

Cefoxitin の嫌気性菌に対する抗菌作用

三和敏夫・望月 泉・江崎孝行・甲畑俊郎・今村博務・
小林とよ子・渡辺邦友・二宮敬宇・上野一恵・鈴木祥一郎
岐阜大学医学部微生物学教室

Cefoxitin はcephalosporin の側鎖に methoxy 基のついた構造を有する cephamycin 系の抗生物質と称されるものである。Cephalosporinase に対する耐性が強化されている点が特徴である¹⁾。

著者らは、本剤の嫌気性菌に対する抗菌作用を *in vitro* および *in vivo* で検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

使用菌株：教室保育の reference strains と各種臨床材料および人の糞便由来の嫌気性菌を用いた。これらの菌株は GAM 半流動高層培地に継代され、実験に供された。

使用薬剤：力価の明らかな Cefoxitin (CFX) を用いた。対照として Cefazolin (CEZ), Cephaloridine (CER), Ceftezole (CTZ), Ampicillin (ABPC), および Carbenicillin (CBPC) を用いた。

薬剤感受性測定法：GAM 寒天培地(ニッスイ)を用いる寒天平板希釈法によって MIC (minimum inhibitory concentration) を求めた²⁾。GAM 半流動高層培地での1夜培養菌をバスタールピペットで GAM ブイヨン(ニッスイ)に1滴接種し、37°Cで18~24時間嫌気培養した菌液を UENO's diluent³⁾で McFARLAND #1の半分の濁度に調整したものを接種菌液とした。この菌液1mlあたりの生菌数は $10^5 \sim 10^6$ 個である。

一部の菌株について、感受性測定用培地の種類、培地の pH および接種菌量の MIC への影響を検討した。感受性測定用培地は、GAM 寒天培地の他に、brain heart infusion 寒天培地 (BBL), SCHAEGLER 寒天培地 (BBL), Columbia 寒天培地 (BBL), BRUCELLA 寒天培地 (BBL) を用いた。GAM 寒天培地を除くこれらの培地には溶血させた家兎血液を5%の割合に添加して用いた。培地の pH は、GAM 寒天培地を用いて pH 6.0, 7.0 および 8.0 の3段階に変化させた。接種菌量は 10^2 , 10^4 , 10^6 および 10^8 個/ml と4段階に変化させた。

自然耐性 mutants の分布および試験管内耐性獲得：一部の菌株について、CFX と接触する前の自然耐性 mutants の分布を検討した。

つぎに同一菌株を用い、いわゆる増量的継代法⁴⁾により試験管内耐性上昇実験を行なった。

実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果：感染菌株に

Fusobacterium necrophorum (S-45) を用いた。この菌株は ddN 系マウス (体重 18~20 g, ♂) に生菌数 10^6 個以上を皮下接種すれば、2~3日で局所に被膜をもった膿瘍を形成し、放置すると腹部皮下全般に広がり死亡する。この菌株の CFX に対する MIC は $0.19 \mu\text{g/ml}$ 以下である。ddN 系マウス (体重 20 g 前後, ♂) に生菌数 10^6 個を皮下接種し、3日後確実に膿瘍形成を認めたものを実験に供した。1群4~6匹で、CFX の投与量は1日、マウス1kg当り20 mg, 100 mg, 200 mgとし、菌接種局所の反対側の大腿に筋注、あるいは尾静脈から静注を行なった。7日間の投薬後、膿瘍の消失および縮小の程度を視診、触診にて観察し、翌日マウスを屠殺剖検し、菌接種局所、心血、肺、肝、脾、腎を培養した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

教室保育の reference strains に対する CFX の抗菌作用を CTZ, CEZ, CER と比較した成績を Table 1 に示した。CFX の MIC は *Peptococcus* では $<0.19 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$, *Peptostreptococcus* では $0.39 \mu\text{g/ml}$, *Veillonella* では $0.19 \mu\text{g/ml}$, *Eubacterium* $0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$, *Clostridium* $0.78 \mu\text{g/ml}$, *Fusobacterium* $3.13 \mu\text{g/ml}$, *Bacteroides* $3.13 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ を示した。他のセファロリン系の薬剤と比較すると、*Bacteroides fragilis* に対する抗菌力が優れている。

