

Cefroxadine (CGP-9000) の抗菌力その他基礎検討

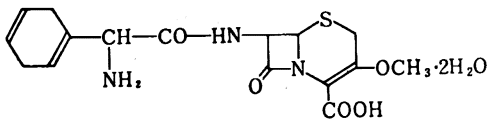
安田賢児・倉茂達徳・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) は新しい経口用セファロsporinである。Cefroxadine は Cephalexin (CEX) と同じ抗菌スペクトルを示した。グラム陽性菌, グラム陰性菌において2倍あるいは同程度の抗菌力を示した。精確な抗菌作用測定による ID_{50} 値の比較では, Cefroxadine は CEX に比べ, 優れていた。接種菌量の影響を調べると, 菌量が低濃度の場合, CEX に比べ抗菌力が優れていた。Cefroxadine は MIC 濃度で殺菌的に作用した。 β -lactamase に対する安定性では, Penicillinase, Cephalosporinase, 両酵素に対して, CEX と同程度の安定性を示した。Penicillin Binding Proteins (PBPs) に対する親和性について検討してみると, 溶菌のメカニズムに関与しているといわれている *E. coli* PBPs-1A, -1Bs, -2, -3 のなかで, Cefroxadine は CEX に比べ, 特に 1A, 1Bs に親和性が強いことが判った。このことは, Cefroxadine の殺菌作用が CEX に比べて強いことの要因のひとつと考えられる。マウス実験感染症に対して Cefroxadine は, CEX より強い治療効果を示した。

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) 7 β -[D-2-Amino-2-(1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-methoxy-ceph-3-em-4-carboxylic acid はスイス CIBA-GEIGY 社で開発された新しい経口用セファロsporin系抗生物質であり, Fig. 1 に示す構造式である。比較薬剤に CEX を用いて, *in vitro* および, *in vivo* 抗菌作用について検討した。抗菌スペクトラムはグラム陽性菌およびグラム陰性菌に広く抗菌活性を示し, CEX に比べ, CXD は殺菌作用の発現が速く, 強い殺菌作用を示す点の特徴である。

Fig. 1 Chemical structure of CXD



I. 実験材料および方法

使用菌株; 各種病原由来細菌, グラム陽性, グラム陰性の標準菌株は当教室保存株を用いた。

使用薬剤; Cefroxadine (CXD) (日本チバガイギー株式会社) Cephalexin (CEX) (武田薬品工業株式会社), Cefazolin (CEZ) (藤沢薬品工業株式会社), Cephaloridine (CER) (鳥居薬品株式会社), Cephalothin (CET) (塩

野義製薬株式会社), Benzylpenicillin (PCG) (明治製菓株式会社) を用いた。

Brain heart infusion broth (BHB, 栄研), Heart infusion agar (H.I.A., 栄研), Antibiotic Medium 3 (ABM 3, DIF-CO), 1% ペプトン水 (ポリペプトン, 10 g; NaCl, 5 g, 1 ℓ 蒸留水), Medium-B (酵母エキス, 2 g; ポリペプトン, 10 g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 7g, KH_2PO_4 , 2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.2 g; グルコース, 2 g; $MgSO_4$, 0.4 g) 1 ℓ 蒸留水を用いた。

MIC; 日本化学療法学会標準法¹⁾に従った寒天平板積法によった。すなわち各薬剤を含む HIA 培地に 1% ペプトン水 37 $^{\circ}C$, 18時間培養菌液の100倍希釈した菌液の1白金耳を接種した。37 $^{\circ}C$ 18時間培養後にその最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

50% 菌発育阻止濃度 (ID_{50}); 加藤ら²⁾の方法によって, ID_{50} 値を求めた。1% ペプトン水前培養菌液を希釈して約300個の菌を種々の濃度に薬剤を含む HIA 平板に接種し, 37 $^{\circ}C$, 18時間培養後, 各平板上のコロニー数を測定した。

