

新しいセファロスポリン Cefotaxime の抗菌作用および β -lactamase に対する態度

益吉 真次・新井 進・三橋 進
群馬大学医学部微生物学教室

- 1) Cefotaxime は、グラム陽性、グラム陰性菌群に対して強い抗菌力を示し、特に β -lactam 系抗生物質に耐性の細菌にも強い抗菌活性が認められた。
- 2) Cefotaxime は、Ampicillin 耐性 *E. coli*, *S. marcescens* および Gentamicin 耐性 *P. aeruginosa* に対して強い抗菌力を示し、これらの細菌に対して交差耐性は認められなかった。
- 3) Cefotaxime は、Cefazolin, Cefoxitin より高い殺菌作用を示した。
- 4) β -lactam 系抗生物質は、接種菌量の大小によって MIC 値, MBC 値に変動を受けるが、Cefotaxime も、接種菌量の減少に伴って、MIC 値, MBC 値に低下が認められた。
- 5) Cefuroxime と類似の化学構造をもつ Cefotaxime は、PCase に対して安定であり、*P. vulgaris* の産生する CSase に対しても、用いた抗生物質中で最も安定であった。
- 6) Cefotaxime の生体内抗菌力は Cefazolin, Cefotiam よりも優れていた。

Cefotaxime(HR 756, CTX), Sodium 7-[2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]cephalosporinate は西ドイツ Hoechst 社とフランス Roussel Uclaf 社によって合成された新しいセファロスポリン誘導体である。このセファロスポリンは、グラム陽性菌、グラム陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトラムを示すとともに、これらの菌群に対して強い抗菌活性を示すこと^{1,2,3)}、およびこれらの細菌の産生する β -lactamase に対して強い抵抗性があることが報告されている⁴⁾。

この論文では、臨床分離株に対する抗菌力、殺菌作用、 β -lactamase に対する安定性およびマウス感染治療効果に関してすぐれた抗菌活性を認めたので以下にその成績を報告する。

I. 実験材料および方法

1) 使用薬

CTX はヘキストジャパン社、日本ルセル社より提供された粉末を用いた。Cefoxitin (CFX), Cefuroxime (CXM) と Cefotiam (CTM) はそれぞれ第一製薬、新日本実業および武田薬品から分与を受け、その他 Cefazolin (CEZ), Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET), Cephalixin (CEX), Carbenicillin (CBPC), Penicillin G (PCG), Gentamicin (GM) と Kanamycin (KM) は市販品を用いた。なお各薬剤は、使用前に溶解させ使用した。

2) 使用菌株抗菌スペクトルの検討 (Table 1 に示す菌株) および臨床分離株の感受性測定には、群馬大学医学部耐性菌実験施設の stock cultures を用いた。

3) 使用培地

Minimum inhibitory concentration (MIC) の測定には、Heart infusion(HI) agar と Brain heart infusion (BHI) agar (栄研化学製), Minimum bactericidal concentration (MBC) と bactericidal activity の測定には Antibiotic medium 3 (ABM 3) (Difco 製), 酵素調製細菌の培養には Brain heart infusion (BHI) broth と Medium B を使用した。

その他ペプトン水、生菌数の測定に Bromthymol blue (BTB) agar を用いた。なお、菌液の希釈には Buffered saline gelatine (BSG) 溶液を用いた。

4) 抗菌力測定

HI agar および BHI agar を用い日本化学療法学会標準法⁵⁾ に準じた寒天平板希釈法に従った。すなわち、被検菌の前培養は、*S. pyogenes* に BHI broth, *H. influenzae* に 10 μ g/ml のヘミンと 2 μ g/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 添加 BHI broth, *Pseudomonas* spp. に 0.3% KNO₃ 添加ペプトン水を用い、残りの菌はペプトン水を使用し、37°C over night 培養した。次にこれらの菌液を BSG 溶液で約 10⁶ cells/ml に希釈後、この菌懸濁液を薬物添加培地に Inoculum replicating apparatus (佐久間鶴東京) を用いて 0.005 ml 接種した。なおこの plate の培地は、*S. pyogenes* に BHI agar, *H. influenzae* にヘミンと NAD 添加 BHI agar, その他 HI agar を使用した。

5) 殺菌力測定

試験菌を ABM 3 broth を用い 37°C over night 培養後、薬物添加培地に最終細菌濃度 10⁴ cells/ml とな

るように接種し、37°C 18時間培養後、外觀上発育のみられなかった薬物濃度を MIC とした。さらにこれらの培地からそれぞれ 0.005 ml づつとり、BTB plate に接種し、37°C 18時間培養後、コロニーのまったく認められない培地濃度を MBC とした。

別の殺菌作用測定としては、試験菌を ABM 3 で 37°C over night 培養後、新しい培地に接種し、振盪培養した。菌数が 10^6 cells/ml になったとき薬物を添加し、経時的に生菌数を計測した。

6) MIC, MBC におよぼす接種菌量の影響

被検菌を ABM 3 で 37°C over night 培養後、10倍希釈系の菌懸濁液を調製し、それぞれを2倍希釈系の薬物添加培地に接種して MIC, MBC を求めた。

7) β -lactamase の調製

penicillinase (PCase) 産生株として、*E. coli* W 3630 (Rms 212⁺)^{6,7)}, *E. coli* W 3630 (Rms 213⁺), *P. aeruginosa* ML 4259 (Rms 139⁺)^{6,7)} と *K. pneumoniae* GN 69⁹⁾ を使用した。cephalosporinase (CSase) 産生株として、*E. coli* GN 5482, *P. aeruginosa* GN 918, *P. vulgaris* GN 76, *E. cloacae* GN 7471, *C. freundii* GN 346 と *P.morganii* GN 5406 を使用した。BHI broth で前培養し、Medium B に接種後振盪培養した。PCase 産生株は、5時間培養した。CSase 産生株は、3時間培養後 inducer として PCG を添加後2時間培養した。それぞれの培養液を冷却下遠心を行ない集菌後、0.05 M リン酸緩衝液で2回洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した。この菌液を超音波破碎後、9000 ×g 30分間遠心し、その上清を酵素液とした。またタンパクは LOWRY 法⁹⁾ により測定した。