2. 臨床分離株その他の感受性分布

主として臨床材料から分離された嫌気性菌の CFX に対する感受性分布を検討し、Table 2 に示した。とくに *Bacteroides fragilis* については5つの各亜種別に感受性分布を Table 3 に示した。CFX は、いずれの菌株に対しても優れた抗菌作用を示したが、*Bacteroides*, *Fusobacterium* に対しては、他の嫌気性菌よりもやや劣る抗菌作用を示した。*Bacteroides fragilis* に対する CFX の抗菌作用を ABPC, CBPC, CET および CEZ と比較し、Fig. 1 に示した。

CFX は *Bacteroides fragilis* に対して CBPC, CET, CEZ よりはやや優れ、ABPC とほぼ同等の抗菌力を示すことが知られた。

3. MIC に影響する因子

Table 1 Antibacterial spectrum of cefoxitin and other cephalosporin antibiotics.

Organism	CFX	CTZ	CEZ	CER
<i>P. aerogenes</i> ATCC 14963	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	0.19	0.39	0.19	0.19
<i>P. variabilis</i> ATCC 14955	0.39	0.19	0.19	0.19
<i>P. variabilis</i> ATCC 14956	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>Ps. parvulus</i> Moore 5229	0.39	0.19	0.19	0.19
<i>Ps. anaerobius</i> B 30	0.39	0.19	0.19	0.19
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17745	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>E. acrofaciens</i> ATCC 25986	1.56	0.19	1.56	0.78
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	0.39	0.19	1.56	0.19
<i>C. perfringens</i> Sakai	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>F. varium</i> ATCC 8501	3.13	3.13	1.56	6.25
<i>F. varium</i> J 43	3.13	3.13	6.25	6.25
<i>B. praeacutus</i> ATCC 25539	3.13	0.19	0.19	0.19
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> J 1035	6.25	25	25	25
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> J 1022	6.25	6.25	25	25
<i>B. fragilis</i> ss. <i>distasonis</i> J 1013	6.25	25	25	6.25
<i>B. fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i> J 1010	3.13	12.5	6.25	12.5

P.; *Peptococcus*, *Ps.*; *Peptostreptococcus*, *V.*; *Veillonella*,
E.; *Eubacterium*, *C.*; *Clostridium*, *F.*; *Fusobacterium*,
B.; *Bacteroides*

Table 2 MIC of anaerobes to CFX

Genus	No. of strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
		≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	≥ 100
<i>Peptococcus</i>	3	2	1								
<i>Peptostreptococcus</i>	2	1	1								
<i>Clostridium</i>	18	8	3	4	2	1					
<i>Propionibacterium</i>	6	4	2								
<i>Fusobacterium</i>	31	2		4	8	16	1				
<i>Bacteroides</i>	64		1	3	4	6	19	20	3	7	1

