

複雑性尿路感染症に対する cefoxitin の治療効果

とくに本剤の β -ラクタマーゼに対する安定性の意義について

神田 静人・加藤 正博・長谷川 真常

富山市民病院泌尿器科

池 内 澄・長 田 恭 明

第一製薬株式会社研究所

(昭和 55 年 1 月 8 日受付)

複雑性尿路感染症患者を対象として、まず cefoxitin (CFX) 以外の β -ラクタム抗生物質による治療を連続 5 日間行ない (第 1 次治療)、臨床および細菌学的に治癒のみられなかった 9 症例に対して CFX の 5 日間連続投与を行なって (第 2 次治療)、その効果を検討した。その結果、9 症例中 4 症例が完全に治癒した。他の 3 症例においては、グラム陰性桿菌から真菌への菌交代がみられ、残る 2 症例は尿中菌数が有意に減少したものの、細菌尿の完全な消滅はみられなかった。第 1 次治療前後に、上記各症例の尿から分離された各菌株の CFX 感受性を比較したところ、治療後の菌株ではいずれも治療前の菌株に比べて MIC 値の上昇がみられた。一方、これら耐性株から抽出した粗 β -ラクタマーゼ標品による加水分解試験では、CFX はほとんど加水分解されず安定であった。しかし、上記試験で用いた同一菌株の生菌懸濁液中に CFX を添加して一定時間後にその残存活性濃度を測定したところ、生菌体との接触によって濃度の低下がみられた。そこで CFX の治療効果、とくに細菌尿消滅効果における本剤の β -ラクタマーゼ安定性の意義について考察を加えた。

序 文

半合成 cephamycin 系抗生物質 CFX¹⁾ は、すでに世界中で広範囲にわたって臨床治験が進められ²⁻³⁾、本邦においては尿路感染症患者に対する二重盲検試験の結果、その効果が証明されている⁴⁾。とくに本抗生物質は各種細菌の産生する β -ラクタマーゼに対して安定度の高い抗生物質であることがよく知られている^{13,15-17)}。 β -ラクタマーゼの細菌生理学的意義については、いまだに議論的にはなっているものの、少なくともこのものが細菌の β -ラクタム抗生物質耐性に大きな役割を演じていることは衆目の一致するところである。本剤はそれら耐性菌による種々の感染症への治療効果が最も期待されている抗生物質の一つでもある。本剤の β -ラクタマーゼ抵抗性については、(1) 7α -メトキシ基による立体的酵素阻害、(2) 酵素との不可逆結合の強さなどがいわれており、実験的にはいくつか証明されている。ある種の抗生物質が菌の β -ラクタマーゼ活性を抑制したり、あるいは何らかの障害作用を示すとすれば、そのこと自体がその抗生物質の抗菌活性を増強することにつながると考えることができる。事実、このような考え方の上に立って clavulanic acid のような β -ラクタマーゼ阻害物質が発見され、本酵素に対して高感度なペニシリンお

よびセファロsporin系抗生物質の活性増強剤としての応用が試みられている¹⁹⁻²⁴⁾。CFX は、それ自体で β -ラクタマーゼに対する抵抗性を持っており、それが本剤の特徴でもある。本報では、その特徴が臨床効果として反映する否かを確認するために、他剤耐性起炎菌による複雑性尿路感染症に対する効果と、それら起炎菌の産生する β -ラクタマーゼに対する安定性とを関連づけて考察を加えた。

材料と方法

抗生物質：治療および実験に用いた抗生物質は、sodium cefoxitin (CFX; Merck Sharp and Dohme Res. Labs.), sodium cefazolin, sodium carbenicillin (CEZ, CBPC; 藤沢薬品), sodium cephalothin, sodium cephalixin, sodium cephaloridine (CET, CEX, CER; 塩野義製薬), sodium ampicillin, sodium cloxacillin, potassium benzylpenicillin (ABPC, MCIPC, PCG; 明治製薬) である。CFX を除いて、すべてこれらは市販品である。

患者および治療法：対象患者は Table 1 に示すように、グラム陰性菌による chronic cystitis, periurethral abscess, chronic prostatitis, acute pyelonephritis, chronic pyelonephritis 等の疾患で入院加療中のもの

Table 1 The patients employed

Case No.	Patients	Sex	Age	Diagnosis	Underlying disease
1	F. M.	M	68	Chronic cystitis	Bladder stone Neurogenic bladder
2	K. K.	M	82	Chronic cystitis	Operated prostatism
3	Y. T.	M	71	Chronic cystitis	Operated prostatic hypertrophy Urethral stricture
4	F. S.	M	72	Chronic cyst-urethritis Periurethral abscess	Urethral stone
5	A. S.	M	62	Chronic cystitis	Operated prostatic hypertrophy
6	H. J.	M	83	Chronic cystitis	Prostatic hypertrophy
7	I. K.	M	70	Chronic cystitis Chronic prostatitis	Prostatic hypertrophy Prostatic hypertrophy
8	O. M.	M	77	Chronic cystitis Acute pyelonephritis	Operated prostatic hypertrophy
9	K. C.	M	76	Chronic cystitis	Operated bladder neck contracture
10	O. K.	M	79	Chronic pyelonephritis	Prostatic hypertrophy

で、いずれも基礎疾患として、bladder stone, neurogenic bladder, operated prostatism, operated prostatic hypertrophy, urethral stricture, urethral stone, prostatic hypertrophy, operated bladder neck contracture を有する複雑性尿路感染症患者である。起炎菌は、*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* および *Pseudomonas picketti* と同定された。これら 10 症例中 7 症例、すなわち症例 2, 3, 4, 5, 8, 9 および 10 は術後感染であった。

患者には、第 1 治療として CFX 以外の β -ラクタム抗生物質を 1 日 2~3 回（静脈内投与は 2 回、経口投与は 3 回）、5 日間連続投与し、尿中細菌の消滅のみられなかった症例に対し、第 2 次治療として CFX の 1 日 2 回、5 日間連続投与を実施した。第 1 次治療では、5 症例に CET, 2 症例に CEX, 他の症例には CBPC, CEZ および ABPC と MCIPC の混合薬剤、すなわち Vicillin S を投与した。