8) β -lactamase の活性測定

β -lactamase 活性の測定は spectrophotometric 法^{10,11)} で行なった。酵素で加水分解された CTX の分解物は 264 nm に吸収を示し、基質の減少を記録した。PCase と CSase の活性は、基質として PCG と CER を用いたときの mg タンパク当りの活性で表わし、substrate specificity は、基質とした PCG, CER の加水分解速度を 100 とした時、他の薬剤との相対加水分解速度で表わした。

9) マウス感染治療実験

ICR®-JCL 雄マウス体重 18~20 g, 1薬剤濃度当り1群 20匹を使用した。試験菌には、*E. coli* ML 4707 1.5×10^7 cells/mouse (90 LD₅₀), *K. pneumoniae* GN 6445 1.1×10^7 cells/mouse (25 LD₅₀) を用い、生理食塩液で希釈し、腹腔内感染を行なった。薬物は、感染1および4時間目に皮下投与し、感染7日後の生存率から ED₅₀値を求めた¹²⁾。

II. 実験成績

1) 抗菌スペクトラム

グラム陽性、グラム陰性菌群に対する CTX の抗菌スペクトラムを CEZ, CTM, CXM, CFX と比較し Table 1 に示した。CTX は、グラム陽性、陰性菌群に対し広い抗菌スペクトラムを有し、*E. coli*, *Salmonella* spp., *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, indole-positive *Proteus* spp., *P. aeruginosa* に対してすばらしい抗菌力を持ち、CEZ, CTM, CXM, CFX の中で最も強い化合物である。

2) 臨床分離株に対する抗菌力

最近臨床的に分離された *E. coli* 110株, *K. pneumoniae* 110株, *P. aeruginosa* 139株, *P. cepacia* 32株, *E. cloacae* 129株, *S. marcescens* 134株, *P. mirabilis* 62株, *P. vulgaris* 61株, *P.morganii* 60株, *P. rettgeri* 37株, *P. inconstans* 32株, *Salmonella* spp. 107株, *H. influenzae* 21株, *S. pyogenes* 32株, *S. aureus* 112株に対する CTX の抗菌力を検討した。Fig. 1~16 に 10^6 cells/ml, 1白金耳の接種時

Fig. 1 MIC distribution of CTX, CEZ and CFX against *S. aureus*

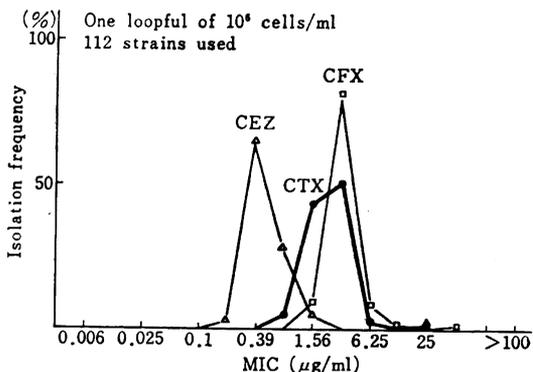


Fig. 2 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CEZ and CFX against *S. aureus*

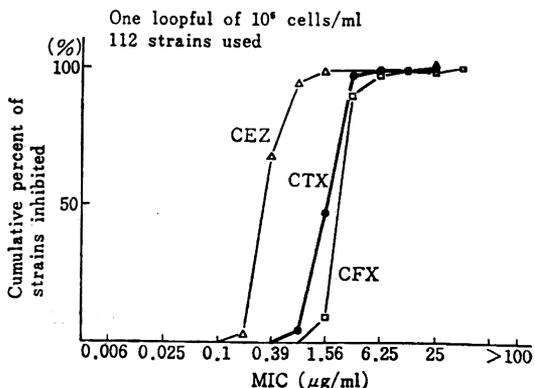
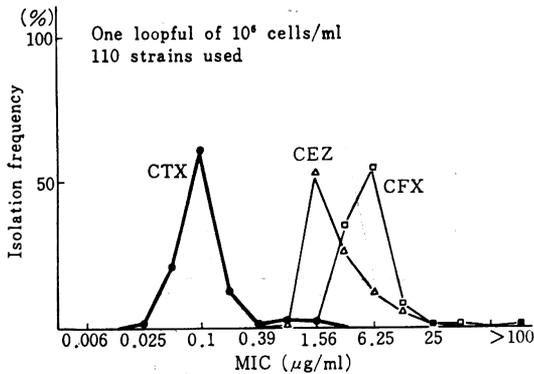


Table 1 Antibacterial spectra of CTX, CEZ, CTM, CXM and CFX against standard strains of bacteria

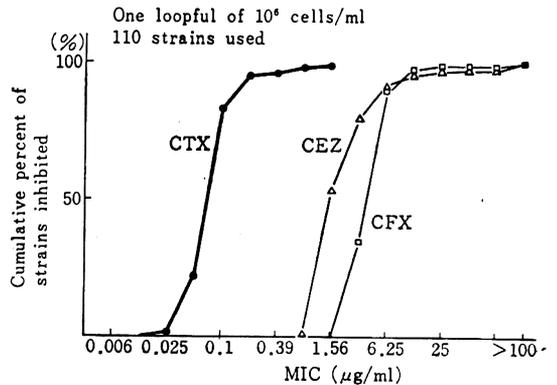
Organism ^a	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	CTX	CEZ	CTM	CXM	CFX
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	1.56	≤ 0.05	0.39	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> E-46	1.56	0.39	0.78	1.56	3.13
<i>S. aureus</i> Terajima	0.39	≤ 0.05	0.1	0.78	0.78
<i>S. aureus</i> 1200 A	0.1	0.1	0.1	0.2	1.56
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.05	1.56	0.1	6.25	6.25
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.39	1.56	0.2	0.05	3.13
<i>S. typhi</i> 901	0.025	0.78	0.05	1.56	0.78
<i>S. paratyphi</i> 1015	< 0.003	1.56	0.025	0.2	1.56
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.013	0.78	0.05	0.1	0.78
<i>S. enteritidis</i> G-14	0.025	0.78	0.05	1.56	1.56
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	> 400	0.39	6.25	> 100
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.1	50	0.78	6.25	> 100
<i>S. marcescens</i> IMA 1184	0.05	> 400	3.13	25	12.5
<i>S. marcescens</i> IID 620	0.1	> 400	3.13	12.5	6.25
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.05	200	0.78	6.25	12.5
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.013	50	0.78	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> HX-19	< 0.003	50	0.2	0.39	3.13
<i>P. morganii</i> IFO 3848	0.013	25	0.1	0.39	3.13
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.013	1.56	0.2	0.1	1.56
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	6.25	> 400	> 400	> 400	> 100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.39	> 400	25	3.13	100

