

Cefmetazole (CS-1170) の抗菌作用に関する検討

生方 公子・高橋 洋子・沢井 稔
 斎藤 洪太・紺野 昌俊
 帝京大学医学部小児科学教室

(昭和 53 年 12 月 18 日受付)

Cepharmycin 系の新規抗生物質である Cefmetazole について、Cefazolin (CEZ) を比較対照薬剤として、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii* および *Proteus inconstans* に対する殺菌効果を、接種菌量による MIC の相違、薬剤処理時の生菌数の変動ならびに菌の形態変化の上から観察し、次の結果を得た。

上記の細菌に対する Cefmetazole の薬剤感受性は優れており、ことに CEZ に耐性を示す菌種にも優れた感受性を示し、いずれの菌種においても 10^8 cells/ml 接種時と 10^6 cells/ml 接種時の MIC の変動は少なかった。

薬剤処理時における菌の形態変化を観察すると、菌は 10^6 cells/ml 接種時の MIC 付近の濃度から filament を形成し、 10^8 cells/ml 接種時の MIC 付近の濃度で spheroplast を形成するが、菌種によっては速やかに溶菌するものや、spheroplast のまま残存するものがみられた。また、*Serratia marcescens* や *Proteus inconstans* では、薬剤濃度によっては filament が形成された後、その先端から再分裂する像もみられたことから、Cefmetazole はそれらの菌種から産生される β -lactamase に必ずしも極めて強い安定性を示すとは思えない面もあった。

Serratia marcescens や *Proteus inconstans* の上記の現象は、生菌数の経時的変動の成績からも推察され、生菌の発育を完全に阻止するためには、 10^6 cells/ml 接種時の MIC の 8 倍の濃度を必要とした。しかしながら、Cefmetazole の殺菌作用は CEZ と比較してそれほど遜色のあるものではなく、ことに CEZ に耐性の菌にも優れた殺菌効果を示すことが明らかにされた。

緒 言

1955 年の cephalosporin C 核の発見に始まる cephalosporin 系薬剤の開発と臨床への応用は、化学療法による細菌感染症の治療に多大な貢献を果してきた。しかし、近年 cephalosporin が効力を有していた菌種の中にも耐性菌が出現し始め、また cephalosporin 系薬剤の使用に伴い、もともとこの種の薬剤に耐性である菌への菌交代現象等も指摘され、治療上に問題を生じ始めている。そして臨床サイドからは、これらの耐性菌に対し強い抗菌力を有する新規抗生物質の開発が期待されるようになった。

Cefmetazole (CS-1170) は我が国において開発された新しい cephamycin 系の抗生物質であり¹⁾、7 位の α 位に methoxy 基を有している点がひとつの特徴である。本薬の特徴は β -lactamase に強い抵抗性を示す点にあり、従って従来の cephalosporin 系薬剤に耐性となった *E. coli*, *Klebsiella* 等に対しても強い抗菌力を示し、また indole 陽性の *Proteus* 属や *Serratia* に対しても抗菌力を有していると報告されている^{2,3,4,5)}。

私達は上記の CS-1170 の特性をさらに明確に把握する目的で、従来私達が行ってきた抗菌力の強弱を MIC や殺菌力あるいは菌の形態変化などから総合的に判断する方法によって検討し、臨床へのアプローチの判断に役立てたいと考えた。

材料と方法

1. 使用菌株

昭和 50 年度に帝京大学医学部付属病院において臨床材料から分離された *Escherichia coli* 68 株、*Klebsiella pneumoniae* 26 株、*Serratia marcescens* 25 株、*Proteus mirabilis* 27 株、*Proteus vulgaris* 8 株、*Proteus morganii* 24 株、*Proteus inconstans* 20 株の計 7 菌種を使用した。

2. 培地

被検菌の増菌や液体培地を用いた菌の形態変化の観察のためには、Heart infusion broth (HI broth, ニッスイ) を用い、薬剤感受性や生菌数の測定には Heart infusion agar (HI agar, ニッスイ) を用いた。

3. 薬剤感受性測定方法

CS-1170 および cephalosporin 系薬剤の上記 7 菌種に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は、日本化学療法学会の指定する標準法⁶⁾に従い、寒天平板希釈法にて実施した。なお、接種菌量による MIC の変動をみるために、1 夜培養した被検菌をそのまま 1 白金耳接種した場合と 100 倍に希釈した場合の両者について同時に MIC を測定した。

4. CS-1170 の菌の増殖に及ぼす影響の検討法

CS-1170 および対照薬とした Cefazolin (CEZ) の菌の増殖に及ぼす影響は、上記 7 菌種の中から各々 2 株づつを選んで検討した。すなわち、本薬が cephalosporin 耐性菌にも効力を有するということから、*E. coli* と *Klebsiella* では対照した CEZ に対し、原液接種時における MIC が高い菌株を選んだ。その他の菌種からは、最も標準的と思われる MIC を示した株を無作為に選んだ。

測定方法は、1 夜培養した被検菌を翌朝さらに新しい HI broth に接種し、菌量がほぼ 10^6 cells/ml に達した時点で種々の濃度の CS-1170 および CEZ を添加し、37°C で培養した。そして薬剤添加後 3, 6, 9, 24 時間後に生菌数を測定した。

5. 菌の形態変化の観察方法

薬剤作用後の菌の形態変化は、4 に述べた菌を用いて 3 通りの方法によって観察した。第 1 の方法は、10 ml の HI broth に CS-1170 あるいは CEZ を 3, 200 $\mu\text{g/ml}$ から 2 倍段階希釈で 0.2 $\mu\text{g/ml}$ までの各濃度を含むように添加した後、被検菌を 10^6 cells/ml になるように接種して 37°C で培養し、6 時間後に菌の増殖の混濁度、生菌数の測定を行い、同時にその培養液の塗抹標本を作製してグラム染色を行い、菌の形態変化を顕微鏡下で観察した。第 2 の方法は、種々の濃度の CS-1170 を含む薄層寒天培地をシートしたチャンパー内に被検菌をシードし、37°C に保温しながら位相差顕微鏡 (ニコン MD 型) 下で経時的に菌の形態変化を観察した。第 3 の方法は、上記の実験に用いた菌の中から、*Klebsiella*, *Pr. morganii* 各 1 株づつを選び、HI broth で培養、対数増殖の初期に種々の濃度の CS-1170 を作用させた後、1, 2, 3 時間後にグルタルアルデヒドとオスミウム酸の二重固定を行い、続いてエタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した後超薄切片を作製して電子顕微鏡 (日立 11 EU) 下にて観察した。

結 果

1. 感受性測定成績

CS-1170 と対照として用いた CEZ の各菌種に対する感受性成績は、Table 1 および Fig. 1 に示した。CS-1170 は *E. coli* に対しては原液接種で 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml の菌接種では 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$ にピークのあ

る 1 峰性の感受性分布を示し、接種菌量によって試験管で 2~3 本の MIC のちがいが見られた。これに対し、CEZ では原液接種で 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する 2 峰性の分布を示し、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株も 20% 近く認められた。 10^6 cells/ml の接種では 1.56 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有しており、接種菌量による MIC の相違が大きかった。

Klebsiella では *E. coli* とほぼ同様の傾向が見られ、また CS-1170 は CEZ に較べ試験管で 1~2 管程度優れた MIC を示した。また原液接種時に CEZ に対して 100 $\mu\text{g/ml}$ から 200 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示していた株は、CS-1170 ではいずれも 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ 前後の MIC を示していた。