なお、症例 10 は第 1 次治療で尿中細菌の消滅した症例の代表として掲げたものである。

細菌学的試験：

1. 使用菌株；第 1 次治療前後の患者尿から分離した起炎菌 7 菌種 95 株を用いた。これらは同定後それぞれ普通寒天斜面培地に純培養して 5℃ 以下に保存し、できるだけ継代培養することなしになるべく早急に各種試験に供した。これ以外に *E. coli* NIHJ および *Staphylococcus aureus* 209 P を薬剤感受性試験の対照株として用いた。

2. 薬剤感受性試験；各分離菌株の薬剤感受性は各抗生物質の MIC 値として表わした。MIC は日本化学療法学会標準法に則り寒天希釈法により測定した。すなわち各抗生物質を 32,000 $\mu\text{g/ml}$ の割合に蒸留水に溶解し 15.6 $\mu\text{g/ml}$ まで 2 倍段階希釈した。これら抗生物質溶液は試験直前に調製した。寒天平板は高圧蒸気滅菌後約 50℃ に冷却したハートインフュージョン寒天培地 (HIA；栄研化学) 9 ml と抗生物質溶液 1 ml とを、直径 9 cm のガラス製シャーレ中で混合し水平に凝固して調製した。菌株はトリプトソイブイオン培地 (YSB；栄研化学) で 37℃ 1 夜培養し、この培養液を新鮮 TSB で 100 倍に希釈した。この希釈培養液を上記各寒天平板上に改良型 Steers' replicator²⁵⁾ (Multiinoculator M-300；永井商会、東京) により接種した。接種菌数はおおよそ 10^6 集落形成単位 (CFU) であった。

3. β -ラクタマーゼ試験；各分離菌株をブレインハートインフュージョン液体培地 (BHIB；Difco) 10 ml 中で 37℃ 1 夜培養した。この培養液を BHIB 100 ml に接種し、37℃、1.5 時間振盪培養し、それに β -ラクタマーゼ誘導物質として、CFX を最終 1/16 MIC 濃度となるように添加し、さらに 2 時間振盪培養した。菌体は 6,000 \times g、10 分間の遠心分離により 0.1 M 磷酸緩衝液 (PB, pH 7.0) で 10 分洗浄後同 PB に再懸濁した。その洗浄菌体を永浴中 20 KHz で超音波処理し、12,000 \times g、60 分間遠心分離した後、その上清を粗酵素標品として小分けし、-30℃ 以下に保存した。なお、菌体の超音波破砕は鏡検により確認した。 β -ラクタマーゼ活性は PERRET 法²⁶⁾によるヨウ素滴定法 (単位：unit/min/mg

蛋白)で、蛋白量は LOWRY 法²⁷⁾によりそれぞれ測定した。

4. 生菌体による抗生物質の不活化試験；患者尿中細菌は、尿中に排泄されてくる抗生物質と接触し、それに抵抗して生き残り、増殖を続けるか、滅殺されて排除されるか、いずれの運命をたどることになる。抗生物質は、細菌との接触によって種々の要因で不活化されることが充分予測される。そこでこうした状況を想定した各分離菌体の各抗生物質不活化活性の程度を検討した。各菌株は BHIB で 37°C 1 夜培養し、その 0.1 ml を 1/16 MIC, CFX 含有の HIA 平板に接種し、37°C 1 夜培養した。これら酵素誘導のかかった各新鮮菌体を、1 mM MgSO₄ 添加の 0.1 M PB (pH 7.0) に 10⁸ CFU/ml の割合に懸濁し、これに各抗生物質を最終濃度 100 µg/ml となるように添加して、37°C 10 分間加温したのち、4°C 以下で 6,000×g, 20 分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルターで濾過滅菌した。その各濾液中の各抗生物質残存抗活性は寒天平板穿孔法により測定した。寒天平板は、試験菌 *Staph. aureus* MB-2786 の TSB 中 37°C 1 夜培養液を 1% の割合に混釈した HIA 250 ml を角型ガラス平板 (25×35 cm) に流し込んで作成し、

凝固後、自動寒天板穿孔機 (永井商会, 東京) で穿孔した。上記各濾液をマイクロピペット (Transferpette; Oriental Instrument, West Germany) を用いて正確に 0.1 ml ずつ寒天孔に注入し、各平板を 37°C で 1 夜培養した。抗生物質濃度は阻止円直径自動測定機 (永井商会, 東京) により平板上の阻止円直径から算出した。各分離菌株の抗生物質不活化活性は、抗生物質の活性濃度低下率で表わした。

成 績

臨床効果：尿路に基礎疾患を有する慢性複雑性尿路感染症で、投与前膿尿 $\geq 10^4$ コ/hpf, 投与前細菌尿 $\geq 10^4$ コ/ml の症例を対象とした。第 1 次治療で有効であった症例 10 を除く他の 9 症例は、第 1 治療ではいずれも判定基準で有効性が認められなかったため、これらにさらに CFX を投与し、その効果を判定した。効果判定は膿尿を正常化 (cleared), 改善 (decreased), 不変 (unchanged) の 3 段階に、細菌尿を陰性化 (eliminated), 減少 (suppressed, $< 10^8$ コ/ml), 菌交代 (replaced), 不変 (unchanged, $\geq 10^8$ コ/ml) の 4 段階に分け、Table 2 のように著効 (excellent), 有効 (good), 無効 (poor) に分けて判定した。

その結果、CFX の効果は Table 3 に示すように著効 0, 有効 6, 無効 3 で、有効率 66.7% であった。無効 3 症例中、症例 1 および 8 は真菌への菌交代であり臨床的には症状の改善もあり満足できる症例であった。

細菌学的所見：患者の排泄尿、あるいはカテーテル尿の第 1 次および第 2 次治療の前後 1 日目の細菌学的所見は Table 4 に示したとおりである。第 1 次治療前 10 症例中 4 症例は *K. pneumoniae*, 2 症例は *Ser. marcescens*, また 3 症例はそれぞれ *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Ps. picketti* の感染で、尿中菌数 (UCB) はいずれも 10⁸