^a Inoculum size, one loopful of bacterial suspension (10^6 cell/ml); Medium, HI agar

Fig. 3 MIC distribution of CTX, CEZ and CFX against *E. coli*

における各菌種の薬剤感受性分布と累積百分率, Table 2 は, 試験した菌種別に臨床分離株の 50%, 70% の株の発育を阻止するために必要な薬剤濃度 MIC_{50} , MIC_{70} を表わした。

CTX は, *S. aureus* に対して $3.13 \mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを示した。このとき CEZ, CFX は, それぞれ 0.39 , $3.13 \mu\text{g/ml}$ であった。*S. aureus* に対する CTX

Fig. 4 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CEZ and CFX against *E. coli*

は, CEZ よりも若干弱く, CFX と同じかわずかに強い抗菌活性を示した (Fig. 1, 2)。

一方, この化合物は, グラム陰性菌群に対して強い抗菌力を示した。*E. coli* に対する CTX の感受性ピークは, $0.1 \mu\text{g/ml}$ を示し, CEZ, CFX はそれぞれ 1.56 , $6.25 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 3, 4)。

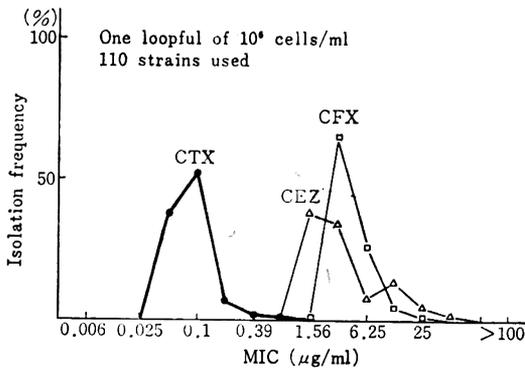
K. pneumoniae に対する CTX の感受性ピークは,

Table 2 Antibacterial activity of CTX and other antibiotics against gram-positive and gram-negative clinical isolates

Species	No. of strains	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
		MIC ₅₀					MIC ₇₀				
		CTX	CEZ	CFX	CBPC	GM	CTX	CEZ	CFX	CBPC	GM
<i>E. coli</i>	110	0.069	1.45	3.80	—	—	0.086	2.24	4.80	—	—
<i>K. pneumoniae</i>	110	0.050	2.00	2.60	—	—	0.066	3.00	3.40	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	139	10.0	>100	>100	39.0	0.88	14.0	>100	>100	50.0	1.25
<i>P. cepacia</i>	32	7.80	>100	>100	>100	92.0	9.40	>100	>100	>100	>100
<i>E. cloacae</i>	129	0.230	>100	>100	8.20	—	0.560	>100	>100	90.0	—
<i>S. marcescens</i>	134	0.360	>100	2.50	70.0	0.520	0.380	>100	>65.0	>100	0.570
<i>P. mirabilis</i>	62	0.034	1.46	1.36	—	—	0.044	1.56	1.62	—	—
<i>P. vulgaris</i>	61	0.125	>100	7.00	—	—	0.360	>100	10.2	—	—
<i>P. morgani</i>	60	0.087	>100	9.80	—	—	0.170	>100	13.8	—	—
<i>P. rettgeri</i>	37	0.032	>100	3.00	—	—	0.105	>100	8.00	—	—
<i>P. inconstans</i>	32	0.140	>100	2.50	—	—	0.280	>100	4.70	—	—
<i>Salmonella</i> spp.	107	0.080	1.20	2.00	—	—	0.120	1.50	2.80	—	—
<i>H. influenzae</i>	21	0.035	33.0	2.25	—	—	0.040	40.0	3.60	—	—
<i>S. pyogenes</i>	32	0.011	0.067	0.300	—	—	0.014	0.079	0.35	—	—
<i>S. aureus</i>	112	1.70	0.320	2.30	—	—	2.25	0.420	2.70	—	—

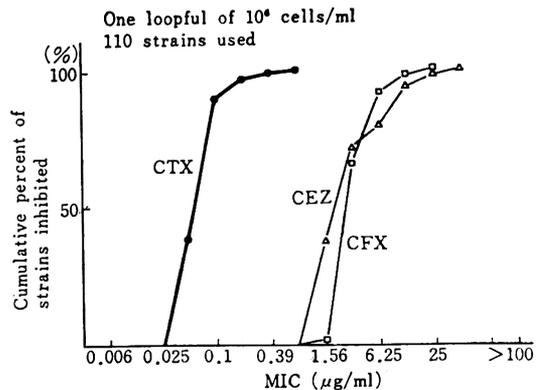
MIC₅₀ and MIC₇₀ represent the concentrations required to inhibit the growth of 50% and 70%, respectively, of the total number of strains used.

— Not tested

Fig. 5 MIC distribution of CTX, CEZ and CFX against *K. pneumoniae*

E. coli の場合と同様に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であったが, CEZ, CFX はそれぞれ 1.56, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ に認められた (Fig. 5, 6).

