

新セファマイシン抗生物質 Cefoxitin に関する細菌学的研究

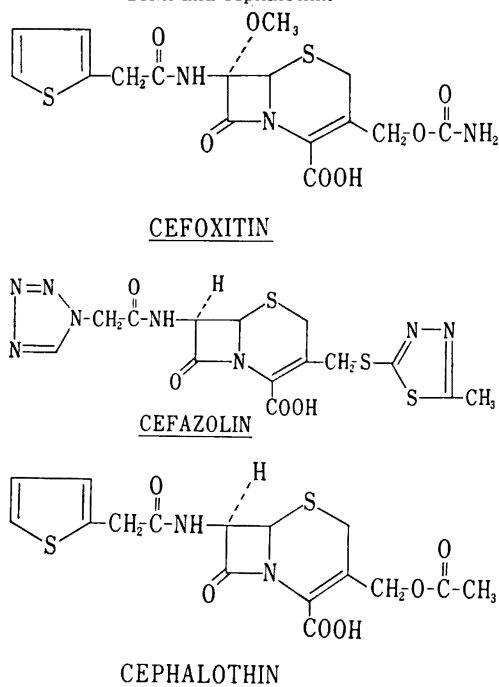
故中沢昭三・戸辺建介・平井芳美・山岡 暢

大崎節子・高井かつみ・西野武志

京都薬科大学微生物学教室

Cefoxitin¹⁾²⁾ は米国 Merck Sharp & Dohme 社によって、1972年開発された新しい半合成セファマイシン系抗生物質である。その化学名は 3-(carbamoyloxymethyl)-7 α -methoxy-7-[2-(2-thienyl)acetamido]-3-cephem-4-carboxylate であり、化学構造は Cephalothin に似ており、3 位の acetoxyl が carbamoyloxy 基に、7 α 位の水素が methoxy 基になっている (Fig. 1)。とくに 7 α 位の methoxy 基を有するために、cephalosporin 系とは区別し、cephamycin 系と呼び、細菌の産生する β -lactamase に強い抵抗性を示し³⁾、それ故、penicillin, cephalosporin 耐性菌の多くに有効であるといわれている⁴⁾。

Fig. 1 Chemical structures of cefoxitin, cefazolin and cephalothin



今回、Cefoxitin に関する *in vitro* および *in vivo* における細菌学的評価を Cefazolin および Cephalothin を比較薬剤として用い、検討を行ったので報告する。なお、本研究は昭和50年4月より、51年8月にかけて実施された。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

Cefoxitin (CFX), Cefazolin (CEZ), Cephalothin (CET) および Cephamycin C (CMC) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌20株、およびグラム陰性菌20株に対して、日本化学療法学会感受性測定法⁵⁾ に順じて、MIC を測定した。

すなわち増殖用培地に tryptosoya broth (TSB, Nissan) を、感受性測定用培地に heart infusion agar (HIA, Nissan) を用い、 10^8 cells/ml 菌液 および 10^6 cells/ml 菌液について inoculator apparatus を用いて菌接種し、37°C、20時間培養後の最小発育阻止濃度 MIC を求めた。なお *Streptococcus* 属および *Corynebacterium diphtheriae* に対しては10%馬血液含有 HIA を用い、37°C、20時間後の MIC を、また *Neisseria* 属に対しては TGC 培地を用いて、37°C、48時間培養後の MIC を求めた。

3. 臨床分離株に対する感受性分布と感受性相関

臨床材料から分離した *Staphylococcus aureus* 50株、*Escherichia coli* 130株、*Proteus mirabilis* 31株、*Proteus vulgaris* 38株、*Proteus rettgeri* 17株および *Proteus morgani* 20株、*Klebsiella* 41株、*Serratia* 107株および *Yersinia enterocolitica* 6株に対して日本化学療法学会感受性測定法に順じて、原液 (10^8 cells/ml) および100倍希釈液 (10^6 cells/ml) に対して MIC を測定した。

4. β -lactamase sample の調製と酵素活性の測定

臨床材料より分離した penicillin, cephalosporin 耐性 *E. coli* No. 18 および *E. coli* No. 8 を nutrient broth (NB, Nissan) を用い、37°C、20時間培養後集菌し、M/15 PBS で洗浄後、超音波破壊を行い、その遠心清を β -lactamase とした。この粗酵素が種々の段階に希釈した液に、最終濃度が 5 μ g/ml になるように、Cefoxitin, CEZ および CET の各基質を加え、37°C で1時間反応させた。100°C、1分間の加熱処理後、残存力価を *Bacillus subtilis* ATCC 6633を用いてカップ法にて測定した。

5. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす血清添加, 接種菌量および pH の影響は *Staphylococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* NIHJC-2, *Klebsiella pneumoniae* および *Proteus mirabilis* 1287 を被験菌として, heart infusion broth (HIB, Nissan) を用いた液体希釈法により, 37°C, 20時間培養後の MIC により求めた。すなわち 0, 10, 25 および 50% の馬血清を含む HIA を用いて血清添加の影響を, $10^3 \sim 10^8$ cells/ml の菌量を含む培地で, 接種菌量の影響を, また pH 5, 6, 7, 8 および 9 に調製した培地を用いて MIC の変動を求め pH の影響を検討した。さらに pH の影響については, 種々の pH に調製した HIA を用いた寒天希釈法により, グラム陽性菌 7 株およびグラム陰性菌 42 株 (Table 7 に示す) に対して, MIC を求めた。また培地 pH を 5.5, 7.0 および 8.5 に調製した HIB で培養した *E. coli* No. 29 の増殖曲線におよぼす Cefoxitin, CEZ および CET の殺菌作用を生菌数測定により検討した。

6. 殺菌作用の検討

1) 濁度変化による殺菌作用の検討: Cefoxitin, CEZ および CET の MIC がいずれも $3.13 \mu\text{g/ml}$ である *E. coli* No. 29 を用い, biophotometer により濁度変化を自動的に記録した。すなわち, TSB による前培養液を, HIB で 10^{-4} に希釈し, biophotometer セルに 9 ml ずつ分注し, 37°C で培養した。その濁度が 60 T% および 30 T% に達した時, 薬剤 1 ml を添加し, 培養を続け, 濁度を観察した。

2) 生菌数測定による殺菌作用の検討: *E. coli* No. 29 の TSB を用いた前培養液を HIB で 10^{-4} に希釈し, 37°C で約 4~5 時間静置培養を行った。菌量が 10^6 cells/ml および 10^7 cells/ml に達した時, 50 ml コルベンに菌液 9 ml および薬剤液 1 ml を各々混和し, 培養を続けた。経時的に培養液を採取し, 適当に希釈後, nutrient agar (NA, Nissan) 上にまき, 20 時間後, colony forming unit を測定した。99.9% 殺菌に要する時間と濃度の関係は, 宮本らの方法⁶⁾により数量的処理を行い, 直線, および N, K の値を求めた。

3) 再増殖の検討: *E. coli* NIHJC-2 の TSB による前培養液を HIB で 10^{-4} に希釈し, 37°C, 4~5 時間培養し, 10^6 cells/ml の菌量に達した時, Cefoxitin, CEZ および CET の MIC 濃度すなわち 6.25, 3.13 および $25.0 \mu\text{g/ml}$ になるように薬剤を添加した。薬剤作用 1 時間後, 遠心洗浄により薬剤を除去し, HIB にて再び 37°C で培養し, 経時的に生菌数測定を行い, 再増殖の様子について検討を行った。

4) 同調培養系における殺菌作用の検討: 42°C で

DNA 合成の開始が止り, 30°C でその合成が始まる温度感受性変異株 *E. coli* K12 N167⁷⁾ (国立予防衛生研究所阿部美穂子博士分与株) を用い, 同調培養方法は阿部の方法⁸⁾に従った。すなわち 30°C で前培養した菌液を 10^{-2} に希釈し, O. D. 0.1 (at 550 nm), 3×10^7 cells/ml になるまで 30°C で 3~4 時間振とう培養した。続いて 42°C で 90 分培養後, 直ちに 30°C にもどした時を培養開始時とした。薬剤との接触方法は以下の (a) および (b) の方法で行った。(a): 種々の濃度の薬剤を培養開始時に加え, 経時的に生菌数を測定した。(b): 同調化した培養液を 10 分毎に採取し, 一定濃度 ($100 \mu\text{g/ml}$) の薬剤と 10 分間接触させ, 生菌数測定を行った。

6. 実験的マウス感染症に対する治療効果

1) 使用マウス: STD-ddY マウス, 4 週令, 雄, $18 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ を 1 群 10 匹で使用した。

2) 感染菌液の調製: *Escherichia coli* No. 29, *Escherichia coli* No. 18, および *Serratia marcescens* T55 についてはそれらの保存株を NB で 37°C, 14 時間振とう培養後, NB で希釈し, 4% mucin (Willson) と等量混合し, 感染菌液とした。*Proteus morganii* No. 101 については, その保存株を HIA の slant にて, 37°C, 18 時間培養後, 生理食塩水で懸濁, 希釈し, 4% mucin と等量混合し, 感染菌液とした。

3) 感染方法 および 治療方法: 感染菌液量は 0.5 ml/mouse とし, マウス腹腔内に感染させた。薬剤投与時期の検討以外の治療時期は感染 2 時間後とし, 生理食塩水に溶解した種々の濃度の薬剤液 0.2 ml を静脈内に 1 回投与した。

4) 薬剤投与時期の検討: 1×10^6 cells/mouse の *E. coli* No. 18 をマウスに I. P. 感染させ, 感染直後 (0 時間), 2 および 4 時間後に薬剤を投与し, その治療効果を生存率で求めた。

5) 治療効果の判定: 感染後 4 日まで, 生死を観察し, その死亡率から LITCHFIELD-WILCOXON 法に基づき, ED₅₀ および危険率 5% での信頼限界を求めた。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌およびグラム陰性菌 40 株に対する抗菌力を検討した結果は Table 1 および 2 に示すとおり, Cefoxitin はグラム陽性, 陰性菌群に対し幅広い抗菌スペクトラムを有した。

その抗菌力を他剤と比較すると, 10^8 cells/ml 菌液で, *Staphylococcus aureus* に対し, Cefoxitin, CEZ および CET の感受性は各々, $1.56 \sim 3.13$, $0.39 \sim 1.56$ および $0.19 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$ であった。*Streptococcus faecalis* および *St. viridans* に対し, CEZ および CET は

Table 1 Antibacterial spectrum (I)
Gram-positive bacteria

| Test strain | With 10 ⁸ cells/ml | | | With 10 ⁶ cells/ml | | |
|--|-------------------------------|-------|------|-------------------------------|-------|-------|
| | CFX | CET | CEZ | CFX | CET | CEZ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209-P | 1.56 | 0.39 | 0.39 | 0.78 | 0.045 | 0.045 |
| " " Smith | 3.13 | 0.19 | 0.39 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| " " Terajima | 3.13 | 0.39 | 0.78 | 3.13 | 0.39 | 0.39 |
| " " Neumann | 3.13 | 0.39 | 0.78 | 3.13 | 0.19 | 0.39 |
| " " E-46 | 3.13 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.19 | 0.39 |
| " " No. 80 | 3.13 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 0.39 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 3.13 | 0.78 | 1.56 | 1.56 | 0.39 | 0.78 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> S-23 | 0.78 | 0.09 | 0.09 | 0.78 | 0.09 | 0.09 |
| " " Cook | 1.56 | 0.19 | 0.19 | 0.78 | 0.19 | 0.19 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 50.0 | >100 | >100 | 25.0 | 50.0 | >100 |
| <i>Streptococcus viridans</i> | 50.0 | >100 | >100 | 25.0 | 50.0 | >100 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> type I | 3.13 | 0.39 | 0.19 | 3.13 | 0.39 | 0.09 |
| " " type II | 6.25 | 0.39 | 0.19 | 3.13 | 0.39 | 0.19 |
| " " type III | 3.13 | 0.39 | 0.19 | 3.13 | 0.39 | 0.19 |
| <i>Micrococcus luteus</i> PCI-1001 | 0.39 | 0.045 | 0.39 | 0.39 | 0.045 | 0.19 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 1.56 | 0.045 | 0.39 | 0.78 | 0.045 | 0.19 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 12.5 | 0.78 | 0.39 | 12.5 | 0.39 | 0.19 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 6.25 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 0.19 |
| <i>Clostridium tetani</i> | 3.13 | 0.39 | 0.19 | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 6.25 | 6.25 | 3.13 | | | |

MIC (μg/ml)

