

Cefaclor の *in vitro* 抗菌作用

吉田 正・亀田康雄・元川清司・村上和久
塩野義製薬株式会社研究所

Cefaclor (CCL) は Cephalexin (CEX) の 3 位の Methyl 基を Chlor 基で置換した化学構造をもつ新しい経口用合成セファロsporin 誘導体である。

CCL の抗菌スペクトルは基本的には CEX と類似しているが、*S. faecalis* を除くグラム陽性菌および *E. coli*, *Klebsiella* sp., *P. mirabilis*, *H. influenzae* 等のグラム陰性菌に強い抗菌力を示した。

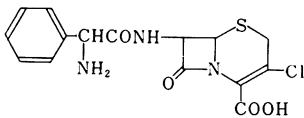
臨床分離株 675 株のうち、これらの菌種に属する大部分の株に対して CCL の MIC は 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下に分布し、その抗菌力は CEX よりも 2~8 倍強かった。CCL の抗菌力は、酸性培地で強く、血清添加の影響をうけ、 β -lactamase 産生菌において接種菌量により弱められた。

グラム陰性菌の産生する β -lactamase に対しては、CEX よりも Penicillinase 型による分解を受けやすかったが、Cephalosporinase 型には安定であった。

殺菌作用は、MIC よりも低い濃度で速やかに発現し、殺菌率も CEX より高く、これが本剤の大きな特徴であった。このことは Penicillinase 産生菌についても同様に認められた。作用菌の形態観察から、CEX にくらべて著しい溶菌効果が認められ、CCL の強い殺菌力に反映した。CCL 作用菌の再増殖は、培地中の作用濃度が殺菌濃度以下に低下したときに起り、本剤に対する耐性化によるものでないことを確かめた。

Cefaclor は米国 Eli Lilly 社の研究所において開発された、経口用の新半合成 Cephalosporin 系抗生物質で、化学名は 3-chloro-7-D-(2-phenylglycinamido)-3-cephem-4-carboxylic acid であり、化学構造式は Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Chemical structure of cefaclor



本剤の抗菌スペクトラムは、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に広範囲であり、特に *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* に対して強い抗菌力を有することが見出されている。^{1,2)}

本報告は Cefaclor の試験管内抗菌作用に関する種々の検討を行ない、他の既知経口 β -lactam 剤と比較を行なったものである。

材料と方法

1. 使用薬剤

Cefaclor (CCL, Eli Lilly), Cephalexin (CEX, Shionogi), Cefatrizine (CFT, Bristol), Cephaloridin (CER, Shionogi), Cefazolin (CEZ, Fujisawa), Amoxicillin (AMPC, Beecham), Ampicillin (ABPC, Fujisawa) のそれぞれ力価の明らかなものを使用した。

2. 試験菌株

標準菌株は、当研究所保存株を使用し、臨床材料由来の菌株は、塩野義製薬株式会社臨床検査室で分離同定されたものを用いた。*E. coli* ML 1410, *E. coli* ML 1410 RGN 238 その他 5 株は、千葉大学薬学部微生物薬品化学教室より分与された。*K. aerogenes* 1082 E, *E. cloacae* 53, *E. coli* W3110 RTEM その他 7 株は、Eli Lilly 社より分与された。

3. 抗菌力測定法

日本化学療法学会により定められた、最小発育阻止濃度測定標準法³⁾に従って MIC を測定した。

増菌用培地には Trypto soy broth (TSB, 栄研) を用いた。Streptococci には、これに非働化馬血清を、また *Haemophilus influenzae* には、これに Bact-fildes enrichment (Difco) を、それぞれ 1% 濃度に添加した液体培地を使用した。感受性測定培地として、Sensitivity test agar (STA, 栄研) を使用したが、streptococci には、これに非働化馬血清を 5% 加えた。*H. influenzae* には、STA 培地に 3% Bact-fildes enrichment を添加して使用した。

接種用菌液は、増菌培地で 37°C、20 時間培養した菌液を TSB 培地で次のように希釈して、10⁸ cells/ml 及び 10⁶ cells/ml の二段階に調製した。すなわち、グラム陽性菌は、原液及び 100 倍希釈液を、グラム陰性菌は、10 倍及び 1,000 倍希釈液を、それぞれ使用した。ただし、*H. influenzae* は 10 倍及び 100 倍希釈液を調

製し、これを 10^7 cells/ml 及び 10^6 cells/ml の菌液として使用した。菌液は接種装置を用いて一白金耳(約 1 μ l)を点滴塗抹し、37°C で一夜培養後 MIC 判定を行った。

4. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

9 株の標準株を用いて、抗菌力に及ぼす各種因子の影響を検討した。試験培地には、STA, Heart infusion agar (HIA), Trypto soy agar (TSA), Mueller hinton agar (MHA), Nutrient agar (NTA), いずれも栄研製を使用した。培地 pH は、滅菌後の STA 培地に 1 N の HCl 及び 1 N の NaOH を加えて、それぞれ 6.0, 7.0, 8.0 に調製した。人血漿は 56°C で 30 分非働化して、10% 及び 50% 濃度で STA 培地に添加した。

5. 殺菌作用の測定法

a) 生菌数の変化

37°C 一夜培養した菌を、TSB 培地中で *E. coli* NIHJ JC-2 株は 500 倍に、*S. aureus* FDA 209P JC-1 株は 10 倍に希釈して、更に 37°C, 1.5 時間静置培養し対数増殖期の菌液を調製した。この菌液を、あらかじめ 37°C に温めた新鮮 TSB 培地で適宜希釈し、所定の菌数を得るようにした。2 倍希釈系列の薬剤は、最終濃度の 10 倍濃度に調製し、その 1 容を培養菌液 9 容に加えて 37°C 水浴中で静置培養した。生菌数の測定は、通常の混釈法により行なった。

b) MBC (最小殺菌濃度) の経時変化

Microtiter 用 U-plate (96 wells, Cooke 社製) に、TSB 培地中で薬剤の 2 倍希釈系列(各 50 μ l)を作成する。次に TSA 培地で培養した対数増殖期の菌液を約 1×10^7 cells/ml に調製し、50 μ l 添加することにより菌を接種して 37°C で静置培養する。各 well から定量的に 0.1 μ l 採取できるように工夫した装置を用いて、経時的に(1, 2, 3, 4, 5, 24 時間)培養液の一部を採取し、NTA 培地(ニッサン)の平板上に点滴塗抹した。移植後平板は 37°C で 20 時間培養し、接種位置に形成される集落数を計測して、集落が 10 個以下になる最低濃度を最小殺菌濃度(MBC)として判定した。また U-plate は、そのまま 37°C, 24 時間培養し、肉眼的に菌の混濁を認めない最小濃度を MIC とした。この実験条件における殺菌率は次式から求められる。

$$\text{殺菌率 (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{点滴中の集落数}}{\text{初菌数}} \times 10^4\right)$$

6. 位相差顕微鏡による作用菌の形態観察

2 倍希釈系列濃度の薬剤を含む STA 平板を準備し、対数増殖期の菌液(約 5×10^7 cells/ml)一白金耳を点滴接種した。塗抹部分にカバーガラスをのせ 37°C で培養し、1 時間毎に位相差顕微鏡(日本光学製、倍率 $\times 1,000$)で作用菌の形態を観察した。

7. 作用中の残存力価測定

TSB 培地で調製した *E. coli* の対数増殖期の菌液 9 容に 2 倍希釈系列の薬剤 1 容を加えて、Biophotometer (Jouan 製)で 37°C 振とう培養し濁度測定を行った。0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後に培養液の一部を採取し、生菌数と培地中の CCL 濃度を測定した。残存力価は、採取した培養液に等量のアセトンを加えて殺菌したのち、Antibiotic medium No. 8 (Difco)を 1/2 濃度にした検定用培地で、*M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とした Band culture 法⁴⁾で測定した。

8. β -lactamase の調製と活性測定法

粗酵素標品の調製は、前報⁵⁾の方法で行なった。ただし、*S. aureus* の場合は、5 mg/ml の PCG で β -lactamase を誘導し、5 分間超音波破碎した。一部の β -lactamase は前報に述べた方法で、カラムクロマトグラフィで部分精製したものをを用いた⁶⁾。 β -lactamase 活性は Microbiological assay 又は、Spectrophotometric assay により測定した⁷⁾。

9. β -lactamase 遺伝子をもった R-plasmid の伝達

接合伝達は、受容菌として *E. coli* ML 1410 (NA 耐性株)を用いて Mueller hinton broth (MHB, 栄研)中で行った。選択培地としては、NA 100 μ g/ml, ABPC 50 μ g/ml を含む NTA 培地を用いた。受容菌、供与菌を別々に 37°C で振とう培養し、菌数が $1 \sim 3 \times 10^8$ cells/ml に達した時、受容菌、供与菌を培養液体積比で 10:1 の割合に混ぜ、37°C で一夜静置培養した。この混合菌液を生理食塩水で適当に希釈し、上記の選択培地上にコンラージで塗布し、37°C で一夜培養後、増殖したコロニーを選択培地上にレプリカして耐性を確認した。増殖したコロニーを分離し、R-plasmid 由来 β -lactamase 産生株として用いた。対照として、受容菌だけ、あるいは、供与菌だけを選択培地上に塗布してコロニーが増殖しないことを確かめた。

実験成績

1. 抗菌スペクトラム

CCL のグラム陽性菌に対する抗菌力は、AMPC に比べてやや低いが CFT と同程度であり、*S. faecalis* を除く菌種に強い抗菌力を示した。一方グラム陰性菌に対して CFT, CEX と同様の範囲のスペクトラムを持つが、CEX や AMPC より強い抗菌力を示した。しかし、*Enterobacter*, *Serratia*, *P. aeruginosa* に対しては、対照薬剤と同様に抗菌力を示さなかった。インドール陽性 *Proteus* に対しては、感受性を示す菌も認められるが、接種菌量を大きくすると抗菌力の低下が顕著に認められた (Table 1, 2)。

Table 1 Antibacterial spectra of cefaclor and other β -lactam antibiotics

Inoculum: One loopful of 10^6 cells/ml

Organisms	MIC (μ g/ml)			
	CCL	CEX	CFT	AMPC
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.1	0.39	0.2	0.025
<i>B. cereus</i> IFO 3001	3.13	12.5	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.78	1.56	0.39	0.1
<i>S. aureus</i> SMITH	1.56	6.25	0.78	0.39
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.39	1.56	0.39	0.1
<i>S. aureus</i> C-14 (ABPC-R)	1.56	3.13	0.78	3.13
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14490	0.39	1.56	0.39	0.39
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.1	0.39	0.05	≤ 0.0125
<i>S. faecalis</i>	100	>100	25	0.78
<i>S. pneumoniae</i> I	0.78	1.56	0.2	0.025
<i>S. pneumoniae</i> II	0.78	3.13	0.39	0.025
<i>S. pneumoniae</i> III	1.56	6.25	0.39	0.05
<i>C. diphtheriae</i> Tront	≤ 0.0125	0.1	0.025	≤ 0.0125

<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	6.25	1.56	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.13	12.5	1.56	6.25
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1	0.39	3.13	0.78	0.78
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.78	6.25	1.56	50
<i>S. dysenteriae</i>	0.78	6.25	0.78	3.13
<i>S. flexneri</i> variant Y	0.78	6.25	0.78	1.56
<i>S. sonnei</i> OHARA	1.56	6.25	0.78	3.13
<i>S. typhi</i>	0.39	3.13	0.39	0.39
<i>S. paratyphi</i> A	1.56	6.25	1.56	0.78
<i>P. mirabilis</i> PR-4	1.56	6.25	1.56	0.78
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	3.13	12.5	3.13	1.56
<i>P. vulgaris</i> CN-329	100	25	12.5	100
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	25	25	3.13	12.5
<i>P.morganii</i> IFO 3848	1.56	12.5	0.78	0.78
<i>P. inconstans</i> IFO 12930	1.56	3.13	0.39	0.39
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	>100	>100	>100	>100
<i>C. freundii</i> IFO 12681	12.5	100	12.5	25
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	>100	>100	>100	25
<i>P. aeruginosa</i> D	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	>100	>100	>100	>100

Agar dilution method

Medium: Sensitivity test agar (STA)

(Streptococcus, Corynebacterium : STA + 5% Horse serum)

Table 2 Antibacterial spectra of cefaclor and other β -lactam antibioticsInoculum: One loopful of 10^8 cells/ml