P. mirabilis に対する CTX の感受性ピークは, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ に示し, *E. coli*, *K. pneumoniae* のそれより低濃度であり, CEZ, CFX はそれぞれ 6.25, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ に認められた (Fig. 7, 8)。すなわち, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. と *P. mirabilis* のような一般に cephalosporin 感受性菌として報告されている細菌に対して, CTX は最も強い抗菌活性を示し,

Fig. 6 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CEZ and CFX against *K. pneumoniae*

1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* すべての菌の生育を阻止した。さらに *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* に対する CTX の MIC₇₀ 値は, それぞれ, 0.086, 0.066, 0.044 $\mu\text{g/ml}$, CEZ, CFX のそれは, それぞれ, 2.24, 3.00, 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 4.80, 3.40, 1.62 $\mu\text{g/ml}$ であった。ゆえに, CTX の抗菌力は, これらの細菌に対して, 25~60 倍強く, また *Salmonella* spp. に対して 10~25 倍以

Fig. 7 MIC distribution of CTX, CEZ and CFX against *P. mirabilis*

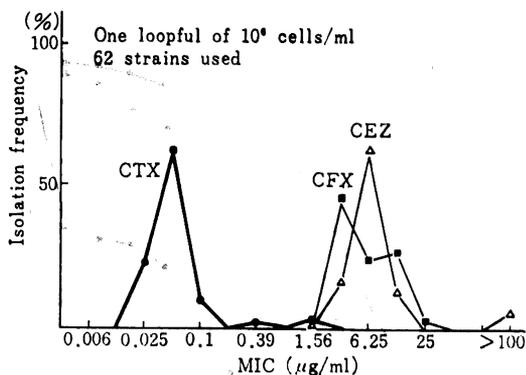


Fig. 8 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CEZ and CFX against *P. mirabilis*

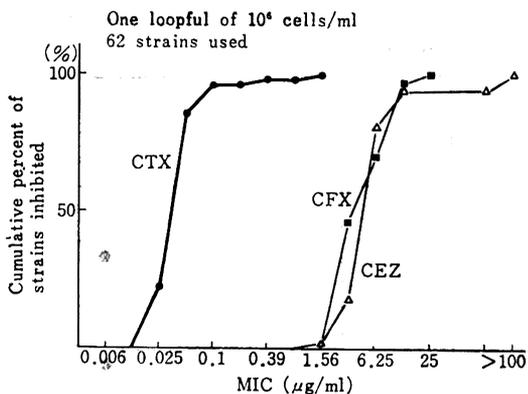
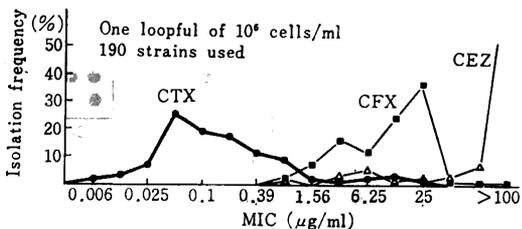


Fig. 9 MIC distribution of CTX, CEZ and CFX against indole-positive *Proteus*



上強力であった。

indole-positive *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp. は、 β -lactam 剤に耐性菌として報告されているにもかかわらず、CTX は、他の cephalosporin 感受性と同様の効果を得た。

indole-positive *Proteus* に対して、CTX は、0.05 $\mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを示し、薬物濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ にお

Fig. 10 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CEZ and CFX against indole-positive *Proteus*

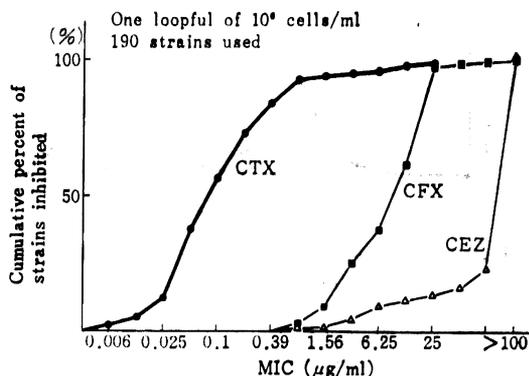


Fig. 11 MIC distribution of CTX, GM, CBPC and CEZ against *P. aeruginosa*

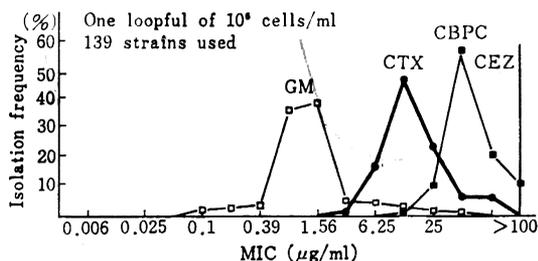
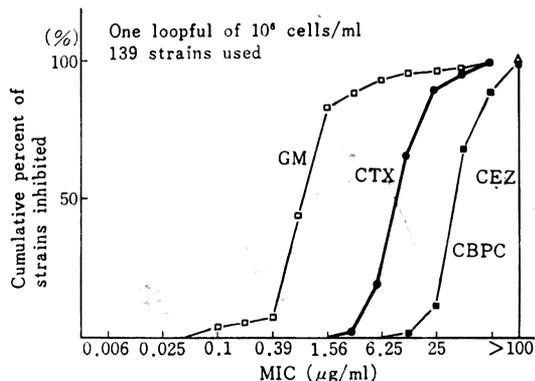


Fig. 12 Cumulative sensitivity distribution of CTX, GM, CBPC and CEZ against *P. aeruginosa*



いてすべての生育を阻止した。ゆえに、この化合物は、*P. morganii* と *P. rettgeri* に対して CFX より 100 倍以上、*P. vulgaris*, *P. inconstans* に対して 20~50 倍以上強力であった (Fig. 9, 10)。

P. aeruginosa に対する CTX の抗菌力は、感受性ピークが 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、 MIC_{50} 値は 10 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CBPC の 39 $\mu\text{g/ml}$ に比し、4 倍強力であった (Fig. 11, 12)。

Fig. 13 MIC distribution of CTX, CBPC and CEZ against *E. cloacae*

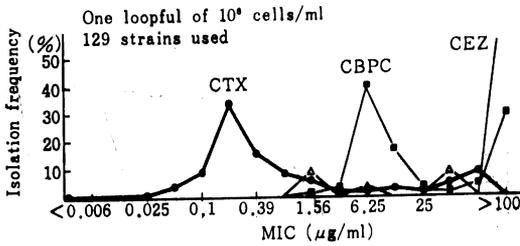


Fig. 14 Cumulative sensitivity distribution of CTX, CBPC and CEZ against *E. cloacae*