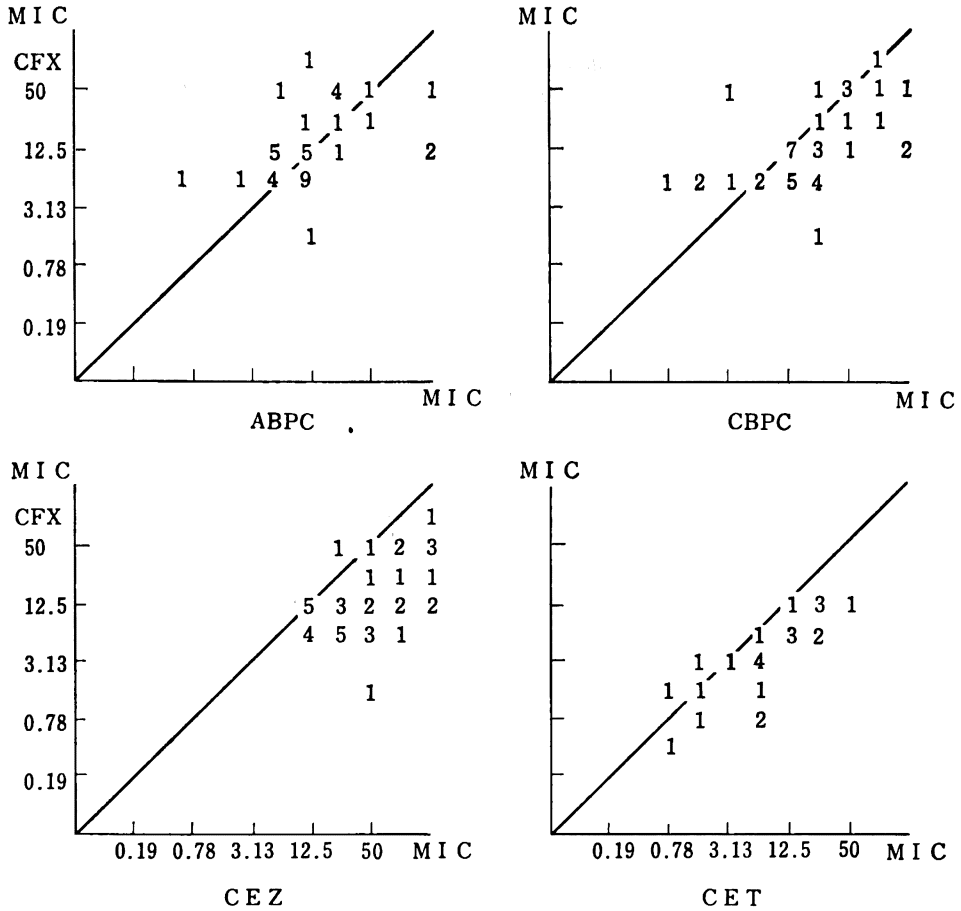
These strains were isolated from clinical specimens, human feces and soil.

Table 3 MIC of *Bacteroides fragilis* to CFX

Organism	No. of strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
		≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	≥ 50
<i>B. fragilis</i>										
ss. <i>fragilis</i>	34				1	2	10	18	1	2
ss. <i>thetaiotaomicron</i>	14				1	2	1	2	2	6
ss. <i>distasonis</i>	4			1	1		2			
ss. <i>vulgatus</i>	8		1	1		1	5			
ss. <i>ovatus</i>	2				1	1				
other	2			1			1			

These strains were isolated from clinical specimens and human feces.

Fig. 1 Correlogram of MICs of CFX, ABPC, CBPC and CEZ against *B. fragilis*



培地 pH の差異による MIC の変動を Table 4 に示した。pH 8.0 のアルカリ側で抗菌力がやや強くあらわれた。

培地の種類による MIC の変動を Table 5 に示した。一部の菌株で SCHAEGLER 寒天培地での MIC が他の培地での MIC より明らかに高くあらわれたが、残りの多くはいずれの培地を用いて MIC を測定しても、±1 希釈段階の間におさまり、変動は小さかった。

接種菌量による MIC の変動は Fig. 2 に示した。*Peptococcus variabilis* の 1 株は、菌量による影響を受けなかったが、他は全て影響を受けた。

4. 自然耐性 mutants 分布および耐性の上昇

CFX との接触前の *Peptococcus variabilis*, *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* および *F. varium* の自然耐性 mutants の分布をみた。*Peptococcus variabilis* では、CFX の 0.78 μg/ml に耐性の mutants が 10⁹ 個中 12 個検出された。*B. fragilis* ss *fragilis* では 50 μg/ml に耐性の mutants が 10⁸ 個中に 27 個検出された。*Fusoba-*

cterium varium では、50 μg/ml に耐性の mutants が 10¹⁰ 個に 6 個検出された。

耐性獲得実験の成績は Fig. 3 に示した。*Peptococcus variabilis* では 10 代継代により MIC が 0.19 μg/ml から 12.5 μg/ml に上昇した。*Fusobacterium* では 3.13 μg/ml から 25 μg/ml に上昇した。*Bacteroides fragilis* では 12.5 μg/ml から 50 μg/ml に上昇した。CFX と接種した後の CFX 耐性菌の分布を Table 6 に示した。*Peptococcus variabilis* では 12.5 μg/ml に 100% 耐性を示し、25 μg/ml に 35%、50 μg/ml に 6% 耐性を示した。*Fusobacterium varium* では、6.25 μg/ml に 100%、12.5 μg/ml に 39%、25 μg/ml に 8% 耐性を示した。*Bacteroides fragilis* は 12.5 μg/ml に 100%、25 μg/ml に 70%、50 μg/ml に 21% 耐性を示した。