Table 2 Antibacterial spectrum (II)
Gram-negative bacteria

| Test strain | With 10 ⁸ cells/ml | | | With 10 ⁶ cells/ml | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|
| | CFX | CET | CEZ | CFX | CET | CEZ |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 0.09 | 0.39 | 0.19 | | | |
| " <i>meningitidis</i> | 0.19 | 0.78 | 0.78 | | | |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 6.25 | 25.0 | 3.13 | 6.25 | 6.25 | 1.56 |
| " NIH | 1.56 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 6.25 | 3.13 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Salmonella typhi</i> T-287 | 0.78 | 0.78 | 6.25 | 0.39 | 0.78 | 1.56 |
| " " O-901 | 0.78 | 0.78 | 3.13 | 0.78 | 0.78 | 1.56 |
| <i>Salmonella paratyphi</i> A | 1.56 | 1.56 | 3.13 | 1.56 | 1.56 | 3.13 |
| " " B | 3.13 | 3.13 | 3.13 | 1.56 | 3.13 | 1.56 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 3.13 | 6.25 | 3.13 | 3.13 | 3.13 | 1.56 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 3.13 | 3.13 | 3.13 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> EW-7 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 1.56 | 6.25 | 1.56 |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10 | 3.13 | 12.5 | 3.13 | 3.13 | 6.25 | 1.56 |
| <i>Shigella boydii</i> EW-28 | 3.13 | 50.0 | 6.25 | 3.13 | 12.5 | 3.13 |
| <i>Shigella sonnei</i> EW-33 | 0.78 | 6.25 | 1.56 | 0.78 | 3.13 | 0.78 |
| <i>Proteus vulgaris</i> OX-19 | 3.13 | >100 | >100 | 3.13 | 12.5 | 12.5 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | 3.13 | 3.13 | 12.5 | 3.13 | 3.13 | 6.25 |
| <i>Proteus morganii</i> Kono | 50.0 | >100 | >100 | 12.5 | >100 | >100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| " " Nc-5 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

MIC (μg/ml)

Table 3 Sensitivity distribution of clinical isolates

| Organisms | Inocu. size | drug | MIC (μg/ml) | | | | | | | | | | | | No. of test strain |
|----------------------------|-----------------|------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|--------------------------|
| | | | 0.09 | 0.19 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25.0 | 50.0 | 100 | >100 | |
| Staph. aureus | 10 ⁸ | CFX | | | | | 1 | 7 | 42 | | | | | | 50 |
| | | CET | 3 | 13 | 26 | 8 | | | | | | | | | |
| | | CEZ | | 1 | 15 | 21 | 8 | 5 | | | | | | | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | 1 | 2 | 44 | 3 | | | | | | 50 |
| | | CET | 14 | 25 | 11 | | | | | | | | | | |
| | | CEZ | 1 | 6 | 32 | 11 | | | | | | | | | |
| E. coli | 10 ⁸ | CFX | | | | | 16 | 21 | 70 | 12 | 6 | 2 | | 3 | 130 |
| | | CET | | | | | 1 | 2 | 3 | 18 | 54 | 35 | 8 | 9 | |
| | | CEZ | | | | | 33 | 46 | 18 | 15 | 6 | 4 | 2 | 6 | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | 2 | 25 | 47 | 45 | 4 | 3 | 1 | | 3 | 130 |
| | | CET | | | | | 3 | 12 | 53 | 38 | 14 | 5 | | 5 | |
| | | CEZ | | | | 33 | 54 | 20 | 12 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | |
| Proteus indole (+) | 10 ⁸ | CFX | | | | | 3 | 14 | 19 | 22 | 8 | 2 | 6 | 1 | 75 |
| | | CET | | | | | | 2 | 7 | 9 | 1 | 1 | 2 | 53 | |
| | | CEZ | | | | | | | 6 | 10 | 5 | 2 | 4 | 48 | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | 1 | 9 | 28 | 18 | 9 | 3 | 2 | 5 | | 75 |
| | | CET | | | | | 1 | 7 | 13 | 4 | 4 | 1 | 5 | 40 | |
| | | CEZ | | | | | | 12 | 9 | 1 | 1 | 1 | 6 | 45 | |
| Proteus indole (−) | 10 ⁸ | CFX | | | | | | 5 | 13 | 10 | 3 | | | | 31 |
| | | CET | | | | | | | 17 | 6 | 5 | | | 3 | |
| | | CEZ | | | | | | 1 | 7 | 12 | 6 | 2 | | 3 | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | | 1 | 18 | 10 | 1 | | | | | 30 |
| | | CET | | | | | 1 | 6 | 15 | 5 | 1 | | | 2 | |
| | | CEZ | | | | | 1 | 8 | 14 | 4 | 1 | | | 2 | |
| Klebsiella pneumoniae | 10 ⁸ | CFX | | | | | | 4 | 27 | 6 | 2 | 1 | 1 | | 41 |
| | | CET | | | | | | 6 | 6 | 7 | 7 | 3 | 7 | 5 | |
| | | CEZ | | | | | 1 | 13 | 4 | 6 | 6 | 4 | 3 | 4 | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | | 9 | 26 | 3 | | 2 | 1 | | | 41 |
| | | CET | | | | | 5 | 14 | 7 | 7 | 4 | 2 | | 2 | |
| | | CEZ | | | | 3 | 13 | 6 | 7 | 6 | 3 | | 2 | 1 | |
| Yersinia enterocolitica | 10 ⁸ | CFX | | | | | | 3 | 2 | | 1 | | | | 6 |
| CET | | | | | | | | | | | | | | | |
| CEZ | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 4 | | |
| | | | | | | | | | | | 1 | 2 | | 3 | |
| Organisms | Inocu. size | drug | MIC (μg/ml) | | | | | | | | | | | | No. of test strain |
| | | | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25.0 | 50.0 | 100 | 200 | 400 | 800 | >800 | |
| Serratia | 10 ⁸ | CFX | | | | 1 | 9 | 26 | 20 | 18 | 21 | 12 | | | 107 |
| | | CET | | | | | | | | | | | | | |
| | | CEZ | | | | | | | | | | | | 107 | |
| | 10 ⁶ | CFX | | | | 15 | 26 | 20 | 12 | 7 | 23 | 4 | | | 107 |
| | | CET | | | | | | | | | | | | | |
| | | CEZ | | | | | | | | | | | | 107 | |

>100 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示したが, Cefoxitin は 50 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。他の 5 株の *Streptococcus* に対して, Cefoxitin, CEZ および CET は各々 0.78~6.25, 0.09~0.19, および 0.09~0.39 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を示した。

グラム陰性菌において, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* に対して, Cefoxitin は各々, 0.09 および 0.19 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し, CEZ および CET より優れていた。また *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* に対して, Cefoxitin は 0.78~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を示し, CEZ の 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ における感受性とほぼ同程度であり, CET の 0.78~25 $\mu\text{g/ml}$ に比べ優れていた。*Proteus vulgaris* および *Proteus morganii* に対して, Cefoxitin は各々 3.13 および 50 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を示し, CEZ および CET の >100 $\mu\text{g/ml}$ に比べはるかに優れた抗菌力を示した。しかし *Pseudomonas* および *Enterobacter* に対して Cefoxitin は CEZ および CET と同様抗菌力を示さなかった。

10⁶ cells/ml の菌液を用いた成績もほぼ同様な傾向を示した。

以上のことより Cefoxitin のグラム陽性菌群に対する抗菌力は CEZ および CET に比べやや劣っていた。しかしグラム陰性菌群に対する抗菌力は CEZ とほぼ同程度で, CET より優れていた。また, Cefoxitin はとくに, インドール陽性 *Proteus* sp. に対して非常に優れた抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布と感受性相関

臨床材料から分離された *Staphylococcus aureus* 50 株, *E. coli* 130 株, インドール陰性 *Proteus* 31 株, インドール陽性 *Proteus* 75 株, *Klebsiella* 41 株, *Serratia* 107 株および *Yersinia* 6 株に対して 10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml 菌液について, MIC 測定を行い, その全成績を Table 3 にまとめ, さらに各属ごとの感受性分布,

累積分布および相関関係で示した。なお感受性相関については 10⁸ cells/ml 菌液における成績のみを示した (Fig. 2~Fig. 20)。

1) *Staphylococcus aureus* (50 株): 10⁸ cells/ml 菌液では Cefoxitin, CEZ および CET の MIC のピークは各々 6.25, 0.78 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 10⁶ cells/ml 菌液では 3.13, 0.39 および 0.19 $\mu\text{g/ml}$ にあり, Fig. 2 に示すように, 各薬剤とも 1 峰性を示した。また Fig. 3 に示す累積分布からも明らかなように, Cefoxitin の感受性は CEZ および CET に比べやや劣っていた。また, Cefoxitin と CEZ および Cefoxitin と CET の感受性相関は認められなかった (Fig. 4)。

2) *Escherichia coli* 130 株: 10⁸ cells/ml 菌液では Fig. 5-1 に示すとおり, Cefoxitin, CEZ および CET の感受性のピークは 6.25, 3.13 および 25.0 $\mu\text{g/ml}$ にあったが, Cefoxitin のピークは他 2 剤より鋭い 1 峰性であり, 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌が CEZ および CET に比べ少なかった。10⁶ cells/ml 菌液では Fig. 5-2 に示すように, Cefoxitin, CEZ および CET の感受性ピークは 3.13, 1.56 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ にあった。Fig. 6 に示す累積分布から, 10⁸ cells/ml 菌液で Cefoxitin は CEZ とほぼ同等の抗菌力を示したが, 10⁶ cells/ml 菌液では CEZ, Cefoxitin, CET の順にすぐれていた。また Fig. 7 に示すように, Cefoxitin と CEZ は感受性の相関する株がかなり見られたが, Cefoxitin と CET は相関性が見られなかった。

3) インドール陰性 *Proteus* (*Proteus mirabilis* 31 株): Cefoxitin, CEZ および CET の感受性ピークは Fig. 8-1 に示す 10⁸ cells/ml 菌液で, 各々 6.25, 12.5 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり, Fig. 8-2 に示す 10⁶ cells/ml 菌液で 3.13, 6.25 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。CEZ および CET に見られる 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌は Cefo-

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staphylococcus aureus* 50 strains

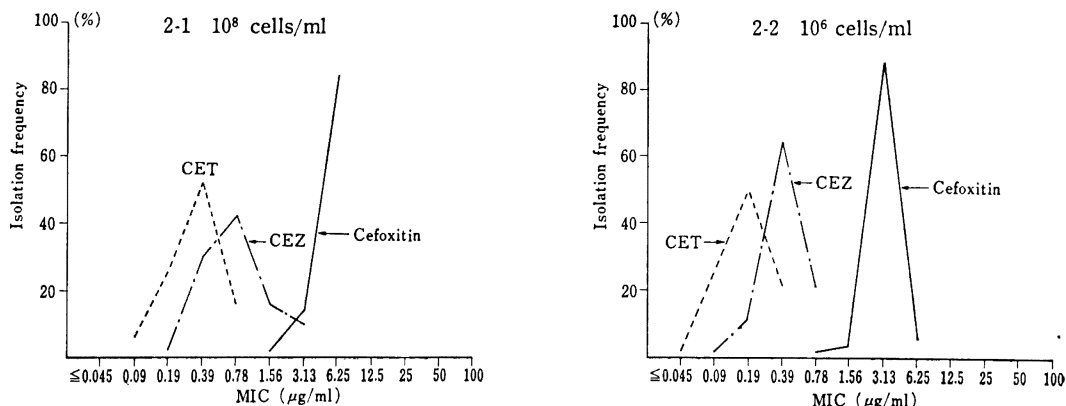
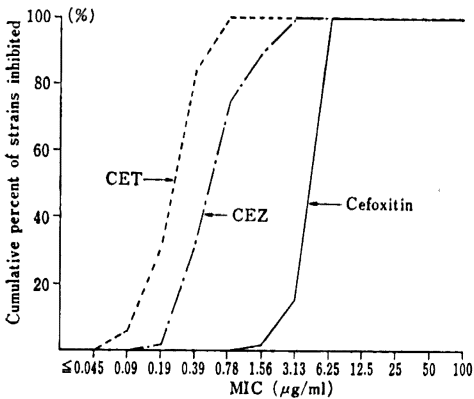


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staphylococcus aureus* 50 strains
3-1 10^8 cells/ml



3-2 10^6 cells/ml

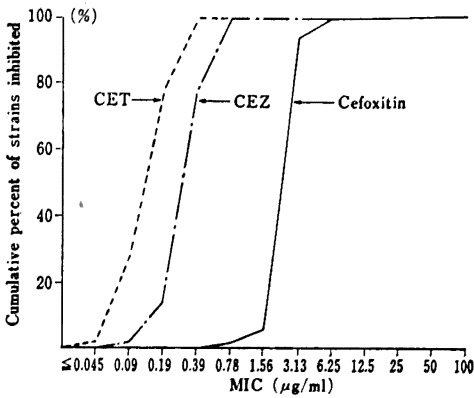
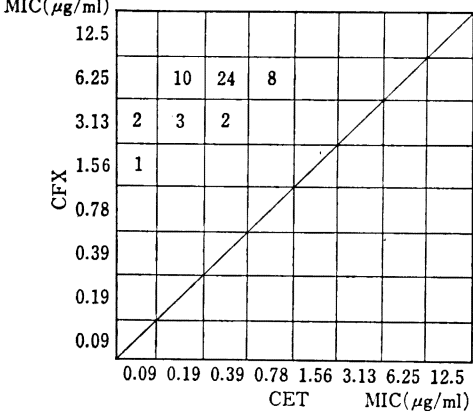