殺菌力測定; 殺菌効果は3通りの方法で他の薬剤と比較した。1つは増殖曲線におよぼす影響を調べたものである。ABM3にて37 $^{\circ}C$ 18時間培養液を ABM3 で 10^3 cells/ml に希釈し振盪培養を行った。振盪培養2時間後 MIC 値付近の濃度薬剤を添加し経時的に生菌数を測定した。さらに, ABM3にて37 $^{\circ}C$ 18時間培養後の培養液

Table 1 Antibacterial activity of CXD against standard strains of bacteria

Test organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}			
	CXD		CEX	
	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209PJC-1	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>S. aureus</i> E-46	3.13	6.25	6.25	12.5
<i>S. aureus</i> Terajima	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Escherichia coli</i> NIHJ-JC-2	3.13	6.25	12.5	12.5
<i>Salmonella typhi</i> 901	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>S. paratyphi</i> 1015	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Serratia marcescens</i> IAMI 184	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	>100	>100	>100
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	>100	>100	>100	>100
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	6.25	12.5	50	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	>100	>100	>100	>100

^{a)} One loopful of 10⁶ cells/ml or 10⁸ cells/ml was inoculated.

に薬剤を加えて、振盪培養を続け、2時間後、18時間後の生菌数を測定した。また別に最小殺菌濃度(MBC)を次の方法を用いて測定した。ABM3にて、37°C18時間培養液を希釈し、倍々希釈して得られたシリーズの薬剤を含むABM3中に最終接種菌量が約10⁴ cells/mlとなるように接種した。37°C18時間培養後生菌の有無を判定した。生菌の全くないところをもってMBCとした。

β -lactamaseに対する安定性の測定; BHBにて前培養した菌液をMedium Bにて大量培養した。6時間振盪培養後集菌し0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)にて洗浄後、同緩衝液に再懸濁し、菌体破壊、遠心後その上清を粗酵素液とした。 β -lactamase活性の測定は、U.V.法³⁾を用いて測定した。Cephalosporinase (CSase)はCERをPenicillinase (PCase)はPCGを100とした相対加水分解速度で表わした。蛋白量はLOWRY法⁴⁾を用いて測定した。

Penicillin binding Proteins (PBPs)に対する親和性; CXDの*E. coli* JE 1011のPBPsに対する親和性をSPRATTらが報告している方法⁵⁾の改良法⁶⁾を用いて調べた。CXDとCEXは¹⁴Cで標識したPenicillin GのPBPs結合に対する拮抗剤として用いた。両拮抗剤の濃度は、¹⁴C-PCG (34 $\mu\text{g/ml}$)の1, 5, 25倍を用いた。

反応終了後、可溶化した膜タンパクをSDSポリアクリルアミド平板電気泳動で分画し、フルオログラフイーによって検出した。デンシトメーターで定量化し、¹⁴C-

PCGのPBPsに対する結合の阻害率より、CXD、CEXのPBPsに対する親和性を検討した。

マウス感染防禦実験; ICR系雄マウス(5週令, 20~22g)を1薬剤濃度について1群20匹使用した*E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445を使用し、マウス腹腔内に感染させ、薬剤は経口で投与した。薬剤は感染後0, 3時間後の2回投与した。算定方法は、LITCHFIELD-WILCOXON法⁷⁾に基づき、95%信頼限界値を計算により算定した。

II. 実験結果ならびに考察

1) 標準菌株を用いての抗菌スペクトラム

CXDの抗菌スペクトラムをCEXを対照薬としてその成績をTable 1に示した。CXDの抗菌スペクトラムはCEXと同じである。グラム陽性菌、グラム陰性菌に対して、強い抗菌力を示した。