5. 実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果

Table 7 に示したとおり、筋肉内注射および静脈内注射とも治療効果がみられた。すなわち対照群は全例に局所に膿瘍を認めその皮膚面は自潰していた。局所の膿か

Table 4 Influence of medium pH on the activity of CFX

Organism	Drug	pH of medium		
		pH 6	pH 7	pH 8
<i>P. aerogenes</i> ATCC 14963		0.19	0.19	0.19
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321		0.39	0.39	0.39
<i>P. variabilis</i> ATCC 14955		0.78	0.78	0.78
<i>P. variabilis</i> ATCC 14956		0.39	0.78	0.39
<i>Ps. anaerobius</i> B 30		0.39	0.78	1.56
<i>Ps. parvulus</i> Moore 5229		3.13	1.56	0.78
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17745		0.19	0.19	0.19
<i>C. perfringens</i> Sakai		1.56	1.56	3.13
<i>C. tetani</i>		0.19	0.39	0.19
<i>E. aerofaciens</i> ATCC 25986		0.39	3.13	0.19
<i>E. limosum</i> ATCC 8486		0.78	0.39	0.78
<i>B. f. ss. distasonis</i>		6.25	6.25	6.25
<i>B. f. ss. fragilis</i> J 1035		12.5	6.25	6.25
<i>B. f. ss. fragilis</i>		12.5	6.25	3.13
<i>B. f. ss. fragilis</i> J 1022		12.5	6.25	6.25
<i>B. f. ss. vulgatus</i> J 1010		6.25	3.13	3.13
<i>B. f. ss. vulgatus</i>		6.25	3.13	3.13
<i>B. f. ss. thetaiotaomicron</i> J 1025		25	6.25	12.5
<i>B. melaninogenicus</i>		12.5	3.13	3.13
<i>B. praeacutus</i> ATCC 25539		3.13	3.13	3.13
<i>F. varium</i> ATCC 2004		6.25	6.25	6.25
<i>F. varium</i> ATCC 8501		3.13	3.13	3.13
<i>F. varium</i>		3.13	3.13	3.13

