

Cefoperazone (T-1551) の細菌学的評価

才川 勇・保田 隆・滝 秀雄・渡辺泰雄

田井 賢・福岡義和・高畑正裕

富山化学工業株式会社総合研究所

Cefoperazone (CPZ, T-1551) の細菌学的評価を行なった結果、次の結論が得られた。

1. CPZはグラム陽性、陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトラムを有していた。
2. 臨床分離株に対する感受性分布では、グラム陰性菌特に *Serratia* sp., indole(+) *Proteus*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. に対して cefazolin (CEZ), cephalothin (CET) より優れた抗菌力を示し、菌量が少なくなるとさらにその傾向は著しくなった。また *Staphylococcus* sp. に対しては CEZ, CET よりやや劣っていた。
3. CPZは殺菌的に作用した。
4. 抗菌力におよぼす培地の種類、培地の pH およびヒト血清添加の影響はほとんど認められなかった。接種菌量の増加に伴い抗菌力がやや低下する傾向がみられた。
5. CPZは cephalosporinase に対しては非常に安定であり penicillinase に対しても CEZ とほぼ同程度安定であった。
6. 実験的マウス感染症に対して、CPZは CEZ より優れた治療効果を示した。

Sodium 7-[D(-)- α -(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)- α -(4-hydroxyphenyl)acetamido]-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylate (Cefoperazone: CPZ, T-1551) は才川ら¹⁾により開発された新規な注射用半合成セファロsporin系抗生物質である。CPZは cefazolin (CEZ) よりも広い抗菌スペクトラムを有し、特にグラム陰性菌に対して CEZが無効とされている菌種、たとえば *Proteus* のインドール陽性群、*Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* に対し強い抗菌力を示す²⁾。

今回著者らは、CPZに関する *in vitro*, *in vivo*での細菌学的評価を既知のセファロsporin系薬剤である CEZ, cephalothin (CET) などと比較検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

CPZは当社総合研究所で製造された凍結乾燥品 (923 μ g 力価/mg) を用いた。Piperacillin (PIPC: 富山化学), carbenicillin (CBPC: 藤沢薬品), penicillin G (PCG:

明治製菓), methicillin (DMPPC: 万有製菓), cephalothin (CET: 塩野義製菓), cephaloridine (CER: 鳥居薬品), cefazolin (CEZ: 藤沢薬品) および gentamicin (GM: 塩野義製菓) を用いた。

2. 抗菌スペクトラム

当社総合研究所保存の標準株を用いて、日本化学療法学会標準法に準じ、寒天平板希釈法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。すなわち trypto-soy broth (TSB: 栄研) 中で 37°C, 1 夜培養した菌液 (約 10^8 cells/ml) およびその 100 倍希釈液 (約 10^6 cells/ml) の 1 白金耳を薬剤の倍数希釈濃度を含む heart infusion agar (HIA: 栄研) 平板上に接種し、37°C, 18 時間培養後、菌の増殖が認められなかった最小濃度を MIC とした。ただし *P. aeruginosa* の場合は前培養液に 0.4% KNO₃ を添加し、*Streptococcus* は前培養液および MIC 測定平板に 10% 羊血液を添加した。

3. 臨床分離株に対する感受性分布

主として 1976 年 4 月から 1977 年 5 までに分離されたヒト病巣由来株を用い、抗菌スペクトラムと同様の方法で MIC を測定した。

4. 殺菌力の測定

1) 最小殺菌濃度 (MBC)

TSB で 37°C, 1 夜培養した菌液を約 $10^8 \sim 10^5$ cells/ml に希釈して、薬剤の倍数希釈濃度を含む nutrient broth (NB: 栄研) に 1 白金耳を接種し、37°C, 18 時間培養し

Fig. 1 Structure of CPZ

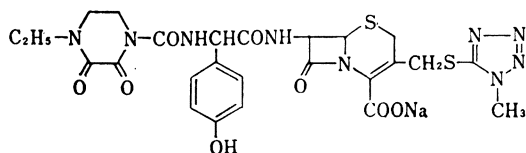


Table 1 Antibacterial spectrum

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

Organism	CPZ		CET		CEZ	
	10^8 *	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0.78	0.78	0.39	0.39	1.56	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> TERASHIMA	3.13	1.56	1.56	0.78	3.13	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	3.13	0.78	1.56	0.78	3.13	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IID 866	1.56	0.39	0.39	≤ 0.1	0.78	0.39
<i>Streptococcus faecalis</i> IID 682	100	25	100	50	>200	200
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.2	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	0.39	≤ 0.1	≤ 0.1	0.78	0.39
<i>Clostridium perfringens</i> IID 520	3.13	1.56	0.2	0.2	0.39	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i> IID 854	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1	0.39	≤ 0.1
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	≤ 0.1	≤ 0.1	3.13	0.78	3.13	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IID 875	≤ 0.1	≤ 0.1	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>Salmonella typhosa</i> IID 611	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	3.13	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> IID 605	0.2	0.2	6.25	6.25	6.25	3.13
<i>Salmonella schottmuelleri</i> IID 607	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	6.25	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i> IID 604	0.39	≤ 0.1	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>Shigella flexneri</i> IID 642	≤ 0.1	≤ 0.1	25	6.25	6.25	3.13
<i>Shigella boydii</i> EW 28	≤ 0.1	≤ 0.1	50	25	6.25	3.13
<i>Serratia marcescens</i> IID 620	0.2	0.2	>200	>200	>200	>200
<i>Proteus vulgaris</i> IID 874	3.13	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Proteus morganii</i> IID 602	1.56	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	25	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Enterobacter aerogenes</i> IID 972	≤ 0.1	≤ 0.1	>200	25	>200	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1001	3.13	1.56	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1002	3.13	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	0.39	≤ 0.1	>200	>200	>200	>200

* Inoculum size; cells/ml

た後肉眼的に菌の増殖が認められなかった最小濃度をMICとした。MIC測定後、各培養液の1白金耳を薬剤を含まないHIAに移植し、37°C、20時間培養後コロニーを全く認めない濃度をMBCとした。

2) 増殖曲線におよぼす影響

TSBで37°C、1夜培養した菌液をNBに接種し、37°Cで振とう培養した。生菌数が約 10^6 cells/mlになった時点でCPZを添加し、経時的に生菌数を測定した。

5. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

1) 培地の影響

HIA, brain heart infusion agar (BHIA: 栄研), nutrient agar (NA: 栄研), trypto-soy agar (TSA: 栄研) および MUELLER-HINTON agar (MHA: 栄研) を用い、接種菌量は約 10^6 cells/mlとしてMICを測定した。