Table 2. The overall clinical efficacy

Pyuria Bacteriuria	Cleared	Decreased	Unchanged
Eliminated	Excellent		
Suppressed		Good	
Replaced			
Unchanged			Poor

Table 3 The clinical evaluation of CFX in the 2nd treatment

Case No.	Patients	Antibiotics ^{a)}	Pyuria	Bacteriuria	Overall clinical efficacy
1	F. M.	CET	Unchanged	Unchanged	Poor
2	K. K.	CET	Unchanged	Eliminated	Good
3	Y. T.	CET	Unchanged	Eliminated	Good
4	F. S.	CBPC	Unchanged	Eliminated	Good
5	A. S.	CEX	Decreased	Suppressed	Good
6	H. J.	CEZ	Unchanged	Unchanged	Poor
7	I. K.	CET	Decreased	Eliminated	Good
8	O. M.	ABPC MCIPC	Unchanged	Unchanged	Poor
9	K. C.	CEX	Unchanged	Suppressed	Good
10	O. K.	CET	—	—	—

a) The antibiotics used in the 1st treatment.

Table 4 The bacterial findings of patient urine

Case No.	Patients	Antibiotics ^{a)}	The organisms isolated from the patient urine (UCB ; CUF/ml ^{b)})		
			before treatment	after the 1st treatment	after the 2nd treatment
1	F. M.	CET	<i>Ser. marcescens</i> (>10 ⁷) <i>Pr. mirabilis</i> (>10 ⁷)	<i>Ser. marcescens</i> (>10 ⁷)	GNR (10 ⁸) ^{c)} Fungi (10 ⁴)
2	K. K.	CET	<i>Ser. marcescens</i> (>10 ⁷)	<i>Ser. marcescens</i> (10 ⁴)	negative
3	Y. T.	CET	<i>K. pneumoniae</i> (>10 ⁷)	<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁵)	negative
4	F. S.	CBPC	<i>Ps. picketti</i> (10 ⁵)	<i>Pr. morgani</i> (10 ⁷)	negative
5	A. S.	CEX	<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁷)	<i>K. pneumoniae</i> (>10 ⁷)	GNR (<10 ⁸)
6	H. J.	CEZ	<i>Ser. marcescens</i> (>10 ⁷)	<i>Ser. marcescens</i> (>10 ⁷)	<i>Ser. marcescens</i> (10 ⁴)
7	I. K.	CET	<i>E. coli</i> (10 ⁵)	<i>E. coli</i> (10 ⁴)	negative
8	O. M.	ABPC MCIPC	<i>K. pneumoniae</i> (>10 ⁷)	<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁷)	Fungi (10 ⁷)
9	K. C.	CEX	<i>K. pneumoniae</i> (>10 ⁷)	<i>Ent. cloacae</i> (10 ³)	Fungi (<10 ⁸)
10	O. K.	CET	<i>Pr. vulgaris</i> (>10 ⁷)	negative	

a) The antibiotics used in the 1st treatment.

b) The urinary counts of bacteria.

c) Gram-negative rods

~10⁷ CFU/mlであった。他の1症例は *Ser. marcescens* と *P. mirabilis* の混合感染であって、ほぼ同数の UCB が認められた。

第1次治療で尿中細菌の消滅した症例10を除く9症例についてみると、症例1の尿中に検出された2菌種のうち、*Pr. mirabilis* は CET による第1次治療で消失したが、*Ser. marcescens* は残存し、上記症例を含む7症例において、第1次治療後も治療前と同じ菌種が残存した。他の2症例では、*Ps. picketti* から *Pr. morgani*, *K. pneumoniae* から *Ent. cloacae* への菌交代がみられた。

ついで、これら第1治療ではなんら細菌学的改善が認められなかった上記9症例について、CFX による第2次治療を実施した。治療は、1日2回 CFX 2g を5%ブドウ糖またはソリタ液 200 ml に溶解し点滴静注で行なった。その結果、4症例は細菌尿が消失し、他の4症例では UCB は有意に減少したものの菌交代がみられた。残る1症例は、UCB の減少はみられたものの治療前の起炎菌が残存した。

これら分離菌株の各抗生物質に対する感受性は Table 5 に示すとおりである。無差別に各菌種から数株を選び、第1次治療に用いた抗生物質に対する感受性をみたところ、2, 3 の症例を除き、治療前後で、その感受性に若干の差がみられた。第1次治療前に分離した株は、ディスク法ではいずれも使用抗生物質に対して感受性であると評価されたが、MIC 試験の結果、それらの中で数例の菌株は使用抗生物質に対し耐性であるとみなされた。2, 3 の症例においては、同一菌種内でも菌株によ

って数希釈段階の差がみられた。以上、同一菌種内でも使用抗生物質に比較的耐性な菌株が第1次治療での淘汰により生残したと考えることもできる知見が得られた。

CFX 治療が無効であった症例では、菌株はすべて MIC 値 3,200 µg/ml 以上を示す CFX 高度耐性株であった。

分離菌株の β-ラクタマーゼ活性：各分離菌株の β-ラクタマーゼ活性は、Table 6, 7 に示したとおりである。今回、われわれは菌株保存中の事故により、分離株すべてについて検討することができなかったが、一般に、第1次治療後分離株の酵素活性は治療前の分離株のそれより高かった。症例1および8では、第1次治療前後いずれにおいても、それぞれ、*Ser. marcescens* および *K. pneumoniae* が分離されたので、そのうちの数株を用いて活性を比較したところ、治療後分離株の β-ラクタマーゼ活性は、治療前分離株のそれよりも有意に高いことが明らかにされた。一方、CFX に対する各菌株の粗酵素標品の加水分解活性はいずれも 0.01 unit/min/mg 蛋白以下であり、CFX はこれらによって全く加水分解されなかった。