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	CCL	CEX	CFT	AMPC
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.78	0.39	0.05
<i>B. cereus</i> IFO 3001	6.25	25	6.25	25
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	1.56	6.25	0.78	0.2
<i>S. aureus</i> SMITH	6.25	12.5	3.13	0.78
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.56	3.13	0.78	0.2
<i>S. aureus</i> C-14 (ABPC-R)	12.5	6.25	3.13	>100
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14490	6.25	3.13	1.56	25
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.2	0.78	0.1	0.025
<i>S. faecalis</i>	100	>100	50	0.78
<i>S. pneumoniae</i> I	0.78	3.13	0.2	0.025
<i>S. pneumoniae</i> II	1.56	3.13	0.39	0.05
<i>S. pneumoniae</i> III	3.13	6.25	0.78	0.05
<i>C. diphtheriae</i> Tront	≤ 0.0125	0.1	0.025	≤ 0.0125
<hr/>				
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	12.5	3.13	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6.25	12.5	3.13	12.5
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1	0.78	6.25	1.56	1.56
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	1.56	6.25	1.56	>100
<i>S. dysenteriae</i>	1.56	6.25	1.56	6.25
<i>S. flexneri</i> variant Y	1.56	6.25	1.56	3.13
<i>S. sonnei</i> OHARA	3.13	6.25	1.56	6.25
<i>S. typhi</i>	0.78	6.25	0.78	0.78
<i>S. paratyphi</i> A	1.56	12.5	1.56	0.78
<i>P. mirabilis</i> PR-4	3.13	25	3.13	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	6.25	25	3.13	1.56
<i>P. vulgaris</i> CN-329	>100	>100	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	>100	>100	100	>100
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	25	25	12.5	50
<i>P.morganii</i> IFO 3848	50	>100	50	12.5
<i>P. inconstans</i> IFO 12930	100	100	25	1.56
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	>100	>100	>100	>100
<i>C. freundii</i> IFO 12681	50	>100	50	100
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	>100	>100	>100	50
<i>P. aeruginosa</i> D	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	>100	>100	>100	>100

Agar dilution method

Medium : Sensitivity test agar (STA)

(Streptococcus, Corynebacterium : STA + 5% Horse serum)

Table 3 Effect of media on antibacterial activity of cefaclor (CCL) by agar dilution method

Inoculum 1) Medium 2) Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	10^6					10^8				
	STA	HIA	TSA	MHA	NTA	STA	HIA	TSA	MHA	NTA
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.78	0.78	0.78	0.39	0.39	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> SMITH	3.13	6.25	3.13	6.25	1.56	6.25	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>S. aureus</i> C-14 (ABPC-R)	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56	12.5	25	12.5	25	12.5
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
<i>E. coli</i> EC-14	0.78	1.56	0.78	1.56	0.78	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56
<i>E. coli</i> 377 (CET-R)	25	25	25	25	12.5	100	100	100	100	50
<i>E. coli</i> 73 (CET-R)	12.5	25	12.5	25	12.5	>100	>100	>100	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>P. mirabilis</i> PR-4	0.78	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56

1) Inoculum size (cells/ml): One loopful for agar dilution plate

2) Media: STA : Sensitivity test agar, HIA : Heart infusion agar, TSA : Trypto-soy agar.
MHA : Mueller-Hinton agar, NTA : Nutrient agar,

Media were distributed from Eiken chemicals.

Table 4 Effect of medium pH on antibacterial activity of cefaclor (CCL) in agar dilution method¹⁾

Inoculum 2) Organisms	pH	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		10^6			10^8		
		6.0	7.0	8.0	6.0	7.0	8.0
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1		≤ 0.1	0.39	0.78	≤ 0.1	0.78	3.13
<i>S. aureus</i> SMITH		1.56	6.25	NG ³⁾	1.56	6.25	25
<i>S. aureus</i> C-14 (ABPC-R)		0.39	1.56	3.13	1.56	25	50
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		1.56	3.13	12.5	6.25	12.5	25
<i>E. coli</i> EC-14		1.56	0.78	1.56	1.56	1.56	3.13
<i>E. coli</i> 377 (CET-R)		25	12.5	100	50	100	>100
<i>E. coli</i> 73 (CET-R)		12.5	12.5	12.5	100	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1		0.78	0.39	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>P. mirabilis</i> PR-4		0.78	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56

1) Medium: Sensitivity test agar (STA)

Medium pH was adjusted with 1N HCl or 1N NaOH.

2) Inoculum size (cells/ml): One loopful for agar dilution plate

3) NG: No growth

Table 5 Effect of human plasma on antibacterial activity of cefaclor (CCL) in agar dilution method¹⁾

Organisms	Inoculum ²⁾ Human plasma %	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		10^6			10^8		
		0	10	50	0	10	50
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1		0.39	0.78	3.13	0.78	1.56	6.25
<i>S. aureus</i> SMITH		3.13	6.25	25	6.25	12.5	50
<i>S. aureus</i> C-14 (ABPC-R)		1.56	3.13	6.25	12.5	50	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		3.13	6.25	25	12.5	25	100
<i>E. coli</i> EC-14		0.78	0.78	3.13	1.56	6.25	25
<i>E. coli</i> 377 (CET-R)		12.5	50	>100	100	>100	>100
<i>E. coli</i> 73 (CET-R)		6.25	12.5	50	>100	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1		0.39	0.39	3.13	0.78	0.78	6.25
<i>P. mirabilis</i> PR-4		0.78	1.56	6.25	1.56	3.13	6.25

1) Medium: Sensitivity test agar

2) Inoculum size (cells/ml): One loopful for agar dilution plate

Table 6 Effect of inoculum size on antibacterial activity of cefaclor (CCL) in agar dilution method¹⁾

Organisms	Inoculum ²⁾	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1		1.56	1.56	0.78	0.78	ND ³⁾	ND
<i>S. aureus</i> SMITH		12.5	6.25	3.13	1.56	ND	ND
<i>S. aureus</i> C-14(ABPC-R)		25	3.13	1.56	1.56	ND	ND
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		12.5	3.13	3.13	1.56	1.56	1.56
<i>E. coli</i> EC-14		3.13	0.78	0.78	0.78	0.39	0.39
<i>E. coli</i> 377 (CET-R)		100	25	12.5	12.5	6.25	3.13
<i>E. coli</i> 73 (CET-R)		>100	100	12.5	6.25	6.25	6.25
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1		0.78	0.78	0.78	0.39	0.39	0.39
<i>P. mirabilis</i> PR-4		1.56	0.78	0.78	0.39	0.39	0.39

1) Medium: Sensitivity test agar (Eiken)

2) Inoculum size (cells/ml) : one loopful for agar dilution plate

3) ND : Not done

Fig. 2 Influence of preservation time with various agar media on antibacterial activity of cefaclor

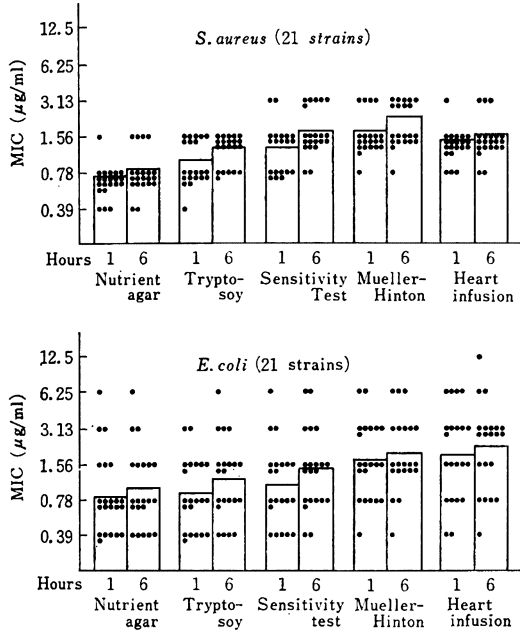


Fig. 3 Effect of various preserving conditions of agar plate prior to inoculation on cefaclor activity

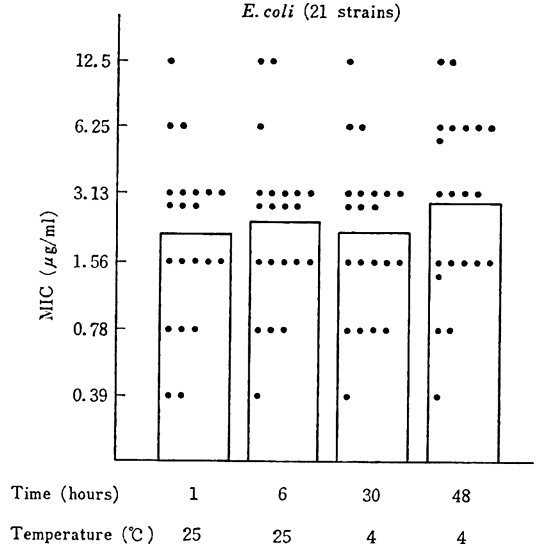
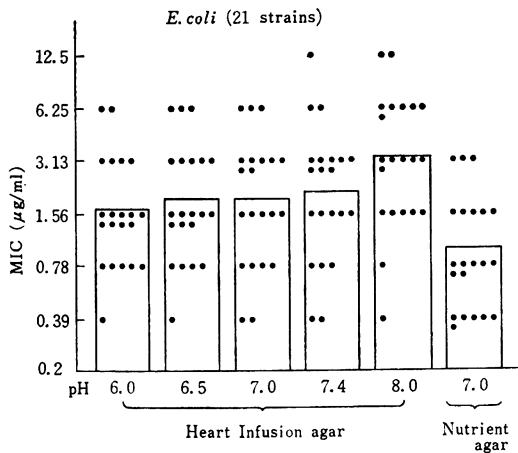


Fig. 4 Effect of medium pH on cefaclor activity



2. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

a) 標準菌株による検討

グラム陽性菌 (*S. aureus*) 3 株及びグラム陰性菌 6 株の計 9 株を用いて、CCL の抗菌力に及ぼす試験培地種、培地 pH、人血漿添加及び接種菌量の影響を寒天稀釈法で調べた。

5 種の寒天培地を用いて感受性を比較した結果、接種菌量をかえても MIC 値の変動は 2 倍以内に収まり有意の差は認めなかった (Table 3)。培地 pH による CCL の抗菌力は、*S. aureus* 3 株に対して低菌量・高菌量接種ともに、酸性側で 2~8 倍増強が認められた。グラム陰性菌に対しては菌株によって様ではないが、塩基性培地で減弱する傾向が認められた (Table 4)。CCL の抗菌力は人血漿添加によって影響を受け、無添加に比べて MIC 値の上昇が認められた (Table 5)。すなわち、低菌量・高菌量接種ともに、抗菌力は無添加培地に比べて 10% 添加で半減、50% 添加で 1/2 から 1/8 程度低下した。接種菌量の影響は 10^8 cells/ml 接種で MIC が顕著に高くなる菌種が認められた (Table 6)。特にこの傾向が強く顕われる菌株は *S. aureus* の ABPC 耐性株、*E. coli* の CET 耐性株である。その他の菌株については、 10^8 cells/ml と 10^6 cells/ml 接種の菌量差で 2~4 倍の MIC 変動にとどまり比較的影響は少なかった。この傾向は後述する臨床分離株の感受性分布においても認められた。

b) 臨床分離菌による検討

CCL の抗菌力に及ぼす試験培地種、培地 pH の影響及び後述する安定性における性質を考慮して、含寒天培地作成から菌接種までの平板の保存条件が MIC に及ぼ

Table 7 Stability of cefaclor in culture medium

Test condition : 37°C
Test concentration : 10 µg/ml

Medium	pH	Remaining activity %						
		0	1	2	3	4	6	24 hrs.
TSB (Eiken)	Ordinary (7.4)	100	81	75	53	55	42	<0.1
	7.5	100	86	74	60	55	39	<0.1
	7.0	100	96	80	73	65	48	1
	6.5	100	93	80	82	77	60	8
	6.0	100	103	99	94	96	89	30
MHB (Difco)	Ordinary (7.4)	100	95	104	91	79	63	3
	7.5	100	88	74	80	68	56	3
	7.0	100	91	93	88	82	75	7
	6.5	100	97	94	98	87	80	17
	6.0	100	92	99	98	104	96	36
HIB (Eiken)	Ordinary (7.3)	100	103	96	86	78	68	5
	7.5	100	97	91	85	80	60	4
	7.0	100	102	92	91	81	76	10
	6.5	100	98	91	91	83	80	21
	6.0	100	97	107	91	109	96	41
NTB (Eiken)	Ordinary (7.1)	100	96	91	93	96	83	12
	7.5	100	93	91	84	90	77	6
	7.0	100	100	91	90	96	79	13
	6.5	100	99	100	98	90	84	26
	6.0	100	100	100	100	92	94	43

