

## Cefoperazone (T-1551) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

南 新三郎・松原信之・村岡拓己

倉茂達徳・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

Cefoperazone (CPZ, T-1551) の抗菌力を日本化学療法学会標準法に従って測定し, cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM) を対照薬として検討を加えた結果, CPZ はグラム陽性菌, グラム陰性菌に対して広範囲の抗菌スペクトラムを有するという知見を得た。グラム陽性菌に対しては CEZ とほぼ同じか, やや劣る成績であった。グラム陰性菌, 特に *P. aeruginosa*, indole positive *Proteus*, *E. cloacae*, *S. marcescens* に対しては CTM, CEZ より優れた抗菌力を有し, 200株の *P. aeruginosa* に対する80%発育阻止濃度が  $6.25 \mu\text{g/ml}$  と優れていた。

$\beta$ -lactamase に対する安定性を direct spectrophotometric method で検討した結果, 各種グラム陰性菌の産生する cephalosporinase (CSase) に対しては比較薬剤中最も安定であり, R因子支配による penicillinase (PCase) に対しては他のセファロsporin系薬剤と同様に安定であった。

マウス実験感染症に対する治療効果は CEZ, carbenicillin (CBPC) より優れた成績が得られた。

Cefoperazone (CPZ, T-1551) は新合成セファロsporin系抗生物質である<sup>1)</sup>。側鎖に piperacillin<sup>1,2)</sup> の時に導入された 4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarbonyl 基を有している<sup>3)</sup>。

今回われわれは cefazolin, cefotiam, carbenicillin など対照薬剤として *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について検討した。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用菌株

各種病巣由来細菌は当教室保存菌株を用いた。対照としてグラム陽性, 陰性の標準菌株に対する抗菌活性も測定した。

#### 2. 使用薬剤

Cefoperazone (CPZ), ampicillin (ABPC), cephalixin (CEX) (富山化学工業株式会社), carbenicillin (CBPC), cefazolin (CEZ) (藤沢薬品工業株式会社), penicillin G (PCG) (明治製薬株式会社), cephaloridine (CER) (鳥居薬品株式会社), cephalothin (CET), cefamandole (CMD) (塩野義製薬株式会社), cefuroxime (CXM) (新日本実業株式会社), cefotiam (CTM), cefsulodin (CFS) (武田薬品株式会社), cefoxitin (CFX) (第一製薬株式会社) を用いた。

#### 3. 使用培地

Heart infusion agar (栄研, HIA), brain heart infusion broth (Difco, BHB), 1%ペプトン水 (ポリペプトン 10

g, NaCl 5 g, 1l 蒸留水), nutrient broth (N-broth, 肉エキス 10g, ポリペプトン 12g, NaCl 5g, 1l 蒸留水), Medium-B (酵母エキス 2g, ポリペプトン 10g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.2g, グルコース 2g,  $\text{MgSO}_4$  0.4g, 1l 蒸留水) を用いた。

#### 4. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法<sup>4)</sup>に従った寒天平板希釈法によった。すなわち被検菌のペプトン水 37°C 18時間培養液 ( $10^9 \sim 10^8$  cells/ml) を  $10^6$  cells/ml になるように希釈し, その一白金耳を薬剤含有培地に接種し, 37°C 18時間培養後, 被検菌の発育が認められない最小濃度をもって minimum inhibitory concentration (MIC) とした。

ヒト血清添加時の MIC 値は, ヒト血清を 0, 10 および 40% になるように加えた HIA を用い, 寒天平板希釈法によって求めた。

#### 5. 殺菌力測定

1 菌種につき 25 株を用い, loop transfer 法により minimum bactericidal concentration (MBC) を求めた。さらに培養液に薬剤添加後, 経時的に生菌数を測定した。用いた培地は N-broth である。

#### 6. 接種菌量の MIC におよぼす影響

接種菌量の 10 倍希釈系列を作り, MIC を測定した。

#### 7. $\beta$ -lactamase に対する安定性

BHB にて前培養した菌液を Medium-B にて大量培養

Table 1 Antibacterial activity of CPZ against standard strain of bacteria

Test organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	CPZ	CEZ
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	0.78	0.39
<i>S. aureus</i> TERASHIMA	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> SMITH	0.78	0.78
<i>S. epidermidis</i> IID866	0.39	0.39
<i>Streptococcus faecalis</i> IID682 <sup>a</sup>	25	200
<i>S. pyogenes</i> S-8 <sup>a</sup>	0.2	0.2
<i>S. pyogenes</i> Cook <sup>a</sup>	$\leq 0.1$	$\leq 0.1$
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.39	0.39
<i>Clostridium perfringens</i> IID520 <sup>a</sup>	1.56	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i> IID854 <sup>a</sup>	$\leq 0.1$	$\leq 0.1$
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	$\leq 0.1$	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IID875	$\leq 0.1$	3.13
<i>Salmonella typhosa</i> IID611	$\leq 0.1$	3.13
<i>S. paratyphi</i> IID605	0.2	3.13
<i>S. schottmuelleri</i> IID607	$\leq 0.1$	3.13
<i>S. enteritidis</i> IID604	$\leq 0.1$	3.13
<i>Shigella flexneri</i> IID642	$\leq 0.1$	3.13
<i>S. boydii</i> EW28	$\leq 0.1$	3.13
<i>Serratia marcescens</i> IID620	0.2	>200
<i>Proteus vulgaris</i> IID874	0.78	>200
<i>P. morgani</i> IID602	0.78	>200
<i>Enterobacter cloacae</i> IID977	0.78	>200
<i>E. aerogenes</i> IID97	$\leq 0.1$	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID1001	1.56	>200
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	0.78	>200
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	$\leq 0.1$	>200

a HIA supplemented with 10% sheep blood

した。5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、同一緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。その後10,000 G 30分間冷却下遠心し、その上清を粗酵素液とした。Penicillinase (PCase) 産生株、および *E. coli* GN 5482を除いた cephalosporinase (CSase) 産生株の場合は、培養後3時間目に PCG を加えて培養した菌体から酵素を抽出した。各薬剤の加水分解速度は direct spectrophotometric method<sup>5)</sup> を用いて測定した。各薬剤の基質濃度は 100  $\mu\text{M}$  で、用いた緩衝液は 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、反応温度は 30°C で測定を行なった。PCase では PCG を 100 とし、CSase では CER を 100 とした相対加水分解速度で各薬剤の加水分解速度を表示した。なお蛋白定量は Lowry 法<sup>6)</sup> を用いて測定した。

#### 8. 50%菌発育阻止濃度 (ID<sub>50</sub>) の測定<sup>7)</sup>

ペプトン水前培養菌液を希釈して、約 300 個の菌を種

々の濃度の薬剤を含む HIA 平板に接種し、37°C 18時間培養後、平板上のコロニー数を測定し ID<sub>50</sub> 値を算出した。

#### 9. マウス感染防禦実験

ICR 系雄マウスを 1 薬剤濃度について 1 群 20 匹使用した。マウス腹腔内に感染させ、薬剤の投与は皮下注射を用いた。薬剤は感染後 1 時間、4 時間後 2 回に分けて投与した。感染 7 日後の生存率から ED<sub>50</sub> 値を求めた。算定方法は LITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>8)</sup> に基づき、95% 信頼限界値を計算により算出した。