生菌体との接触による各種抗生物質活性濃度の低下：各抗生物質治療の患者尿中における菌の環境を考慮し、生菌体との接触による各抗生物質の活性濃度の変化を検討した。その結果、Table 6, 7 および Fig. 2 に示すように、このような条件下で、各抗生物質はかなりの割合で不活化されることが明らかにされた。その原因としていろいろ考えられる中で、今回は各菌株の β-ラクタマーゼとの関係について検討した。すなわち、各菌株の粗酵素標品の加水分解活性と生菌体接触不活化率の間の相

Table 5 Susceptibilities of isolates from the patient urine

Case No.	Organisms	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}													
			3.13	6.26	12.5	25	50	100	200	400	800	1,600	3,200	>3,200		
1	<i>Ser. marcescens</i>	CET	B ^{b)}													5 ^{c)}
		CFX	A							1		4			5	
1	<i>Pr. mirabilis</i>	CET	B				5									
		CFX	B				5									
2	<i>Ser. marcescens</i>	CET	B													5
		CFX	A							2	3	2	3			5
3	<i>K. pneumoniae</i>	CET	B			1	1	1		2						
		CFX	A		5		5			2	5					
4	<i>Ps. picketti</i>	CBPC	B											5		
		CFX	B						1	4						
4	<i>Pr. morgani</i>	CBPC	A											5		5
		CFX	A													
5	<i>K. pneumoniae</i>	CEX	B			4			1	5						
		CFX	A		4	1	5									
6	<i>Ser. marcescens</i>	CEZ	B													5
		CFX	A										1			5
7	<i>E. coli</i>	CET	B			5	5									
		CFX	A	3	2	5										
8	<i>K. pneumoniae</i>	ABPC	B													5
		MCIPC	A													5
9	<i>K. pneumoniae</i>	CFX	B	1	4											5
		CFX	A		5											5
9	<i>Ent. cloacae</i>	CEX	B			1	2				2					
		CFX	B			1	2	2								
9	<i>Ent. cloacae</i>	CEX	A													5
		CFX	A										5			

a) The MICs were determined according to the agar dilution method using HIA.

b) The strains of isolates isolated before (B) and after (A) the 1st treatment.

c) Number of strains susceptible to indicated concentration of the antibiotics.

関性を検討した。まず、各菌株の産生する β -ラクタマーゼの型にかかわらずそれぞれの分散図を求めたところ、Fig. 1-a, 1-b が得られその相関係数は加水分解基質にかかわらず高い値が得られた ($\gamma_{\text{CER}}=0.9252$, $\gamma_{\text{CEZ}}=0.9318$)。また、各菌株の活性度は大きく A, B, C の3群に分けられた (Fig. 1-a)。すなわち、各群の CER に対する酵素活性の対数と生菌体による CER 不活化率は、それぞれ -1.00 以下対 30% 以下 (A群), -0.01

~1.00 対 30~70% (B群) および 1.00 以上対 70% 以上 (C群) である。CEZ を基質とした場合には菌株は4群に分けられた (Fig. 1-b)。そこで、各菌株を β -ラクタマーゼの基質プロファイルによってセファロsporin産生菌とペリシナーゼ産生菌に分け、セファロsporin産生菌を優勢に産生する菌株だけをプロットすると、Fig. 1-c および 1-d に示すように、Fig. 1-a および 1-b にみられる B群の菌株はこの図から消え、相

Table 6 The antibiotic inactivation activity of sonicates of the isolates and corresponding whole cells

Case No.	Organisms	No. of strain	Antibiotics	Inactivation activity	
				sonicates ^{a)}	whole cells ^{b)}
1	<i>Ser. marcescens</i>	10	CET	8.95	53.9
			CFX	<0.01	5.5
			CER	48.9	60.7
			PCG	2.52	19.1
1	<i>Pr. mirabilis</i>	5	CET	<0.01	12.8
			CFX	<0.01	10.5
			CER	0.06	22.4
			PCG	0.03	22.0
2	<i>Ser. marcescens</i>	10	CET	0.78	79.2
			CFX	<0.01	4.5
			CER	3.51	56.9
			PCG	2.80	43.9
3	<i>K. pneumoniae</i>	5	CET	0.17	29.6
			CFX	<0.01	6.0
			CER	2.46	64.0
			PCG	4.21	88.6
4	<i>Ps. picketti</i>	5	CBPC	0.03	7.4
			CFX	<0.01	3.0
			CER	<0.01	16.6
			PCG	0.01	16.0
4	<i>Pr. morgani</i>	5	CBPC	0.57	55.2
			CFX	<0.01	4.8
			CER	21.7	83.0
			PCG	7.43	68.6
5	<i>K. pneumoniae</i>	5	CEX	0.07	21.0
			CFX	<0.01	8.4
			CER	1.20	52.2
			PCG	2.74	82.4
6	<i>Ser. marcescens</i>	10	CEZ	47.6	100
			CFX	<0.01	6.7
			CER	64.1	100
			PCG	3.27	56.0
7	<i>E. coli</i>	5	CET	0.02	8.4
			CFX	<0.01	6.2
			CER	0.02	22.0
			PCG	<0.01	10.2
8	<i>K. pneumoniae</i>	5	ABPC	13.5	92.8
			MCIPC	0.15	20.3
			CFX	<0.01	16.3
			CER	11.3	67.8
			PCG	10.8	92.6
9	<i>K. pneumoniae</i>	5	CEX	0.04	19.2
			CFX	<0.01	11.0
			CER	2.39	63.4
			PCG	3.65	100
9	<i>Ent. cloacae</i>	5	CEX	12.8	54.0
			CFX	<0.01	12.0
			CER	125.3	83.4
			PCG	3.52	21.6

a) The mean β -lactamase activity idometrically measured according to the method of PERRET (U/min/mg protein).

b) The mean reduction rate of bioactive concentration of the antibiotics by contact with whole cells (%).