2) 臨床分離株に対する感受性分布

グラム陽性菌、陰性菌当教室保存の臨床分離株615株を用いて、CXDの抗菌力を検討した。対照薬としてCEXを用いた。*S. aureus* 90株に対するCXDの感受性分布は3.13 $\mu\text{g/ml}$ に感受性のピークがみられ、3.13 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で、CEXと同様全株の65%の株の発育を阻止した(Fig. 2)。*E. coli* 200株に対するCXDの感受性のピークは、6.25 $\mu\text{g/ml}$ にありCEXに比べ強い抗菌力を示した。6.25 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度でCXDは全株の75%の発育を阻止した。CEXのそれは10%で

Fig. 2 Antibacterial activity of CXD One loopful of 10^6 cells/ml

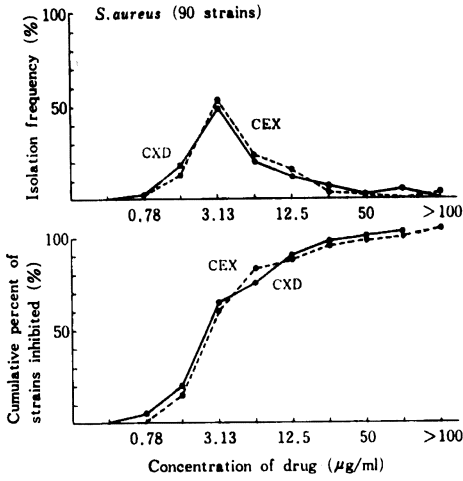


Fig. 4 Antibacterial activity of CXD One loopful of 10^6 cells/ml

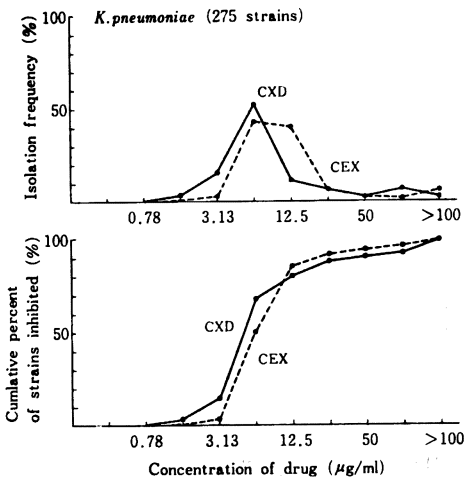


Fig. 6 Antibacterial activity of CXD against *E. coli* ML 4707

