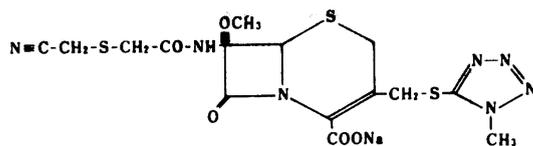


CS-1170に関する細菌学的研究

西野武志・宇津井 幸男・中沢昭三
京都薬科大学 微生物学教室

CS-1170は三共株式会社中央研究所において開発された新しいcephamycin系抗生物質である。化学名は、Sodium (6R,7S)-7-[2-(cyanomethylthio)acetamido]-7-methoxy-3-[[[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo(4.2.0)oct-2-ene-2-carboxylateで、セファロスポラン酸の7位にメトキシ基¹⁾を有している(Fig.1)。本剤は、分子式が

Fig. 1 Chemical structure of CS-1170



$C_{18}H_{18}N_7O_6S_2Na$ 、分子量が493.50の白色ないし微黄白色の粉末で、水、メタノール、アセトンなどに易溶の物質である。本剤は、グラム陽性、陰性菌群に対し広範囲な抗菌力を有し²⁾、特に7位にメトキシ基を有するために細菌の産生する β -lactamaseに強い抵抗性を示し³⁾、近年临床上問題となっているグラム陰性桿菌、なかでもpenicillinやcephalosporinに耐性の*Escherichia coli*やインドール陽性の*Proteus*群、*Serratia marcescens*などにすぐれた抗菌力を有する。今回、私どもはCS-1170の細菌学的評価をCephalothinとCefazolinを比較薬剤として検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

薬剤としては、CS-1170、Cephalothin(CET)、Cefazolin(CEZ)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群およびグラム陰性菌群に対する試験管内抗菌力(MIC: $\mu\text{g/ml}$)を日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法⁴⁾により求めた。すなわち前培養にTryptosoy Broth(TSB; Nissan)を用い、測定用培地にはHeart Infusion Agar(HIA; Nissan)を用い、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群、Corynebacterium diphtheriaeについては10%馬血液添加HIAを用いて37°C、20時間培養後のMICを、また嫌気性菌群のClostridium tetani、Clostridium perfringensにはチオグリコール酸塩培地

(TGC; Nissan)を、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidisにはGonococcus培地(GC; Nissan)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

臨床分離のStaphylococcus aureus 51株、Escherichia coli 61株、Klebsiella pneumoniae 41株、Serratia marcescens 54株、Proteus mirabilis 24株、インドール陽性のProteus 67株について日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法にしたがって、原液(10^8 cells/ml)とその100倍希釈液(10^6 cells/ml)とを接種し感受性を求めた。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす培地pH、馬血清添加、接種菌量の影響について、Staphylococcus aureus 209 P-JC、Escherichia coli NIHJ JC-2、Proteus mirabilis 1287、Klebsiella pneumoniae 124を試験菌として、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を検討した。すなわち培地pHの影響では、pHを5、6、7、8、9に調整した培地中でのMICの変動を、馬血清添加の影響では馬血清を0%、10%、25%、50%に含む培地中でのMICの変動により検討した。また接種菌量の影響では培地中の菌量を $10^8 \sim 10^7$ cells/mlとした10倍希釈系列でのMICの変動により検討した。

5. 増殖曲線におよぼす影響

Biophotometerを用いて増殖曲線におよぼす影響について検討を行った。すなわちTSBで、Escherichia coli No.29(cephalosporin感受性株)およびEscherichia coli No.21(cephalosporin耐性株)を前培養し、Escherichia coli No.29はHIBに、またEscherichia coli No.21はTSBにおおの 10^6 cells/mlとなるように接種し、約3時間培養後の対数期途上に、CS-1170、CET、CEZを添加し、以後濁度の変化を観察すると同時に経時的に生菌数測定を行った。

6. 血清中および臓器内濃度

滅菌蒸留水でCS-1170、CET、CEZをそれぞれ1mg/mouse(50mg/kg)となるように溶解し、ddY系雄マウス(1群4匹)に皮下投与した。以後7.5、15、30、60、90、120分目にクロロホルム麻酔下に採血と臓器(肝、腎、肺、脾)の抽出を行った。血液は遠心(3000rpm、10分)

により血清を分離し、また臓器は1/15M PBS (pH6.5) でホモジネートを作り、いずれもペーパーディスクにしみこませ、これを *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする薄層平板上に置き、37°C 20時間培養後に薬剤濃度の測定を行った。

7. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウス実験的感染症に対する治療効果を、以下の9株を用いて検討した。マウスは ddY 系雄、体重18~20g のものを1群10匹として用いた。

(a) *Escherichia coli* No.29 および cephalosporin 耐性の *Escherichia coli* No.21, *Klebsiella pneumoniae* 138, *Proteus morgani* 101, *Proteus vulgaris* 109, *Serratia marcescens* T-55 感染症に対する治療効果

それぞれの菌株を Nutrient Broth (NB; Nissan) で 37°C 24時間培養後、さらに同培地に継代し 37°C で14時間振とう培養を行った。この菌液を NB にて適宜希釈後、6% gastric mucin と等量混合し、その0.5ml をマウス腹腔内に接種した。接種後2時間目に1回、CS-1170, CET, CEZ で皮下治療を行い、7日後の生存率よりおのこの薬剤の ED₅₀ 値を求めた。

(b) *Klebsiella pneumoniae* 感染症に対する治療効果 NB で24時間培養後、さらに同培地に継代し、37°C で18時間静置培養した。この菌液を生理食塩水にて希釈し、6% gastric mucin と等量混合した。その0.5ml をマウス腹腔内に接種し、2時間後に1回皮下治療を行い、おの

この薬剤の ED₅₀ 値を求めた。

(c) *Streptococcus pneumoniae* type III 感染症に対する治療効果

10% 馬血清加肉汁パイオンで18時間培養後、さらに17時間肉汁パイオンで静置培養を行った。この菌液を生理食塩水にて希釈しその0.25ml をマウス腹腔内に接種した。おのこの薬剤を接種2時間後に1回皮下治療し ED₅₀ 値を求めた。

(d) *Escherichia coli* ST-0198 感染症に対する治療効果

TSB で20時間前培養した菌液を HIA の斜面に塗抹して18時間培養した。これを白金耳でかき取り、calf serum を10% 加えた HIB に浮遊して-80°C のディープ・フリーザーにて保存した。実験当日室温にて融解後、HIB にて希釈し、6% gastric mucin と等量混合し、その0.5ml をマウス腹腔内に接種した。薬剤は感染2時間後に1回皮下治療し ED₅₀ 値を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性および陰性菌群に対する試験管内抗菌力について検討した結果を Table 1, 2 に示した。すなわち 10⁷ cells/ml の菌液を1白金耳接種し MIC (μg/ml) を求めたもので、CS-1170 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、特にグラム陰性菌群に対し優れた抗菌力を有していた。その抗菌力を他

Table 1 Antibacterial spectrum of CS-1170 (Gram-positive bacteria)

MIC (μg/ml)

Test strain	CS-1170	CET	CEZ
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	0.19	0.19
" SMITH	1.56	0.19	0.19
" TERAJIMA	1.56	0.78	0.78
" NEUMANN	0.78	0.78	0.78
" E-46	1.56	0.39	0.39
" No. 80	1.56	0.78	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.78	0.78	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.39	0.19	0.39
" COOK	0.78	0.19	0.19
<i>Streptococcus faecalis</i>	50	50	100
<i>Streptococcus viridans</i>	50	100	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.39	0.19	0.19
" II	0.78	0.19	0.09
" III	0.39	0.19	0.19
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.78	0.39	0.39
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.19	0.09	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	0.022	0.19
<i>Bacillus anthracis</i>	3.13	0.19	0.19
<i>Clostridium tetani</i>	0.19	0.39	0.19
<i>Clostridium perfringens</i>	3.13	3.13	1.56

Table 2 Antibacterial spectrum of CS-1170 (Gram-negative bacteria)

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

Test strain	CS-1170	CET	CEZ
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.78	0.39	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.19	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	1.56	25	3.13
" NIH	1.56	12.5	3.13
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	25	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.19	0.78	0.78
" O-901	0.39	0.78	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.19	1.56	3.13
" B	0.78	1.56	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.78	6.25	3.13
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	1.56	6.25	3.13
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	1.56	6.25	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW-28	1.56	25	3.13
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.78	12.5	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.78	3.13	3.13
" NCTC 9632	0.78	3.13	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	>100	>100
" NCTC 10006	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	6.25	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	12.5	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	1.56	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	3.13	3.13	6.25
<i>Proteus morgani</i> KONO	6.25	>100	>100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.78	>100	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	12.5	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100
" Nc-5	>100	>100	>100

の薬剤と比較すると、グラム陽性菌群の *Staphylococcus aureus* 6株に対しては、CS-1170は0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$ 、CETは0.19~0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、CEZは0.19~1.56 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を有しCET>CEZ>CS-1170の順に優れていた。*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*に対しては、CS-1170は0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、CETは0.19 $\mu\text{g/ml}$ 、CEZは0.09~0.39 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し、CET>CEZ>CS-1170の順に優れていた。ほかに *Corynebacterium diphtheriae*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus anthracis* などに対してもCETが最も優れ、次いでCEZ>CS-1170の順であった。

