

新しい経口用セファロsporin系抗生物質 Cefroxadine (CGP-9000) に関する細菌学的研究

西野武志・吉本 正・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

新しく開発された経口用 Cephalosporin 系抗生物質 Cefroxadine (CGP 9000, CXD) について、Cephalexin (CEX), Cephadrine (CED) を比較薬として細菌学的評価を行った。

CXD はグラム陽性菌群, グラム陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトラムを有しており, その抗菌力は CEX, CED とほぼ同等であった。抗菌力におよぼす諸因子の影響を検討したところ, 培地 pH, 接種菌量, 血清添加などにより CEX, CED とほぼ同様の傾向を示した。*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* を用いて増殖曲線におよぼす影響を検討したところ, CXD を高菌量に作用させた時に CEX, CED よりも非常に優れた殺菌作用を示した。薬剤除去後の再増殖も検討したが, 3者間に差は認められなかった。マウス実験の感染症に対する治療実験において CXD は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* で CEX, CED より 1.5~5 倍ほど優れた治療効果を有していた。

以上 *in vivo* において CXD は CEX, CED に比し優れた効果を有することが判明した。

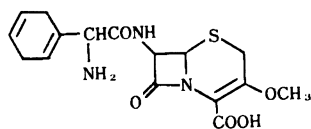
序 文

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) はスイス CIBA-GEIGY 社において開発された新しい経口用セファロsporin系抗生物質である¹⁾。化学名は 7β-[D-2-Amino-2-(1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-methoxy-ceph

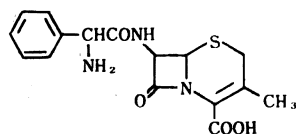
-3-em-4-carboxylic acid で, 分子式が $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 2H_2O$, 分子量が 401.43 の淡黄色の結晶性粉末で特異なおいを持ち, 水またはメタノールにやや溶けにくく, エタノールまたは塩化メチレンにほとんど溶けない。CXD の構造式は Fig. 1 に示すように Cephalexin, Cephadrine に類似しており, Cephadrine の 3位の $-CH_3$ 基を $-OCH_3$ 基に置換したものである (Fig. 1)。

本薬は他のセファロsporin系抗生物質と同様にグラム陽性菌, 陰性菌に対し広い抗菌スペクトルを有し, その作用は殺菌的である²⁾。殺菌作用, 溶菌作用および感染動物における治療効果は Cephalexin, Cephadrine よりも優れており^{3,4)}, ヒトに経口投与した場合, 速やかに高い血中濃度が得られ, 体内でほとんど分解されることなく尿中に排泄される。今回私どもは CXD の細菌学的評価を Cephalexin, Cephadrine を比較薬として検討を行ったので報告する。

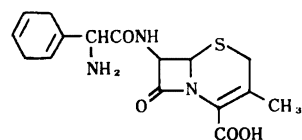
Fig. 1 Chemical structure of 3 oral cephalosporins



cefroxadine



cephalexin



cephadrine

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬

薬剤としては, CXD, Cephalexin (CEX), Cephadrine (CED) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. 抗菌スペクトラム

Table 1 Antibacterial spectrum
Gram-positive bacteria (10^8 cells/ml)

Test strain	CXD	CED	CEX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	6.25	6.25	3.13
" Smith	3.13	3.13	3.13
" Terajima	12.5	12.5	12.5
" Neumann	6.25	6.25	6.25
" E-46	3.13	6.25	3.13
" No. 80(PC-R)	12.5	12.5	6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	3.13	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.39	0.39	0.78
" Cook	0.39	0.78	1.56
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	1.56	3.13	3.13
" type II	1.56	3.13	3.13
" type III	1.56	3.13	6.25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.025	0.05
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.78	0.78	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	1.56	1.56	1.56
<i>Clostridium tetani</i>	1.56	3.13	1.56
<i>Clostridium perfringens</i>	3.13	12.5	12.5

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

教室保存のグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対する試験管内抗菌力 (MIC, $\mu\text{g/ml}$) を日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法³⁾により求めた。すなわち前培養に Tryptosoy broth (TSB; 日水) を、測定用培地には Heart infusion agar (HIA; 日水) を用い、 37°C 、20時間培養後の最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。なお *Streptococcus* 群、*Corynebacterium diphtheriae* においては10%馬血液添加 HIA を用い、*Haemophilus influenzae* においては5%消化馬血液添加 Brain heart infusion broth を用いて 37°C 、20時間培養後の MIC を、また嫌気性菌群の *Clostridium tetani*、*Clostridium perfringens* には Thioglycollate medium (TGC; 日水) を *Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis* には *Gonococcus* 培地 (GC; 栄研) を用いローソク培養を行い、いずれも 37°C 、48時間培養後の MIC を求めた。

3. 臨床分離株に対する感受性分布と感受性相関

臨床分離の *Staphylococcus aureus* 63株、*Escherichia coli* 58株、*Klebsiella pneumoniae* 42株、*Proteus mirabilis* 32株、*Proteus vulgaris* 38株、*Proteus morgani* 27株、*Proteus rettgeri* 17株、*Haemophilus influenzae*

22株について日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法にしたがって原液 (10^8 cells/ml) とその100倍希釈液 (10^6 cells/ml) とを接種し MIC を求めた。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす培地 pH、馬血清添加、接種菌量の影響について、*Staphylococcus aureus* 209-PJC、*Escherichia coli* NIH JC-2、*Klebsiella pneumoniae* NCTC 9632 を試験菌として、Heart infusion broth (HIB; 日水) を用いた液体希釈法により検討した。すなわち培地 pH の影響では、pH を5.5、6、7、8、8.5 に調整した培地中での MIC の変動を馬血清添加の影響では、馬血清を0%、10%、25%、50%に含む培地中での MIC の変動により検討した。また接種菌量の影響では培地中の菌量を $10^3 \sim 10^7$ cells/ml とした10倍希釈系列での MIC の変動により検討した。

5. 増殖曲線におよぼす影響

増殖曲線におよぼす影響を、*Staphylococcus aureus* 209-PJC、*Escherichia coli* NIH JC-2、*Klebsiella pneumoniae* NCTC 9632 を試験菌として生菌数測定により検討を行った。すなわち TSB で前培養した菌液を HIB で希釈し、 37°C で振盪培養を行い対数増殖期にする。こ

Table 2 Antibacterial spectrum
Gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)

Test strain	CXD	CED	CEX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	1.56	1.56	1.56
" Smith	1.56	1.56	1.56
" Terajima	12.5	6.25	6.25
" Neumann	3.13	3.13	3.13
" E-46	1.56	3.13	3.13
" No. 80(PC-R)	6.25	6.25	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	3.13	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.19	0.39	0.78
" Cook	0.39	0.78	0.78
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.78	1.56	3.13
" type II	1.56	3.13	3.13
" type III	1.56	3.13	6.25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.025	0.05
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.39	0.78	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.78	1.56	1.56
<i>Clostridium tetani</i>	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i>	—	—	—

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

の菌液に薬を添加し、以後経時的に生菌数測定を行った。

6. *in vitro* における薬剤除去後の再増殖実験

TSB で前培養した菌液を HIB で希釈し、 37°C で振盪培養を行い対数増殖期にする。この菌液に *Staphylococcus aureus* 209-PJC では 1, 4 MIC, *Escherichia coli* KC-14 では 1, 5 MIC, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 では 1, 10 MIC となるように薬を作用した。薬を添加後1, 2, 4 時間後に遠心で薬を除去し、薬を含まない新しい HIB に再懸濁させ、経時的に生菌数を測定した。

7. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウス実験的感染症に対する治療効果を *Staphylococcus aureus* Smith, *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を使用し検討を行った。マウスは ddY系♂, 体重 18~20 g のものを1群10匹として用いた。菌の調整は HIA 斜面培地に一夜培養後、10% Calf serum添加 HIA で懸濁し、 -80°C に凍結保存した菌液を用時融解させ用いた。この菌液を Nutrient broth (NB; 日水) で所定の菌液に希釈し、それに 6% gastric

mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) を等量混合させ、その 0.5 ml をマウス腹腔内に接種した。薬は 0.5% CMC に懸濁し、菌接種2時間後経口投与を行った。ED₅₀ は7日目の生存率より LITCHFIELD-WILCOXON 法⁹⁾ により算出した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性および陰性菌群に対する試験管内抗菌力について検討した結果を Table 1, 2, 3, 4 に示した。 10^6 cells/ml, および 10^8 cells/ml の菌液を1白金耳接種し MIC ($\mu\text{g/ml}$) を求めたもので、CXD は CEX, CED と同様グラム陽性、陰性菌群に対し幅広い菌スペクトラムを有していた。その抗菌力を他の薬剤と比較すると、グラム陽性菌群の *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* に対しては、CXD CEX, CED とともに 10^8 cells/ml 接種で 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml 接種で 1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を有していた。*Streptococcus pyogenes* に対しては CXD は 0.19~0.39 $\mu\text{g/ml}$, CEX は 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$, CED