Fig. 4 Correlation of sensitivity *Staphylococcus aureus* 50 strains 10^8 cells/ml

a) CET and CFX



b) CEZ and CFX

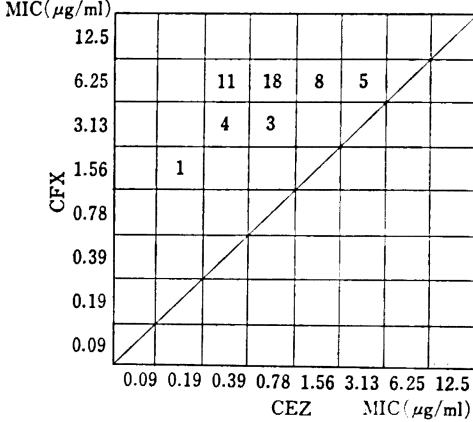
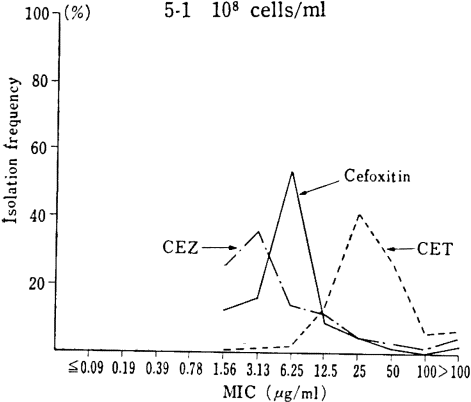


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. coli* 130 strains

5-1 10^8 cells/ml



5-2 10^6 cells/ml

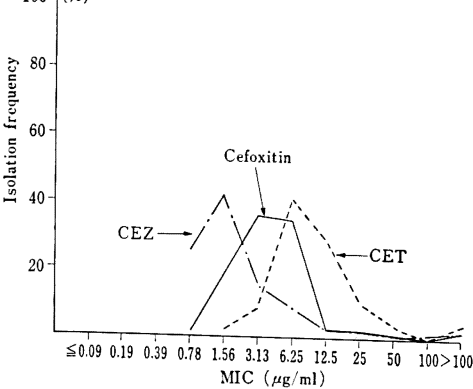
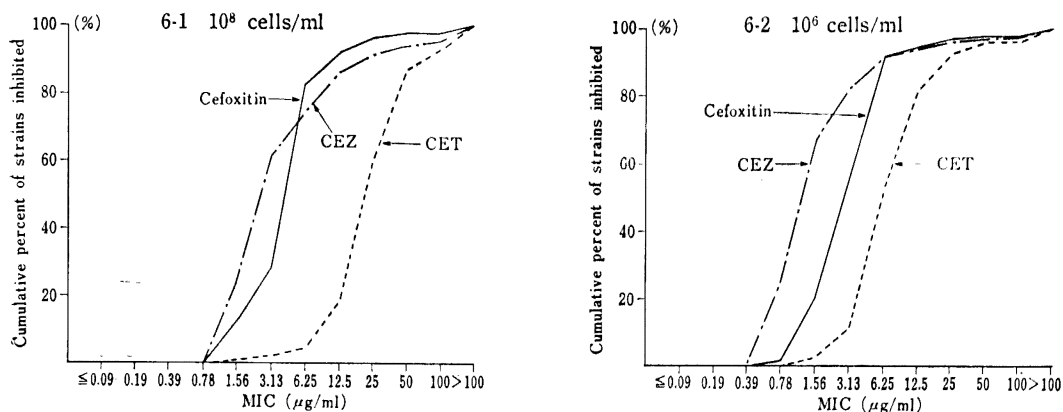
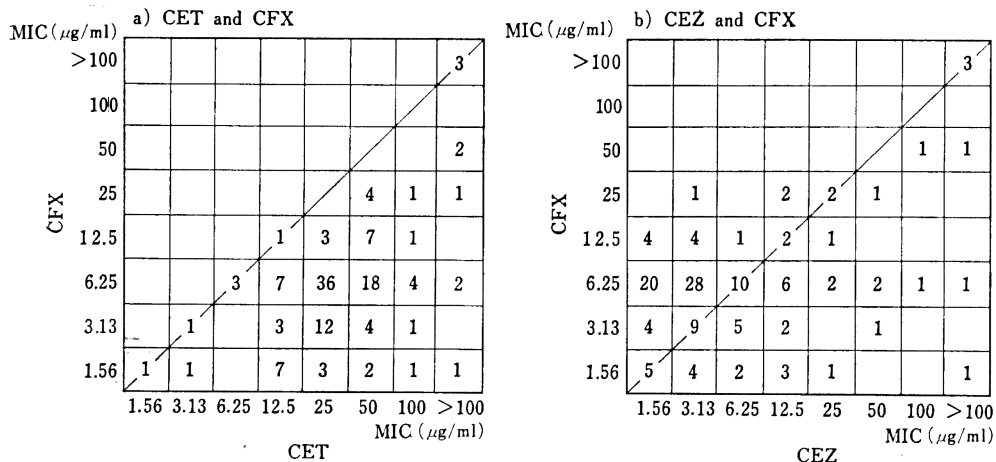


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. coli* 130 strainsFig. 7 Correlation of sensitivity *E. coli* 130 strains 10^8 cells/ml

xitin には見られなかった。

Fig. 9 に示す累積分布によると Cefoxitin の抗菌力は CEZ および CET に比べ優れていることが分った。

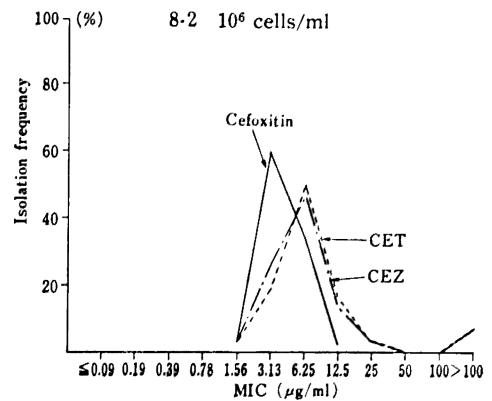
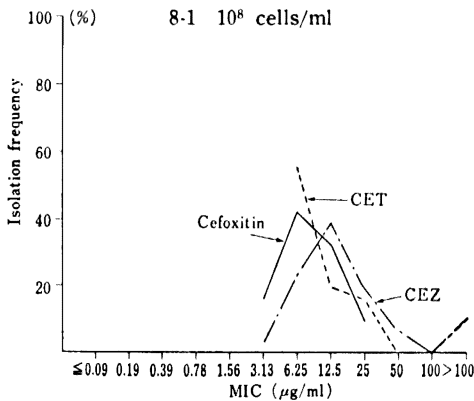
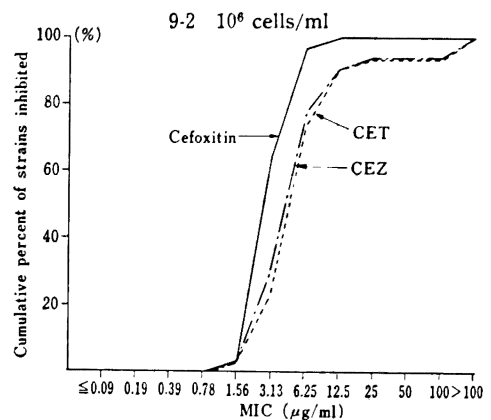
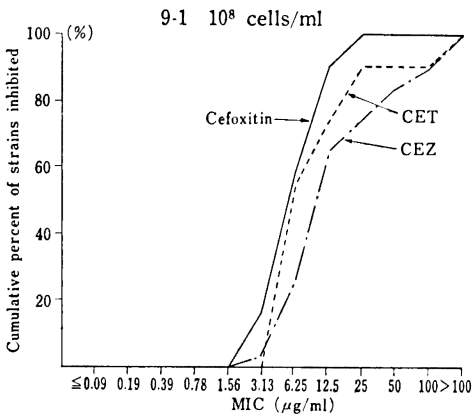
Fig. 10 に示す感受性相関から、CEZ および CET 感受性株に対しては Cefoxitin と相関するものが見られたが、CEZ および CET 耐性株に対しては Cefoxitin は感受性を示し、相関性は認められなかった。

4) インドール陽性 *Proteus* 75株 (*Proteus vulgaris* 38株, *Proteus rettgeri* 17株, *Proteus morganii* 20株): 3薬剤とも、感受性ピークは2峰性を示し、 10^8 cells/ml 菌液では Fig. 11-1 に示すように Cefoxitin は12.5および100 μg/ml に、CEZ および CET はいずれも12.5および>100 μg/ml に感受性ピークを示した。

10^6 cells/ml 菌液でも Fig. 11-2 に示すように、2峰性を示し、Cefoxitin のピークは3.13および100 μg/ml

に、CEZ は3.13および>100 μg/ml に、CET は6.25および>100 μg/ml であった。2峰間における分布量は Cefoxitin が低濃度側のピークが大部分をしめるに比べ、CEZ および CET では高濃度側のピークが大部分をしめた。すなわち、Cefoxitin は CEZ および CET 耐性株に対し非常に優れた抗菌力を有することが分った。Fig. 11~Fig. 13 の成績は *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri* および *Proteus morganii* の3 species をまとめて、インドール陽性 *Proteus* sp. として集計したものであるが、いずれの species に対しても、Cefoxitin は他2剤よりはるかに優れた抗菌力を有した。

また Fig. 12 で示す累積分布においても、Cefoxitin はいずれの菌量においても CEZ および CET に比べ優れた抗菌力を示した。また感受性相関は Fig. 13 に示すように、CEZ および CET 耐性菌に対して、Cefoxitin

Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus*, indole(-) 31 strainsFig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus*, indole(-) 31 strains

は感受性を示し、相関性は認められなかった。

5) *Klebsiella* 41株: 10^8 cells/ml 菌液では Fig. 14-1 に示すとおり、Cefoxitin の感受性ピークは $6.25 \mu\text{g/ml}$ であり、鋭い1峰性を示すのに比べ、CEZ および CET の MIC の分布は横に幅広く広がり、Cefoxitin には見られない中程度以上の耐性菌が多いことを示していた。

10^6 cells/ml 菌液でも Fig. 14-2 に示すように、同様の傾向であった。

Fig. 15 に示す累積分布では Cefoxitin, CEZ, CET の順に優れており、とくに CEZ および CET 耐性株に対して優れていることが分った。感受性相関は Fig. 16 に示すように、感受性株では Cefoxitin と他2剤の間に相関性のみられる株もあったが、CEZ および CET 耐性株では相感性は認められなかった。

6) *Serratia* 107株: Fig. 17 に示すように CEZ および CET の MIC は全株に対し $800 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。しかし Cefoxitin のそれは $6.25 \sim 400 \mu\text{g/ml}$

に幅広い分布を示し、Cefoxitin $100 \mu\text{g/ml}$ で全菌株の75%を、 $400 \mu\text{g/ml}$ で全菌株の発育を阻止できた。

また、Fig. 18 に示す累積分布から明らかなように、Cefoxitin の抗菌力は他2剤に比べ非常に優れていることが分った。

感受性相関は Fig. 19 に示すとおり、相関関係は全く認められなかった。

7) *Yersinia enterocolitica* 6株: 感受性分布、および累積分布の成績を Fig. 20-1 および Fig. 20-2 に示した。Cefoxitin は $3.13 \mu\text{g/ml}$ で半数の菌株を、また $12.5 \mu\text{g/ml}$ で全菌株の発育を抑えたのに比べ、CEZ および CET の感受性は $25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に分布した。従って Cefoxitin は他2剤に比べ優れた抗菌力を示した。

3. β -lactamase に対する安定性

Cefoxitin に感受性、CEZ および CET に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上耐性の *E. coli* No. 18 から抽出した β -lactamase