一方、グラム陰性菌群では、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Salmonella*、*Shigella* などに対して、CS-1170は0.19~1.56 $\mu\text{g/ml}$ 、CETは0.78~25 $\mu\text{g/ml}$ 、CEZは0.78~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の抗菌力を有し、CS-1170>CEZ>CETの順に優れていた。また *Serratia marcescens* およびインドール陽性の *Proteus* に対して、CS-1170は0.78~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に抗菌力を有するのに対し、CET、CEZは>100 $\mu\text{g/ml}$ を示し全く抗菌力がなかつ

た。*Enterobacter* および *Pseudomonas aeruginosa* には3剤とも>100 $\mu\text{g/ml}$ で抗菌力は認められなかった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布および感受性相関

臨床分離の *Staphylococcus aureus* 51株、*Escherichia coli* 61株、*Klebsiella pneumoniae* 41株、*Serratia marcescens* 54株、*Proteus mirabilis* 24株、インドール陽性の *Proteus* 67株についての感受性分布および相関性を検討した結果を Fig. 2~37に示した。

(1) *Staphylococcus aureus* の場合

Fig. 2は 10^8 cells/mlの菌液を1白金耳接種し、MIC($\mu\text{g/ml}$)を求めた分布で、Fig. 3はその時の累積百分率を示している。CS-1170は0.78~3.13 $\mu\text{g/ml}$ 、CETは0.19~0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、CEZは0.39~3.13 $\mu\text{g/ml}$ に分布し耐性株は認められなかった。

10^6 cells/ml接種ではFig. 4、5に示すように 10^6 cells/ml接種に比べてCET、CEZともに2倍感受性が良好となったがCS-1170は変わらなかった。いずれの場合にもCET>CEZ>CS-1170の順に良好な感受性を示した。

また感受性相関ではFig. 6、7に示すようにCS-1170

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staph. aureus* 51 strains 10^8 cells/ml

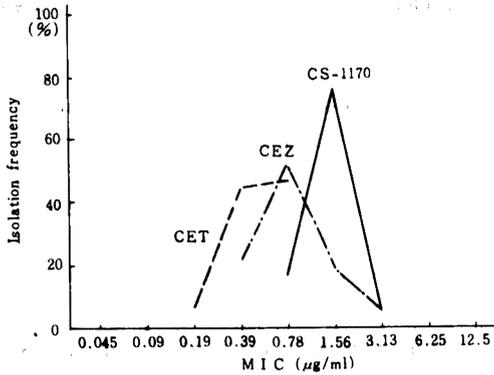


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staph. aureus* 51 strains 10^8 cells/ml

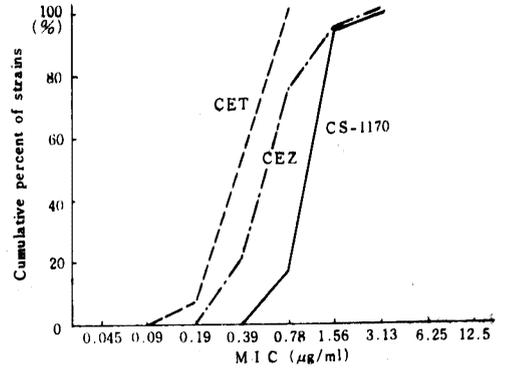


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staph. aureus* 51 strains 10^6 cells/ml

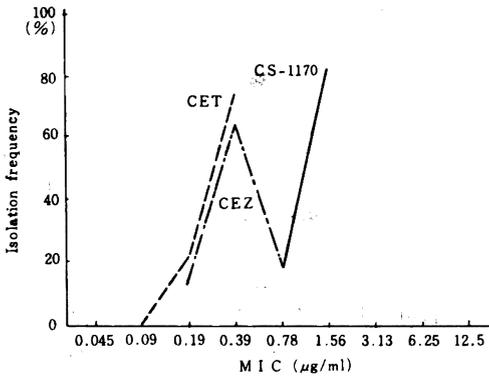


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staph. aureus* 51 strains 10^6 cells/ml

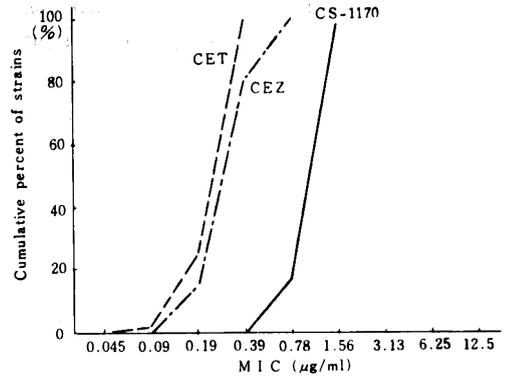


Fig. 6 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *Staph. aureus* 51 strains

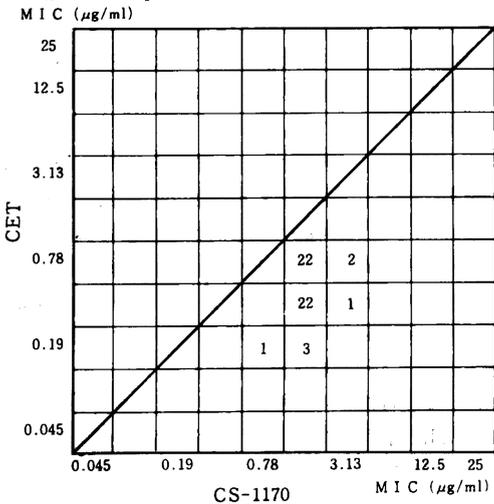
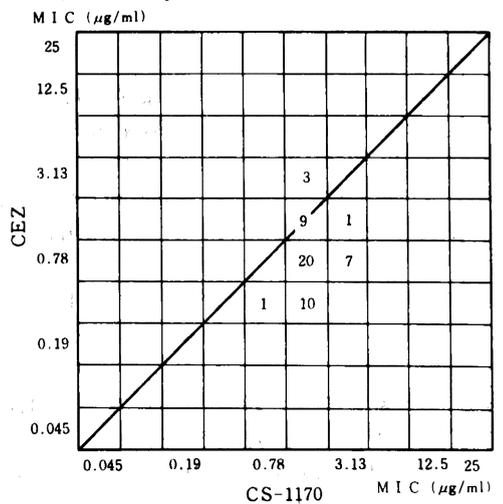


Fig. 7 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *Staph. aureus* 51 strains



と CET, CEZ との間にはほぼ相関性が認められた。

(2) *Escherichia coli* の場合

Escherichia coli では *Staphylococcus aureus* の場合と異なり, CS-1170 が最も優れた感受性を示した。すなわち 10^8 cells/ml 接種の場合, Fig. 8, 9 に示すように CS-1170 は $0.78 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ に約 90% 以上が分布し, CEZ は $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に約 80%, CET は $6.25 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ に約 70% が分布した。

10^6 cells/ml 接種では Fig. 10, 11 に示すように CS-1170 の抗菌力は 2 倍, CEZ は 4 倍, CET は 8 倍程度良好となった。いずれの場合にも CS-1170 > CEZ > CET の順に優れていた。

また感受性相関では, Fig. 12, 13 に示すように CS-1170 と CET, CEZ との間に交差耐性が認められなかった。すなわち CET, CEZ に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株に対しても CS-1170 は $25 \mu\text{g/ml}$ 以下で増殖を抑制した。

(3) *Klebsiella pneumoniae* の場合

いずれの菌量でも CS-1170 が *Escherichia coli* の場合と同様最も優れた抗菌力を示した。すなわち 10^8 cells/ml 接種の場合, Fig. 14, 15 に示すように CS-1170 は $0.78 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に分布し約 90% 以上が, $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

一方, CET や CEZ では $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株がそれぞれ約 40%, 約 25% 存在した。

また 10^6 cells/ml 接種では, Fig. 16, 17 に示すように CS-1170 は 10^8 cells/ml 接種の場合とほぼ同程度の抗菌力を示し, CET では 8 倍程度, CEZ では 4 倍程度感受性が良好となった。

感受性相関は Fig. 18, 19 に示すように CS-1170 は CET, CEZ に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株に対しても $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の濃度で完全に増殖を抑制し, 交差耐性が認められなかった。

(4) *Serratia marcescens* の場合

Serratia marcescens に対しては, Fig. 20, 21, 22, 23 に示すように 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml 接種のいずれの場合でも, CET, CEZ はともに $800 \mu\text{g/ml}$ で抗菌力を示さなかった。一方, CS-1170 は $6.25 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布し, 約 50% の株には $25 \mu\text{g/ml}$ 以下の抗菌力を有していた。

また Fig. 24, 25 に示すように CS-1170 と CET および CEZ との間には全く相関性は認められなかった。

(5) *Proteus* の場合

インドール陽性, 陰性の *Proteus* に対しても CS-1170 が CET や CEZ よりも優れた抗菌力を示した。すなわちインドール陰性の *Proteus mirabilis* に対しては, 10^6 cells/ml 接種の場合, Fig. 26, 27 に示すように CS-1170

は $1.56 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ に感受性を示したが, CET, CEZ では $25 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す株も約 25% 存在した。