Table 3 Antibacterial spectrum
Gram-negative bacteria (10^8 cells/ml)

Test strain	CXD	CED	CEX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.39	0.78	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.56	1.56	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25	25	12.5
" NIH	6.25	25	12.5
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	>100	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	6.25	6.25	6.25
" O-901	3.13	6.25	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> A	6.25	6.25	6.25
" B	6.25	6.25	6.25
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5	25	12.5
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	6.25	12.5	12.5
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	6.25	12.5	6.25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	12.5	12.5	25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	3.13	6.25	6.25
<i>Haemophilus influenzae</i> K-1	12.5	25	25
" K-2	25	50	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.25	12.5	6.25
" NCTC 9632	12.5	12.5	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	>100	>100	>100
" NCTC 10006	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	25	25	25
<i>Proteus morgani</i> Kono	>100	>100	>100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	>100	>100	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100
" Nc-5	>100	>100	>100

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 4 Antibacterial spectrum
Gram-negative bacteria (10^6 cells/ml)

Test strain	CXD	CED	CEX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.39	0.78	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.56	1.56	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	3.13	12.5	6.25
" NIH	6.25	12.5	12.5
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	6.25	12.5	12.5
<i>Salmonella typhi</i> T-287	3.13	6.25	3.13
" O-901	3.13	6.25	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> A	6.25	6.25	6.25
" B	3.13	6.25	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i>	3.13	6.25	3.13
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	3.13	6.25	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	6.25	6.25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	3.13	6.25	6.25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	3.13	3.13
<i>Haemophilus influenzae</i> K-1	12.5	12.5	25
" K-2	12.5	50	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.13	6.25	3.13
" NCTC 9632	3.13	6.25	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	25	50	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12.5	25	25
" NCTC 10006	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	25	25	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	12.5	12.5	12.5
<i>Proteus morgani</i> Kono	>100	>100	>100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	6.25	12.5	6.25
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	12.5	12.5	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100
" Nc-5	>100	>100	>100

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

は 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を有し, *Streptococcus pneumoniae* に対しては CXD は 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$, CEX は 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$, CED は 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ を有し, $\text{CXD} > \text{CED} \geq \text{CEX}$ の順に優れていた。他に, *Haemophilus influenzae*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis* などに対しては 3 薬ともほぼ同等の抗菌力を示した。一方, グラム陰性菌群では, *Escherichia coli*, *Shigella* sp. で, CXD は 10^8 cells/ml 接種で 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml 接種で 1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$, CEX, CED はともに 10^8 cells/ml 接種で 6.25~25 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml 接種で 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ の抗菌力を有し, $\text{CXD} > \text{CEX} \geq \text{CED}$ の順に優れていた。また *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae* で CXD は 10^8 cells/ml 接種で 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml 接種で 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し CXD と CEX はほぼ同程度であり, CED よりやや優れていた。

Citrobacter freundii, *Enterobacter* sp., *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, インドール陽性の *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* などに対しては 10^8 cells/ml で 3 薬物とも $>100 \mu\text{g/ml}$ であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床分離の *Staphylococcus aureus* 63 株, *Escherichia*

coli 58 株, *Klebsiella pneumoniae* 42 株, *Proteus mirabilis* 32 株, *Proteus vulgaris* 38 株, *Proteus morganii* 27 株, *Proteus rettgeri* 17 株についての感受性分布を検討した結果を Fig. 2~17 に示した。

(a) *Staphylococcus aureus* の場合

Fig. 2, 3 は 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml の菌液を 1 ml 金耳接種し, MIC ($\mu\text{g/ml}$) を求めたもので, その分布と累積百分率をグラフに示している。 10^8 cells/ml 接種で 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml 接種で 3.13 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示した。

(b) *Escherichia coli* の場合

Escherichia coli の場合は 10^8 cells/ml 接種で Fig. 4 に示すように 3 薬物とも 12.5 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有し, ほぼ同等であった。しかし, 10^6 cells/ml 接種では CXD が最も優れた感受性を示した。すなわち Fig. 5 に示すように CXD は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ に 80% が, CEX は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ に 80% が, CED は 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に 90% が分布しており, CXD の抗菌力は CEX より 2 倍, CED より 2~4 倍程度優れていた。

(c) *Klebsiella pneumoniae* の場合

Klebsiella pneumoniae に対しては, 10^8 cells/ml 接種では Fig. 6 に示すように 3 薬物とも 6.25~25 $\mu\text{g/ml}$ に 65~80% の分布を示した。一方, 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staphylococcus aureus* (63 strains)

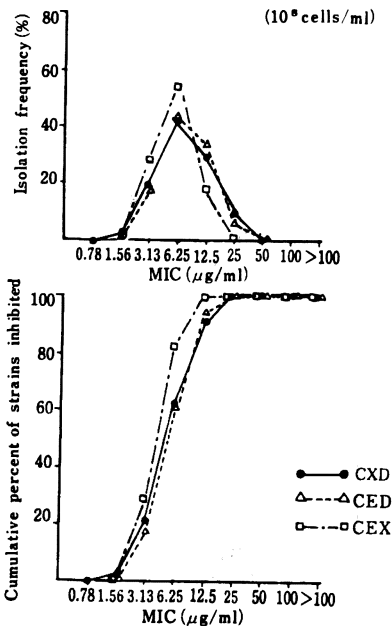


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates *Staphylococcus aureus* (63 strains)

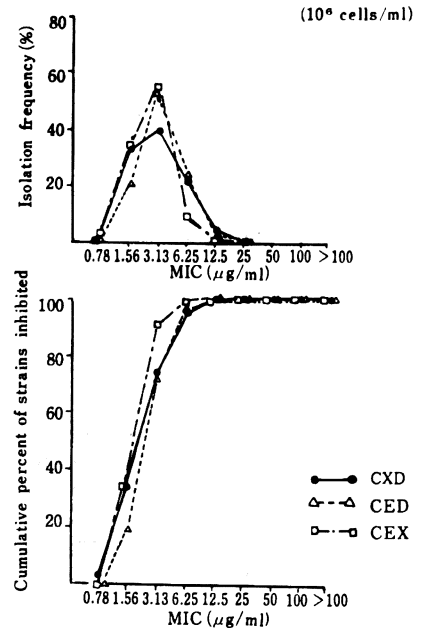


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* (58 strains)

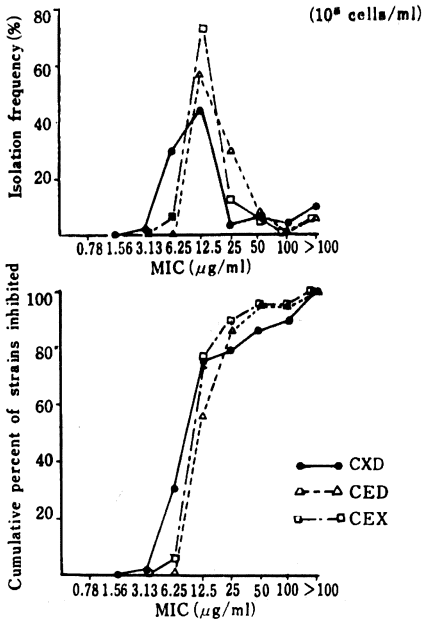


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* (58 strains)

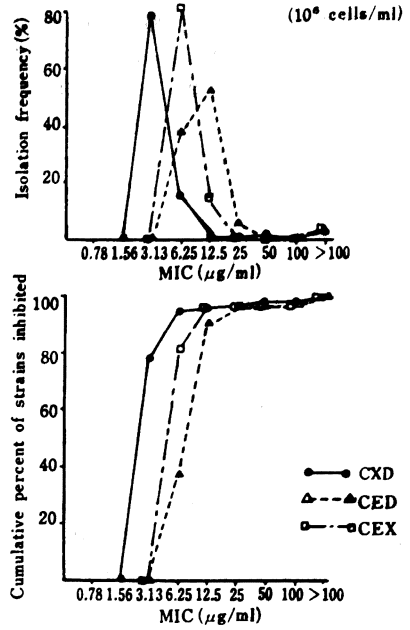


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* (42 strains)