Pr. mirabilis に対しては、原液接種時にはむしろ CS-1170 のほうが 1 管程度 MIC が劣っているが、 10^6 cells/ml 接種では逆に CEZ よりも 1 管程度優れた MIC を示し、*Pr. mirabilis* では CS-1170 のほうが CEZ に比較して接種菌量による影響を多少多く受けていると思われる。なお、被検菌 27 株のうち CEZ に 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した 2 株に対する CS-1170 の MIC は、 10^6 cells/ml 接種で 1 株は 12.5 $\mu\text{g/ml}$, もう 1 株は 50 $\mu\text{g/ml}$ を示していた。

Fig. 1 Influence of inoculum size on minimum inhibitory concentration of CS-1170

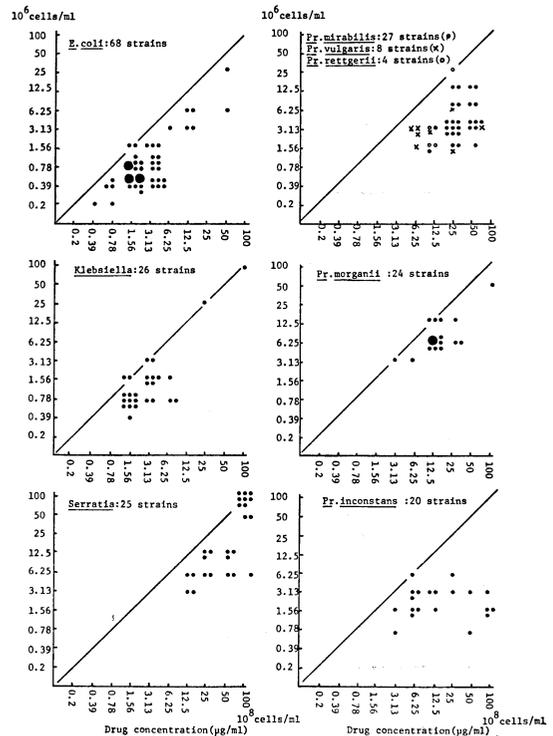
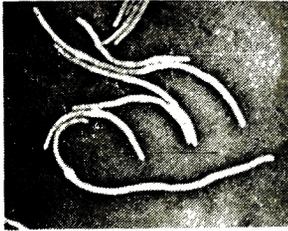
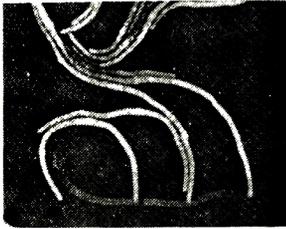


Fig. 4 Phase-contrast micrographs of *E. coli* TK705-1057 strain exposed to CS-1170A) 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (2x MIC)

Start



3 hours



4 hours



5 hours



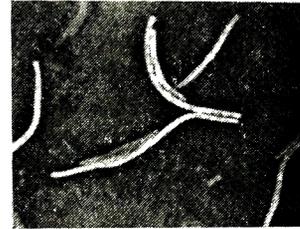
5.5 hours

B) 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (8x MIC)

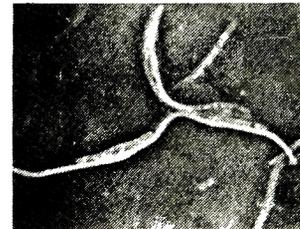
Start



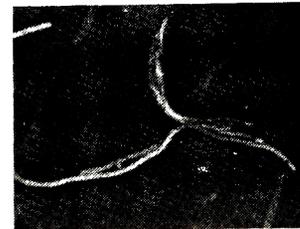
2 hours



3 hours



4 hours



4.5 hours

Pr.morganii ではほとんどの株が CEZ に対しては 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示したが、CS-1170 では 24 株中 1 株が 100 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した他は、原液接種で 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、 10^8 cells/ml の接種で 6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークのある 1 峰性の分布であった。しかも接種菌量の相違による MIC の変動が少ない点も注目された。

Pr.inconstans では原液接種で CS-1170 に対する MIC は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ までのなだらかな分布を示したのに対し、 10^8 cells/ml の接種ではほとんどの株で MIC は 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の間に集中した。つまり原液接種時に CS-1170 に対する MIC の高い菌株のほうが、MIC の低い株に比し接種菌量による影響を受

け易いものと考えられた。なお、*Pr. vulgaris* 8株に対するCS-1170のMICは、3.13~6.25 µg/mlであった(Fig. 1)。

Serratia に対しては、CEZは全て200 µg/ml以上のMICを示したが、CS-1170は原液接種で12.5 µg/mlから200 µg/mlまでの幅広いMICの分布を示し、10⁶ cells/ml接種では6.25 µg/mlおよび100 µg/mlにピークを有する2峰性のMICの分布を示していた。

2. CS-1170の菌の増殖に及ぼす影響とその際の菌の形態変化について

1) *Escherichia coli*

被検菌TK 705-1057株はFig. 2に示したように、CS-1170に対して10⁸ cells/ml接種時に3.13 µg/ml, 10⁶ cells/ml接種時に0.78 µg/mlのMICを示し、対照のCEZにはそれぞれ200 µg/ml, 25 µg/mlのMICを示す株である。なお図中の殺菌曲線に記載した薬剤濃度の後にある括弧内の数値は、10⁶ cells/ml接種時のMICからみた時の倍率である。薬剤添加後の生菌数の消長を見ると、CEZに対し比較的高いMICを示す株であっても、CEZの添加により3時間までは生菌数は急速に減少し、その後には再増殖が見られたが、培地中のCEZが菌の有する不活化酵素によって失活するために生ずるものと推察された。一方、CS-1170の場合には、薬剤添加後3~6時間までは生菌数は減少するが、その後1.56 µg/mlと6.25 µg/mlの濃度では再増殖が見られ、菌を完全に死滅させるためには25 µg/ml程度の薬剤濃度が必要であると思われた。

次に各種薬剤濃度における菌の形態変化について述べると(Fig. 3), CEZでは10⁶ cells/ml接種時のMICと10⁸ cells/mlの接種時のMICの間の濃度において、正常な形をした桿菌が見られ、それに重複するように、

filamentの形をした菌が50 µg/mlから400 µg/mlの間で見られ、spheroplast化した菌も50 µg/ml以上の濃度で見られた。このように、CEZに高いMICを示す菌であっても、菌は薬剤の影響を受け、filamentあるいはspheroplastから溶菌に至る過程をとるが、感性菌との大きなちがいは、filamentが形成される薬剤濃度の幅は狭いにもかかわらず、同一濃度においてspheroplast化した菌と正常な桿菌がみられることである。このことは培地中の力価が急速に減少するに伴って、溶菌せずに残った菌が正常な桿菌に分裂再増殖し始めているものと考えられ、Fig. 2に示した生菌数の測定とFig. 3に示している6時間よりも24時間後に一段と培地の混濁度が高濃度まで認められることと一致している。

他方、CS-1170ではfilamentを形成する薬剤濃度の幅はCEZに比しやや広いが、10⁸ cells/ml接種時のMIC以上の濃度では、培地の混濁度は24時間後にも認められず、菌は発育を阻止されていると考えられた。さらにCS-1170を作用させた際の形態変化を位相差顕微鏡下で経時的に観察した成績をFig. 4に示す。写真の左側A)はCS-1170の作用で最も長いfilamentを形成する1.56 µg/mlの濃度で作用させた時の経過である。薬剤作用後3時間までは一様に長いfilamentを形成していくが、その頃から菌は菌体の中央部が膨潤し始め、その部位から菌体内内容物が溶出して、次々と溶菌してゆく像が見られた。右側のB)には6.25 µg/mlの濃度を作用させた時の変化を示してあるが、作用させる薬剤濃度が高くなるほど比較的短いfilamentから短時間のうちに溶菌する像が観察された。上述した実験はもう1株TK 705-1015株でもしらべているが、全く同じような結果であったので省略する。