2) 培地 pH の影響

IN-HClまたはIN-NaOHでpH調整したHIAを用い、接種菌量は約 10^6 cells/mlとしてMICを測定した。

3) 血清の影響

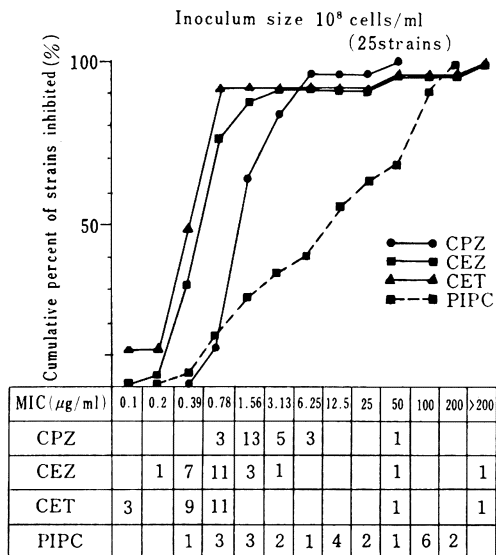
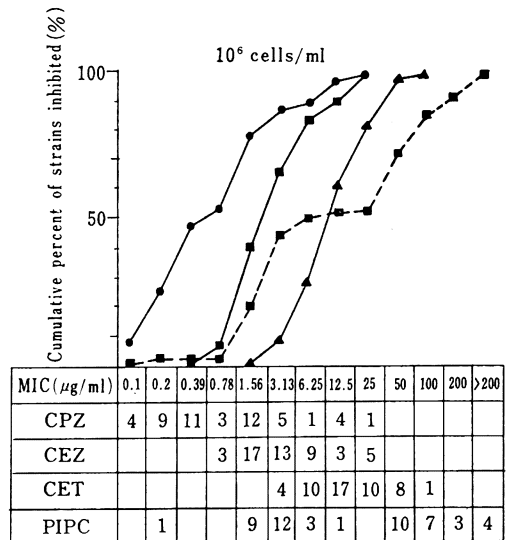
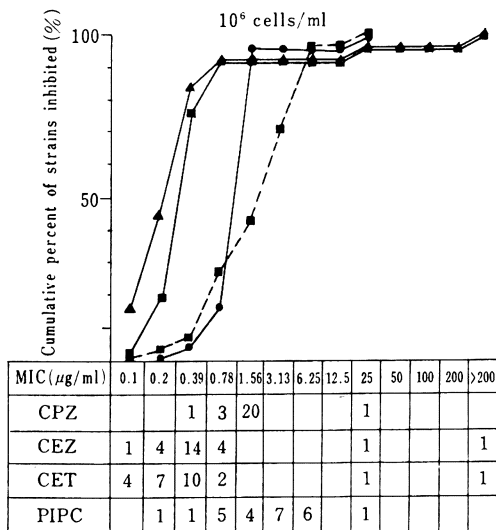
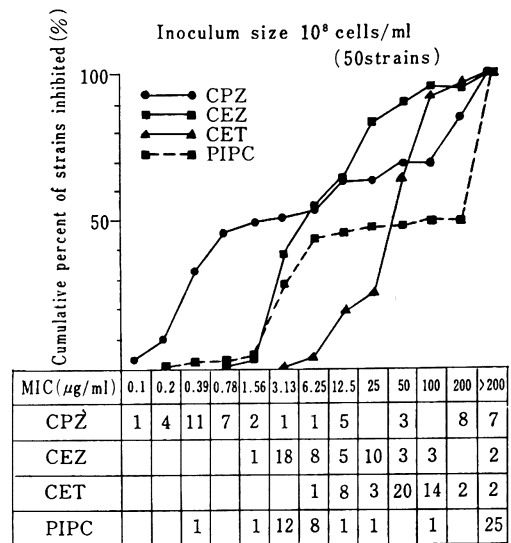
ヒト血清を0, 10, 25および50%添加したheart infusion broth (HIB: 栄研)を用い、接種菌量は約 10^6 cells/mlとして液体希釈法でMICを測定した。

4) 接種菌量の影響

HIAを用い、TSBで37°C、1夜培養した菌液および100倍、10,000倍希釈液を接種してMICを測定した。

6. 液体培地中での CPZ の安定性

Brain heart infusion broth (BHIB: 栄研), HIB, NB, TSBおよび10%羊血液添加HIBでCPZの $100 \mu\text{g/ml}$ 溶液を調製した。37°Cで放置し経時的にCPZの残存活性を

Fig. 2 Antibacterial activity of CPZ against 25 strains of *Staphylococcus* sp.Fig. 3 Antibacterial activity of CPZ against 50 strains of *Escherichia coli*

P. aeruginosa NCTC 10490 を検定菌とする薄層 cup 法により求めた。

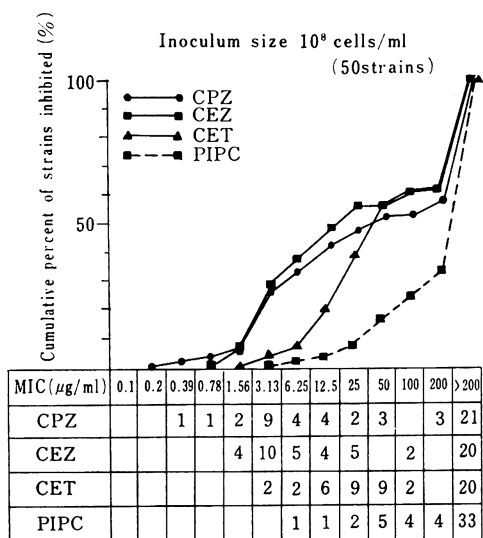
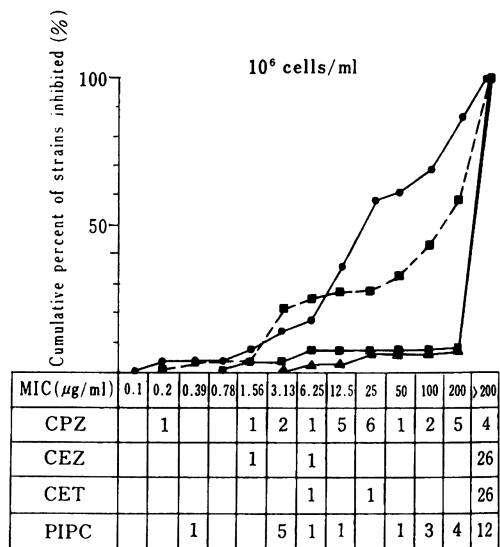
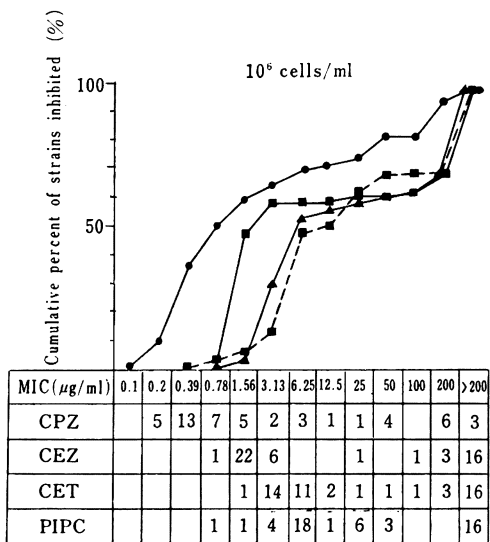
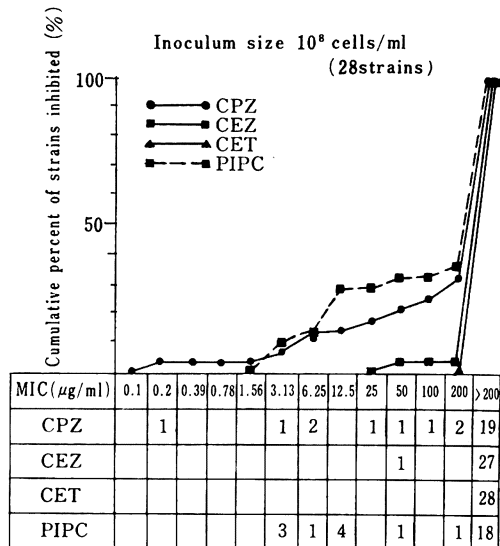
7. 試験管内耐性獲得

NB で 37°C 、1 夜培養した菌液の 1 白金耳を薬剤の倍數希釈濃度を含む NB に接種し 37°C 、24 時間培養後 MIC を測定した。1/2 MIC 培養液の 1 白金耳を、再び 1/2 MIC およびさらに高濃度の薬剤を含む NB に移植して MIC を測定した。以後、同様の操作で 15 代まで継代培養して MIC の変動を調べた。

8. β -lactamase に対する安定性

1) β -lactamase 酵素液の調製

BHIB で 37°C 、1 夜培養した菌液 50 ml を Medium-B³⁾ 1 l に接種し 37°C 、5 時間振とう培養した後、遠心により集菌した。ただし、*Staphylococcus aureus* F-19 では DMPPC を inducer として $0.5 \mu\text{g/ml}$ 添加し、*Proteus vulgaris* GN 76 および *P. aeruginosa* GN 918 では PCG を 0.5 mg/ml および 5 mg/ml 振とう培養時に添加した。菌体を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) の適当量に懸濁し、

Fig. 4 Antibacterial activity of CPZ against 50 strains of *Klebsiella* sp.Fig. 5 Antibacterial activity of CPZ against 28 strains of *Serratia* sp.