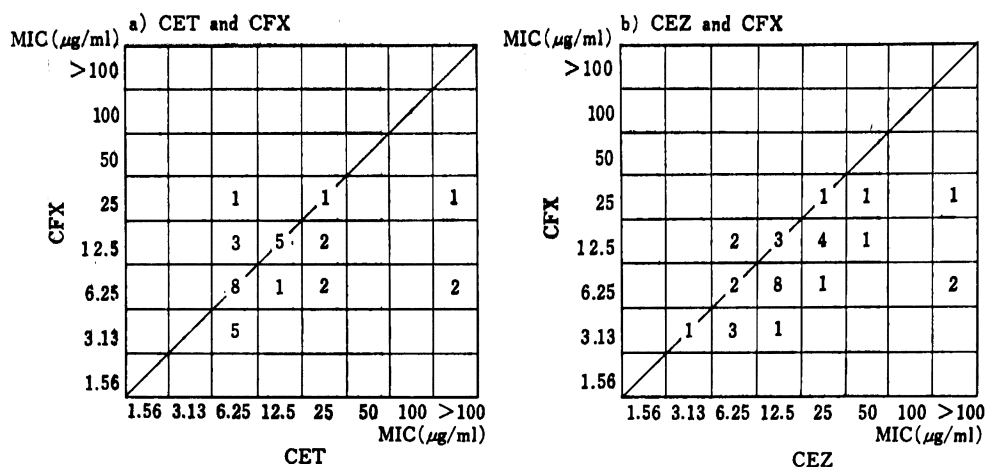
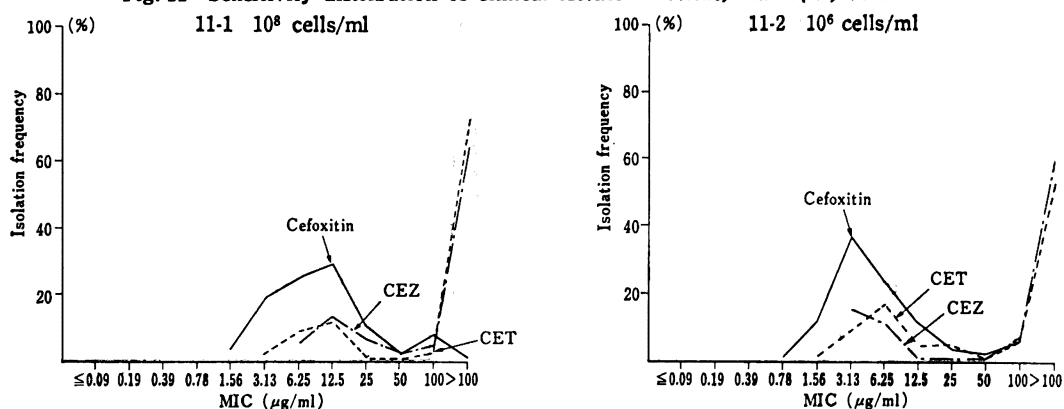
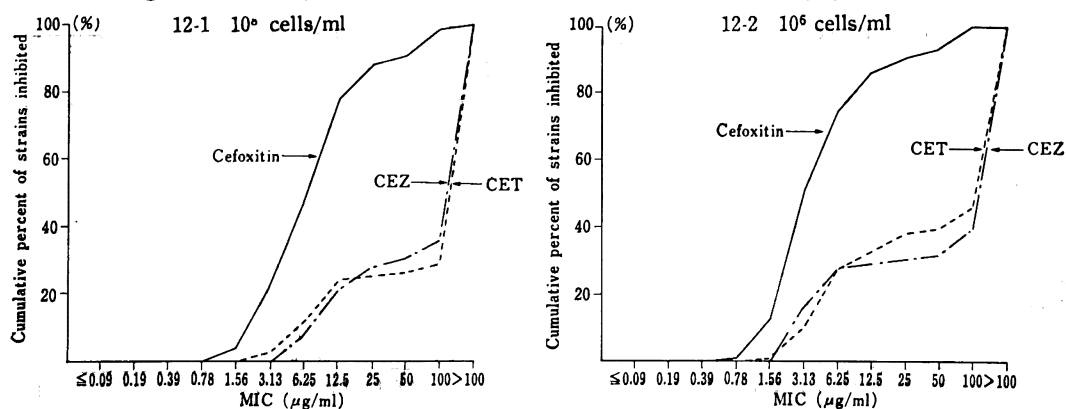
Fig. 10 Correlation of sensitivity *Proteus*, indole(-) 31 strains 10^8 cells/mlFig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus*, indole(+) 75 strainsFig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus*, indole(+) 75 strains

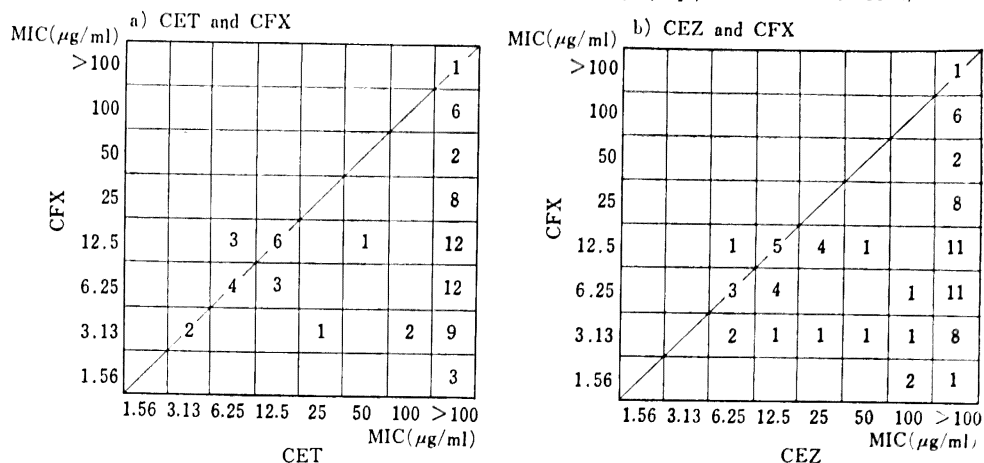
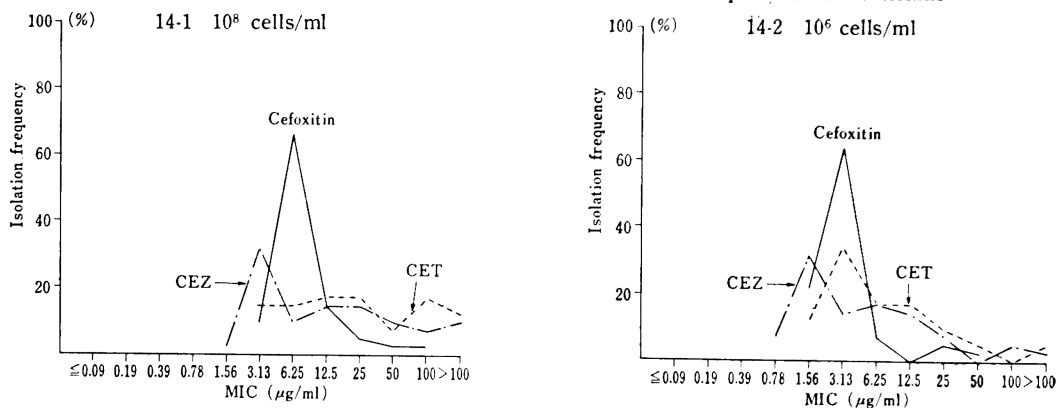
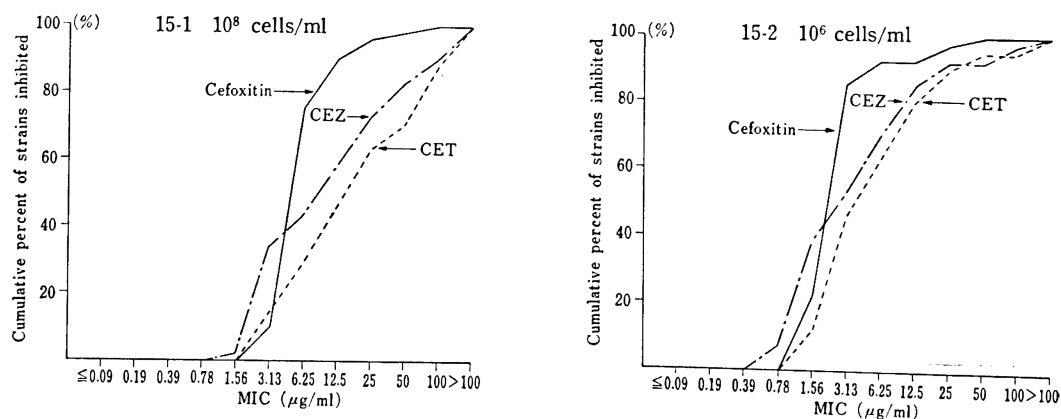
Fig. 13 Correlation of sensitivity *Proteus*, indole(+) sp., 75 strains 10^8 cells/mlFig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* 41 strainsFig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* 41 strains

Fig. 16 Correlation of sensitivity *Klebsiella pneumoniae* 41 strains 10^8 cells/ml