## II. 実験結果

### 1. 標準菌株を用いた抗菌スペクトラム

CPZ の抗菌スペクトラムを CEZ を対照薬として比較検討した。その成績を Table 1 に示した。CPZ の抗菌力はグラム陽性菌に対しては CEZ とほぼ同程度であった。しかし、グラム陰性菌に対しては従来の  $\beta$ -lactam 系薬剤が無効な菌種も含めて、極めて強い抗菌力を示した。特に *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. cloacae* などに強い抗菌力を示した。

### 2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床分離菌株の 12 菌種、1361 株について、10<sup>6</sup> cells/ml 1 白金耳の接種における各菌種の薬剤感受性分布を Fig. 1~12 に示した。対照薬は CEZ, CTM を用いた。

*S. aureus*: CPZ の感受性分布は 1.56  $\mu\text{g/ml}$  にピークがあり、3.13  $\mu\text{g/ml}$  の薬剤濃度で約 95% の菌の発育を阻止したが CEZ よりやや抗菌力は劣っていた (Fig. 1)。

*E. coli*: 200 株に対する感受性のピークは、CPZ では 0.1  $\mu\text{g/ml}$  にあり、CEZ に比べ強い抗菌力を示した。CEZ が全く抗菌力を示さない薬剤濃度 0.39  $\mu\text{g/ml}$  で、CPZ は約 60% の菌の発育を阻止した。しかし、CEZ に比して感受性分布は鋭いピークを示さず、やや分布はブロードであった。高度耐性菌 (MIC > 100  $\mu\text{g/ml}$ ) は CPZ, CEZ とともにほとんどみられなかった (Fig. 2)。

*K. pneumoniae*: CPZ の 100 株に対する感受性分布は 0.2  $\mu\text{g/ml}$  に 1 つのピークを示し、0.78~12.5  $\mu\text{g/ml}$  にブロードな分布がみられ、CEZ に比して強い抗菌作用を示した。高度耐性菌 (MIC > 100  $\mu\text{g/ml}$ ) は *E. coli* と同様両薬剤ともに、ほとんどみられなかった (Fig. 3)。

*P. mirabilis*: 100 株に対する CPZ の感受性分布は 0.78  $\mu\text{g/ml}$  にピークを示し、CEZ に比し強い抗菌力を示し、CTM と同程度であった。1.56  $\mu\text{g/ml}$  の薬剤濃度では、CPZ は約 85% の菌の発育を阻止したが、CEZ はこの濃度では全く抗菌力を示さなかった (Fig. 4)。

Indole positive *Proteus* [*P. morgani* (69 株), *P. vulgaris* (70 株), *P. rettgeri* (40 株), *P. incostans* (30 株)]: *P. rettgeri* を除いた 3 菌種では CPZ の感受性分布は 1.56

