

新経口セファロスポリン剤 Cefroxadine (CGP-9000) の細菌学的評価

2. 試験管内耐性獲得試験およびマウスにおける化学療法効果

中谷林太郎・後藤延一・堀内三吉

岡村 登・千田俊雄・柴岡はるみ

東京医科歯科大学医学部微生物学教室

上田貞善・石塚 巖・佐々木美子・江戸正成

栄研環境科学研究所

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) について Cefatrizine (CFT) および Cephalexin (CEX) を参考薬剤として、試験管内耐性獲得試験、交差耐性試験、および経口投与によるマウスの感染防禦効果を検討した。*E. coli* および *S. aureus* を用い増量法による耐性獲得試験を行った結果、耐性変異はきわめて起こりにくく、またわずかな耐性上昇は他剤に対する交差耐性を伴うことが認められた。マウスの実験的感染症に対する経口治療効果の成績は、*S. aureus* および *P. mirabilis* 感染に対して顕著な効果を発揮することを示した。*E. coli* 感染に対しても優れた効果を示したが、*K. pneumoniae* に対する効果は著明ではなかった。以上の成績を前報の結果と併せて総括すると、CXD は現在わが国で使用されている CEX と同様な抗菌スペクトルを有するが、その抗菌力、特に生体内での効力の点では CEX に優ると考えられる。

新経口セファロスポリン系抗生物質 Cefroxadine (CGP-9000, CXD) の試験管内抗菌作用は、前報¹⁾に述べたように、参考薬剤として使用した経口セファロスポリン剤 Cephalexin (CEX) に比べてやや強力であり、Cefatrizine (CFT) よりは幾分弱いことが明らかである。本報では、CXD の試験管内耐性獲得およびマウスにおける経口の化学療法について実験を行い、本剤の効力に関する知見を補完する基礎的成績が得られたので報告する。

材料と方法

抗生物質：前報¹⁾と同じく CXD, CEX, および CFT を使用した。

菌株：試験管内耐性獲得試験には *Escherichia coli* NIH JC-2 および *Staphylococcus aureus* 209-P JC を使用した。化学療法実験には臨床分離株²⁾のなかから選んだ *Proteus mirabilis* 5株、*Klebsiella pneumoniae* 5株、*E. coli* 5株、および *S. aureus* 7株を用い、これらのうちから毒力の強いものを各1株ずつ選択して用いた。

培地：トリプトソイブイオン (TSB, 栄研) およびハートインフュージョン寒天培地 (栄研) を用いた。

感受性測定法：前報同様に日本化学療法学会法により MIC を測定した。

試験管内耐性獲得試験：TSB で各薬剤の2倍階段希釈系列を作製し、これらに *E. coli* および *S. aureus* の TSB 37°C, 18時間培養菌を接種し、37°Cで約24時間培養した。対照 TSB と同程度の発育を示した薬剤含有 TSB の菌をとり、その培地の薬剤濃度を中心として高低4段階の薬剤濃度の TSB および対照 TSB に移植した。この操作を35代にわたり継続した。

マウス。ICR 系4週令 (18~20g, 雌) のマウスを使用した。

毒力株の選定：菌を TSB に37°C, 一夜培養後、滅菌生理食塩液で希釈系列を作製し、これらの菌液を5%ムチン (Wilson Laboratories, 1701W) に1/10量加え攻撃用菌液とした。これらの菌液を1群10匹からなるマウスの腹腔内に0.5 ml ずつ接種し、7日間にわたり生死を観察し、致死率を求めた。この致死率から Probit 法³⁾により LD₅₀ を算出した。なお、LD₅₀ を求めた直線より LD₉₉ の推定値を求めた。

感染防禦試験：感染菌を TSB に37°C, 一夜培養後、滅菌生理食塩液で希釈し、それを5%ムチン液に1/10量加えて、約1 LD₉₉ の菌数を含むように調製した。この