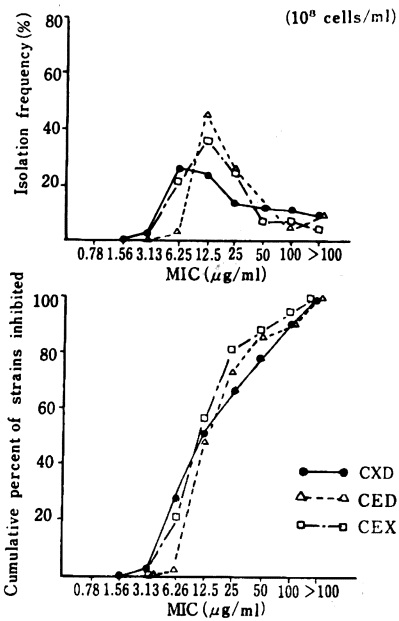


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* (42 strains)

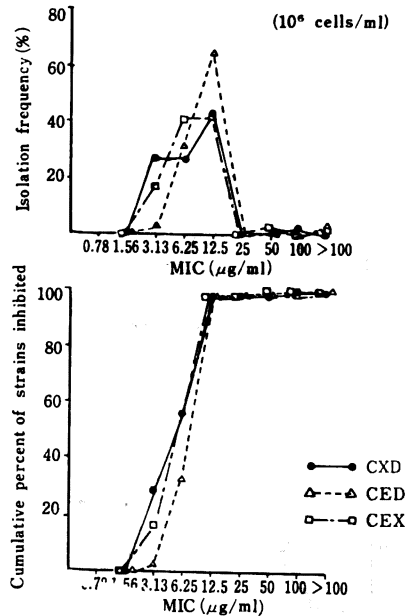


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus mirabilis* (32 strains)

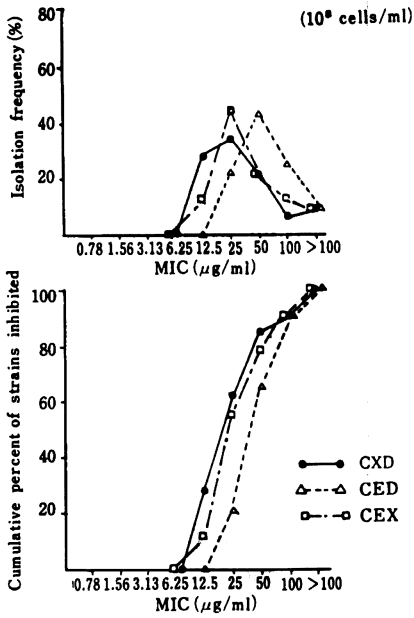


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus mirabilis* (32 strains)

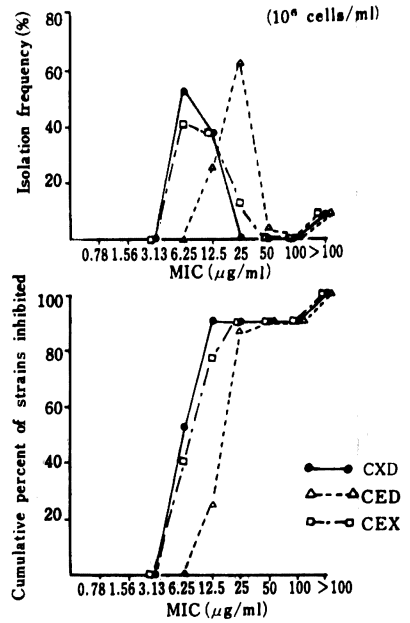


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus vulgaris* (38 strains)

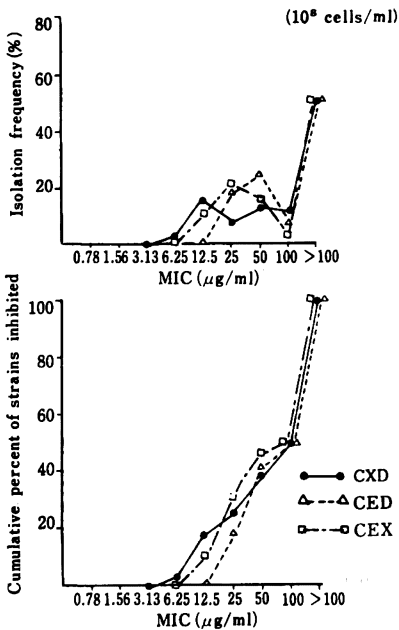


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus vulgaris* (38 strains)

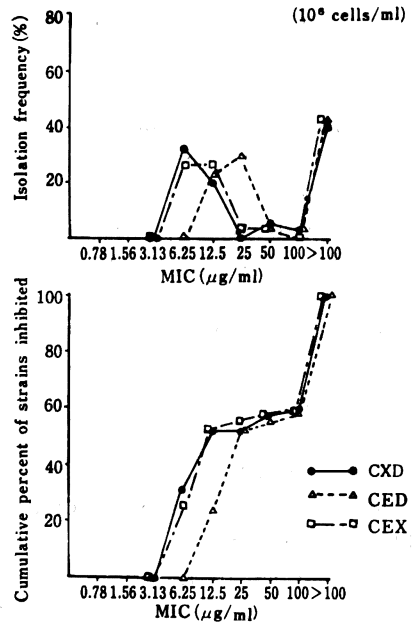


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus morganii* (27 strains)

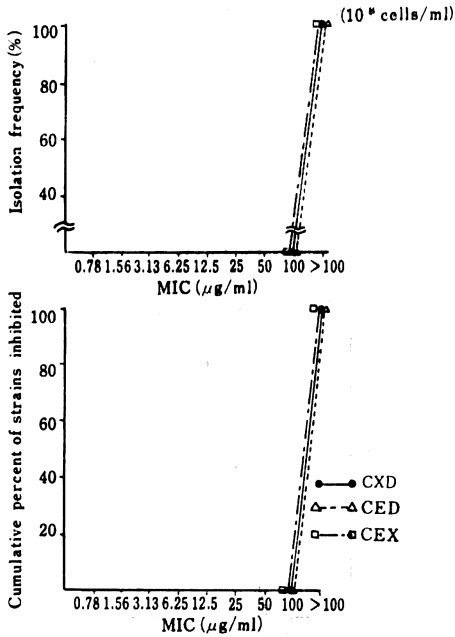
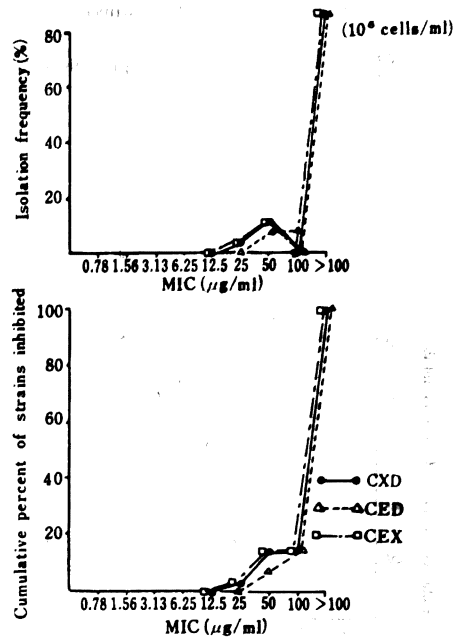


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus morganii* (27 strains)



耐性株も少数ながら存在した。 10^6 cells/ml 接種では Fig. 7 に示すように CXD, CEX は $3.13 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ に、CED は $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ に 95% 以上が分布し、CXD の抗菌力は CEX と同程度で CED よりやや優れていた。

(d) *Proteus mirabilis* の場合

Proteus mirabilis に対しては、 10^8 cells/ml 接種では Fig. 8 に示すように CXD, CEX は $12.5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ に、CED は $25 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に分布を示し、CXD は CEX と同程度であり、CED より感受性が良好であった。 10^6 cells/ml 接種でも Fig. 9 に示すように同様の傾向が認められた。

(e) *Proteus vulgaris* の場合

インドール陽性の *Proteus vulgaris* に対しては、 10^8 cells/ml 接種では Fig. 10 に示すように 3 薬物とも $>100 \mu\text{g/ml}$ を 50% の株が示し、幅広く分布していた。 10^6 cells/ml 接種では Fig. 11 に示すように 3 薬物とも約 40% は $>100 \mu\text{g/ml}$ であったが、CXD は CEX と同程度で CED より 2 倍程度優れていた。

(f) *Proteus morganii* の場合

インドール陽性の *Proteus morganii* に対しては Fig. 12, 13 に示すように 10^8 cells/ml 接種では全てが $>100 \mu\text{g/ml}$ であり、また 10^6 cells/ml 接種では 85% 以上が

