

6059-S の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用

真山 三賀雄・永田 弘・大瀬 満寿代

塩野義製薬株式会社研究所

Oxacephem 系抗生物質である 6059-S の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用について、Cefoxitin (CFX), Cefotaxime (CTX), Cefmetazole (CMZ), Piperacillin (PIPC) 及び Clindamycin (CLDM) 等を主要な対照薬剤として比較検討し、以下のような成績を得た。

6059-S はグラム陽性及びグラム陰性の嫌気性菌に対し広域抗菌スペクトラムを示した。

特に、*Bacteroides fragilis* に対して、CLDM よりはやがた、CFX, CTX, CMZ 及び PIPC よりも明らかに強い抗菌活性を示した。また、CLDM, CTX 及び CFX に耐性を示した *B. fragilis* は、6059-S に対しては感受性を示した。

B. fragilis に対する殺菌作用及び溶菌作用においても、6059-S は CFX 及び CTX よりも明らかに強い活性を示した。また、殺菌作用及び溶菌作用の経時的推移における regrowth 菌の出現は、6059-S の場合が最も少ないことが認められた。

B. fragilis の産生する β -lactamase に対し、6059-S は CFX と同様極めて高い安定性を示した。また、供試された β -lactamase 産生菌株の大部分は CTX, CEZ 及び ABPC に対して耐性を示したが、6059-S に対してはすべて感受性を示した。

緒 言

従来報告のセファロスポリン系抗生物質のうち、Cefoxitin は、嫌気性菌のうち特に *Bacteroides fragilis* に対して優れた抗菌活性を示す薬剤として評価されてきた。¹⁻⁹ 著者らは、今回、Oxacephem 系抗生物質である 6059-S の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用を、Cefoxitin, Cefmetazole, Cefotaxime 及び Clindamycin 等を主要な対照薬剤として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

6059-S (Lot F 55 KO 63 S 009 N, 重量力価)、及び主要な対照薬剤としては、Cefoxitin (CFX), Cefotaxime (CTX), Cefmetazole (CMZ) 及び Clindamycin (CLDM) を用いた。また、補足的な対照薬剤としては、Ceftizoxime (CZX), Piperacillin (PIPC), Cefazolin (CEZ), Cefotiam (CTM), PCG, ABPC 及び CBPC を用いた。

2. 使用菌株

抗菌スペクトラム検討用としては、代表的な嫌気性菌 9 属、16 種、25 株を用いた。感受性分布の測定には、臨床分離株の *Bacteroides fragilis* 100 株、*Fusobacterium* 31 株、グラム陽性球菌 24 株及び *Propionibacterium* 10 株の計 165 株を用いた。その他の実験用菌株は上記の菌株から適宜選択して用いた。これらの菌株は、すべて -78°C の deep freezer で凍結保存された。また、

これら嫌気性菌の培養は、GAM 半流動高層培地の場合を除き、他はすべて anaerobic chamber (N_2 : 80%, H_2 : 10%, CO_2 : 10% の混合ガス, 37°C , 平沢製作所製) を用いて行なった。

3. 薬剤感受性測定法

感受性測定法に関しては、渡辺の方法^{5,6)} 及び日本化学療法学会感受性測定法^{7,8)} を参照し、以下のような方法で行なった。すなわち、感受性測定用培地には GAM 寒天培地 (ニッスイ) を用い、寒天平板希釈法により MIC を測定した。接種用菌液の調製に関しては、GAM 半流動高層培地で一夜培養菌 (37°C) をパストールピペットで GAM ブイオンに少量 (または白金線コイル量) 接種し、18 時間嫌気培養した菌液を O. D. 及び生菌数を指標として所期の各接種菌液の調製 (主として 10^6 及び 10^8 CFU/ml) を行なった。次いで、これらの接種菌液を multiinoculator を用いて、予め調製されたシャーレ中の薬剤含寒天培地の表面にスポットし、可及的速かに嫌気培養を行ない、24 時間後に (ただし、発育の遅い *B. melaninogenicus* は 48 時間後) シャーレを取り出し、肉眼的に MIC を求めた。なお、MIC の判定は日本化学療法学会 MIC 測定法^{7,8)} に準じて行なった。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

試験菌には代表的な嫌気性菌として 6 属、8 種、11 菌株を用い、培地としては GAM 寒天培地、TEP 寒天培地 (栄研)、Brucella (Br と略) 寒天培地 (BBL, 5%

羊溶血血液添加), Schaedler (Sch と略) 寒天培地 (BBL, 5% 羊溶血血液添加) 及び Brain Heart Infusion (BHI と略) 寒天培地 (栄研, 5% 羊溶血血液添加) の 5 種類を用い, 試験菌の発育及び 6059-S の抗菌活性に及ぼす影響を検討した。また, pH 6.0, 7.2, 及び 8.0 に調製した GAM 寒天培地を用い, また, 正常人血清を 50% の割合に添加した GAM 寒天培地 (pH 7.2) と接種菌量 (10^6 及び 10^8 CFU/ml) を用い, 更に, $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml の接種菌量を含む GAM 寒天培地を用いてそれぞれ寒天平板希釈法により MIC を求め, pH の影響, 血清の影響及び接種菌量の影響を検討した。

5. 殺菌作用の検討

a: 生菌数の経時的推移を指標とした殺菌作用

薬剤は 6059-S, CFX, CTX 及び CLDM を用い, 試験菌株は β -lactamase 非産生の *B. fragilis* ss *fragilis* R-1-20 株, β -lactamase 産生菌で CTX 耐性の *B. fragilis* ss *fragilis* V-283 株, β -lactamase 非産生菌で CLDM 及び CTX 耐性の *B. fragilis* ss *fragilis* V-290-1 株及び β -lactamase 非産生菌で CFX に耐性傾向を示す *B. fragilis* ss *fragilis* 2509 株の計 4 株を用いた。接種菌は, GAM ブイオンで 37°C で嫌気培養した対数増殖期の菌を用い, 接種菌量は, R-1-20 株の場合は 10^5 及び 10^7 CFU/ml を, その他の菌株は約 10^6 CFU/ml を用いた。各薬剤に曝された菌のサンプリングに関するタイムコースは 1, 3, 5, 7 及び 21 時間とした。生菌数測定用培地には GAM 寒天培地を用い, diluent には GAM ブイオンを用いた。生菌数測定のための希釈及び GAM 寒天培地への plating 操作は, air room 中で可及的速に行ない, 寒天培地が固化した後, 直ちに嫌気培養を行なった。また, 生菌数測定のための嫌気培養は 37°C , 48 時間まで行ない, 肉眼的に発育が認められたコロニー数をカウントした。

b: MBC を指標とした殺菌作用 薬剤は 6059-S, CFX, CTX 及び CLDM を用い, 試験菌は *B. fragilis* ss *fragilis* 39 株を用い, 接種菌量は約 10^6 CFU/ml。測定用培地には GAM ブイオンを用いた。Broth dilution method により, 嫌気培養 24 時間後肉眼的に各薬剤の MIC を求めた後, MIC 近傍の各薬剤濃度を対象として, その 1,000 倍希釈菌液について, 嫌気培養 24 時間後, 菌の発育の有無を肉眼的に判定し, MBC を求めた (殺菌率: 約 99.9%)。

