

Cefaclor の *in vivo* 抗菌作用

松浦真三・三和秀明・東山伊佐夫・島岡 登

塩野義製薬株式会社研究所

新しい経口用セファロsporin系抗生物質 Cefaclor (CCL) の実験的マウス腹腔内感染に対する治療効果, その効果におよぼす諸因子の影響, ならびに, 実験的マウス尿路感染症に対する治療効果について Cephalexin (CEX) を対照薬剤として比較検討を行ない, 以下の成績を得た。

1) CCL は各種のグラム陽性および陰性菌による腹腔内感染に対して広く有効であり, その活性の強さは, *Staphylococcus aureus* を除く試験したすべての感染系に対して CEX よりも優れており, とくに, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* EC-14, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* および *Enterobacter aerogenes* の感染系ではその差が著明であった。

2) 腹腔内感染の治療効果におよぼす諸因子の影響として, 接種菌量, 薬剤の投与時期ならびに投与回数による影響を検討した結果, CCL と CEX は活性の強さに違いはあるが *in vivo* 作用上の特徴としてはかなりの類似性を示した。

3) *E. coli* および *P. mirabilis* を用いた実験的マウス尿路感染症に対する CCL の治療効果は腹腔内感染と同様, CEX に比べて明らかに優れていた。

経口用セファロsporin剤として新しく開発された CCL は同系統の経口剤である CEX に比し *in vitro* の抗菌力が優れ, とくに, 短時間で強い殺菌作用を示すことが明らかにされている。本報では, マウスを用いた実験的感染症に対する CCL の *in vivo* 抗菌作用の特徴を CEX と比較検討した成績について報告する。

材料と方法

1) 使用動物

JCL-ICR マウスの 5 週令, 雌, 体重 19~23 g を用いた。

2) 使用薬剤

CCL (950 μ g/mg 力価, Eli Lilly) および CEX (956 μ g/mg 力価, 塩野義製薬 K.K.) を用い, 両剤とも 5% アラビアゴム液に懸濁して経口的に投与した。

3) 使用菌株

実験に使用した菌株はすべて寒天斜面で 18~20 時間培養し, 10% 非動化牛血清加ハート・インフュージョンブイヨン培地 (HIB: 栄研) で 10^{8-9} CFU/ml の菌濃度に懸濁し, 小容器に分注して -80°C のフリーザー中に凍結保存した。使用に際しては, これら凍結菌液を温浴中で速やかに融解し, それぞれの毒力に応じて HIB で適宜希釈して接種菌液とした。

4) 感染および治療試験

i) 腹腔内感染: *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* および *K. pneumoniae* は HIB に, その他の菌株は 5% ムチン (American Laboratories Inc.) に懸濁し, 0.5 または 1 ml を腹腔内に接種した。薬剤の投

与は, とくにことわりのない限り, 菌接種 1 時間後および 5 時間後の 2 回経口的に行なった。1 群 8 匹のマウスを使用し, 7 日後の生存率から Probit 法によって 50% 有効量 (ED_{50}) および信頼限界 (95%) を求め, 1 回の投与量で表現した。

ii) 尿路感染: 感染菌として *E. coli* EC-14 および *P. mirabilis* 434 の 2 株を用いた。前日より約 15 時間給水を制限したマウスを強制的に排尿させた後, Sodium pentobarbital で麻酔し, 尿道口周辺をアルコール綿で充分消毒した後, 先端をまるめた 1/3 注射針装着のツベルクリン注射筒を用いて菌液 0.125 ml を経尿道的に膀胱内に注入した。膀胱触診によって注入の成否を確認し直ちに外尿道口を小型クリップで 4 時間閉鎖した。*E. coli* 感染系では菌接種 4 および 7 時間後に, *P. mirabilis* 感染系では 6 時間後に薬剤を経口投与し, 以後翌日より朝夕 2 回 3 日間治療を継続した。最終投薬の翌日, 即ち菌接種 4 日後に両腎を摘出し, HIB を加えてホモジナイズした後, 10 倍希釈系を作製してドリガルスキー改良培地 (BTB: 栄研) による定量培養を行ない, 腎 1 g 当りの生菌数を求めた。1 群 10~20 匹のマウスを用い, 腎内生菌数が 10^4 CFU/g 以下の場合を有効と判定し, 各投与量における有効率から Logit 法²⁾によって ED_{50} を算出した。

