

Cefroxadine (CGP-9000) の尿中における殺菌効果について

吉本 正・西野武志・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

新しく合成された経口用セファロsporin系抗生物質 Cefroxadine (CGP-9000, CXD) の尿中殺菌力について *Escherichia coli* K-12 を用いて検討を行い、次のような成績を得た。

Heart infusion broth および尿中での増殖曲線に対する CXD の殺菌作用は、高菌量 (約 $1 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml) でも Cephalexin (CEX) より速くかつ強力であった。特に薬剤濃度 125~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 付近において、CXD は CEX より非常に優れた殺菌効果を示した。

次に、CXD の尿中排泄の経時的な排泄濃度に従い、その simulation model を作製し、CEX と比較した。*E. coli* K-12 を 99.9% 殺菌するために要する時間は、Heart infusion broth 中では CEX より 2 倍以上の好成績であった。また尿中では高菌量で CEX はまったく殺菌作用を持ちえなかったのに対し、CXD は優れた殺菌力を示した。

最後に、より臨床に近づけるため CXD と CEX のクロスオーバー法により得られた尿を用い種々の *in vitro* での実験を行った。クロスオーバーにより得られた薬剤経口投与後の尿を培地とし、増殖曲線におよぼす影響をみたところ CGP-9000 は CEX に比較して、1~2、2~4 時間後の尿で初期殺菌能において勝っており、4~6 時間後の尿でも優れた殺菌力を有していた。また 6~8、8~12 時間後の尿では CEX は再増殖がみられた。

同様にクロスオーバーにより得られた尿を用い、*E. coli* K-12 を順々に各時間の尿サンプルで置換していった系においては、CXD は CEX より約 10 倍程度優れていた。

序 文

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) は、スイス CIBA-GEIGY 社で開発された経口用セファロsporin系抗生物質である¹⁾。

本薬は化学名を、7 β -[D-2-Amino-2-(1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-methoxy-ceph-3-em-4-carboxylic acid といい、これまでの報告によりグラム陽性菌、陰性菌に対し広い抗菌スペクトルを有し^{2)~4)}、経口投与後速やかに高い血中濃度が得られ、生体内ではほとんど分解されることなく尿中に排泄されるとされている。

今回私どもは、Cephalexin を比較薬とし、尿中排泄時の経時的濃度変化にともなう simulation model を作製し、CXD の尿中殺菌力について *Escherichia coli* K-12 を用いて検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬および使用菌株

薬剤としては CXD, Cephalexin (CEX) のいずれも力価の明らかなものを、また菌株としては *Escherichia*

coli K-12 を用いた。

2. 増殖曲線におよぼす影響

E. coli K-12 を Tryptosoya broth (TSB; 日水) で 37°C 一夜静置培養し、この菌液を Heart infusion broth (HIB; 日水) で希釈し、37°C で振盪培養した。そして対数増殖期後半の菌を遠心 (3,500 rpm, 15 min) 集菌し、HIB または尿中に懸濁させ、CGP-9000, CEX をそれぞれ作用し、以後経時的に試料を採取して、10 倍希釈系列によるコロニー・カウント法を用いて生菌数を測定した。

3. 尿サンプルの採取と尿中濃度測定

CXD と CEX の 250 mg (力価) をクロスオーバーでそれぞれ経口投与し、0~1、1~2、2~4、4~6、6~8、8~12 時間後の尿を採取し、その尿量と濃度を測定した。なお、尿は尿採取後ミリポアを使用して無菌尿とした後、凍結保存した。また、尿中濃度は Tryptosoya Agar 培地、*M. luteus* ATCC 9341 菌株を用い Cup 法で力価を求めた。