2) *Klebsiella pneumoniae*

被検菌TK 508-168株に対するCS-1170とCEZの殺菌作用の比較はFig. 5に示した。50 µg/ml濃度のCEZの作用では、9時間目頃までは菌数は減少するものの、その後*E. coli*の場合と同様再増殖が見られたが、200

Fig. 5 Bactericidal effect of CS-1170 and cefazolin against *Klebsiella* TK 508-168

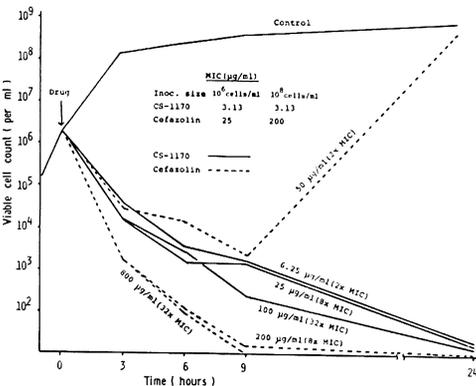
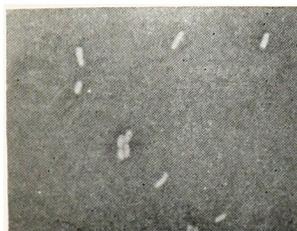


Fig. 6 Morphological changes of *Klebsiella*(TK 508-168) exposed to various concentrations of cefazolin and CS-1170

	Drug concentration (µg/ml)	Time (hours)															
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	
Cefazolin	Morphological changes 6 ^h	[Microscopic images showing normal rods]															
	Turbidity 6 ^h	[Turbidity scale from +++ to -]															
	Viable cell count 6 ^h	[Log scale from 10 ⁷ to <10 ¹]															
	Turbidity 24 ^h	[Turbidity scale from +++ to -]															
CS-1170	Morphological changes 6 ^h	[Microscopic images showing normal rods]															
	Turbidity 6 ^h	[Turbidity scale from ++ to -]															
	Viable cell count 6 ^h	[Log scale from 10 ⁷ to 10 ²]															
	Turbidity 24 ^h	[Turbidity scale from +++ to -]															

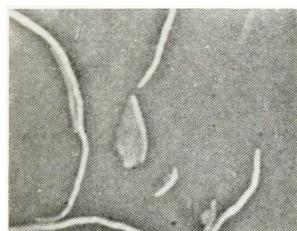
Medium: HI broth Inoculum size: 10⁶ cells/ml [] : MIC(10⁸/ml inoc. size)
 [] : Normal [] : Filamentous [] : Spherical [] : MIC(10⁶/ml inoc. size)

Fig.7 Phase-contrast micrographs of *Klebsiella* TK 508-168 strain exposed to CS-1170A) 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (4x MIC)

Start



2 hours



3 hours



3.5 hours



4 hours

B) 50 $\mu\text{g/ml}$ (16x MIC)

Start



30 min.



1 hour



2 hours



3 hours

$\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度ではむしろ CS-1170 よりも殺菌効果は強い傾向がみられた。一方、CS-1170 では 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で 24 時間後にはほとんどの菌が完全に死滅していたが、菌数の減少の割合は CEZ に比してやや緩慢であるという結果であった。

薬剤を作用させた時の形態変化は Fig. 6 に示した。

CEZ が 10^6 cells/ml 接種時の MIC 付近から既に spherical な形態を呈してくるのに対し、CS-1170 では MIC 付近の濃度から 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで比較的短い filament の形成が見られたが、その反面 spherical な菌は MIC 以下の濃度でも重複してみられた。このことは CS-1170 の *Klebsiella* に対する作用は、MIC 以下の濃度でも菌

Fig. 8 Electron micrograph of *Klebsiella* TK 508-168 strain. Normal cells before exposed to CS-1170.

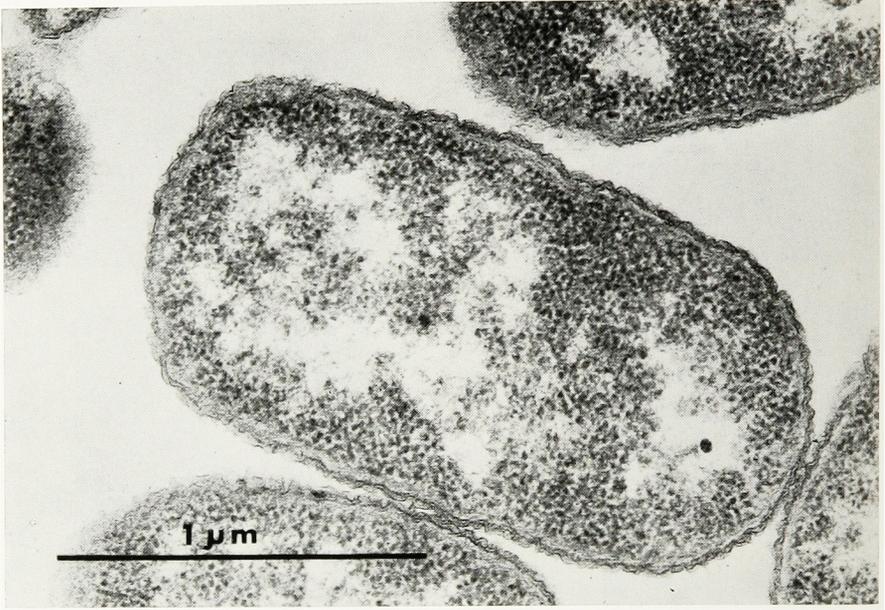
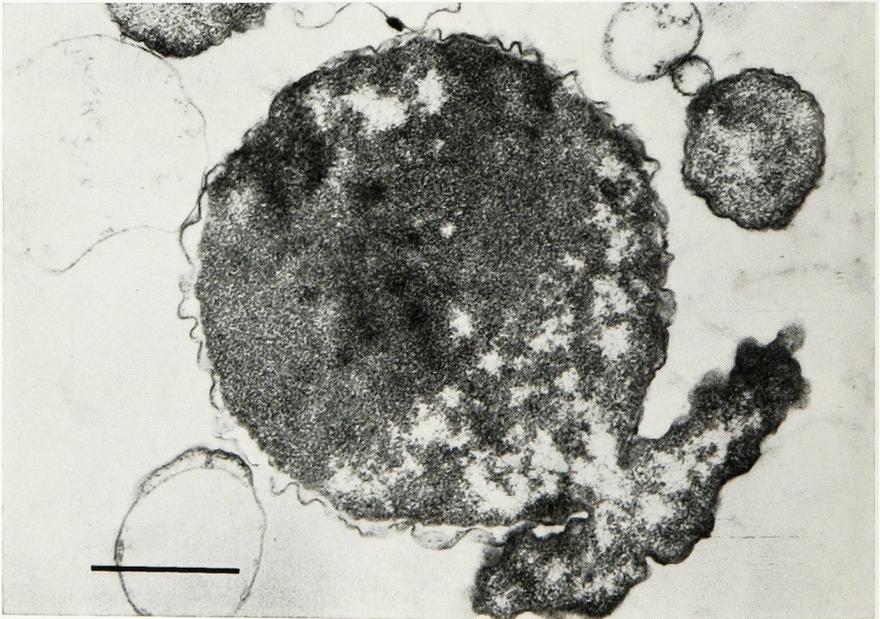


Fig. 9 Electron micrograph of *Klebsiella* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 1 hour.