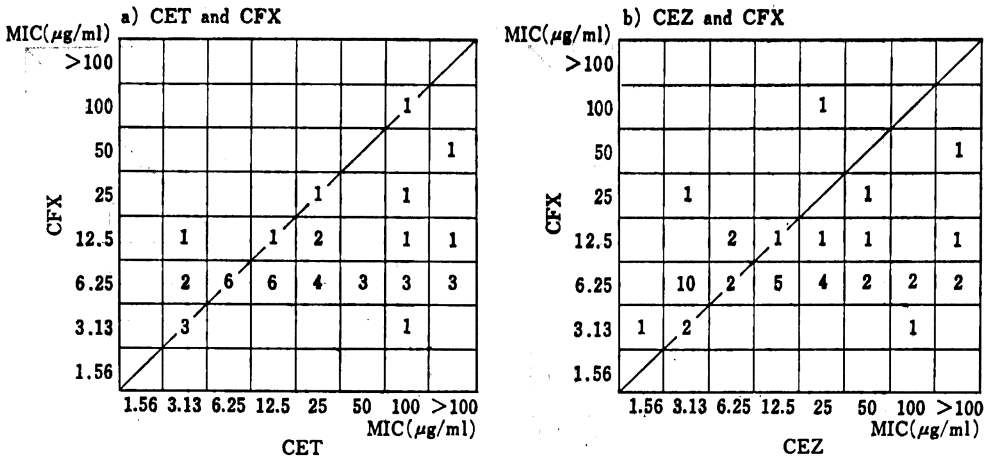


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates *Serratia* 107 strains

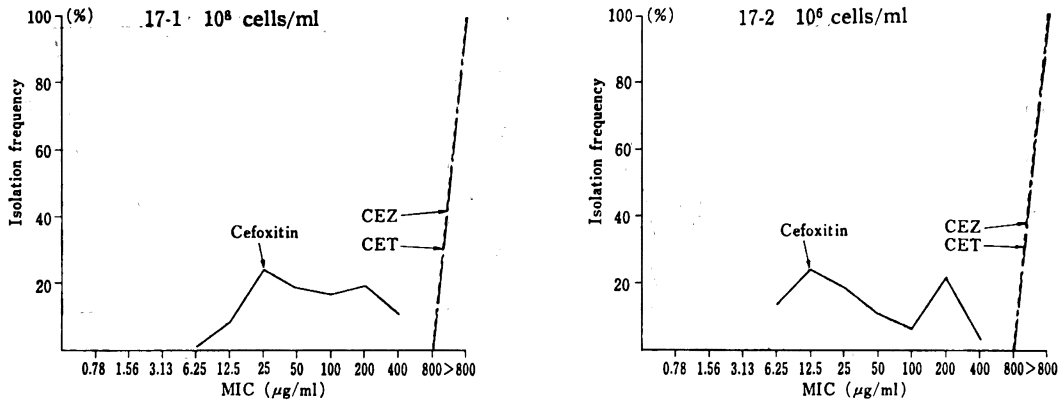


Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates *Serratia* 107 strains

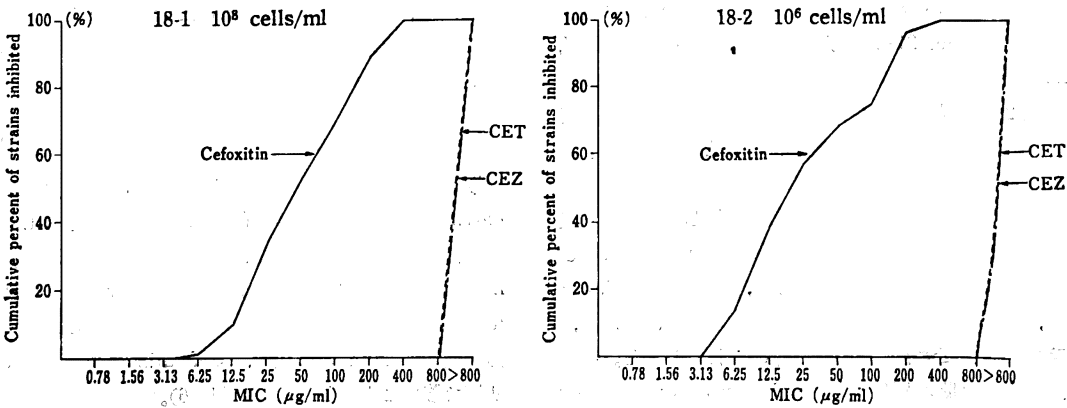
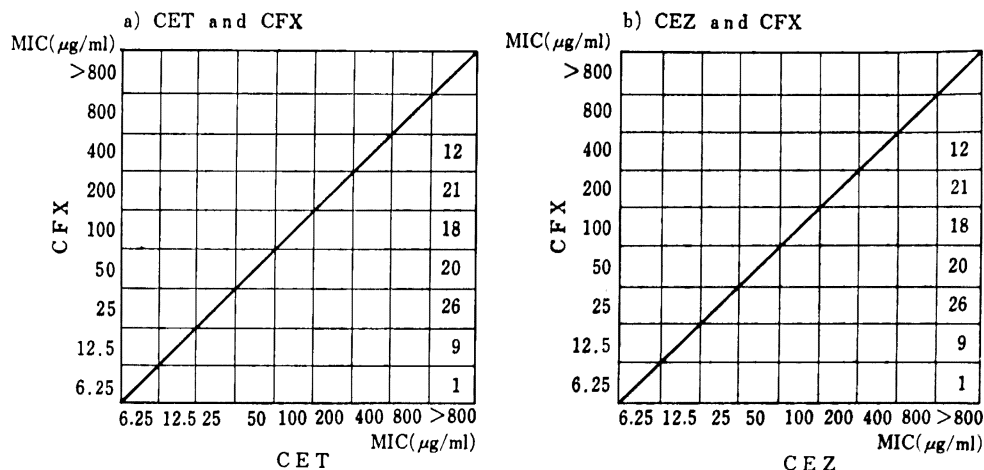
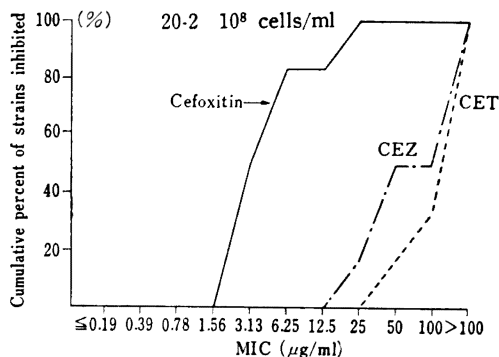
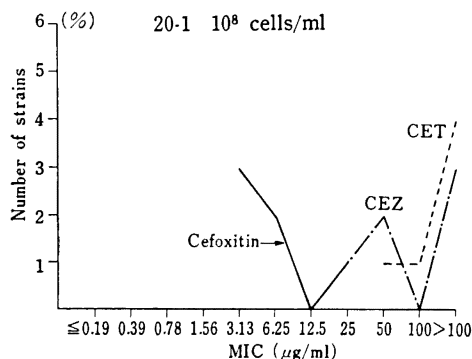


Fig. 19 Correlation of sensitivity *Serratia* 107 strains 10^8 cells/mlFig. 20 Sensitivity distribution of clinical isolates *Yersinia enterocolitica* 6 strains

に対する安定性は Fig. 21-1 に示すように、CEZ および CET よりはるかに安定であった。

また、Cefoxitin, CEZ および CET の 3 剤に耐性を示す *E. coli* No. 8 から抽出した β -lactamase に対する安定性は Fig. 21-2 に示すように、Cefoxitin, CEZ, CET の順に安定であった。

上記 2 株の *E. coli* から抽出した β -lactamase に対して Cefoxitin は非常に安定であることを確認した。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

1) 血清添加の影響: 被験 4 菌株に対して種々の濃度の血清を添加した HIB を用い、Cefoxitin, CEZ および CET の MIC 測定を行ったところ、Table 4 に示すとおり、3 剤とも血清添加による MIC の変動は少なく、抗菌力におよぼす著しい影響は認められなかった。

2) 接種菌量の影響: *Staphylococcus aureus* 209 P

に対する Cefoxitin, CEZ および CET の抗菌力は接種菌量の変化により全く影響を受けなかった。しかしグラム陰性菌 3 株 *E. coli* NIHJC-2, *Klebsiella pneumoniae* および *Proteus mirabilis* 1287 に対する CEZ および CET の MIC は接種菌量の増加につれて増大したが、Cefoxitin のそれは増大の幅が小さく抗菌力に対して接種菌量の影響をうけにくいことが分った (Table 5)。

3) pH の影響

i) 液体希釈法による MIC 測定: *Staphylococcus aureus* 209 P に対する Cefoxitin, CEZ および CET の抗菌力は酸性域で増強された。グラム陰性菌 3 株, *E. coli* NIHJC-2, *Klebsiella pneumoniae* および *Proteus mirabilis* 1287 に対する CEZ および CET の抗菌力が酸性域で強いのに比べ、Cefoxitin のそれはアルカリ域で強いことが分った (Table 6)。

Fig. 21-1 Stability of CFX, CET and CEZ to β -lactamase
E. coli No. 18

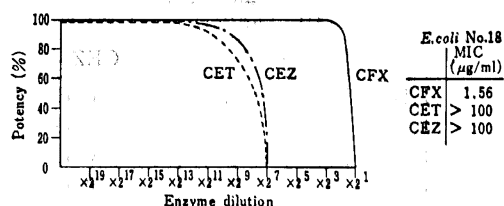
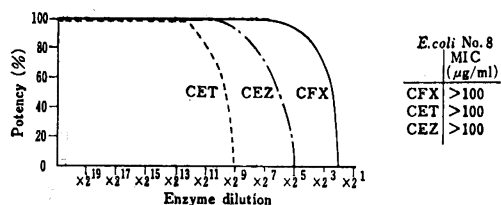


Fig. 21-2 Stability of CFX, CET and CEZ to β -lactamase
E. coli No. 8



The assay for β -lactamase degradation was performed by reaction of the extracted crude enzyme for 1 hr at 37°C with 5 μ g of cefoxitin, cephalothin and cefazolin per ml as substrate. β -lactamase activity was determined by bioassay using cylinder plate method with *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

ii) 寒天希釈法による MIC 測定：抗菌力におよぼす培地 pH の影響をより多くの菌株に対して検討するため、種々の pH に調製した HIA を用いて MIC を測定し、その変動を調べた。*E. coli* 15 株、*Salmonella* 8 株、および *Shigella* 4 株を含む合計 27 株のグラム陰性菌に対して、pH の影響を検討した結果を MIC の累積により、Fig. 22 に示した。それによると CEZ および CET の MIC は酸性域で小さい菌株が多いのに比べ、Cefoxitin のそれはアルカリ域で小さい菌株が多かった。さらに、*Klebsiella*、*Proteus* および *staphylococci* に対しても同様に検討した結果を Table 7 に示した。それによると *E. coli*、*Shigella*、*Salmonella*、*Proteus* および *Klebsiella* に対する Cefoxitin の抗菌力は pH の増大につれて増強された。一方、*staphylococci* に対する Cefoxitin の抗菌力、および *staphylococci*、グラム陰性菌に対する CEZ および CET の抗菌力は pH の減少につれて増強された。また Cepharmycin C は Cefoxitin と同様の傾向を示した。

iii) 増殖曲線におよぼす殺菌作用の検討：pH 5.5, 7.0, および 8.5 に調製した培地で発育中の *E. coli* No. 29 に対する殺菌作用を生菌数測定により検討した。その結果は Fig. 23 に示すとおり、Cefoxitin 添加 1.5 時

Table 4 Effect of Horse Serum against Antibacterial Activities of CFX, CEZ and CET by the broth dilution method^{a)}

| Test organisms | serum (%) | MIC (μ g/ml) | | |
|---------------------------------------|-----------|-------------------|------|------|
| | | CFX | CET | CEZ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC | 50.0 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 25.0 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 10.0 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 0 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 50.0 | 3.13 | 50.0 | 6.25 |
| | 25.0 | 3.13 | 25.0 | 3.13 |
| | 10.0 | 3.13 | 25.0 | 3.13 |
| | 0 | 3.13 | 12.5 | 1.56 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | 50.0 | 12.5 | 12.5 | 12.5 |
| | 25.0 | 6.25 | 6.25 | 6.25 |
| | 10.0 | 3.13 | 3.13 | 3.13 |
| | 0 | 3.13 | 3.13 | 3.13 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 50.0 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |
| | 25.0 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |
| | 10.0 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |
| | 0 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |

a) Tests were conducted in HI broth by the broth dilution method. Approximately 10^6 cells of each culture were poured into each tube.

間までは酸性で殺菌力が強いが、3 時間以上経過すると、アルカリ性で強くなった。一方 CEZ および CET の殺菌力は終始酸性で強かった。

液体希釈法および寒天希釈法による MIC 測定、さらに増殖曲線に対する殺菌作用の検討により、抗菌力におよぼす培地 pH の影響を検討した結果、CEZ、CET はじめ他の多くの β -lactam 剤の抗菌力が酸性域で増強されるのに比べ Cefoxitin のグラム陰性菌に対する抗菌力はアルカリ域で増強されることが分った⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

5. 殺菌作用の検討

Cefoxitin、CEZ および CET の MIC が等しく 3.13 μ g/ml である *E. coli* No. 29 を用い、biophotometer による濁度変化および生菌数測定により殺菌作用を検討し、また薬剤除去後の再増殖についても調べた。さらに、同調培養系を用い、cell cycle における薬剤の感受性 phase を検討した。

1) 濁度測定による検討：Biophotometer を用い、*E. coli* No. 29 の培養対数期途中、すなわち T% が 60 および 30 に達した時、薬剤を添加し、濁度変化を調べた。その結果は Fig. 24-1、-2 に示すように、いずれの接種菌量においても、薬剤添加数時間までは、MIC 濃

Table 5 Effect of inoculum size against antibacterial activities of CFX, CET and CEZ by the broth dilution method^{a)}

| Test organisms | Inoculum size (cells/ml) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------|------|
| | | CFX | CET | CEZ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC | 5.9×10^7 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 5.9×10^6 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 5.9×10^5 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 5.9×10^4 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| | 5.9×10^3 | 1.56 | 0.19 | 0.19 |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 4.7×10^8 | 12.5 | 100.0 | 25.0 |
| | 4.7×10^7 | 6.25 | 50.0 | 6.25 |
| | 4.7×10^6 | 6.25 | 25.0 | 3.13 |
| | 4.7×10^5 | 6.25 | 12.5 | 1.56 |
| | 4.7×10^4 | 3.13 | 6.25 | 1.56 |
| | 4.7×10^3 | 3.13 | 6.25 | 0.78 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | 4.2×10^7 | >100 | >100 | >100 |
| | 4.2×10^6 | 6.25 | 12.5 | 50.0 |
| | 4.2×10^5 | 3.13 | 6.25 | 12.5 |
| | 4.2×10^4 | 3.13 | 3.13 | 6.25 |
| | 4.2×10^3 | 1.56 | 1.56 | 3.13 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1.4×10^7 | 3.13 | 6.25 | 6.25 |
| | 1.4×10^6 | 3.13 | 3.13 | 3.13 |
| | 1.4×10^5 | 3.13 | 3.13 | 1.56 |
| | 1.4×10^4 | 3.13 | 1.56 | 1.56 |
| | 1.4×10^3 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |

a) Tests were conducted in HI broth by the broth dilution method.