実験成績

1) 各種細菌のマウス腹腔内感染に対する治療効果

グラム陽性, 陰性合わせて 9 菌種 14 菌株を用いたマウス腹腔内感染症に対する CCL および CEX の治療

Table 1 Effect of CCL and CEX against experimental intraperitoneal infections in mice

Test organism	Inoculum size (CFU/mouse)	X LD ₅₀ (mucin)	ED ₅₀ (mg/kg/dose)		MIC (μg/ml)			
					CCL		CEX	
			CCL	CEX	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>S. aureus</i> Smith	10 ⁵	60(+)	0.073 (0.053–0.10)	0.13 (0.11–0.18)	6.25	1.56	12.5	6.25
<i>S. aureus</i> S-26	10 ⁷	50(+)	15.2 (6.75–22.8)	10.5 (7.65–14.3)	12.5	1.56	12.5	6.25
<i>S. pyogenes</i> C-203	10 ³	300(–)	0.60 (0.35–1.05)	4.11 (2.87–8.03)	0.2	0.1	0.78	0.39
<i>S. pneumoniae</i> Type-1	10 ³	700(–)	25.7 (16.2–42.8)	115 (57.4–229)	0.78	0.78	3.13	1.56
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1	10 ⁴	230(–)	12.4 (6.46–20.9)	103 (58.3–145)	0.78	0.39	6.25	3.13
<i>E. coli</i> EC-14	10 ⁴	180(+)	0.95 (0.65–1.43)	9.46 (6.02–13.4)	3.13	0.78	12.5	6.25
<i>E. coli</i> EC-83*	10 ⁵	140(+)	8.46 (4.75–12.4)	25.8 (19.1–40.2)	>100	6.25	12.5	12.5
<i>E. coli</i> EC-104*	10 ⁶	100(+)	4.56 (3.33–6.46)	30.6 (21.0–38.2)	25	1.56	25	6.25
<i>E. coli</i> 73*	10 ⁶	190(+)	9.50 (3.90–14.3)	19.1 (13.4–27.7)	>100	12.5	50	12.5
<i>E. aerogenes</i> TB-510	10 ⁵	60(+)	33.7 (12.8–67.3)	359 (N.C.)	>100	25	>100	>100
<i>H. influenzae</i> 88562	10 ⁶	580(+)	0.77 (0.53–0.95)	7.65 (5.26–11.5)	0.78	0.78	6.25	6.25
<i>P. mirabilis</i> PR-4	10 ⁷	30(+)	3.33 (2.47–4.47)	41.1 (26.8–52.6)	3.13	1.56	25	6.25
<i>P. mirabilis</i> 434	10 ⁶	50(+)	1.17 (0.81–1.64)	38.7 (28.1–53.4)	1.56	1.56	12.5	12.5
<i>P. vulgaris</i> CN-329	10 ⁵	70(+)	22.4 (13.1–38.2)	60.2 (40.2–118)	>100	100	>100	25

Mucin (+) indicated that JCL-ICR mice were infected intraperitoneally with test organism in 0.5 ml or 1 ml of 5% mucin. Antibiotics were administered orally 1 and 5 hours after infection.

ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

MIC was assayed by the agar dilution method. * Mark indicated ABPC resistant strains.

Table 2 Effect of challenge dose on ED₅₀ of CCL and CEX against *E. coli* EC-14 infection in mice

Challenge dose (CFU/mouse)	Challenge LD ₅₀	ED ₅₀ (mg/kg/dose)	
		C C L	C E X
5 × 10 ⁴	1 × 10 ²	0.73 (0.33–1.11)	7.71 (2.91–13.5)
5 × 10 ⁶	1 × 10 ⁴	3.69 (2.45–8.09)	16.6 (8.23–33.3)
5 × 10 ⁷	1 × 10 ⁵	82.3 (40.9–166)	> 1,500

JCL-ICR mice were infected intraperitoneally with *E. coli* EC-14 in 0.5 ml of 5% mucin.

Antibiotics were administered orally at 1 and 5 hours after infection.

ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

効果 (ED₅₀) を一括して Table 1 に示した。

グラム陽性菌では *S. aureus* に対して CCL は CEX とほぼ同程度の治療効果を示したが, *S. pyogenes* C-203 および *S. pneumoniae* Type-I に対しては CEX に比べ 4~7 倍優れていた。

グラム陰性菌では今回試験したすべての感染系に対して CCL は CEX を凌駕する活性を示し, とくに *K. pneumoniae* SRL-1, *E. coli* EC-14, *H. influenzae* 88562, *E. aerogenes* TB-510, *P. mirabilis* PR-4 および 434 の各感染マウスに対して CCL は CEX の 10~30 倍強い治療効果を示した。*E. coli* EC-83, EC-104, および 73 はいずれも Ampicillin 耐性の臨床分離株であるが, これらの感染マウスに対しても CCL は 10 mg/kg 以下の ED₅₀ を示して有効であった。また, CCL の *P. vulgaris* CN-329 に対する *in vitro* 活性は CEX よりも劣るにもかかわらず治療効果は CEX より優れていた。

2) 治療効果におよぼす諸因子の影響

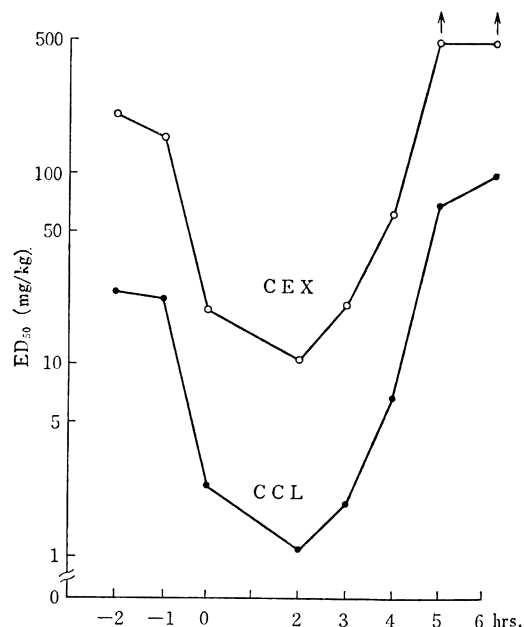
i) 接種菌量による影響

E. coli EC-14 感染系で接種菌量を 5 × 10⁴ (100LD₅₀), 5 × 10⁶ および 5 × 10⁷ CFU/マウス に増大した場合について CCL および CEX の治療効果を検討し, その成績を Table 2 に示した。

接種菌量を 100 倍に増加しても CCL の ED₅₀ 値は約 5 倍の上昇にすぎないが, 1,000 倍の菌量増加では約 100 倍の ED₅₀ 値を示した。CEX は毒性による投与量制限のため 5 × 10⁷ CFU 接種時の ED₅₀ を求めることが出来なかったが, 接種菌量に対する反応の点で CCL

と大差はないものと思われる。

Fig. 1 Effect of administration-time on ED₅₀ of CCL and CEX against *E. coli* EC-14 infection in mice



JCL-ICR mice were infected intraperitoneally with *E. coli* EC-14 in 0.5ml of 5% mucin.

Antibiotics were single administered orally at the times indicated in the figure.

Table 3 Effect of multiple administrations on ED₅₀ of CCL and CEX against *K. pneumoniae* SRL-1 infection in mice

Antibiotic	ED ₅₀ (mg/kg)		MIC (µg/ml)	
	1,5 hrs.	1,2,3,4,5 hrs.	10 ⁸ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml
CCL	34.1 (18.8–54.2)	15.0 (4.66–44.3)	0.78	0.39
CEX	448 (157–628)	106 (17.3–311)	6.25	3.13

JCL-ICR mice were infected intraperitoneally with *K. pneumoniae* SRL-1 in 0.5 ml of HIB.
Antibiotics were administered orally at the times indicated in the table.
ED₅₀ value was calculated as a total dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.
MIC was assayed by the agar dilution method.