20 kHz, 5 分間氷冷下で音波処理しこの破砕液を12,000 × G, 20 分間遠心した上清を酵素液とした。

2) 加水分解速度の測定

PERRET のヨード法⁴⁾に基づいて測定した。ただし、ペニシリンは4分子、CPZは5分子、CER, CETは2.3分子、CEZは3.7分子のヨードを吸収するものとして計算した。

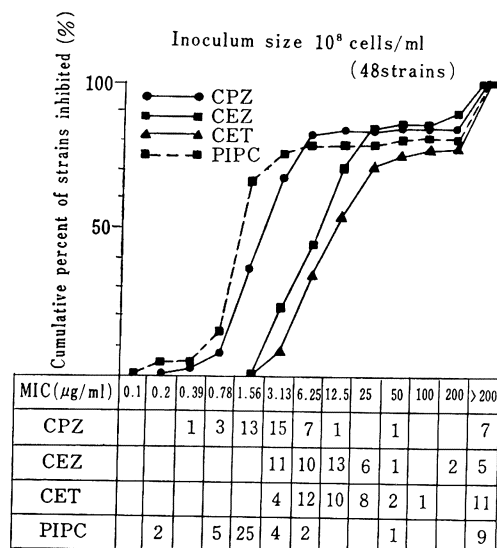
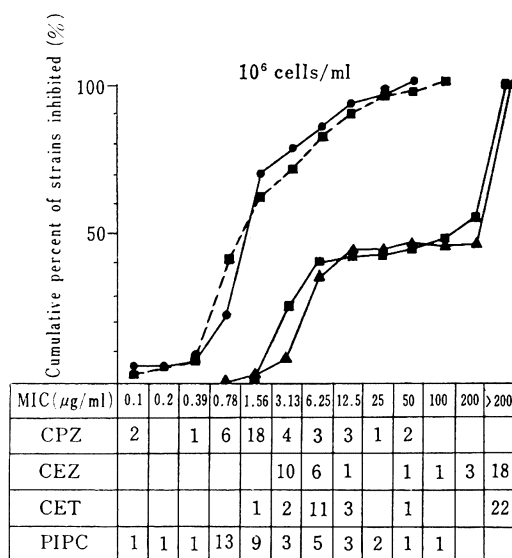
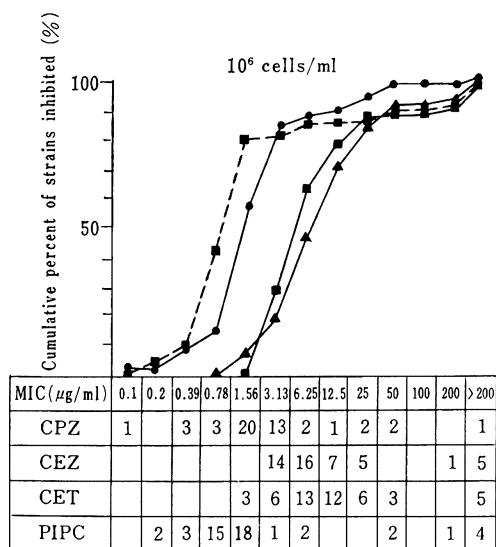
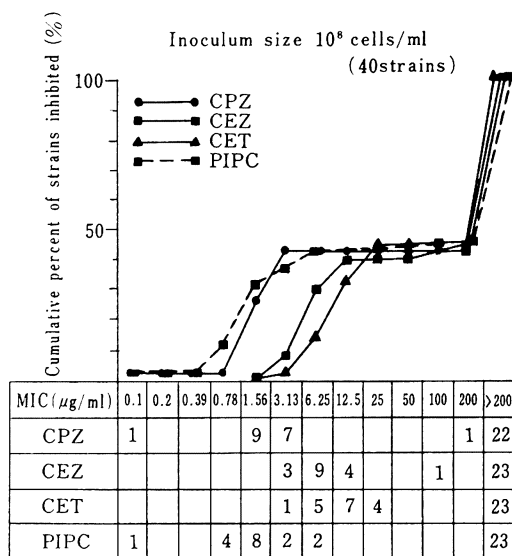
9. 位相差顕微鏡による形態変化の観察

TSB で 37°C , 1 夜培養した菌液を HIB で 100 倍に希

釈し 37°C , 約 2 時間振とう培養を行ない, 対数期途上の菌液 1 白金耳を, スライドガラス上に作製した薬剤の倍数希釈濃度を含むフィルム寒天 (HIA) 上に塗抹した後, カバークラスをかぶせ, パラフィンで封入した。これを 37°C 恒温装置の位相差顕微鏡 (日本光学) により菌の形態変化を観察した。

10. マウス実験的感染症に対する治療効果

試験菌を HIA 上で 37°C , 1 夜培養した後, 5 % gastric mucin (半井化学薬品) に懸濁し, 1 群 5 匹の SLC/ICR

Fig. 6 Antibacterial activity of CPZ against 48 strains of *Proteus mirabilis*Fig. 7 Antibacterial activity of CPZ against 40 strains of *Proteus vulgaris*

系雄性マウス(体重 19 ± 1 g)に腹腔内接種した。薬剤は菌接種後1回あるいは2回に分けて背部皮下投与した。7日後のマウス生存数により ED_{50} (mg/mouse) を VAN DER WAERDEN 法により求めた。