$>100 \mu\text{g/ml}$ を示し、3 薬物ともほとんど感受性を示さなかった。

(g) *Proteus rettgeri* の場合

インドール陽性の *Proteus rettgeri* に対しては Fig. 14, 15 に示すように 10^8 cells/ml 接種で約 90% が $>100 \mu\text{g/ml}$ であり、 10^6 cells/ml 接種でもほとんど感受性を示さなかった。

(h) *Haemophilus influenzae* の場合

Haemophilus influenzae に対しては Fig. 16, 17 に示すように 10^8 cells/ml 接種では CXD, CEX は $12.5 \mu\text{g/ml}$ と $>100 \mu\text{g/ml}$ にピークを有し、CED は $25 \mu\text{g/ml}$ と $>100 \mu\text{g/ml}$ にピークを有した。 10^6 cells/ml 接種では $>100 \mu\text{g/ml}$ の株がすべて CXD, CEX では $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、CED では $25 \mu\text{g/ml}$ 付近へ移行した。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

Staphylococcus aureus 209-PJC, *Escherichia coli* NIH JC-2, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9632 を用いて抗菌力におよぼす培地 pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について検討した結果を Table 5, 6, 7 に示した。培地 pH の影響では、*Staphylococcus aureus* の場合 CXD, CEX, CED とともに酸性側で抗菌力が強くなった。しかし、*Klebsiella pneumoniae* の場合逆に酸性側で 3 薬物ともに抗菌力は減弱された。*Escherichia coli*

Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus rettgeri* (17 strains)

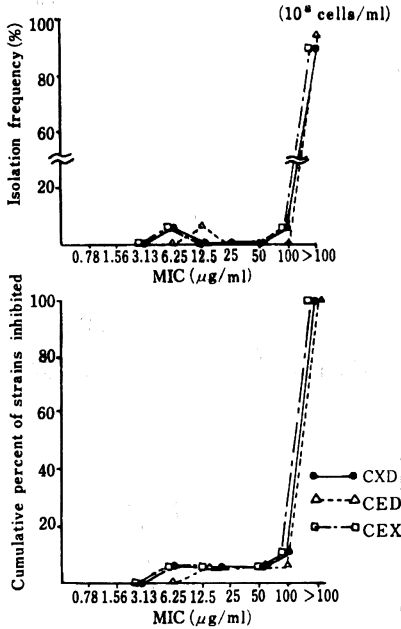


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus rettgeri* (17 strains)

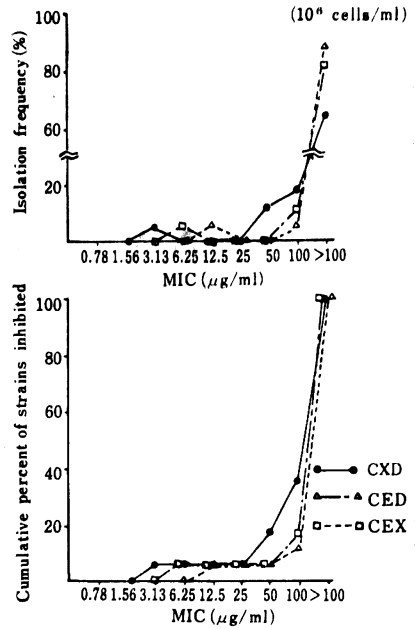


Table 5 Effect of medium pH on the antibacterial activity of CXD, CED and CEX

Organisms	Medium pH	MIC (µg/ml)		
		CXD	CED	CEX
<i>S. aureus</i> 209-P JC	5.5	0.19	0.19	0.09
	6	0.78	0.78	0.39
	7	1.56	1.56	1.56
	8	1.56	3.13	1.56
	8.5	1.56	3.13	3.13
<i>E. coli</i> NIH JC-2	5.5	25	50	50
	6	12.5	50	25
	7	12.5	25	25
	8	12.5	25	25
	8.5	25	50	25
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	5.5	25	200	100
	6	25	100	50
	7	12.5	12.5	12.5
	8	6.25	12.5	6.25
	8.5	6.25	12.5	6.25

Heart infusion broth

Table 6 Effect of horse serum on the antibacterial activity of CXD, CED and CEX

Organisms	Horse serum (%)	MIC (µg/ml)		
		CXD	CED	CEX
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0	1.56	1.56	1.56
	10	1.56	1.56	1.56
	25	1.56	1.56	3.13
	50	3.13	3.13	3.13
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0	12.5	12.5	12.5
	10	6.25	12.5	6.25
	25	6.25	12.5	6.25
	50	6.25	12.5	6.25
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	0	6.25	12.5	6.25
	10	6.25	12.5	6.25
	25	6.25	12.5	6.25
	50	6.25	12.5	6.25

Heart infusion broth

Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates *Haemophilus influenzae* (22 strains) (10^8 cells/ml)

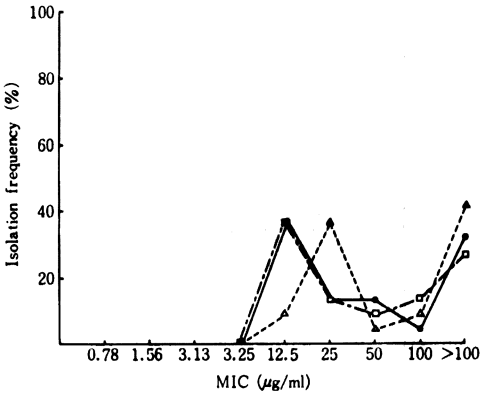


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates *Haemophilus influenzae* (22 strains) (10^6 cells/ml)

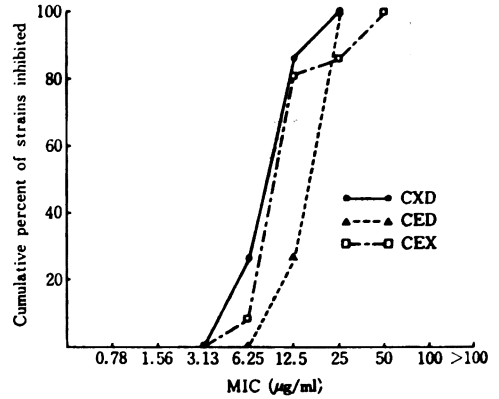
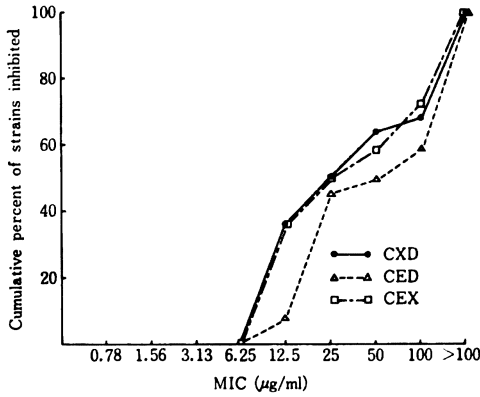
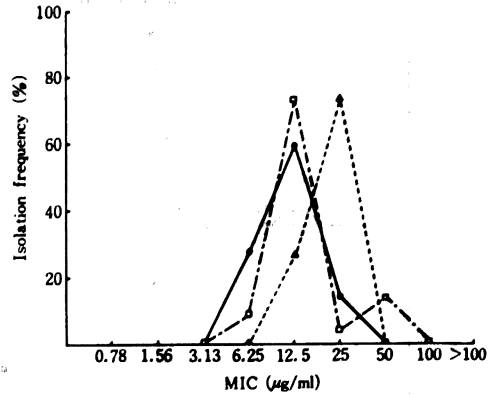


Fig. 18 Effect of CXD on viability of *Staphylococcus aureus* 209-PJC

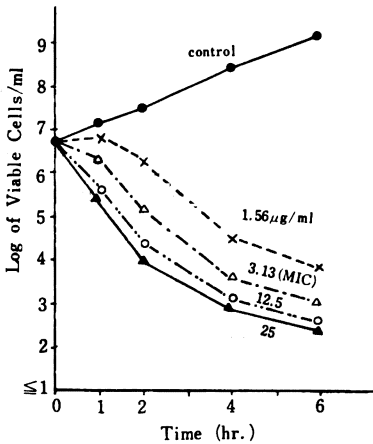


Fig. 19 Effect of CEX on viability of *Staphylococcus aureus* 209-P JC

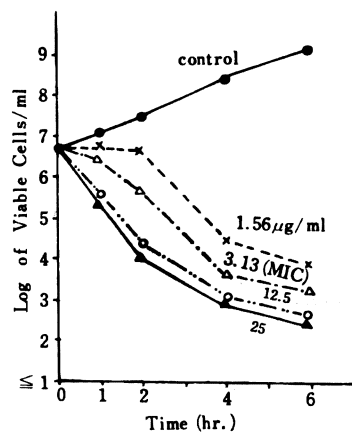


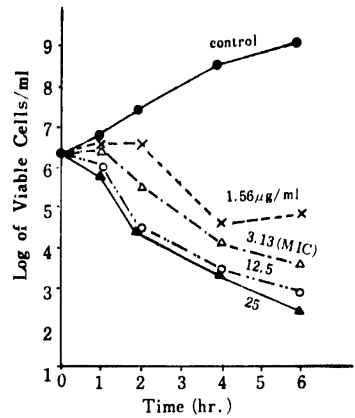
Table 7 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of CXD, CED and CEX