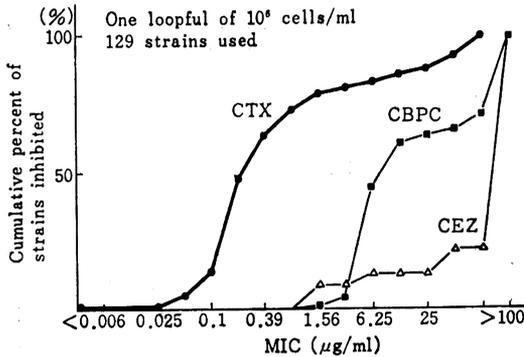


Fig. 15 MIC distribution of CTX, GM, CBPC and CEZ against *S. marcescens*

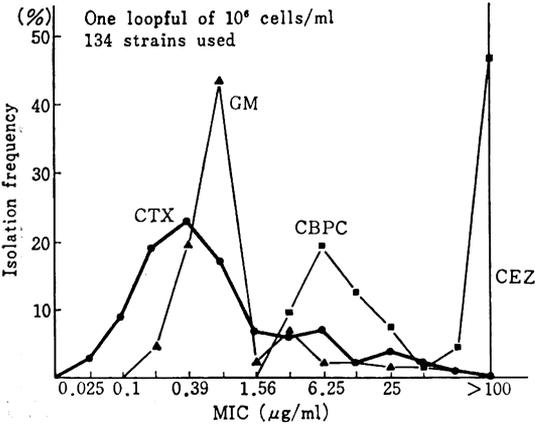


Fig. 16 Cumulative sensitivity distribution of CTX, GM, CBPC and CEZ against *S. marcescens*

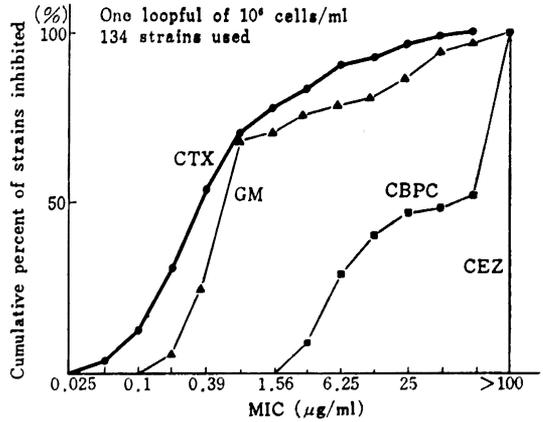
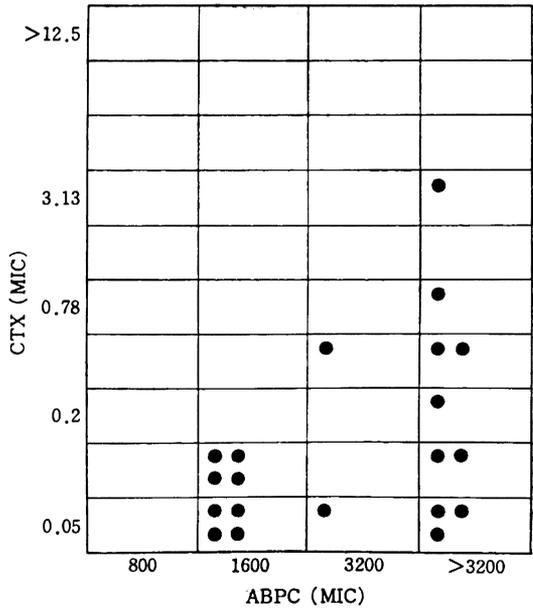


Fig. 17 Correlation of MICs between CTX, and ABPC against ABPC-resistant strains of *E. coli*



E. cloacae に対する CTX の抗菌力は、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ に感受性ピークが認められ、この化合物と CBPC の MIC_{50} 値はそれぞれ $0.23, 8.20 \mu\text{g/ml}$ であり、35 倍以上強かった (Fig. 13, 14)。

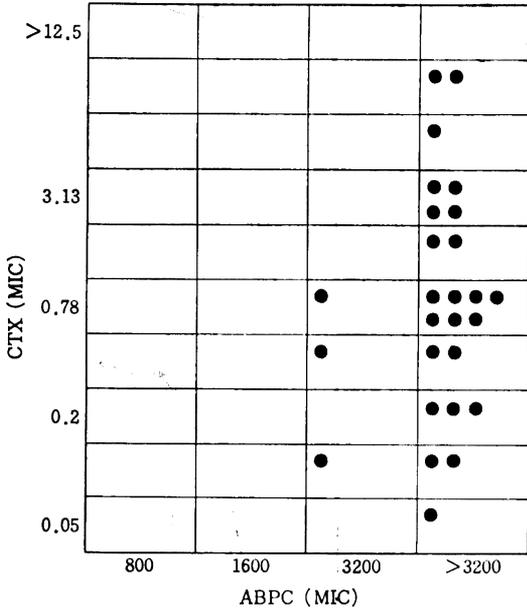
現在市販品の penicillin 系、cephalosporin 系薬剤すべてに対して耐性であり、臨床での患者から分離が増加しつつある *S. marcescens* 菌に対しても、CTX は感受性が認められ、 $0.39 \mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを示し

ており、GM のそれとほぼ同等の抗菌力であった (Fig. 15, 16)。なお *Salmonella* spp., *H. influenzae*, *S. pyogenes* に対する抗菌力は CEZ より 6~100 倍、CFX より 25~65 倍以上強力であった。

3) 耐性菌に対する抗菌力

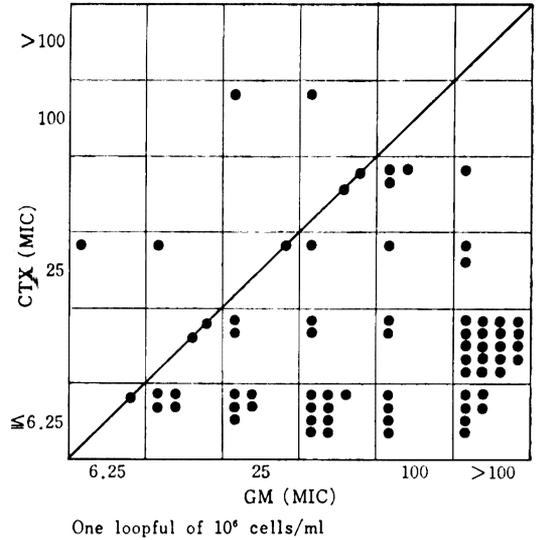
ABPC および GM 耐性菌に対する CTX の抗菌力を検討した。CTX は ABPC に高度耐性 *E. coli* ($1600 \mu\text{g/ml}$ 以上) と *S. marcescens* ($3200 \mu\text{g/ml}$ 以上) に対して強い抗菌力を示し、*E. coli* に対して $3.13 \mu\text{g/}$