す影響を、臨床分離 *S. aureus*, *E. coli* の各 21 株で検討した。5 種の培地で CCL 含寒天平板培地を作製し、菌接種まで室温 (25°C) で 6 時間放置したものと、菌接種直前 (25°C 1 時間) に含寒天平板培地を作製したものとで MIC に及ぼす影響を調べ、感受性分布の成績を Fig. 2 に示した。図中帯グラフの高さは幾何平均値を示している。

S. aureus, *E. coli* とともに MIC 平均値は、5 種の培地で比較するとたかだか 2 倍程度の差を示すにすぎないが、感受性は NTA 培地で高く、MHA 培地で低くあらわれた (Fig. 2)。一方、寒天平板作製から菌接種までの放置時間を室温で 6 時間に延長しても、両菌種ともに MIC 値に有意の差は認めなかった。更に、菌接種までの平板の保存状態をかえた時の感受性分布の成績を Fig. 3 に示した。4°C で 48 時間保存した平板で分布が MIC の高い方へ広がる傾向を示したが、それ以外の条件では MIC は 0.39~12.5 µg/ml に分布し、相互に差を認めなかった。すなわち、CCL を含む平板は、室温

(25°C) に放置した場合 6 時間以内、冷所 (4°C) に保存した場合 30 時間以内に使用すれば MIC 値を変動させるほどの失活は起らないということが出来る。*E. coli* に対する CCL の抗菌力は、培地の pH を 6.0 から 7.4 の範囲で変えてもほとんど影響を受けなかったが、pH 8.0 で低下し、MIC 値が上昇する株を認めた (Fig. 4)。

c) 培地中の CCL 安定性

4 種の液体培地に初濃度 10 µg/ml を添加して、37°C における CCL 濃度変化を調べた (Table 7)。市販培地を通常処方 pH にした場合の安定性についてみると、TSB が最も不安定であり、CCL 力価は 3~6 時間で半減し 24 時間後には完全に失活した。しかし、他の 3 培地中では力価の低下はやや遅れ、6 時間で 60% 以上の力価が残存した。なかでも NTB では 83% と力価の失活は少なく最も安定であった。一方、培地の pH をかえると各培地とも酸性側で比較的安定であったが、中性より塩基性になると顕著な失活が認められ、CCL の抗菌力が塩基性培地で低下することを裏づけている。

Table 8-a Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> (110)	10^8	CCL					10	26	33	13	14	11	3	
		CEX						19	49	37	5			
		CFT				7	42	31	13	15	2			
		AMPC		7	9					2	8	28	9	5
	10^6	CCL			1	33	61	12	3					
		CEX				2	40	55	12	1				
		CFT			12	71	27							
		AMPC	7	11	3	36	18	18	14	3				
<i>Streptococcus pyogenes</i> (21)	10^6	CCL	11	8	1	1								
		CEX		1	3	15	1	1						
		CFT	20		1									
		AMPC	21											
<i>Streptococcus agalactiae</i> (33)	10^8	CCL				3	14	16						
		CEX						7	26					
		CFT		1	11	21								
		AMPC	32	1										
	10^6	CCL				12	21							
		CEX					1	25	7					
		CFT		2	28	3								
		AMPC	33											

3. 臨床分離株の感受性分布と交差感受性

臨床分離由来のグラム陽性菌 181 株及びグラム陰性菌 494 株に対する MIC 値を測定し、対照薬剤と比較して、その分布株数を Table 8 に示した。なお、感受性菌種については、累積百分率及び対照薬剤との感受性相関を Fig. 5~16 に示した。

S. aureus 110 株に対する CCL の MIC 値は、 10^6 cells/ml 接種で $0.39\sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に分布し、その最頻値は $1.56 \mu\text{g/ml}$ にあった (Table 8)。CCL の抗菌力は CEX より 2 倍程度強く CFT より 2 倍程度弱かった (Fig. 5)。 10^8 cells/ml 接種では、 $1.56\sim 100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布するようになり、接種菌量により MIC が 8 倍以上の差を示す菌株が 42 株認められた。これは CEX の 11 株、CFT の 21 株に比べて多く、菌量の影響を受けやすいことを示した。

CEX とで感受性相関を調べると、低菌量では、CCL に強い感受性を示すが、概ね良く相関している。高菌量接種では、CCL に強い感受性を示す株が 30%、逆に CEX に強い感受性を示す株が 30% あり、相関性が低くなる (Fig. 6)。このうち CCL に $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す 28 株は、CEX にはむしろ感受性が高く、AMPC にすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す

耐性菌であるところから、Penicillinase による影響が考えられた (Fig. 7)。その他のグラム陽性菌では、*Streptococcus pyogenes* に $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以下、*Streptococcus agalactiae* に $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 分布を示し、CEX よりそれぞれ 8 倍、4 倍抗菌力が強かった。しかし、*Streptococcus faecalis* に対する抗菌力は CEX と同様に弱かった。

E. coli 106 株に対する CCL の MIC 値は、 10^6 cells/ml 接種でその 96% が $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布した (Table 8)。CCL の抗菌力は CEX に比べて 4 倍程度強く、CFT とほぼ同等であった (Fig. 8)。 10^8 cells/ml 接種では、 1.56 から $>100 \mu\text{g/ml}$ まで広く分布し最頻値は $6.25\sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ を示した。接種菌量の大小により CCL の MIC が 8 倍以上の差を示す菌株が 29 株認められ、CEX の場合 (0 株) よりも多く、接種菌量の影響を受けやすい株が多く認められた。

CEX との感受性相関を調べると、低菌量では、CCL に強い感受性を示すが概ね良く相関している。高菌量接種では、CCL に感受性の高い株が 53% と多く認められるが、CEX に感受性の高い株も 19% あり、相関性は低下した (Fig. 9)。高菌量接種で CCL に $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す 23 株のうち、20 株は AMPC

Table 8-b Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Antibiotics	MIG ($\mu\text{g/ml}$)											
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100
<i>Streptococcus faecalis</i> (17)	10^8	CCL							1				14	2
		CEX									1			16
		CFT							1			16		
		AMPC			9	8								
	10^6	CCL							1				16	
		CEX									1		5	11
		CFT							1		4	12		
		AMPC				17								
<i>Escherichia coli</i> (106)	10^8	CCL					13	15	23	32	10	5	5	3
		CEX						1	23	63	17	1		1
		CFT			8	12	29	26	15	2	2	4	8	
		AMPC				12	5	28	12	2				47
	10^6	CCL		4	12	40	32	14	3					1
		CEX					13	58	32	1	1			1
		CFT		1	18	43	25	12	4	2				1
		AMPC			3	13	9	33	2				1	45
<i>Klebsiella sp.</i> (111)	10^8	CCL		1	10	62	18	10	1	5	2	1	1	
		CEX					6	74	25	6				
		CFT			16	45	24	15	2	3	2	3	1	
		AMPC			1	1				2	9	18	80	
	10^6	CCL		2	59	36	5	7	1	1				
		CEX					27	75	9					
		CFT		1	37	51	13	4	3	2				
		AMPC			2			1	2	13	29	43	21	

に $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性を示した。しかしながら、AMPCに $>100 \mu\text{g/ml}$ のMICを示す耐性菌47株の中に、CCLに $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下のMICを示す株が27株認められており、Penicillinase産生菌にも強い抗菌力をもつことを示した (Fig. 10)。

Klebsiella sp. 111株に対するCCLのMIC値は、低菌量接種で $0.2 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に広く分布するが、そのうち97株は $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し、CCLの抗菌力はCEXに比べて4~8倍程度強かった。高菌量接種では、 $0.39 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布するが、91株が $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布した (Table 8)。接種菌量によりCCLのMICが8倍以上の差を示す菌株は3株認められたにすぎず、*E. coli*の場合と異なり高菌量接種によるMIC上昇は少なかった (Fig. 11)。

CEXとの感受性相関を調べると、低菌量ではCEXに比べて広い濃度域に分布する傾向があったが、ほとんどの株はCCLに強い感受性を示した (Fig. 12)。高菌量ではなお広がるが、CCLに強い感受性を示してお

り、CEXよりもCCLに感受性の低い株は5%にすぎなかった。被検株のほとんどはAMPCに $25 \mu\text{g/ml}$ 以上のMICを示したが、CCLは $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し、AMPCとの交叉耐性は認めなかった (Fig. 13)。

P. mirabilis 36株に対するCCLのMIC値は、 $0.78 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に分布し、低菌量接種で $1.56 \mu\text{g/ml}$ 、高菌量接種で $3.13 \mu\text{g/ml}$ に鋭い一峰性のピークを示した (Fig. 14)。低菌量のMICで抗菌力を比較すると、CEXより8倍、CFTよりも2倍程度優れた感受性分布を示した。この菌種では、接種菌量によるMICの変動は少なかった。

インドール陽性のプロテウス菌には、4菌種155株を試験したが、CEXと同様に抗菌力は極めて弱かった (Table 8, Fig. 17, 18)。

*Enterobacter*には、被検菌44株のほとんどがCCLに非感受性であり、 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上のMICであった。

*Citrobacter freundii*は、*Enterobacter*よりも感受性は高いが抗菌力は極めて弱かった。

Table 8-c Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> (22)	10^8	CCL												22
		CEX												22
		CFT									1	2	3	16
		AMPC										2		20
	10^6	CCL							1		1	3	6	11
		CEX									1	2	3	16
		CFT						1	1	2	5	1	6	6
		AMPC									2		3	17
<i>Enterobacter cloacae</i> (22)	10^8	CCL											22	
		CEX											22	
		CFT										2	6	14
		AMPC											1	21
	10^6	CCL								1	1	11	5	4
		CEX									2	5	4	11
		CFT							2	8	9	2	1	
		AMPC									1			21
<i>Proteus mirabilis</i> (36)	10^8	CCL			1	4	30	1						
		CEX						1	25	9	1			
		CFT				3	30	3						
		AMPC			19	17								
	10^6	CCL			2	31	2	1						
		CEX						2	33		1			
		CFT				1	12	22	1					
		AMPC			1	23	12							

H. influenzae の MIC 測定に関して、 10^8 cells/ml 接種では判定が困難であるので、 10^6 , 10^7 cells/ml 接種で MIC を測定した。ABPC 耐性菌 6 株を含む 22 株の *H. influenzae* に対する CCL の MIC 値は、 10^6 cells/ml 接種で $0.78\sim 12.5$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、その最頻値は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ に認められた (Table 8)。抗菌力の強さは CEX と AMPC の中間に位し CFT と同等であった (Fig 15)。接種菌量による MIC の変動は少なく、AMPC 耐性株にも強い抗菌力を認めた (Fig. 16)。

4. 殺菌作用

a) 生菌数の経時変化

S. aureus 209P JC-1 の 3.1×10^6 cells/ml に対する CCL, CEX の殺菌作用を検討し Fig. 19 に示した。CCL は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で生菌数を減少させ、生菌数を初菌数の $1/100$ に減少させるには 6 時間を必要とした。CEX は生菌数を減少させるのに CCL の 4 倍濃度 (1.56 $\mu\text{g/ml}$) を要した。さらに、24 時間培養後菌増殖による混濁の認められない最低濃度は 1.56 μg