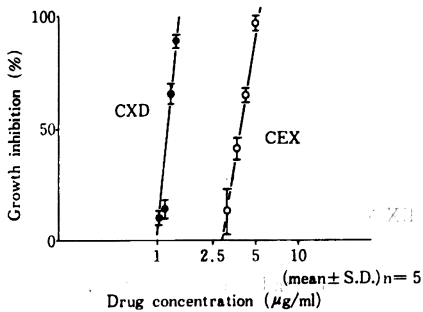


Fig. 3 Antibacterial activity of CXD One loopful of 10^6 cells/ml

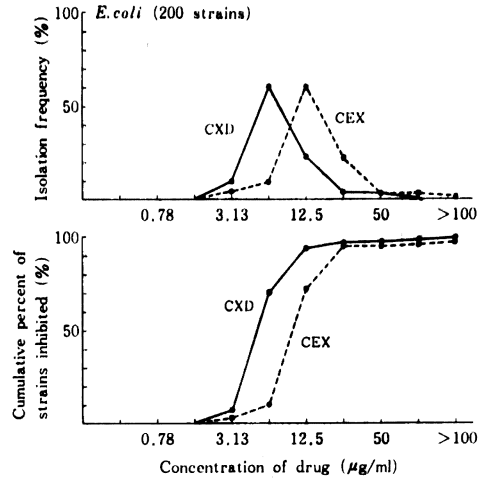


Fig. 5 Antibacterial activity of CXD One loopful of 10^6 cells/ml

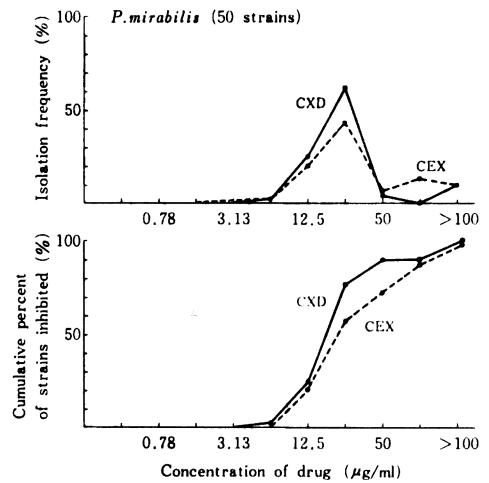


Fig. 7 Antibacterial activity of CXD against *K. pneumoniae* GN 6445

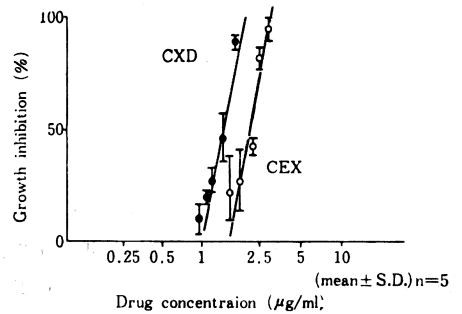


Fig. 8 Effect of inoculum-size on antibacterial activity of CXD against 100 *E. coli* strains

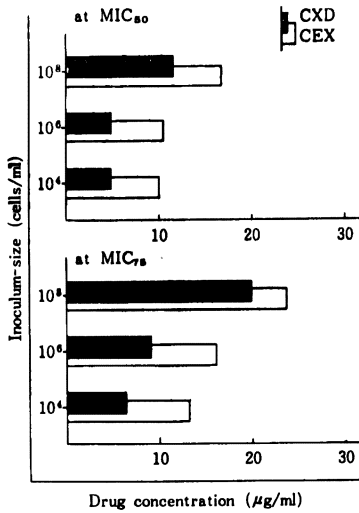


Fig. 10 Bactericidal activity of CXD and CEX against *E. coli* ML 4707

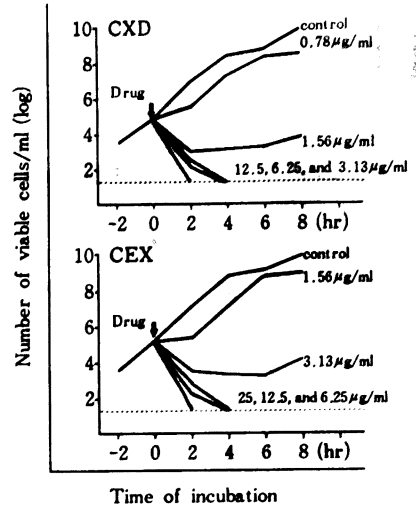
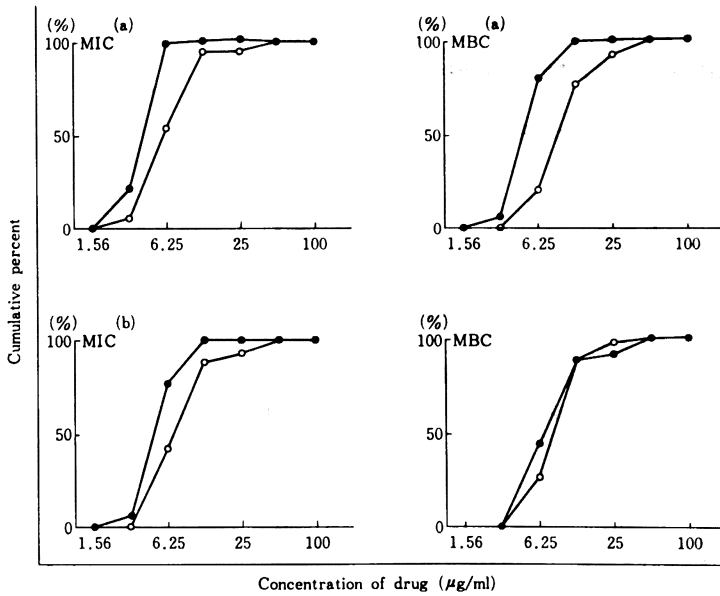