Fig. 1 Antibacterial activity of CPZ

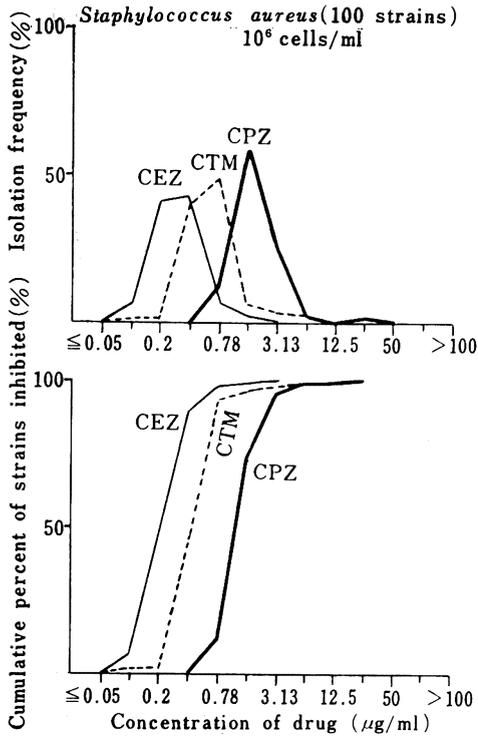


Fig. 2 Antibacterial activity of CPZ

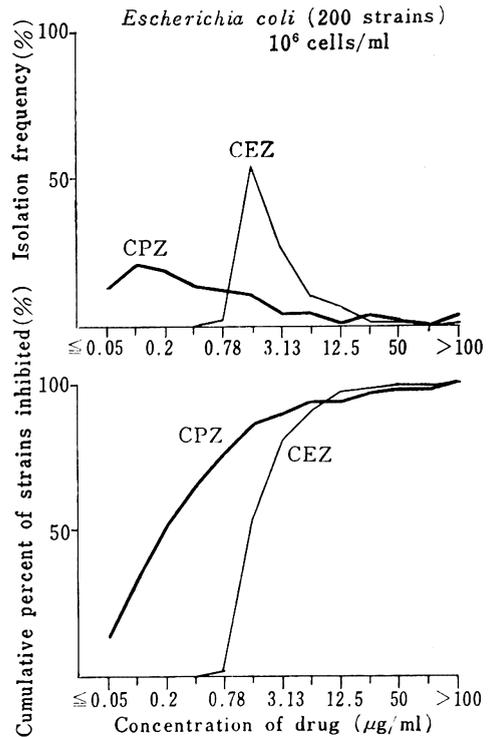


Fig. 3 Antibacterial activity of CPZ

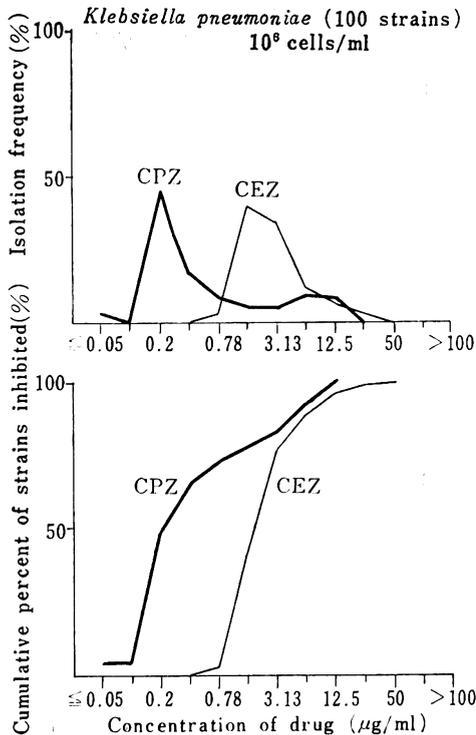


Fig. 4 Antibacterial activity of CPZ

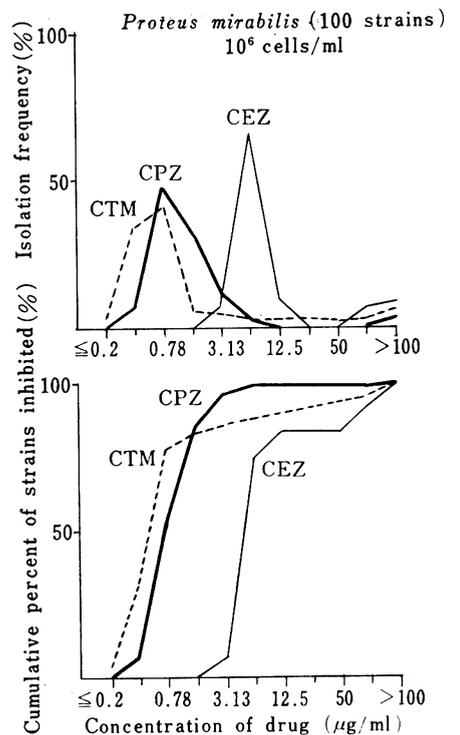


Fig. 5 Antibacterial activity of CPZ

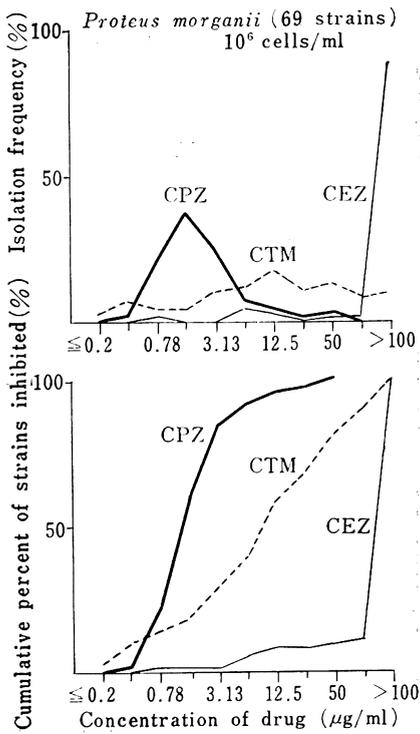


Fig. 6 Antibacterial activity of CPZ

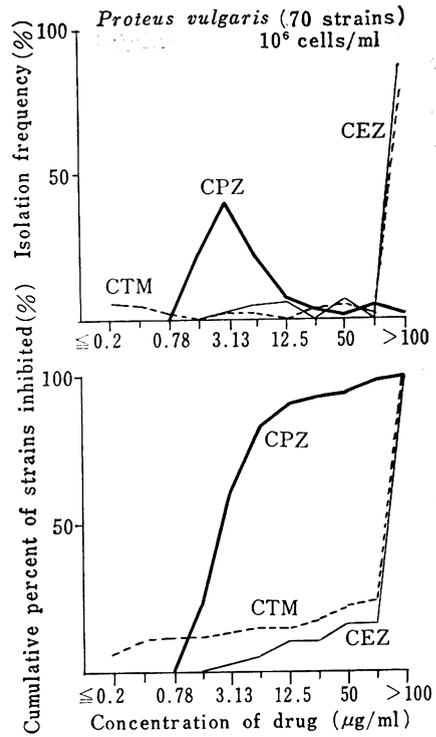


Fig. 7 Antibacterial activity of CPZ

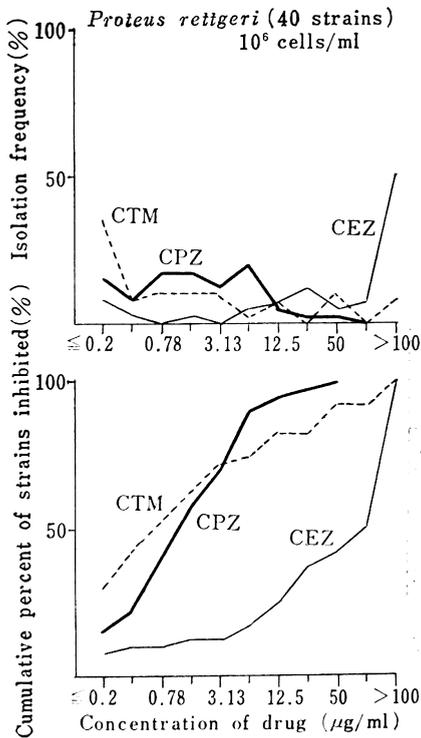


Fig. 8 Antibacterial activity of CPZ

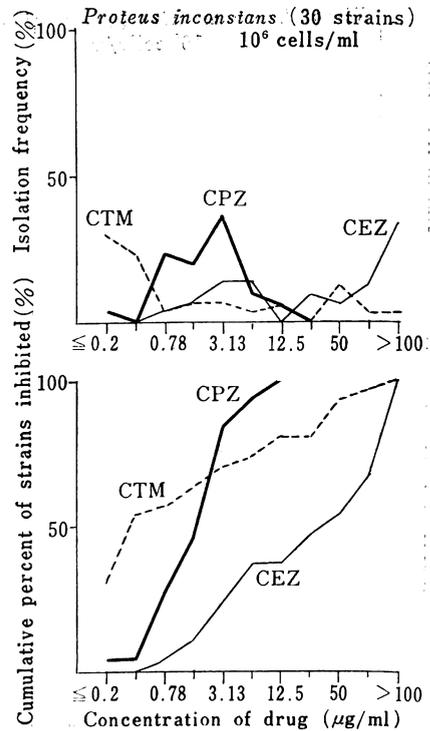


Fig. 9 Antibacterial activity of CPZ

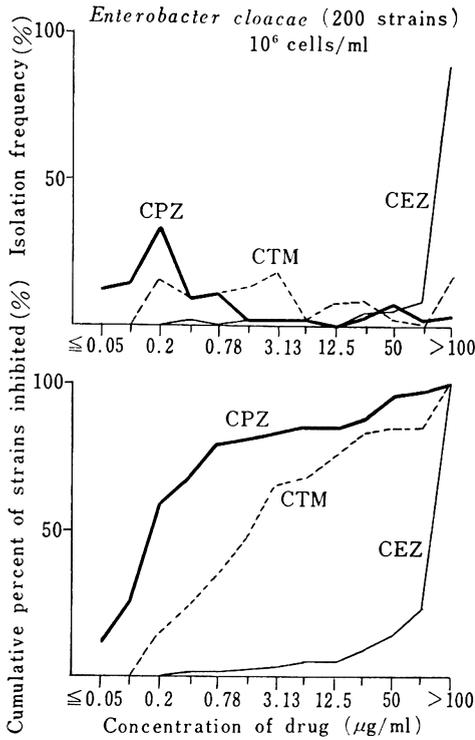


Fig. 10 Antibacterial activity of CPZ

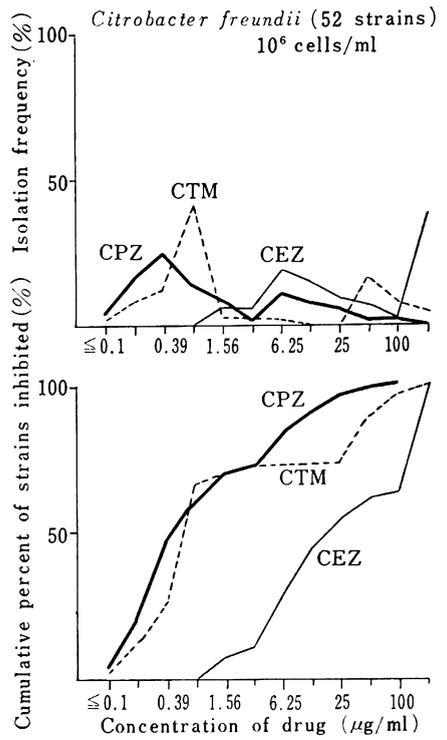


Fig. 11 Antibacterial activity of CPZ

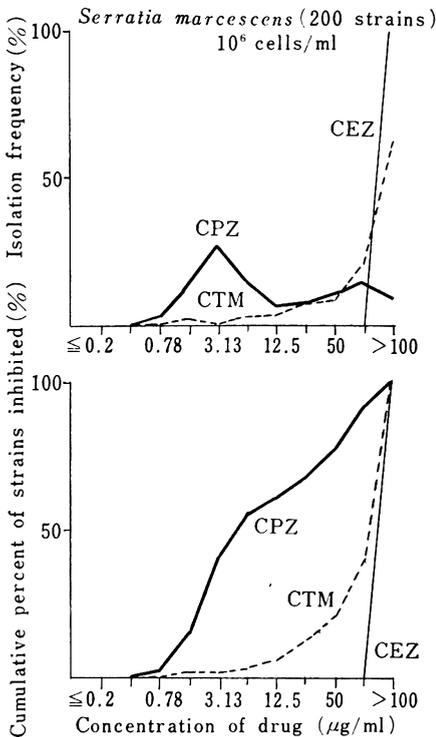


Fig. 12 Antibacterial activity of CPZ

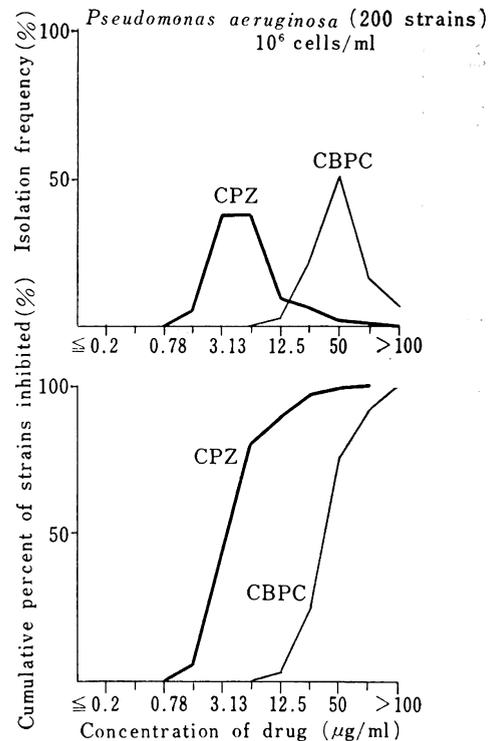
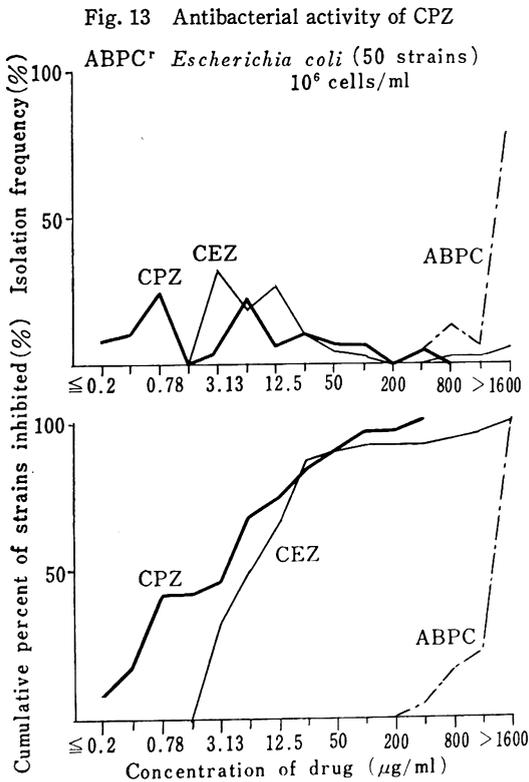


Table 2 Antibacterial activity of CPZ against clinical isolates of bacteria

Organism	No. of strains	Drug concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>			
		MIC <sub>50</sub>		MIC <sub>70</sub>	
		CPZ	CEZ	CPZ	CEZ
<i>E. coli</i>	200	0.19	1.46	0.53	2.28
<i>K. pneumoniae</i>	100	0.21	1.81	0.61	2.72
<i>P. aeruginosa</i>	200	3.60	<100	5.19	<100
<i>S. marcescens</i>	200	5.40	<100	19.0	<100
<i>P. mirabilis</i>	100	0.76	4.90	1.15	6.00
<i>P.morganii</i>	69	1.30	<100	2.05	<100