に障害は与えるものの、死滅させるためには CEZ に比較し時間が多少かかるという Fig. 5 の成績を裏書きしているような結果であった。

しかしながら、このように短い filament を位相差顕微鏡下に観察すると、Fig. 7 に示したように、*E. coli* よりも比較的短時間のうちに溶菌し始めることが明らか

にされた。右側の B) に示した 50 $\mu\text{g/ml}$ の作用では、30 分後で既に溶菌しているものが見られ、ほとんど filament 化せずに溶菌してゆく像だけ観察された。電子顕微鏡下においてその微細構造の変化を観察した成績を示すと、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の CS-1170 の作用により、対照に比して (Fig. 8), 1 時間後に既に大きな spheroplast を

Fig. 10 Electron micrograph of *Klebsiella* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 2 hours.

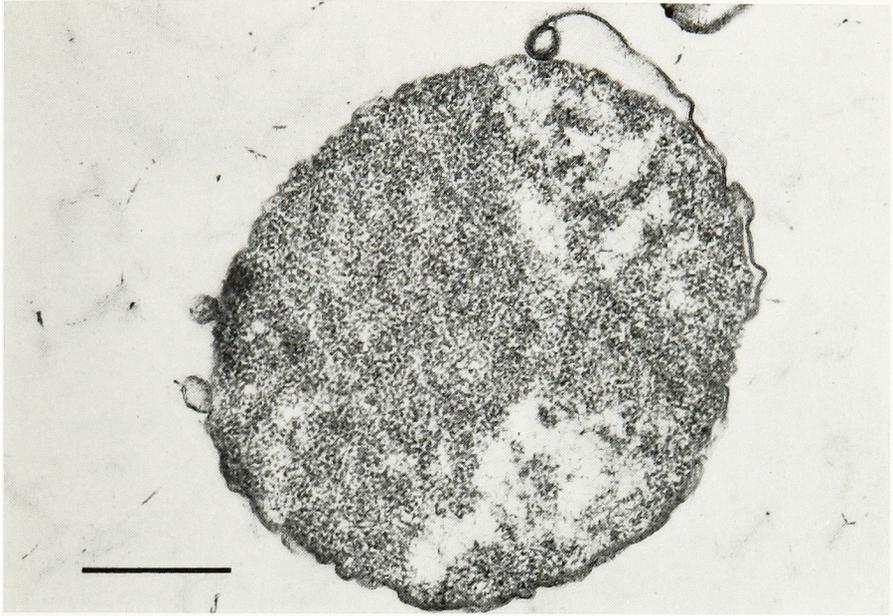


Fig. 11 Electron micrograph of *Klebsiella* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 3 hours.

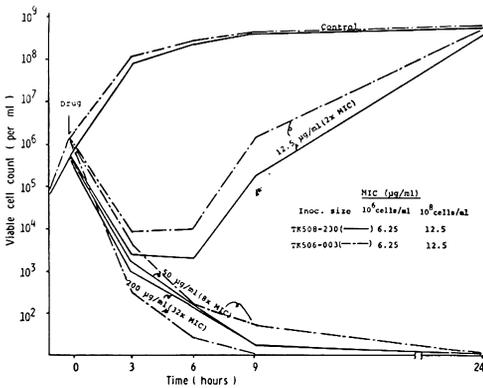


形成し、かつ細胞壁の剥離が目立ち (Fig. 9), 中には溶菌しているものも散見された。さらに2時間後には不完全ながらも細胞壁の一部を失った像 (Fig. 10) も認められた。そして3時間後には filament の形のままでほとんどの菌が溶菌に至り (Fig. 11), 細胞実質の溶出してしまった残骸だけが認められた。

3) *Serratia marcescens*

被検菌 TK 508-230 および TK 506-003 株に対する CS-1170 の殺菌効果の成績は Fig. 12 に示した。この両株は CS-1170 に感受性のある株であり、MIC はいずれも 10^6 cells/ml 接種で 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 10^8 cells/ml 接種で 12.5 $\mu\text{g/ml}$ である。これらの株では CS-1170 の 50 $\mu\text{g/}$

Fig. 12 Barctericial effect of CS-1170 against *Serratia marcescens* TK 508-230 and TK 506-003



ml 以上の濃度中では9時間までの間にほとんどの菌は死滅し、24時間後には生菌は認められず、かなり強い殺菌効果が見られたが、12.5 µg/ml の濃度では3時間までは急速な菌数の減少が見られるものの、その後は両株ともしばらくの lag phase の後に再増殖が見られた。

CS-1170 を作用させた時のこれら両菌株の形態変化を観察した成績は Fig. 13 に示してあるが、MIC 以下の濃度でも比較的長い filament 像が観察される点が *E. coli* や *Klebsiella* と異なり特徴的であった。また培地の混濁の有無は、6時間後に混濁を示していた濃度よりも24時間後にはさらに2管程度高濃度まで濁度の上昇が見られた。位相差顕微鏡下の観察では、MIC付近の濃度を作用させた場合には、最初は一樣に長い filament を形成し、菌体の中央部も膨化して長い円錐状となり、極端に変形していくが、6時間目頃からその円錐状化した filament の細い先端から正常な桿状の形をした菌が分裂し、その桿菌がさらに上述したような形態変化を繰り返しながら再分裂してゆく像が観察された (Fig. 14A)。この再分裂像が培地の濁度の上昇や再増殖と結びつく変化と推測された。しかし、50 µg/ml 以上の濃度の作用では、filament はほとんど形成されず、薬剤作用後1時間頃から次々と溶菌してゆく像が観察された (Fig. 14B)。つまり CS-1170 は低濃度では菌の産生する β-lactamase によって徐々に不活化され、再分裂・再増殖につながって行くが、比較的高濃度では不活化される速度よりも菌の受ける障害の速度のほうが上廻る結果、死滅するものと考えられた。

4) *Proteus vulgaris*

Pr. vulgaris に対する CS-1170 の殺菌効果の結果は Fig. 15 に示したが、菌株によって多少の相違が見られ

Fig. 13 Morphological changes of *Serratia* (TK506-003, TK 508-230)exposed to various concentrations of CS-1170

Drug concentration (µg/ml)	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	
TK506-003	Morphological changes	[Microscopic images showing filamentous and spherical forms]														
	Turbidity 6h	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Viable cell count 6h	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
	Turbidity 24h	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
TK508-230	Morphological changes	[Microscopic images showing filamentous and spherical forms]														
	Turbidity 6h	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Viable cell count 6h	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
	Turbidity 24h	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

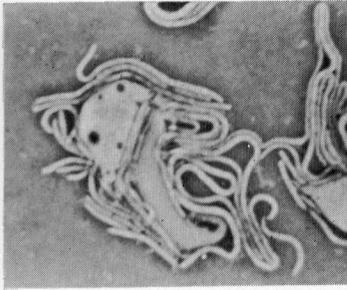
た。すなわち、接種菌量による MIC にあまり差のない TK 611-295 株では、MIC 以上の CS-1170 を添加すると、時間の経過に伴い生菌数は暫時減少し、24時間後にはほとんど生菌は認められなくなるのに対し、接種菌量により MIC に試験管で4本の差が見られた TK610-448 株では、10⁶ cells/ml 接種時と 10⁸ cells/ml 接種時の MIC の範囲内の薬剤濃度では、菌数の減少はわずかでむしろ静菌的であり、殺菌作用が見られるには 10⁸ cells/ml 接種時の MIC 以上の濃度を必要とした。