II. 結果および考察

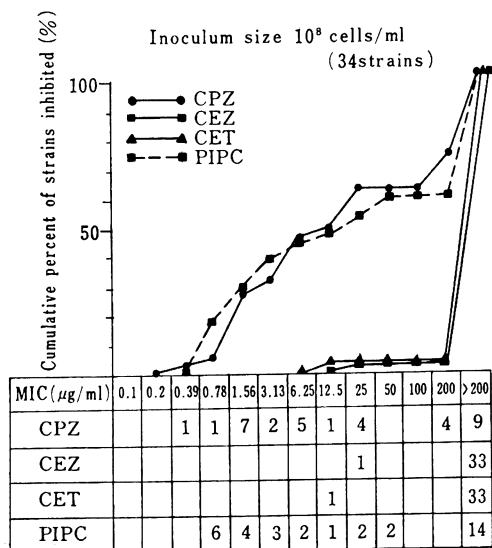
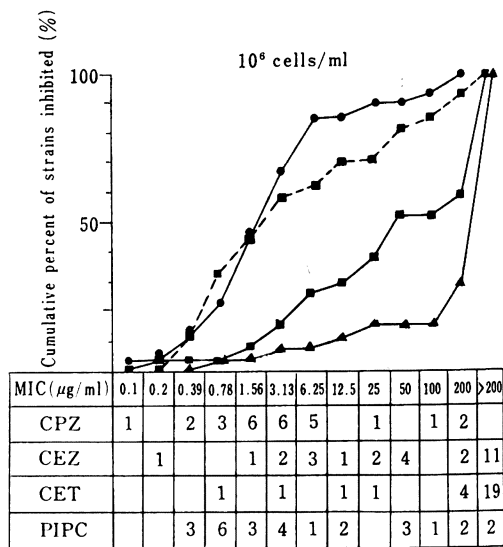
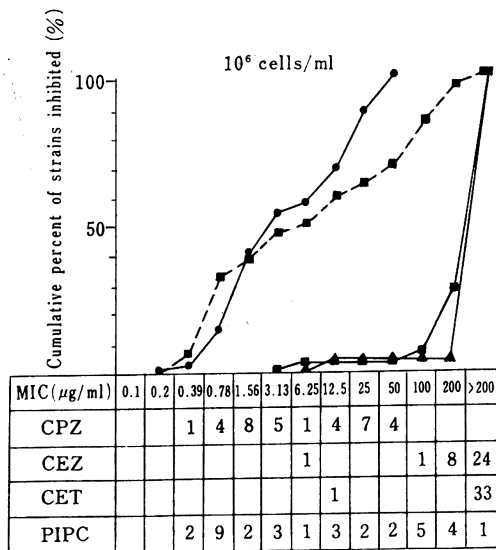
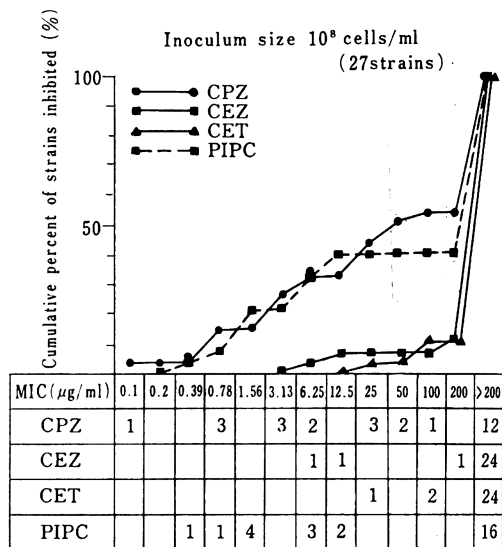
1. 標準菌株を用いての抗菌スペクトラム

CPZの抗菌スペクトラムを既知セファロsporin系薬剤のCEZ, CETを対照薬剤として比較検討し, その結果をTable 1に示した。CPZの抗菌力はグラム陽性菌に対

してCET, CEZとはほぼ同程度であった。しかしグラム陰性菌に対してはCET, CEZより強い抗菌力を示し, 特に *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella* において8倍以上の抗菌力を有し, また対照薬剤に無効である *Serratia marcescens*, *Proteus*, *Enterobacter* および *P. aeruginosa* に対しても $\leq 0.1 \sim 25$ $\mu\text{g/ml}$ のMICを示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床的に分離された *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Kleb-*

Fig. 8 Antibacterial activity of CPZ against 34 strains of *Proteus morganii*Fig. 9 Antibacterial activity of CPZ against 27 strains of *Proteus rettgeri*

siella sp., *Serratia* sp., *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *Enterobacter* および *Pseudomonas* sp. (GM 感受性株), *Pseudomonas* sp. (GM 耐性株) に対する CPZ の抗菌力を, 接種菌量 10^8 cells/ml と 10^6 cells/ml で検討した。感受性分布と累積百分率を CET, CEZ, PIPC および GM を対照薬剤として比較し Fig. 2~12 に示した。

1) *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus sp. 25 株に対する抗菌力は, Fig. 2 に示

すように CPZ は CET, CEZ よりやや劣り, そのピークは 10^8 cells/ml で $1.56 \mu\text{g/ml}$ であった。接種菌量による MIC の変動は認められなかった。

2) *E. coli*

E. coli 50 株に対する抗菌力を Fig. 3 に示した。 10^8 cells/ml において, 感受性のピークは CPZ が最も低濃度で $0.39 \mu\text{g/ml}$ を示し, 次いで CEZ, PIPC, CET であった。また, 高度耐性 (MIC $\geq 200 \mu\text{g/ml}$) を示す株は CPZ で 30%, CEZ で 4%, PIPC で 50%, CET で 8% 存

Fig. 10 Antibacterial activity of CPZ against 35 strains of *Enterobacter* sp.

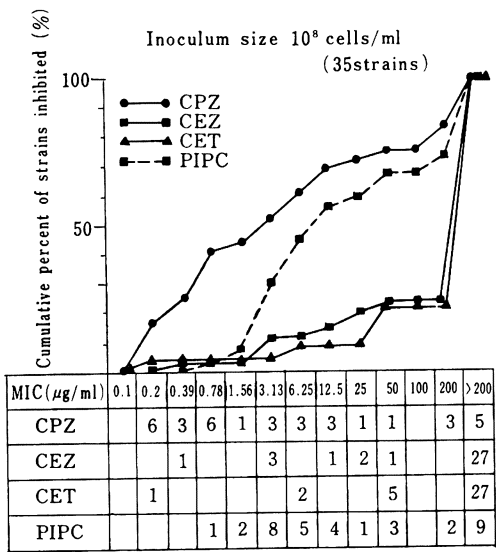
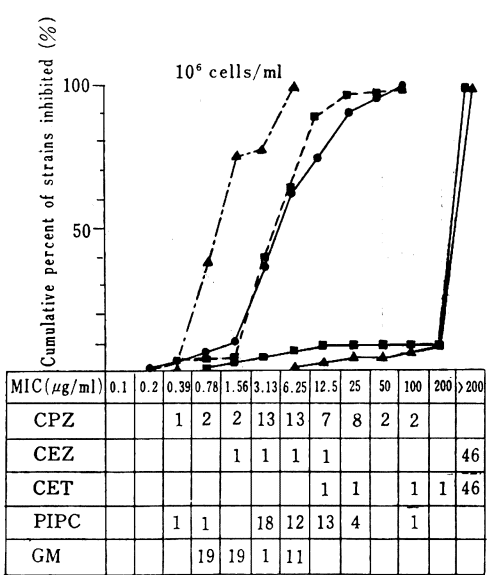
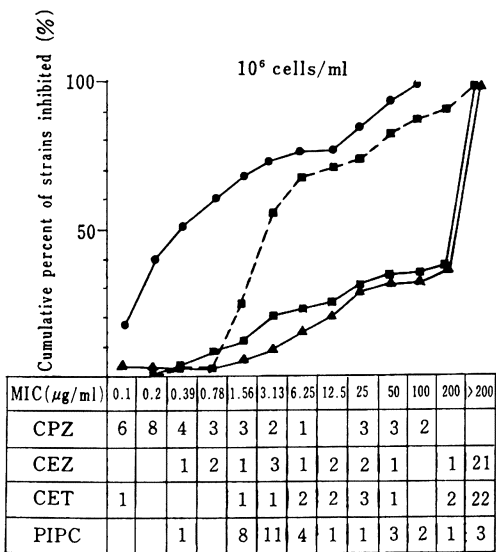
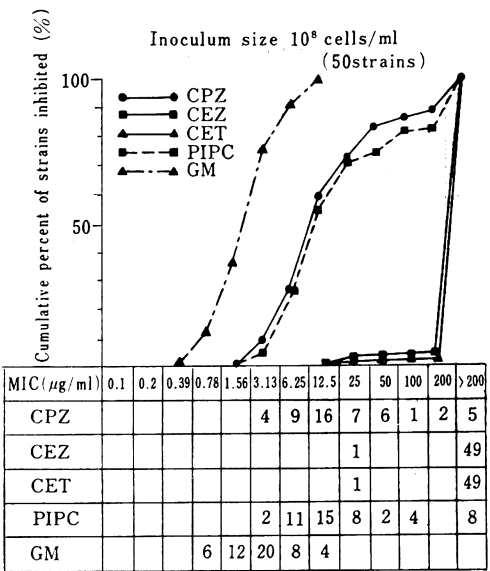