6. *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* R-1-20 の形態に及ぼす作用

試験薬剤は 6059-S, CFX 及び CTX を用い, 試験菌株は *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* R-1-20 株を用いた。また, GAM ブイオンを用い, 嫌気培養した対数

増殖期の 10^8 CFU/ml の菌液を接種菌とした。各濃度の薬剤の処理時間は 1, 3, 5, 7 及び 21 時間まで行なったが, 図表及び写真として示したものは 5 時間処理のデータに限定した。位相差顕微鏡による観察は, 厚さ約 0.7 mm の感性ディスク用寒天培地のフィルムをスライドガラス上に置き, その上に嫌気培養から取り出した試料の小白金量を滴下し, その上にカバーガラスをかぶせ, 倍率 1,000 倍で検鏡し, air room 中で写真撮影を行なった。なお, 本実験は殺菌作用の検討実験と平行して同時に行なったものである。

7. *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* の β -lactamase 活性の有無と β -lactam 系抗生物質の MIC との関連並びにこれら β -lactamase に対する β -lactam 系抗生物質の安定性について

a: 菌体粗酵素液の調製 主として, CTX 及び CEZ に高度耐性を示した菌株を対象として選択した試験菌の凍結保存菌 (-78°C) を GAM ブイオン 200 ml に接種し, 約 16 時間嫌気培養を行ない (ただし, 対照として用いた *Klebsiella pneumoniae* 363 は Heart infusion broth で好気的条件下で培養した), この培養液を, 4°C , 4,000~6,000 rpm, 15~30 分遠沈して集菌した。次いで, この遠沈菌塊を 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 buffer (以下, P-buffer と略, pH 7.0) 6.25 ml に suspend し (これは最初の培養液に対し 32 倍の濃縮率に相当する), 超音波により菌体を破砕し (5 分), 次いで, この破砕液を 4°C , 17,000 rpm, 30 分高速遠沈を行ない, この上清を粗酵素液として使用した。

b: β -lactamase 活性の測定 O'CALLAGHAN⁹⁾ らの方法に準じ, 有色セファロsporin (87/312) の加水分解による呈色反応を利用して酵素活性の測定を行なった。すなわち, u-プレートに酵素試料の P-buffer による 50 μl 倍々希釈系列をつくり, 一方, 試薬有色セファロsporin (87/312) の 0.1 mg/ml 溶液 (黄色) を基質として, 酵素試料の各 well に 50 μl ずつ入れ (基質濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 攪拌後, 室温で 30 分放置し, 黄色の基質が赤色化することにより酵素活性有りと判定した。なお, 酵素活性の相対的強度 (β -lactamase 活性) は, 最初の培養液に対する希釈度 ($1/32 \times$ 酵素液の活性を示した最大希釈倍数) で算出した。

c: β -lactamase の基質特異性並びに β -lactam 系抗生物質の相対的不活化度 (相対的安定性) の測定 G. W. Ross¹⁰⁾ らの報告した microbiological assay (II) に準じて特異性を測定した。すなわち, *E. coli* B を残存活性テスト用試験菌とし, その一夜培養の斜面培養菌を約 10^5 cells/ml となるように Antibiotic medium No. 1 の溶解寒天培地に接種し, 角シャーレに 20 ml 流

して活性測定用平板を作製し、固化した後、1枚の平板に12個のwellをうち抜いた。一方、 β -lactamase活性の認められた酵素試料につき、u-プレートにP-bufferによる50 μ lの倍々希釈系列をつくり($\times 2 \cdots \times 2048$ 及び酵素濃度0)、また、基質として6059-S、CTX、CEZ、CER、PCG、ABPC及びCBPCをとり、終濃度250 μ g/mlとし、P-bufferで調製した溶液を前記の酵素試料希釈系列の各wellに50 μ lずつ入れて37°C、2時間培養した後、その反応液を前記の*E. coli* Bの平板の各wellに20 μ lずつ入れ、37°Cで一晩培養した後、阻止像の直径を測り、各反応液中の薬剤の残存力価を求めた。これより、各基質を50%不活化する酵素試料の希釈度を求め、CERの希釈度を100とした場合の各薬剤の相対的不活化度(相対的安定性)を求めた。

II. 実験成績

1. 6059-Sの抗菌活性に及ぼす諸因子の影響

*In vitro*での嫌気性菌に対する6059-Sの抗菌活性の評価に先立って、試験菌の発育に及ぼす培地の種類の影響、活性に及ぼす諸因子の影響として培地の種類、培地pH、接種菌量及び人血清の添加の影響を検討した。

a: 培地種類の影響 成績はTable 1に示したとおりである。試験菌の発育に関しては、TEP培地におい

て、*Bacteroides fragilis*グループの4菌株が肉眼的に見て他の培地よりも明かに悪いことが認められた。TEP以外の培地では顕著な差は認められなかったが、全体を通して見た場合、GAM培地上での発育は最も良い傾向を示した。MIC値に関しては、GAM及びTEPの両培地では有意の差は認められなかったが、Br寒天培地、Sch寒天培地及びBHI寒天培地では、*Bacteroides fragilis*及び*Fusobacterium*の一部の菌種菌株に対して、GAM及びTEPの場合よりも4倍以上高いMICを与えることが認められた。また、表としては示していないが、CTX、CFX及びCMZにおいても同様の実験結果が認められた。

これら薬剤のMIC値のdeviationは、GAM培地の場合が最も小さいことが認められ、再現性の点でも最も優れていることが認められた。また、血液加Br、Sch及びBHIの各寒天培地では、MICに関するend pointの判読は、血液の添加を必要としないGAM及びTEP培地よりも若干不鮮明で読みにくさがあり、そのため、MIC値の再現性を悪くすることが推測された。更に、培地調製の簡便さの点においては、血液の添加を必要としないGAM及びTEP培地に利点が認められた。以上のような諸結果から、感受性測定用培地としては、前記5種類の培地の中ではGAM培地は調製が最も簡便

Table 1 Effect of media and medium pH on antibacterial activity of 6059-S in agar dilution test