10^6 cells/ml 接種では Fig. 28, 29 に示すように 3 薬剤とも約 2 倍抗菌力は良好となった。

また Fig. 30, 31 に示すように CET, CEZ に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株にも CS-1170 は $3.13 \mu\text{g/ml}$ と良好な抗菌力を示し, 交差耐性は認められなかった。

一方, インドール陽性株に対しては Fig. 32, 33 に示すように 10^6 cells/ml 接種の場合, CS-1170 は $1.56 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布するが約 80% は $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。これに対し CET, CEZ では約 80% が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。

10^6 cells/ml 接種では Fig. 34, 35 に示すように CS-1170 は 2 倍程度抗菌力は良好となるが, CET, CEZ では 10^6 cells/ml 接種の場合とほとんどかわりがなかった。

また, 感受性相関は Fig. 36, 37 に示すように CET, CEZ に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株に対しても, CS-1170 は優れた抗菌力を示し, 相関関係はほとんど認められなかった。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

Staphylococcus aureus 209P-JC, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Proteus mirabilis* 1287, *Klebsiella pneumoniae* 124 を用いて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結果を Table 3, 4, 5 に示した。

培地 pH の影響では, *Staphylococcus aureus* の場合 CS-1170, CET, CEZ ともに酸性側で抗菌力が良くなった。しかし, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* の場合, CS-1170 ではアルカリ側で抗菌力が良好となり, 逆に *Klebsiella pneumoniae* に対する CET の場合を除き CET, CEZ では酸性側で抗菌力が良好となった。

馬血清の影響では添加量が増大するに伴い, CS-1170, CET, CEZ ともにいずれの株に対してもやや抗菌力の減弱が認められた。

また, 接種菌量の影響では, CET, CEZ ともに *Proteus mirabilis* の場合, 10^6 cells/ml ~ 10^7 cells/ml の付近で $12.5 \mu\text{g/ml}$ から $> 100 \mu\text{g/ml}$ と大きな変動がみられ, 一方 CS-1170 では $3.13 \mu\text{g/ml}$ が $25 \mu\text{g/ml}$ に変動した。

他の *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* では菌量の増加に伴い, 3 薬剤ともその抗菌力は 2 ~ 8 倍程度減弱した。

結局, CS-1170 が最も菌量の影響を受け難く, CET ならびに CEZ は, ほぼ同程度影響を受けることが認められた。

Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates *E.coli* 61strains 10^8 cells/ml

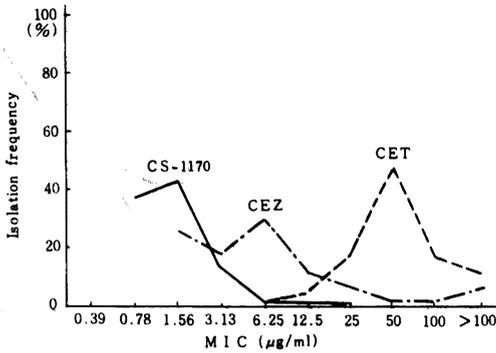


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates *E.coli* 61strains 10^8 cells/ml

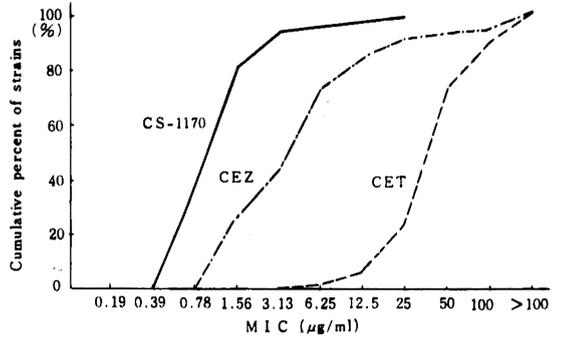


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates *E.coli* 61strains 10^6 cells/ml

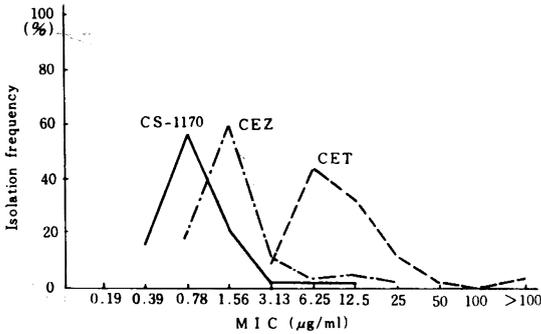


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates *E.coli* 61strains 10^6 cells/ml

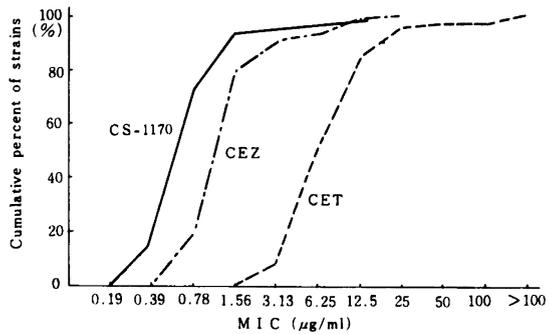


Fig. 12 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *E.coli* 61strains

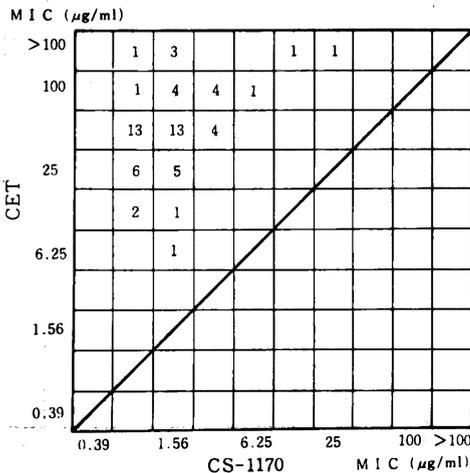


Fig. 13 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *E.coli* 61strains

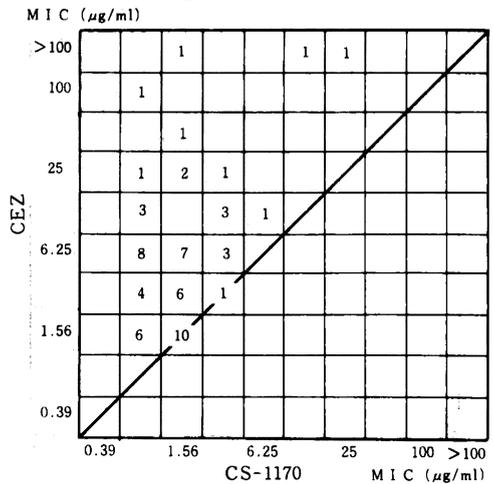


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates *K. pneumoniae* 41 strains 10^8 cells/ml

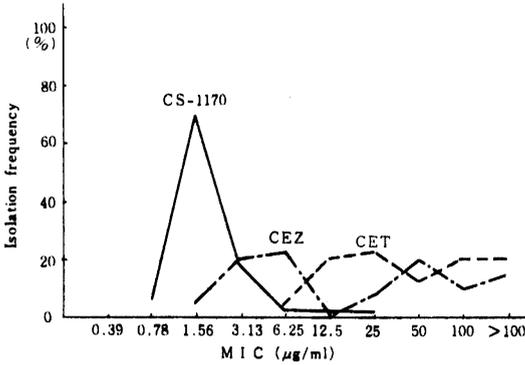


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates *K. pneumoniae* 41 strains 10^8 cells/ml

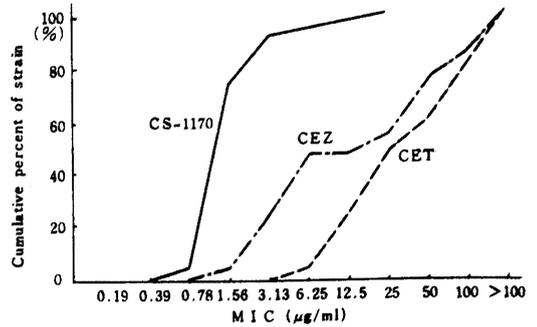


Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates *K. pneumoniae* 41 strains 10^8 cells/ml

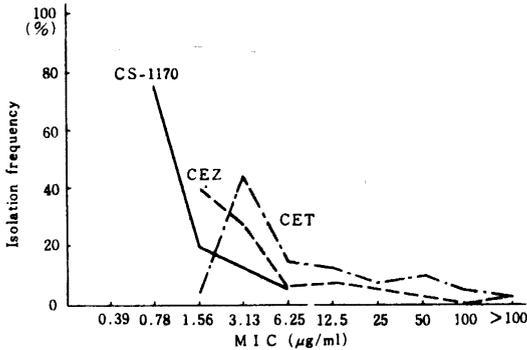


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates *K. pneumoniae* 41 strains 10^8 cells/ml

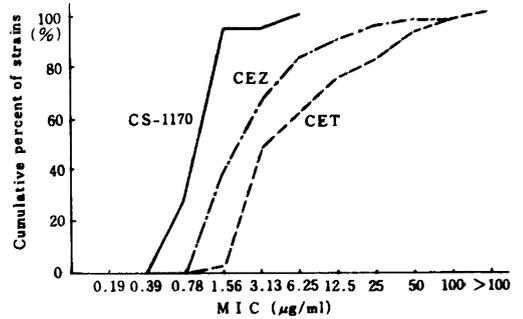


Fig. 18 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *K. pneumoniae* 41 strains