Organisms	Inoculum size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		CXD	CED	CEX
<i>S. aureus</i> 209-PJC	1.4×10^7	3.13	3.13	3.13
	1.4×10^6	3.13	3.13	3.13
	1.4×10^5	1.56	3.13	3.13
	1.4×10^4	1.56	1.56	1.56
	1.4×10^3	0.78	1.56	1.56
<i>E. coli</i> NIH JC-2	9.0×10^6	200	800	400
	9.0×10^5	12.5	25	12.5
	9.0×10^4	6.25	12.5	12.5
	9.0×10^3	6.25	12.5	12.5
	9.0×10^2	3.13	12.5	12.5
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	8.0×10^6	100	800	400
	8.0×10^5	12.5	25	12.5
	8.0×10^4	6.25	12.5	6.25
	8.0×10^3	3.13	12.5	6.25
	8.0×10^2	3.13	12.5	6.25

Heart infusion broth

の場合には pH の影響はあまり認められなかった。馬血清の影響では、血清添加量が増えても3薬物とも抗菌力にはほとんど変動はみられなかった。また、接種菌

Fig. 20 Effect of CED on viability of *Staphylococcus aureus* 209-P JC



量の影響では、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* の場合、 10^6 と 10^7 cells/ml の間で菌量の影響により抗菌力が CXD で8~16倍、CEX で32倍、CED で32倍となる大きな変動がみられた。

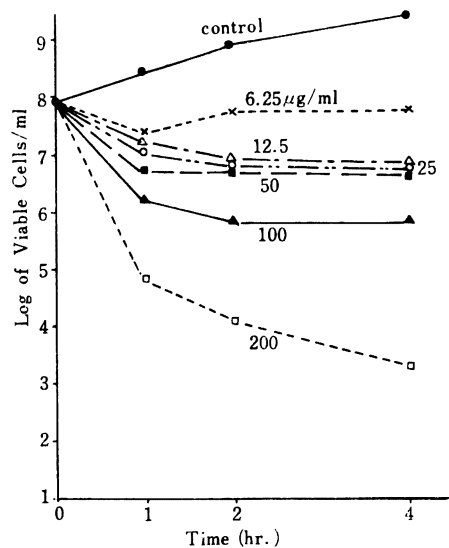
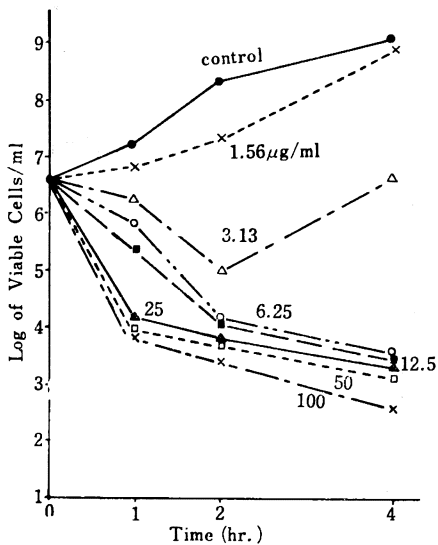
4. 増殖曲線におよぼす影響

Staphylococcus aureus 209-PJC, *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 の対数増殖期に薬を添加し生菌数の変化について検討を行った。*Staphylococcus aureus* 209-PJC の場合、Fig. 18, 19, 20 に示すよ

Fig. 21 Effect of CXD on viability of *E. coli* KC-14

(a)

(b)



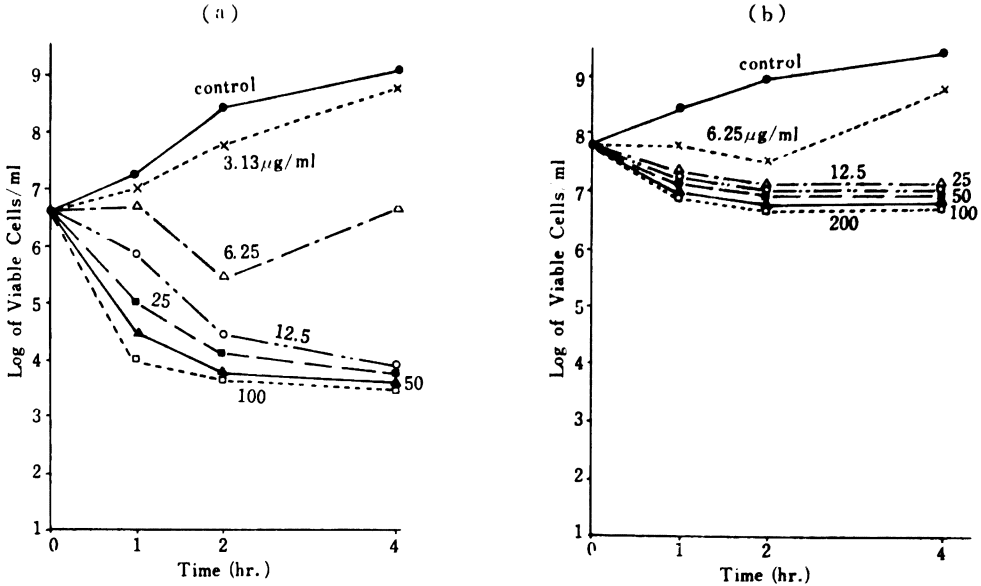
The initial viable cell count were 6×10^6 cells/ml (a) and 9×10^7 cells/ml (b).

うに菌量が $10^6 \sim 10^7$ cells/ml の中間の菌数で薬を添加すると CXD, CEX, CED はいずれもほぼ同様な殺菌作用を示したが作用 1 時間後の殺菌力は CXD, CEX の方が CED よりも優れていた。

Escherichia coli KC-14 の場合, Fig. 21(a), 22(a),

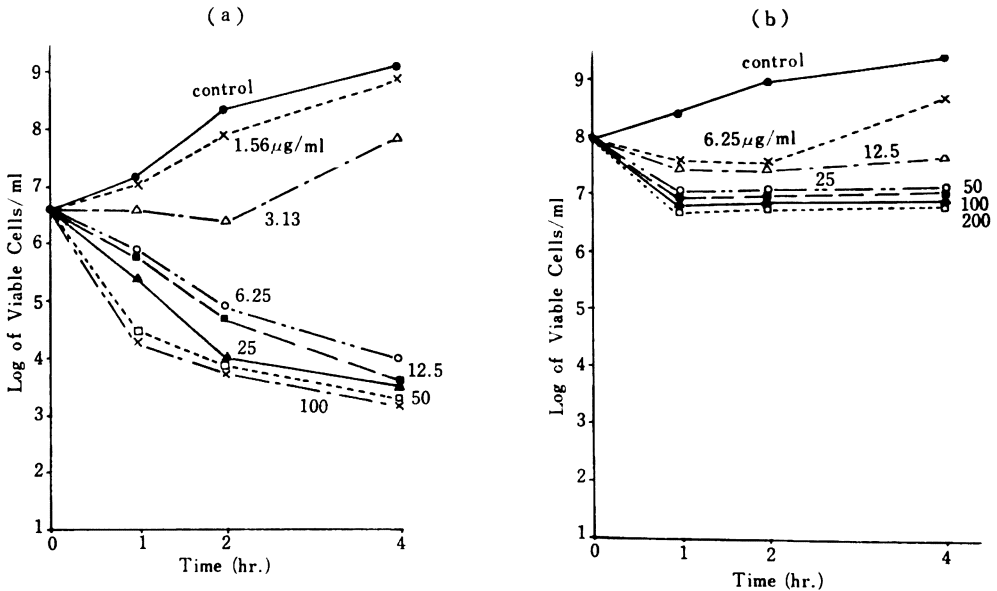
23(a) に示すように, 菌量が $10^6 \sim 10^7$ cells/ml の中間の時に薬を添加した場合 CXD は $6.25 \mu\text{g/ml}$ ($1/2$ MIC) 以上で殺菌作用を示し, $3.13 \mu\text{g/ml}$ ($1/4$ MIC) で作用後 2 時間後に殺菌作用が認められたが, 以後再増殖がみられた。CEX は $6.25 \mu\text{g/ml}$ ($1/2$ MIC) 以上, CED は

Fig. 22 Effect of CED on viability of *E. coli* KC-14



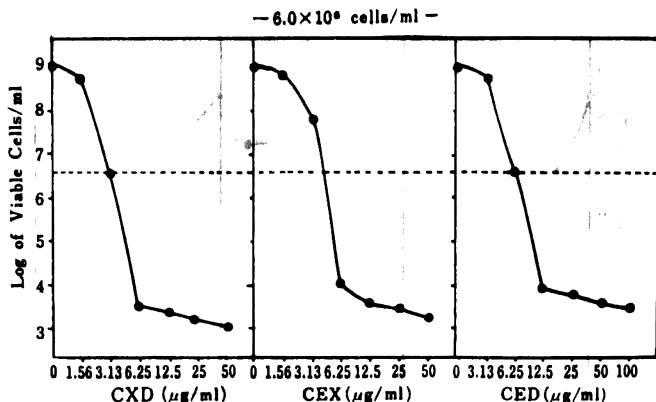
The initial cell count were 6×10^6 cells/ml (a) and 9×10^7 cells/ml (b).