4. 尿中排泄の simulation model での殺菌作用

2. と同様に調整した菌を CXD および CEX 80 $\mu\text{g}/$

Fig. 1 Effect of CXD on viability of *E. coli* K-12 in HIB

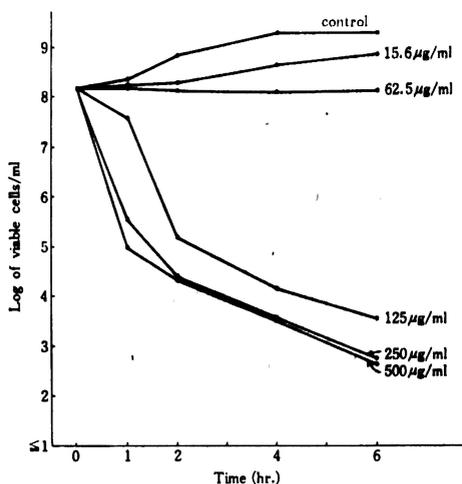


Fig. 2 Effect of CEX on viability of *E. coli* K-12 in HIB

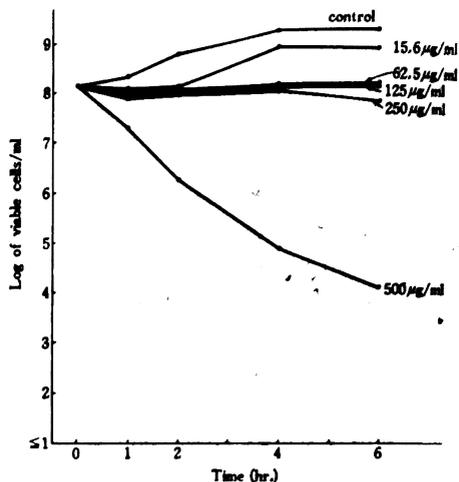


Fig. 3 Effect of CXD on viability of *E. coli* K-12 in urine

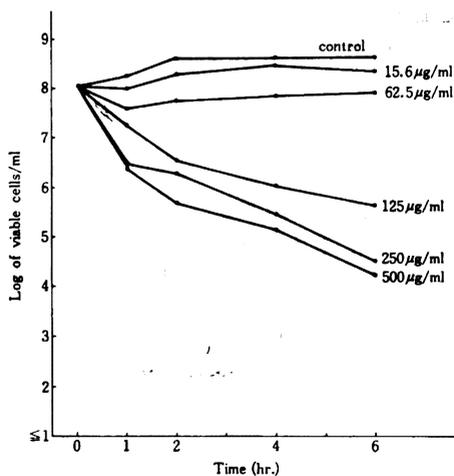
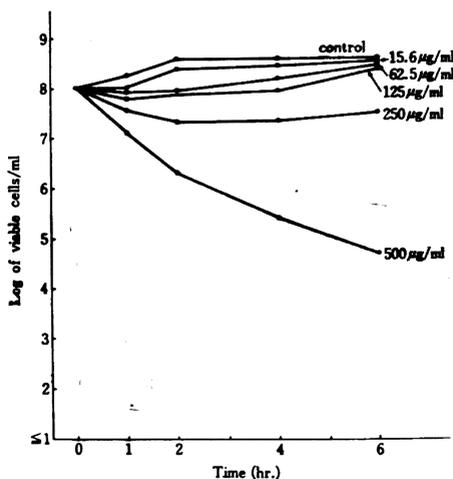


Fig. 4 Effect of CEX on viability of *E. coli* K-12 in urine



ml を含む尿または HIB に加え、1 時間後に遠心 (3,500 rpm 15 min) により集菌し、以後 350, 500, 250, 20, 10 µg/ml に調整した尿、HIB 中に 1, 2, 4, 6, 8 時間後にそれぞれ加えて同様に処理し、生菌数を測定した。