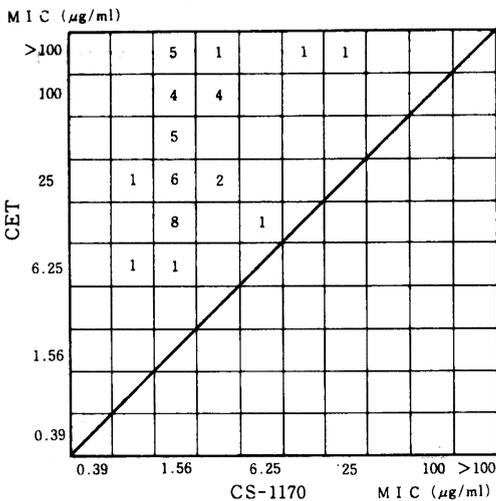


Fig. 19 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *K. pneumoniae* 41 strains

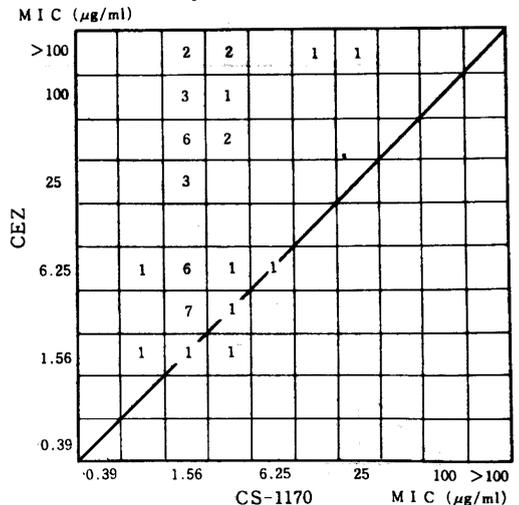


Fig. 20 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* 54 strains 10⁶ cells/ml

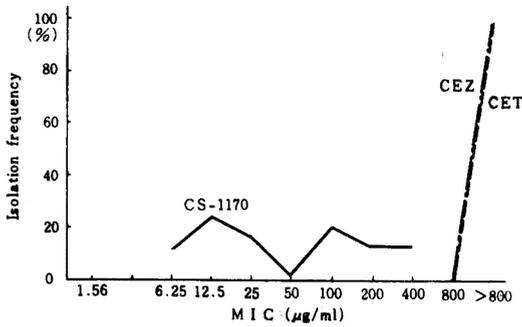


Fig. 21 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* 54 strains 10⁸ cells/ml

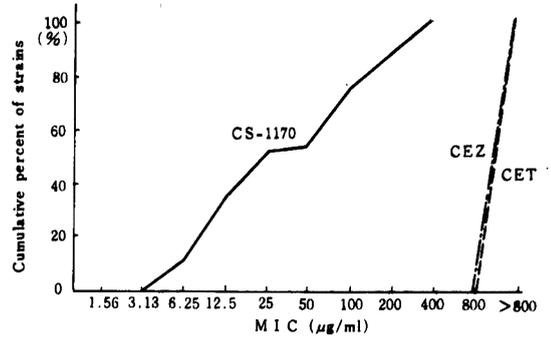


Fig. 22 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* 54 strains 10⁶ cells/ml

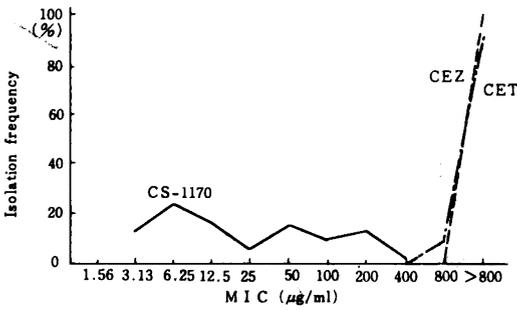


Fig. 23 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* 54 strains 10⁶ cells/ml

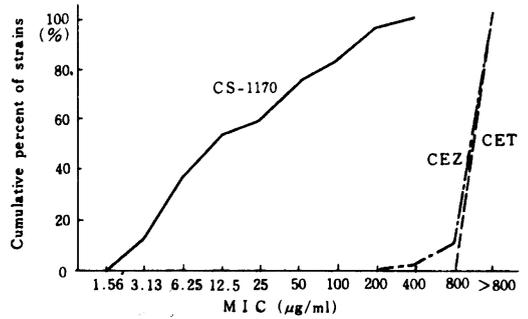


Fig. 24 Cross sensitivity (10⁸ cells/ml) *S. marcescens* 54 strains

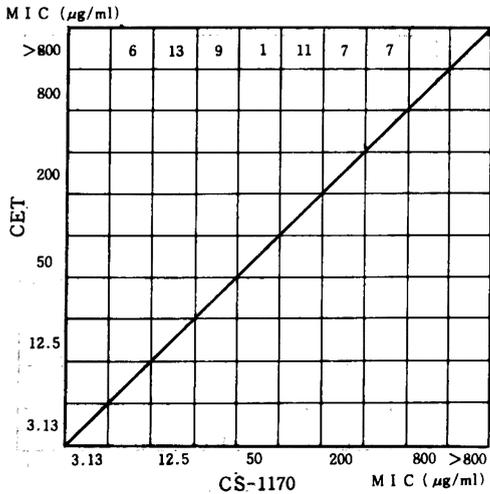


Fig. 25 Cross sensitivity (10⁸ cells/ml) *S. marcescens* 54 strains

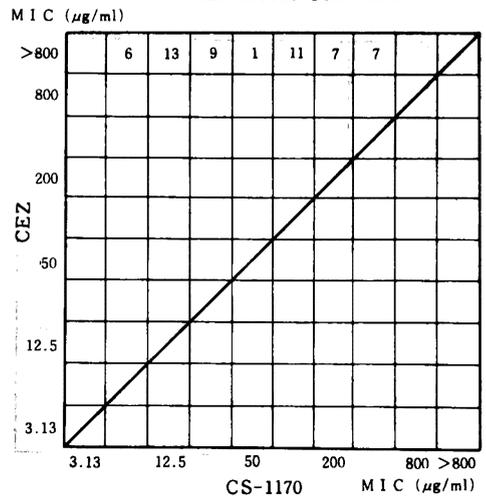


Fig. 26 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. mirabilis* 24 strains 10^8 cells/ml

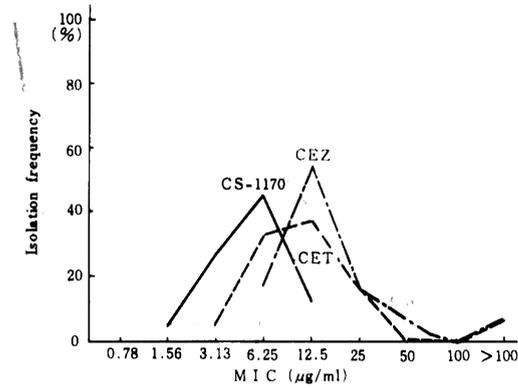


Fig. 27 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. mirabilis* 24 strains 10^8 cells/ml

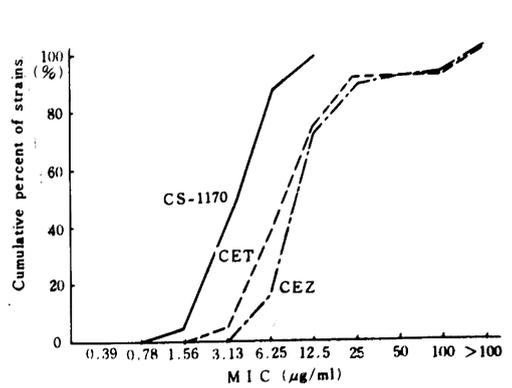


Fig. 28 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. mirabilis* 24 strains 10^8 cells/ml

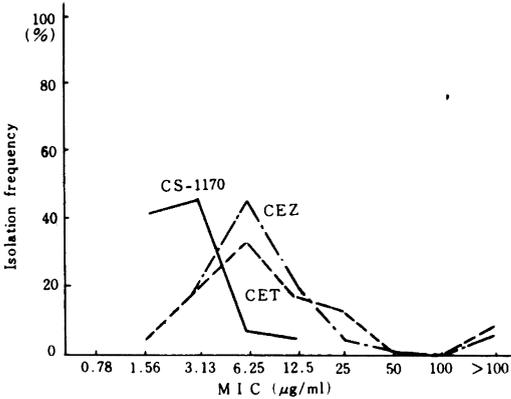


Fig. 29 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. mirabilis* 24 strains 10^8 cells/ml

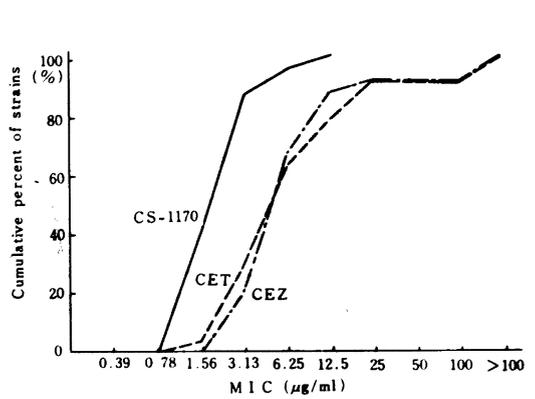


Fig. 30 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *P. mirabilis* 24 strains