Fig. 23 Effect of CEX on viability of *E. coli* KC-14



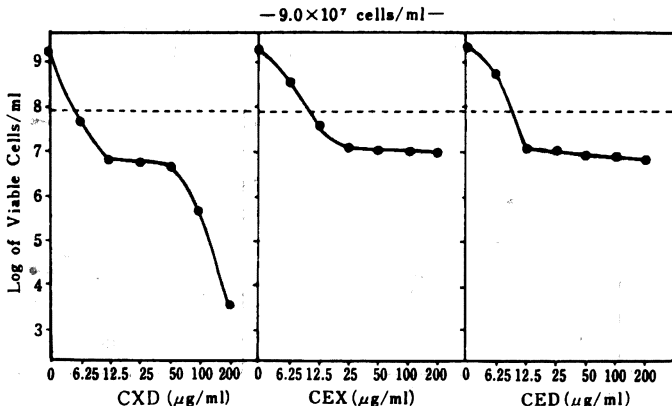
The initial cell count are 6×10^6 cells/ml (a) and 9×10^7 cells/ml (b).

Fig. 24 Effect of CXD, CEX and CED on viability of *E. coli* KC-14



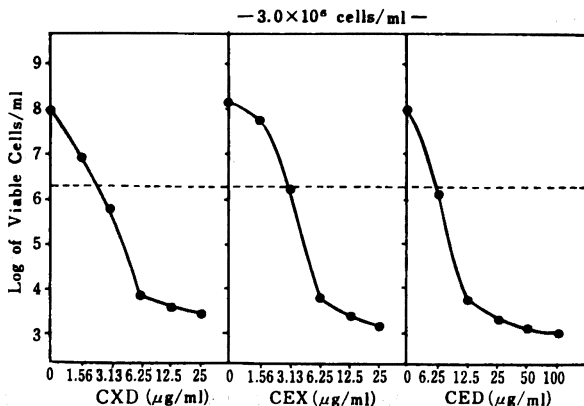
The viable cell counts were plotted after incubation with cephalosporin for 4 hrs. The dotted line showed the initial viable cell counts.

Fig. 25 Effect of CXD, CEX and CED on viability of *E. coli* KC-14

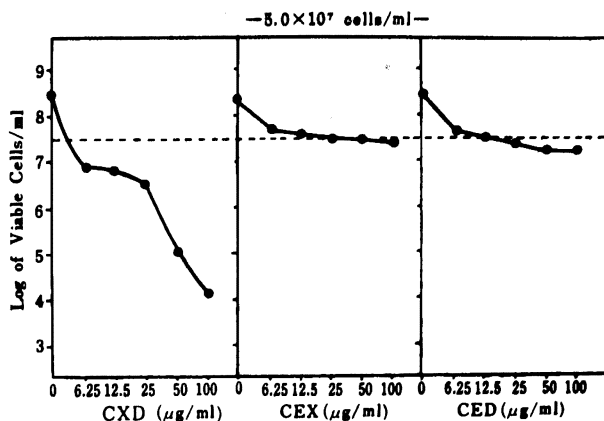


The viable cell counts were plotted after incubation with cephalosporin for 4 hrs. The dotted line showed the initial viable cell counts.

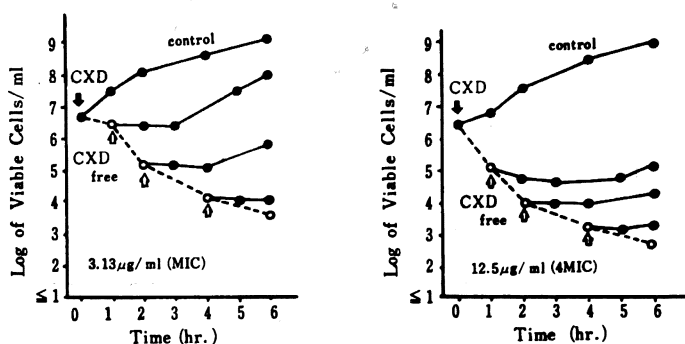
Fig. 26 Effect of CXD, CEX and CED on viability of *K. pneumoniae*



The viable cell counts were plotted after incubation with cephalosporin for 4 hrs. The dotted line showed the initial viable cell counts.

Fig. 27 Effect of CXD, CEX and CED on viability of *K. pneumoniae*

The viable cell counts were plotted after 4 hours from the addition of the cephalosporin. The dotted line shows the initial viable cell count.

Fig. 28 Behavior *in vitro* of *Staphylococcus aureus* 209-P'JC previously exposed to CXD

CXD was removed after 1, 2 or 4 hours. The dotted lines showed the viable cell counts in the case of incubation with cephalosporin, for 6 hrs.

12.5 µg/ml (MIC) 以上で殺菌作用を示し, CXD は CEX と同程度で CED よりやや殺菌作用が強かった。また Fig. 21 (b), 22 (b), 23 (b) に示すように菌量が 10^8 cells/ml に近い時に薬を添加した場合, CXD は 100 µg/ml (8 MIC) 以上で強い殺菌作用がみられ, 特に 200 µg/ml 1 時間作用で 99.9% 以上の細菌に対して強力な殺菌作用が認められ, CEX, CED に比べ優れた殺菌作用を有することが判った。また, それぞれの 4 時間目の生菌数をプロットして Fig. 24, 25 に示した。菌量が 10^6 cells/ml 後半の場合には 4 時間目の生菌数は 3 薬物ともほぼ同じであったが, 菌量が 10^7 cells/ml 後半の場合には CXD は CEX, CED より強い優れた殺菌作用を有していた。

K. pneumoniae KC-1 でも *E. coli* KC-14 と同様な

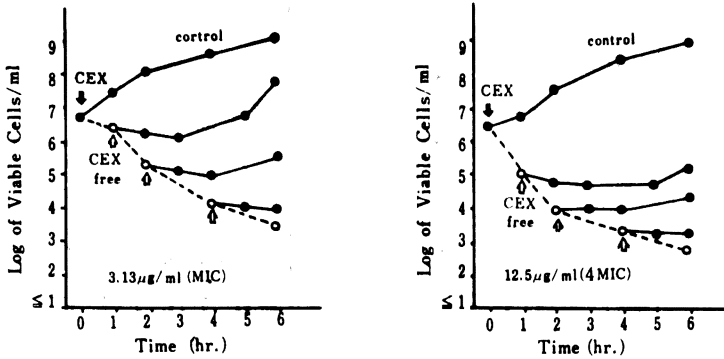
結果が得られ, 4 時間後の生菌数をプロットしたものを Fig. 26, 27 に示した。これからも明らかなように CXD は菌量が 5×10^7 cells/ml の時に CEX, CED に比べ非常に優れた殺菌作用を示すことが判った。

5. *in vitro*における薬剤除去後の再増殖実験

in vitro における再増殖実験を *Staphylococcus aureus* 209-P'JC, *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を用い検討した。

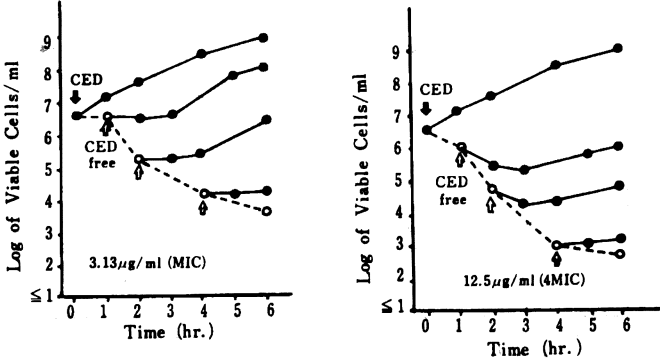
Staphylococcus aureus 209-P'JC の場合 Fig. 28~30 に示すように, CXD, CEX, CED の 3.13 µg/ml (MIC) および 12.5 µg/ml (4 MIC) を添加後 1, 2, 4 時間目に薬を除去した場合, いずれも同様な増殖抑制効果を示した。また Fig. 31, 32 に示すように CXD, CEX の 3.13 µg/ml (MIC) を添加し 30 分 (Fig. 31), 1, 2, 4

Fig. 29 Behavior *in vitro* of *Staphylococcus aureus* 209-P JC previously exposed to CEX



CEX was removed after 1, 2 or 4 hours. The dotted lines showed the viable cell counts in the case of incubation with cephalosporin, for 6 hrs.