<i>P. vulgaris</i>	70	2.50	<100	4.50	<100
<i>P. rettgeri</i>	40	1.13	100	3.13	<100
<i>P. inconstans</i>	30	1.62	36.0	2.40	<100
<i>C. freundii</i>	52	0.47	18.0	2.00	<100
<i>E. cloacae</i>	100	0.16	<100	0.45	<100
<i>S. aureus</i>	100	1.20	0.21	1.52	0.28

<sup>a</sup> MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>70</sub> represented the concentrations required to inhibit the growth of 50 and 70%, respectively, of the total number of strains used.



~3.13 $\mu\text{g/ml}$ に明瞭なピークを示し、CEZ、CTMより極めて強い抗菌力を示した。*P. rettgeri*では明瞭なピークを示さず、分布はブロードであった。これはCEZ、CTMにも共通にみられた (Fig. 5, 6, 7, 8)。

*E. cloacae*: 200株に対する感受性分布はCPZで0.2 $\mu\text{g/ml}$ に大きなピークと50 $\mu\text{g/ml}$ に小さなピークの2峰性の分布を示し、CEZ、CTMより強い抗菌力を示した (Fig. 9)。

*C. freundii*: 52株に対する感受性分布は、CPZで0.39 $\mu\text{g/ml}$ に大きなピーク、6.25 $\mu\text{g/ml}$ に小さなピークの2峰性の分布を示した。抗菌力はCEZよりはるかに優れており、CTMとはほぼ同様であった。1.56 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度では、CPZは約70%の菌の発育を阻止し、CTMと同じであった (Fig. 10)。

*S. marcescens*: 200株に対する感受性分布のピークは3.13 $\mu\text{g/ml}$ にピークを示し、CEZ、CTMよりはるかに強い抗菌力を示した。12.5 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で、CPZは約60%の菌の発育を阻止したが、CEZ、CTMはほとんど抗菌作用を示さなかった。高度耐性菌 (MIC>100 $\mu\text{g/ml}$ )がCPZでは約10%みられた (Fig. 11)。

*P. aeruginosa*: 200株に対するCPZの感受性分布は3.13 $\mu\text{g/ml}$ ないし6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークがみられ、CBPCより優れた抗菌力を示した。薬剤濃度6.25 $\mu\text{g/ml}$ で、CPZは80%の菌の発育を阻止したがCBPCは全く菌の発育を阻止しなかった。200株中CPZに対する高度耐性菌 (MIC>100 $\mu\text{g/ml}$ )はみられなかった (Fig. 12)。