Fig. 1 Patterns of development of resistance of *Escherichia coli* NIH JC-2 to Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalexin

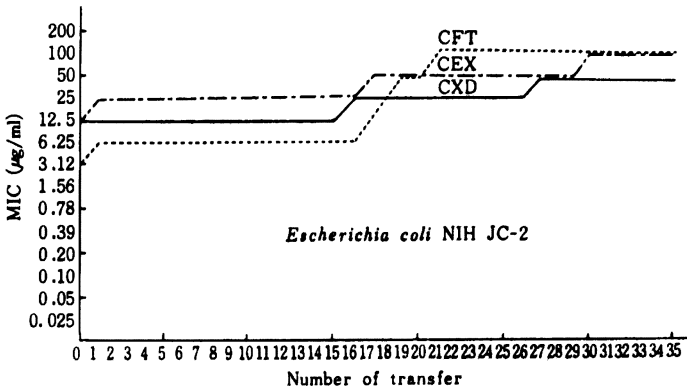
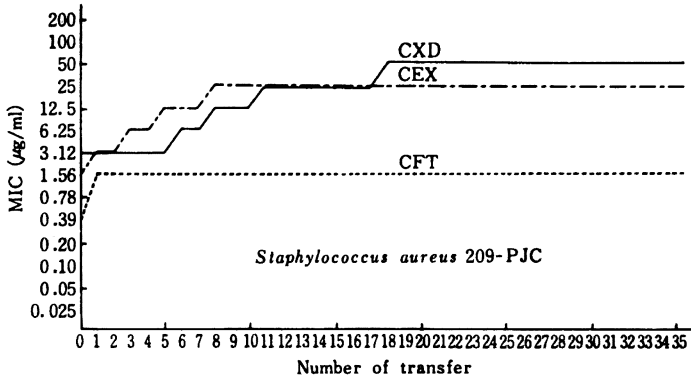


Fig. 2 Patterns of development of resistance of *Staphylococcus aureus* 209-P JC to Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalexin



菌液を 0.5 ml ずつマウスの腹腔内に接種した。感染 1 時間後に生理食塩液で種々の濃度に調製した各薬剤液 (0.2 ml) を経口投与し、経日的にマウスの生死を 7 日間にわたり観察した。マウスは 1 薬剤 1 濃度につき 1 群 10 匹を用い、各薬剤につき計 6 群、対照として菌液のみの接種群 10 匹を供試した。マウスの生残率から Probit 法²⁾により ED₅₀ (mg/kg) およびその 95% 信頼限界値を求めた。

結 果

試験管内耐性獲得：*E. coli* NIH JC-2 は CFT に最も耐性 (MIC=100 µg/ml) を獲得し、ついで CEX、

CXD の順であった (Fig. 1)。*S. aureus* 209-P JC では CXD および CEX に対してほぼ同様の推移で耐性 (MIC=25~50 µg/ml) を獲得したが、CFT に対しては耐性獲得が認められなかった (Fig. 2)。

交差耐性：前記の *E. coli* および *S. aureus* の 3 剤それぞれに対する耐性獲得試験の実施中、移植 5 代目ごとに 35 代目までの菌を保存しておき、それらの菌の 3 剤に対する MIC を測定し、交差耐性の有無を調べた (Table 1, 2, 3)。

CXD 系列由来 *E. coli* は、CXD に対して 15 代目以後 MIC が 2 倍上昇したが、それとほぼ同時期に CFT および CEX にも 2 倍上昇した (Table 1)。なお CEX

Table 1 Cross resistance among Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalexin of the organisms isolated after transfer through CXD-containing broth