/ml で CCL と一致した。

E. coli NIHJ JC-2 の作用初菌数を 3 段階にかえて、それぞれに CCL 及び CEX を作用させたときの生菌数変化を Fig. 20 に示した。 10^6 cells/ml の初菌数に作用させたとき CCL は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度から生菌数を減少させ、これは平板希釈法による MIC と一致した。作用 4 時間までの生菌数で比較すると、CCL は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で生菌数を $1/1,000$ に低下させたが、CEX では CCL の 4 倍濃度を作用させても $1/100$ の生菌数低下が認められるにすぎず、短時間における CCL の殺菌力が CEX より強いことが明らかである。初菌数を 10^7 , 10^8 cells/ml にしたときも同一濃度では CEX よりも CCL の殺菌作用は強くあらわれた。しかしながら、CCL の特徴としていちど低下した生菌数は時間経過と共に再増殖する傾向が認められた。短時間における殺菌力と再増殖の特徴は、 10^7 cells/ml の菌数に作用させたときさらに強調された。

b) MBC の経時変化

Table 8-d Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Anti- biotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100		
<i>Indole positive Proteus</i> (155)	10^8	CCL				2						4	7	142		
		CEX						2				1	3	10	139	
		CFT				3						2	4	6	21	119
		AMPC			1	2							2	9	18	123
	10^6	CCL		3	1	3	1	3	8	17	15	32	72			
		CEX				3	3	2	5	8	20	26	88			
		CFT		3	4	4	9	19	18	17	19	13	49			
		AMPC		3			2	7	4	10	18	33	78			
<i>Proteus vulgaris</i> (60)	10^8	CCL												60		
		CEX											1	59		
		CFT													60	
		AMPC													60	
	10^6	CCL									3	2	11	44		
		CEX									5	8	6	41		
		CFT							1	2	6	7	7	37		
		AMPC									3	2	6	49		
<i>Proteus morganii</i> (47)	10^8	CCL										1	2	44		
		CEX											2	45		
		CFT								1	2		11	33		
		AMPC									1		1	45		
	10^6	CCL							2	3	6	10	9	17		
		CEX								1	1	3	7	35		
		CFT				2	5	13	10	3	2	3	9			
		AMPC							1		1	6	20	19		

臨床分離大腸菌 29 株に対する CCL の MBC 値 (最小殺菌濃度) を作用時間をかけて測定し, ABPC 感受性菌と耐性菌とに分けて検討した (Fig. 21)。

ABPC 感受性大腸菌 14 株に対する 24 時間作用後の MIC と MBC の分布は CCL と CEX で一致した。しかしながら短時間の殺菌効果では明らかに差が認められ, CCL の MBC 値は CEX に比べて $1/4 \sim 1/8$ 程度低い濃度に分布した。また CCL の 2~3 時間の MBC は, MIC に比べて $1/16$ 程度低くこの濃度でも殺菌率 98% を示すが, CEX は MIC の $1/2$ 濃度でしか殺菌効果を示さなかった。この傾向は, 前述の生菌数変化による殺菌作用において認めた結果とよく一致している。

これに対して, ABPC に $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示す耐性大腸菌に対する 24 時間作用後の MIC と MBC 分布では, CCL は CEX に比べて, 2~4 倍劣った。2~4 時間作用後の MBC 値を比較すると CCL の方が CEX より低い菌株が多く認められ短時間の殺菌効果

では CCL の方が CEX より強かった。CCL に対する ABPC 耐性大腸菌の MBC 分布範囲は CEX に比べて広く, また ABPC 感受性株の MBC 値との差も大きく認められた。ABPC 感受性株と耐性株の間で短時間の殺菌効果を比較すると, CEX では差が認められないが, CCL では時間の経過と共にこの差が広がる。E. coli の ABPC 耐性株は Penicillinase 型を産生するものが多く, CCL が CEX に比べて Penicillinase 型に不安定な性質を有することを示唆した。

5. 位相差顕微鏡による作用菌の形態観察

CCL および CEX を $0.05 \sim 800 \mu\text{g/ml}$ の濃度を含む STA 培地上に, 対数増殖期の E. coli NIHJ JC-2, K. pneumoniae SRL-1 を作用させてから, 1 時間毎に形態変化を位相差顕微鏡下で観察し, 形態変化の特徴から filament 形成濃度, 溶菌が始まる濃度および filament 像がなく溶菌像のみを認める濃度の 3 段階に分けて, 濃度と作用時間の関係をしらべた。

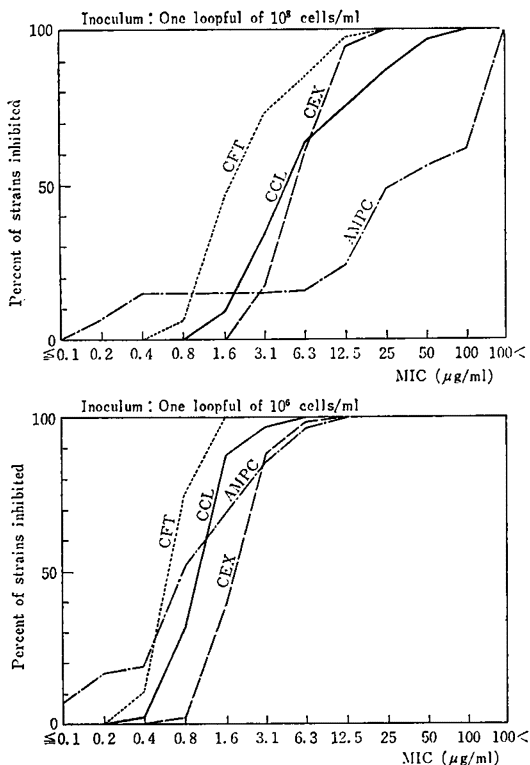
Table 8-e Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100	
<i>Proteus rettgeri</i> (21)	10^8	CCL					2						1	1	17
		CEX						2					1	1	17
		CFT				3						2		3	13
		AMPC			1	2							5	5	8
	10^6	CCL			3		1				2	2	2	6	5
		CEX					3				1	1	3	8	5
		CFT			3		2	3	1	1	2	8	1		
		AMPC			3			1	3	1	1	5	5	2	
<i>Proteus inconstans</i> (27)	10^8	CCL											2	4	21
		CEX										1	2	6	18
		CFT									1		6	7	13
		AMPC										1	4	12	10
	10^6	CCL				1	2	1	1	3	6	1	6	6	
		CEX						3	2	3	1	6	5	7	
		CFT				4		1	4	5	6	2	2	3	
		AMPC						1	3	3	5	5	2	8	
<i>Citrobacter freundii</i> (20)	10^8	CCL							1					4	15
		CEX									1			1	18
		CFT						1				4	4	5	6
		AMPC						1					2		17
	10^6	CCL					1		1	6	5	3	1	3	
		CEX								1	4	8	2	5	
		CFT					1	3	9	2	3			2	
		AMPC						1		3		3	5	8	

Table 8-f Susceptibility distribution of clinical isolates

Organisms (strains)	Inoculum size (cells/ml)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												
			≤ 0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	>100	
<i>Haemophilus influenzae</i> (22)	10^7	CCL					1	15	2		4				
		CEX							2	10	3	2	2	3	
		CFT							13	4	2	3			
		AMPC			6	6	3		1				5	1	
	10^6	CCL				1	6	10	1	2	2				
		CEX							5	8	5	2		2	
		CFT					1	15	3	2	1				
		AMPC		1	9	2	3		1		4	2			

Fig. 5 Susceptibility of *Staphylococcus aureus* (110 strains) to cefaclor, cephalixin, ceftazidime and amoxicillin



a) *E. coli* NIHJ JC-2

作用 2 時間後の形態変化は、CCL 0.39 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で始まり filament form を形成し、中央部に膨化した bulge form が観察された。CCL の作用濃度を上げるに伴い、細胞内容が bulge 部分から漏出した ghost filament が多くなり、さらに濃度を上げると filament を形成せず、完全に溶菌された残滓のみを認めるようになった (Fig. 22)。これらの変化があらわれる薬剤濃度の推移を Fig. 23 に示した。Filament を形成し始める濃度は、CCL の 0.39 $\mu\text{g/ml}$ に対して CEX では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、CCL は CEX よりも 1/8 低い濃度から形態変化が観察された。溶菌像が認められる濃度は 1 時間後 CCL, CEX の、それぞれ 12.5, 400 $\mu\text{g/ml}$ で観察された 32 倍の差が認められた。2 時間以降で溶菌濃度は更に低下し、CCL は 1.56 $\mu\text{g/ml}$, CEX は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ まで観察された。一方ほとんど完全に溶菌させる濃度は、CCL の場合 1 時間で 100 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間で 50 $\mu\text{g/ml}$, 5 時間で 12.5 $\mu\text{g/ml}$ と漸次低下した。これに対して CEX では 1 時間で >800 $\mu\text{g/ml}$, 2,3 時間で 800 $\mu\text{g/ml}$ であり、4 時間以降でようやく 50 $\mu\text{g/ml}$ に低下し、5 時間で 12.5 $\mu\text{g/ml}$ となり、CCL と一致した。このように CCL は CEX に比べて、短時間に優れた溶菌作用を示した。

b) *K. pneumoniae* SRL-1

薬剤作用菌は、本菌の非運動性を反映して filament は屈曲した S 字形状をなし、中央部に bulge の形成が認められた (Fig. 24)。CCL 作用菌は 1 時間後 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で filament を形成し、6.25 $\mu\text{g/ml}$ では溶菌を始

Fig. 6 Cross susceptibility of *Staphylococcus aureus* (110 strains) between cefaclor and cephalixin

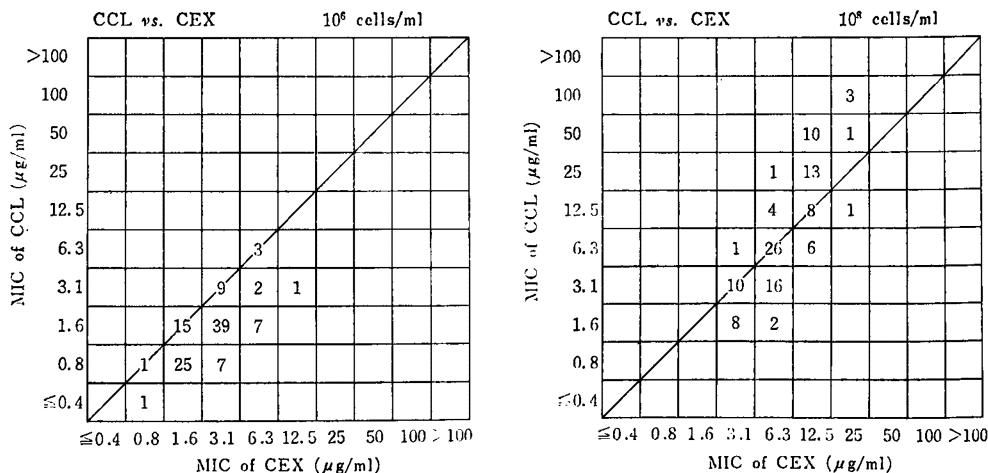


Fig. 7 Cross susceptibility of *Staphylococcus aureus* (110 strains) between cefaclor and amoxicillin

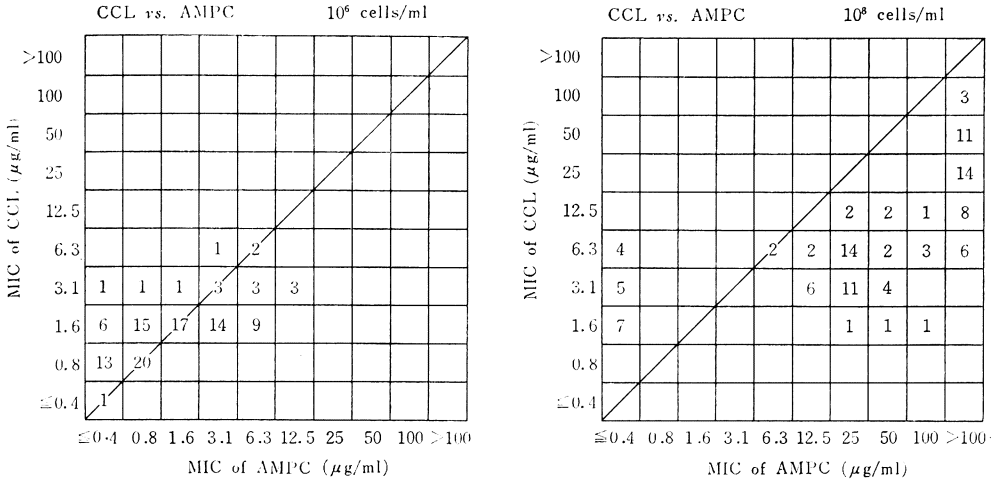
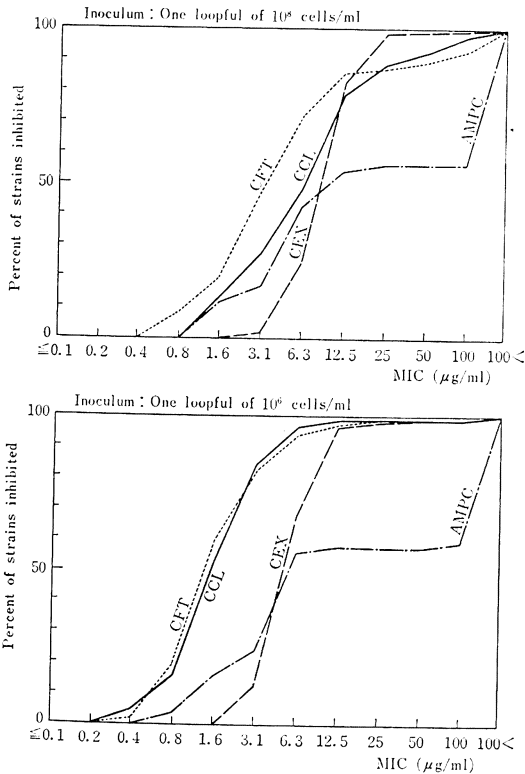