Fig. 14 Antibacterial activity of CPZ

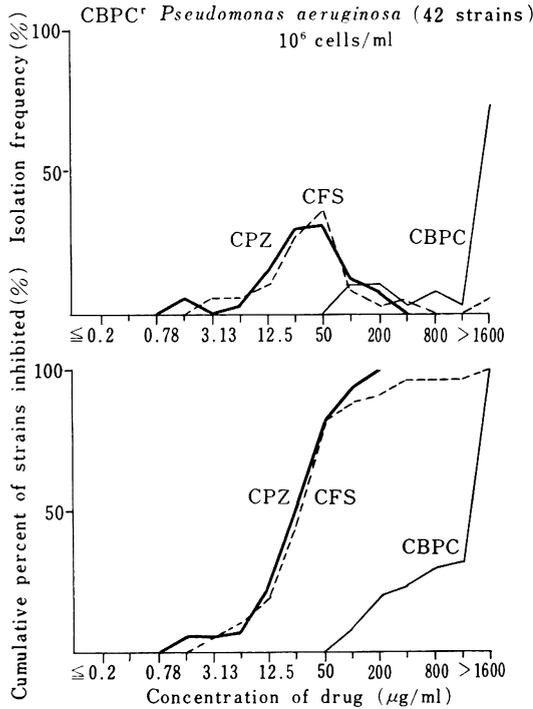


Fig. 15 Antibacterial activity of CPZ

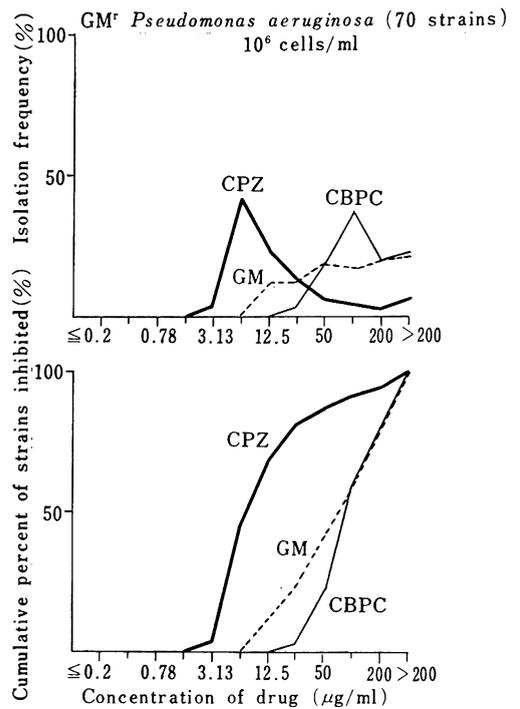


Table 3 Effect of human serum on antibacterial activity of CPZ

Human serum (%)	MIC (µg/ml)							
	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>	
	GN 6291	GN 6292	GN 6306	GN 6717	GN 6727	GN 7855	MS 11103	MS 11106
0	0.1	0.2	0.39	12.5	6.25	6.25	1.56	1.56
10	0.39	0.2	0.39	12.5	6.25	12.5	1.56	3.13
40	0.39	0.39	0.78	12.5	12.5	12.5	3.13	3.13

臨床分離菌に対する CPZ の抗菌力を CEZ と比較して Table 2 にまとめた。調べた菌株のそれぞれ50%および70%の株の発育が阻止される濃度をもって示した。グラム陰性菌ではCEZよりはるかに優れた抗菌作用を持つことがわかった。

3. 各種耐性菌に対する抗菌力

ABPC 耐性 *E. coli*, CBPC および GM 耐性 *P. aeruginosa* に対する感受性を調べた (Fig. 13~15)。

ABPC 耐性 *E. coli*: ABPC に対し 400 µg/ml 以上の MIC を示す *E. coli* 50株についての CPZ の感受性分布は、0.78 µg/ml およびに 6.25 µg/ml に比較的大きなピーク、400 µg/ml に小さなピークの 3 峰性の分布パターンを示した。抗菌力は CEZ より優れていたが、MIC が 100 µg/ml 以上を示す耐性菌が約10%存在していた (Fig. 13)。

CBPC 耐性 *P. aeruginosa*: CBPC に対して 100 µg/ml 以上の MIC を示す 42株に対する感受性分布は、CPZ で 25~50 µg/ml にピークを有し、CFS と同程度の抗菌力を示した。薬剤濃度 50 µg/ml で CPZ は約80%の菌の発育を阻止した (Fig. 14)。

GM 耐性 *P. aeruginosa*: GM に対して 12.5 µg/ml 以上の MIC を示す 70株に対する感受性分布は、CPZ で 6.25 µg/ml にピークを示し、交差耐性はみられなかった (Fig. 15)。

4. 抗菌力におよぼす血清の影響

*E. coli* (3株), *P. aeruginosa* (3株), *S. aureus* (2株) の臨床分離株について血清添加の抗菌力におよぼす影響について検討した。血清の添加率を 0, 10, 40% と変えてみたところ、CPZ の MIC は、血清40%添加時に

Fig. 16 Relation between MIC and MBC

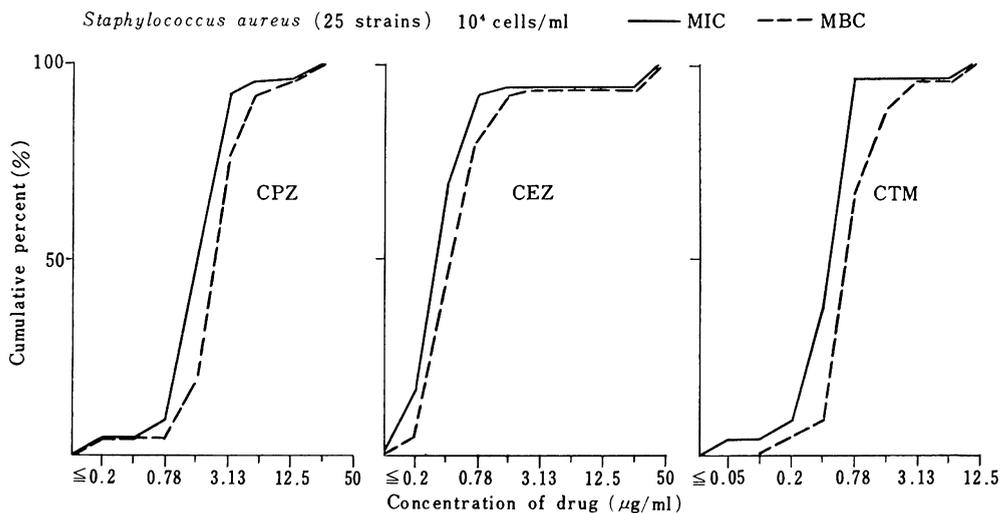
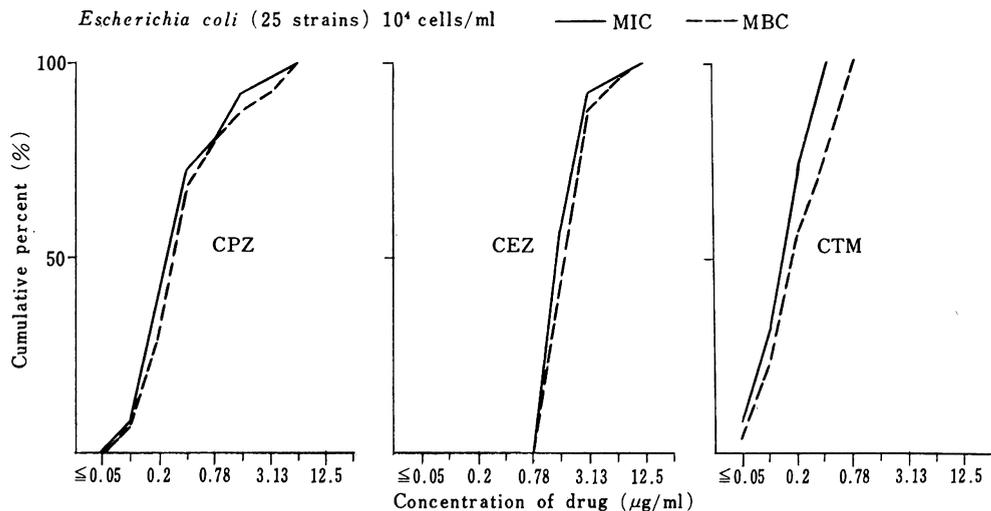