Fig. 11 Antibacterial activity of CPZ against 50 strains of *Pseudomonas* sp. (GM sensitive)



在した。 10^6 cells/ml では、 CPZ, CEZ, CET はすべて MIC が $100 \mu\text{g/ml}$ 以下であり 4 薬剤中 CPZ が最も強い抗菌力を示した。

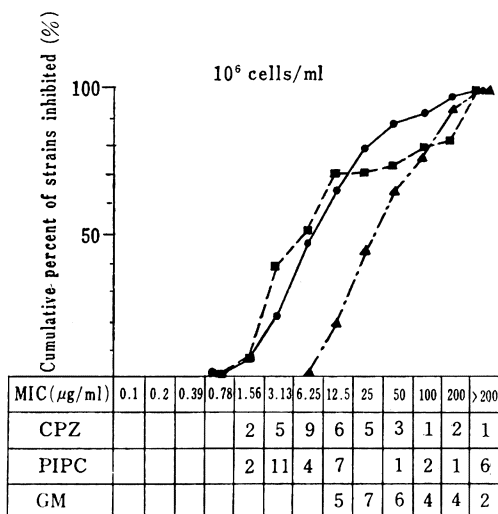
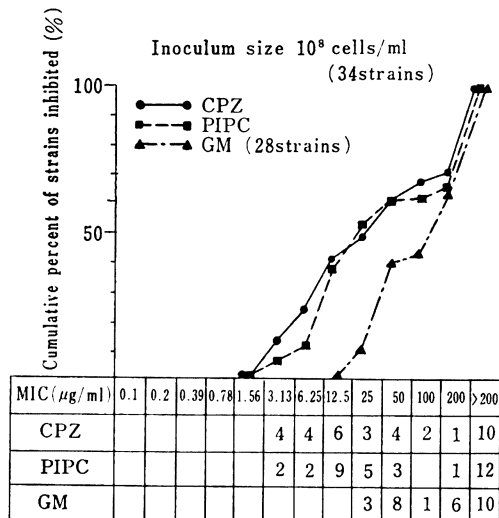
3) *Klebsiella* sp.

Klebsiella sp. 50株に対する抗菌力を Fig. 4 に示した。 10^8 cells/ml において、 CPZ では MIC が $0.39 \mu\text{g/ml}$ から $50 \mu\text{g/ml}$ まで、 CEZ では $1.56 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ までの感受性株と耐性株 (MIC $\geq 200 \mu\text{g/ml}$) の 2 峰性の感受性分布を示し、 CET, PIPC より優れていた。 10^6

cells/ml では、 CPZ が最も強い抗菌力を示し、 その感受性のピークは $0.39 \mu\text{g/ml}$ で、 感受性株 (MIC $\leq 50 \mu\text{g/ml}$) は 80% であった。

4) *Serratia* sp.

Serratia sp. 28 株に対する抗菌力を Fig. 5 に示した。 10^8 cells/ml において、 CPZ に感受性 (MIC $\leq 50 \mu\text{g/ml}$) を示す株は 21%、 PIPC は 32% 存在した。 10^6 cells/ml では、 CPZ で $12.5 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ をピークとする感受性株 (MIC $\leq 50 \mu\text{g/ml}$) が 61% 存在した。

Fig. 12 Antibacterial activity of CPZ against 34 strains of *Pseudomonas* sp. (GM resistant)5) *P. mirabilis*

P. mirabilis 48 株に対する抗菌力を Fig. 6 に示した。 10^8 cells/ml において、CPZ の感受性のピークは $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ を示し PIPC よりやや劣り CET, CEZ より優れていた。高度耐性株 ($\text{MIC} \geq 200 \mu\text{g/ml}$) は 4 剤に約 10% 存在した。接種菌量による MIC の変動はあまり認められなかった。

6) *P. vulgaris*

P. vulgaris 40 株に対する抗菌力を Fig. 7 に示した。両接種菌量において CPZ と PIPC, CEZ と CET はほぼ同

等の抗菌力を示した。 10^8 cells/ml において、4 薬剤ともに感受性株と耐性株の 2 峰性の感受性分布を示し、耐性株は全体の約 60% 存在していた。感受性株においては CPZ と PIPC が優れていた。 10^6 cells/ml では CPZ および PIPC の MIC はすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以下であり CPZ は $1.56 \mu\text{g/ml}$ を、PIPC は $0.78 \mu\text{g/ml}$ をピークとする 1 峰性の感受性分布を示した。

7) *P.morganii*

P. morganii 34 株に対する抗菌力を Fig. 8 に示した。 10^8 cells/ml において、CPZ, PIPC ではほぼ同等の感受性を示し、CPZ では MIC が $0.39 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ の感受性株と耐性株 (38%) の 2 峰性の感受性分布を示した。 10^6 cells/ml では、CPZ の MIC はすべて $50 \mu\text{g/ml}$ 以下であり $1.56 \mu\text{g/ml}$ と $25 \mu\text{g/ml}$ をピークとする 2 峰性の感受性分布となった。両接種菌量において CEZ, CET はほとんど抗菌力を示さなかった。

8) *P. rettgeri*

P. rettgeri 27 株に対する抗菌力を Fig. 9 に示した。 10^8 cells/ml において、CPZ および PIPC では全体の約 40~50% が感受性 ($\text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/ml}$) を示すのに対し、CEZ, CET ではほとんど感受性を示さなかった。 10^6 cells/ml では CPZ の MIC はすべて $200 \mu\text{g/ml}$ 以下となりそのピークは $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ であり CPZ が最も優れた抗菌力を示した。

9) *Enterobacter* sp.

Enterobacter sp. 35 株に対する抗菌力を Fig. 10 に示した。いずれの接種菌量においても CPZ が最も優れ、次いで PIPC であり、CEZ と CET はほぼ同等であった。 10^8 cells/ml において CPZ では MIC が $0.2 \mu\text{g/ml}$ から $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ の幅広い感受性分布を示した。 10^6 cells/ml では CPZ の MIC はすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

10) *Pseudomonas* sp.

GM の MIC が $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の GM 感受性 *Pseudomonas* sp. 50 株に対する抗菌力を Fig. 11 に示した。 10^8 cells/ml において、GM では $3.13 \mu\text{g/ml}$ をピークとする感受性分布を示すのに対し、CPZ は PIPC とほぼ同等の $12.5 \mu\text{g/ml}$ をピークとする感受性株と耐性株 ($\text{MIC} > 200 \mu\text{g/ml}$) の 2 峰性の感受性分布を示した。 10^6 cells/ml では CPZ, PIPC の MIC はすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以下であり、感受性のピークは $3.13 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ であった。

GM の MIC が $25 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す GM 耐性 *Pseudomonas* sp. 34 株に対する抗菌力を Fig. 12 に示した。 10^8 cells/ml において、CPZ では $12.5 \mu\text{g/ml}$ を小さなピークとする感受性を示し、PIPC とほぼ同等であった。 10^6 cells/ml においても CPZ は PIPC とほぼ同程度の感受