Fig. 8 Susceptibility of *Escherichia coli* (106 strains) to cefaclor, cephalexin, cefatrizine and amoxicillin



め、200 μg/ml でほとんど伸張せずに完全に溶菌した (Fig. 25)。2 時間以降で溶菌は更に低下し、3 時間で 0.2 μg/ml となり最大に達した。完全溶菌濃度も 2 時間の 200 μg/ml から、時間の経過と共に低下し、4 時間で 12.5 μg/ml となり、24 時間では 0.78 μg/ml と MIC 濃度まで低下した。一方、CEX 作用菌では 1.56 μg/ml で filament を形成し、CCL よりも 8~16 倍高濃度を要した。溶菌の始まる濃度は、1 時間作用で 400 μg/ml と CCL よりも明らかに劣り、2 時間以降急激に低下し 4 時間で 1.56 μg/ml と最大に達するが、CCL よりも常に高濃度を要した。完全溶菌についても同様の傾向が観察され、作用 5 時間後に 200 μg/ml で認められるにすぎず CCL に比べて明らかに劣った。

6. CCL 作用中の残存力価と再増殖

TSB 培地中で対数増殖期の *E. coli* NIHJ JC-2 株の 4.3×10⁶ cells/ml に CCL 0.78~6.25 μg/ml を作用させ、Biophotometer で培養しながら経時的にその一部を採取して、培養液中の CCL 濃度と生菌数を測定し、CCL 濃度と再増殖の関係を調べた (Fig. 26)。培養液中の CCL 濃度は培養直後から速やかに低下し始め、初濃度の高低にかかわらず、2 時間後には初濃度の 1/2 に、3 時間後には 1/4 程度にまで低下した。一方、生菌数は、0.78 μg/ml 以上で低下するが一定時間経過すると再び増殖した。菌の再増殖が始まる時間は、CCL の作用濃度が高くなるほど遅れた。各作用濃度で再増殖が始まる時の CCL 残存力価は、図中、円で示したように 0.7~0.9 μg/ml で一致した。この現象は HIB 培地でも認められたところから、CCL の殺菌効果は初濃度に比例して培地中濃度が 0.8 μg/ml になるまで進行する

Fig. 9 Cross susceptibility of *Escherichia coli* (106 strains) between cefaclor and cephalixin

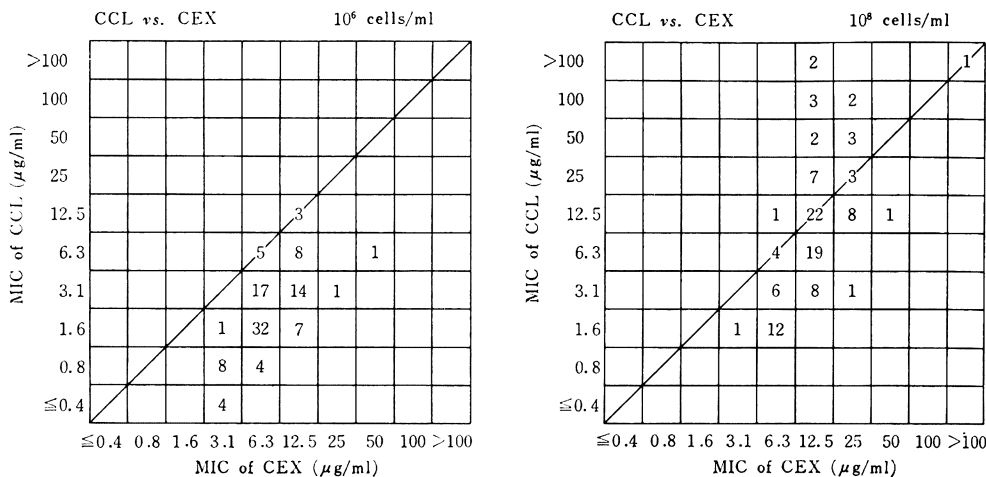
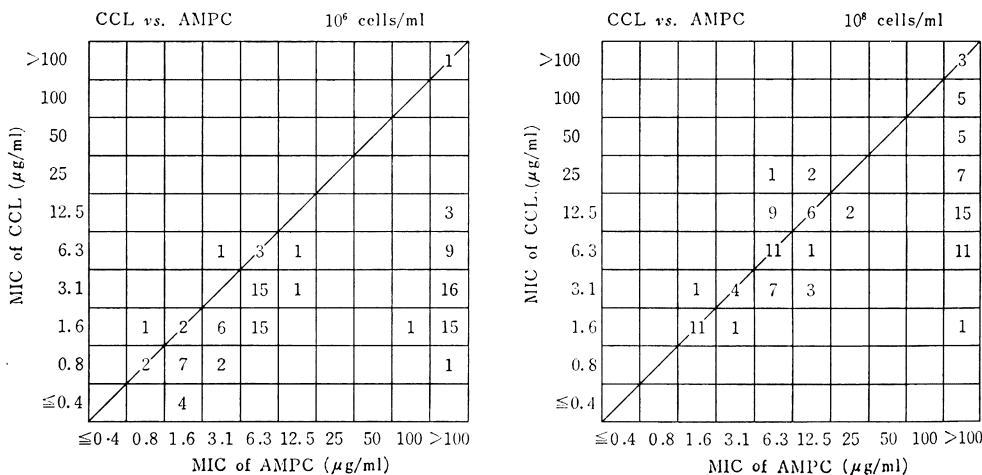


Fig. 10 Cross susceptibility of *Escherichia coli* (106 strains) between cefaclor and amoxicillin



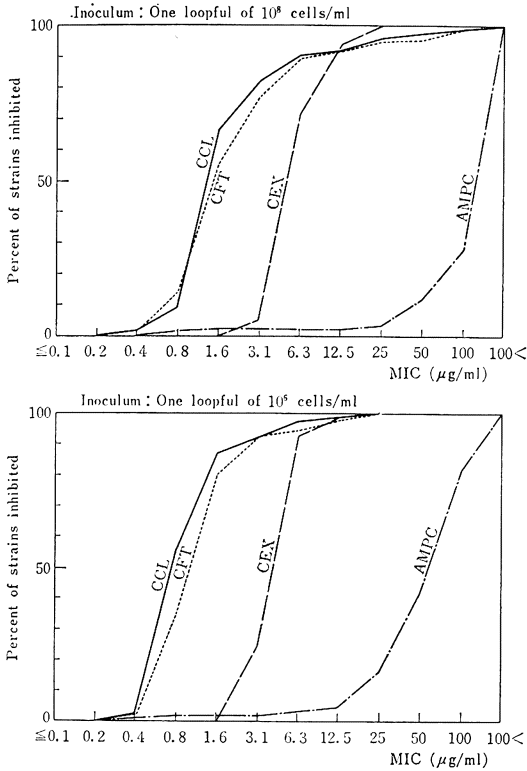
が、再増殖は初濃度に拘わりなく、培地中の濃度が 0.8 μg/ml に低下した時点では生存菌が増殖を始めることを意味している。Biophotometer における再増殖の発現は遅れるが生菌数が 10⁷ cells/ml 近傍になる時間と一致し、生菌数と濁度の関係に矛盾がない。また、再増殖した菌はこの方法で原菌と同じ感受性を示しており、耐性化によるものでないことが確かめられた。

7. β-lactamase に対する安定性

臨床分離株より CER, CET, PCG, ABPC のうち 2 剤以上に耐性な株 (MIC >100 μg/ml) を 72 株選んだ。うち少なくとも 10 株は、R プラスミドを持つことがわかり、これらのプラスミドは、*E. coli* ML1410 に接合

伝達された。更に、標準株 17 株を加え計 89 株を β-lactamase 産生株として用いた。その内訳は、*E. coli* 1 株、*Klebsiella* sp. 3 株、*K. aerogenes* 3 株、*P. vulgaris* 5 株、*P. morgani* 3 株、*P. rettgeri* 2 株、*P. inconstans* 9 株、*E. aerogenes* 4 株、*E. cloacae* 10 株、*S. marcescens* 6 株、*H. alvei* 1 株、*C. freundii* 9 株、*P. aeruginosa* 9 株、R プラスミドを持った *E. coli* 16 株、*S. aureus* 8 株であった。これらの菌株の粗酵素標品を調製し、各薬剤の相対加水分解速度を bioassay 法で測定した。Fig. 27 にグラム陰性菌 81 株について CCL, CEX, ABPC の相対加水分解速度 (CER を 100 とした) を対数でプロットした。CCL は多くの

Fig. 11 Susceptibility of *Klebsiella* sp. (111 strains) to cefaclor, cephalixin, cefatrizine and amoxicillin



β -lactamase で CEX よりも不安定であった。CEX は Penicillinase には比較的安定であったが、CCL にはこのような傾向は見られず、どのタイプの β -lactamase にも不安定であるため Penicillinase において特に CEX との間に安定性に差があった。

β -lactamase は、多様性に富んだ酵素群であるが、大別すると種特異的な染色体由来酵素と R プラスミド由来酵素に分かれ、更に、R プラスミド由来のものは、クロキサシリン加水分解速度の大きな OXA 型と、小さな TEM 型に分類されている^{8,9}。そこで、 β -lactamase 遺伝子の接合伝達が観察されなかった 13 株、OXA 型産生株である *E. coli* ML1410 RGN 238¹⁰ と、TEM 型産生株である *E. coli* W3110 RTEM、グラム陽性菌 *S. aureus* 1 株を選び、Table 9 に各薬剤に対する相対加水分解速度を示した。CCL は、菌種特異的と思われる多くの β -lactamase に、また、R プラスミド由来の OXA 型、TEM 型の β -lactamase にも CEX より不安定であった。更に、*S. aureus* の産生する β -lactamase によってもわずかながら加水分解された。

4 株を選び、それらの産生する β -lactamase を部分精製して、UV 法により Vmax, Km を測定した (Table 10)。この方法による測定でも CCL は CEX に比べ大きな Vmax を示し、 β -lactamase には、より不安定であった。Km に関しては、CEX に比べ若干大きな値をとる傾向があったが、各々の酵素に対する Km 値は、CEX のそれと平行して居り有意の差を示さなかった。

Fig 12 Cross susceptibility of *Klebsiella* sp. (111 strains) between cefaclor and cephalixin

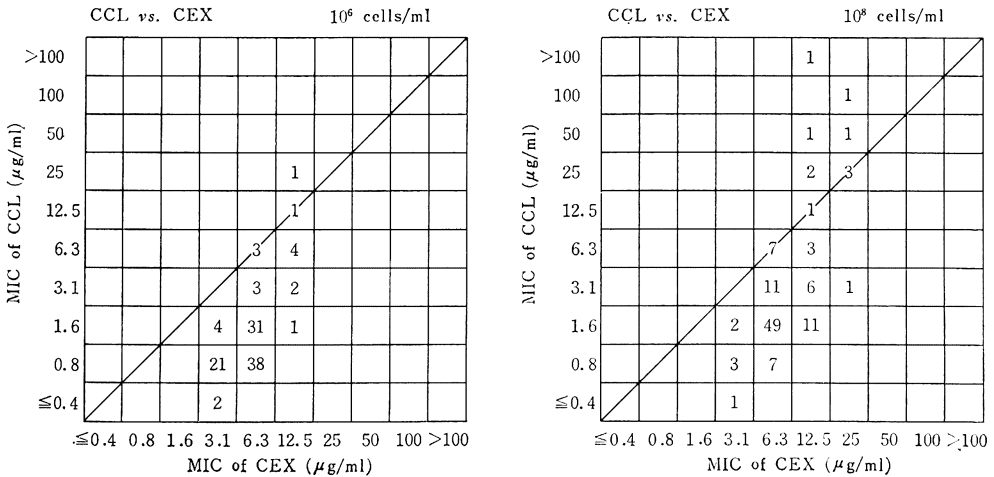


Fig. 13 Cross susceptibility of *Klebsiella* sp. (111 strains) between cefaclor and amoxicillin