Fig. 2 Effect of inoculum size on antibacterial activity of CFX

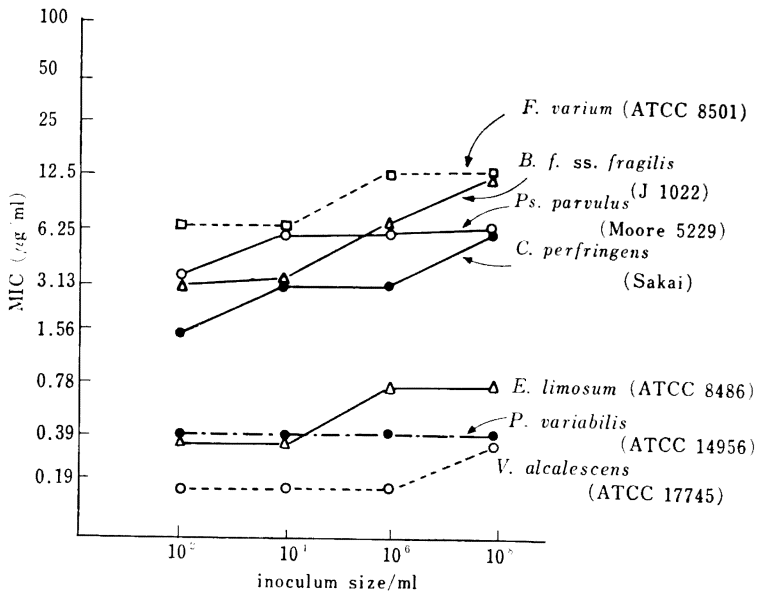


Table 5 MIC of CFX on various media

Organism	GAM	Colum*	BHI**	Schaed***	Brucella
<i>P. aerogenes</i> ATCC 14963	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>P. variabilis</i> ATCC 14955	0.39	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>P. variabilis</i> ATCC 14956	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>Ps. anaerobius</i> B 30	0.39	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>Ps. parvulus</i> Moore 5229	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17745	0.19	3.13	3.13	3.13	0.19
<i>C. perfringens</i> Sakai	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>C. tetani</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>E. aerofaciens</i> ATCC 25986	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	0.39	0.78	0.78	0.39	0.19
<i>B. f. ss. distasonis</i>	6.25	25	12.5	12.5	12.5
<i>B. f. ss. fragilis</i> J 1035	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25
<i>B. f. ss. fragilis</i>	6.25	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>B. f. ss. fragilis</i> J 1022	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>B. f. ss. vulgatus</i> J 1010	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>B. f. ss. thetaiotaomicron</i> J 1025	12.5	50	25	25	25
<i>B. melaninogenicus</i>	1.56	3.13	0.78	1.56	1.56
<i>B. praeacutus</i> ATCC 25539	3.13	0.78	1.56	12.5	3.13
<i>F. varium</i> ATCC 2004	6.25	6.25	6.25	12.5	3.13
<i>F. varium</i> ATCC 8501	3.13	3.13	3.13	25	3.13
<i>F. varium</i>	3.13	6.25	3.13	50	12.5

* Colum.: Columbia agar

** BHI: Brain Heart Infusion agar

*** Schaed.: Schaedler agar

These four media were used as 5% blood plate, but GAM was used without blood.

Table 6 Population of resistant cells to CFX after serial subcultures in GAM semisolid medium with CFX

Organism	No. of serial subcultures	No. of* colony tested	No. of resistant strains				
			6.25	12.5	25	50	100 µg/ml
<i>P. variabilis</i>	10	51	51	51	18	3	0
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i>	10	53	53	53	37	11	0
<i>F. varium</i>	10	52	52	39	4	0	0

* : After 3 subcultures passaged in media (GAM semisolid) without CFX, the culture was streaked on GAM agar plates and 51, 52 and 53 colonies were obtained.

And then, CFX resistance of these colonies was examined on plates containing CFX.

らは全例に多数の *Fusobacterium necrophorum* を検出した。臓器培養では、脾 6 匹中 6 匹、肝、腎、肺各々 6 匹中 5 匹、心血 6 匹中 3 匹に *Fusobacterium necrophorum* を検出した。CFX 投与群では、投与量 200 mg/kg/日では、筋肉内注射、静脈内注射共、膿瘍は全く消失していた。100 mg/kg/日では、筋肉内注射では 5 匹中 3 匹、静脈内注射では 4 匹中 1 匹に自潰した膿瘍を認めた。局所の膿からは、筋肉内注射では 5 匹中 3 匹、静脈内注射

では 4 匹中 1 匹から、*Fusobacterium necrophorum* を検出した。20 mg/kg/日では明らかな治療効果は認められなかった。

ま と め

著者らは CFX の嫌気性菌に対する抗菌力を教室保育株を用いて検討した。さらに本剤の嫌気性菌に対する感受性と使用培地、培地 pH、接種菌量との関係についても検討した。本剤の自然耐性 mutants の population,

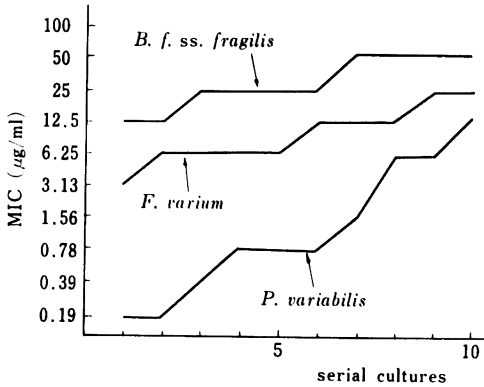
Table 7 Chemotherapeutic effect of CFX subcutaneous abscess of mouse due to *F. necrophorum*