Fig. 17 Relation between MIC and MBC



やや悪くなる傾向をみせた (Table 3)。これは他の  $\beta$ -lactam 系薬剤にもみられる傾向である。

#### 5. 殺菌効果

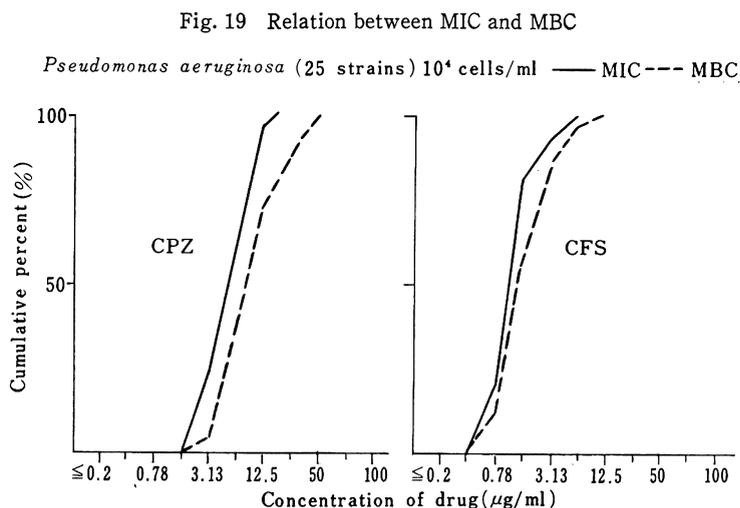
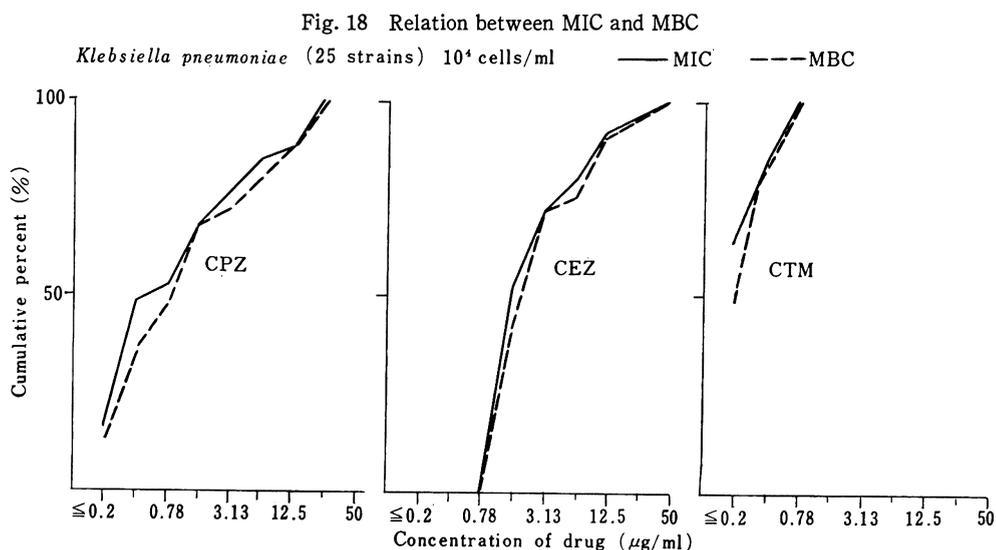
*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* おおの25株の臨床分離株を用いて CPZ の MIC と MBC を比較検討した。対照薬剤として CEZ, CTM を用い, *P. aeruginosa* に対しては CFS を対照薬とした。

*E. coli*, *K. pneumoniae* では CPZ および比較薬剤ともに MIC, MBC はほとんど一致しており, 殺菌的に作用していることがわかった。また *S. aureus*, *P. aeruginosa* では一管程度 MBC が MIC より高くなっていたが, 同様に殺菌的に作用していた (Fig. 16~19)。

この殺菌的作用は細菌の増殖曲線におよぼす薬剤の影響からも確認された。*E. coli*, *K. pneumoniae* において CPZ では, 薬剤添加後 MIC の 1/2, 1/4 の濃度でも急激な生菌数の減少がみられ, MIC 以上の濃度では完全に殺菌的に作用していることがわかった。また CEZ と比較して殺菌力においてまさっていることがわかった。*P. aeruginosa* では MIC の 1/2 以上の濃度では時間とともに生菌数の減少がみられたが, *E. coli*, *K. pneumoniae* ほど急激な生菌数の減少はみられなかった。しかし殺菌的作用は確認された (Fig. 20~22)。

#### 6. 接種菌量の MIC におよぼす影響

*E. coli* ML 4707, *S. marcescens* IID 620 の2株を用い



て、接種菌量の影響を検討した。*E. coli* では CEZ を、*S. marcescens* では CFX を比較薬剤とした。*E. coli*、*S. marcescens* とともに CPZ は接種菌量が少なくなるにつれて MIC 値は著しく減少し、特に *S. marcescens* では顕著であった。一方、比較薬剤の CEZ、CFX とともに MIC はほとんど変化しなかった (Fig. 23, 24)。

#### 7. 50%菌発育阻止濃度 ( $ID_{50}$ )

従来の抗菌性物質の抗菌力測定と異なり、より正確に薬剤の抗菌作用を測定する目的で  $ID_{50}$  の測定法が当教室で開発された<sup>7)</sup>。

約 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*、*P. aeru-*

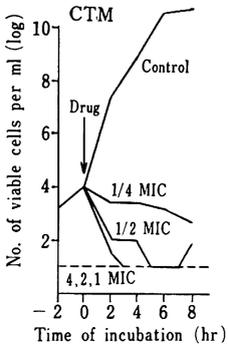
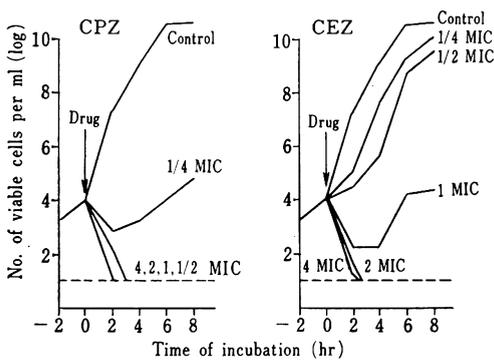
*ginosa* を用いて検討した<sup>8)</sup>。

*E. coli* および *K. pneumoniae* においては、CPZ の  $ID_{50}$  値はそれぞれ約  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.08 \mu\text{g/ml}$  であり、CEZ のそれは  $0.5 \mu\text{g/ml}$  および  $0.8 \mu\text{g/ml}$  であった。従って CPZ は *E. coli*、*K. pneumoniae* において CEZ の約 10 倍近い抗菌力を示した。また *P. aeruginosa* では、CPZ の  $ID_{50}$  は約  $5 \mu\text{g/ml}$  で CBPC の  $50 \mu\text{g/ml}$  に比べて同じく 10 倍近い抗菌力を示した (Fig. 25~27)。