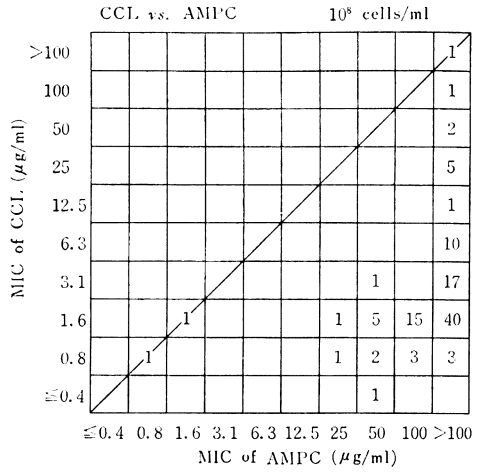
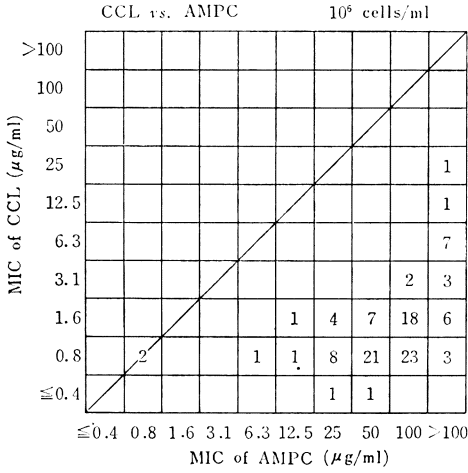


Fig. 14 Susceptibility of *Proteus mirabilis* (36 strains) to cefaclor, cephalixin, cefatrizine and amoxicillin

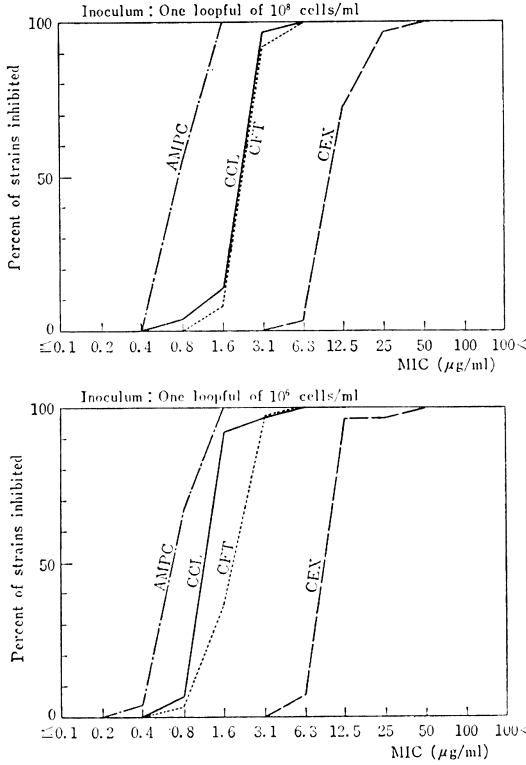


Fig. 15 Susceptibility of *Haemophilus influenzae* (22 strains) to cefaclor, cephalixin, cefatrizine and amoxicillin

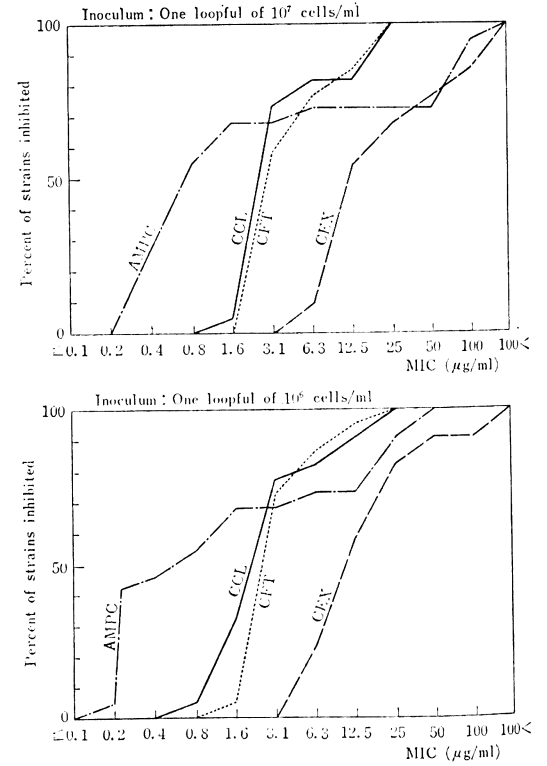


Fig. 16 Cross susceptibility of *Haemophilus influenzae* (22 strains) between cefaclor and amoxicillin

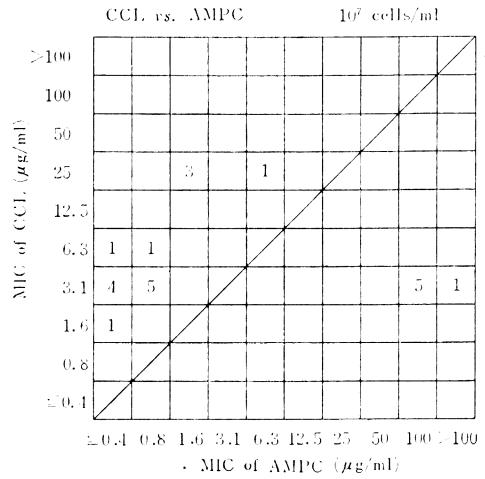
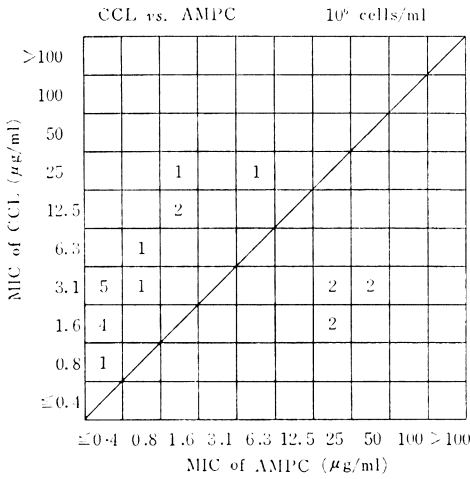
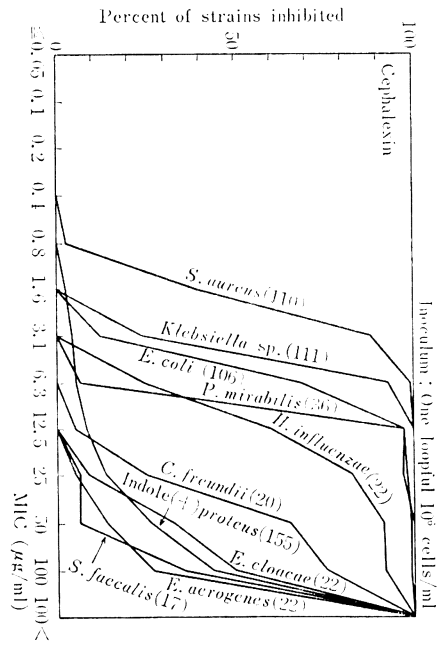
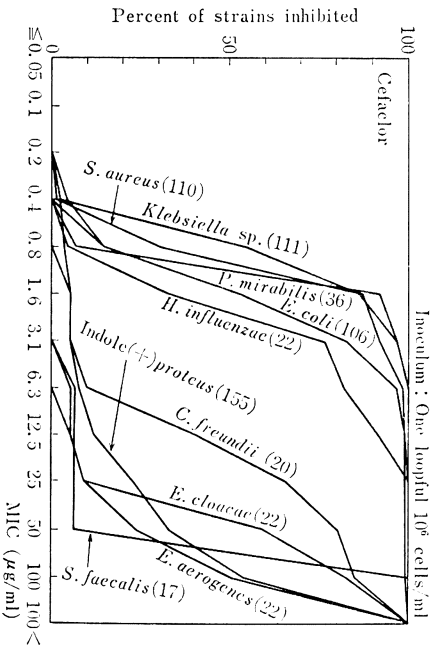


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates to cefaclor

Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates to cephalixin



考 察

近年、 β -lactam 抗生物質が感染治療に果たす役割が大きく、既存の Penicillin, Cephalosporin 剤で種々の改良がなされ、特に注射用 Cephalosporin で抗菌スペ

クトラムの拡大と抗菌力の増強された誘導体が種々開発されるに至っている。しかしながら、経口剤としての Cephalosporin は少なく、CEX, Cephaloglycin (CEG), Cephradine (CED), Cefatrizine (CFT) 等が開発されているにすぎない。一般に、広く使用されている CEX

Fig. 19 Bactericidal activity of cefaclor and cephalixin

Test organism : *Staphylococcus aureus* 209P JC-1
Medium : Tryptosoy broth (Eiken)
Concentration : $\mu\text{g/ml}$

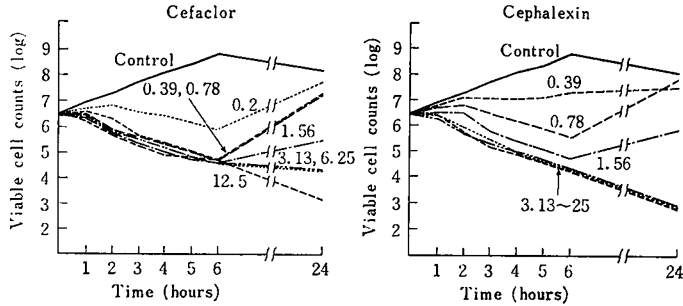


Fig. 20 Bactericidal activity of cefaclor and cephalixin

Test organism : *Escherichia coli* NIHJ JC-2
Medium : Tryptosoy broth (Eiken)
Concentration : $\mu\text{g/ml}$