Strain	Transfer	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		CXD		CFT ^a		CEX ^b	
		10 ⁸ ^c	10 ⁶ ^c	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0	6.25	3.12	1.56	1.56	6.25	6.25
	5 th	6.25	3.12	1.56	1.56	6.25	6.25
	10 th	6.25	3.12	1.56	1.56	12.5	6.25
	15 th	12.5	6.25	3.12	1.56	12.5	12.5
	20 th	12.5	6.25	3.12	1.56	12.5	12.5
	25 th	12.5	6.25	3.12	1.56	12.5	12.5
	30 th	12.5	6.25	3.12	1.56	25	12.5
	35 th	12.5	6.25	3.12	1.56	25	12.5
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0	0.78	0.39	0.39	0.20	0.78	0.78
	5 th	3.12	0.39	0.78	0.20	3.12	0.78
	10 th	3.12	0.39	0.78	0.20	3.12	3.12
	15 th	3.12	0.39	0.78	0.20	3.12	3.12
	20 th	50	1.56	3.12	0.39	25	3.12
	25 th	50	1.56	3.12	0.39	25	3.12
	30 th	50	1.56	3.12	0.39	25	3.12
	35 th	50	1.56	3.12	0.39	25	3.12

^a CFT : Cefatrizine (Banyu seiyaku).^b CEX : Cephalexin (Takeda yakuhin-kogyo).^c Inoculum size per ml.

Table 2 Cross resistance among Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalexin of the organisms isolated after transfer through Cefatrizine-containing broth

Strain	Transfer	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		CXD		CFT ^a		CEX ^b	
		10 ⁸ ^c	10 ⁶ ^c	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0	6.25	3.12	1.56	1.56	6.25	6.25
	5 th	6.25	3.12	1.56	1.56	6.25	6.25
	10 th	6.25	3.12	3.12	1.56	6.25	6.25
	15 th	6.25	6.25	3.12	1.56	6.25	6.25
	20 th	6.25	6.25	3.12	1.56	6.25	6.25
	25 th	6.25	6.25	3.12	1.56	12.5	6.25
	30 th	6.25	6.25	6.25	1.56	25	6.25
	35 th	6.25	6.25	400	1.56	400	6.25
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78
	5 th	1.56	0.78	1.56	0.39	1.56	0.78
	10 th	6.25	3.12	1.56	0.39	3.12	3.12
	15 th	6.25	3.12	1.56	0.39	6.25	3.12
	20 th	6.25	3.12	1.56	0.39	6.25	3.12
	25 th	25	3.12	1.56	0.78	25	6.25
	30 th	25	3.12	1.56	0.78	50	6.25
	35 th	25	3.12	1.56	0.78	100	6.25

^a CFT : Cefatrizine.^b CEX : Cephalexin.^c Inoculum size per ml.

Table 3 Cross resistance among Cefroxadine (CXD), Cefatrizine (CFT) and Cephalexin (CEX) of the organisms isolated after transfer through Cephalexin-containing broth

Strain	Transfer	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		CXD		CFT		CEX	
		10^8 ^a	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0	6.25	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25
	5 th	6.25	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25
	10 th	12.5	3.12	3.12	3.12	25	12.5
	15 th	12.5	3.12	3.12	3.12	25	12.5
	20 th	12.5	3.12	3.12	3.12	25	12.5
	25 th	25	6.25	3.12	3.12	25	25
	30 th	25	6.25	3.12	3.12	25	25
	35 th	25	6.25	3.12	3.12	25	25
<i>S. aureus</i> 209P JC	0	0.78	0.39	0.39	0.20	0.78	0.78
	5 th	6.25	0.78	1.56	0.20	6.25	1.56
	10 th	6.25	0.78	1.56	0.20	12.5	1.56
	15 th	6.25	0.78	1.56	0.20	25	1.56
	20 th	6.25	1.56	1.56	0.39	25	6.25
	25 th	6.25	1.56	1.56	0.39	25	6.25
	30 th	6.25	1.56	1.56	0.39	25	6.25
	35 th	12.5	3.12	1.56	0.39	25	6.25

^a Inoculum size per ml.