Fig. 30 Behavior *in vitro* of *Staphylococcus aureus* 209-P JC previously exposed to CED



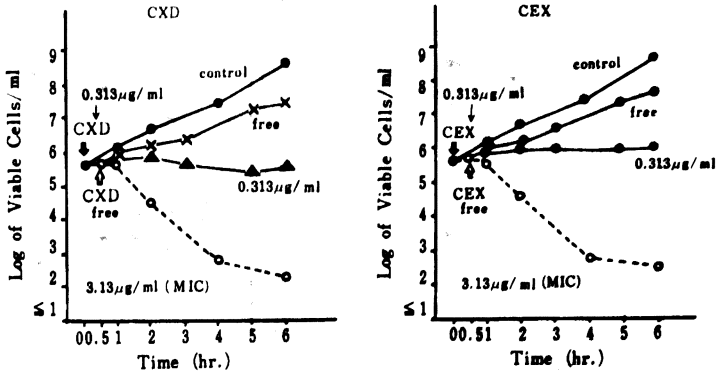
CED was removed after 1, 2 or 4 hours. The dotted lines showed the viable cell counts in the case of incubation with cephalosporin, for 6 hrs.

Table 8 Protecting effect of CXD, CEX and CED against experimental *Staphylococcus aureus* Smith infection in mice

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge dose		ED ₅₀ * mg/mouse
	10 ⁸	10 ⁶	cells/mouse	LD ₅₀	
CXD	3.13	1.56	1.45 × 10 ⁷	100	0.0026(0.0012~0.0057)
CEX	3.13	1.56			0.0034(0.001~0.012)
CED	3.13	1.56			0.0034(0.001~0.010)

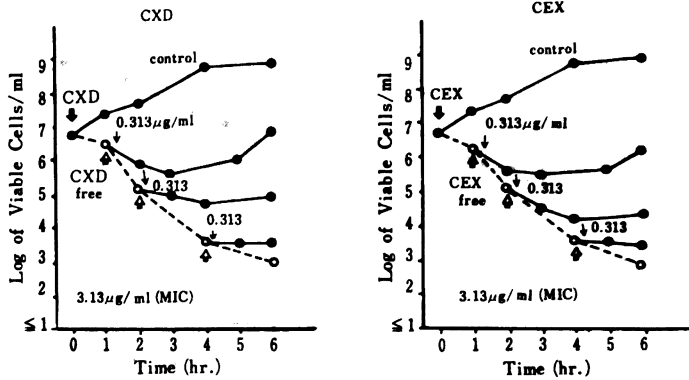
* Litchfield-Wilcoxon method
() : 95% confidence limits

Fig. 31 Behavior *in vitro* of *Staphylococcus aureus* 209-P JC previously exposed to CXD and CEX



- × — × : The cephalosporin was removed 30 minutes after adding CXD or CEX in the concentration of 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
 ▲ — ▲ : The concentration of cephalosporin was changed from 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 0.313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 30 minutes.
 ○ — ○ : In the case of incubation with CXD or CEX for 6 hours.

Fig. 32 Behavior *in vitro* of *Staphylococcus aureus* 209-P JC previously exposed to CXD and CEX



The concentration of cephalosporin was changed from 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 0.313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 1, 2 or 4 hours.

時間 (Fig. 32) 後に薬を除去し、ただちに 0.313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1/10 MIC) を加えて再増殖抑制効果を検討したところ CXD と CEX はほとんど同様な傾向を示した。 *Escherichia coli* KC-14 の場合、Fig. 33~35 に示すように 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MIC) および 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 MIC) を添加後 1, 2, 4 時間目に薬を除去し、その増殖抑制効果について検討したところいずれの薬においても同様な傾向が認められた。 *Klebsiella pneumoniae* KC-1 の場合も *Escherichia coli* KC-14 と同様な傾向を示した。

6. マウス実験的感染症に対する治療効果

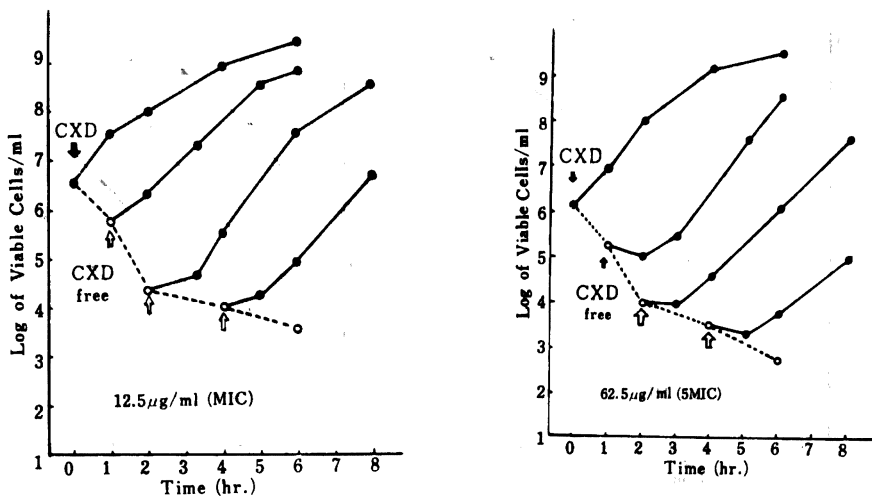
Staphylococcus aureus Smith, *Escherichia coli* KC-

14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を用いてマウス実験的感染症に対する治療効果を検討し、Table 8, 9, 10 に示した。

Staphylococcus aureus Smith 感染症に対して CXD は 0.0026 mg/mouse, CEX, CED はともに 0.0034 mg/mouse の ED₅₀ 値を示し、CXD が CEX, CED よりやや優れていた。

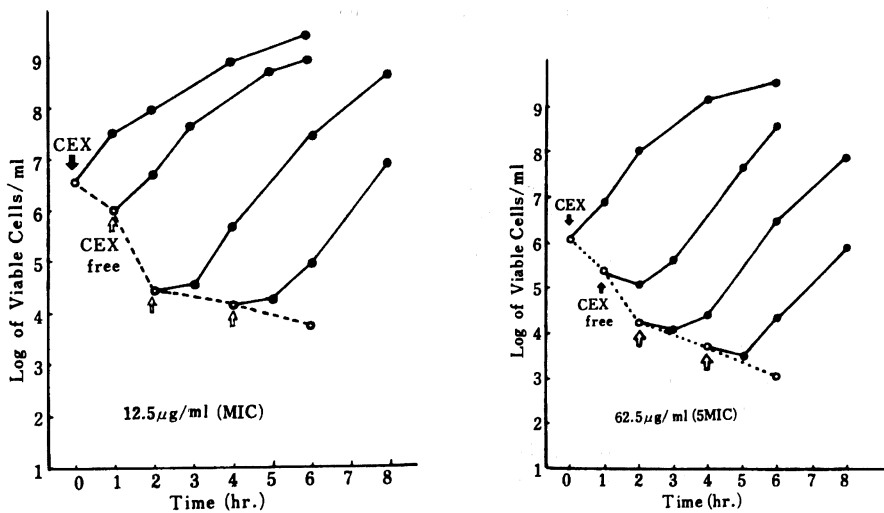
Escherichia coli KC-14 感染症に対して、CXD は 0.076 mg/mouse, CEX は 0.22 mg/mouse, CED は 0.23 mg/mouse の ED₅₀ 値を示し CXD が CEX, CED より約 3 倍すぐれた治療効果を有していた。

Fig. 33 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CXD

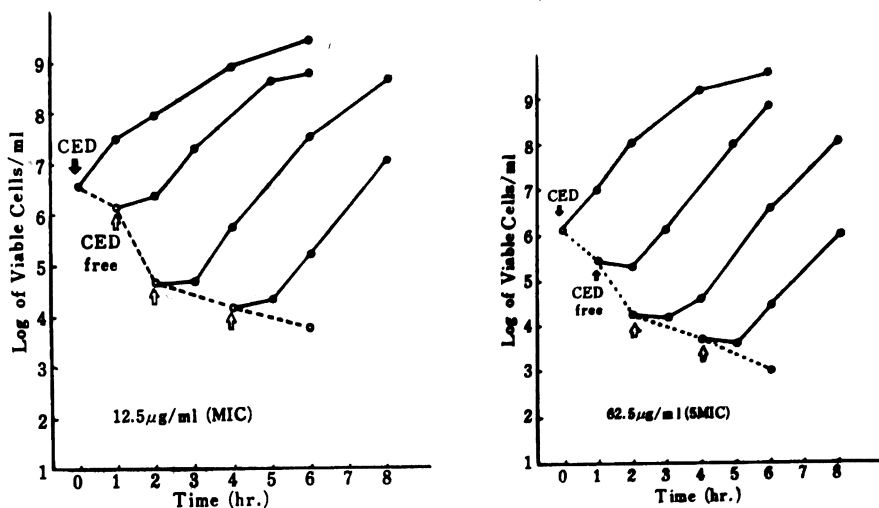


CXD was removed after 1, 2 or 4 hours.