Organism	Growth* (10 ⁶ CFU/ml)					Media** (10 ⁶ CFU/ml)					Medium pH (GAM agar) (10 ⁶ CFU/ml)		
	GAM	TEP	Br	Sch	BHI	GAM	TEP	Br	Sch	BHI	6.0	7.2	8.0
<i>P. anaerobius</i> ATCC 14956	+	+	+	+	+	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	0.78	1.56	1.56
<i>Px. anaerobius</i> B-38	++	++	++	++	++	6.25	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	+	+	+	+	+	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25
<i>C. perfringens</i> JAM-3-1	+++	+++	+++	+++	+++	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.2	0.39	0.78
<i>V. parvula</i> 10790	+	+	+	+	+	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> W-1	+++	+	++	++	+++	0.78	0.78	1.56	1.56	3.13	0.78	0.78	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>thetaiotaomicron</i> IMA-9	+++	+	++	++	+++	0.78	0.2	1.56	1.56	0.39	0.78	0.39	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>vulgatus</i> ES-15	+++	+	++	++	+++	1.56	1.56	3.13	3.13	3.13	1.56	1.56	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> Ju-11-1	+++	+	++	++	+++	3.13	1.56	>100	6.25	12.5	1.56	1.56	1.56
<i>F. varium</i> ATCC 8501	+++	+++	++	++	+++	12.5	12.5	>100	>100	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>F. necrophorum</i> S-45	+++	+++	++	++	+++	0.39	0.2	0.39	0.2	≤0.05	0.2	0.39	0.78

* +: Fair growth, ++: Good growth, +++: Excellent growth

** Br: Brucella agar with 5% sheep blood, Sch: Schaedler agar with 5% sheep blood, BHI: Brain Heart Infusion agar with 5% sheep blood

Table 2 Effect of inoculum size on antibacterial activity of 6059-S, CTX, CMZ and CFX in agar dilution test*

Test organism	6059-S					CTX					CMZ					CFX				
	Inoculum size (CFU/ml)					Inoculum size (CFU/ml)					Inoculum size (CFU/ml)					Inoculum size (CFU/ml)				
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
<i>P. anaerobius</i> ATCC 14956	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>Ps. anaerobius</i> B-38	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	0.78	0.78	0.88	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>E. limosum</i> ATCC B486	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	0.05	0.1	0.1	0.2	0.39	0.39	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>C. perfringens</i> JAM-3-1	0.39	0.39	3.13	3.13	3.13	0.1	0.1	6.25	6.25	12.5	0.2	0.2	0.2	3.13	6.25	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13
<i>V. parvula</i> 10790	1.56	1.56	3.13	3.13	NT**	0.1	0.2	0.2	0.2	NT	0.1	0.1	0.2	0.2	NT	0.2	0.2	0.2	0.39	NT
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> W-1	0.78	0.78	1.56	3.13	6.25	3.13	6.25	25	50	100	6.25	6.25	6.25	12.5	25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>thetataoamicon</i> IMA-9	0.39	0.39	0.78	0.78	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	25	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	0.78	1.56	1.56	1.56	3.13
<i>B. fragilis</i> ss <i>vulgatus</i> ES-15	0.78	1.56	1.56	6.25	>100	1.56	1.56	3.13	12.5	>100	12.5	12.5	12.5	25	>100	6.25	6.25	6.25	6.25	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> Ju-11-1	1.56	1.56	1.56	3.13	>100	3.13	3.13	3.13	12.5	>100	25	50	50	100	>100	25	25	25	25	>100
<i>F. varium</i> ATCC 8501	12.5	12.5	12.5	12.5	>100	12.5	12.5	50	100	>100	3.13	3.13	6.25	12.5	>100	3.13	6.25	6.25	12.5	>100
<i>F. necrophorum</i> S-45	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.025	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

* Medium : GAM agar ** NT : Not tested

Table 3 Effect of human serum on antibacterial activity of 6059-S and CFX in agar dilution test

Test organism	Inoculum size (CFU/ml)	MIC (μg/ml)				Control growth*	
		6059-S		CFX		0% HS	50% HS
		0% HS	50% HS	0% HS	50% HS		
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-20	10 ⁶	0.78	1.56	6.25	3.13	++	++
	10 ⁸	1.56	1.56	6.25	6.25	++	++
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 5550	10 ⁶	0.39	0.78	3.13	3.13	++	++
	10 ⁸	1.56	1.56	3.13	3.13	++	++
<i>B. fragilis</i> ss <i>thetataoamicon</i> R-2-1	10 ⁶	6.25	6.25	12.5	6.25	++	+
	10 ⁸	50	50	12.5	12.5	++	++
<i>F. varium</i> 1482	10 ⁶	6.25	12.5	3.13	6.25	+	++
	10 ⁸	12.5	12.5	6.25	6.25	+	++
<i>F. necrophorum</i> S-45	10 ⁶	0.2	0.39	0.1	0.2	++	++
	10 ⁸	0.39	0.78	0.2	0.39	++	++
<i>F. nucleatum</i> FN-1	10 ⁶	0.78	0.39	0.1	0.1	++	+
	10 ⁸	1.56	1.56	0.1	0.2	++	++
<i>P. anaerobius</i> ATCC 14956	10 ⁶	1.56	3.13	0.39	0.78	+	+
	10 ⁸	1.56	3.13	0.39	0.78	+	+
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 14953	10 ⁶	3.13	3.13	0.78	0.78	±	±
	10 ⁸	3.13	3.13	0.78	0.78	+	+
<i>Ps. anaerobius</i> 0-82	10 ⁶	3.13	6.25	0.39	0.78	++	++
	10 ⁸	6.25	12.5	0.39	1.56	++	++
<i>C. perfringens</i> SAKAI	10 ⁶	0.1	0.1	0.39	0.78	++	++
	10 ⁸	3.13	3.13	3.13	3.13	++	++

* ++ : Good growth, + : Fair growth, ± : Poor growth

で、多種類の菌の発育がよく、かつ、MIC 値の再現性が最も高い結果を示した。従って、Agar Dilution 法における感受性測定用培地としては、GAM 培地が最もすぐれていると判定された。

b: 培地 pH の影響 成績は Table 1 に示したとおりである。6059-S の活性に及ぼす pH (6.0, 7.2, 及び 8.0) の影響は、pH 6.0 と 8.0 との間で、*C. perfringens*, *V. parvula* 及び *F. necrophorum* などの菌株で約 4 倍の MIC 値の差が認められたが、一貫した傾向は認め難く、pH 6.0 と 7.2 及び pH 7.2 と 8.0 との間では、いずれも 2 倍以内の差が認められたに過ぎなかった。また、表には示していないが、CTX, CFX 及び CMZ においても pH 6.0 と 7.2 及び 7.2 と 8.0 との間には有意に異なる MIC 値は認められない実験成績を得た。従って、以上のような諸結果から、培地 pH は GAM 培地無修正の 7.2 が適当であると判定された。