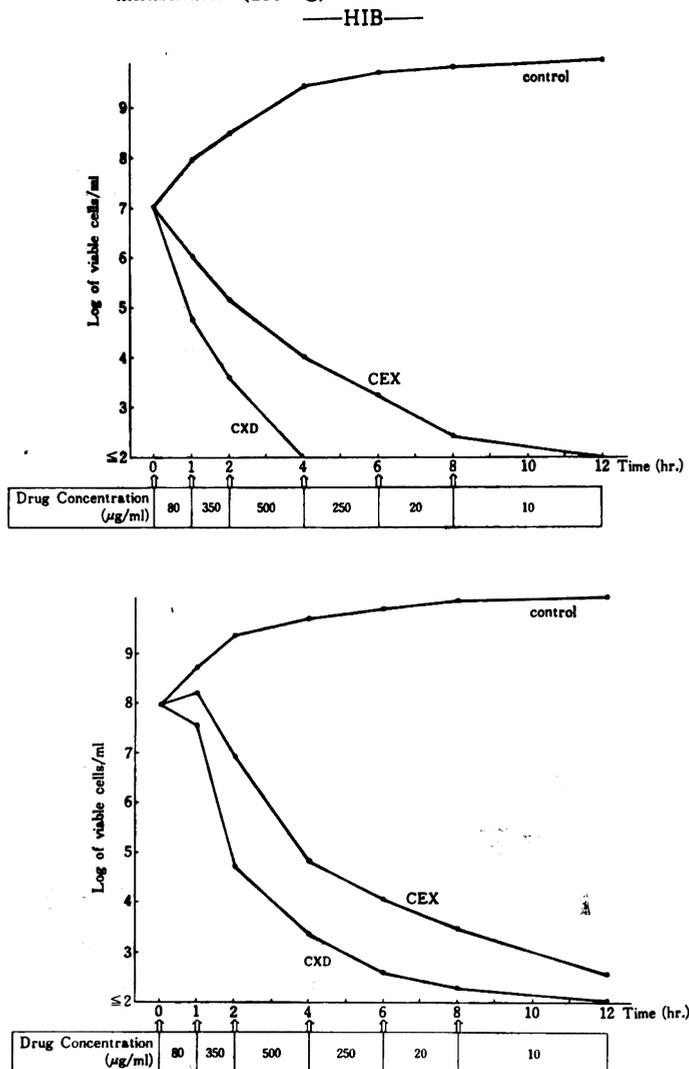
次に、健康人より採取した尿サンプルを使用し同様の実験を行った。なお、遠心集菌や培地などでの置換装作に要する時間は増殖曲線の時間外とした。

実験結果

1. 培地中および尿中における CXD と CEX の殺菌結果

HIB 中で *E. coli* K-12 に対する CXD と CEX の増殖曲線におよぼす影響を、対数期後半 (菌量約 $1 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml) の菌を用いて比較検討した。CXD は Fig. 1 に示すように 125 µg/ml 以上の濃度で CEX の

Fig. 5 Bactericidal activity of CXD and CEX in a model system simulating human urine levels after oral administration (250 mg)



500 $\mu\text{g/ml}$ より強力な殺菌的作用を示した。一方、CEX は Fig. 2 に示すように 250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも静菌的作用を示し、500 $\mu\text{g/ml}$ で漸く殺菌的作用が認められた。また、薬物添加後1時間目の初期殺菌効果は CEX 500 $\mu\text{g/ml}$ で 1/10 (90%) 未満であるのに対し、CXD は 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ で 1/1,000 (99.9%) 以上の強力な殺菌効果を示した。

次に、培地を人尿に変え同様の実験を行った。培地を HIB から尿に変えることにより、Control の菌の増殖速

度は鈍くなり、またその増殖限界も約 5×10^8 cells/ml に減じた。しかしながら、HIB 中と同様に CXD は Fig. 3 に示すように、125 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で殺菌的效果を示したのに対し、CEX は 250 $\mu\text{g/ml}$ でも静菌的な作用しか示さなかった (Fig. 4)。また CXD は CEX より初期殺菌力が優れていた。

2. 尿中排泄の Simulation model での殺菌作用

CXD の 250 mg (力価) を 3 名に経口投与し、その 0~1, 1~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~12 時間の尿中濃度