Fig. 22 Effect of pH against antibacterial activities of cefoxitin, cephalothin and cefazolin Gram-negative bacteria 27 strains (*E.coli* 15, *Salmonella* 8 and *Shigella* 4 strains)

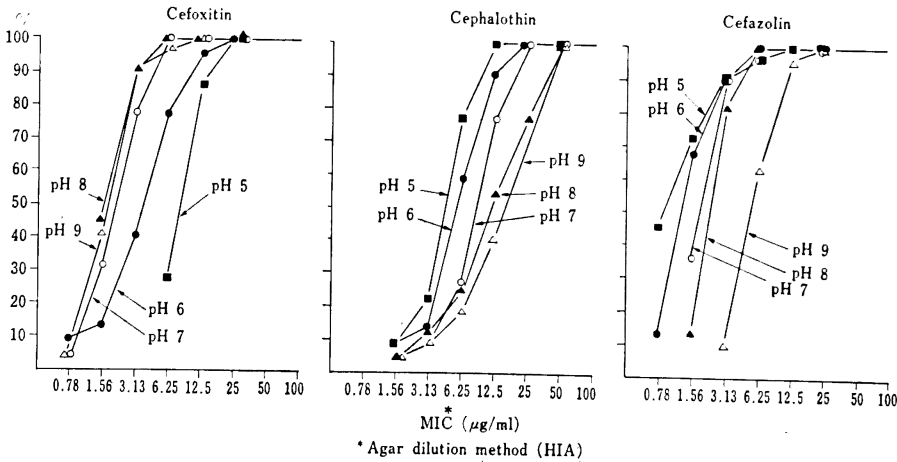


Table 6 Effect of pH upon the antibacterial activities of cefoxitin, cephalothin and cefazolin by the broth dilution method^{a)}

| Test organisms | pH | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|----------------------------------|-----|--------------------------|-------|-------|
| | | CFX | CET | CEZ |
| <i>Staphylococcus</i> 209-P | 5.0 | ----- | ----- | ----- |
| | 6.0 | 0.78 | 0.045 | 0.045 |
| | 7.0 | 1.56 | 0.09 | 0.09 |
| | 8.0 | 1.56 | 0.09 | 0.09 |
| | 9.0 | 1.56 | 0.09 | 0.09 |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 5.0 | 12.5 | 6.25 | 1.56 |
| | 6.0 | 6.25 | 12.5 | 3.13 |
| | 7.0 | 6.25 | 12.5 | 3.13 |
| | 8.0 | 3.13 | 25.0 | 6.25 |
| | 9.0 | 0.39 | 50.0 | 12.5 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | 5.0 | 3.13 | 1.56 | 6.25 |
| | 6.0 | 3.13 | 1.56 | 6.25 |
| | 7.0 | 3.13 | 1.56 | 6.25 |
| | 8.0 | 3.13 | 1.56 | 6.25 |
| | 9.0 | 3.13 | 3.13 | 12.5 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5.0 | 6.25 | 3.13 | 0.78 |
| | 6.0 | 3.13 | 3.13 | 1.56 |
| | 7.0 | 3.13 | 3.13 | 1.56 |
| | 8.0 | 3.13 | 3.13 | 1.56 |
| | 9.0 | 1.56 | 3.13 | 3.13 |

a) Tests were conducted in HI broth by the broth dilution method. Approximately 10^6 cells of each culture were poured into each tube.

度で3剤間に差は見られなかったが、 $1/2$ MIC 濃度で Cefoxitin の殺菌力が他2剤より強かった。これは、この薬剤の殺菌作用が接種菌量により影響をうけにくいことによるものであろう。また Fig. 24-1 で示されるように *E. coli* に Cefoxitin を作用させた濁度曲線は上下運動する場合がしばしば観察された。

2) 生菌数測定による検討: *E. coli* No. 29 の培養対数期途上すなわち菌量が、 10^6 cells/ml および 10^7 cells/ml に達した時に種々の濃度の薬剤を作用させ殺菌作用を検討した。

10^6 cells/ml の接種菌量では Fig. 25-1 に示すように Cefoxitin, CEZ および CET はほぼ同程度の殺菌力を示し、3剤の間に差は見られなかった。しかし 10^7 cells/ml の接種菌量では Fig. 25-2 に示すように3剤ともに高濃度で殺菌力に顕著な差は見られなかったが、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で CEZ および CET が静菌的であるのに比べ Cefoxitin は殺菌的であり、明らかに差が認められた。

3) 99.9%殺菌に要する時間と濃度の関係: *in vitro* における殺菌作用を検討するために、接種菌量の99.9%を殺菌するに要する時間と濃度の関係を Fig. 25から求め、宮本らの方法²⁶⁾により数量的処理を行い、Fig. 26に示した。Fig. 26の直線の方程式は次のとおりに表わされる。

$$\log C = -\frac{1}{N} \log t + \frac{1}{N} \log K$$

NおよびKは直線から求められる。Nの意味は殺菌作用発現が主として薬剤の濃度に依存するか、接触時間に依存するかを示す。すなわち、Nが大きい程、濃度依存性が強く、Nが小さい程、時間依存性が強い。また、Nが、同程度であればKが小さい程、殺菌力が強いことを示している。

Fig. 26において、接種菌量 10^6 cells/ml および 10^7 cells/ml とも N の値は Cefoxitin が他2剤より大きい、このことは殺菌のために、接触時間の長さよりも、薬剤濃度の高さが必要であることを示している。

接種菌量 10^6 cells/ml における CET の K の値はかなり小さいが、しかしながら、この値は CET $3.13 \mu\text{g/ml}$ で99.9%殺菌できないため2点間を結んだ直線から求めた値であり、信頼性にとぼしい。従って殺菌力 (K値) に関しては3薬剤ともほぼ同程度とみなせよう。

4) 再増殖の検討: *E. coli* NIHJC-2 の培養液に MIC 濃度の薬剤を添加し、1時間作用後、薬剤を遠心洗浄により除去し、HIB を用い再増殖させた。Cefoxitin, CEZ および CET のいずれの薬剤で処理した場合でも、Fig. 27 に示すように、0.5時間後から増殖を始め、それらの増殖速度は1時間後には無処置 control と同じになり、尾崎らの報告¹²⁾に見られるような、菌数増殖抑制時間は見られなかった。

5) 同調培養系を用いた感受性時期の検討: 温度感受性変異株、*E. coli* K 12 N 167⁷⁾ の同調培養系⁸⁾を用いた。まず同調培養開始時に種々の濃度の Cefoxitin および CET を加え、経時的に生菌数測定を行い、同調培養系の増殖曲線におよぼす薬剤の影響を検討した。Cefoxitin $0.78 \mu\text{g/ml}$, CET $3.13 \mu\text{g/ml}$ で殺菌作用がみられ、両薬剤とも $3.13 \mu\text{g/ml}$ で60分から90分にかけて著しい菌数の減少が見られた (Fig. 28)。

つぎに菌の cell age に起因する薬剤の感受性時期を検討するために、同調化した培養系から培養液を10分毎に採取し、 $100 \mu\text{g/ml}$ の Cefoxitin, CEZ および CET と10分間接触させ、生菌数測定を行った。その結果 Fig. 29に示すとおり、無処置 control の菌数が2倍に増える直前に、3薬剤とも菌数の減少が著しく、この時期が薬剤感受性 phase であることを示した。Cell cycle を HELMSTETTER-COOPER model¹³⁾により3つの時期に

Table 7 Effect of pH upon the antibacterial activities of cefoxitin, cephalothin, cefazolin and cephamycin C by the agar dilution method^{a)}

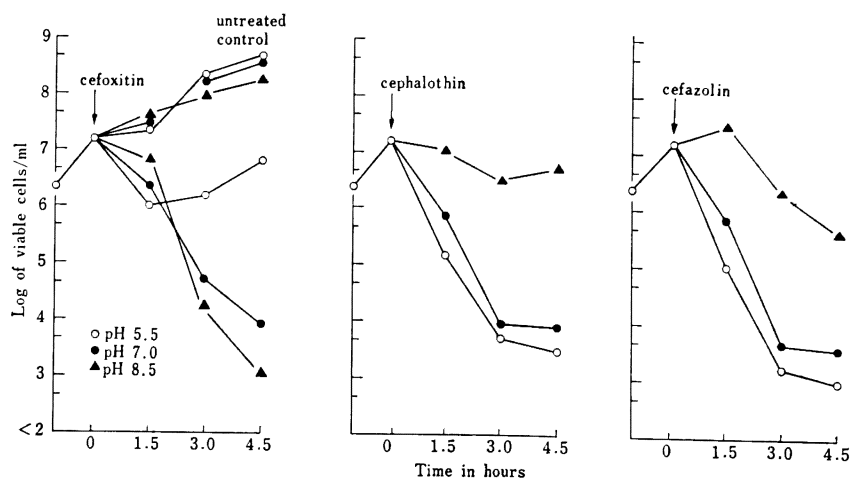
| Drugs ^{c)} | Organisms | No. ^{b)} | pH | | | | | | |
|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 8.5 | 9.0 |
| | | | Average MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
| CFX | <i>E. coli</i> | 15 | 12.9 | | 7.34 | 3.54 | 2.81 | | 2.45 |
| | <i>Shigella</i> | 4 | 4.69 | | 3.91 | 3.52 | 2.74 | | 2.35 |
| | <i>Salmonella</i> | 8 | | 36.91 | | 1.86 | | 1.71 | |
| | <i>Proteus</i> | 8 | | 21.80 | | 9.38 | | 5.86 | |
| | <i>Klebsiella</i> | 7 | | 16.4 | | 7.59 | | 4.91 | |
| | <i>Staphylo.</i> | 7 | | 0.96 | | 2.00 | | 2.68 | |
| CET | <i>E. coli</i> | 15 | 8.02 | | 10.80 | 12.60 | 14.59 | | 42.08 |
| | <i>Shigella</i> | 4 | 4.69 | | 9.38 | 12.50 | 21.88 | | 21.88 |
| | <i>Salmonella</i> | 8 | | 20.12 | | 2.88 | | 4.30 | |
| | <i>Proteus</i> | 8 | | 7.03 | | 7.30 | | 7.80 | |
| | <i>Klebsiella</i> | 7 | | 12.70 | | 12.05 | | 13.30 | |
| | <i>Staphylo.</i> | 7 | | 0.30 | | 0.60 | | 0.64 | |
| CEZ | <i>E. coli</i> | 15 | 1.25 | | 2.24 | 2.92 | 3.44 | | 9.19 |
| | <i>Shigella</i> | 4 | 2.15 | | 2.54 | 3.52 | 4.30 | | 8.60 |
| | <i>Salmonella</i> | 8 | | 13.09 | | 1.56 | | 5.86 | |
| | <i>Proteus</i> | 8 | | 10.90 | | 11.72 | | 11.72 | |
| | <i>Klebsiella</i> | 7 | | 12.95 | | 7.59 | | 12.00 | |
| | <i>Staphylo.</i> | 7 | | 1.19 | | 1.51 | | 2.62 | |
| CM C | <i>E. coli</i> | 15 | | | | | | | |
| | <i>Shigella</i> | 4 | 11.38 | | 8.83 | 7.81 | 7.10 | | 6.78 |
| | <i>Salmonella</i> | 8 | | | | | | | |
| | <i>Proteus</i> | 8 | | 43.75 | | 10.47 | | 11.72 | |
| | <i>Klebsiella</i> | 7 | | 28.57 | | 11.61 | | 9.82 | |
| | <i>Staphylo.</i> | 7 | | 41.00 | | 71.40 | | 78.57 | |

a) Tests were conducted in HI agar by the agar dilution method. Approximately 10^8 cells of each culture were placed on the surface of the plates.

b) Numbers indicate the number of isolate averaged.

c) Abbreviations of drugs are as follows; CFX: cefoxitin, CET: cephalothin, CEZ: cefazolin, CM C: cephamycin C.

Fig. 23 Effect of pH of medium upon antibacterial activities of cefoxitin, cephalothin and cefazolin against *E. coli* No. 29^{a)}



a) MIC values for cefoxitin, cefazolin and cephalothin with *E. coli* No. 29 are all, $3.13 \mu\text{g/ml}$. Drug concentrations used are all $6.25 \mu\text{g/ml}$, respectively.