次にこれらの株の形態変化についての成績は、Fig 16 に示したが、filament 形成は 10⁶ cells/ml 接種時の MIC 以下の濃度で見られ、しかも比較的短いのが特徴であった。それ以上の濃度では spherical form の形成が見られ、TK 611-295 株ではそれらの spherical form から溶菌に至る像が見られるのに対し、TK610-448 株では spherical form の形状を保ったままのものが多かった。この形態変化の違いは、おそらく両株の産生する β-lactamase の量あるいは質的な相違によるものと考えられた。

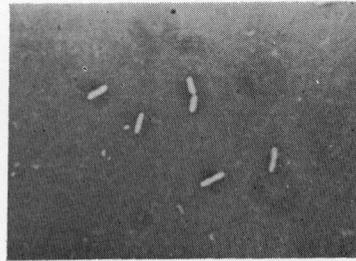
5) *Proteus morganii*

CS-1170 を作用させた際の TK 507-448 株の生菌数の変化は、Fig. 17 に示した。この菌種は本来cephalosporin 系薬剤に対する MIC は高いのであるが、対照の CEZ では 400 µg/ml の濃度の作用で菌数は一時的に減少するものの、その後徐々に再増殖が観察された。しかし、1,600 µg/ml の高濃度処理では強い殺菌作用が見られた。一方、CS-1170 では 10⁸ cells/ml 接種時の MIC である 12.5 µg/ml 以上の濃度でかなり強い殺菌効果が見られ、また 24 時間後にも生菌は認められなかった。

次に CS-1170 作用後の菌の形態変化の成績を示すと (Fig. 18)、MIC 以下の低濃度で filament の形成が見られ、MIC 以上ではむしろ spherical form が形成されて、それらが溶菌している像が多数観察された。対照とした CEZ では filament 形成は見られず、高濃度域で正常な桿菌から spherical form への移行が見られた。

Fig. 14 Phase-contrast micrographs of *Serratia marcescens* (TK 506-003) exposed to CS-1170A) 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (MIC)

8 hours

B) 50 $\mu\text{g/ml}$ (8xMIC)

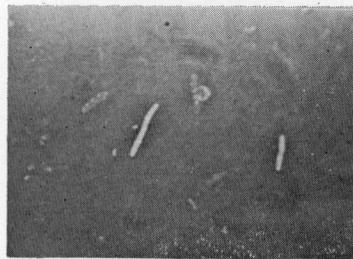
Start



1 hour



2 hours



3 hours

さらにこの溶菌に至る経過を位相差顕微鏡下に経時的に観察すると (Fig. 19A), 薬剤添加後1時間目頃から菌体の一部が突出して spherical form を形成し, 続いて菌体内容物が流出して次々と溶菌してゆく像が短時間のうちに観察された。また電子顕微鏡下での観察でも, 1時間後には既に薬剤無処理のもの (Fig. 20) に較べ, あまり filament 化していない菌体から遊離しつつあると思われる protoplast 像が数多く見られた (Fig. 21)。

このような protoplast は全視野の中の約20%の菌において見られ, この観察時間ではその形状を保っているものが多く, 比較的安定なように思えたが (Fig. 22), 2~3時間後の標本では細胞実質が抜けてしまった残骸の像だけが数多く観察され (Fig. 23), この protoplast は2~3時間の中に徐々に溶菌して行くものと推測された。

6) *Proteus inconstans*

最後に *Pr. inconstans* における成績を示す。TK 410-

Fig. 15 Bactericidal effect of CS-1170 against *Proteus vulgaris* TK 611-295 and TK 610-448

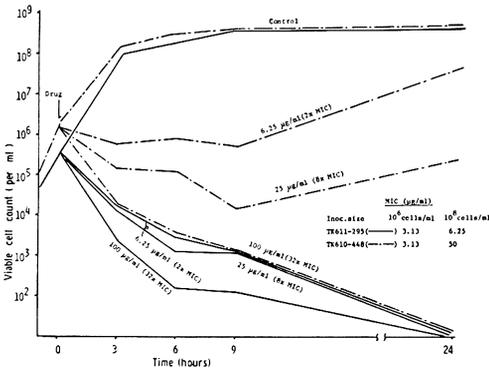


Fig. 17 Bactericidal effect of CS-1170 against *Proteus morgani* TK 507-448

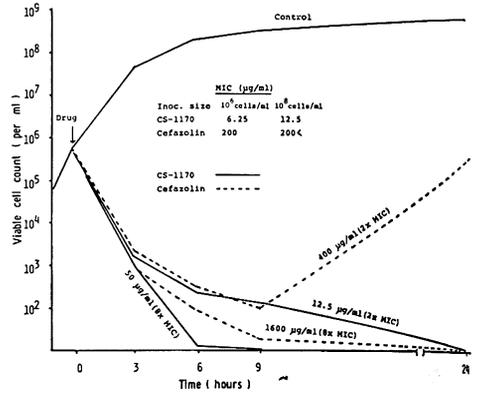


Fig. 16 Morphological changes of *Pr. vulgaris* (TK 610-448, TK 611-295) exposed to various concentrations of CS-1170

Drug concentration (µg/ml)	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200
TK611-295	Morphological changes 6'														
	Turbidity 6'														
	Viable cell count 6'														
	Turbidity 24'														
	Viable cell count 24'														
	Turbidity 24'														
TK610-448	Morphological changes 6'														
	Turbidity 6'														
	Viable cell count 6'														
	Turbidity 24'														
	Viable cell count 24'														
	Turbidity 24'														

Fig. 18 Morphological changes of *Pr. morgani*(TK 507-448) exposed to various concentrations of cefazolin and CS-1170

Drug concentration (µg/ml)	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200
Cefazolin	Morphological changes 6'														
	Turbidity 6'														
	Viable cell count 6'														
	Turbidity 24'														
CS-1170	Morphological changes 6'														
	Turbidity 6'														
	Viable cell count 6'														
	Turbidity 24'														

421 株に CS-1170 および CEZ を作用させた際の生菌数の変化は Fig. 24 に示した。本来耐性である CEZ では一時的に菌の増殖を抑えるものの、3~6 時間後には再増殖し始め、24 時間後には検討したすべての濃度で生菌数の増加が見られた。一方、CS-1170 では MIC 付近の濃度でも薬剤添加後 6 時間程度に徐々に菌数が減少し、その後ゆるやかな菌数の増加が見られ、菌の発育を完全に抑えるには 50 µg/ml 程度の濃度が必要であった。なおもう 1 株についても検討を加えているが、その株でも完全に殺菌作用を発揮した濃度は 50 µg/ml であった。*Pr. inconstans* における CS-1170 作用時の生菌数の経時的減少の度合は、他の菌種に比して鈍い傾向が目立った。

この菌の CS-1170 作用時の形態変化の特徴は (Fig. 25), 10⁸ cells/ml 接種時と 10⁶ cells/ml 接種時の MIC の間の濃度付近において、filament 状の菌が見られたことで、対照の CEZ では正常な桿菌が見られている。これは CEZ が *Pr. inconstans* の産生する β-lactamase に対する抵抗性が弱いために、正常な桿菌として再分裂し増殖してくるものと考えられた。位相差顕微鏡下に経