関係数はさらに上昇した。この結果から、 β -ラクタマーゼに不安定な抗生物質の生菌体による活性低下は、菌の産生する β -ラクタマーゼ活性と有意に相関することが

明らかにされた。

CFX に関しては、各粗酵素標品による加水分解率が、ヨウ素滴定法では検出し得ないため両者間の相関性解析

Table 7 Changes of the antibiotic inactivation activity of isolates during the first treatment with β -lactam antibiotics

	Case No.	Patients	Organisms	Substrates	Inactivation activity	
					before ^{a)}	after ^{a)}
Sonicates ^{c)}	1	F. M.	<i>Ser. marcescens</i>	CET	6.6 \pm 0.1 ^{b)}	11.3 \pm 3.4
				CEZ	33.3 \pm 1.6	39.7 \pm 4.2
				CER	43.1 \pm 1.6	54.6 \pm 2.2
	8	O. M.	<i>K. pneumoniae</i>	ABPC	9.4 \pm 0.1	18.0 \pm 2.0
				MCIPC	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1
				CEZ	0.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3
Whole cells ^{d)}	1	F. M.	<i>Ser. marcescens</i>	CET	45.0 \pm 8.0	74.6 \pm 8.4
				CFX	3.6 \pm 1.9	7.4 \pm 5.4
				CEZ	73.0 \pm 8.3	76.4 \pm 9.0
				CER	45.0 \pm 1.9	76.4 \pm 2.7
				PCG	6.2 \pm 3.5	32.0 \pm 7.9
	8	O. M.	<i>K. pneumoniae</i>	CFX	8.8 \pm 2.3	23.8 \pm 2.3
				CEZ	20.4 \pm 9.2	42.4 \pm 9.1
				CER	55.8 \pm 17.3	79.8 \pm 8.8
				ABPC	85.6 \pm 9.9	100.0 \pm 0.0
			MCIPC	14.0 \pm 3.8	26.6 \pm 3.8	

a) The antibiotic inactivation activity of organisms isolated before and after the 1st treatment.

b) Mean \pm Standard error.

c) β -Lactamase activity iodometrically determined according to the method of PERRET (U/min/mg protein).

d) Reduction rate of bioactive concentration of the substrates by contact with whole cells (%).

Fig. 1 The correlativity between antibiotic inactivation activity of sonicates of CFX-induced cultures and that of corresponding whole cells

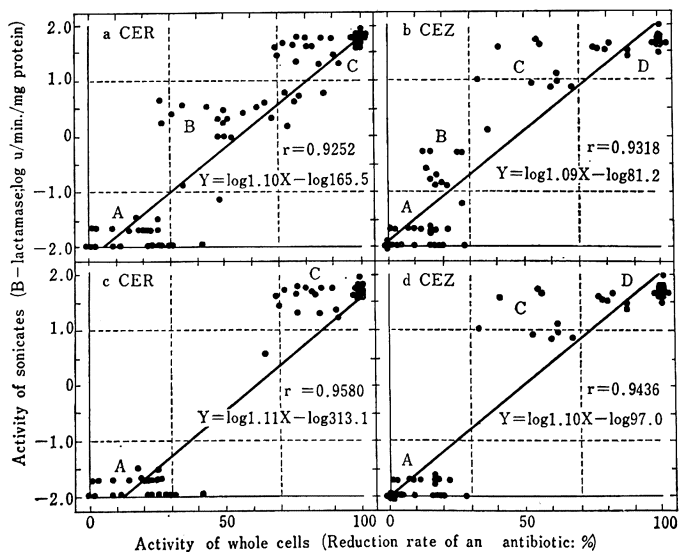


Fig. 2 The antibiotic unactivation activity of whole cells of isolates

Case No.	Organisms	Drugs	Reduction rate of antibiotics (%)																				
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100										
1	<i>Ser.marcescens</i>	CFX CET CER	□	•																			
2	<i>Ser.marcescens</i>	CFX CET CER	□	•																			
3	<i>K.pneumoniae</i>	CFX CET CER	□	•																			
4	<i>Pr.morganii</i>	CFX CBPC PCG	□	•																			
5	<i>K.pneumoniae</i>	CFX CEX CER	□	•																			
6	<i>Ser.marcescens</i>	CFX CEZ CER	□	•																			
7	<i>E.coli</i>	CFX CET CER	□	•																			
8	<i>K.pneumoniae</i>	CFX NICIPC ABPC	□	•																			
9	<i>Ent.cloacae</i>	CFX CEX CER	□	•																			

The activity was represented as the reduction rate of bioactive concentration of antibiotics by contact with whole cells. The antibiotic was added to a test tube containing the bacterial suspension (10⁸ CFU/ml) to give a final concentration of 100 µg/ml, and the test tube was incubated at 37°C for 10 minutes. After removal of bacterial cells by centrifugation and membrane-filtration below 4°C, the residual bioactive concentration of the antibiotic was measured microbiologically. The reduction rate was obtained by subtraction of the residual level from the original level (100 µg/ml).

□ and ● illustrates the mean and individual values.

は不可能であった。すなわち、CFX に対する粗酵素標品の活性の対数は全株とも -2.00 以下であるのに対し、対応する生菌体との接触によってその抗菌活性は種々の程度に低下することが認められた。Fig.2 は CFX, CER および第1次治療で使用した各抗生物質の生菌体による不活化率を示したものである。この図でも明らかなように他の抗生物質に比べて CFX は比較的不活化されにくく、第2次治療終了時点で菌交代がみられた症例8を除いて、CFX 不活化率は15% 以下であった。しかしながら第2次治療後でも菌が残存した症例1, 5 および6 由来の分離株の中には CFX を15% 以上不活化する菌株も認められた。