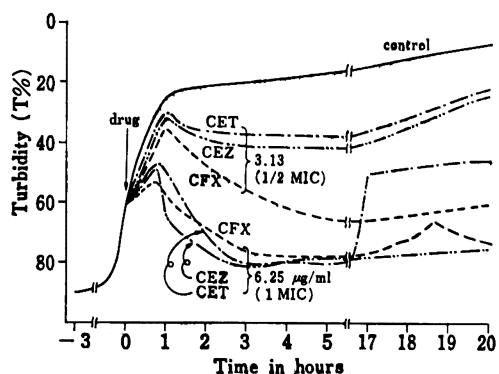
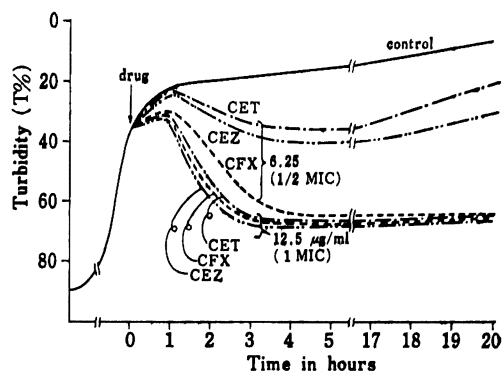
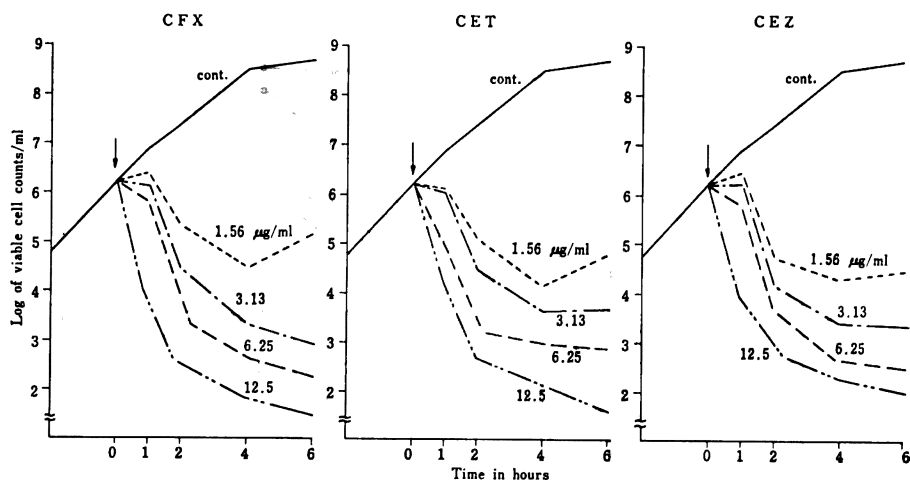
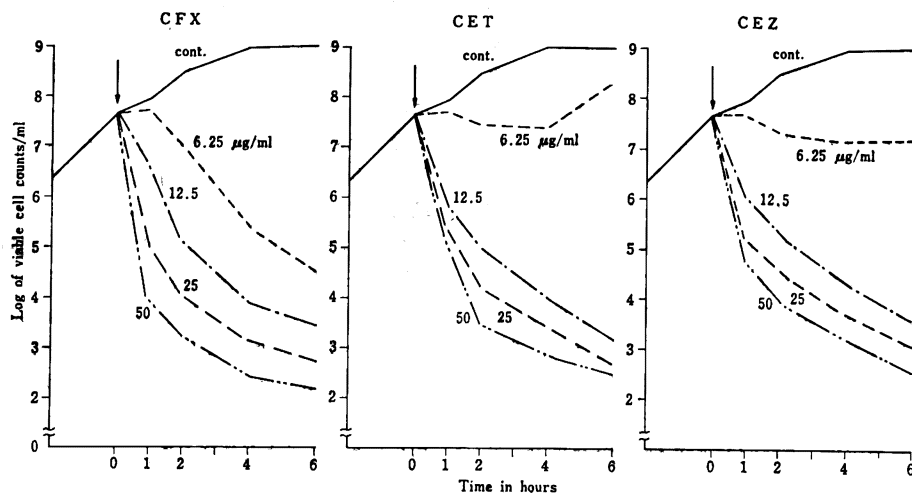
Fig. 24-1 Effects of CFX, CET and CEZ on growth curve of *E. coli* No. 29Fig. 24-2 Effects of CFX, CET and CEZ on growth curve of *E. coli* No. 29Fig. 25-1 Bactericidal effects against *E. coli* No. 29Fig. 25-2 Bactericidal effects against *E. coli* No. 29

Fig. 26-1, 2 Relation between time and concentration of cefoxitin, cefazolin and cephalothin to kill 99.9% of *E. coli* No. 29

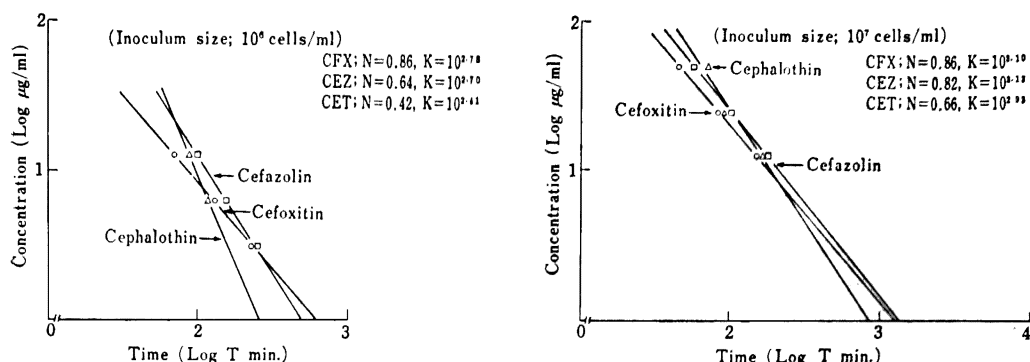
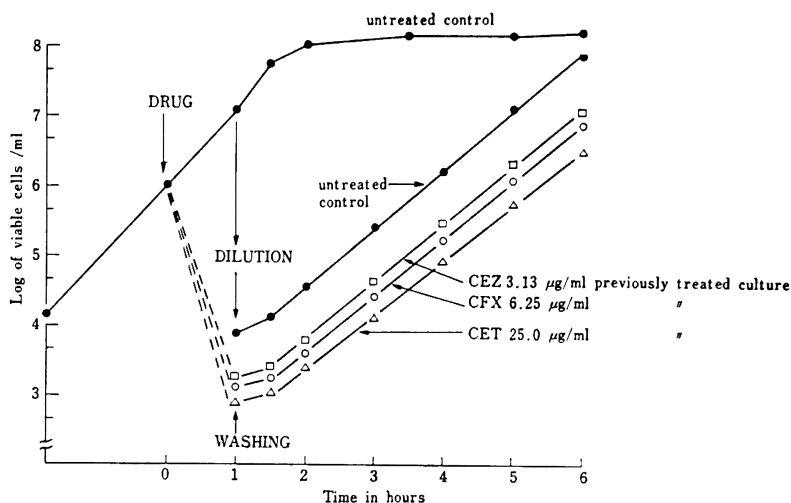


Fig. 27 Behavior *in vitro* of *E. coli* NIH JC-2 previously exposed to cefoxitin, cefazolin and cephalothin



分けると、DNA 合成が開始されるまでの“I期”，DNA 合成が行われている“C期”，および DNA 合成が終了して分裂するまでの“D期”となる。Fig. 29 で示された薬剤の感受性時期は benzylpenicillin¹⁴⁾ および Cephalixin¹⁵⁾ の感受性時期であると報告されている“C期の後半”に相当するものと思われる。従ってこの方法では Mecillinam¹⁵⁾ のような他の β -lactam 剤と異なった感受性時期は Cefoxitin においては見出せなかった。

6. 実験的マウス感染防禦効果

1) 薬剤投与時期の検討：マウス感染防禦実験における治療効果は薬剤投与時期により大きく左右され、薬剤により最適投与時期のあることが、報告されている⁶⁾。Cefoxitin の最適投与時期を検討するため、*E. coli* No. 18を用い、感染直後、2時間および4時間後に薬剤を投与し、治療効果を求めた。Fig. 30 に示すとおり、Cefo-

xitin の治療効果は CEZ および CET と同様、感染2時間後が最も優れていた。従って以後の感染治療実験では感染2時間後に薬剤を1回投与し治療効果を検討した。

2) セファロsporin感受性 *E. coli* に対する治療効果：Cefoxitin, CEZ および CET の感受性の等しい *E. coli* No. 29を用い、2段階の接種菌量に対する治療効果を求めた。Table 8 に示すように、低接種菌量(10^6 cells/mouse)での治療効果(ED_{50})は CEZ, Cefoxitin, CET の順であったが、高接種菌量(10^7 cells/mouse)での効果は Cefoxitin, CEZ, CET の順に優れていた。このことは Cefoxitin の抗菌力が接種菌量により影響を受けにくいことが、*in vitro* 同様 *in vivo* においても認められたことを示すものである。

3) セファロsporin耐性 *E. coli* に対する治療効

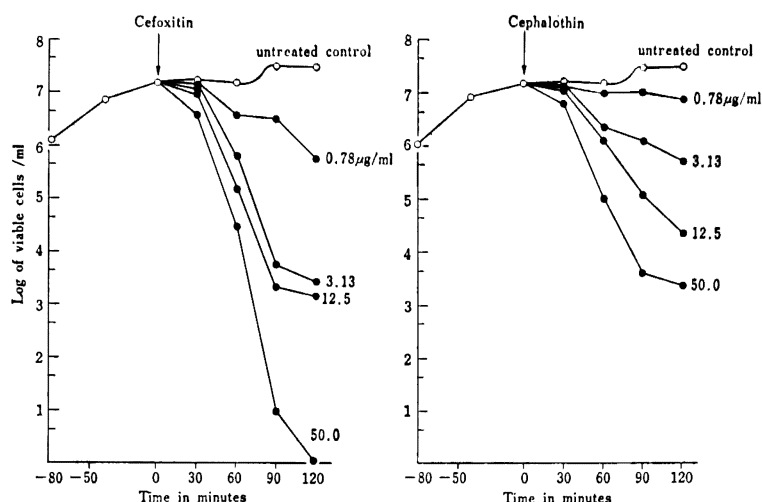
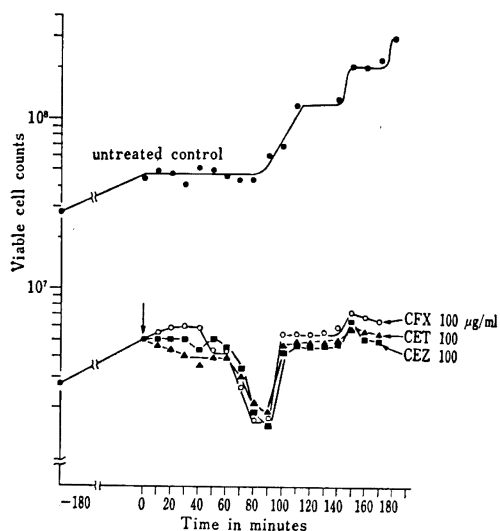
Fig. 28 Effects of cefoxitin and cephalothin against synchronous culture of *E. coli* K 12 N 167

Fig. 29 Sensitivity of cefoxitin, cefazolin and cephalothin as a function of cell age



果：Cefoxitin 感受性，CEZ および CET 耐性 *E. coli* No. 18 に対する *in vivo* 有効性を検討したところ，Table 8 に示すように，Cefoxitin，CEZ および CET の示す ED_{50} は各々 0.71，2.80 および 8.20 mg/mouse であり， 10^6 cells/ml 菌液での *in vitro* 感受性 (MIC) との間に相関性が認められた。

4) *Proteus* および *Serratia* に対する治療効果：
Proteus morganii No. 101 に対する治療効果を検討したところ，Table 9 に示すとおり，Cefoxitin，CEZ および CET の示す ED_{50} は各々 2.50，5.20 および 20.5 mg/mouse であった。CEZ および CET の有効性につ

いて，*in vitro* 有効性はほとんど認められないにもかかわらず，*in vivo* 有効性はある程度現われていたが，しかしながら Cefoxitin の効果にはおよばなかった。

Serratia marcescens T55 を用いた感染防禦効果を検討したところ，Cefoxitin，CEZ および CET の示す ED_{50} は各々 8.80， >25.0 ，および >25.0 mg/mouse であった。この菌に対する治療効果は *in vitro* 感受性とよく一致し，CEZ および CET は *in vivo* においても全く有効性を示さず，Cefoxitin のみが有効であった (Table 9)。

III. 総括ならびに考察

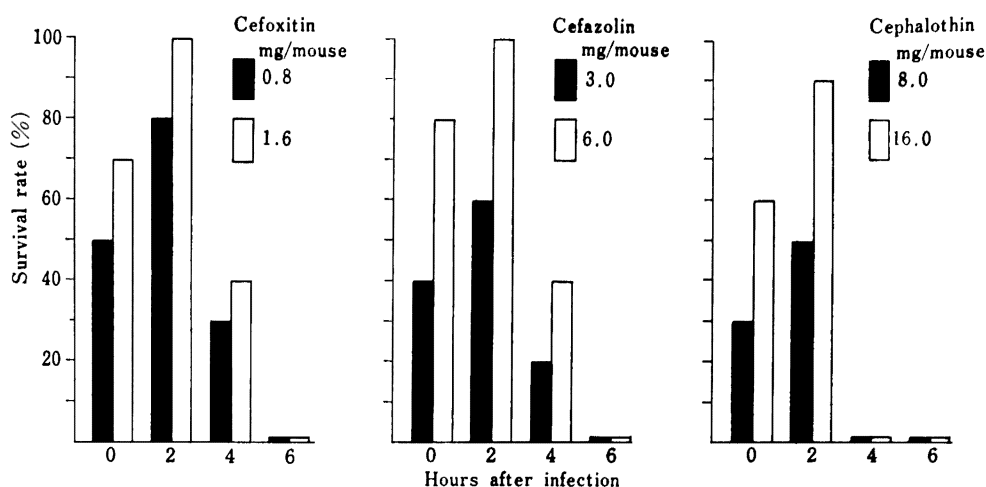
Cephalosporin 骨格の 7 α 位に methoxy 基を有する新セファマイシン系抗生物質，Cefoxitin は既知 β -lactam 抗生物質とは質的に異なった種々の性質を示した。

すなわち，既知セファロsporin系抗生物質に無効な indole 陽性 *Proteus* sp. および *Serratia* に対して有効であり，より広い抗菌スペクトラムを示した。

臨床分離株に対しても，indole 陽性 *Proteus* sp. および *Serratia* のみならず， β -lactamase を産出し，セファロsporinに耐性を示す，*E. coli*，*Klebsiella*，および *Proteus mirabilis* の大部分に有効であった。また staphylococci に対しても，Cefoxitin 6.25 μ g/ml で全株の発育を抑えており，十分に有効範囲内であろう。

Cefoxitin の抗菌力におよぼす接種菌量の影響を，MIC 測定，増殖曲線におよぼす殺菌作用，および *in vivo* 感染防禦効果により，調べたところ，CEZ および CET に比べその変動が少ないことが分った。これもまた， β -lactamase に対する強い抵抗性に起因するものと思われる¹⁷⁾。

Fig. 30 Influence of therapeutic time on therapeutic efficacy* of cefoxitin, cefazolin and cephalothin in an infection** with *E. coli* No. 18*** in mice



* once i.v. administration.