時的に観察すると (Fig. 19 B)), 本菌そのものの発育が他の菌種に比して遅いこともあるが、CS-1170 の作用後次第に filament 化し、ところどころが膨化しつつ菌体内に空胞を生じて来るが、添加濃度が 10⁶ cells/ml 接種時の MIC の 4 倍, 10⁸ cells/ml 接種時の MIC 濃度であるにもかかわらず、この濃度では溶菌像はほとんど見られず、しかも 7~8 時間後にはこれほど変形した filament の先端が再分裂し始め、またその桿菌が filament 化しながら分裂を繰り返して行くという像が観察された。このことは、おそらく CS-1170 が CEZ に比しては *Pr. inconstans* の産生する β-lactamase に抵抗性を有するが、徐々に多少不活化されて培地中の力価が減るために生ずる現象と考えられ、先の生菌数の消長の個所で述べた時間の経過とともに再増殖してくることに関連していると考えられた。そして写真には示していないが、さらに CS-1170 の濃度を増して観察すると、大きな spherical form の形成は見られるものの、再分裂は見られなかった。しかしながら、高濃度処理によっても *Pr. inconstans* では溶菌像はほとんど見られず、大きな spherical form のまま菌体内に空胞を生じて死滅する

Fig. 19 Phase-contrast micrographs of *Pr. morganii* (TK 507-448) and *Pr. inconstans* (TK 410-421) exposed to CS-1170

A) *Pr. morganii*

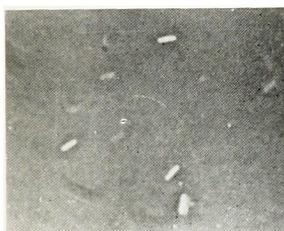
12.5 $\mu\text{g/ml}$ (2x MIC)



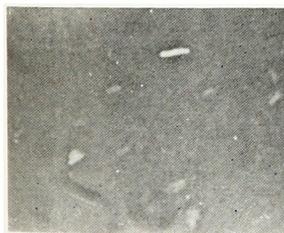
Start



1.5 hours



2.5 hours



3.5 hours



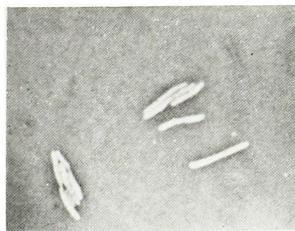
4.5 hours

B) *Pr. inconstans*

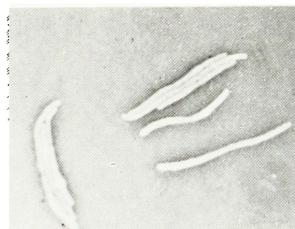
6.25 $\mu\text{g/ml}$ (4x MIC)



Start



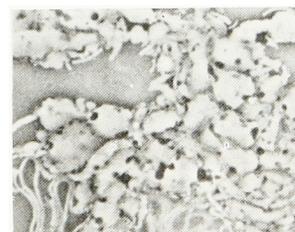
2 hours



4 hours



6 hours



24 hours

ものと思われた。

考 察

CS-1170 は cephamycin 系に属する新規抗生物質¹⁾であるが、側鎖を別にすれば従来の cephalosporin 核の 7

位の α 位に methoxy 基が導入されている点が 1 つの特徴といえる。この化学構造のために、今までの cephalosporin 系薬剤とは異なるいくつかの特徴を有していることから、きわめて有効な化学療法剤となる可能性が高

Fig. 20 Electron micrograph of *Pr. morgani* TK 507-448 strain. Normal cells before exposed to CS-1170

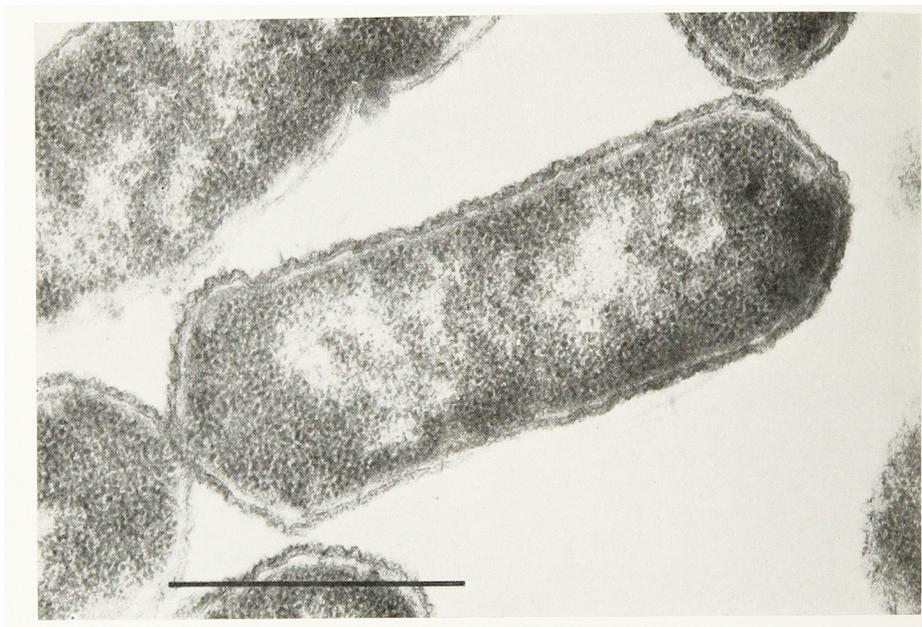


Fig. 21 Electron micrograph of *Pr. morgani* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 1 hour.



い。その特徴の第1は、 β -lactamase に対する抵抗性が強い^{2,3,5)}、*E. coli*、*Klebsiella* 等の β -lactamase 産生菌に対しても感性菌に対するとはほぼ同等の強い抗菌力を示すことであり、特徴の第2は従来 cephalosporin 系薬剤が無効であった cephalosporinase 型の β -lactamase 産生菌と考えられる indole 陽性の *Proteus* 属や

Serratia にも抗菌力を有することである⁴⁾。特徴の第3は、この種の薬剤の target site である penicillin binding proteins (PBP) に対する親和性が CER や CEZ 等^{7,8)}とは異なり、PBP 1A, 1Bs の他に PBP の3, 4, 5, 6にも親和性を有し、しかも特に PBP の4(D-alanine carboxypeptidase IB), 5(D-alanine carboxypeptidase

Fig. 22 Electron micrograph of *Pr. morganii* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 1 hour.