Table 2 Correlation between MICs and MBCs

Organism	Inoculum size (cells/ml)	CPZ		CET		CEZ		PIPC	
		MBC*	MIC*	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>S. aureus</i> FDA 209P	2.4×10^3	1.56	1.56	1.56	0.78	0.39	0.2	0.78	0.78
	2.4×10^4	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.2	1.56	0.78
	2.4×10^5	1.56	1.56	3.13	1.56	1.56	0.39	6.25	0.78
	2.4×10^6	200	1.56	50	0.78	50	0.39	>200	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.9×10^3	0.2	0.2	25	25	3.13	3.13	3.13	3.13
	1.9×10^4	0.2	0.2	25	25	3.13	3.13	12.5	3.13
	1.9×10^5	0.39	0.39	100	25	12.5	3.13	12.5	3.13
	1.9×10^6	0.39	0.39	100	25	12.5	3.13	25	6.25
<i>K. pneumoniae</i> IID 875	1.2×10^3	0.78	0.39	1.56	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25
	1.2×10^4	0.78	0.78	6.25	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25
	1.2×10^5	1.56	0.78	6.25	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25
	1.2×10^6	1.56	0.78	12.5	12.5	6.25	3.13	200	12.5
<i>P. morganii</i> IID 602	3.7×10^3	1.56	1.56	>200	>200	>200	>200	0.78	0.39
	3.7×10^4	3.13	1.56	>200	>200	>200	>200	3.13	0.78
	3.7×10^5	3.13	3.13	>200	>200	>200	>200	25	12.5
	3.7×10^6	100	25	>200	>200	>200	>200	200	100
<i>P. aeruginosa</i> IID 1001	1.8×10^3	6.25	6.25	>200	>200	>200	>200	12.5	6.25
	1.8×10^4	12.5	6.25	>200	>200	>200	>200	25	6.25
	1.8×10^5	100	25	>200	>200	>200	>200	25	12.5
	1.8×10^6	>200	25	>200	>200	>200	>200	>200	25

* $\mu\text{g/ml}$

Fig. 13 Bactericidal activity of CPZ against *S. aureus* FDA 209P

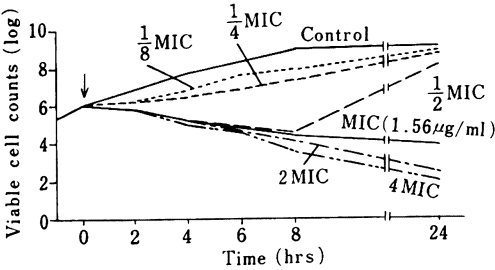


Fig. 14 Bactericidal activity of CPZ against *K. pneumoniae* GN 3850

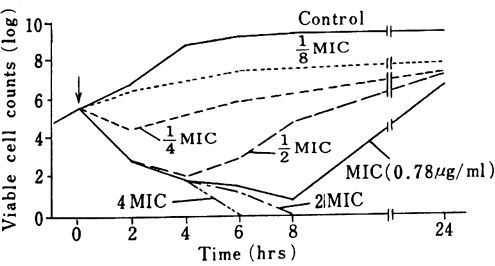


Fig. 15 Bactericidal activity of CPZ against *E. aerogenes* IID 972

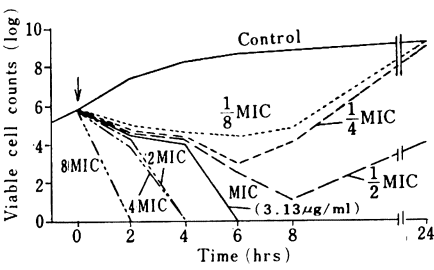


Fig. 16 Bactericidal activity of CPZ against *P. aeruginosa* IFO 3445

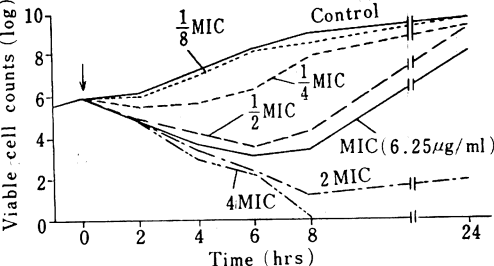


Table 3 Effect of various factors on antibacterial activity

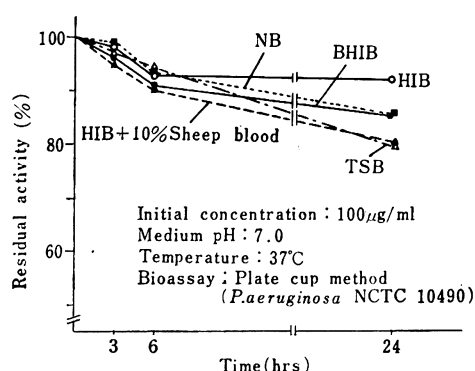
Factor		MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		<i>S. aureus</i> FDA209P		<i>E. coli</i> NIHJ		<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	
		CPZ	CEZ	CPZ	CEZ	CPZ	CEZ
Medium	HIA	1.56	0.2	≤ 0.025	0.78	0.05	>200
	BHIA	1.56	0.39	≤ 0.025	0.78	0.05	>200
	NA	1.56	0.2	≤ 0.025	0.78	0.05	>200
	TSA	1.56	0.1	≤ 0.025	0.78	0.05	>200
	MHA	1.56	0.2	≤ 0.025	0.78	0.1	>200
pH	5.0	0.05	0.1	≤ 0.025	0.39	0.1	>200
	6.0	0.78	0.2	≤ 0.025	0.78	0.1	>200
	7.0	1.56	0.2	≤ 0.025	1.56	0.1	>200
	8.0	0.78	0.2	≤ 0.025	3.13	0.1	>200
Human serum (%)	0	1.56	0.39	0.1	1.56	0.78	>200
	10	3.13	0.78	0.2	3.13	0.78	>200
	25	6.25	0.78	0.1	6.25	0.78	>200
	50	6.25	0.78	0.05	6.25	0.78	>200

Table 4 Effect of inoculum size on antibacterial activity of CPZ

Organism	Initial size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		CPZ			CEZ		
		$\times 10^0$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^0$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-4}$
<i>S. aureus</i> FDA209P	4.1×10^8	1.56	1.56	1.56	0.78	0.2	0.2
<i>E. coli</i> NIHJ	1.0×10^8	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	1.56	0.78	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.8×10^8	0.39	0.39	0.1	3.13	0.78	0.78
<i>K. pneumoniae</i> IID875	2.4×10^8	0.1	0.1	0.1	1.56	1.56	1.56
<i>P. morganii</i> IID602	3.3×10^8	3.13	1.56	0.78	>200	>200	>200
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	2.2×10^8	0.39	0.05	0.05	>200	>200	>200
<i>P. aeruginosa</i> IID1001	2.5×10^8	6.25	3.13	3.13	>200	>200	>200

Inoculum size: One loopful of bacterial suspension

Fig. 17 Stability of CPZ in liquid media



性を示した。

GM感受性株, GM耐性株に対するCPZの感受性はほぼ同等であった。

3. 殺菌作用

主として標準菌株を用いてCPZの殺菌作用を検討した。

1) MICとMBCの関係

S. aureus FDA 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* IID875, *P. morganii* IID 602 および *P. aeruginosa* IID 1001 を用いて接種菌量約 10^8 cells/ml $\sim 10^6$ cells/ml の MIC と MBC を測定し, CEZ, CET および PIPC と比較した結果を Table 2 に示した。*S. aureus* FDA 209P で