c: 接種菌量の影響 成績は Table 2 に示したとお

りである。10⁸ CFU/ml の高菌量では、6059-S の *B. fragilis* ss *vulgatus*, *B. fragilis* ss *distasonis*, *F. varium* の各 1 株に対する抗菌活性は著しく低下する影響が認められたが、このような影響は、CFX, CMZ 及び CTX においてもまったく同様に認められた。10⁸ CFU/ml と 10⁴ CFU/ml の 100 倍の菌量差における 6059-S の MIC 値の差は、11 株中 1 株 (*C. perfringens*) に対して 8 倍差を示し、2 株 (*B. fragilis* ss *fragilis* w-1 及び *B. fragilis* ss *vulgatus* ES-15) に対しては 4 倍差を示したが、他の 8 株に対してはすべて 2 倍以内の差を示した。他剤と比較すると、CFX よりも若干大きい影響を受けることが認められるが、CTX よりもその影響は小さく、CMZ とほぼ同程度の影響を受けることが認められた。従って、全体的に見ると、10⁸ CFU/ml 以下の菌量では、6059-S の抗菌力に及ぼす接種菌量の影響は一部の菌を除けば比較的小さいことが認められた。

d: 人血清添加の影響 成績は Table 3 に示したと

Table 4 Antibacterial spectra of 6059-S, CFX, CMZ, CTX and CLDM against anaerobic bacteria*

Organism	MIC (μg/ml)									
	Inoculum size: 10 ⁶ CFU/ml					Inoculum size: 10 ⁸ CFU/ml				
	6059-S	CFX	CMZ	CTX	CLDM	6059-S	CFX	CMZ	CTX	CLDM
Gram-positive anaerobes										
<i>P. anaerobius</i> ATCC 14956	1.56	0.39	0.39	1.56	0.78	3.13	0.39	0.39	6.25	0.78
<i>P. anaerobius</i> 1123	3.13	0.78	0.78	3.13	100	3.13	0.78	0.78	25	>100
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 14953	3.13	0.78	0.39	0.78	0.05	3.13	0.78	0.39	0.78	0.05
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	1.56	0.39	0.2	0.39	0.05	1.56	0.39	0.2	0.39	0.1
<i>Ps. anaerobius</i> B-38	6.25	0.78	1.56	0.78	0.025	6.25	0.78	1.56	0.78	0.05
<i>Ps. productus</i> ATCC 27340	3.13	0.78	1.56	0.78	0.2	3.13	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	6.25	0.78	0.39	0.1	0.1	6.25	0.78	0.39	0.1	0.1
<i>E. lentum</i> H-1	100	6.25	6.25	50	0.1	>100	12.5	12.5	>100	0.1
<i>P. acnes</i> P-15	0.2	0.1	0.05	0.025	0.05	0.39	0.1	0.1	0.05	0.05
Gram-negative anaerobes										
<i>V. parvula</i> 10790	1.56	0.2	0.1	0.2	0.05	3.13	0.39	0.2	0.2	0.05
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> W-1	0.78	6.25	6.25	3.13	0.05	1.56	12.5	6.25	25	0.1
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 2509	0.39	25	25	0.78	0.05	0.78	25	50	3.13	0.1
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 5550	0.78	6.25	6.25	1.56	>100	1.56	6.25	6.25	25	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>thetaiotaomicron</i> IMA-9	0.78	0.78	1.56	3.13	0.2	1.56	1.56	3.13	6.25	0.2
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> Ju-11-1	1.56	12.5	25	1.56	0.2	3.13	25	25	3.13	0.39
<i>B. fragilis</i> ss <i>vulgatus</i> ES-15	1.56	6.25	12.5	1.56	0.1	6.25	6.25	25	25	0.1
<i>B. fragilis</i> ss <i>ovatus</i> 2505	3.13	12.5	25	12.5	0.2	50	25	100	50	0.39
<i>F. varium</i> ATCC 8501	12.5	3.13	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	6.25	50	6.25
<i>F. varium</i> B-1083	6.25	3.13	1.56	3.13	0.78	6.25	3.13	3.13	6.25	3.13
<i>F. necrophorum</i> S-45	0.39	0.2	0.1	0.05	0.025	0.39	0.2	0.1	0.05	0.05
<i>F. nucleatum</i> FN-1	1.56	0.2	0.1	0.2	0.025	3.13	0.78	0.2	0.78	0.05
<i>F. mortiferum</i> F-1-9	6.25	3.13	1.56	>100	0.05	12.5	6.25	3.13	>100	0.05
<i>B. melaninogenicus</i> ss <i>asaccharolyticus</i> R-25	0.39	0.2	0.1	0.05	0.1	0.39	0.39	0.2	0.05	0.1
<i>B. melaninogenicus</i> ss <i>melaninogenicus</i> B-11	50	6.25	6.25	6.25	0.0125	100	6.25	6.25	50	0.0125
Spore forming anaerobe										
<i>C. perfringens</i> JAM-3-1	0.39	1.56	0.2	0.1	0.1	3.13	3.13	3.13	6.25	0.2

* Medium : GAM agar

おりである。各種の代表的嫌気性菌 10 株に対する 6059-S の抗菌力に及ぼす 50% の人血清の影響は、接種菌量 10^6 及び 10^8 CFU/ml のいずれの場合でも、無添加に比べ 2 倍以内の MIC の差を示したにとどまり、その影響は極めて小さいことが認められた。CFX の場合も同様の結果が認められた。

2. 抗菌スペクトラム

成績は Table 4 及び Table 5 に示したとおりである。6059-S の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムの特徴は、特定の少数菌種を除き、ほとんど大部分のグラム陽性菌及び陰性菌の両者に対して 0.2~6.25 の MIC を示し、広域抗菌スペクトラムを示すことである。これらの抗菌スペクトラム及び抗菌力の強さを他剤と比較すると、CLDM よりは明らかに弱い活性を示した。Cephalosporin 系抗生物質の CFX, CMZ, CTX 及び CZX

と較べると、*B. fragilis* を除いた菌種に対しては、全体的に見てこれらよりも 6059-S の活性はある程度弱い傾向を示したが、*B. fragilis* ss *fragilis* に対しては、6059-S は他のいずれよりも強い活性を示す特長が認められた。また、CLDM 耐性の *P. anaerobius* F-1-9, CZX に耐性傾向を示す *B. fragilis* ss *fragilis* V-288, V-283, V-287-1, CFX 及び CMZ に耐性傾向を示す *B. fragilis* ss *fragilis* 2509, 及び CMZ に耐性傾向を示す *B. fragilis* ss *distasonis* Ju-11-1 は、いずれも 6059-S に対しては感受性を示すことが認められた。

3. 臨床分離株の感受性分布と感受性相関

a: *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* 56 株 感受性分布に関する成績は Fig. 1 (接種菌量: 10^8 CFU/ml) 及び Fig. 2 (10^6 CFU/ml) に、感受性相関の結果は Fig. 3 に示したとおりである。

