~1305, 1976
- 15) HENRIKSEN, S. D.: *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Review* 37: 552~561, 1973
- 16) 中沢昭三, 小野尚子, 大槻雅子, 井沢武年: 合成セファロスポリン Cefazolin の細菌学的評価. *Chemotherapy* 18: 512~521, 1970

ANTIMICROBIAL EVALUATION OF CEFOXITIN, A NEW SEMISYNTHETIC CEPHAMYCIN ANTIBIOTIC

TSUTOMU UNE, MASAYUKI NAKAJO, YASUAKI OSADA and HIDEMASA OGAWA
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

Antimicrobial evaluation of cefoxitin, a new semisynthetic cephamycin antibiotic, was performed using cefazolin and cephalothin as main reference drugs. The results obtained were as follows:

1. Cefoxitin showed a broad antibacterial spectrum. Against Gram-negative bacteria, except for several genera, cefoxitin was equally active as cefazolin and more active than cephalothin. Cefoxitin was highly active against indole-positive *Proteus* and *Serratia marcescens* which were highly resistant to cefazolin and cephalothin. Nevertheless, against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*, cefoxitin was as inactive as was cefazolin and cephalothin. Against Gram-positive bacteria, cefoxitin was less active than cefazolin and cephalothin.

2. Alkalinization of medium-pH enhanced the antimicrobial activity of cefoxitin against Gram-negative bacteria including *Escherichia coli*, *Pr. vulgaris* and *Ser. marcescens*, while depressing activity against staphylococci.

3. The activity of cefoxitin, cefazolin and cephalothin against *E. coli* decreased by increasing the inoculum size. However, the degree of decrease of activity was the least for cefoxitin. Against *Staph. aureus*, no decrease of the activity was found among the antibiotics.

4. Regardless of supplementation of horse serum in medium, the activity of cefoxitin was hardly depressed, while cefazolin and cephalothin had a tendency to decrease the activity by increases in the concentration of serum in the medium.

5. The binding rate of cefoxitin to serum proteins was lower than that of cefazolin and cephalothin.

6. Microorganisms such as *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis* and *Staph. aureus* acquired little or no resistance to cefoxitin *in vitro*.

7. In mice protection tests, the antibiotics were intravenously administered immediately and 6 hours after bacterial challenge. Cefoxitin and cefazolin were more effective against infections with *E. coli* and *Pr. mirabilis* than cephalothin. Against infections with *Pr. vulgaris* and *Ent. cloacae*, cefoxitin exhibited a surprisingly higher effect than cefazolin and cephalothin. Against infection with *Staph. aureus*, on the other hand, cefoxitin was less effective than cefazolin and more effective than cephalothin.