#### 8. $\beta$ -lactamase に対する安定性

CPZ の  $\beta$ -lactamase に対する安定性を各種セファロスポリン系薬剤を対照として比較検討した。各種グラム陰性桿菌の産生する CSase<sup>9~11)</sup> に対しては、CPZ は比較薬剤中最も安定で CER の加水分解速度を 100 とした場合

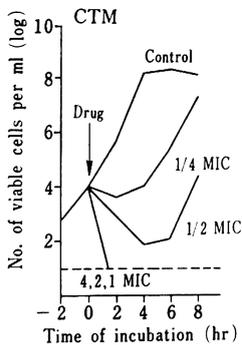
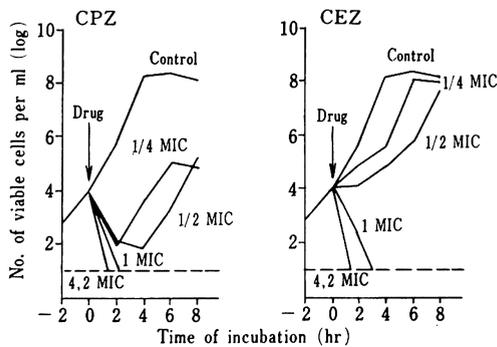
Fig. 20 Bactericidal activity of CPZ



Drug	CPZ	CEZ	CTM
MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.39	1.56	0.2

*E. coli* GN 6307  
N-broth

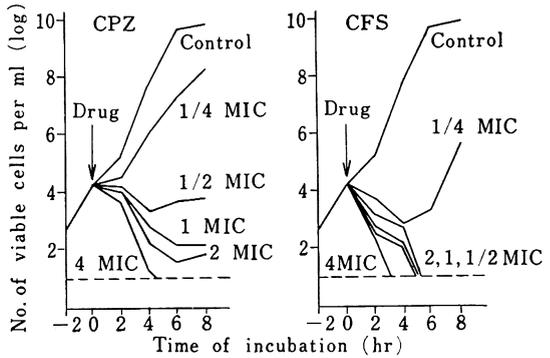
Fig. 21 Bactericidal activity of CPZ



Drug	CPZ	CEZ	CTM
MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.39	1.56	0.2

*K. pneumoniae* GN 5558  
N-broth

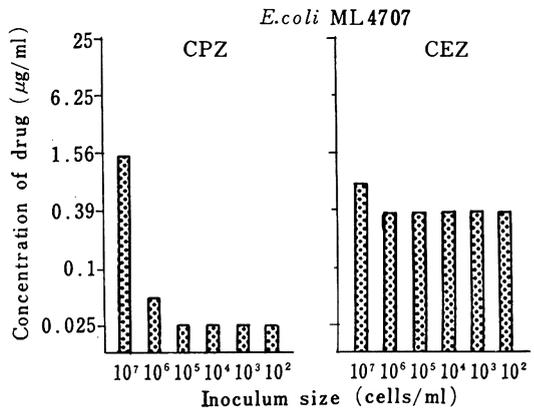
Fig. 22 Bactericidal activity of CPZ



Drug	CPZ	CFS
MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	12.5	1.56

*P. aeruginosa* GN 6736  
N-broth

Fig. 23 Effect of inoculum size on MIC

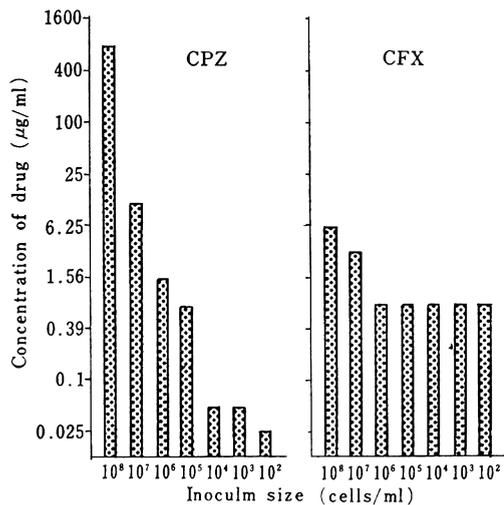
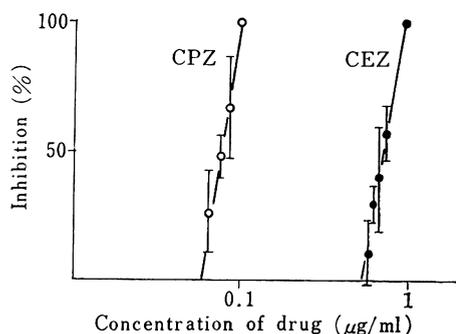
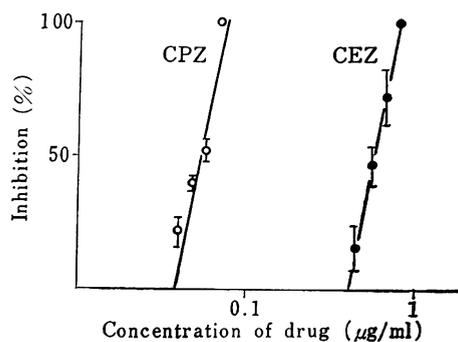
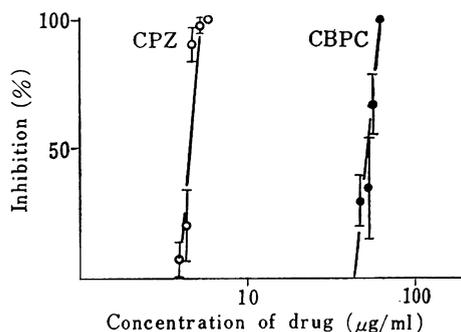


*P. vulgaris* の産生する CSase を除いて、すべて1以下であった。*P. vulgaris* の産生する CSase では他の菌種の CSase に比べてやや不安定であったが、他の薬剤よりも安定であった。

R因子支配による PCase<sup>12-14</sup>) に対しては、CPZ は他のセファロスポリン系薬剤と同様に安定であった。I型 PCase や *K. pneumoniae* GN 69 の産生する PCase に対しては CEZ, CET, CEX と比較するとやや不安定であった。II型、IV型の PCase に対しては安定であった (Table 4)。

9. マウス実験的感染症に対する治療効果

CPZ の生体内抗菌力を、*E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445, *P. aeruginosa* NC-5 の3菌種を用いて、

Fig. 24 Effect of inoculum size on MIC  
*S. marcescens* IID 620Fig. 25 Inhibitory effect of CPZ on *E. coli* ML 4707Fig. 26 Inhibitory effect of CPZ on *K. pneumoniae*  
GN6445Fig. 27 Inhibitory effect of CPZ on *P. aeruginosa*  
NC-5Table 4 Stability of CPZ against  $\beta$ -lactamases