接種菌量 10^6 CFU/ml の場合では、6059-S の MIC 分布幅は 0.39~12.5 μ g/ml を示し、そのピーク値は 0.78 及び 6.25 の二峰性を示した。また、MIC の累積 % では 6.25 μ g/ml 以下の濃度で 96.4% を示すことが認められた。これらの成績を他剤と比較すると、CLDM は、9 株の耐性菌を除き、6059-S よりも明らかに強い活性を示すことが認められたが、これら 9 株の CLDM 耐性菌は 6059-S に対してはすべて感受性を示すことが認められた。 β -lactam 系抗生物質である CFX, CMZ, CTX 及び PIPC に比べ、6059-S は、これらのいずれよりも明らかに強い活性を示すことが認められた。一方、接種菌量 10^8 CFU/ml の場合においても、 10^6 CFU/ml の場合とまったく同様の結果が認められた。

更に、感受性相関の検討成績 (Fig. 3) においても、6059-S は CFX, CMZ, PIPC 及び CTX のいずれよりも明らかに強い活性を示すことが認められた。すなわち、以上のような結果を総合すると、臨床分離菌 *B. fragilis* ss *fragilis* に対し 6059-S は、CFX, CMZ, PIPC 及び CTX のいずれよりも優る抗菌活性を示すことが認められた。

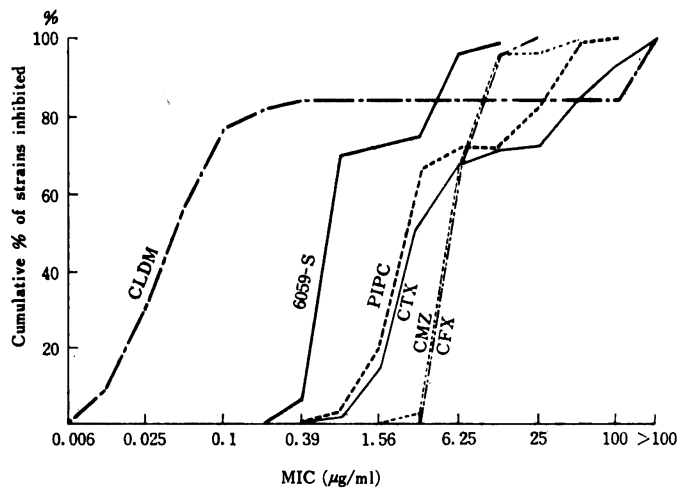
b: *Bacteroides fragilis* グループ 100 株 (ss *fragilis* 56 株, ss *thetaiotaomicron* 14 株, ss *distasonis* 12 株, ss *vulgatus* 16 株, ss *ovatus* 2 株) 感受性分布に関する成績は Fig. 4 (接種菌量 10^6 CFU/ml) 及び Fig. 5 (10^8 CFU/ml) に示したとおりである。 10^6 CFU/ml の場合における 6059-S の MIC の分布幅は 0.39~50 μ g/ml を示し、そのピーク値は 0.78 及び 6.25 μ g/ml の二峰性を示した。MIC の累積 % では、6.25 μ g/ml 以下の濃度で約 90% を示すことが認められた。これらの成績を他剤と比較すると、CLDM は、

Table 5 *In vitro* antibacterial activity of 6059-S against anaerobes compared with that of CZX in agar dilution test*

Test organism	MIC (μ g/ml)	
	6059-S	CZX
Gram-positive anaerobes		
<i>P. anaerobius</i> ATCC 14956	1.56	0.78
<i>P. anaerobius</i> 1123	1.56	3.13
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 14953	3.13	0.78
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	1.56	0.39
<i>Pa. anaerobius</i> 5227	6.25	0.1
<i>Pa. anaerobius</i> 0-82	3.13	0.1
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	6.25	3.13
<i>E. lentum</i> H-1	100	25
<i>P. acnes</i> P-15	0.2	≤ 0.006
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	0.2	≤ 0.006
Gram-negative anaerobes		
<i>V. parvula</i> 10790	0.78	0.1
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-20	0.78	1.56
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-288	6.25	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 5550	0.78	1.56
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-280-1	0.78	1.56
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-283	6.25	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-287-1	6.25	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-231	0.78	1.56
<i>B. fragilis</i> ss <i>thetaiotaomicron</i> R-2-1	12.5	6.25
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> R-3-25	1.56	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> clin 99-3	1.56	3.13*
<i>B. fragilis</i> ss <i>distasonis</i> Ju-11-1	0.78	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>ovatus</i> 2505	6.25	3.13
<i>F. varium</i> ATCC 8501	6.25	3.13
<i>F. varium</i> 1482	6.25	6.25
<i>F. varium</i> B-1083	6.25	0.39
<i>F. necrophorum</i> S-45	0.2	0.0125
<i>F. necrophorum</i> 8C	0.2	0.05
<i>F. necrophorum</i> 6487	0.2	0.0125
<i>F. mortiferum</i> F-1-9	3.13	>100
<i>F. mortiferum</i> EG-1	3.13	0.2
Spore forming anaerobes		
<i>C. perfringens</i> SAKAI	0.1	0.05
<i>C. perfringens</i> NH-6	0.1	0.05

* Medium: GAM agar, Inoculum size: 10^6 CFU/ml

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates of anaerobic bacteria
B. fragilis ss *fragilis* (10⁶ cells/ml)
56 strains



Drug	Tested strain	MIC (μg/ml)															
		≤0.0025	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
6059-S	56						4	35	1	2	12	2					
CFX	56									1	37	16	2				
CMZ	56									2	37	15		2			
PIPC	56							2	10	25	3		6	9	1		
CLDM	56	5	12	16	10	3	1									9	
CTX	56							1	8	21	9	1	1	6	5	4	

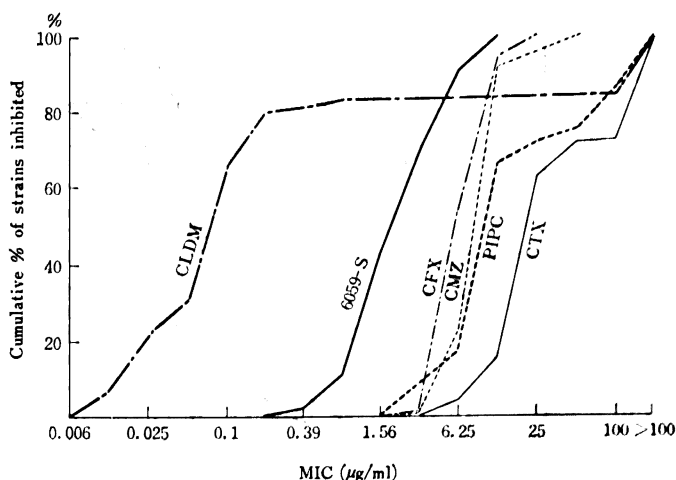
11 株の耐性菌を除けば、6059-S よりも明らかに強い活性を示したが、これら 11 株の CLDM 耐性株に対しては 6059-S は明らかに CLDM よりも強い活性を示すことが認められた。また、6059-S は β -lactam 系抗生物質である CTX、PIPC、CFX、CMZ、CEZ 及び CTM よりも明らかに強い活性を示すことが認められた。一方、接種菌量 10⁶ CFU/ml の場合においても (Fig. 5), 10⁶ CFU/ml の場合と同様な結果が得られた。すなわち、*Bacteroides fragilis* グループの菌群に対しても 6059-S は CTX、PIPC、CFX、CMZ、CEZ 及び CTM よりも明らかに優る活性を示すことが認められた。