Fig. 18 Emergence of drug resistance to CPZ

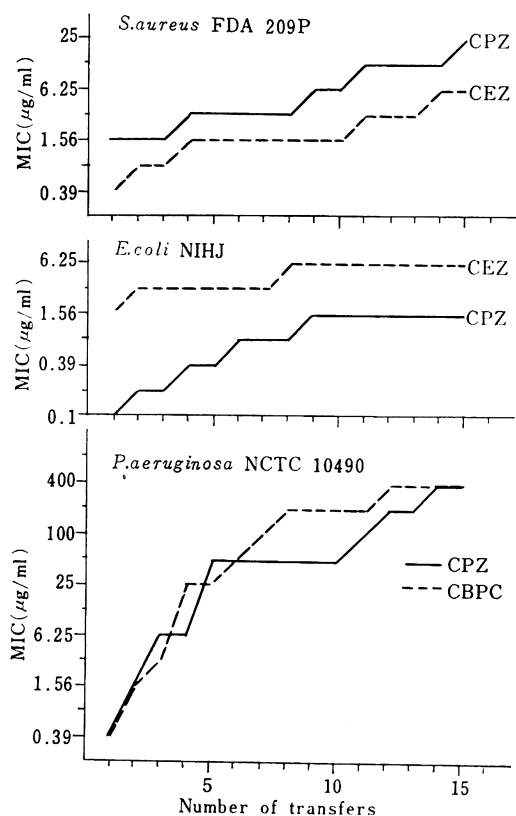
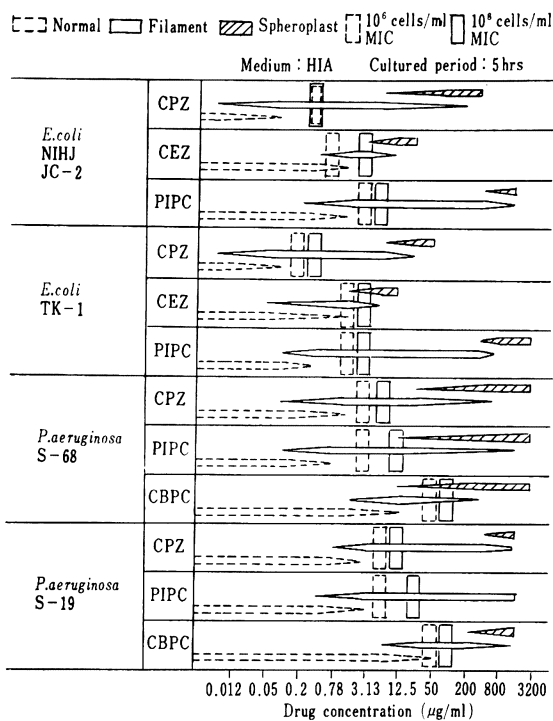


Fig. 19 Morphological changes at various concentrations of CPZ

Table 5 Stability against β -lactamase

Enzyme from		Substrate						
		CER	CPZ	CEZ	CET	PCG	PIPC	CBPC
Cephalosporinase	<i>E. coli</i> GN5482	100*(90)**	0.9	130	100	22	1	0.1
	<i>C. freundii</i> GN346	100 (2900)	0.3	150	17	15	0.06	0.03
	<i>S. marcescens</i> W-8	100 (2200)	3	94	10	21	20	0.9
	<i>P. vulgaris</i> GN76	100 (300)	3	440	105	9	8	0.7
	<i>P. aeruginosa</i> GN918	100 (250)	0.8	410	91	16	1	0.09
Penicillinase	<i>S. aureus</i> F-19	0.2	<0.08	<0.08	0.8	100*(48)**	375	86
	<i>E. coli</i> TK-3	115	16	21	10	100 (330)	94	11
	<i>K. pneumoniae</i> Y-4	41	13	4	2.4	100 (230)	72	7
	<i>P. aeruginosa</i> GN3379	18	0.1	2	1	100 (100)	9	96
	<i>P. aeruginosa</i> S-12	112	14	18	10	100 (63)	105	10

* Hydrolysis ratio is expressed as a relative rate of hydrolysis, taking the absolute rate of PCG or CER as 100.

** Specific activity (units/mg of dry weight)

Table 6 MIC of β -lactamase producing strains

Organism	Antibiotics					
	CPZ	CER	CEZ	CET	PIPC	CBPC
<i>S. aureus</i> F-19	3.13* 25	0.2 6.25	0.78 6.25	0.78 1.56	6.25 >1600	12.5 400
<i>E. coli</i> TK-3	12.5 >1600	100 >1600	25 400	50 1600	400 >1600	>1600 >1600
<i>E. coli</i> GN5482	1.56 25	50 400	50 400	1600 >1600	25 100	50 50
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	12.5 >1600	100 200	6.25 100	12.5 100	200 >1600	>1600 >1600
<i>P. vulgaris</i> GN76	1.56 >1600	800 >1600	400 >1600	800 >1600	3.13 >1600	50 400
<i>C. freundii</i> GN346	100 >1600	800 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	200 800	400 400
<i>S. marcescens</i> W-8	100 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	100 >1600	>1600 >1600
<i>P. aeruginosa</i> GN918	25 50	>1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	50 100	400 400
<i>P. aeruginosa</i> GN3379	50 200	>1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	100 >1600	>1600 >1600
<i>P. aeruginosa</i> S-12	50 400	>1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	200 >1600	>1600 >1600

Inoculum size: upper 1 loopful of 10^6 cells/ml, lower 1 loopful of 10^8 cells/ml*: $\mu\text{g/ml}$ Table 7 *In vivo* antibacterial activity of CPZ against systemic infections

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	LD ₅₀ (\times)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				ED ₅₀ (mg/mouse)	
			CPZ		CEZ		CPZ	CEZ
			10^8	10^6	10^8	10^6		
<i>S. aureus</i> F-30	2.6×10^7	4	6.25	3.13	1.56	0.39	0.73	0.035
<i>E. coli</i> NIHJ	3.7×10^7	60	≤ 0.01	≤ 0.01	1.56	0.78	< 0.01	0.16
<i>E. coli</i> TK-16	2.0×10^6	100	0.20	≤ 0.10	3.13	1.56	1.45	>31.3
<i>E. coli</i> No. 1	3.5×10^6	20	6.25	3.13	100	25	0.08	0.36
<i>K. pneumoniae</i> GN3850	3.4×10^6	40	1.56	0.20	6.25	1.56	0.053	0.12
<i>K. pneumoniae</i> Y-3	1.1×10^5	40	50	1.56	6.25	1.56	0.18	0.14
<i>K. pneumoniae</i> No. 2	2.6×10^6	40	12.5	1.56	12.5	3.13	5.83	1.45
<i>P.morganii</i> 101	1.0×10^5	50	1.56	0.78	6.25	3.13	1.46	2.21
<i>E. cloacae</i> H-6	1.7×10^7	10	0.78	0.20	>200	>200	0.48	>50
<i>P. aeruginosa</i> S-68*	1.6×10^5	8	6.25	3.13	>200	>200	0.18	>50

Therapy: sc injection at 1 hr after infection

*sc injection at 1 and 4 hr after infection

は、CPZ は 2.4×10^5 cells/ml 以下の接種では MIC と MBC が一致し殺菌的に作用したが、 2.4×10^6 cells/ml 接種では他剤と同様 MIC と MBC の間に大きな開きがあった。*E. coli* NIHJ JC-2、*K. pneumoniae* IID 875 では、CPZ は強い殺菌力を示し他剤より優れていた。CEZ、CET の MIC が $200 \mu\text{g/ml}$ 以上であった *P. morganii* IID 602、*P. aeruginosa* IID 1001 では、CPZ は PIPC と同程度の殺菌力を示した。

2) 増殖曲線におよぼす影響

S. aureus FDA 209P、*K. pneumoniae* GN 3850、*Enterobacter aerogenes* IID 972 および *P. aeruginosa* IFO 3445 を用い対数期途中の菌に CPZ の MIC を中心に、1/8、1/4、1/2、1、2、4、8 MIC を作用させ、その後の生菌数の変化を24時間まで観察し Fig. 13, 14, 15, 16 に示した。*S. aureus* FDA 209P では、MIC で静菌的であった。*K. pneumoniae* GN 3850 および *P. aeruginosa* IFO 3445 では、2 MIC で殺菌的であったが MIC で8時間以後に再増殖が認められた。*E. aerogenes* IID 972 では MIC で殺菌的に作用した。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