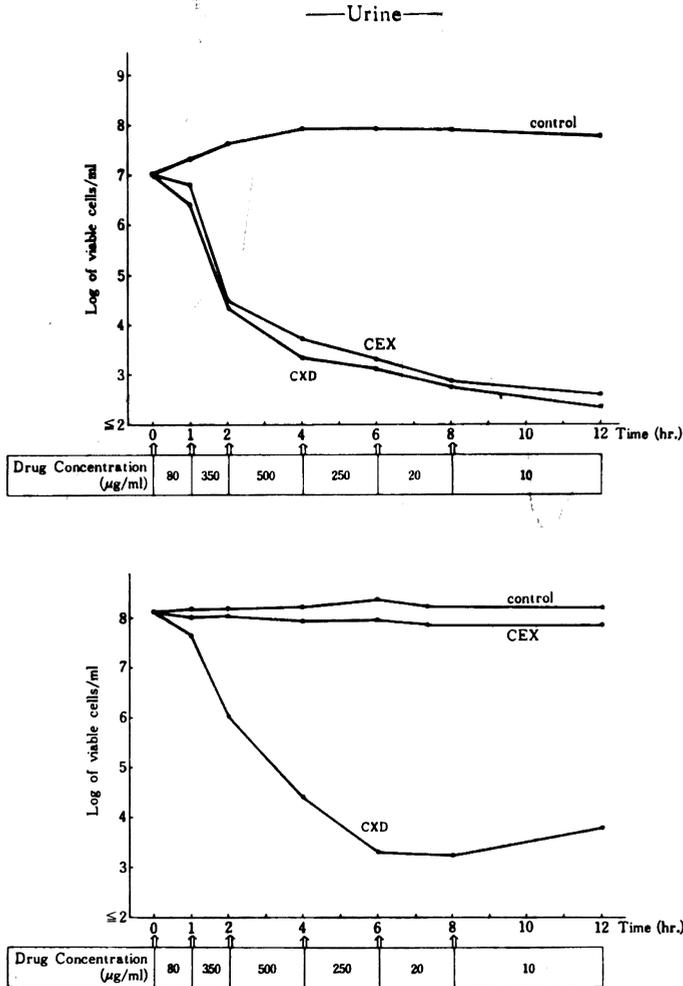
Table 1 Urinary excretion of CXD after a single oral administration of 250mg in healthy volunteers

Dose mg	Volunteer initial	Time after administration (hr.)																	
		0~1		1~2		2~4		4~6		6~8		8~12							
		Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %						
250	H. S.	240	83	8.0	173	540	37.4	138	540	29.8	115	460	21.1	153	43	2.7	80	19	0.6
	K. K.	60	25	0.6	60	310	7.4	95	550	22.0	100	200	8.0	153	11	0.7	183	7.6	0.5
	M. K.	120	95	4.6	120	220	10.6	130	300	15.6	175	66	4.6	190	6.0	0.5	175	6.7	0.5
	Mean		67.67	4.40		356.7	18.47		473.3	22.47		242.0	11.23		20.0	1.30		11.10	0.53
	S. E.		21.61	2.14		95.3	9.51		87.4	4.11		115.7	5.03		11.6	0.70		3.96	0.03

Table 2 Urinary excretion of CXD and CEX after a single oral administration of 250mg in healthy volunteers

Drug	Volun- teer initial	Time after administration (hr.)																			
		0~1		1~2		2~4		4~6		6~8		8~12		0~12							
		Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %	Vol. ml	Conc. µg/ml	Excret. %					
CGP- 9000	T. Y.	30	47.0	0.56	30	2200	26.40	62	2350	58.28	105	271.5	11.40	80	54.8	1.75	107	12.5	0.54	414	98.93
	T. T.	35	62.6	0.88	30	313.0	3.76	80	1875	60.00	106	431.0	18.27	105	141.3	5.93	245	15.65	1.53	601	90.37
	S. Y.	85	235.0	7.99	82	1250	41.00	205	313.0	25.67	195	138.0	10.76	100	58.7	2.35	265	12.5	1.33	932	89.10
	T. T.	68	188.0	5.11	58	1016	23.57	75	1720	51.60	115	293.5	13.50	120	86.2	4.14	540	8.75	1.89	976	99.81
	T. T.	53	332.0	7.04	55	625.0	13.75	90	1575	56.70	110	293.0	12.89	62	250.0	6.20	215	41.0	3.53	585	100.11
	S. Y.	47	86.2	1.62	38	2200	33.44	62	1738	43.10	90	704.0	25.34	73	220.0	6.42	145	62.5	3.63	455	113.55