c: *Fusobacterium* 31 株 (*F. varium* 8 株, *F. necrophorum* 11 株, *F. nucleatum* 7 株, *F. mortiferum* 5 株) 感受性分布に関する成績は Fig. 6 に示したとおりである。接種菌量 10⁶ CFU/ml における

6059-S の MIC の分布幅は 0.2~12.5 μ g/ml を示し、そのピーク値は 0.39 及び 6.25 μ g/ml の二峰性を示したが、ほとんどすべての菌株に対して $\leq$ 6.25 μ g/ml の MIC を示した。また、MIC の累積%では、 $\leq$ 6.25 μ g/ml 以下の濃度で約 90% を示した。この成績を他剤と比較した場合、CLDM、PIPC、CTX、CEZ、CMZ、CFX 等よりは弱い、CTM にほぼ近い強さの活性を示すことが認められた。なお、CTX に対して耐性 (MIC>100 μ g/ml) を示した 3 菌株は、6059-S に対してはすべて 6.25 μ g/ml の MIC を示した。

d: グラム陽性球菌 24 株 (*Peptococcus* 16 株, *Peptostreptococcus* 8 株) 感受性分布に関する成績は Fig. 7 に示したとおりである。接種菌量 10⁶ CFU/ml における 6059-S の MIC 分布幅は 0.1~6.25 μ g/ml を示し、ピーク値は 1.56 μ g/ml を示した。また、MIC

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates of anaerobic bacteria
B. fragilis ss *fragilis* (10^8 cells/ml)
 56 strains



Drug	Tested strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)															
		≤ 0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
6059-S	56						1	5	19	15	11	5					
CFX	56									1	31	22	2				
CMZ	56									1	12	39	2	2			
CLDM	56	4	8	5	20	8	1	1								9	
PIPC	56									5	5	27	3	2	6	8	
CTX	56										2	6	26	6		16	

の累積%の成績を見ると、PIPC, CLDM, CFX, CMZ, CEZ, CTX 等よりも弱い、CTM とほぼ同等の活性を示し、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で 100% を示した。

e: *Propionibacterium acnes* 10 株 感受性分布に関する成績は Table 6 に示したとおりである。接種菌量 10^6 CFU/ml における 6059-S の MIC の分布幅は 0.2~1.56 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CLDM, CTX, CFX, CMZ, PIPC, ABPC, CEZ, CTM よりは弱い、CP 及び TC とほぼ同等の強さの活性を示すことが認められた。

4. 殺菌作用の検討

a: 生菌数の経時的推移を指標とした殺菌作用 β -lactamase 非産生菌 *B. fragilis* ss *fragilis* R-1-20 株 (接種菌量 1.9×10^5 CFU/ml) に対する殺菌作用の成績は Fig. 8 に示したとおりである。6059-S の殺菌作用は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で発現され、その作用は 3.13

$\mu\text{g/ml}$ (4 MIC) までは顕著に増強され、経時的には 1~3 時間後に最も強く発現され、以後 21 時間まで持続される。8 時間の時点では、3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではほぼ 10^{-3} の生菌数の減少を示し、21 時間の時点ではほぼ 10^{-4} に減少することが認められた。また、regrowth 菌の出現は認められなかった。CLDM の殺菌作用に較べると、絶対濃度的には CLDM のほうが強い殺菌作用を発現することが認められたが、培養 8 時間以降において regrowth 菌の出現が認められた。CTX 及び CFX に較べると、絶対濃度を指標にして見ると、6059-S のほうが明らかに強い殺菌作用を示すことが認められた。また、CTX の場合には、regrowth 菌の出現が認められた。本菌株の接種菌量を 1.3×10^7 CFU/ml に増量した場合の殺菌作用の成績は、Fig. 9 に示したとおりであるが、全体的に見れば、6059-S, CFX 及び CLDM は

Fig. 3 Correlation of MICs between 6059-S and other antibiotics against 56 clinical isolates of *Bacteroides fragilis* ss *fragilis*