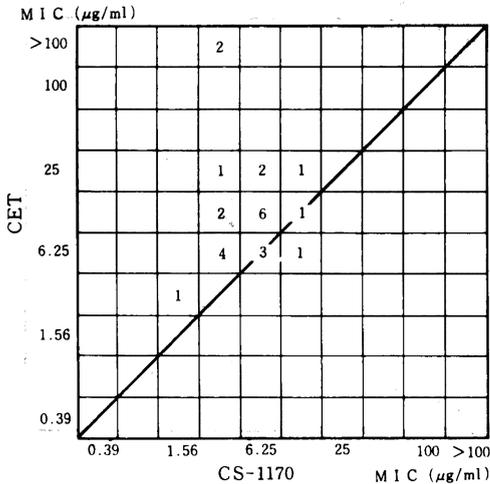


Fig. 31 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *P. mirabilis* 24 strains

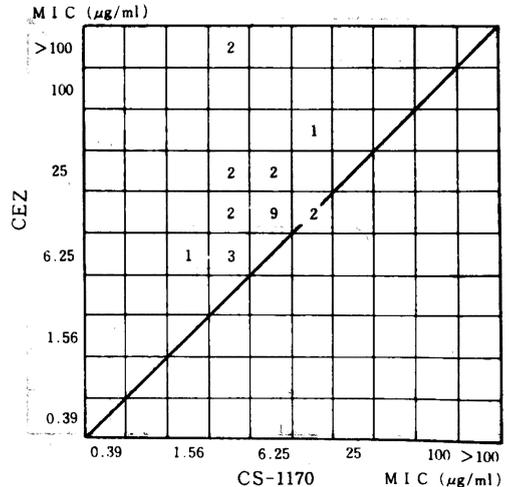


Fig. 32 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus indole(+)* 67 strains 10^8 cells/ml

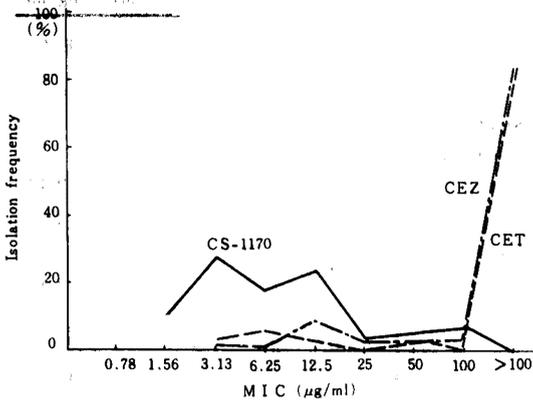


Fig. 33 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus indole(+)* 67 strains 10^6 cells/ml

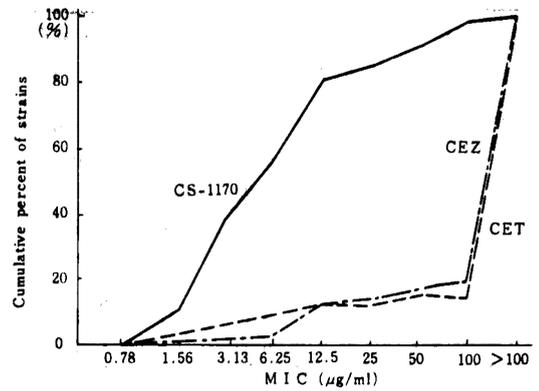


Fig. 34 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus indole(+)* 67 strains 10^6 cells/ml

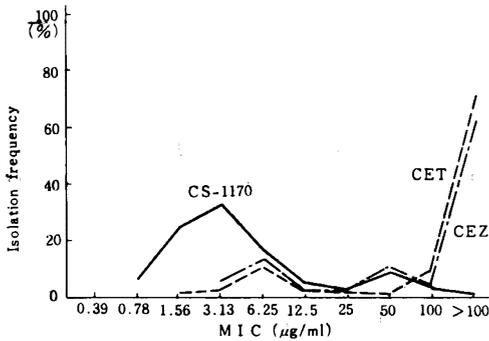


Fig. 35 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus indole(+)* 67 strains 10^6 cells/ml

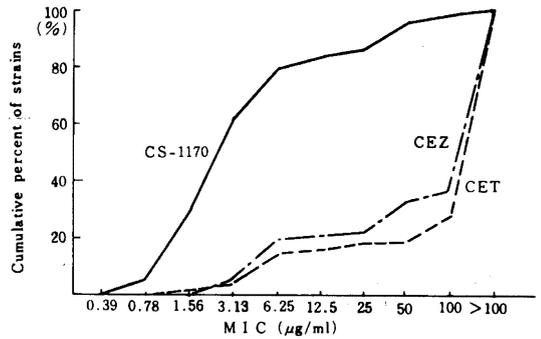


Fig. 36 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *Proteus indole(+)* 67 strains

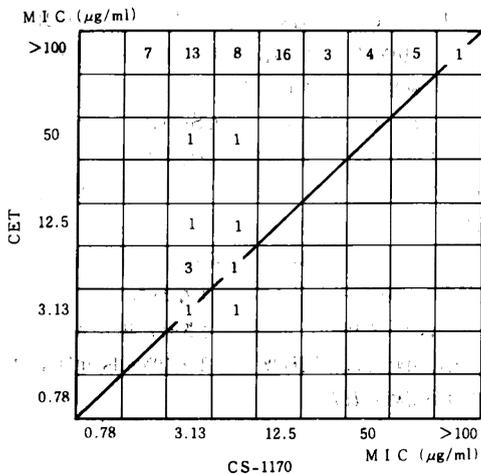


Fig. 37 Cross sensitivity (10^8 cells/ml) *Proteus indole(+)* 67 strains

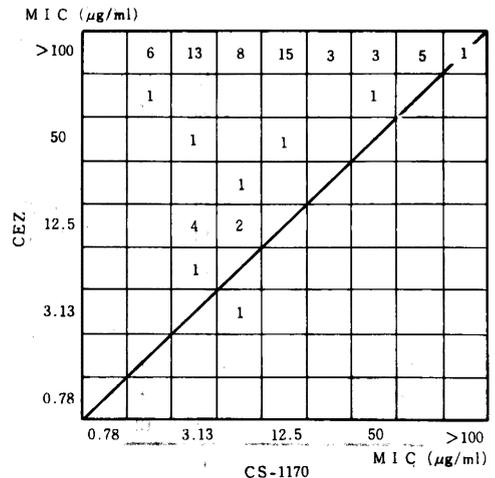


Table 3 Influence of pH on activity of CS-1170, CET and CEZ
MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	pH	CS-1170	CET	CEZ
<i>Staph. aureus</i> 209-P JC	9	0.78	0.19	0.39
	8	0.78	0.19	0.19
	7	0.78	0.09	0.09
	6	0.39	0.045	0.09
	5	0.09	< 0.022	0.022
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	9	1.56	50	12.5
	8	1.56	25	6.25
	7	1.56	25	3.13
	6	3.13	12.5	3.13
	5	6.25	6.25	1.56
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	9	1.56	12.5	25
	8	1.56	6.25	12.5
	7	3.13	6.25	6.25
	6	3.13	6.25	6.25
	5	6.25	6.25	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 124	9	1.56	6.25	12.5
	8	1.56	6.25	12.5
	7	3.13	6.25	6.25
	6	6.25	12.5	6.25
	5	12.5	12.5	6.25

Test medium : Heart Infusion Broth

Table 4 Influence of horse serum on activity of CS-1170, CET and CEZ
MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	Horse serum	CS-1170	CET	CEZ
<i>Staph. aureus</i> 209-P JC	0(%)	0.78	0.19	0.19
	10	0.78	0.19	0.19
	25	0.78	0.39	0.39
	50	1.56	0.78	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0	1.56	12.5	1.56
	10	1.56	25	3.13
	25	1.56	25	6.25
	50	3.13	50	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0	3.13	6.25	6.25
	10	3.13	6.25	12.5
	25	6.25	6.25	12.5
	50	12.5	12.5	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 124	0	3.13	6.25	3.13
	10	3.13	6.25	3.13
	25	3.13	6.25	3.13
	50	6.25	12.5	6.25

Test medium : Heart Infusion Broth

Table 5 Influence of inoculum size on activity of CS-1170, CET and CEZ
MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	Inoculum size	CS-1170	CET	CEZ
<i>Staph. aureus</i> 209-P JC	5.0×10^6	0.78	0.39	0.39
	10^6	0.78	0.19	0.39
	10^4	0.78	0.19	0.19
	10^3	0.39	0.09	0.19
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.1×10^7	3.13	50	6.25
	10^6	3.13	50	3.13
	10^5	1.56	25	3.13
	10^4	1.56	12.5	3.13
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	1.2×10^7	25	>100	>100
	10^6	3.13	12.5	12.5
	10^5	3.13	6.25	6.25
	10^4	1.56	3.13	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 124	2.2×10^7	6.25	25	25
	10^6	3.13	12.5	12.5
	10^5	3.13	6.25	3.13
	10^4	1.56	3.13	3.13