Fig. 6 Bactericidal activity of CXD and CEX in a model systems simulating human urine levels after oral administration (250 mg)



の平均を求めた (Table 1)。

これを用いて、0~1 時間目の尿中濃度を80 $\mu\text{g/ml}$ と設定し、同様に 1~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~12時間の尿中濃度を 350 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ とした。CEX もほぼ同様の排泄パターンを示すものと思われ、CXD と同様の濃度で実験を行った⁵⁾。各時間ごとに CXD, CEX のそれぞれの濃度を菌に接触させ、生菌数を測定した。

HIB 中では Fig. 5 に示すように、菌量約 1×10^7 cells/ml の時において CXD の 99.9% 殺菌効果は約 1.5 時間であったのに対し、CEX では約 4 時間を必要とし

た。菌量の 1×10^8 cells/ml では 99.9% 殺菌効果は CXD で約 2 時間であるのに対し、CEX はやはり約 4 時間必要とした。また培地を人尿に変えたところ、Fig. 6 に示すように、菌量約 1×10^7 cells/ml では CXD と CEX において有意差は認められなかった。

しかし、薬量を約 1×10^8 cells/ml にすると CEX はまったく殺菌的效果を示さなかったが、CXD は低菌量の時と同様に強い殺菌作用を示した。この時の形態を光学顕微鏡で観察すると、CEX は filament 化していたのに対し、CXD はほとんど elongation せずに溶菌していた。