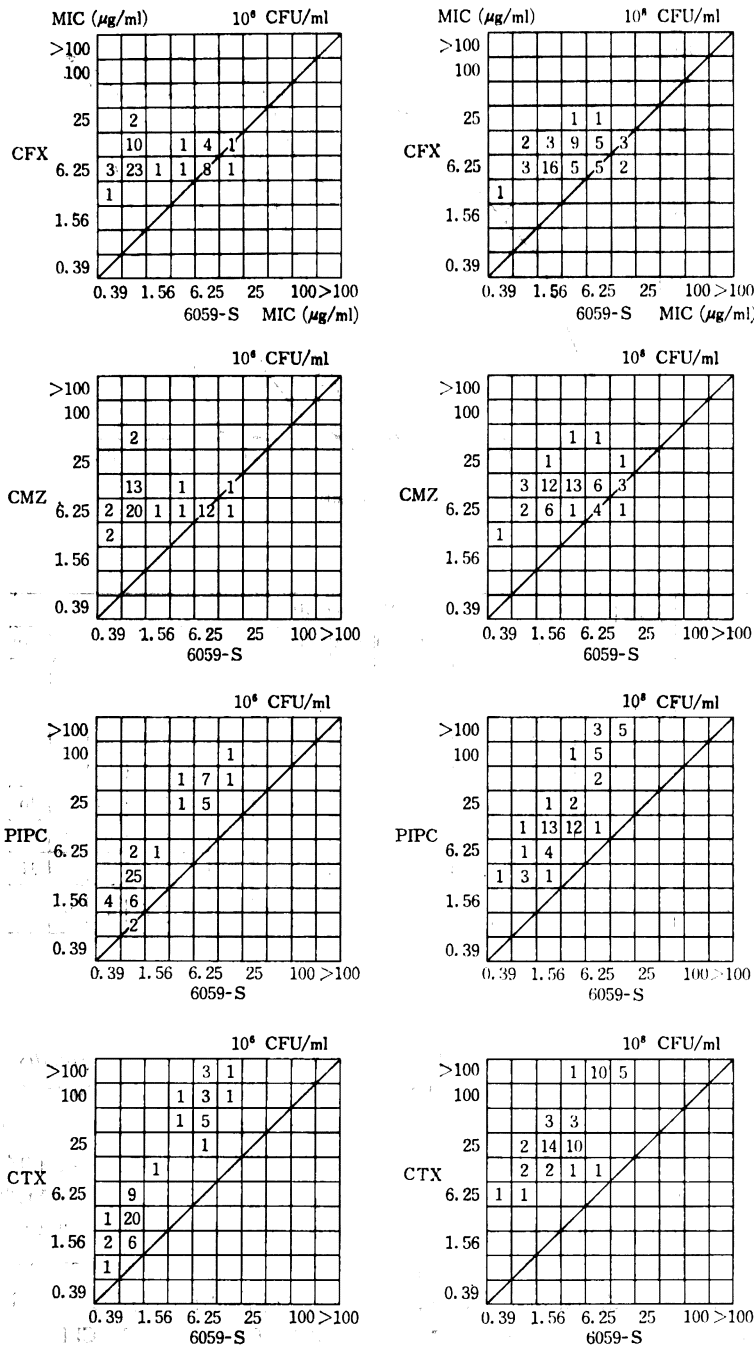
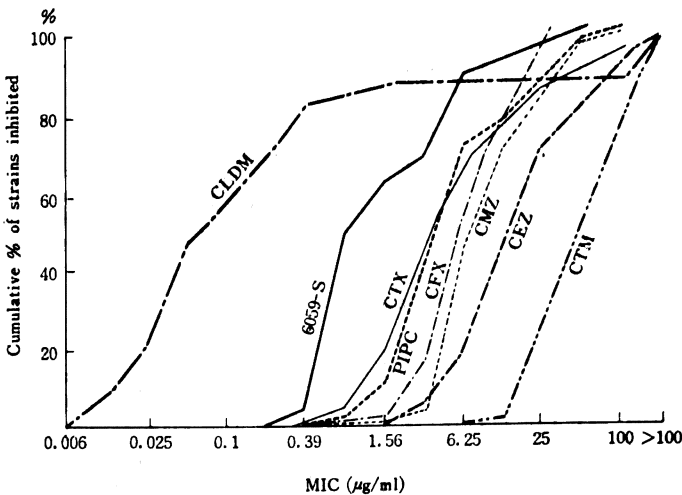


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates of anaerobic bacteria
Bacteroides fragilis (10^8 cells/ml)
100 strains



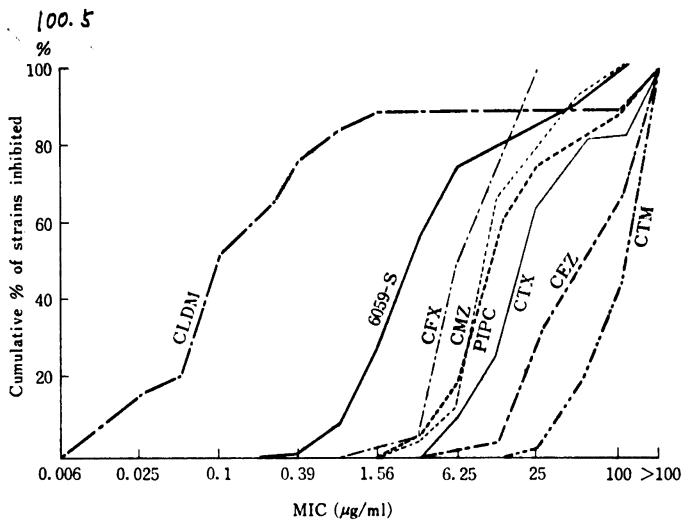
Drug	Tested strain	MIC (µg/ml)														
		≤0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
6059-S	100						4	44	15	6	21	4	4	2		
CFX	100							1	1	15	39	24	20			
CMZ	100								1	3	42	26	13	13	2	
CEZ	100									6	13	29	23	11	1	17
CTM	100											3	23	33	31	10
PIPC	100							2	10	32	26	8	10	10	2	
CLDM	100	9	12	26	13	10	14	1	4							11
CTX	100						1	4	17	33	13	9	6	7	5	5

1.9×10^5 CFU/ml の場合とはほぼ同様の殺菌力を示したのに対し、CTX の殺菌力は顕著に低下する特徴が見られた。

Regrowth 菌の出現に関しては、CTX が最も顕著である特徴を示し、CLDM 及び CFX でも若干の regrowth 菌の出現が見られたが、6059-S では見られなかった。以上のように、本菌株に対する 6059-S の殺菌作用の強さは、絶対濃度的には CLDM よりは弱い、CFX 及び CTX よりも明らかに強いことが認められた。これら殺菌作用の強さの関係は、MIC から見た活性の強さによく平行することが認められた。また、6059-S の殺菌作用は接種菌量の影響を最も受け難いことが認められた。次に、 β -lactamase 産生菌で CTX に耐

性を示した *B. fragilis* ss *fragilis* V-283 に対する殺菌作用の検討成績は、Fig. 10 に示したとおりである。6059-S の殺菌力は CLDM よりは弱い、CTX 及び CFX よりも明らかに強い殺菌力を示し、かつ、regrowth 菌は 6059-S の場合が最も出現し難い結果を示した。更に、 β -lactamase 産生菌で CTX 及び CLDM に耐性を示した *B. fragilis* ss *fragilis* V-290-1 に対する殺菌作用の検討成績は、Fig. 11 に示したとおりであるが、6059-S は CTX、CLDM 及び CFX のいずれよりも明らかに強い有効な殺菌作用を示すことが認められた。また、 β -lactamase 非産生菌で CFX に対して耐性傾向を示した *B. fragilis* ss *fragilis* 2509 に対する殺菌作用の検討成績は、Fig. 12 に示したとおりであ

Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates of anaerobic bacteria
Bacteroides fragilis (10⁸ cells/ml)
100 strains



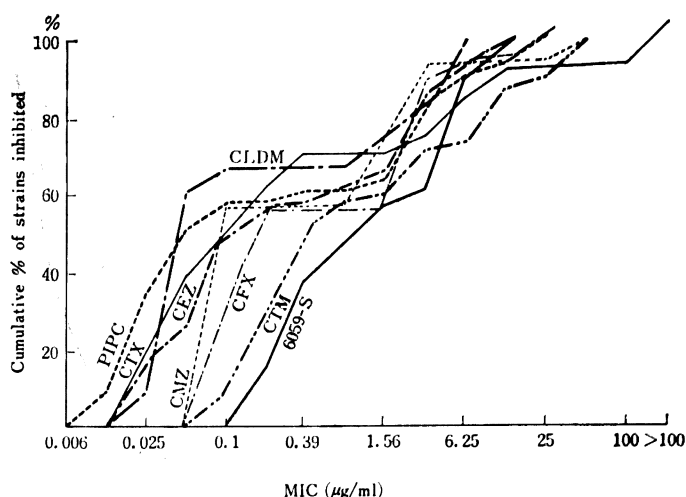
Drug	Tested strain	MIC (µg/ml)														
		≤0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
6059-S	100						1	7	21	28	18	5	6	5	9	
CFX	100								2	3	45	28	22			
CMZ	100									3	12	52	14	12	7	
CEZ	100										2	2	27	19	16	34
CTM	100												2	17	25	56
PIPC	100									5	15	39	17	8	6	10
CLDM	100	8	8	5	31	9	15	8	4				1			11
CTX	100										10	19	36	17	1	17