Fig. 9 MIC and MBC values of CXD (●) and CEX (○). Twenty-five strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* was used. (a), *E. coli* (b), *K. pneumoniae*



あった (Fig. 3)。 *K. pneumoniae* 275株に対する感受性分布のピークは、CXD の場合 6.25 µg/ml に CEX の場合 6.25 µg/ml と 12.5 µg/ml にみられる。 6.25 µg/ml の薬剤濃度で CXD は全株の 75% の株の発育を阻止

し、CEX は 45% の株の発育を阻止した (Fig. 4)。 *P. mirabilis* 50株に対する感受性分布のピークは、CXD、CEX、ともに 25 µg/ml である。 25 µg/ml の薬剤濃度で CXD は全株の 80% の発育を阻止し、一方 CEX は、50

Fig. 11 Bactericidal activity of CXD and CEX against *K. pneumoniae* GN 6445

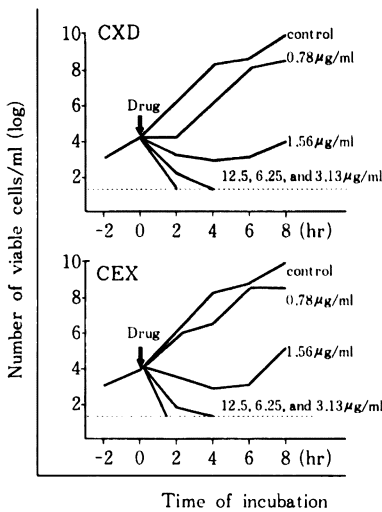


Fig. 12 Bactericidal activity of CXD and CEX against *E. coli* ML 4707

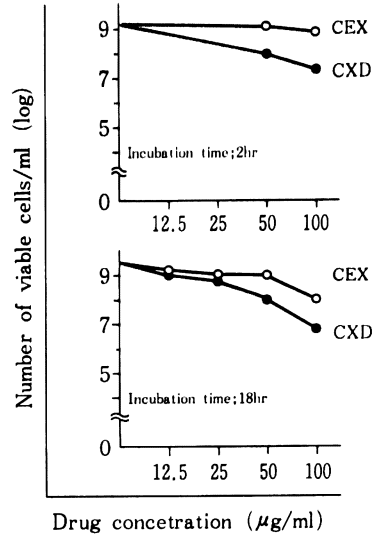


Table 2 Substrate profiles of various β -lactamases

Enzyme source	Type of β -lactamases ^{a)}	Specific activity (U/mg of protein)	Relative rate of hydrolysis					
			CER	CXD	CEX	CEZ	CET	PC-G
<i>E. coli</i> GN 5482	CSase	0.24	100	33	41	135	691	29
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	CSase	0.24	100	43	32	160	480	25
<i>E. cloacae</i> GN 7471	CSase	3.58	100	62	56	50	402	83
<i>P. Morganii</i> GN 5407	CSase	5.22	100	58	31	74	242	100
<i>P. aeruginosa</i> ML 4259 Rmsl 39+	PCase IV	0.05	9	<1	<1	1	<1	100
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	PCase	0.11	15	<1	<1	3	3	100

^{a)} PCase : penicillinase, CSase : cephalosporinase.