Fig. 7 Effect of CXD and CEX on viability of *E. coli* K-12

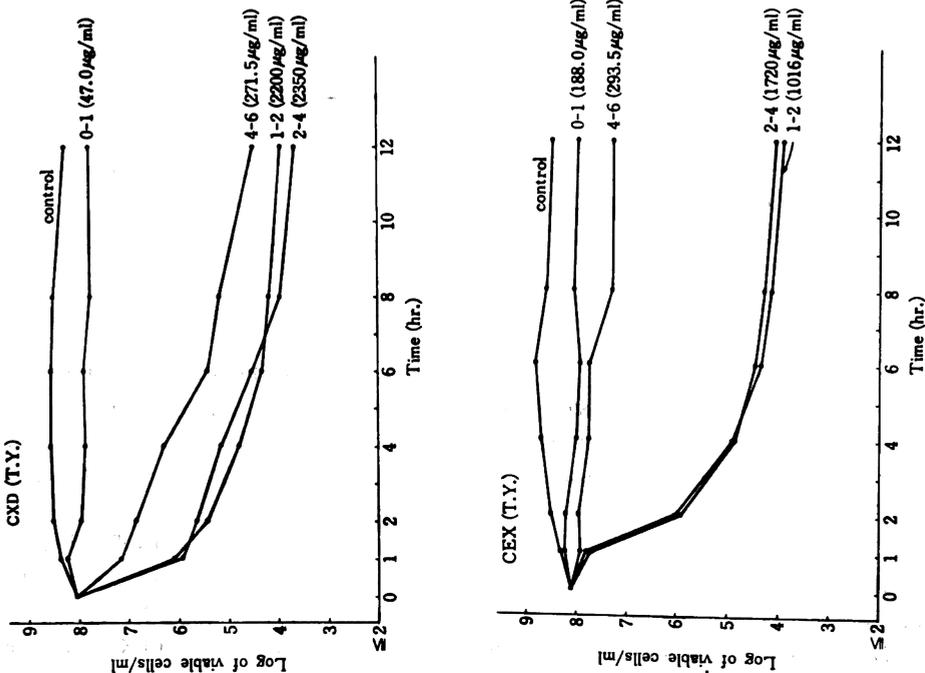


Fig. 8 Effect of CXD and CEX on viability of *E. coli* K-12

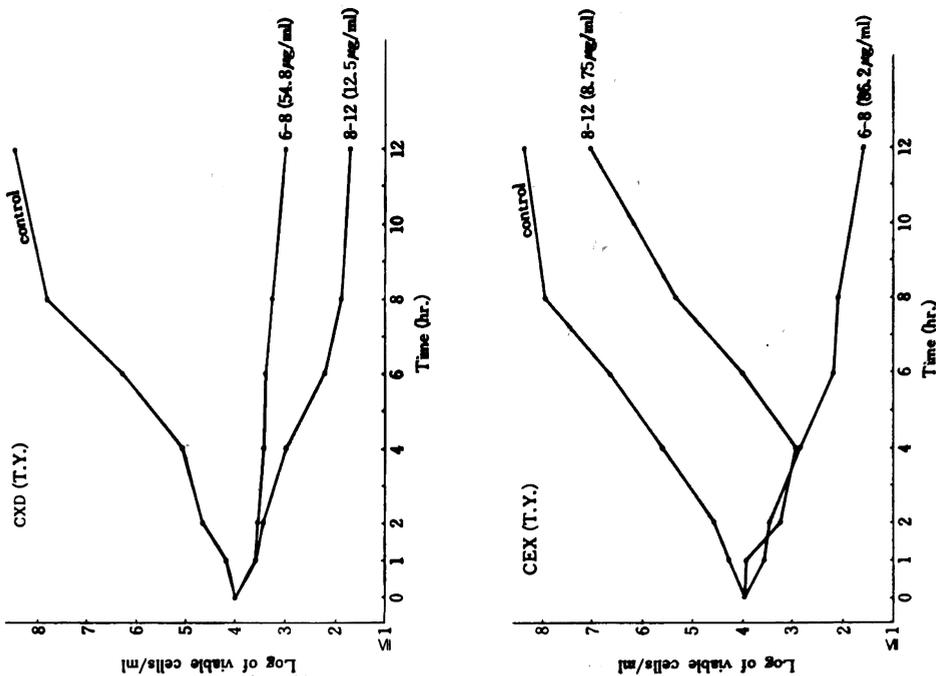
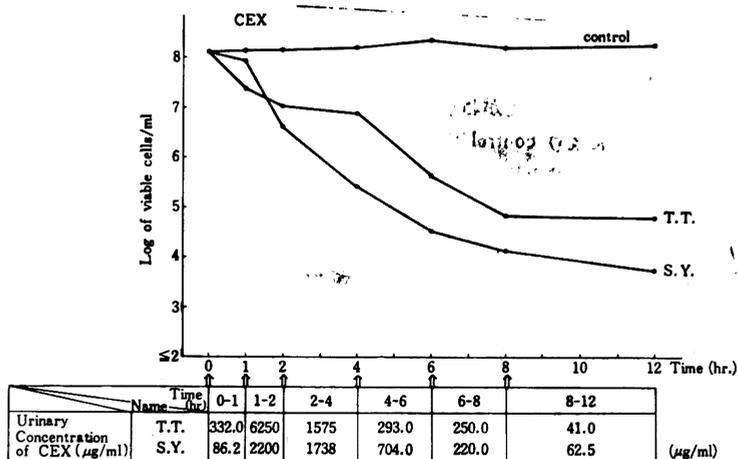
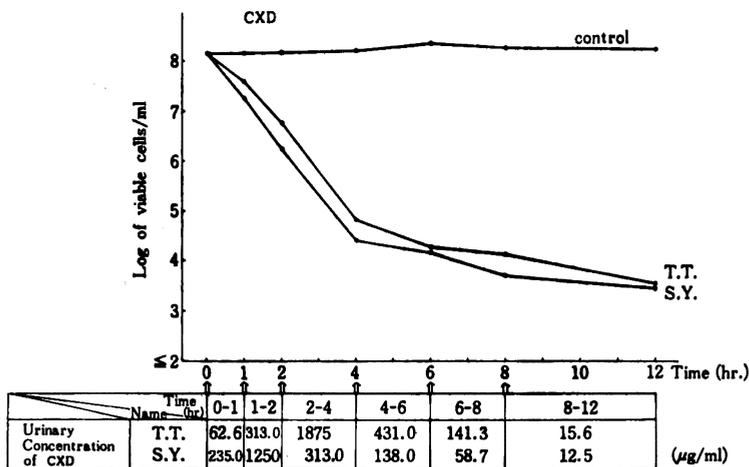