に対しては30代以後4倍に上昇した。以上のようにCXDによる*E. coli*耐性菌の選択では耐性上昇度はきわめてわずかであったが、上昇した場合には他の2薬剤にも交差耐性が認められた。一方、*S. aureus*では、5代以後および20代以後 $10^8/\text{ml}$ 接種時のMICがそれぞれ4倍および16倍に上昇を示した(Table 1)。これらの場合も他の2剤に対するMICもほぼ平行して上昇した。しかし、 $10^6/\text{ml}$ 接種によるMICからみると、耐性はきわめてわずかに上昇したにすぎなかった。

CFT系列の*E. coli*ではCXDとの交差耐性は認められなかったが、CEXとの間では $10^8/\text{ml}$ 接種時にもみ交差耐性が認められた(Table 2)。同系列由来の*S. aureus*ではCXDおよびCEXとの交差耐性がみられた。

CEX系列由来の*E. coli*および*S. aureus*ではCXDおよびCFTとの交差耐性が認められた。

以上の結果を総合すると、薬剤増量法による試験管内耐性獲得試験では、いずれの試験薬剤に対しても高度耐性菌の発生は起こりにくいことは明らかで、低いレベルの耐性菌が選択された場合には他剤と交差耐性を示す傾向が認められた。

毒力株の選択：*P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, および

*E. coli*のそれぞれ5株、および*S. aureus*7株を5%ムチン液に浮遊させ、腹腔内に接種して各株のLD₅₀を求めた。その結果Table 4に示す4株が各菌種のなかで最も毒力の強い菌株として選択され、これらの菌株のLD₉₉推定値(Table 4)は化学療法実験に充分使用可能な値であると認められたので、以後の実験に供試することとした。

攻撃用菌株の薬剤感受性値：化学療法実験に用いた4株の感染菌に対するCXD, CFT, およびCEXのMICはTable 5に示すとおりで、いずれも感受性菌と認められた。

感染防禦効果：上記4株の5%ムチン浮遊液(約1LD₉₉/0.5 ml)を腹腔内に接種されたマウスに、感染1時間後、CXD, CFT, およびCEXの希釈液をそれぞれ経口的に投与してED₅₀(mg/kg)を求めた(Table 6)。ED₅₀は*P. mirabilis*に対してはCFTが最も小さく、ついでCXD, CEXの順に値が大きくなった。*K. pneumoniae*に対してはCFT<CEX<CXD、*E. coli*に対してはCXD<CFT<CEX、*S. aureus*に対してはCFT<CXD<CEXの順に大きくなっていることを認めた。ED₅₀とその信頼限界値(95%)に基づいて各薬剤間の防禦効果を各攻撃菌ごとに比較すると次のとおりにな

Table 4 Virulence of infecting organisms

Infecting organism	LD ₅₀ ^a	LD ₉₉ ^b
<i>Proteus mirabilis</i> 32	8.5 × 10 ⁴ (2.2 × 10 ⁴ ≤ LD ₉₅ ≤ 3.0 × 10 ⁵) ^c	1.3 × 10 ⁷
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 28	7.3 × 10 ⁴ (2.7 × 10 ⁴ ≤ LD ₉₅ ≤ 2.0 × 10 ⁵)	5.7 × 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> 32	1.6 × 10 ⁵ (5.0 × 10 ⁴ ≤ LD ₉₅ ≤ 5.0 × 10 ⁵)	3.8 × 10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	2.1 × 10 ⁶ (1.1 × 10 ⁶ ≤ LD ₉₅ ≤ 4.0 × 10 ⁶)	2.2 × 10 ⁷

^a 50% Lethal dose (number of viable cells per mouse) calculated by probit analysis from experimental data.

^b Estimated by probit analysis.

^c 95% Confidence limits of LD₅₀.