%の発育を阻止した (Fig. 5)。

3) 50%菌発育阻止濃度 (ID₅₀)

従来の MIC の測定と異なり、より精確な薬剤の抗菌作用を測定する目的で ID₅₀ の測定法が当教室において開発された。約200~300個の菌を種々の濃度の薬剤平板に接種し培養後、そのコロニー数を算定することにより求められる薬剤の50%菌発育阻止濃度を *E. coli*, *K. pneumoniae* を用いて検討した。測定値は、5枚の平板の平均値を用いて算出した。*E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445 の場合の CXD の ID₅₀ はおのおの 1.2 µg/ml, 1.45 µg/ml であり、CEX に比べ約1.5~4倍強い抗菌力を示した (Fig. 6, 7)。

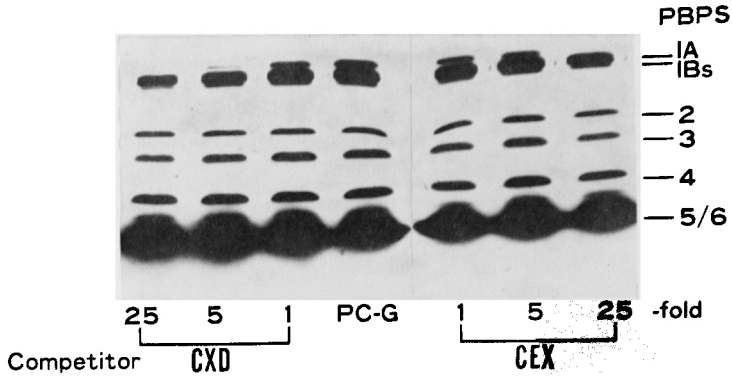
4) 抗菌力におよぼす接種菌量の影響

臨床分離 *E. coli* 100株を用いて、それらの株の50%, 75%の発育阻止するのに必要な薬剤濃度 MIC₅₀, MIC₇₅ におよぼす影響を検討した。両薬剤とも、接種菌量の影響は 10⁶ と 10⁸ cells/ml 間で認められた。また接種菌量が 10⁴, 10⁶ cells/ml の場合、MIC₅₀, MIC₇₅ おおのおおについて CEX に比べ約2倍優れていた (Fig. 8)。

5) 殺菌効果

E. coli と *K. pneumoniae* の臨床分離それぞれ25株を用いて、CXD と CEX の MICs と MBCs の値を得た (Fig. 9)。CXD は6.25 µg/ml の濃度で菌株の95%の発育を阻止し、80%の殺菌が認められた。一方、CEX

Fig. 13 Competitive inhibition of CXD for ^{14}C -PCG binding to *E. coli* PBPs



Abscissa indicates the concentration of CXD added to the reaction mixture: 1-, 5-, and 25-fold concentration of ^{14}C -labeled penicillin G (34 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ordinate indicates the *E. coli* PBPs.

は同濃度で、菌株の50%の発育を阻止し、20%の殺菌が認められた。*K. pneumoniae* の場合、発育阻止および殺菌ともに、CXD は CEX より2倍以上の効果をもっていた。*E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445, を用いて、増殖曲線におよぼす経時の変化を検討した (Fig. 10, 11)。両菌種、それぞれ、菌量 10^4 cells/ml で両薬剤とも、MIC レベルで殺菌作用が認められた。Stationary phase にある菌に対する CXD と CEX の殺菌効果を、2時間後、18時間後の生菌数より検討した (Fig. 12)。CXD は2時間後ですでに、薬剤濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、溶菌作用が発現しているが、CEX の場合は、ほとんどその作用が認められなかった。18時間後で比較すると、両薬剤とも各濃度で溶菌が認められるが、溶菌量からみると、CXD は CEX より優れていた。従って CXD は CEX に比べ、殺菌作用発現は速く、強い殺菌作用をもつと考えられる。