考 察

近年、高齢者が増加の傾向にあり、それに伴って尿路に何らかの基礎疾患を有する慢性複雑性尿路感染症が増加し、泌尿器科領域での重要な疾患となってきた。これに伴って臨床での抗生物質の使用頻度も高くなり、これらに対する耐性菌も徐々に増加しているのが現状である。とくに β-ラクタム抗生物質高度耐性菌による尿路感染症が増加している事實は、その感をいっそう深くするものである²⁸⁻³⁰⁾。そこでわれわれは CFX の複雑性尿路感染症に対する効果を、とくに起炎菌の産生する β-ラクタマーゼに対する安定性ととの関連から検討した。本抗生物質は cell free の系ではこの酵素に対して高度に安定であることが良く知られており^{13,15-18)}、他の β-ラクタム抗生物質耐性菌による感染症に対する有用性が期待されている^{10,29,31)}。しかしながら CFX の β-ラクタマーゼ安定性とその臨床効果を直接証明する根拠はほとんど得られていない。そこでわれわれは他の β-ラクタム抗生物質の治療で治癒し得なかった患者を対象に、その起炎菌の β-ラクタマーゼ活性と CFX の治療効果の関係について予備的検討を試みた。

第1次治療前に分離した菌は、感受性ディスク試験により、当然のことながら用いた抗生物質に対してそれぞれ感受性とみなされたが、症例1~9 はこれら抗生物質の投与では尿中起炎菌を消滅させることができなかった。これら分離起炎菌集落を無作為に抽出して MIC 試験をおこなったところ、半数以上の菌株が用いた各抗生物質に対し MIC の上で耐性値を示した。WAITZ³²⁾ は、ディスク拡散法がブイオン希釈法と同様、耐性菌を識別することはできても、感受性菌に対しては両試験法間の結果に統計学的な相関性が成立しないと述べている。HATALIN³³⁾ らは、同じことをブイオンおよび寒天希釈法と比較し、MIC 値については数株を除いて同じか、あるいは差があっても1希釈段階程度の差であることを確認している。彼らはさらに、ディスク拡散法との比較で寒天希釈法のほうが(1)時間が短縮できる、(2)寒天の厚さに無関係である、(3)抗菌活性がより長く安定である等の点で、ディスク拡散法より多くの利点を有していることを強調している。われわれもディスク拡散法における寒天平板の厚さと接種菌量は、試験の結果に大きく影響をおよぼす因子であると考えた。寒天層が薄ければ薄いほどディスクに含まれる抗生物質の拡散はより良好となり、接種菌量を少なくすることは抗生物質の菌に対する感受性の判定を誤らす結果を招くおそれがあるからである。

さて、第1次治療で治癒しなかった症例についての CFX による第2次治療の結果、9 症例のうち、4 症例

は尿中細菌が完全に消失したが、CFX に対して高度耐性を示す *Ser. marcescens* (MIC > 3,200 µg/ml) の 1 症例に対しては当然のことながら完治不可能であった。また他の 4 症例は、尿中菌数が有意に減少したものの真菌などの菌交代がみられた。MIC 試験ではほとんどの症例において起炎菌は必ずしも CFX に対して感受性ではなかったが、尿中菌数は有意に減少した。この成績は本邦における他の臨床研究の結果と一致した^{9,11-13,20}。これは、一部はその高い尿中濃度によるものといえようが^{11,12,20,34}、起炎菌の産生する β-ラクタマーゼに対する本抗生物質の高度な安定性も関与しているといえよう。事実、cell free 系の実験では、本抗生物質は今回分離した起炎菌由来の粗酵素標品では全く加水分解されなかった。

グラム陰性菌においては、β-ラクタマーゼ産生能力の低い菌においても、酵素誘導によりその産生量が著しく高まることが知られている^{15,35}。ONISHI 氏¹⁵は CFX の酵素誘導活性について検討し、粗酵素レベルで約 10~15 倍の活性増強が起ることを報告している。今回の実験では、CFX で産生誘導した粗酵素標品をもってしても CFX は何ら加水分解を受けなかった。しかしながらこの事実は必ずしも本抗生物質の活性濃度の維持に β-ラクタマーゼが全く影響をおよぼしていないことの説明にはならない。われわれは、ONISHI 氏¹⁵が示唆しているように、誘導基質量と誘導時間の関係が不適当な場合、誘導基質が早期に分解してしまい、その後発育してきた生残菌の量によっては産生酵素が見掛け上、希釈される可能性もあると考える。

SABATH 氏³⁰も述べているように、β-ラクタマーゼと菌の耐性とは常に相関しているとは限らない。事実、種類の β-ラクタム抗生物質に対する菌の耐性度が、これら抗生物質の β-ラクタマーゼによる加水分解率とは必ずしも関係していないという知見がしばしば得られている^{32,37-41}。β-ラクタマーゼは他の耐性機構、たとえば透過性障壁等と協力的に働いて細菌細胞を耐性化するという考えもある^{26,42}。CFX は精製 β-ラクタマーゼに対しては高い親和性を示すことも知られている¹⁵。NEU¹⁵ および MEDEIROS 氏⁴¹は、耐性菌細胞内では β-ラクタマーゼが合目的にある部位に位置し、侵入してくる CFX と結合し、CFX の標的部位への結合を妨げるような作用機構の可能性を示唆している。今回われわれは、CFX で産生誘導した β-ラクタマーゼの CFX に対する加水分解活性と、対応する生菌体による CFX の活性濃度の低下率との間に何ら相関性を見出すことができなかった。これはヨウ素滴定法の感度が微生物学的定量法のものより低いことによるためと考えることができるし、

加えて超音波処理による β-ラクタマーゼの部分的な不活化もその原因の 1 つと考えられる¹³。

生菌体との接触による CFX の活性濃度低下率は他の抗生物質に比べてはるかに小さいが、数例においては有意な低下率を示した。すなわち、活性濃度低下率には菌株間でかなりのばらつきがみられた。しかし生菌体との接触により比較的高率に不活化した場合でも、その菌株由来の粗酵素標品はヨウ素滴定法では何ら加水分解活性を示さなかった。このような菌では、この抗生物質が β-ラクタマーゼによる加水分解以外の機構によって不活化されている可能性も考慮する必要がある。NEU¹⁵が示唆しているように、生菌体との接触による CFX の活性濃度の低下は、β-ラクタマーゼとの不可逆的結合、すなわち β-ラクタマーゼの“CFX-trapping”がその 1 因子と考えることもできるかもしれない。さらに NEU 氏⁴³は、CFX の加水分解と菌の耐性とがあまり相関しないという理由から、むしろ CFX との接触によって菌側の細胞壁や細胞表面のレセプター変化がおけると考えたほうが妥当のように思える」と述べている。事実、彼らは、CBPC 治療例において起炎菌にこのような選択的变化が起って耐性化した例を認めている。これに関して ONISHI 氏¹⁵は、細菌細胞中に β-ラクタマーゼ産生が誘導されると同時に透過性障壁が障害を受け、細胞に漏出性変化が起ることを示唆している。いいかえれば、この漏出現象によって細胞内に産生蓄積されていた酵素が細胞外に放出され、そのことによって CFX の活性濃度が菌の生残を許す程度まで低下するというわけである。こうした菌の生き残り現象は、当然の帰結として、MIC 試験では MIC 値上昇の 1 因ともなるし、患者の場合には、尿中細菌の不完全消失の原因の 1 つになると考えられる。