Fig. 9 Bactericidal activity of CXD and CEX excreted in urine after oral administration (250 mg)



3. 健康な Volunteer より得られた尿を用いての殺菌作用

CXD, CEX の250 mg (力価) を3名に経口投与し、0~1, 1~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~10時間の尿を採取し、その尿を使用し以下の実験を行った。3名の各時間の尿量と尿中濃度を Table 2 に示した。

Fig. 7 は T.Y. より採取した0~1, 1~2, 2~4, 4~6の各時間の尿中に菌量約 2×10^8 cells/ml の *E. coli* K-12 を加え、経時的に生菌数を測定したものである。CXD は CEX より1~2, 2~4 時間目の尿で初期殺菌力に優れており、また4~6 時間目の尿において CEX より有意に殺菌力が優れていた。Fig. 8 は 6~8, 8~12

時間目の尿中に菌量の 1×10^4 cells/ml を加え同様の実験を行ったもので、8~12時間目の尿で CXD の殺菌的作用を示すのに対し、CEX は4時間目より再増殖がみられた。

次に、Fig. 9 に示すように、T.T., S.Y. より採取した尿を用いて各時間ごとの尿で経時的に菌を順次置換させていき、殺菌作用を比較した。すなわち、尿中排泄の経時的な尿中濃度の変化に対応して菌がどのように殺菌されていくか、より生体内に近い条件下で実験を行うこととした。

CXD は CEX より全体的に優れた殺菌作用を示し、特に4時間目付近で CXD は CEX より T.T. で約100

倍, S.Y. で約10倍ほど強い殺菌力を示した。

考 察

現在, 経口で有効なセファロスポリン系抗生物質は Cephalexin (CEX), Cephadrine (CED) と僅かしかなく新しい経口セファロスポリン系抗生物質の開発が望まれて来た。今回スイス CIBA-GEIGY 社で開発された CXD はこれまでの CEX, CED 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ており, その抗菌力は CEX, CED とほぼ同程度であった。しかしながら, *in vivo* におけるマウス実験的感染症に対する ED₅₀ 値は, 菌種にもよるが 2~3 倍程度 CXD が優っていた⁴⁾。また, 臨床分野でも高い有効率を示している⁵⁾。今回の私どもの尿を使用した *E. coli* K-12 の実験より, 以下のようなことが考えられた。増殖曲線におよぼす影響で CXD は高菌量において 100~300 µg/ml の濃度で CEX と大きな差が認められた。すなわち, HIB および尿中で CXD は, 100~250 µg/ml で強力な殺菌作用を示したのに比べ, CEX は静菌的な作用しか示さなかった。これら殺菌力の差については次報においてさらに詳細に検討を加えたい。なお, 尿を培地がわりに使用した今回の実験では, 尿の使用により control 中の菌は増殖速度が HIB 使用時より鈍く, また増殖限界も約 5×10^8 cells/ml 付近であることに注意しておかなければならない。また, 経口投与後の尿中排泄の Simulation model を作製し, CXD および CEX の殺菌作用を検討した実験では, HIB 中で CXD が CEX より強い殺菌効果を示した。また, HIB を尿に変えた場合, 低菌量 (約 1×10^7 cells/ml) では CXD と CEX では差が認められなかったが, 高菌量 (約 1×10^8 cells/ml) では CXD の殺菌作用は低菌量の時と同様なのに対し, CEX は全く殺菌作用を示さなくなった。これは CEX が初期濃度 (80 µg/ml) で菌に対する殺菌作用を持たず静菌的な作用を示すため, 後に高い濃度を与えても菌は静菌的に近い状態になっているため薬が効かなくなったのではないかと考えられる。薬剤経口投与後の各時間の尿サンプルを培地がわりに用い増殖曲線を見ると, CXD は CEX に比べ, 1~2, 2~4 時間目の尿で初期殺菌能に優れ, 4~6 時間目の尿でも殺菌作用を持っていた。また, 8~12 時間目の尿では CEX は再増殖していた。これらの結果から CXD は CEX より強い殺菌力と抑制効果を持