** i.p. infection with 10^6 cells/mouse.

*** MICs for cefoxitin, cefazolin and cephalothin with *E. coli* No. 18 are 1.56, >100 and >100 μ g/ml, respectively.

また、抗菌力におよぼす培地 pH の影響について、液体希釈法および寒天希釈法による MIC 測定、さらに増殖曲線におよぼす殺菌作用により検討したところ、既知 penicillin, cephalosporin 系抗生物質が酸性側で抗菌力が增強されるのに比べ⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、Cefoxitin のグラム陰性菌に対する抗菌力はアルカリ側で增強されることが分った。一方、cell wall 合成阻害を作用機作とする薬剤は細菌の保有する自己融解酵素 autolysin と協力的に働き、殺菌作用を発現すると考えられており¹⁸⁾、多くのグラム陰性菌のもつ autolysin の至適 pH は一般にアルカリ領域にあると報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。これは Cefoxitin 殺菌作用発現の至適 pH 領域と一致し、この薬剤の抗菌作用機作を追求する上で興味ある問題であろう。

この薬剤が生体に吸収された後の排泄速度は比較的速く、CET とほぼ同程度であるとされている²¹⁾。しかしながら、3 剤の感受性がほぼ等しい *E. coli* No. 29 を用いたマウス実験的感染防禦実験の成績では、CET より 2~3 倍優れ、生体内持続時間の長い、CEZ とほぼ同程度の ED₅₀ 値を示した。このことは Cefoxitin が *in vivo* において、感染菌との接触時間が短いにもかかわらず、強い治療効果を発揮する薬剤であることを示していると思われる。

また、セファロsporin に耐性を示す *E. coli*, *Proteus*, および *Serratia* に対して、*in vitro* 同様、*in vivo* においても、Cefoxitin の有効性が CEZ および CET より優れていることが確かめられた。

ま と め

新セファマイシン系抗生物質 Cefoxitin に関する細菌学的評価を、Cefazolin (CEZ) および Cephalothin (CET) を比較薬剤として検討を行い、次のような成績を得た。

1. Cefoxitin の抗菌スペクトラムに関して、グラム陽性菌に対しては CEZ および CET より抗菌力が劣った。しかしグラム陰性菌に対しては CEZ とほぼ同程度であり、CET より優れていた。また Cefoxitin はとくに indole 陽性 *Proteus* sp. に対して優れ、さらに CEZ および CET に無効である *Serratia* に対しても感受性を示した。

2. 臨床分離株に対する Cefoxitin の抗菌力は indole 陽性 *Proteus* sp. および *Serratia* のみならず cephalosporin 耐性 *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* および *Yersinia* に対しても優れた抗菌力を示した。一方 staphylococci に対しては CEZ および CET に比べ劣っていた。

3. Cephalosporin 耐性 *E. coli* から抽出した β -lactamase に Cefoxitin は非常に安定であることを確認した。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響を検討したところ、血清添加による影響はほとんど認められなかったが、接種菌量により Cefoxitin の抗菌力は CEZ および CET より影響を受けにくいことが分った。さらに pH の影響を検討したところ、CEZ および CET の抗菌力

Table 8 Protective effect of cefoxitin, cefazolin and cephalothin on experimental mice i.p. infections with *E. coli*

| Test organisms | Cells* per ml | MIC** ($\mu\text{g/ml}$) | | | Inoculum size | | ED50**** (mg/mouse)*** (95% confidence limit) | | |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|------|------|-------------------------|--------------------|--|---------------------|---------------------|
| | | CFX | CEZ | CET | $\times \text{LD}_{50}$ | Cells per mouse | Cefoxitin | Cefazolin | Cephalothin |
| <i>Escherichia coli</i> No. 29 | 10^6 | 1.56 | 0.78 | 1.56 | 50 | 5×10^6 | 0.46 (0.31-0.69) | 0.25 (0.16-0.39) | 1.02 (0.86-1.54) |
| | 10^8 | 3.13 | 3.13 | 3.13 | 500 | 5×10^7 | 0.84 (0.55-1.29) | 1.15 (0.75-1.76) | 2.45 (1.16-3.75) |
| <i>Escherichia coli</i> No. 18 | 10^6 | 1.56 | 12.5 | 25.0 | 110 | 6×10^6 | 0.71 (0.51-0.99) | 2.80 (1.86-4.28) | 8.20 (7.26-9.27) |
| | 10^8 | 1.56 | >100 | >100 | | | | | |

* Inoculum size in vitro
 ** MIC was determined by the agar dilution method.
 *** Once intravenous injection 2 hours after i.p. infection.
 **** ED 50 was calculated by the Litchfield-Wilcoxon method.

Table 9 Protective effect of cefoxitin, cefazolin and cephalothin on experimental mice infections with *Serratia marcescens* and *Proteus morganii*

| Test organisms | MIC* ($\mu\text{g/ml}$) | | | Inoculum size | | ED 50*** (mg/mouse)** (95% confidence limit) | | |
|---------------------------------|---------------------------|------|------|-------------------------|-----------------|---|---------------------|---------------------|
| | CFX | CEZ | CET | $\times \text{LD}_{50}$ | Cells/mouse | CFX | CEZ | CET |
| <i>Proteus morganii</i> No. 101 | 6.25 | 400 | >800 | 150 | 7×10^5 | 2.50 (1.72-3.63) | 5.20 (3.43-7.90) | 20.5 (13.5-31.2) |
| <i>Serratia marcescens</i> T 55 | 12.5 | >800 | >800 | 200 | 5×10^6 | 8.80 (5.85-13.3) | >25.0 | >25.0 |

* MIC was determined by the agar dilution method.
 ** Once i.v. injection 2 hours after i.p. infection.
 *** ED₅₀ values were calculated by Litchfield-Wilcoxon method.

が酸性域で増強されるのに対し、Cefoxitin のそれはアルカリ域で増強されることが分った。

5. *E. coli* の増殖曲線におよぼす殺菌効果を検討したところ、Cefoxitin は $1/2$ MIC 濃度で、また接種菌量の多い場合に、CEZ および CET より強い殺菌力を示した。

6. Cephalosporin 感受性 *E. coli* を用いた Cefoxitin のマウス実験的感染防禦効果 (ED_{50}) は CET より 2~3 倍優れ、CEZ とはほぼ同等の成績を示した。また cephalosporin に耐性を示す *E. coli*, *Proteus morganii* および *Serratia marcescens* を用いた Cefoxitin の治療効果は CEZ および CET よりはるかに優れ、*in vitro* の感受性を反映した。

文 献

- 1) ALBERS-SCHONBERG, G.; B. H. ARISON & J. L. SMITH: New β -lactam antibiotics: Structure determination of cephamycin A and B. *Tetrahedron Lett.* 29: 2911~2914, 1972
- 2) STAPLEY, E. O.; M. J. S. HERNANDEZ, S. B. ZIMMERMAN, S. A. CURRIE, S. MOCHALES, J. M. MATA, H. B. WOODRUFF & D. H. HENDLIN: Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurance* nov. sp. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 2: 122~131, 1972
- 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 & Chemoth.* 5: 38~48, 1974.
- 4) WALLICK, H. & D. HENDLIN: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Susceptibility studies. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 5: 25~32, 1974
- 5) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 23: 1~2, 1975
- 6) 宮本忠昭, 小林章男, 降矢 震: 抗生物質の抗菌力定量化の試み. *Chemotherapy* 21: 6~10, 1973
- 7) 阿部美穂子: DNA の replication と initiation の mutant. 蛋白質核酸酵素, 細菌ファージ実験法. 125~126, 1972
- 8) 阿部美穂子: 同調培養. 蛋白質核酸酵素, 細菌ファージ実験法: 84~91, 1972
- 9) 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
- 10) 中沢昭三, 西野武志, 久保田恭子, 笹埜礼子, 中尾雅文: 合成ペニシリン Nafcillin の細菌学的評価. *Chemotherapy* 19: 688~693, 1971
- 11) RETSEMA, J. A. & V. A. RAY: Correlation between the binding of β -lactam antibiotics to *Staphylococcus aureus* and their physical-chemical properties. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 2: 173~180, 1972
- 12) 尾崎 守, 西村欣也, 小林功二, 青集誠二, 木村美司, 中村光男, 小林譲二, 板倉隆志, 加藤博: 注射用 Cephalosporin C 系抗生剤の殺菌効果について, 第 1 報 *in vitro* における cephalosporin 系抗生剤の *Escherichia coli* に対する殺菌効果. *Chemotherapy* 23: 3179~3191, 1975
- 13) HELMSTETER, C. E. & S. COOPER: DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 31: 507~518, 1968
- 14) HOFFMAN, B.; W. MESSER & U. SCHWARZ: Regulation of polar cap formation in the life cycle of *Escherichia coli*. *J. Supramol. Struct.* 1: 29~37, 1972
- 15) JAMES, R.; J. Y. HAGA & A. B. PARDEE: Inhibition of an early event in the cell division cycle of *Escherichia coli* by FL 1060, an amidinopenicillanic acid. *J. Bacteriol.* 122: 1283~1292, 1975
- 16) 中沢昭三, 西野武志, 大槻雅子, 平井芳美, 中野一行, 黒田浩之, 安部史紀, 島元晴敏, 東村治樹, 油井三枝子: マウス実験的感染症に対する治療実験とその問題点について. *Chemotherapy* 23: 3285~3291, 1975
- 17) 田井 賢, 保田 隆, 高下 寛, 酒井広志, 中川三千子, 才川 勇: ペニシリン系薬剤の接種菌量による MIC の変動と β -lactamase 活性の関係について, 第 25 回日本化学療法学会総会, 1977
- 18) TERNOVE, E. H. & L. DANELO-MOORE: The role of autolytic enzymes in bactericidal effect of cell wall antibiotics. Published in 16th Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy in Chicago, 1976
- 19) ELMROS, THEIDER; LARS G. BURMAN & GUNNAR D. BLOOM: Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 126: 969~976, 1976
- 20) IZAKI, K. & J. L. STROMINGER: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell wall. XIV. Purification and properties of two D-alanine carboxypeptidases from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 242: 3193~3201, 1968
- 21) 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 & Chemoth.* 6: 338~346, 1974

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW CEPHAMYCIN ANTIBIOTIC, CEFOTIXIM

SHOZO NAKAZAWA, KENSUKE TOBE, YOSHIMI HIRAI, MASANOBU YAMAOKA,
SETSUOKO OSAKI, KAZUMI TAKAI and TAKESHI NISHINO
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Bacteriological evaluation of cefotixim (CFX), a new cephamycin antibiotic was studied in comparison with cefazolin (CEZ) and cephalothin (CET). Results were obtained as follows:

1. Antibacterial spectrum of CFX was slightly less potent on Gram-positive bacteria than that of CEZ and CET. On Gram-negative bacteria, however, that of CFX was found to be of the same order as CEZ, and it was superior to CET. Moreover, this agent was especially effective against indole-positive *Proteus* sp., and *Serratia* compared with CEZ and CET.

2. Sensitivity distribution of clinical isolates to CFX exhibited stronger activity of CFX than CEZ and CET against not only indole-positive *Proteus* sp. and *Serratia* but also against most strains of cephalosporin-resistant *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* and *Yersinia*, while slightly inferior to those of CEZ and CET against staphylococci.

3. CFX was very stable to beta-lactamase derived from cephalosporin-resistant strains of *E. coli*.

4. Antibacterial activity of CFX was not affected by the concentration of horse serum in test media, but it was influenced by inoculum size to a lesser degree as compared with those of CEZ and CET. It was clarified that the activity of CFX was enhanced at high pH, while the activities of CEZ and CET were increased at low pH.

5. Bactericidal activity of CFX was studied as to the effect on *E. coli* growth curves, and its Superiority was demonstrated versus the control drugs, when they were applied even at a half MIC, or even against large inoculum size.

6. In protective effect studies on experimental mice infection with cephalosporin-sensitive *E. coli*, the activity (ED 50) of CFX was the same degree as that of CEZ, and 2 to 3 times superior to that of CET. Against cephalosporin-resistant strains of *E. coli*, *Proteus morganii* and *Serratia marcescens*, the protective effect of CFX was further superior to those of CEZ and CET.