Test medium : Heart Infusion Broth

4. 細菌の増殖曲線におよぼす影響

Escherichia coli No.29をHIBに培養後、菌数が 10^7 cells/mlに達した時に薬剤を添加し、濁度ならびに生菌数の変化について検討を行った。

その結果はFig.38~43に示すようにCS-1170作用では $0.78\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}\text{MIC}$)以上で殺菌作用が認められた。

CETでは $1.56\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}\text{MIC}$)で、やや静菌的な作用が、 $3.13\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}\text{MIC}$)以上で殺菌作用が見られた。

CEZでは、 $0.78\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}\text{MIC}$)で静菌的な作用が、 $3.13\mu\text{g/ml}$ (1MIC)以上で殺菌作用が認められた。

またCET, CEZに耐性の*Escherichia coli* No.21を用い、菌数が 10^6 cells/mlに達した時におのおのの薬剤を作用させ、濁度ならびに生菌数の変化について検討を行った結果をFig.44~47に示した。CS-1170作用では $0.78\mu\text{g/ml}$ (1MIC)以上で殺菌作用が見られ、とくに $3.13\mu\text{g/ml}$ (4MIC)以上では添加後2時間以内に99.9%以上の細胞に対して強力な殺菌作用が認められた。一方CET, CEZでは作用1時間後に殺菌作用が認められたが、以後著しい再増殖が見られた。すなわちCET $400\mu\text{g/ml}$ あるいはCEZ $100\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合4時間後には薬剤作用時とほぼ同程度(約 2×10^6 cells/ml)にまで再増殖が認められた。

Fig. 38 Effect of CS-1170 on growth curve of *E. coli* No. 29

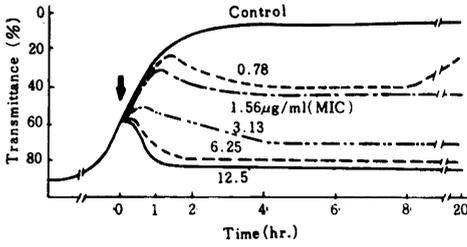


Fig. 40 Effect of CET on growth curve of *E. coli* No. 29

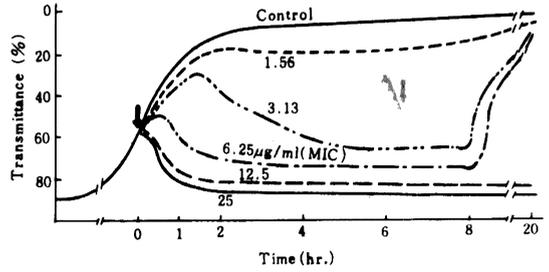


Fig. 39 Bactericidal effect of CS-1170 against *E. coli* No. 29

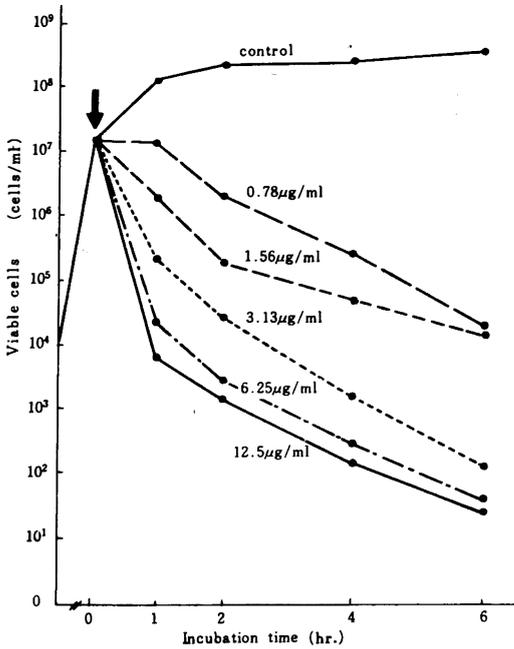


Fig. 41 Bactericidal effect of CET against *E. coli* No. 29

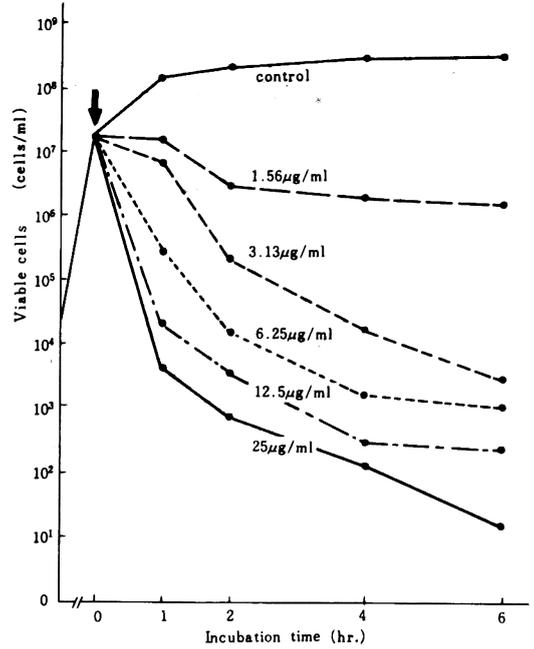


Fig. 42 Effect of CEZ on growth curve of *E.coli* No. 29

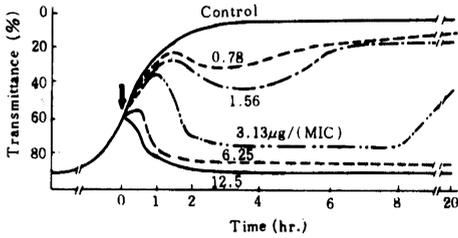


Fig. 44 Effect of CS-1170 and CET on growth curve of *E.coli* No. 21

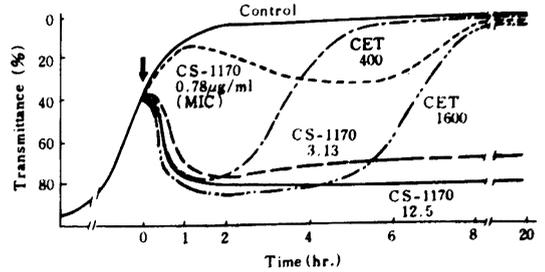


Fig. 43 Bactericidal effect of CEZ against *E.coli* No. 29

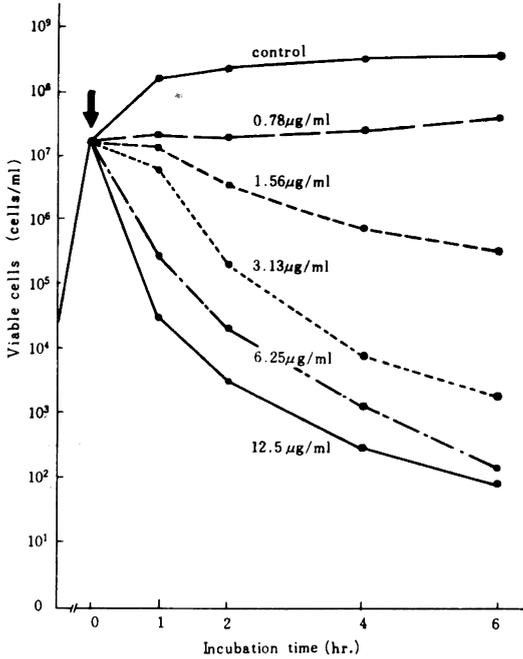


Fig. 45 Bactericidal effect of CS-1170 and CET against *E.coli* No. 21

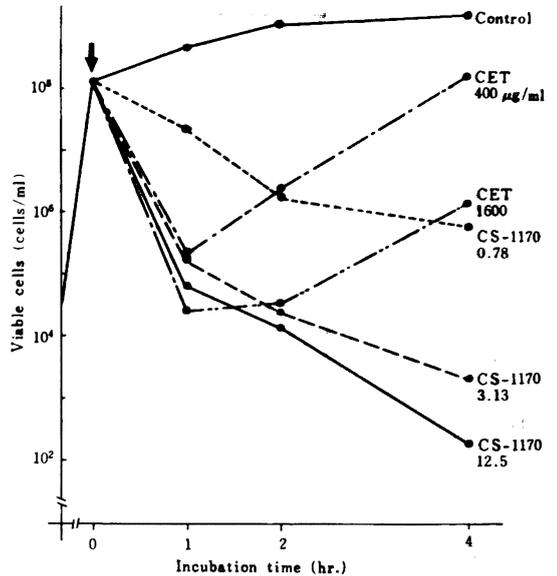


Fig. 46 Effect of CS-1170 and CEZ on growth curve of *E. coli* No. 21

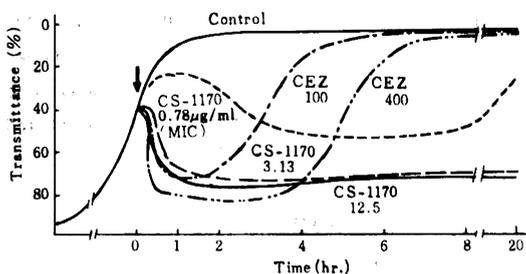
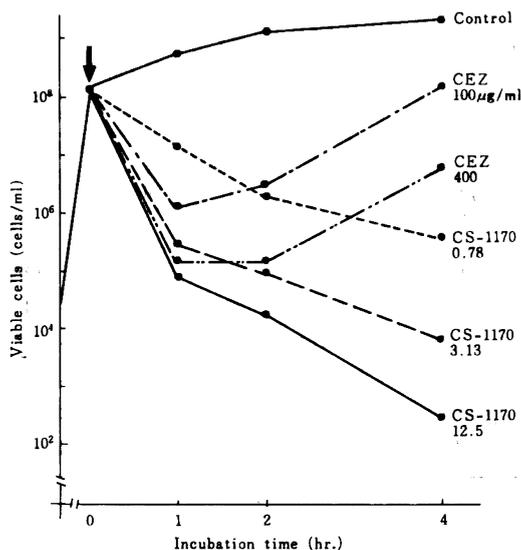