っており, CEX より長時間, 菌の増殖を抑えることを期待できるのではないかと思われた。これらの結果は, 臨床的に CXD の 3 回投与と CEX の 4 回投与が同等の効果であるとの結果にも一致するようになる。この実験はここに示した T.Y. の他にも 3 名の尿を使用して検討したが, 同様の傾向が認められた。次に, 同じように採取した尿サンプルを用い, 菌を時間ごとに採取した尿サンプルに作用させた場合も CXD は CEX より優れた殺菌作用を示した。

これらの結果は全て高菌量での実験であり, どの程度, 臨床分野に反映されるかはわからない。しかし, 例え CEX の効力が極端に減じる高菌量の状態でも, CXD は相変わらず強力な抗菌作用を持ち続けることができ, 時間的にも CEX より長時間抗菌作用を期待出来るであろうと思われる。これらの実験結果は CXD の優れた特性を示唆しているように思われる。

なお, これらの Simulation model の実験方法, 尿中排泄濃度と尿量との関係による実験への影響, 尿使用による尿成分からの実験への影響など, 今後さらに検討しなければならないと考えている。

文 献

- 1) CASTAÑER, J. & A. C. PLAYLE : CGP-9000. Drugs of the Future 2 : 574~578, 1977
- 2) 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
- 3) VISCHER, W. A. ; O. ZAK, E. A. KONOPKA, H. FEHLMANN, J. REGOS & 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
- 4) 西野武志, 吉本 正, 谷野輝雄 : 新しい経口セファロスポリン系抗生物質 Cefroxadine (CGP-9000) に関する細菌学的研究。Chemotherapy 28(S-3) : 51~71, 1980
- 5) 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

ANTIBACTERIAL EFFECT OF CEFROXADINE (CGP-9000) IN THE URINE

TADASHI YOSHIMOTO, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The antibacterial activity of Cefroxadine (CGP-9000, CXD) a newly synthesized orally effective cephalosporin, in the urine was studied by use of *Escherichia coli* K-12. The following results were obtained.

CXD showed more rapid and stronger bactericidal activity both in heart infusion broth and in the urine at a large inoculum size (about $1\sim 2 \times 10^8$ cells/ml) than Cephalexin (CEX), when the activity was evaluated by effect on growth curve. In particular, the bactericidal activity of CXD was by far stronger at concentrations of 125~500 $\mu\text{g/ml}$ than that of CEX.

The urinary excretion of CXD was measured in the course of time after administration and a simulation model was prepared for comparison with that of CEX. The time needed to kill 99.9% of *E. coli* K-12 was measured by use of heart infusion broth. CXD was superior by 2 times or more to CEX. The former exerted strikingly powerful bactericidal activity even in the urine containing microorganisms in high concentrations, whereas the latter showed no bactericidal effect.

In order to perform *in vitro* studies under conditions as similar as possible to those in practical clinics, CXD and CEX were given orally by a cross-over method, and urine samples were collected in the course of time after administration. The effect of urine samples on growth curve was examined.

The 1~2 and 2~4 hours' urines of CXD showed stronger bactericidal activity than those of CEX, and the 4~6 hours' urine of CXD was still bactericidal. By contrast, microorganisms regrew in the urines of 6~8 and 8~12 hours following the CEX administration.

The urine samples collected after the cross-over medications of CXD and CEX were also examined for their antibacterial potency with use of *E. coli* K-12 in sequence of times after administration. CXD was about 10 times stronger in potency than CEX.