(c) Initial cells size : 1.1×10^8 cells/ml

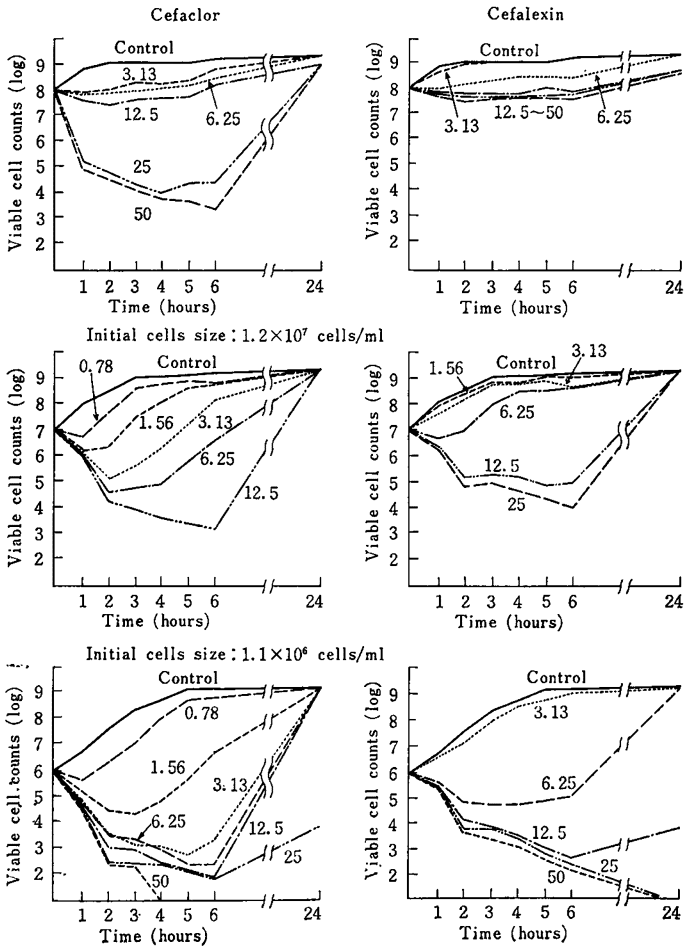


Fig. 21 Time course of MBC values against of *E. coli* clinical isolates

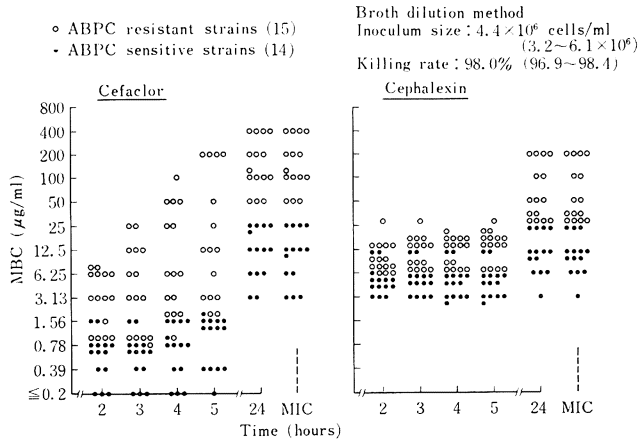
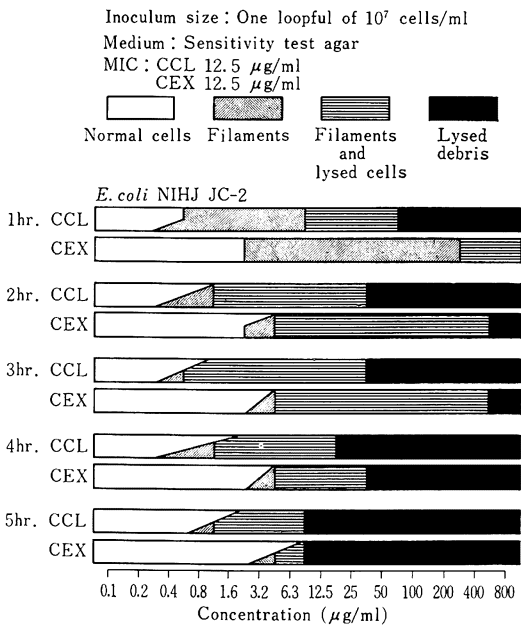


Fig. 23 Morphology of *E. coli* treated with CCL and CEX



は注射用 Cephalosporin に比べて抗菌力が劣り、特に殺菌作用の弱いことが指摘されている¹¹⁾。

CCL の抗菌力におよぼす諸因子の影響を調べたところ、試験培地種の影響は少ないが、臨床分離株を用いて母集団を大きくして調べると、液体培地中の本検体の安定性を反映して (Table 7), TSA 培地で抗菌力が低く、NTA 培地で高くあらわれる傾向を認めた。しかし、日本化学療法学会改訂 MIC 測定法に定められている HIA 培地と STA 培地では、培地間で MIC 値に有

意差は認めなかった。培地 pH の影響は、*S. aureus* に対して酸性側で抗菌力増強が認められ、*E. coli* では塩基性側でわずかに低下した。本検体は、人血漿添加の影響を顕著に受け、添加量を上げるに伴って抗菌力の低下が認められた。接種菌量の影響は、菌種によって様ではないが、 10^8 cells/ml 接種で MIC が顕著に高くなる菌種が多く認められた。含 CCL 寒天平板の作製後、菌接種までの保存条件をかえて、安定性が MIC 測定に及ぼす影響をみたところ、室温 (25°C) では 6 時間、冷室 (4°C) で一昼夜保存しても MIC の変動は少なく MIC の測定に支障がなかった。

CCL の抗菌力は、CEX と同様にグラム陽性菌およびグラム陰性菌に広い抗菌スペクトラムを有し、CEX に比べてグラム陽性菌で 2~4 倍、グラム陰性菌で 4~8 倍優れた抗菌力を示すが、*Enterobacter*, *Serratia*, *P. aeruginosa* には抗菌力を示さず諸家の成績を確認した^{1,2,12-14)}。

臨床分離株 675 株の CCL に対する感受性分布は、 10^6 cells/ml 接種では、*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* はすべて 6.25 µg/ml 以下の MIC を示した (Table 8)。*Klebsiella* sp. および *E. coli* ではその 80% の株が、それぞれ 1.56, 3.13 µg/ml 以下の MIC を示した。特に、*H. influenzae* は ABPC 耐性株にも強い抗菌力を示し、本菌種に対する優れた抗菌力は CCL の特徴の一つと考えられる。しかしながら、*C. freundii* には 70% の株が 12.5~50 µg/ml に集まり、*S. faecalis*, インドール陽性 *Proteus* 群、*Enterobacter* 群にはほとんど抗菌力を示さなかった。BILL ら²⁾ や SANTORO ら¹²⁾ は、CCL の MIC が接種菌量により影響されることを *S. aureus*, *E. coli* で認め

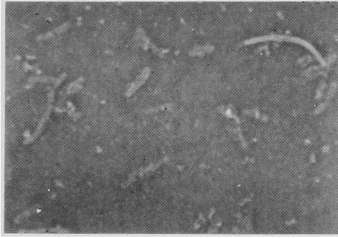
Fig. 22 Phase contrast micrographs of *E. coli* morphology*Escherichia coli* NIHJ JC-2

Treatment: 2 hours on sensitivity test agar

MIC: CCL 12.5 $\mu\text{g/ml}$ CEX 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ($\mu\text{g/ml}$)

Cefaclor

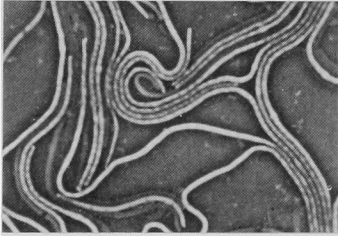
50



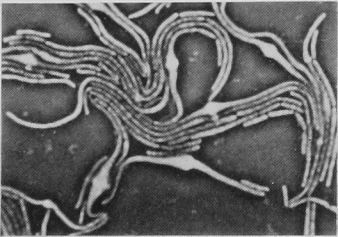
25



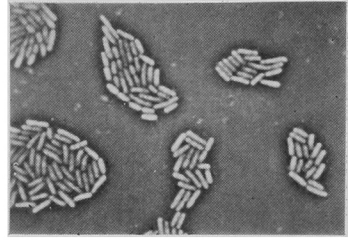
6.3



0.8

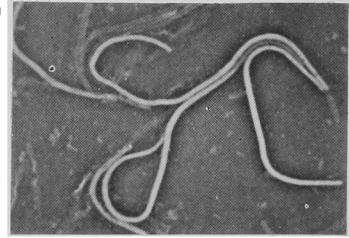


Control

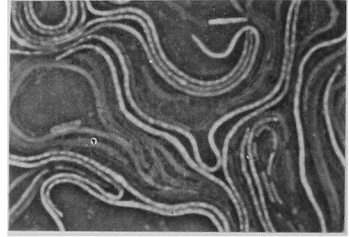
($\mu\text{g/ml}$)

Cephalexin

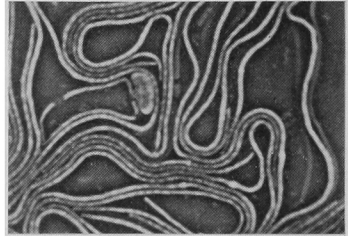
400



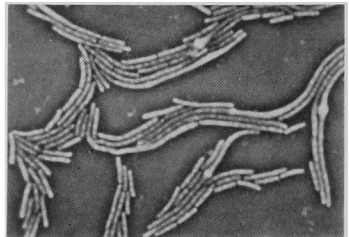
200



50



3.1



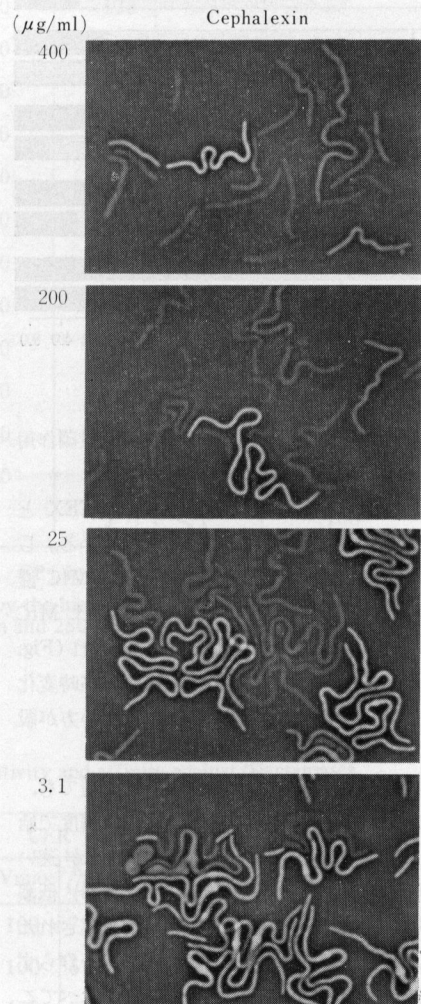
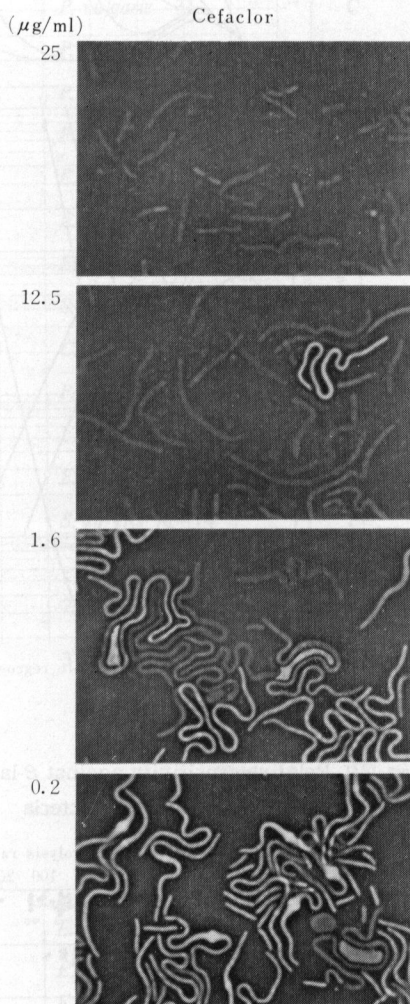
ており, SANDERS¹⁹ は Methicillin 耐性 *S. aureus* で CCL との交差耐性を報告している。本報告の臨床分離菌の MIC 測定結果からも同様の現象が確認された。すなわち, CCL の MIC 値が菌量により 8 倍以上上昇する菌株が, *S. aureus* で 38%, *E. coli* で 22% の高率に認められた。また, これら菌株のほとんどが ABPC に $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性菌であることを考慮すると,

CEX よりも β -lactamase に不安定な性質が反映していると考えられた (Fig. 27)。

R プラスミド由来 β -lactamase は, ペニシリナーゼであることが多くの研究者によって報告されているので, Table 9 に示したセファロsporinase は染色体由来, すなわち, 菌種特異的 β -lactamase であると考えられる。CCL はこれらの酵素に対しても, また R プラ

Fig. 24 Phase contrast micrographs of *K. pneumoniae* morphology*K. pneumoniae* SRL-1

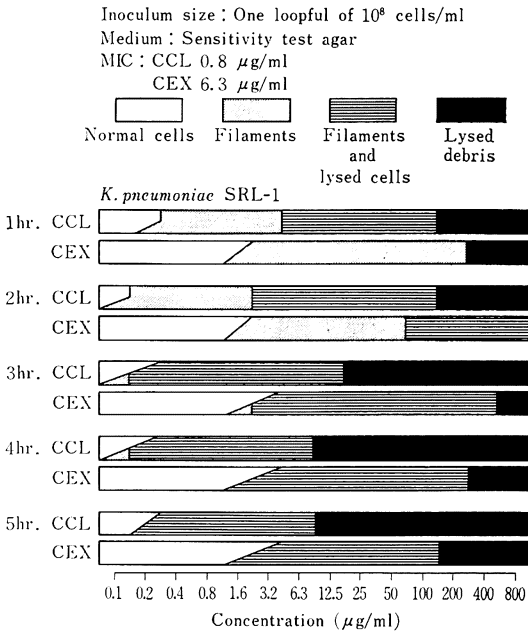
Treatment: 3 hours on sensitivity test agar