Table 5 Minimum inhibitory concentration of Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalixin against infecting organisms used for experimental infection of mice ^a

Organism	MIC (μg/ml)					
	CXD		CFT		CEX	
	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>Proteus mirabilis</i> 32	6.25	6.25	1.56	1.56	6.25	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 28	6.25	3.12	3.12	1.56	12.5	6.25
<i>Escherichia coli</i> 32	6.25	6.25	3.12	3.12	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	6.25	1.56	1.56	0.78	6.25	3.12

^a Heart infusion Agar, 37°C 18h.

Inoculum size ; 10⁸/ml and 10⁶/ml (Tryptosoy broth).

Table 6 Chemotherapeutic activity of Cefroxadine, Cefatrizine and Cephalixin against infections of Gram-negative and Gram-positive bacteria in female ICR mice ^a

Infecting organism	Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/kg) ^b		
		CXD	CFT	CEX
<i>Proteus mirabilis</i> 32	1.0 × 10 ⁷	8.8 (4.9~16) ^c	0.69 (0.51~0.96)	62 (34~110)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 28	4.7 × 10 ⁷	510 (83~3,100)	38 (16~91)	230 (110~470)
<i>Escherichia coli</i> 32	7.0 × 10 ⁷	91 (34~180)	130 (63~250)	400 (190~870)
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	3.3 × 10 ⁷	1.2 (0.72~2.1)	0.70 (0.39~1.3)	4.1 (2.6~6.4)

^a Infection : i.p. challenge with 5% mucin suspension of the organisms.

Administration of the drugs : p.o.

^b Calculated by probit analysis.

^c 95% Confidence limits of ED₅₀.

る。

P. mirabilis 32 : CFT > CXD > CEX ; 各薬剤間に有意差が認められた。ED₅₀の相対値は、CXDを1.0として上の順にならべると(以下も同様)、0.78 : 1.0 : 71。

K. pneumoniae 28 : CFT > CEX, CFT ≥ CXD, CEX = CXD ; 各薬剤間に有意差は認められなかった。ED₅₀の相対値 = 0.075 : 1.0 : 0.45。

E. coli 32 : CXD ≥ CFT, CFT ≥ CEX, CXD > CEX ; CXDはCEXより効果が大きであったが、CFTとの間には有意差が認められなかった。CFTとCEX間にも有意差は認められなかった。ED₅₀の相対値 = 1.4 : 1.0 : 4.4。

S. aureus 76 : CFT ≥ CXD > CEX ; CFTとCXDの間には有意差が認められなかったが、これら2剤はCEXより効果が大きであった。ED₅₀の相対値 = 0.58 : 1.0 : 3.4。

以上の結果を要約すると、*K. pneumoniae*感染を除いて、CXDの防禦効果はCEXよりは優れ、CFTと比べればやや弱いかほぼ同等とみなすことができる。

考 察

薬剤増量法により *E. coli* および *S. aureus* の CXD および参考薬剤 CFT と CEX に対する試験管内耐性獲得試験を試みた。CXD 加ブイオン中で *E. coli* を35回継代したが、耐性上昇はほとんどみられなかった。*S. aureus* では原株の16倍濃度の CXD 存在下でも発育し、一見耐性が上昇したかにみえたが、平板培地で MIC を測定したところ耐性上昇度は2倍にすぎないことが判明した。他の2薬剤についてもほぼ同様で、いずれの薬剤に対しても耐性変異はきわめて起こりにくく、ペニシリン型耐性上昇を示すことが認められた。なお、CXD に対するわずかな耐性上昇は、CFT および CEX に対する交差耐性を伴っていた。ほぼ同様な傾向が CFT や CEX を選択薬剤に用いた場合にもみられた。

経口投与による CXD の化学療法効果をマウスを用いた他の経口セファロsporin 剤と比較検討した。その結果、CXD の感染防禦効果は CEX より優れ、CFT と比べればやや弱いかほぼ同等とみなされる成績が得られた。このことは ZAK^らの知見を確認したものといえる。前報¹⁾の試験管内抗菌作用に関する実験成績では、CXD の抗菌力は CEX と CFT の中間に位することが示されたが、溶菌作用および増殖遅滞作用は CEX より明らかに強力であることが示された。マウスの感染に対する防禦効果と各薬剤の攻撃菌株に対する MIC