Table 4 Effect of CCL and CEX against experimental urinary tract infections in mice

Test organism : *E. coli* EC-14
Inoculum size : 3 × 10⁴ CFU/mouse

mg/kg/dose	CCL		CEX	
	Log of viable cells/g (Mean±S.D.)	Effective/Tested	Log of viable cells/g (Mean±S.D.)	Effective/Tested
500	2.79 ± 1.35	8/10	3.25 ± 1.26	12/20
150	3.20 ± 1.25	14/20	4.02 ± 1.10	8/20
50	4.36 ± 1.53	6/15	4.87 ± 1.69	4/15
15	5.65 ± 1.72	1/10	7.18 ± 0.62	0/9
5	7.08 ± 0.72	0/10		
(Control)	8.42 ± 0.61	0/13		
ED ₅₀	81.0 (56.6–105)		267 (153–381)	

JCL-ICR mice were infected transuretherally with *E. coli* EC-14 in 0.125 ml of HIB. Antibiotics were administered orally at 4, 7 hours and b.i.d. for 3 days after infection.
Mice were sacrificed at 4 days after infection and viable cells in kidneys of a mouse were counted, mice with kidney counts of less than 10⁴ CFU/g were regarded as "effective".
ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

ii) 投与時期による影響

E. coli EC-14 を感染菌とし、菌接種 (8×10^4 CFU/マウス) 前後の種々の時間にそれぞれ 1 回投与を行い、ED₅₀ におよぼす投与時期の影響を検討した。

Fig. 1 から明かなように、CCL と CEX は ED₅₀ 値の違いはあっても極めて類似したパターンを示し、2 時間後附近の投与の効果が最も優れるのに対し、前投与および 5 時間以降の投与での治療効果は著しく低下した。

iii) 投与回数による影響

K. pneumoniae SRL-1 を感染菌とし、ムチン無添加で菌接種後 1 および 5 時間の 2 回投与と、1, 2, 3, 4 および 5 時間の 5 回投与との治療効果を比較した。この実験に限り、ED₅₀ 値は各分割投与の総量をもって表わした。

Table 3 に示すごとく、5 回投与における CCL の ED₅₀ は 15.0 mg/kg で 2 回投与の 34.1 mg/kg に比

べて約 1/2 に減少したにすぎなかった。いっぽう、CEX では 5 回投与の ED₅₀ は 106 mg/kg で 2 回投与の 448 mg/kg に比べ約 1/4 の減少であった。

3) マウス尿路感染症に対する治療効果

E. coli EC-14 および *P. mirabilis* 434 感染系での成績をそれぞれ Table 4 および 5 に示した。

E. coli EC-14 感染系での ED₅₀ は CCL が 81 mg/kg, CEX が 267 mg/kg で CCL は CEX に比べ約 3 倍優れた治療効果を示した。いっぽう、*P. mirabilis* 434 の感染系においても ED₅₀ は CCL, CEX それぞれ 8 mg/kg, 122 mg/kg で CCL が CEX よりも約 15 倍強い効果を示した。無処置対照群の腎内生菌数は両感染系ともに 10^8 CFU/g のレベルに達し、標準偏差値に見られるごとくマウス個体間のばらつきはかなり小さかった。また、治療群の腎内生菌数を指数平均で示した場合、各投与群の間に有効率と同様の明らかな dose response が認められた。

Table 5 Effect of CCL and CEX against experimental urinary tract infections in mice

Test organism : *P. mirabilis* 434

Inoculum size : 3×10^3 CFU/mouse

mg/kg/dose	C C L		C E X	
	Log of viable cells/g (Mean±S.D.)	Effective/Tested	Log of viable cells/g (Mean±S.D.)	Effective/Tested
500			2.08 ± 0.29	14/14
150	2.25 ± 0.74	14/15	3.81 ± 2.34	6/10
50	2.36 ± 0.79	9/10	6.72 ± 1.18	1/10
15	3.76 ± 2.08	10/15	6.96 ± 0.45	0/10
5	4.47 ± 2.25	4/10		
1.5	6.68 ± 1.30	1/10		
(Control)	8.07 ± 0.53	0/12		
ED ₅₀	8.21 (5.37–11.1)		122 (91.2–153) [*]	

JCL-ICR mice were infected transuretherally with *P. mirabilis* 434 in 0.125 ml of HIB. Antibiotics were administered orally at 6 hours and b.i.d. for 3 days after infection. Mice were sacrificed at 4 days after infection and viable cells in kidneys of a mouse were counted, mice with kidney counts of less than 10^4 CFU/g were regarded as "effective". ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