Fig. 18 Correlation of MICs between CTX and ABPC against ABPC-resistant strains of *S. marcescens*



One loopful of 10^8 cells/ml

Fig. 19 Correlation of MICs between CTX and GM against GM-resistant strains of *P. aeruginosa*



One loopful of 10^8 cells/ml

Table 3 Effect of inoculum size on antibacterial activities of CTX, CEZ, CTM, and CBPC

Organism	Inoculum size (CFU)	CTX		CEZ		CTM		CBPC	
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.2×10^8	1.56	1.56	6.25	12.5	12.5	25.0		
	1.2×10^7	0.78	0.78	0.78	12.5	1.56	12.5		
	1.2×10^6	0.013	0.05	0.78	1.56	0.10	0.39		
	1.2×10^5	<0.006	<0.006	0.39	1.56	0.10	0.10		
	1.2×10^4	<0.006	<0.006	0.39	0.78	0.05	0.10		
	1.2×10^3	<0.006	<0.006	0.39	0.78	0.05	0.05		
	1.2×10^2	<0.006	<0.006	0.39	0.78	0.05	0.05		
<i>S. marcescens</i> IID 620	2.9×10^7	12.5	100					12.5	200
	2.9×10^6	6.25	25					12.5	100
	2.9×10^5	0.10	1.56					3.13	12.5
	2.9×10^4	0.05	0.39					1.56	12.5
	2.9×10^3	0.05	0.10					0.78	6.25
	2.9×10^2	0.025	0.05					0.78	1.56

Medium: ABM 3 (Difco)

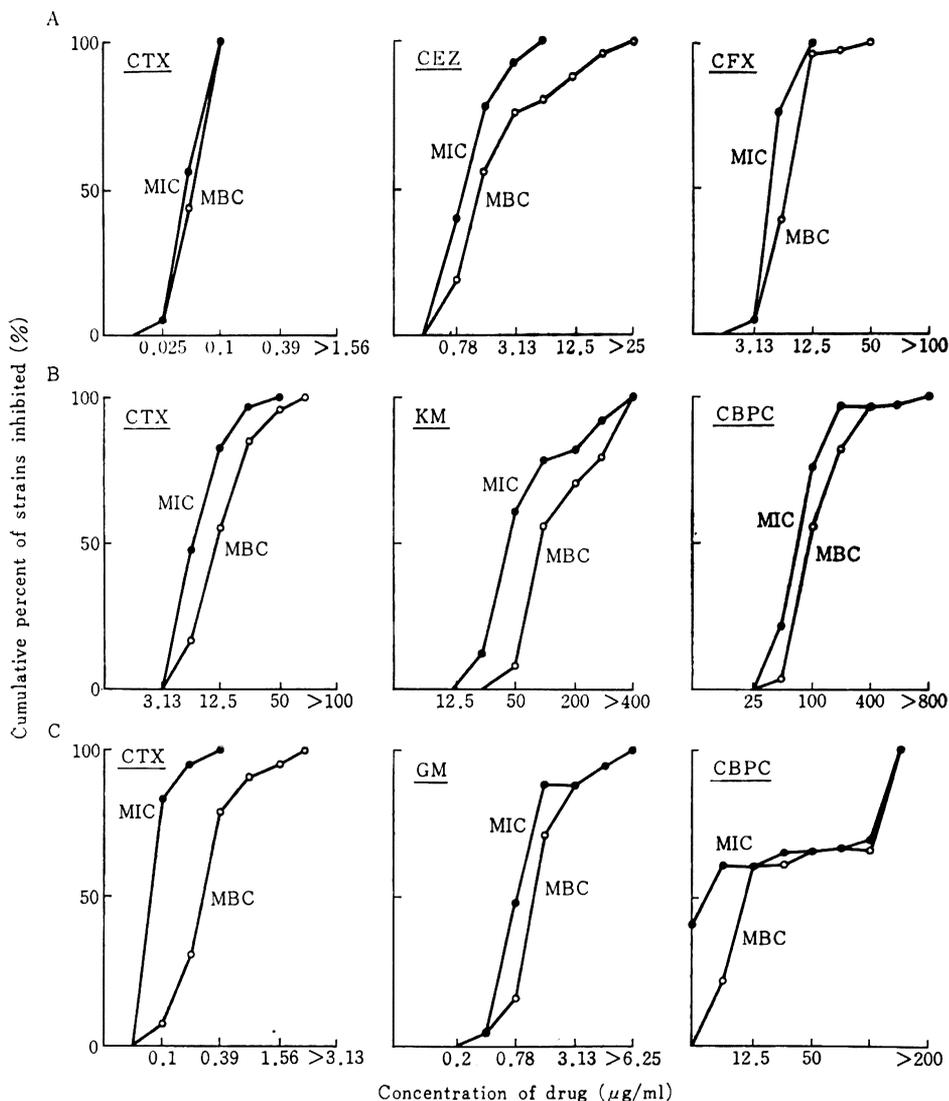
ml, *S. marcescens* に対して 25 $\mu\text{g/ml}$ の薬物濃度ですべての生育を阻止し、さらに交差耐性が認められなかった (Fig. 17, 18)。また GM 耐性菌 *P. aeruginosa* に対する CTX の感受性ピークは 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、強い抗菌力を示したが、一部耐性菌が認められた (Fig.