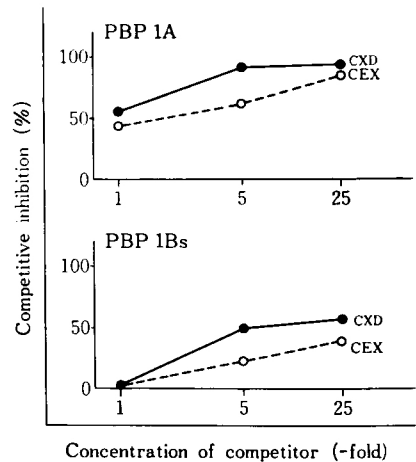
6) β -lactamase に対する安定性

β -lactamase に対する安定性について、Penicillinase (PCase) あるいは Cephalosporinase (CSase) を、産生する代表菌株6株、基質5標品で、各酵素に対する安定性を検討した (Table 2)。*P. aeruginosa* の産生する PCase⁹⁾, その他 PCase に対して CXD は CEX と同様に安定であった。また *P. aeruginosa* の産生する CSase⁹⁾, その他 CSase の場合他の薬剤, CER, CET, CEZ に比べて、安定性は CEX と同程度であった。

7) Penicillin Binding Proteins に対する親和性

E. coli の内膜には Penicillin-G 特異的に結合する7

Fig. 11 Competitive inhibition of CXD for ^{14}C -PCG binding to 1A and 1Bs at each competitor concentration was quantitor added to the reaction mixture 1-, 5-, 25-fold concentration of ^{14}C -PCG (34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



個の Proteins が知られている。これらのなかで、溶菌のメカニズムに関与していると考えられている Proteins PBP-1A, -1Bs, -2, -3, である。とりわけ PBP-1A, 1Bs, は溶菌に深く関与しているといわれている。*E. coli* の PBP-1A は、細胞壁 Peptidoglycan の Cross-linking 反応に関与しているとの報告がある⁶⁾。PBP-1A は単独

Table 3 In vivo antibacterial activity of CXD against systemic infection ^{a)}

Challenge organism	Challenge dose	Drug	MIC mcg/ml	ED ₅₀ (95% confidence limit) mg/kg
<i>E. coli</i> ML 4707	3×10 ⁷ cells (60×LD ₅₀) in saline	CXD	3.13	21.4(16.0~29.7)
		CEX	6.25	35.1(26.1~47.5) p<0.05
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	3×10 ⁷ cells (30×LD ₅₀) in saline	CXD	3.13	10.9(8.2~ 14.2)
		CEX	3.13	45.1(27.8~125.8) p<0.05

^{a)} Drug ; oral administration at 0 and 3 hours after infection. Challenge Intraperitoneal injection with a saline suspension of each organism. ED₅₀, 50% effective dose ; LD₅₀, 50% lethal dose.

でこの部分が欠如していても細胞の増殖には影響を与えないといわれ、PBP-1Bs が欠如している場合の *detour enzyme* としての機能を果たとも考えられている⁶⁾。PBP-2 は細胞の形の維持に関与しており、この部分を特異的に阻害すると、細胞は卵形の形態を示す⁹⁾¹⁰⁾。隔壁形成に関与しているといわれている PBP-3 は、阻害されると細胞の形態はフィラメント状になる⁶⁾。これらの Proteins に対する CXD と CEX の親和性を調べて、CXD と CEX の抗菌力の性質の違いを検討した。Fig. 13 は SDS 平板電気泳動で分画した *E. coli* の PBP を、X-ray film 上にフルオログラフィーによって検出したものである。Penicillin G の 1 倍、5 倍、25 倍濃度で、それぞれの阻害率を算出した (Fig. 14)。1A に対する阻害では、CXD は約 5 倍濃度で 80~90% 阻害し、CEX の場合同濃度で 60% の阻害であった。1Bs に対する阻害の場合、CXD は 5 倍濃度で 60% 阻害するのに対して CEX は同濃度で阻害は認められない。25 倍濃度で約 35% の阻害が認められた。また、PBP-2, -3, -4, -5/6 に対する親和性については CEX との間に留意すべき差は認められなかった。