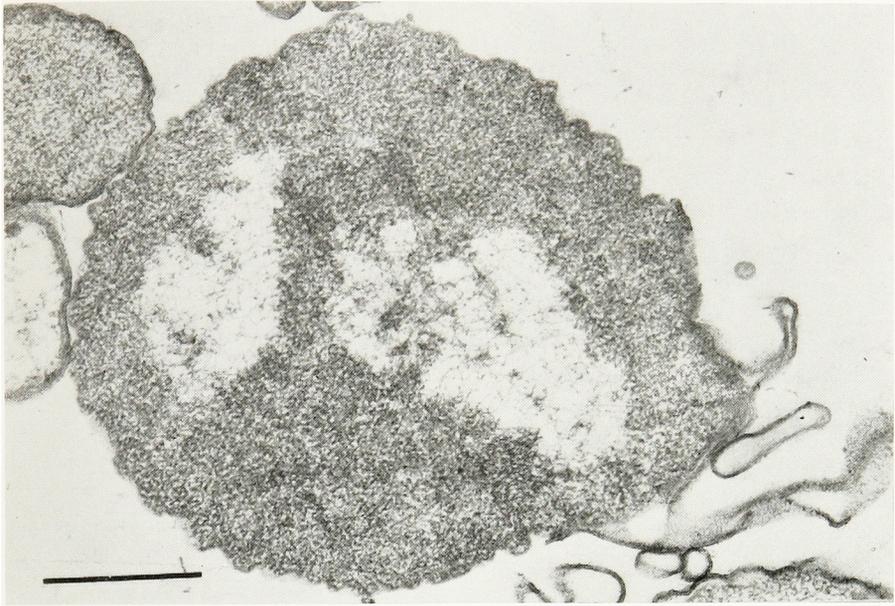
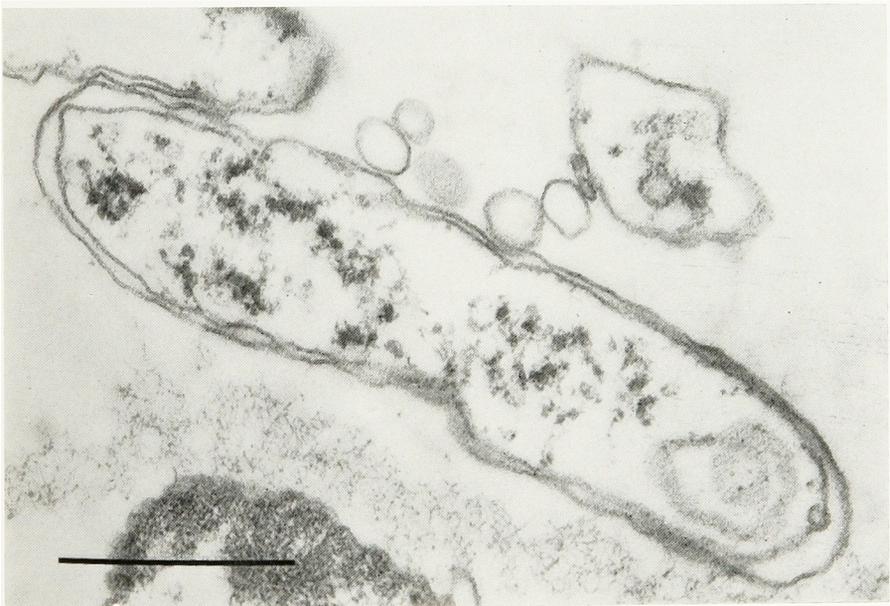


Fig. 23 Electron micrograph of *Pr. morganii* exposed to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of CS-1170 for 2 hours.

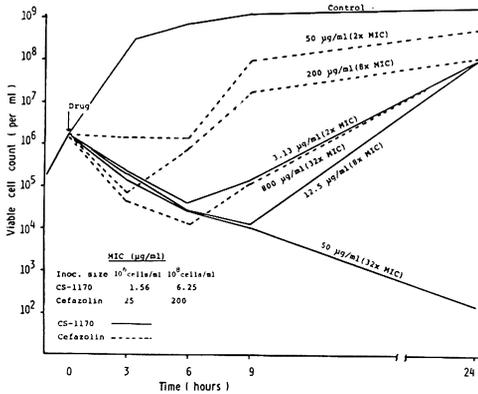


IA), 6 (機能は現在不明) に強く結合し, ほとんど遊離しないと報告されている点である⁹⁾。

近年開発され, あるいはされつつある新規の penicillin や cephalosporin 系抗生物質の多くは, 接種菌量を減じた場合には MIC は非常に優れているが, 10^8 cells/ml の接種菌量では耐性を示すというような, 接種菌量によ

り MIC が著しく変動するという性質を有するものが多く, これらの薬剤の特徴は PBP 3 にとくに高い親和性を有しているものが多い^{10,11)}。そして filament は形成するが, filament 形成の幅が広く, 溶菌させるには結局は 10^8 cells/ml 程度あるいはそれ以上の濃度を必要とする。このような penicillin や cephalosporin 系薬剤で

Fig. 24 Bactericidal effect of CS-1170 and cefazolin against *Proteus inconstans* TK 410-421



は、個々に眺めればそれ以外にもいくつかの特徴があるのであろうが、薬剤の作用により溶菌しないということは、必ずしも生体側にとって有利な条件ではない。すなわち、それらの薬剤のように、filamentは形成するが溶菌せず、ただ分裂を阻止しているということは、ある意味では殺菌性の薬剤というよりも静菌作用の強い薬剤とも考えられ、このような薬剤の臨床における有効性は、生体側に感染防禦能に対する機能が正常に反応するヒトに対してであれば、臨床症状の改善は見られるであろうし、有用性はあると考えられる。しかしながら、新生児や未熟児、あるいは抗癌剤、免疫抑制剤等の使用により感染防禦能が著しく低下している症例の感染症であれば、臨床サイドからはやはり低濃度で確実に殺菌的に作用する抗生物質を望むのは当然である。

その点では、結果の項で順次明らかにしたように、CS-1170は *E. coli*, *Klebsiella*, *Pr. morganii* などで接種菌量による MIC の変動の幅が比較的少なく、また *Pr. inconstans*, *Serratia* 等でも試験管で3~4本のずれはあるものの 10^8 cells/ml の接種菌量の MIC でも臨床的には到達でき得る程度の濃度¹²⁾であることが注目される。また、*E. coli* や *Klebsiella* の中で、cephalosporin 系薬剤中 *E. coli* や *Klebsiella* に対しても最も殺菌性の高い CEZ に耐性を示す株に対しても、感性菌に対すると同程度の優れた感受性を示し、このことは、おそらくこの薬剤が β -lactamase に対して非常に安定で不活化され難いことの反映であろうと推測される。さらにこれらの耐性菌に対して、CEZ に比しそれほど遜色のないかなり強い殺菌作用を有していることが、生菌数の経時的測定、および位相差顕微鏡と電子顕微鏡による観察によって証明できたと考えられ、これらは CS-1170 が PBP 3 だけでなく β -lactamase が関与しているとい

Fig. 25 Morphological changes of *Pr. inconstans* (TK 410-421) exposed to various concentrations of cefazolin and CS-1170

Drug concentration (µg/ml)	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	
Cefazolin	Morphological changes														
	Turbidity 6h														
	Viable cell count 6h														
	Turbidity 24h														
CS-1170	Morphological changes														
	Turbidity 6h														
	Viable cell count 6h														
	Turbidity 24h														

われる PBP 5, 6 に強い親和性を有し、なおかつ PBP1 A, 1Bs にも強い親和性を有していることも合致する。

一方、indole 陽性の *Proteus* 属に対しては、菌種によってやや趣を異にし、*Pr. morganii* には驚くほどの殺菌作用を有し、菌はほとんど filament を形成することなくすみやかに溶菌に至る像が際立ったのに比べ、*Pr. vulgaris* に対しては殺菌作用の強く認められる株と弱い株があるように思われた。*Pr. inconstans* に対しては他の菌種に較べると殺菌効果は劣り、検討した2株とも完全に菌を死滅させるためには 50 µg/ml 前後の濃度を必要としている。また *Pr. inconstans* では薬剤の作用によって filament 状を呈するにもかかわらず、溶菌に至る像の少ない点が注目され、MIC 付近では filament からの再増殖が見られている。

Serratia では CS-1170 に耐性を示す株が 1/3 程度は認められるが、感性株でも MIC 付近の濃度では殺菌効果はそれほど強くは見られず、filament を形成した菌であっても時間の経過とともに *Pr. inconstans* と同様に filament の先端が再分裂し、徐々に増菌してくる像が観察され、致死的な濃度としては 10^8 cells/ml 接種時の MIC の8倍近い濃度が必要であろうと推測される。