19)。

4) MIC と MBC の比較

CTX の MIC 値と MBC 値の比較を *E. coli* 25株, *P. aeruginosa* 23株, *S. marcescens* 25株を用いて検討した。*E. coli*, *P. aeruginosa* の両者に対して MIC

Fig. 20 Comparison of MIC and MBC values for CTX and other antibiotics: A, 25 *E. coli* strains; B, 23 *P. aeruginosa* strains; and C, 25 *S. marcescens* strains.



値と MBC 値は、CEZ, CFX, KM, CBPC の結果と同じ傾向を示したが、*S. marcescens* に対して、MIC 値が MBC 値より 4 倍高い値であった (Fig. 20)。

5) MIC 値と MBC 値に対する接種菌量の影響

抗菌力は、接種菌量の大小によって影響を受けることが報告されている^{13,14,15)}。今回接種菌量を 10^2 cells/ml ~ 10^7 cells/ml あるいは 10^8 cells/ml の 6 あるいは 7 種の異なった接種菌量における MIC 値, MBC 値の影響について、*E. coli* NIHJ JC-2 と *S. marcescens* IID 620 株を用いて検討した。両菌株とも、すべての薬物において MIC 値, MBC 値に影響が認められ、すべての薬剤で接種菌量の減少に伴って MIC 値, MBC 値が

低下した。特に CTX は、*E. coli* の 10^7 cells/ml と 10^6 cells/ml, *S. marcescens* の 10^6 cells/ml と 10^5 cells/ml の間で MIC 値, MBC 値に大きな変動を生じた (Table 3)。

6) 殺菌力

CTX は、*E. coli* ML 4707 に対して生菌数の明らかな減少を伴ない、0.05 μg/ml 以上の濃度において殺菌的に作用することが観察された。CEZ では 1.56 μg/ml, CFX では 3.13 μg/ml で認められ 20 時間培養後も再生育が認められなかった (Fig. 21)。

7) β-lactamase に対する安定性

CTX の R-mediated PCase と CSase に対する安定

Table 4 β -Lactamase hydrolysis of CTX compared with other known cephalosporins

Organism	Type of β -lactamases	Specific activity (U/mg of protein)	Relative rate of hydrolysis ^a						
			CER	CTX	CXM	CEZ	CET	CEX	PCG
<i>E. coli</i> W 3630 (Rms 212 ⁺)	PCase type I	2.10	18.2	<0.1	<0.1	7.2	7.3	<1.3	100
<i>E. coli</i> W 3630 (Rms 213 ⁺)	PCase type II	0.23	3.9	<0.1	<0.1	4.6	9.2	<2.6	100
<i>P. aeruginosa</i> MI 4259 (Rms 139 ⁺)	PCase type VI	0.66	8.6	<0.1	<0.1	<0.5	<0.5	<0.6	100
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	PCase ^b	0.97	15.1	<0.1	<0.1	2.7	2.8	<0.5	100
<i>E. coli</i> GN 5482	CSase	0.24	100	<0.1	<0.1	135	691	55.5	28.7
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	CSase	0.24	100	<0.1	<0.1	160	480	62.9	24.8
<i>P. vulgaris</i> GN 76	CSase	0.40	100	28.0	148	357	204	52.0	21.0
<i>E. cloacae</i> GN 7471	CSase	3.68	100	<0.1	<0.1	50	402	54.0	83.1
<i>C. freundii</i> GN 346	CSase	3.27	100	<0.1	<0.1	120	127	81.1	7.0
<i>P. morganii</i> GN 5406	CSase	0.14	100	<0.1	<0.1	74	242	31.0	121.0

^a Hydrolysis of each substrate by PCase and CSase is expressed as a relative rate of hydrolysis taking the absolute rate of PCG or CER hydrolysis as 100.

^b Chromosome-mediated PCase of type 1 (8).

Table 5 Chemotherapeutic effects of CTX on experimental infections in mice

Organism	Challenge dose	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit
<i>E. coli</i> ML 4707	1.5 × 10 ⁷ cells (90 LD ₅₀) in saline	CTX	0.025	2.00	1.36 ~ 2.69
		CEZ	1.56	50.1	40.7 ~ 62.4 (P < 0.05)
		CTM	0.05	20.6	16.5 ~ 25.8
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	1.1 × 10 ⁷ cells (25 LD ₅₀) in saline	CTX	0.025	0.56	0.43 ~ 0.75
		CEZ	1.56	14.9	10.6 ~ 20.3 (P < 0.05)
		CTM	0.10	6.31	4.75 ~ 8.69

性を PCG と 6 種の cephalosporin 剤との相対加水分解速度で表わした (Table 4)。CXM と類似の構造をもつ CTX は、R-mediated PCase と *K. pneumoniae* PCase に対して安定であった。また *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. morganii* の産生する CSase に対しても安定であった。一方、*P. vulgaris* の産生する CSase に対して、CTX が最も強い抵抗性を示し、CER の 3.5 倍、CXM, CEZ, CET, CEX よりも 2~13 倍以上安定であった。

8) マウス感染治療効果

E. coli ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445 株を用いて CTX, CEZ, CTM の生体内抗菌力を検討した。CTX は、*E. coli* に対して CEZ, CTM の 1/20, 1/10 量、*K. pneumoniae* に対して CEZ, CTM の 1/25, 1/10 量で同等の治療効果が認められた (Table 5)。