Fig. 34. Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CEX



CEX was removed after 1, 2 or 4 hours.

Fig. 35 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CED

CED was removed after 1, 2 or 4 hours.

Table 9 Protecting effect of CXD, CEX and CED against experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Challenge dose		ED ₅₀ * mg/mouse
	10 ⁸	10 ⁶	cells/mouse	LD ₅₀	
CXD	6.25	3.13	23000	200	0.076(0.043~0.13)
CEX	6.25	3.13			0.22(0.15~0.33)
CED	12.5	6.25			0.23(0.14~0.38)

* Litchfield-Wilcoxon method
(): 95% confidence limitsTable 10 Protecting effect of CXD, CEX and CED against experimental *Klebsiella pneumoniae* infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Challenge dose		ED ₅₀ * mg/mouse
	10 ⁸	10 ⁶	cells/mouse	LD ₅₀	
CXD	6.25	3.13	5000	10000	0.82(0.55~1.23)
CEX	6.25	3.13			1.20(0.89~1.62)
CED	12.5	6.25			2.80(1.93~4.06)

* Litchfield-Wilcoxon method
(): 95% confidence limits

Klebsiella pneumoniae KC-1 感染症に対して, CXD は 0.82 mg/mouse, CEX は 1.20 mg/mouse, CED は 2.80 mg/mouse の ED₅₀ 値を示し, CXD は CEX より約 1.5 倍, CED より約 3 倍すぐれた治療効果を有していた。

また, 接種菌量と ED₅₀ 値との関係を, *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を用いて検討し Table 11, 12 に示した。*Escherichia coli* KC-14 株の場合, 菌量が 10⁴, 10⁶, 10⁷ cells/mouse と増加するに従って 3 薬物とも, 治療効果は悪くなったが, いずれの

Table 11 Influence of challenge dose on ED₅₀ of CXD, CEX and CED in experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Challenge dose		ED ₅₀ (mg/mouse)*			Ratio	
cells/mouse	LD ₅₀	CXD ^{a)}	CEX ^{b)}	CED ^{c)}	b/a	c/a
2.5 × 10 ⁴	2 × 10 ³	0.084 (0.034~0.12)	0.30 (0.23~0.39)	0.36 (0.26~0.50)	4.7	5.6
2.5 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	0.35 (0.25~0.49)	0.82 (0.57~1.20)	1.2 (0.80~1.8)	2.3	3.4
2.5 × 10 ⁷	2 × 10 ⁵	10.3 (6.87~15.5)	>30	>30	>3	>3

* Litchfield-Wilcoxon method, () : 95% confidence limits

MIC (10⁸ cells/ml) : CXD 6.25 μg/ml
 CEX 6.25
 CED 12.5

Table 12 Influence of challenge dose on ED₅₀ of CGP-9000, CEX and CED in experimental *K. pneumoniae* KC-1 infection in mice

Challenge dose		ED ₅₀ (mg/mouse)*			Ratio	
cells/mouse	LD ₅₀	CXD ^{a)}	CEX ^{b)}	CED ^{c)}	b/a	c/a
5.5 × 10 ³	1 × 10 ⁴	1.2 (0.83~1.74)	2.5 (1.85~3.38)	4 (2.76~5.80)	2.1	3.3
5.5 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	2.7 (1.86~3.92)	5.5 (3.93~7.70)	5.5 (3.93~7.70)	2.0	2.0
5.5 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	12 (6.67~21.6)	15 (7.5~30)	14 (7~28)	1.3	1.2

* Litchfield-Wilcoxon method, () : 95% confidence limits

MIC (10⁸ cells/ml) : CXD 6.25 μg/ml
 CEX 6.25
 CED 12.5

菌量においても CXD が CEX, CED に比べ優れた治療効果を示した。また *Klebsiella pneumoniae* KC-1 株の場合、3 薬物ともほぼ同様な菌量の影響を受けたが、*Escherichia coli* KC-14 株の場合と同様 CXD が優れていた。

III. 考 察

β-lactam 系抗生物質の研究開発の進歩は、近年特に目ざましく、多くの有用な薬剤が開発されつつある。しかしながら経口用セファロsporin系抗生剤に関しては、注射剤に比べてまだ十分な抗菌力を有するとはいい難く、さらに強い抗菌性を有する本系薬剤の開発が待たれているように思われる。この点において、新しく開発された経口用セファロsporin系抗生物質 CXD の抗菌作用に興味もたれた。CXD はグラム陽性および陰性

菌群に対して幅広く抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力は CEX, CED とほぼ同様であった。しかし *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* に対する抗菌作用型式において CXD と CEX, CED 間に大きな差が認められた。すなわち薬を作用させる時の菌量が 10⁶ cells/ml の場合、CXD, CEX, CED のいずれの薬も強い殺菌および溶菌作用を示したが、菌量が 10⁷ cells/ml の場合、CXD が強い殺菌および溶菌作用を示したのに対し、CEX, CED では 100 μg/ml 作用でも強い殺菌作用がみられず、静菌的な作用を示した。

CXD は CED の 3 位の -CH₃ 基を -OCH₃ 基に置きかえた化学構造を有するが、これによって上に述べた強い殺菌作用を有することとなり、CXD の抗菌作用機作を追求する上で興味ある問題と思われる。

一般的に β-lactam 系抗生物質の抗菌作用を考えた場

合、その薬の(1) β -lactamase に対する安定性、(2) 細胞壁外膜透過性、(3) Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性、(4) lytic enzyme の関与、これら4つの因子が相互に関連して抗菌作用を発揮するものと考えられる。

CXD と CEX, CED 間でみられた抗菌力の差は、どのような原因によるものか、現在さらに検討を加えているが、PBPs において、CXD の方が CEX, CED に比べ IBs に対する親和性が強く、このことが抗菌力の差に結びついている一つの原因であると考えられる。これらの点については次報においてさらに詳細な検討を加えた。

最後にマウス実験的感染症に対する治療効果について検討したところ、CXD は CEX と同じ MIC であるにもかかわらず *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* で CEX, CED より約1.5~5倍優れた治療効果を有していた。CXD の *in vivo* におけるこのような優れた効果は *in vitro* における優れた殺菌作用の反映であると考えられる。

文 献

- 1) 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
- 2) 第27回日本化学療法学会総会 : 新薬シンポジウム IV. CGP-9000, 1979
- 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) 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) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 99~113, 1949

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON CEFROXADINE (CGP-9000), A NEW ORALLY ACTIVE CEPHALOSPORIN

TAKESHI NISHINO, TADASHI YOSHIMOTO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Cefroxadine (CGP-9000, CXD), a new orally active cephalosporin antibiotic, was bacteriologically evaluated in comparison with Cephalexin (CEX) and Cephadrine (CED).

CXD showed a broad antibacterial spectrum against gram-positive and gram-negative microorganisms. Its activity was comparable to that of CEX or CED.

The effects of various factors such as medium pH, inoculum size and the addition of horse serum to the medium on the antibacterial activity of CXD were studied and found to be nearly the same as those observed with CEX and CED. Effect on growth curve was examined by use of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The bactericidal activity of CXD was much stronger in when the initial viable cell count was high than that of CEX or CED.

Re-growth of organisms was also observed after the removal of the antibiotics. There was noticed no difference among the three antibiotics. The therapeutic effect of CXD against infection experimentally caused with *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* in mice was by 1.5~5 times superior to that of CEX or CED.

The obtained results demonstrated that CXD shows stronger antibacterial *in vivo* activity than CEX and CED, probably because of its higher bactericidal activity.