なお、私達が調べた菌種のうち、*E. coli*, *Pr. morganii*, *Serratia* についての形態変化は既に西野等⁹⁾によっても報告されているが、*E. coli* に関しては彼等の用いた菌株は CEZ に感性の株であり、私達の用いた菌株は、*E. coli*, *Klebsiella* とも CEZ に耐性を示す株を用いている点に特徴がある。そして、その CEZ 耐性菌においても、CS-1170 を作用させた際の菌の形態変化は、西野等⁹⁾の示した CEZ 感性菌のそれとほぼ同様の結果であり、*Klebsiella* についても *E. coli* とほぼ同じ形態変化がみられた。また、*Pr. morganii*, *Serratia* の形態変化でも西野等⁹⁾の報告とほぼ同様の成績が得られているが、私達が行なった *Pr. vulgaris*, *Pr. inconstans* では *Pr. morganii* と異なりむしろ *Serratia* に近い形態変化の像が観察された。すなわち、本研究によって明らかになったのは、CS-1170 を作用させた際の菌の形態変

化に関して3の型に大別できるのではないかと考えられた点である。第1は *E. coli* や *Klebsiella* で観察された長い filament 形成の後比較的早く溶菌に至るもの、第2は *Pr. morgani* に代表される比較的短い filament あるいは spheroplast から速やかに溶菌に至るもの、第3は *Serratia* や *Pr. inconstans* に代表される長い filament を形成するものの、溶菌に至るまでの経過が長く、溶菌に至らない菌では正常な桿菌への再分裂がみられるものがあるということになる。

このような菌種間における形態変化の相違は、それぞれの菌が産生する β -lactamase の CS-1170 に対する量的あるいは質的な相違によるものと理解されるが、それだけではなく、菌そのものの持つ壁構造や細胞膜の相違による点も加味されていると考えられ、今後は単に MIC や菌の形態を見るだけでなく、これらの菌種による相違も解明しなければ真の意味での薬剤の有効性及び臨床へのアプローチは考えられないと感じられた。さらに個々の菌種に対する CS-1170 の作用を眺める時、まだかなりの改良点のあることを認識し、それらの菌種に対してはさらに MIC の優れた、しかも低濃度で殺菌作用の強い薬剤の開発が必要であろうし、また *Serratia* の無効株を含めて、*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* 等にも抗菌力を有する薬剤の開発が近い将来に望まれる。

以上、CS-1170 が抗菌作用を示すいくつかの菌種に対しての殺菌作用の特徴について考察を述べ、さらにそれらの事実から今後解決されるべき2, 3の問題点があることを言及した。それらの中から臨床への橋渡しとして考えられることは、CS-1170 は従来の cephalosporin 系薬剤耐性菌にも効くし、殺菌作用も強いということから、おそらく将来は新生児・未熟児などへの適応がいちばん重要な課題となるであろうし、また現在の耐性菌の出現状況を考えると、臨床には不可欠な薬剤であると考えられる。成人における臨床試験の後、安全性が確認されるのならば、早急に小児科領域への適応を検討すべき薬剤であろう。

引用文献

- 1) NAKAO, H.; H. YANAGISAWA, B. SHIMIZU, M. KANEKO, M. NAGANO & S. SUGAWARA: A new semisynthetic 7 α -methoxycephalosporin, CS-1170: 7 β -[[[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) 五島瑛智子, 小川正俊, 辻明良, 金子康子, 桑原章吾: Cepharmycin 系の新物質 CS-1170 の細菌学的評価: Cephalosporin 剤および Cefoxitin との抗菌作用の比較。 *Chemotherapy* 26, S-5: 1~

- 20, 1978
- 3) 田島政三, 三橋進: CS-1170 の抗菌作用について。 *Chemotherapy* 26, S-5: 21~26, 1978
- 4) 西野武志, 宇津井幸男, 後藤直正, 故中沢昭三: CS-1170 による *Escherichia coli*, *Proteus morgani*, *Serratia marcescens* の形態変化について。 *Chemotherapy* 26, S-5: 67~80, 1978
- 5) 菅原真一, 田島政三, 五十嵐勇, 宇津井幸男, 大屋哲, 中原正城: 新セファマイシン系抗生物質 CS-1170 の抗菌活性。 *Chemotherapy* 26, S-5: 81~98, 1978
- 6) MIC 測定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 7) SPRATT, B.G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. *Eur. J. Biochem.* 72: 341~352, 1977
- 8) NOGUCHI, H.; M. MATSUHASHI, T. NIKAIDO, J. ITOH, N. MATSUBARA, M. TAKAOKA & S. MITSUHASHI: Affinities of beta-lactam antibiotics to bind to penicillin-binding proteins in *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in relation to their antibacterial potencies. "Microbial Drug Resistance, Vol. II. Microbial Drug Resistance and Related Plasmids" University of Tokyo Press, 1978
- 9) OHYA, S.; M. YAMAZAKI, S. SUGAWARA, S. TAMAKI & M. MATSUHASHI: New cephamycin antibiotic, CS-1170: Binding affinity to penicillin-binding proteins and inhibition of peptidoglycan-crosslinking reactions in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 780~785, 1978
- 10) IIDA, K.; S. HIRATA, S. NAKAMUTA & M. KOIKE: Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by a new synthetic penicillin, piperacillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 257~266, 1978
- 11) NOGUCHI, H.; M. MATSUHASHI, M. TAKAOKA & S. MITSUHASHI: New antipseudomonal penicillin, PC-904: Affinity to penicillin-binding proteins and inhibition of the enzyme cross-linking peptidoglycan. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 617~624, 1978
- 12) 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

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF A NEW CEPHAMYCIN DERIVATIVE CEFMETAZOLE (CS-1170)

KIMIKO UBUKATA, HIROKO TAKAHASHI, MINORU SAWAI,

KOTA SAITO and MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine

The bactericidal effect of cefmetazole, a new antibiotic of cephamycin derivative, against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii* and *Proteus inconstans* has been observed in comparison with cefazolin (CEZ), through the differences of MIC depending on the inoculum size, the change of viable cell counts during the treatment of antibiotics and the morphological alteration of bacilli; the following results have been obtained.

1. The sensitivity of cefmetazole to the above bacilli is very well and especially good sensitivity is shown to bacilli resistant to CEZ. For all of bacilli tested, a few changes of MIC between the inoculum size of 10^8 cells/ml and that of 10^6 cells/ml were observed.

2. Viewing from the morphological alteration of bacilli during the treatment of antibiotics, bacilli form filaments with a concentration around MIC when 10^6 cells/ml are inoculated and form spheroplasts with a concentration around MIC when 10^8 cells/ml are inoculated. Depending on the kinds of bacillus, some were seen to be rapid lysis and some remained as spheroplasts. With *Serratia marcescens* and *Proteus inconstans*, some were seen to regrow from its tip after filaments were formed due to the concentration of antibiotic used for treatment. Judging from this, it is considered that cefmetazole is not always stable enough to β -lactamase produced from these bacilli.

3. The above-mentioned phenomenon of *Serratia marcescens* and *Proteus inconstans* can be inferred from the sequential change of viable cell counts during the treatment with antibiotic and 8 times the concentration of MIC when 10^6 cells/ml are inoculated is required to prevent live bacilli from growing.

4. Bactericidal action of cefmetazole, however, is nearly comparable with that of CEZ and it has been clarified that cefmetazole shows prominent bactericidal effect against bacilli resistant to CEZ.