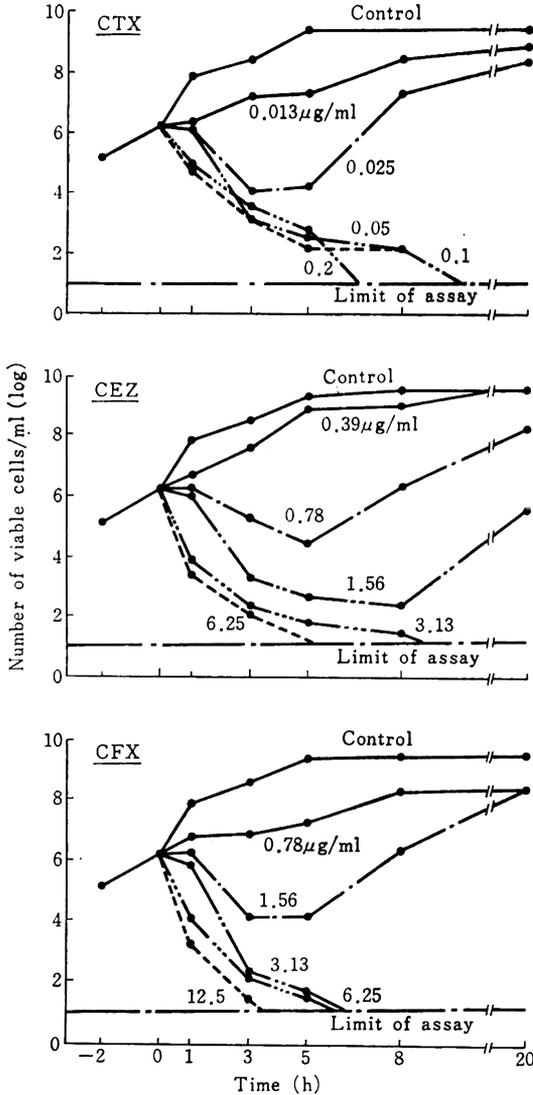
III. 考 察

今回の *in vitro* の実験では、臨床から分離されたグラム陽性、グラム陰性菌群に対して高い抗菌力を持っていること、およびマウス感染治療実験においても同様な結果が示された。そしてこの事は、当然臨床的にもよい結果が期待できることを示している。

CTX の最も興味ある特徴の 1 つは、一般に β -lactam 系抗生物質に耐性であると報告されている菌種 (indole-positive *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Pseudomonas* spp.) に対して強い抗菌力をもっていることである。また ABPC 耐性の *E. coli*, *S. marcescens* および GM 耐性の *P. aeruginosa* に対して強い抗菌力を示したことから、ペニシリン剤、アミノ糖抗生剤と交差耐性を示さないものと考えられる。この原因は、今回の実験で示したごとく、これらの細菌が産

Fig. 21 Antibacterial activity of CTX, CEZ, and CFX against *E. coli* ML 4707.

MIC values for CTX, CEZ and CFX against the strain were 0.05, 1.56 and 3.13 $\mu\text{g/ml}$, respectively.



生する β -lactamase に対して安定であることはもちろんのこと、すぐれた菌体内への浸入力あるいは、作用点との親和力が推測される。CTX の作用メカニズムについては、今後さらに検討する必要がある。

文 献

1) DRASAR, F. A.; W. FARRELL, A. J. HOWARD, C. HINCE, T. LEUNG & J. D. WILLIAMS: Activity of HR 756 against *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* and gram-negative rods. *J. Antimicrob. Chemother.* 4: 445~450,

1978
 2) HAMILTON-MILLER, J. M. T.; W. BRUMFITT & A. V. REYNOLDS: Cefotaxime (HR 756), a new cephalosporin with exceptional broad-spectrum activity *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 4: 437~444, 1978
 3) HEYMES, R.; A. LUTZ & E. SCHRINNER: Experimental evaluation of HR 756, a new cephalosporin derivative; In *Current Chemotherapy. Proc. 10th Int. Congr. Chemother.*; 823~824, 1978
 4) FU, K. P. & H. C. NEU: Beta-lactamase stability of HR 756, a novel cephalosporin, compared to that of cefuroxime and cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 322~326, 1978
 5) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 23: 1~2, 1975
 6) MITSUHASHI, S.: Drug resistance plasmid, *Molecular and Cellular Biochemistry*, in press. 1979
 7) MITSUHASHI, S.; S. YAMAGISHI, T. SAWAI & H. KAWABE: Biochemical mechanisms of plasmid-mediated resistance; In *R factor-Drug Resistance Plasmid*; S. MITSUHASHI (ed.) Univ. of Tokyo press, Univ. Park Press, Tokyo, Baltimore and London. p. 195~254, 1975
 8) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Penicillinases of *Klebsiella pneumoniae* and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R factors. *J. Bact.* 115: 1045~1054, 1973
 9) LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBERG, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
 10) 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. *Analyt. Chem.* 54: 9~16, 1973
 11) SAMUNI, A.: A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the β -lactamase reaction. *Anal. Biochem.* 63: 17~26, 1975
 12) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol.* 92: 99~113, 1948
 13) LURIA, S. E.: A test for penicillin sensitivity and resistance in *Staphylococcus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 61: 46~51, 1964
 14) NOGUCHI, H.; M. KUBO, S. KURASHIGE & S. MITSUHASHI: Antibacterial activity of apalcillin (PC-904) against gram-negative bacilli, especially ampicillin, carbenicillin, and gentamicin-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 745~752, 1978
 15) SABATH, L. D.; C. GARNER, C. WILCOX & M.

FINLAND: Effect of inoculum and of beta-lactamase on the antistaphylococcal activity of thi-

irteen penicillins and cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 8 : 344~349, 1975

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY
AND β -LACTAMASE STABILITY OF CEFOTAXIME,
A NEW CEPHALOSPORIN

SHINJI MASUYOSHI, SUSUMU ARAI
and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine,
Gunma University, Maebashi

The present study investigated the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity and β -lactamase stability of the cefotaxime (HR 756, CTX) provided by Hoechst Japan Limited and Nippon Roussel K. K. using various strains from stock cultures of the Laboratory of Microbial Resistance, Gunma University.

The results are summarized as follows.

- (1) Cefotaxime was highly active against gram-positive and gram-negative bacteria. This compound showed potent antibacterial activity against bacteria resistant to β -lactam antibiotics.
- (2) Cefotaxime was active against ampicillin resistant *E. coli*, *S. marcescens* and gentamicin resistant *P. aeruginosa*. This compound expressed no cross-resistance between ampicillin and gentamicin
- (3) Cefotaxime displayed a much higher degree of bactericidal activity than did cefazolin and cefoxitin.
- (4) The antibacterial and bactericidal activities were influenced by the inoculum size. The concentration of cefotaxime became lower as the inoculum decreased.
- (5) Cefotaxime, like cefuroxime was stable to PCase and CSase. To CSase produced by *P. vulgaris*, this compound was most resistant of all the tested antibiotics.
- (6) Cefotaxime was more effective than cefazolin and cefotiam against infections with *E. coli* and *K. pneumoniae* in mice.