Fig. 47 Bactericidal effect of CS-1170 and CEZ against *E. coli* No. 21

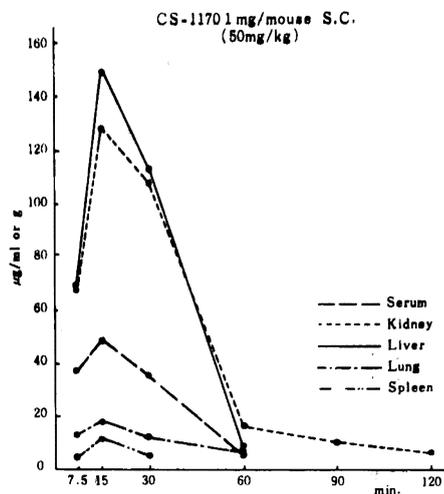


5. 血清中および臓器内濃度

CS-1170, CET, CEZをそれぞれ皮下投与した時の血清中および臓器内濃度の成績を Fig.48~50に示した。CS-1170では吸収のピーク値は薬剤投与15分後で、ピーク時の濃度は肝臓で最も高く149.4 μ g/g、次いで腎臓で127.8 μ g/g、血清中で47.8 μ g/mlであり、その他肺臓>脾臓の順であった。

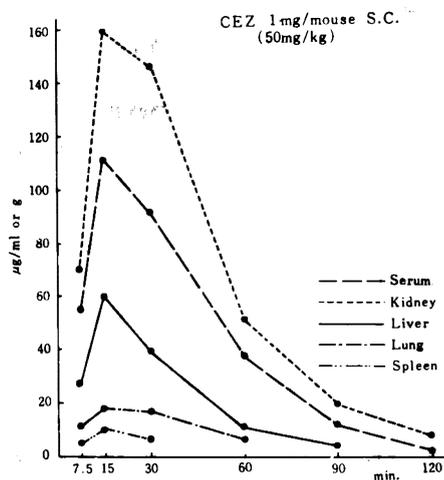
CEZでもCS-1170の場合と同様に15分でピークに達するが腎臓で最も高く158.6 μ g/g、次いで血清中で111.3 μ g/ml、肝臓で59.9 μ g/gであり、その他肺臓>脾臓の順であった。CS-1170とCEZのピーク値を比較した場合、血清中ではCEZの方がCS-1170よりも約2.3倍多く移行したが、肝臓中ではCS-1170の方がCEZよりも約2.5倍多く移行し、両剤間の吸収パターンに大きな差が認められた。しかし、他の臓器ではこのような大きな差は

Fig. 48 Tissues and serum levels after S. C. administration in mice



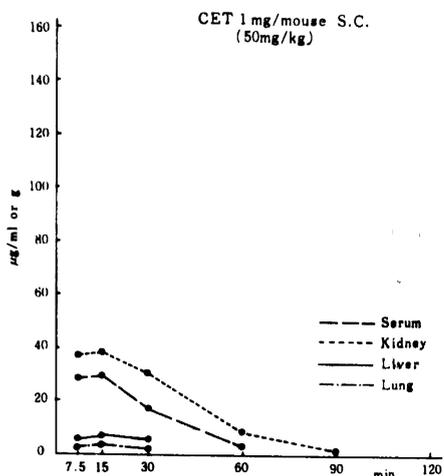
min.	7.5	15	30	60	90	120
Serum	36.5	47.8	34.8	5.1	+	-
Kidney	67.7	127.8	108.0	15.7	9.7	5.8
Liver	69.1	149.4	111.9	7.8	+	-
Lung	12.8	17.9	12.0	7.0	+	-
Spleen	4.2	11.6	4.4	+	-	-

Fig. 49 Tissues and serum levels after S. C. administration in mice



min.	7.5	15	30	60	90	120
Serum	53.5	111.3	90.5	37.0	11.3	1.8
Kidney	70.3	158.6	145.9	51.2	18.9	7.9
Liver	27.1	59.9	38.7	9.8	3.4	+
Lung	10.6	17.8	17.3	6.4	-	-
Spleen	4.2	10.6	6.4	-	-	-

Fig. 50 Tissues and serum levels after s. c. administration in mice



min.	7.5	15	30	60	90	120
Serum	27.7	29.2	16.7	3.5	+	-
Kidney	37.0	37.5	30.2	7.9	1.5	-
Liver	6.1	6.7	5.3	+	-	-
Lung	2.9	3.5	2.1	-	-	-
Spleen	+	+	+	-	-	-

認められなかった。

CET では腎臓>血清>肝臓>肺臓の順に多く移行したが、腎臓でもせいぜいそのピーク値は37.5µg/gであり、CS-1170、CEZと比較すると血清ならびに諸臓器とも低値であった。

6. マウス実験的感染症に対する治療効果

CS-1170、CET、CEZの3薬剤に感性菌の感染症に対する治療効果を検討し、その結果をTable 6に示した。グラム陽性菌である *Streptococcus pneumoniae* typelll 感染症に対してCEZは2.62mg/mouse、CS-1170は5.27 mg/mouse、CETは9.97mg/mouseのED₅₀値を示しCEZの治療効果が優れていた。しかしグラム陰性菌の *Escherichia coli* No.29 感染症に対しては、CS-1170のED₅₀値は0.14mg/mouse、CEZは0.23mg/mouse、CETは0.63mg/mouseであり、*Escherichia coli* ST-0198 感染症に対しては、CS-1170は0.10mg/mouse、CEZは0.13mg/mouse、CETは0.40mg/mouseで、両菌株に対しCS-1170のほうがCETよりも約3~4倍優れておりCEZよりもやや優れた治療効果を示した。また *Klebsiella pneumoniae* 感染症に対してはCS-1170が2.64 mg/mouse、CEZは2.30mg/mouse、CETは8.20mg/mouseでCETの治療効果が最も劣り、CS-1170とCEZではほぼ同程度の治療成績が得られた。

次にCET、CEZ耐性菌の感染症に対する治療効果を検討し、その結果をTable 7に示した。*Escherichia coli* No.21感染症に対してはCS-1170のED₅₀値が0.19mg/mouseに対し、CEZは2.36mg/mouse、CETは6.95mg/mouseであり、CS-1170がCET、CEZに比べ10倍以上優れた治療効果を示した。また *Klebsiella pneumoniae* 138 感染症に対してもCS-1170はCET、CEZよりも15倍以上優れた治療効果を示した。*Proteus morganii* 101および *Proteus vulgaris* 109 感染症では、CS-1170のED₅₀値はそれぞれ0.28mg/mouse、0.60mg/mouseであり、CETはいずれにも>16mg/mouseで治療効果は認められず、CEZは2.82mg/mouseと>16mg/mouseでCS-1170よりもはるかに劣った治療効果を示した。*Serratia*

Table 6 Protecting effect of CS-1170, CET and CEZ against experimental mice infections

Organism.	Challenge dose (cells/mouse)	*MIC and **ED ₅₀		
		CS-1170	CET	CEZ
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	600×LD ₅₀ (—)	(*0.39) **5.27	(0.19) 9.97	(0.19) 2.62
<i>E. coli</i> No. 29 (+)	100×LD ₅₀ (1.2×10 ⁸)	(1.56) 0.14	(6.25) 0.63	(3.13) 0.23
<i>E. coli</i> ST-0198(+)	60×LD ₅₀ (8.5×10 ⁸)	(0.39) 0.10	(1.56) 0.40	(0.78) 0.13.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (+)	2000×LD ₅₀ (5.5×10 ⁸)	(0.78) 2.64	(3.13) 8.20	(3.13) 2.30

(+) 3% mucin added (*µg/ml) **mg/mouse

Table 7 Protecting effect of CS-1170, CET and CEZ against experimental mice infections

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	*MIC and **ED ₅₀		
		CS-1170	CET	CEZ
<i>E. coli</i> No. 21(+)	10×LD ₅₀ (2.4×10 ⁸)	(*0.78) **0.19	(800) 6.95	(100) 2.36
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 138(+)	70×LD ₅₀ (2.5×10 ⁷)	(12.5) 0.16	(>800) 12.56	(800) 2.69
<i>Proteus morganii</i> 101(+)	400×LD ₅₀ (3.5×10 ⁶)	(6.25) 0.28	(>800) >16	(>800) 2.82
<i>Proteus vulgaris</i> 109(+)	400×LD ₅₀ (2.0×10 ⁷)	(1.56) 0.60	(>800) >16	(>800) >16
<i>Serratia marcescens</i> T-55(+)	300×LD ₅₀ (3.8×10 ⁶)	(6.25) 3.24	(>800) >16	(>800) >16