一方、CFX 以外の抗生物質については、生菌体による活性濃度の低下率と、各菌株の粗 β-ラクタマーゼ標品の活性との間に高い相関性がみられた。このことからわれわれは、第 1 次治療で用いた抗生物質が患者の尿中起炎菌を減少、減殺できなかった理由の 1 つが、各菌株の産生する β-ラクタマーゼによる加水分解にあると考えた。

以上述べたように、生菌体による β-ラクタム抗生物質の不活化試験は、いわゆるヨウ素滴定法による CFX の β-ラクタマーゼ抵抗性の成績とはかかわりなく、このものの臨床での有効性を判断する上に、1 つの貴重な情報を与えてくれたといえよう。たしかに、ある菌では、その β-ラクタマーゼ活性と耐性とが必ずしも相関しているとは限らないが、β-ラクタマーゼが β-ラクタム抗生物質に対する耐性に関して依然主導的立場にあることにはかわりがない。このことから、CFX の β-ラ

クタマーゼ抵抗性という新しい特徴と、この酵素への高い親和性とその抗菌活性を補足し合っていると考えることもできる¹⁵⁾。

今回の臨床試験成績、すなわち第1次治療無効症例に対する CFX 有効率が 66.7% であったという事実は、以上述べてきた CFX が β -ラクタマーゼに対して安定であるという基礎的成績をある程度裏付けるものであると考える。

文 献

- 1) KARADY, S.; S. H. PINES, L. M. WEINSTOCK, F. E. ROBERTS, G. S. BRENNER, A. M. HOINOWSKI, T. Y. CHENG & M. SLETZINGER: Semi-synthetic cephalosporins *via* a novel acyl exchange reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 1410~1411, 1972
- 2) HESELTINE, P. N. R.; D. F. BUSH, R. D. MEYER & S. M. FINEGOLD: Clinical experience with cefoxitin. *Clin. Res.* 24: 113A, 1976
- 3) FINEGOLD, S. M.: Therapy for infections due to anaerobic bacteria: An overview. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*: S 25~S 29, 1977
- 4) GEDDES, A. M.: Cefoxitin: A hospital study. *Brit. Med. J.* 1: 1126~1128, 1977
- 5) HAYWOOD, H. B. & R. J. DUMA: Cefoxitin in the treatment of presumptive anaerobic or mixed anaerobic-aerobic infections. *Clin. Res.* 25: 28A, 1977
- 6) HESELTINE, P. N. R.; D. F. BUSH, R. D. MEYER & S. M. FINEGOLD: Cefoxitin: Clinical evaluation in thirty-eight patients. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 427~434, 1977
- 7) HINTHORN, D. R.; D. DWORZACK, G. R. HODGES, J. HARMS & C. LIU: Evaluation of cefoxitin treatment of bacterial infections. *Clin. Res.* 25: 586A, 1977
- 8) MCCLOSKEY, R. V.: Results of clinical trial of cefoxitin, a new cephamycin antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12: 636~641, 1977
- 9) 藤村宣夫, 湯浅正明, 上間健造, 黒川一男: 複雑性尿路感染症に対する Cefoxitin の使用経験。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 575~S 580, 1978
- 10) 稗田 定, 尾本徹男, 熊沢浄一, 百瀬俊郎: 複雑性尿路感染症に対する Cefoxitin の使用経験。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 581~S 586, 1978
- 11) 平野 学, 荒木 徹, 近藤捷嘉, 高本 均, 鎌田日出男, 新島端夫: 複雑性尿路感染症に対する Cefoxitin の基礎的および臨床的検討。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 566~S 574, 1978
- 12) 大前博志, 黒田泰二, 片岡頌雄, 三田俊彦, 石神襄次: 尿路感染症に対する Cefoxitin の応用。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 560~S 565, 1978
- 13) 境 優一, 江藤耕作: 複雑性尿路感染症に対する Cefoxitin の臨床的検討。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 587~S 591, 1978
- 14) 石神襄次, 百瀬俊郎, 他 (23施設): 複雑性尿路感染症に対する Cefoxitin (CFX) と Cefazolin (CEZ) の比較試験。 *西日本泌尿器科* 40: 601~639, 1978
- 15) NEU, H. C.: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by Gram-negative *bata*-lactamase. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 6: 170~176, 1974
- 16) ONISHI, H. R.; D. R. DAOUST S. B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Resistance to betalactamase inactivation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 5: 38~48, 1974
- 17) WISE, R.: Clavulanic acid and susceptibility of *Bacteroides fragilis* to penicillin. *Lancet* 2: No. 8029, 145, 1977
- 18) 沢井哲夫, 高橋郁子, 山岸三郎: Cefoxitin の各種 β -ラクタマーゼに対する安定性と β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌作用。 *Chemotherapy* 26 (S-1): S 83~S 87, 1978
- 19) JACKSON, R. T.; L. F. HARRIS & R. H. ALFORD: Sodium clavulanate potentiation of cephalosporin activity against clinical isolates of cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 118~125, 1978
- 20) MILLER, J. M.; C. N. BAKER & C. THORNBERRY: Inhibition of β -lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* by sodium clavulanate. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 740~796, 1978
- 21) NEU, H. C. & K. P. FU: Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamase. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 650~655, 1978
- 22) PAISLEY, J. W. & J. A. WASHINGTON II: Combined activity of clavulanic acid and ticarcillin against ticarcillin-resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 224~227, 1978
- 23) WISE, R.; J. M. ANDREWS & K. A. BEDFORD: *In vitro* study of clavulanic acid in combination with penicillin, amoxicillin and carbenicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 389~393, 1978
- 24) WUST, J. & T. D. WILKINS: Effect of clavulanic acid on anaerobic bacteria resistant to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 130~133, 1978
- 25) STEERS, E.; E. L. FOLTZ & B. S. GRAVES: An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemoth.* 9: 307~311, 1959
- 26) PERRET, C. J.: Iodometric assay of penicillinase.