Enzyme source	Type of $\beta$ -lactamases	Specific <sup>b</sup> activity	Relative rate of hydrolysis <sup>a</sup>						
			CER	CPZ	CEZ	CET	CEX	CMD	PCG
<i>E. coli</i> GN5482	CSase	0.24	100	<0.04	135	691	55.5	<0.04	28.7
<i>P. aeruginosa</i> GN918	CSase	0.24	100	0.04	160	480	62.9	0.04	24.8
<i>P. vulgaris</i> GN76	CSase	0.40	100	7.00	375	204	52.0	276	21.0
<i>E. cloacae</i> GN7471	CSase	3.68	100	0.80	50	402	54.0	1.70	83.1
<i>C. freundii</i> GN346	CSase	3.27	100	0.01	120	127	81.1	68.9	7.0
<i>P. morgani</i> GN5406	CSase	0.60	100	<0.04	73.5	242	31.0	<0.04	121
<i>E. coli</i> W3630 Rms212 <sup>+</sup>	PCase Type I	2.10	18.2	12.4	7.2	7.3	<1.3	20.5	100
<i>E. coli</i> W3630 Rms213 <sup>+</sup>	PCase Type II	0.23	18.8	<3.9	4.6	9.2	<2.6	11.0	100
<i>P. aeruginosa</i> ML4259	PCase Type IV	0.66	8.6	<0.4	<0.5	<0.5	<0.6	<0.4	100
<i>P. aeruginosa</i> Rms139 <sup>+</sup>	PCase	0.97	15.1	13.7	2.7	2.8	<0.5	1.7	100

<sup>a</sup> Hydrolysis of each substrate by PCase and CSase is expressed as relative rate of hydrolysis taking the absolute rate of PC-G and CER hydrolysis as 100, respectively.

<sup>b</sup> Units per mg of protein

Table 5 *In vivo* antibacterial activity of CPZ against systemic infection

Challenge organism	Challenge dose (cells/mouse)	Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	ED <sub>50</sub> (mg/kg) (95% confidence limit)	
<i>E. coli</i> ML4707	1.2 × 10 <sup>7</sup> (25 LD <sub>50</sub> )	CPZ	0.1	1.40 (1.08—1.83)	} p < 0.05
		CEZ	0.78	16.7 (13.2—21.2)	
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	1.1 × 10 <sup>7</sup> (35 LD <sub>50</sub> )	CPZ	0.1	2.10 (1.53—2.92)	} p < 0.05
		CEZ	0.39	14.3 (10.7—19.3)	
<i>P. aeruginosa</i> NC-5	3.5 × 10 <sup>4</sup> (100 LD <sub>50</sub> ) in 5% mucin	CPZ	12.5	335 (279—410)	} p < 0.05
		CBPC	200	1500 (1190—1920)	

*E. coli*, *K. pneumoniae* では CEZ を, *P. aeruginosa* では CBPC を対照薬として検討した。

*E. coli*, *K. pneumoniae* では CEZ のそれぞれ, 約 1/12, 1/7 量で本剤は同等の治療効果を示した。*P. aeruginosa* では CBPC の約 1/5 量で同等の治療効果を示し, 生体内抗菌力は有意の差 (p < 0.05) が認められた。*In vivo* でも *in vitro* と同様の抗菌力を発揮することがわかった (Table 5)。

### III. 考 察

CPZ はグラム陽性菌および陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有し, 特に従来のセファロsporin 系薬剤が全く無効であった *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *Proteus* 属に対しても強い抗菌作用を示した。このような抗菌スペクトラムの拡大と強力な抗菌力は, おそらく, 膜透過性の増大, ターゲットサイトへの親和性の増大,  $\beta$ -lactamase に対する安定性等の性質によってもたらされたのであろう。しかし, まだその強力な抗菌力がどのような性質に裏付けられているか明確ではない。これから先, さらに詳細な検討が望まれる。

### 文 献

- 1) UEO, K.; Y. FUKUOKA, T. HAYASHI, T. YASUDA, T. TAKI, M. TAI, Y. WATANABE, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-1220, a new semisynthetic penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 12: 455~460, 1977
- 2) 上田 泰: 広域ペニシリン剤 T-1220 の基礎的・臨床的研究のまとめ。 *Chemotherapy* 25(5): 683~699, 1977
- 3) 第27回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム I, T-1551 抄録集, 1979
- 4) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 5) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 789~790, 1974
- 6) ROWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGHT, A. L. FARR & R. T. RANDAAL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 7) KATO, T.; S. KURASHIGE, Y. A. CHABBERT & S. MITSUHASHI: Determination of the ID<sub>50</sub> values of antibacterial agents in agar. *J. Antibiotics* 31: 1299~1303, 1978
- 8) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simple method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol.* 92: 99~113, 1948
- 9) YAGINUMA, S.; T. SAWAI, H. ONO, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Biochemical properties of a cephalosporin  $\beta$ -lactamase from *P. aeruginosa*. *Jap. J. Microbiol.* 17: 141~149, 1973
- 10) SAWAI, T.; S. MITSUHASHI & S. YAMAGISHI: Drug resistance of enteric bacteria XIV. Comparison of  $\beta$ -lactamase in gram-negative rod bacteria resistant to  $\alpha$ -aminobenzyl penicillin. *Jap. J. Microbiol.* 12: 423~434, 1968
- 11) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The gram-negative bacteria and their possible physiological role; In *advances in microbial physiology*, A. H. ROSE and P. W. TEMPEST (ed.), Academic Press Inc., London, vol. 9, p. 31~88, 1973
- 12) YAMAGISHI, S.; K. OHARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI: The purification and properties of penicillin  $\beta$ -lactamases mediated by transmissible R factors in *E. coli*. *J. Biochem.* 66: 11~20, 1969
- 13) EGAWA, R.; T. SAWAI & S. MITSUHASHI: Drug resistance of enteric bacteria. XXI. Unique substrate specificity of penicillinase produced by R factor. *Jap. J. Microbiol.* 11: 173~178, 1967
- 14) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Penicillinases of *K. pneumoniae* and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R factors. *J. Bact.* 115: 1045~1054, 1973

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF  
CEFOPERAZONE (T-1551)

SHINZABURO MINAMI, NOBUYUKI MATSUBARA, TAKUMI MURAOKA,  
TATSUNORI KURASHIGE and SUSUMU MITSUHASHI

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

*In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of cefoperazone (CPZ, T-1551) were compared with those of cefazolin (CEZ) and cefotiam (CTM) against gram-positive and gram-negative bacteria which were isolated from clinical materials in Japan.

CPZ has a broad spectrum of antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. CPZ is more effective than CEZ against gram-negative bacilli, that is, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* species, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. It is noteworthy that CPZ has high antibacterial activity particularly against *P. aeruginosa* and inhibited the growth of more than 80% of the total number of *P. aeruginosa* strains tested at a concentration of 6.25  $\mu\text{g/ml}$ .

CPZ acts bactericidally on bacteria at a minimum inhibitory concentration (MIC) or a little higher concentration.

A remarkable influence of inoculum size on the antibacterial activities of CPZ is observed as shown in the other  $\beta$ -lactam antibiotics.

It is another remarkable characteristic that CPZ is rather stable to  $\beta$ -lactamase produced by gram-negative bacteria. Relative rates of hydrolysis of CPZ by cephalosporinases (CSases) are 7.0 to 0.01, taking the absolute rate of cephaloridine (CER) hydrolysis as 100. CPZ is more stable to various type of penicillinase (PCase) than penicillin G (PCG) and CER.

No great difference is observed in the MIC values of CPZ when human serum is added to the medium.

*In vivo* antibacterial activities of CPZ, CEZ and carbenicillin (CBPC) were compared using the systemic infections of mice with *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli*. The ED<sub>50</sub> values (mg/kg) were consistently less than those of CEZ and CBPC.