(+) 3% mucin added (*µg/ml) **mg/mouse

marcescens T-55 感染症に対しても CET, CEZ は >16 mg/mouse で治療効果は認められないが, CS-1170 は 3.24mg/mouse で CET, CEZ よりも優れた治療効果が得られた。以上の動物実験の結果より *in vitro* の場合と同様, *in vivo* においても CS-1170 は CET, CEZ 耐性菌に対し優れた抗菌力を有することが判った。

III. 総括ならびに考察

今回ほとんどは新しい cephamycin 系抗生物質 CS-1170 に関する細菌学的評価を CET, CEZ を比較薬剤として検討した。その結果本剤はグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対して広範囲な抗菌スペクトラムを有することが認められた。すなわちグラム陽性菌群に対しては CET, CEZ と同程度か若干劣る抗菌力を示したが, グラム陰性菌群に対しては CET, CEZ よりもはるかに優れた抗菌力が得られた。特に CET, CEZ が全く無効であるインドール陽性の *Proteus* 群や *Serratia marcescens* に対しても 1.56~12.5 μ g/ml という優れた抗菌力を有していた。

臨床分離株に対する感受性分布は *Staphylococcus aureus* では 1.56 μ g/ml にピークを有し CET, CEZ よりも劣っていた。 *Escherichia coli* では CS-1170 は 1.56 μ g/ml にピークを有し CET の 50 μ g/ml, CEZ の 6.25 μ g/ml よりもすぐれた感受性分布を示した。 *Klebsiella pneumoniae* でも CS-1170 は 1.56 μ g/ml にピークを有し CET, CEZ よりも優れた抗菌力を示した。特に CET, CEZ 耐性菌と交差耐性が認められなかったことは興味深い。また CET, CEZ に耐性のインドール陽性の *Proteus* や *Serratia marcescens* に対しても CS-1170 は優れた抗菌力を示し, CS-1170 と CET, CEZ 間に交差耐性が見られなかった。このように交差耐性が成立しなかった原因としては, CS-1170 は 7 位にメトキシ基を有するために penicillin, cephalosporin 耐性菌の産生する β -lactamase に対し強い抵抗性を示すためと考えられる。

抗菌力におよぼす培地 pH の影響では, 既知 penicillin, cephalosporin 系抗生物質が酸性側で抗菌力が増強されるのに対し^{5A,7A)}, CS-1170 のグラム陰性菌に対する抗菌力はアルカリ側で増強されることが判った。一般的に細胞壁の合成を阻害する抗生物質は細菌細胞が持っている自己融解酵素 Autolysin と協力的に働き, 殺菌的に作用すると考えられており⁹⁾, 多くのグラム陰性菌のもつ Autolysin の至適 pH はアルカリ領域にあると報告されている^{10,11)}。これは CS-1170 の殺菌作用発現の至適 pH 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と思われる。血清添加による影響では 3 剤間に差が認められなかった。また CS-1170 は, CET, CEZ よりも菌量の影響を受けにくいことが判った。

増殖曲線におよぼす作用を検討したところ感性菌に対し CS-1170 は CET, CEZ と同様に殺菌的に作用した。また CET, CEZ 耐性菌に対しても CS-1170 は殺菌的に作用し CET, CEZ では 1 時間後に殺菌作用が見られたが, その後再び増殖を開始した。これは CET, CEZ が耐性菌の産生する β -lactamase によって不活化されるためではないかと思われる。

マウスでの体内移行を検討したところ CS-1170, CEZ の両薬剤とも 15 分後にピーク値が得られ, CS-1170 では肝臓, 腎臓に多く移行し, CEZ では腎臓, 血清中に多く移行した。

最後にマウス実験の感染症に対する治療効果について検討したところ CS-1170 はグラム陰性桿菌感染症に CET, CEZ より優れた治療効果を示した。特に cephalosporin 耐性の *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii*, *Serratia marcescens* 感染症にも優れた治療効果が認められ, *in vitro* 同様 *in vivo* においてもこれらの耐性菌に対し, CS-1170 は優れた抗菌力を有することが判った。以上の細菌学的評価の結果, CS-1170 はグラム陰性桿菌に対し CET, CEZ に比べすぐれた抗菌力を有する新しい cephamycin 系抗生物質であることが確かめられた。

結 論

新しく開発された cephamycin 系抗生物質 CS-1170 について Cephalothin (CET) と Cefazolin (CEZ) を比較薬剤として細菌学的評価を行った結果次のような成績が得られた。

- 1) CS-1170 はグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトラムを有していた。
- 2) CS-1170 は臨床分離のグラム陰性桿菌に優れた抗菌力を有し, 特に cephalosporin 耐性 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, インドール陽性の *Proteus* 群, *Serratia marcescens* に対して優れた抗菌力を示した。一方, グラム陽性の *Staphylococcus aureus* に対しては CET, CEZ に比べ少し劣っていた。
- 3) 抗菌力におよぼす諸因子の影響を検討したところ, CS-1170 のグラム陰性桿菌に対する抗菌力はアルカリ側で増強され, CET, CEZ の抗菌力は酸性側で増強された。また接種菌量の影響は CET, CEZ より受けにくいことが判った。
- 4) cephalosporin 感性および耐性の *Escherichia coli* を用い増殖曲線におよぼす影響を検討したところ, CS-1170 はいずれの場合も MIC 濃度で殺菌的に作用した。
- 5) マウスを用いて血清中, 臓器内濃度について検討したところ, CS-1170 は肝臓, 腎臓に多く移行し, 次いで血清, 肺臓, 脾臓の順であった。

6) CS-1170はマウス感染治療実験においても、グラム陰性桿菌による感染症に優れた治療効果を示し、特に cephalosporin 耐性 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii*, *Serratia marcescens* などの感染症に優れた治療効果が認められた。

文 献

- 1) NAKAO, H. ; H. YANAGISAWA, B. SHIMIZU, M. KANEKO, M. NAGANO & S. SUGAWARA : A new semisynthetic 7 α -methoxycephalosporin, CS-1170 : 7 α -[[[(cyanomethyl)thio]acetamido]-7 α -methoxy-3-[[[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]methyl]-3-cephem-4-carboxylic acid. J. Antibiotics 29 : 554~558, 1976
- 2) 第25回日本化学療法学会西日本支部総会 新薬シンポジウムII CS-1170. 1977, 岡山
- 3) ONISHI, H. R. ; D.R. DAoust, S.B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E.O. STAPLEY : Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Resistance to β -lactamase inactivation. Antimicrob. Agents & Chemother. 5 : 38~48, 1974
- 4) 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
- 5) 中沢昭三, 板垣守正, 横田芳武, 江本栄子, 天野翠, 猪俣陽子, 服部清二郎, 伊倉義隆, 小野尚子, 貴宝院善博, 小谷川清子, 谷口弘子, 山本 宏 : 合成 Cephalosporin C-Cephalothin, Cephaloridine に関する基礎的研究. J. Antibiotics Ser. B 18(6) 431~438, Dec. 1965
- 6) 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
- 7) 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
- 8) RETSEMA, J. A. & V. A. RAY : Correlation between the binding of β -lactam antibiotics to *Staphylococcus aureus* and their physical-chemical properties. Antimicrob. Agents & Chemother. 2 : 173~180, 1972
- 9) TERNOVE, E. H. & L. DANEY-MOORE : The role of autolytic enzymes in bactericidal effect of cell wall antibiotics. Published in 16th Inter-science Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy in Chicago. 1976
- 10) 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
- 11) ELMROS, T. ; L. G. BURMAN & G. D. BLOOM : Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 126 : 969~976, 1976

BACTERIOLOGICAL STUDIES OF A NEW CEPHAMYCIN ANTIBIOTIC, CS-1170

TAKESHI NISHINO, YUKIO UTSUI and SHOZO NAKAZAWA
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of CS-1170 was compared with that of cephalothin (CET) and cefazolin (CEZ). The following results were obtained.

1) Studies on the antibacterial activity of CS-1170 *in vitro* showed the compound to be active against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

2) Sensitivity distribution of clinical isolates to CS-1170 exhibited stronger activity than CET and CEZ against not only cephalosporin sensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* but also most strains of cephalosporin-resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, indole-positive *Proteus* sp. and *Serratia marcescens*, while slightly inferior to those of CET and CEZ against *Staphylococcus aureus*.

3) It was cleared that the antibacterial activity of CS-1170 against Gram-negative bacteria was enhanced at high pH, on the contrary, those of CET and CEZ were rather increased at low pH. The antibacterial activity of CS-1170 was influenced by inoculum size to lesser degree as compared with those of CET and CEZ.

4) Bactericidal action of CS-1170 was observed at the level of MIC against cephalosporin-sensitive or resistant *Escherichia coli*.

5) After subcutaneous administration of CS-1170 to mice at a single dose of 50mg/kg, the tissue level at the peak was highest in the liver and kidney, followed by the serum, lung and spleen in descending order.

6) CS-1170 was more effective than CET and CEZ in experimental mice infections caused by Gram-negative bacteria, including cephalosporin-resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii* and *Serratia marcescens*.