- Nature 174 : 1012~1013, 1954
- 27) LOWRY, O. H. ; N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
- 28) 五島瑳智子, 辻 明良, 高橋邦子, 金子康子 : *Serratia marcescens* の薬剤感受性—1975 年尿分離株と 1973 年分離保存株の比較—。Chemotherapy 25 : 2319~2326, 1977
- 29) 川島尚志, 大井好忠, 後藤俊弘, 角田和之, 岡元健一郎 : 尿路感染症における Cefoxitin の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 26 (S-1) : S 592~S 599, 1978
- 30) 清水昌寿, 石神襄次, 三橋 進 : 臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の抗生物質感受性。Chemotherapy 26 : 753~756, 1978
- 31) WISE, R. : Use of antibiotics: Cephalosporins. Brit. Med. J. 2 : 40~42, 1978
- 32) WAITZ, J. A. : Interrelationship between disk and tube dilution sensitivity tests for the aminoglycoside antibiotics gentamicin, kanamycin, sisomicin and tobramycin. Antimicrob. Agents & Chemoth. 4 : 445~454, 1973
- 33) HALTALIN, K. C. ; A. H. LARKLEY & E. WOODMAN : Agar plate dilution method for routine susceptibility testing in a hospital laboratory. Am. J. Clin. Pathol. 60 : 384~394, 1973
- 34) 石山俊次, 中山一誠, 岩本英男, 岩井重富, 鷹取睦美, 川辺隆道, 村田郁夫, 大橋 満, 水足裕子 : Cefoxitin の抗菌力, 吸収, 排泄, 代謝, 臓器移行性および外科臨床応用について。Chemotherapy 26 (S-1) : S 389~S 399, 1978
- 35) DAOUSET, D. R. ; H. R. ONISHI, H. WALLICK, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY : Cephameycins, a new family of β -lactam antibiotics: Antibacterial activity and resistance to β -lactamase degradation. Antimicrob. Agents & Chemoth. 3 : 254~261, 1973
- 36) SABATH, L. D. & M. FINLAND : Resistance of penicillins and cephalosporins to β -lactamase from Gram-negative bacilli: Some correlations with antibacterial activity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 145 : 237~247, 1968
- 37) FARRAR, W. E. & J. M. KRAUSE : Relationship between β -lactamase activity and resistance of *Enterobacter* to cephalothin. Infect. Immun. 2 : 610~616, 1970
- 38) GARBER, N. & J. FRIEDMAN : β -Lactamase and the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to various penicillins and cephalosporins. J. Gen. Microbiol. 64 : 343~352, 1970
- 39) RICHMOND, M. H. ; G. W. JACK & R. B. SYKES : The β -lactamases of Gram-negative bacteria including *Pseudomonas*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 182 : 243~257, 1971
- 40) MEDEIROS, A. A. ; R. L. KENT & T. F. O'BRIEN : Characterization and prevalence of different mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 6 : 791~801, 1974
- 41) MEDEIROS, A. A. & T. F. O'BRIEN : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type B possessing a TEM-type β -lactamase but little permeability barrier to ampicillin. Lancet 1 : No. 7909, 716~718, 1975
- 42) SMITH, J. T. ; J. M. HAMILTON-MILLER & R. KNOX : Bacterial resistance to penicillins and cephalosporins. J. Pharm. Pharmacol. 21 : 337~358, 1969
- 43) NEU, H. C. & H. SWARZ : Carbenicillin: Clinical and laboratory experience with a parenterally administered alpha-carboxyphenyl penicillin. Ann. Intern. Med. 71 : 903~913, 1969

CEFOXITIN THERAPY OF COMPLICATED URINARY
TRACT INFECTIONS WITH SPECIAL REFERENCE
TO ITS STABILITY TO DEGRADATION
BY β -LACTAMASE

SHIZUO KANDA, MASAHIRO KATO and MASATSUNE HASEGAWA

Department of Urology, Toyama City Hospital, Toyama

TORU IKEUCHI and YASUAKI OSADA

Research Institutes, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Tokyo

Cefoxitin therapy of complicated urinary tract infections in geriatric patients incurable by treatment with other β -lactam antibiotics was successful in improvement of clinical signs, and in eradication of the causal organisms from the urine. Of 9 cases employed, 4 cases recovered completely, and 4 cases fell into the bacterial substitution with other Gram-negative bacilli and fungi. In the last one case, though the urinary counts of bacteria were reduced significantly, the treatment failed in complete elimination of the causal organisms from the urine.

The susceptibilities of the isolates to cefoxitin more or less decreased during the first treatment with other antibiotics, and most of them were estimated as resistant ones in regard of MIC values. Nevertheless, the antibiotic was stable to hydrolysis by β -lactamase in sonicates of these isolates, but its bioactive concentration was more or less reduced by contact with corresponding whole cells. Thus the effect of cefoxitin on elimination of urinary counts of bacteria was discussed both in connection with its stability to hydrolysis by the crude β -lactamase preparations and reduction of its bioactive concentration with whole cells of the isolates. In some populations of causal organisms, other mechanisms than hydrolysis by β -lactamase may participate in resistance to the antibiotic. Because the cells with such resistance mechanisms should survive the therapy, and subsequently multiply after the treatment, a few cases failed in complete elimination of the organisms from the urine even by treatment with cefoxitin.