(Table 4) とはほぼ平行する傾向がみられたが、なかには MIC が等しくても防禦効果に有意差のある場合もみられた。すなわち、*P. mirabilis* 感染の場合の CXD と CEX、*K. pneumoniae* 感染における3剤の場合である。以上のことは CXD の生体内での抗菌力は、MIC よりむしろ溶菌作用や増殖遅滞作用によってよく表現されていると考えることができよう。その意味で CXD の臨床的効果が期待できる。

以上前報および本報で述べた成績を総合すると、現在国内で使用されている経口セファロsporin 剤 CEX に比べると、CXD は抗菌スペクトルの点では類似しているが、抗菌力、特に生体内での抗菌力が優れていると結論できよう。

謝 辞

薬剤および種々の便宜を提供くださった日本チバガイギー株式会社、薬剤を提供くださった武田薬品工業、万有製薬、およびムチンを分与くださった国立予防衛生研究所山田千昌博士に対し感謝します。

文 献

- 1) 中谷林太郎, 後藤延一, 堀内三吉, 岡村 登, 千田俊雄, 柴岡はるみ, 上田貞 著, 石塚 巖, 佐々木美子, 池戸正成: 経口セファロsporin 剤 Cefroxadine (CGP-9000) の細菌学的評価。1. 試験管内抗菌作用。Chemotherapy 28(S-3): 11~26, 1980
- 2) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 3) ZAK, O.; W. A. VISCHER, C. SCHENK, W. TOSCH, W. ZIMMERMANN, J. REGÖS, E. R. SUTER, F. KRADOLFER & J. GELZER: CGP-9000: A new orally active, broad-spectrum cephalosporin. J. Antibiotics 29: 653~655, 1976
- 4) VISCHER, W. A.; O. ZAK, E. A. KONOPKA, H. FEHLMANN, J. REGÖS & W. TOSCH: Experimental evaluation of CGP-9000, a new orally active cephalosporin. Current chemotherapy. Proc. of the 10th Internat. Congr. of Chemother., Zurich/Switzerland, 18~23 Sept. 1977. Ed. W. Siegenthaler, R. Luethy, Vol. II. Washington, D.C., Amer. Soc. f. Microbiol. 825~827, 1978
- 5) ZAK, O.; W. TOSCH, W. A. VISCHER & F. KRADOLFER: Comparative experimental studies on 3-methoxy and 3-methylcephems. Drugs Exptl. Clin. Res. 3: 11~20, 1977

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF CEFROXADINE
(CGP-9000), A NEW ORAL CEPHALOSPORIN : *IN VITRO*
DEVELOPMENT OF RESISTANCE AND *IN VIVO*
ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

RINTARO NAKAYA, NOBUICHI GOTO, SANKICHI HORIUCHI
NOBORU OKAMURA, TOSHIO CHIDA and HARUMI SHIBAOKA

Department of Microbiology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine

SADAYOSHI UEDA, IWAO ISHIZUKA, YOSHIKO SASAKI and MASANARI IKEDO
Institute of Environmental Sciences, Eiken Chemical, Ltd.

Cefroxadine (CGP-9000, CXD), a new orally active, broad-spectrum cephalosporin, was compared with cephalixin (CEX) and cefatrizine (CFT) in the capacity to develop resistant organisms *in vitro*. A series of transfers of *E. coli* and *S. aureus* strains through medium containing cefroxadine did not lead to development of significant level of resistance. Similar effects were observed with other drugs. The oral protective effects of cefroxadine in mice infected with *S. aureus*, *P. mirabilis* and *E. coli* were far more potent than those of CEX, but approximately equivalent to those of CFT. It was concluded that cefroxadine is consistently more active than CEX, but is slightly less potent than CFT.