Dose (/kg/mouse/day) and route of injection	Survival rate (%)	Mouse number	Local finding	Recovery of organism from**					
				A	Li	S	K	H	Lu
200 mg i.v.	4/4 (100%)	1	ulcer w/o pus	-	-	-	-	-	-
		2	"	-	-	-	-	-	-
		3	granulation	-	-	-	-	-	-
		4	"	-	-	-	-	-	-
100 mg i.v.	4/4 (100%)	1	ulcer with pus	+	+	+	+	+	-
		2	ulcer w/o pus	-	-	-	-	-	-
		3	"	-	-	+	+	+	-
		4	"	-	-	-	-	-	-
20 mg i.v.	3/4 (75%)	1	ulcer with pus	+	+	+	+	-	+
		2*	"	+	-	+	+	+	+
		3	"	+	+	+	+	-	+
		4	"	+	+	+	+	-	+
200 mg i.m.	5/5 (100%)	1	ulcer w/o pus	-	-	-	-	-	-
		2	"	-	-	-	-	-	-
		3	"	-	-	-	-	-	-
		4	granulation	-	-	-	-	-	-
		5	"	-	-	-	-	-	-
100 mg i.m.	5/5 (100%)	1	ulcer with pus	+	+	+	+	-	-
		2	"	+	-	-	-	-	-
		3	"	+	-	-	-	-	-
		4	granulation	-	-	-	-	-	-
		5	"	-	-	-	-	-	-
20 mg i.m.	4/5 (80%)	1	ulcer with pus	+	+	+	+	-	-
		2	"	+	+	+	+	+	+
		3	"	+	-	-	-	-	-
		4	"	+	-	+	+	-	-
		5*	"	+	+	-	+	+	-
Control	3/6 (50%)	1	ulcer with pus	+	+	+	+	+	+
		2	"	+	+	+	+	-	+
		3*	"	+	+	+	+	+	+
		4*	"	+	+	+	+	+	+
		5*	"	+	-	+	-	-	+
		6	"	+	+	+	+	-	-

* Mouse died

** A: Abscess, Li: Liver, S: Spleen, K: Kidney, H: Heart, Lu: Lung

Fig. 3 Development of resistance of *P. variabilis*, *B. fragilis* ss. *fragilis* and *F. varium* *in vitro* to CFX



試験管内耐性上昇についても検討を加えた。また実験的嫌気性菌感染症の治療実験も行なった。

本剤は、嫌気性菌感染症に対しても臨床効果が期待される薬剤である。また本剤の特徴としてあげられている

β -lactamase に対する抵抗性は、 β -lactamase を産生する菌種である *B. fragilis* で、その MIC が他のセファロsporin系の薬剤の MIC より小さいことで確かめられた。

文 献

- 1) 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
- 2) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について 1 MIC に影響する因子。 *Chemotherapy* 22: 1459~1465, 1975
- 3) BALLOW, A.: "Anaerobic Bacteria: Role in Disease", C. C. Thomas, Springfield, U. S. A., 1973
- 4) 上野一恵, 二宮敬宇, 神谷春子, 渡辺邦友, 鈴木祥一郎: Sulfobenzylpenicillin の嫌気性菌に対する抗菌作用について。 *Chemotherapy* 19: 875~880, 1971

CEFOXITIN: ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST ANAEROBES

TOSHIO MIWA, IZUMI MOCHIZUKI, TAKAYUKI EZAKI, SHUNRO KOBATA,
HIROMU IMAMURA, TOYOKO KOBAYASHI, KUNITOMO WATANABE, KEIU NINOMIYA,
KAZUE UENO and SHOICHIRO SUZUKI

Department of Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

Present paper describes results of the following studies on cefoxitin (CFX): (1) Antimicrobial activity against stock cultures of anaerobes, (2) Influence of medium used, medium pH and inoculum size on antimicrobial activity, (3) Population of spontaneous mutants, (4) Acquisition of resistance *in vitro*, and (5) Chemotherapeutic effect on experimental anaerobic infection in mice.

From the results, CFX was considered to be a useful antibiotic for clinical treatment of anaerobic infections. Resistance to hydrolysis by β -lactamase, a main characteristic of CFX, was confirmed by obtaining smaller values of minimum inhibitory concentrations of CFX than that of other cephalosporins against enzyme-producing species of *Bacteroides fragilis*.