MIC: CCL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ CEX 6.3 $\mu\text{g/ml}$ 

スミド由来の OXA 型,あるいは TEM 型酵素に対しても CEX より不安定であった。CEX はペニシラナーゼには比較的安定であったが, CCL にはこのような酵素の型による安定性の差は,見られなかった。NEU ら⁶⁾も, CCL は β -lactamase に不安定であることを報告している。ただ,彼らは Type III の β -lactamase は CCL を加水分解できないことを報告しているが,我々

はこのような酵素を見いだせなかった。 β -lactamase に対する安定性に関しては, CCL は CEX より劣っていたが,抗菌力は CEX よりも優れており,この理由として(1) CCL の標的酵素に対する反応性の高まり,あるいは,(2)細菌外膜透過性の高まりなどが考えられる。特に(1)については, CEX の 3 位のメチルが塩素に置換された CCL になると β -lactamase に対する反応性が高

Fig. 25 Morphology of *K. pneumoniae* treated with CCL and CEX



まっており、その可能性が強いように思われ、殺菌作用における両薬剤の差となっていると考えられる。

SANDERS¹³⁾によれば、CCLの殺菌効果は、CEXと同様に弱く生菌数の減少は緩やかであるとしている。しかしながら、ここに報告した*E. coli*の成績をMIC濃度と比較すると、短時間の殺菌効果はCEXの1 MIC濃度に比べてCCLでは1/4 MIC濃度で認められ(Fig. 20)、また、臨床分離大腸菌を用いたMBCの経時変化の成績もそれを裏づけており(Fig. 21)、CCLの方が殺菌効果にすぐれていた。

作用菌の形態学的変化を経時的に観察した成績でも、CCLの溶菌作用がCEXに比べて遙かに低い濃度で始まり、CCLは殺菌活性の強いこと、作用の発現が速いことが明らかにされた(Fig. 23, 25)。すなわち、低濃度の作用で隔壁合成阻害によりfilamentが形成されたのちに溶菌し、或る濃度を越えるとfilamentを作らずにそのままの形で溶菌する。CCLはCEXに比べてこれらの発現濃度がいずれも低いのが特徴である。

一方、CCLを作用させた*E. coli*の生菌数変化から再増殖が観察された。この再増殖は、作用菌の耐性獲得によるものではなく、培地中のCCLの失活に帰因することを明らかにした(Fig. 26)。すなわち、CCLは0.8 μg/ml以上の濃度が維持されている間、*E. coli*の生菌数を低下させる殺菌活性を有していた。MIC値がこの値に比べて高いのは20時間の作用時間における再増殖

Fig. 26 Correlation between the regrowth of *E. coli* exposed with cefaclor and the remained activity of cefaclor in culture medium

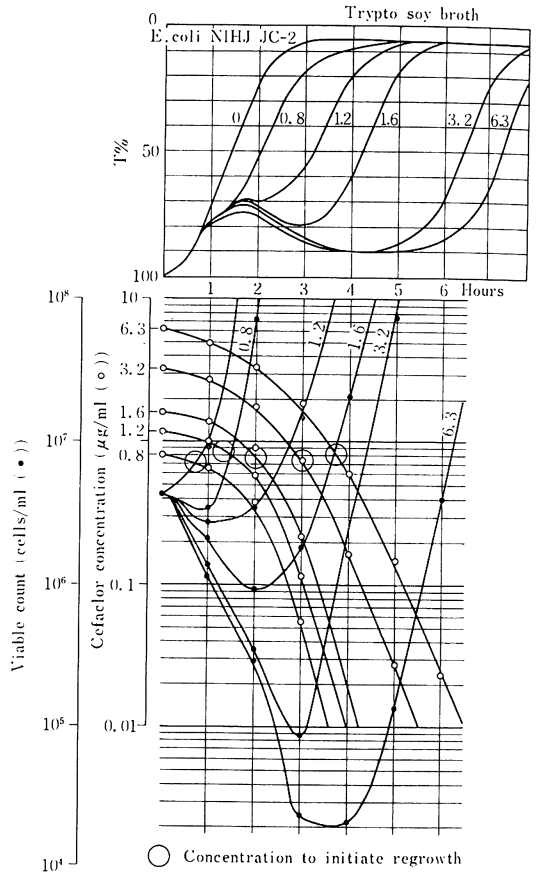
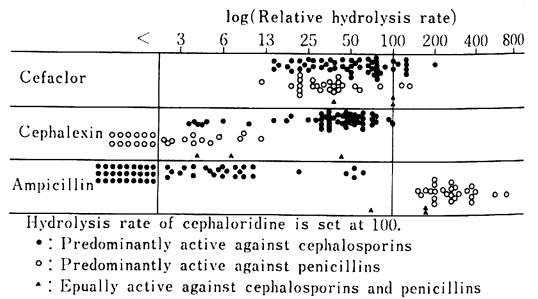


Fig. 27 Relative sensitivity against β-lactamases from gram-negative bacteria



の結果によるものと考えられる。松浦¹⁵⁾らは、*in vivo*作用の成績でCCLがCEXに比較してMIC値から期待されるよりも優れた治療効果を示している。従って、

Table 9 Relative sensitivity of cefaclor against β -lactamases

Source of β -lactamase	Enzyme ¹⁾ type	Relative hydrolysis rate ²⁾			
		CER	CCL	CEX	ABPC
<i>E. coli</i> 6	C	100	47	- ³⁾	5
<i>Klebsiella</i> sp. 110	P	100	35	5	264
<i>K. aerogenes</i> 1082E	CP	100	100	44	174
<i>P. vulgaris</i> 31	C	100	123	71	53
<i>P. morgani</i> 69	C	100	76	53	5
<i>P. rettgeri</i> 5	C	100	50	-	<1
<i>P. inconstans</i> 31	C	100	35	4	<1
<i>E. aerogenes</i> 10	C	100	31	44	1
<i>E. cloacae</i> 53	P	100	41	<10	246
<i>E. cloacae</i> 92	C	100	76	50	3
<i>S. marcescens</i> 52	C	100	107	44	<1
<i>C. freundii</i> 27	C	100	23	76	<3
<i>P. aeruginosa</i> 30	C	100	76	38	8
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	P	100	115	8	696
<i>E. coli</i> W3110 RTEM	P	100	53	6	200
<i>S. aureus</i> C-14	P	<1	3	<1	100

1) C : Cephalosporinase, P : Penicillinase, CP : Intermediate.

2) The rate of hydrolysis was determined by the bioassay. Initial substrate concentration was 500 $\mu\text{g/ml}$ for cephalixin and 250 $\mu\text{g/ml}$ for the other antibiotics.

3) Not determined.

Table 10 Relative sensitivity and affinity against β -lactamases

	Enzyme type ¹⁾	CCL		CER		CEX		CEZ	
		Vmax	Km (μM)	Vmax	Km (μM)	Vmax	Km (μM)	Vmax	Km (μM)
<i>E. coli</i> 6	C	43	47	100	750	6.3	17	134	1,430
<i>E. cloacae</i> 214	C	21	101	100	670	9.0	115	170	2,080
<i>E. coli</i> W3110 RTEM	P	22	1,576	100	787	0.61	1,032	14	498
<i>Klebsiella</i> sp. 363	P	79	639	100	180	5.8	588	60	29

The hydrolysis rate was determined by the spectrophotometric assay at 30°C.

Enzymes were partially purified.

1) C : Cephalosporinase, P : Penicillinase

CCL の抗菌力は MIC 値よりも、むしろ短時間の MBC 値で理解すべきで、短時間の殺菌活性が治療効果に反映していると考えられた。本剤は、人において CEX と同程度の血中濃度が得られると報告されているので¹⁶⁾、強い殺菌活性は、感染症治療上 CEX よりも優れた成績を与える要因となることが期待される。

文 献

- 1) SILVER, M. S.; W. COUNTS, D. ZELEZNIK & M. TURCH: Comparison of *in vitro* antibacterial activity of three oral cephalosporins: cefaclor, cephadrine, and cephalixin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12(5):59~596, 1977
- 2) BILL, N. J. & J. A. WASHINGTON II: Comparison of *in vitro* activity of cephalixin, cephadrine, and cefaclor. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11(3):470~474, 1977
- 3) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22:1126~1128, 1974
- 4) 木村靖雄, 土肥正善, 吉田 正: 抗生剤の微量定量一帯培養法の応用。 *Chemotherapy* 25:449~450, 1977
- 5) 吉田 正, 元川清司, 亀田康雄, 村上和久, 中野雅夫: Cefamandole の *in vitro* 抗菌作用。 *Chemotherapy* 27 (S-5): 70~106, 1979
- 6) NEU, H. C. & K. P. FU: Cefaclor: *In vitro* spectrum of activity and beta-lactamase stability. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13:584~588, 1978
- 7) ROSS, G. W.; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. M. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O'CALLAGHAN: Comparison of assay techniques for β -lactamase activity. *Anal. Biochem.* 54:9~16, 1973
- 8) DATTA, N. & P. KONTOMICHALOU: Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in enterobacteriaceae. *Nature* 208:239~241, 1965
- 9) SYKES, R. B. & M. MATTHEW: The β -lactamases of gramnegative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemoth.* 2:115~157, 1976
- 10) EGAWA, R.; T. SAWAI & S. MITSUHASHI: Drug resistance of enteric bacteria. XII. Unique substrate specificity of penicillinase produced by R factor. *Jpn. J. Microbiol.* 11:173~178, 1967
- 11) 藤井良知, 紺野昌俊, 岡田一穂, 八森 啓, 生方公子: 小児科領域における経口 Cephalosporin C 製剤の検討, 特に Cephalixin を中心として。 *小児科臨床* 22(9):1093~1105, 1969
- 12) SANTORO, J. & M. E. LEVISON: *In vitro* activity of cefaclor, a new orally administered cephalosporin antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12(3):442~443, 1977
- 13) SANDERS, C. C.: *In vitro* studies with cefaclor, a new oral cephalosporin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12(4): 490~497, 1977
- 14) SHADOMY, S.; G. WAGNER & M. CARVER: *In vitro* activities of five oral cephalosporins against aerobic pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12 (15) 609~613, 1977
- 15) 松浦真三, 三和秀明, 東山伊佐夫, 島岡 登: Cefaclor の *in vitro* 抗菌作用。 *Chemotherapy* 27(S-7): 98~104, 1979
- 16) 神木照雄, 山田秀雄, 尾態隆嘉: Cefaclor の臨床第一相試験。 *Chemotherapy* 27(S-7): 158~174, 1979

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFACLOR

TADASHI YOSHIDA, YASUO KAMEDA, KIYOSHI MOTOKAWA,
and KAZUHISA MURAKAMI

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

Cefaclor (CCL) is a new oral semi-synthetic cephalosporin which possesses a unique chemical structure substituted with chlor atom for the 3-methyl group present in cephalexin (CEX) molecule. It substantially resembled to CEX in antibacterial spectra, but the superiority of CCL to CEX was consistently observed in antibacterial activity.

Susceptibility of 675 clinical isolates of pathogenic bacteria to cefaclor was measured by an agar dilution method and compared with those of CEX, cefatrizine (CFT) and amoxicillin (AMPC). A majority of the tested strains of gram-positive cocci other than enterococci, *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* sp., *P. mirabilis*) and *H. influenzae* were inhibited at below 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of CCL. CCL were twice to eight times more active than CEX. Most of the AMPC-resistant strains of these bacteria were susceptible to CCL and no cross resistance was observed between two antibiotics. Most isolates of indole-positive *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* tended to be resistant.

The activity of CCL was greater in acidic medium than in alkaline medium because of unstable nature in alkaline solution, and were curtailed in the presence of human serum. CCL showed more pronounced inoculum effect than CEX, especially in the β -lactamase producing strains. CCL was stable to some of β -lactamases but tends to be more hydrolysable by penicillinase type than CEX.

One of the most characteristic features of CCL was a rapid bactericidal action against gram-negative bacteria. The time-course experiment of MBC against *E. coli*-clinical isolates clearly revealed that the short-time MBCs were always lower than the MICs. Changes of viability and morphological observations of the treated cells also supported rapid bacteriolytic action of this antibiotic.

Regrowth phenomenon of the CCL-treated bacteria was explained by the decrease of the concentration in the medium below the short-time MBC, and the regrown cells did not acquire resistance to CCL.