S. aureus FDA 209P、*E. coli* NIHJ、*P. aeruginosa* NCTC 10490 を用いて培地の種類、培地 pH、ヒト血清添加の抗菌力におよぼす影響を CEZ と比較検討した。その結果を Table 3 に示した。各種培地による抗菌力の変動は、CEZ においてのみ *S. aureus* FDA 209P でわずかに認められた。培地 pH が酸性側に移行すると抗菌力は、CPZ において *S. aureus* FDA 209P で強くなり、CEZ においても *E. coli* NIHJ でやや強くなった。ヒト血清添加により CPZ は *S. aureus* FDA 209P、CEZ は *E. coli* NIHJ で抗菌力の低下が認められた。

また7種の菌株を用いて抗菌力におよぼす接種菌量の影響を検討し Table 4 に示した。接種菌量の増加に伴い抗菌力はやや低下する傾向がみられた。

5. 液体培地中での安定性

CPZ の各種液体培地中での安定性を Fig. 17 に示した。HIB 中で最も安定であり、24時間後の残存活性は92%を示し、NB、BHIB 中では86%、羊血液10%添加 HIB 中では80%、TSB 中では79%を示した。この結果から CPZ は培地中では安定であり、抗菌力測定時に CPZ の分解による影響はほとんどないと思われる。

6. 試験管内耐性獲得

S. aureus FDA 209P、*E. coli* NIHJ、*P. aeruginosa* NC TC 10490 用い、CPZ と CEZ または CBPC に対する試験管内耐性獲得について15代まで検討し、その結果を Fig. 18 に示した。

S. aureus FDA 209P では、CPZ および CEZ に対し同程度にゆるやかに耐性を獲得し、15代までに CPZ は MIC が $1.56 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ に上昇した。

E. coli NIHJ では、9代までに CPZ に対し $0.1 \mu\text{g/ml}$ から $1.56 \mu\text{g/ml}$ 、CEZ に対し $1.56 \mu\text{g/ml}$ から $6.25 \mu\text{g/ml}$ へと耐性を獲得し、以後両薬剤の感受性は変化しなかった。

P. aeruginosa NCTC 10490 では、CPZ および CBPC に5代目で速やかに以後はゆるやかに耐性を獲得し、15代までに両薬剤の MIC は $0.39 \mu\text{g/ml}$ から $400 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性株となった。これらの高度耐性株は β -lactamase 産生能が高くなり増殖速度が遅くなっていたが、これが耐性上昇の一因であると思われる。

7. β -lactamase に対する安定性

臨床分離菌10株の菌体から得られた penicillinase (PCase) および cephalosporinase (CSase) に対する CPZ の安定性およびその産生菌に対する抗菌力を Table 5, 6 に示した。CPZ は、CSase に対して CEZ、CET と比較して非常に安定であり、PCase に対しては CEZ、CET とほぼ同等であった。これらの β -lactamase 産生株に対して CPZ は強い抗菌力を示し、特に *P. aeruginosa* においては PIPC、CBPC より優れていた。また CPZ が比較的不安定な挙動を示す β -lactamase 産生株に対し、抗菌力に菌量差が認められた。この原因としては、培地中の菌体外 β -lactamase による分解が考えられる⁵⁾。

8. 位相差顕微鏡による形態変化

E. coli NIHJ JC-2、*E. coli* TK-1、*P. aeruginosa* S-68 および *P. aeruginosa* S-19 に CPZ を作用させ、培養5時間後の抗菌像を観察し、薬剤濃度と菌の形態変化の関係を PIPC、CEZ および CBPC を対照薬剤として Fig. 19 に示した。*E. coli* NIHJ JC-2、*E. coli* TK-1 において、CPZ は PIPC と同様に、MIC を中心に CEZ より広い濃度域でフィラメントを形成し、より高濃度でスフェロブラストを形成した。しかし CPZ のスフェロブラスト化は PIPC より低濃度で認められた。

P. aeruginosa S-68、*P. aeruginosa* S-19 において CPZ は PIPC と同様に、MIC を中心に CBPC より広い濃度域でフィラメント化を示し、高濃度でスフェロブラストを形成した。

これらの結果より CPZ の *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する作用機作は PIPC と同様であると思われた⁶⁾。

9. マウス実験的感染症に対する治療効果

S. aureus、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. morganii*、*Enterobacter cloacae* および *P. aeruginosa* を用いたマウス実験的感染症に対する治療効果を CEZ を対照とし

て検討した時の結果を Table 7 に示した。 *E. coli* 3 株, *K. pneumoniae* GN 3850, *P.morganii* 101, *E. cloacae* H-6 および *P. aeruginosa* S-68 において, CPZ は CEZ より ED₅₀ 値が小さく治療効果は優れていた。この結果はほぼ *in vitro* 抗菌力と相関していた。

文 献

- 1) 才川 勇, 高野俊太郎, 桃井海秀, 高倉 勇, 工谷千姝, 落合裕一, 吉田長作, 保田 隆, 滝 秀雄: β -ラクタム系抗生物質の薬学的研究 (第8報) 7-[D(-)- α -(4-alkyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)phenylacetamido]cephalosporanic acid類の合成ならびに構造-抗菌活性。薬学雑誌 99(9): 929~935, 1979
- 2) MITSUHASHI, S; N. MATSUBARA, S. MINAMI, T.

MURAOKA, T. YASUDA & I. SAIKAWA: Antibacterial activity of a new semisynthetic cephalosporin, T-1551. 18th I. A. A. C. (Atlanta), 1978

- 3) 植尾健次, 田井 賢, 林 敏雄, 福岡義和, 三橋進: T-1220 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 25: 700~709, 1977
- 4) PERRET, C. J.: Iodometric assay for penicillinase. Nature 174: 1012~1013, 1954
- 5) 田井 賢, 保田 隆, 高下 寛, 酒井広志, 中川三千子, 才川 勇: ペニシリン系薬剤の接種菌量による MIC の変動と β -lactamase 活性の関係について。第25回日本化学療法学会総会, 1977
- 6) 西野武志, 山岸純一, 渡辺泰雄, 中沢昭三: 緑膿菌に対する T-1220 の抗菌像について。Chemotherapy 25: 755~764, 1977

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON CEFOPERAZONE (T-1551)

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, HIDEO TAKI,
YASUO WATANABE, MASARU TAI, YOSHIKAZU FUKUOKA
and MASAHIRO TAKAHATA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of cefoperazone (CPZ, T-1551) have been carried out, and the following results were obtained:

- 1) CPZ showed broad antibacterial spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria.
- 2) The *in vitro* antibacterial activity of CPZ against clinical isolates of *Serratia* sp., indole (+) *Proteus*, *Enterobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. was found to have more effective than cefazolin (CEZ) and cephalothin (CET).
- 3) Bactericidal activity of CPZ was studied, minimum bactericidal concentration (MBC) was almost the same as its minimum inhibitory concentration (MIC).
- 4) Antibacterial activity of CPZ was not affected by the change of pH and media, and addition of human serum to culture media.
- 5) Stability to β -lactamase extracted from penicillin and cephalosporin resistant clinical isolated bacteria was demonstrated. CPZ was very stable than CEZ and CET against cephalosporinase, and was similar to CEZ and CET against penicillinase.
- 6) On the protecting effects for systemic infections of various bacteria in mice, CPZ was more active than CEZ.