考 察

各種の病原細菌を用いたマウス腹腔内感染に対する CCL の *in vivo* 抗菌作用に関し CEX を対照薬剤として検討を行なった結果、今回の実験では *S. aureus* を除くすべての感染系において CCL は CEX よりも明らかに優れた効果を示した。とくに *H. influenzae* 感染マウスに対して著効を示したことは、CEX の抗菌スペクトラムをさらに拡大したものとして注目される。CCL の *H. influenzae* に対する *in vitro* の抗菌力が CEX に比べて強いことは数多く報告されている³⁻⁵⁾。また、CCL の *in vivo* 活性が CEX に比べ、両者の MIC 値の差から予想される以上に優れていることが今回用いられた多くの感染系において観察された。CCL のマウスでの血中吸収が CEX に比べて劣り、半減期も短い⁶⁾にもかかわらず *in vivo* の効果が優れることは CCL の短時間での *in vitro* 殺菌作用が強いこと¹⁾ を反映しているものと考えられる。

治療効果におよぼす諸因子の影響として今回の実験では、接種菌量、投与時期および投与回数を取り上げた。投与時期の検討 (Fig. 1) において菌接種前の投与は薬剤の吸収排泄、菌接種後の投与は菌量の影響をある面では意味しているものと思われる。事実、*E. coli* EC-14 の感染系では菌接種後の腹腔内生菌数は 4 時間から 5 時間後にかけて 10^6 から 10^7 CFU に増加し、それに伴って ED₅₀ 値の著明な上昇が認められ、Table 2 に示した 10^6 から 10^7 CFU への接種菌量増加による ED₅₀ 値の著しい変動と平行した成績が得られた。我々は先に Cefamandole (CMD) が *K. pneumoniae* SRL-1 の感染系において短時間頻回投与を行なうことによって治療に要する総投与量を著しく減少せしめ得ることを報告した⁷⁾。今回同様の検討を CCL および CEX について行なった結果、両薬剤ともに CMD に見られたような著明な頻回投与の効果は観察されなかった。この違いは恐

らく注射剤と経口剤との吸収排泄の差によるものと推察される。

マウスを用いた実験的尿路感染においても腹腔内感染と同様、CCL は CEX よりも優れた治療効果を示し尿路感染症治療への有用性が示唆された。なお、今回用いられたマウスの尿路感染モデルは、比較的簡便で再現性があり各種の病原菌に応用し得るので抗菌剤の治療効果の評価に有用な方法と思われる。

文 献

- 1) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司, 村上和久, 中本省三: Cefaclor の *in vitro* の抗菌作用。Chemotherapy 27(S-7): 71~97, 1979
- 2) ASHTON, W. D.: The logit transformation with special reference to its uses in biology. 2nd Ed., Griffin, London pp. 46~63, 1972
- 3) KAMMER, R. B.; D. A. PRESTON, J. R. TURNER & L. C. HAWLEY: Rapid detection of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and their susceptibility to sixteen antibiotics. Antimicrob. Agents & Chemother. 8(1): 91~94, 1975
- 4) SANDERS, C. C.: *In vitro* studies with cefaclor, a new oral cephalosporin. Antimicrob. Agents & Chemother. 12(4): 490~497, 1977
- 5) SINAI, R.; S. HAMMERBERG, M. I. MARKS & C. H. PAI: *In vitro* susceptibility of *Haemophilus influenzae* to sulfamethoxazole-trimethoprim and cefaclor, cephalexin and cephadrine. Antimicrob. Agents & Chemother. 13(5): 861~864, 1978
- 6) 吉田 正, 木村靖雄, 中清水弘, 棚野義博, 大坪 龍: Cefaclor の動物における吸収・排泄。Chemotherapy 27(S-7): 105~115, 1979
- 7) 松浦真三, 島岡 登, 東山伊佐夫, 三和秀明: Cefamandole の *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 27(S-5): 107~111, 1979

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFACLOR

SHINZO MATSUURA, HIDEAKI MIWA, ISAO HIGASHIYAMA and NOBORU SHIMAOKA

Shionogi Research Laboratory, Shionogi and Co., Ltd.

The protective effects of cefaclor, a new oral cephalosporin antibiotic, against experimental intraperitoneal and urinary tract infections in mice were compared with those of cephalixin.

Cefaclor showed considerably higher protective effect than cephalixin in mice systemically infected with various gram-positive and gram-negative bacteria, including *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter aerogenes*. However, there was no significant difference between two antibiotics in the influence of inoculum size of bacteria and dosing schedule.

Against experimental urinary tract infections with *E. coli* and *P. mirabilis*, cefaclor was also more effective than cephalixin.