8) マウス感染治療効果

CXD の ICR 系マウス実験感染症に対する治療効果を各薬剤濃度について 1 群 20 匹使用して検討した (Table 3)。マウス腹腔内に感染させ、薬剤は経口投与とし、その感染防禦効果を調べた。薬剤は *E. coli*, *K. pneumoniae* とも、感染 0 時間と 3 時間後の 2 回投与した。*E. coli* ML 4707 では CXD は CEX よりも 2 倍程度、*K. pneumoniae* GN 6445 では CXD は CEX よりも 4 倍程度すぐれていた。

文 献

1) 日本化学療法学会：最少発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23 : 1~2, 1975

- 2) KATO, T. ; S. KURASHIGE, Y. A. CHARBBERT & S. MITSUHASHI : Determination of the ID₅₀ values of antibacterial agents in agar. J. Antib. 31 : 1299~1303, 1978
- 3) O'CALLAGHAN, C. H. ; P. W. MUGGLETON & G. W. ROSS : Effects of β -lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. Antimicrob. Agents Chemother 57, 1968
- 4) LOWRY, O. H. ; N. J. ROSEBROUGHT, A. L. FARR & R. J. RANDAAL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
- 5) SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 2999~3003, 1975
- 6) TAMAKI, S. ; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI : Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding 1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 5472~5476, 1977
- 7) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92 : 99~113, 1948
- 8) SAWADA, Y. ; S. YAGINUMA, M. TAI, S. IYOBE & S. MITSUHASHI : Plasmid-mediated penicillin beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 55~60, 1976
- 9) YAGINUMA, S. ; T. SAWAI, H. ONO, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI : Biochemical properties of a cephalosporin β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpan. J. Microbiol. 17 : 141~149, 1973
- 10) SPRATT, B. G. & A. B. PARDEE : Penicillin binding proteins and cell shape in *E. coli*. Nature (London) 254 : 516~517, 1975

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFROXADINE(CGP-9000)

KENJI YASUDA, SHIGENORI KURASHIGE and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine Gunma University, Maebashi

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) is new orally active cephalosporin. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cefroxadine (CXD) and cephalexin (CEX) were compared against gram-positive and gram-negative bacteria which were isolated from clinical specimens. The results were summarized as follows :

- 1) *In vitro* antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacteria were compared using about 50~300 clinical isolates of each species of bacteria including *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis*. CXD and CEX exhibited almost similar effectiveness.
- 2) Effect of inoculum-size on antibacterial activity of CXD and CEX against clinical isolates. The *in vitro* antibacterial activity of CXD was increased when the size of the bacterial inoculum was decreased, as compared to a slight increase in that of CEX.
- 3) The 50 percent growth inhibition dose (ID_{50}) of CXD was found to be less than that of CEX.
- 4) Minimum bactericidal concentration (MBC) toward various strains of gram-negative rod bacteria was almost the same as minimum inhibitory concentration (MIC) values and was less than MBC of CEX.
- 5) CXD was stable to penicillinase (PCase) as well as CEX, but was hydrolyzed by cephalosporinase (CSase) and its relative rate of hydrolysis was similar to that of CEX.
- 6) The affinities of CXD and CEX to penicillin binding proteins (PBP) of *E. coli* were estimated by measuring the competition of unlabeled CXD and CEX with ^{14}C -penicillin G for binding to PBPs. The affinity of CXD to PBP-1Bs was especially higher than that of CEX. Therefore, it seems likely that CXD has more intensive lytic activity than that of CEX.
- 7) *In vivo* antibacterial activities of CXD and CEX were compared using the systemic infection of mice with *E. coli* and *K. pneumoniae*. The ED_{50} values (mg/kg) of CXD were consistently less than those of CEX.