るが、6059-S は CFX 及び CTX のいずれよりも明らかに強い殺菌作用を示した、CTX においては、regrowth 菌の出現が顕著に認められた。以上のように、6059-S は β -lactamase 非産生の感受性菌及び CFX 耐性菌、 β -lactamase 産生の CTX 耐性菌及び CTX と CLDM の両者の耐性菌である *B. fragilis* ss *fragilis* に対し、すべて有効な殺菌作用を示す特長が認められた。また、regrowth 菌の出現に関しては、CTX の場合は極めて顕著に認められ、CLDM 及び CFX の場合にもある程度認められたが、6059-S の場合はほとんど認められない特長を示した。

b: 臨床分離菌 *B. fragilis* ss *fragilis* 39 株に対

する 6059-S の MBC の検討 殺菌率を 99.9% に設定した場合の MBC の成績は Fig. 13 に示したとおりである。それらのほとんどすべての菌株に対する MBC は、1 MIC~2 MIC の濃度幅に存在することが認められた。MBC の累積%から見ると、約 70% の菌株が 6.25 µg/ml 以下の濃度に存在することが認められた。6059-S の MBC は CLDM のそれよりは明らかに高い濃度を示したが、CTX 及び CFX よりも明らかに強いことが認められた。すなわち、6059-S は *B. fragilis* ss *fragilis* に対して、MIC の場合と同様に、MBC でも他の β -lactam 系抗生物質よりも明らかに優れている特長を有することが見出された。

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates of anaerobic bacteria
Fusobacterium (10^8 cells/ml)
 31 strains

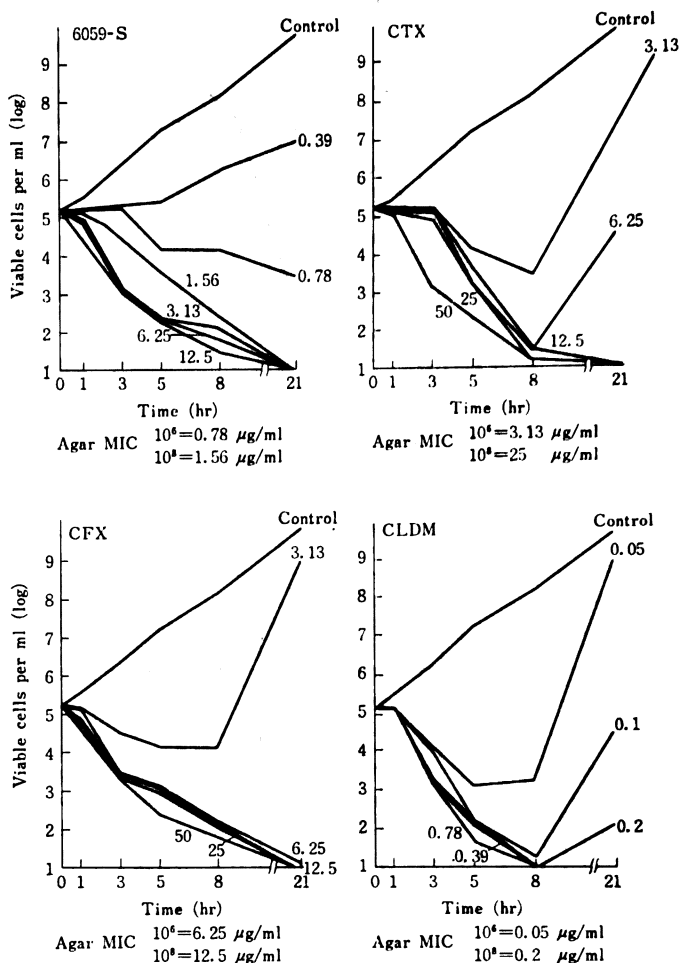


Drug	Tested strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
		≤ 0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
6059-S	31					5	7	3	3	1	9	3				
CFX	31				10	8				10	1		2			
CMZ	31			1	17				6	5				2		
CEZ	31		5	3	8	2		1	2	6	2	2				
CTM	31				3	6	7	2	1	3	1	4	1	3		
PIPC	31	3	8	5	2		1		1	6	2	1	2			
CLDM	31		3	16	2				2	3	5					
CTX	31		6	6	4	3	3			1	3	2				3

5. *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* R-1-20 の形態に及ぼす 6059-S の作用 各薬剤の処理時間については、1, 3, 5, 7, 及び 21 時間まで検討したが、exposure time 1 時間では各薬剤とも高濃度における lysed cells 以外の著明な形態変化は認められなかった。Exposure time 3 時間では、低濃度から高濃度になるにつれて filament cells, spheroplast 様 cells, lysed cells の形成が示され、exposure time 5 時間及び 7 時間で、それらの形態変化は最も著明になることが示された。そこで、成績は Fig. 14 (写真) に示したように、薬剤に対する菌の exposure time 5 時間のものに限定して示した。6059-S による形態変化としては、菌細胞の伸長化による filament cells の形成、更に、spheroplast 様 cells 及び lysed cells の形成が認められたが、これらの基本

的な形態変化は、CTX 及び CFX の場合にも共通して認められた。しかし、この filament cells の形成に関しては、CTX では、cells の伸長化が最も顕著で、かつ長い filament cells の形成濃度域が最も広く、0.78 ~ 25 $\mu\text{g/ml}$ を示したのに対し、6059-S では、それよりも狭く、かつ低濃度域の 0.2 ~ 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CFX では、僅かに伸長化した filament cells が極く狭い濃度域 (1.56 ~ 3.13 $\mu\text{g/ml}$) で形成される特徴が認められた。また、lysed cells の形成が発現される濃度は、6059-S が最も低くて約 0.78 $\mu\text{g/ml}$ を示し、次いで、CFX の場合で 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CTX の場合では最も高くて 25 $\mu\text{g/ml}$ を示した。なお、exposure 21 時間では、6059-S の各濃度における形態変化は、exposure 5 時間の場合とほぼ同様であったが、CFX のそれ

Fig. 8 Bactericidal activity of 6059-S, CTX, CFX and CLDM against *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* R-1-20 *in vitro* (1.9×10^5 cells/ml)



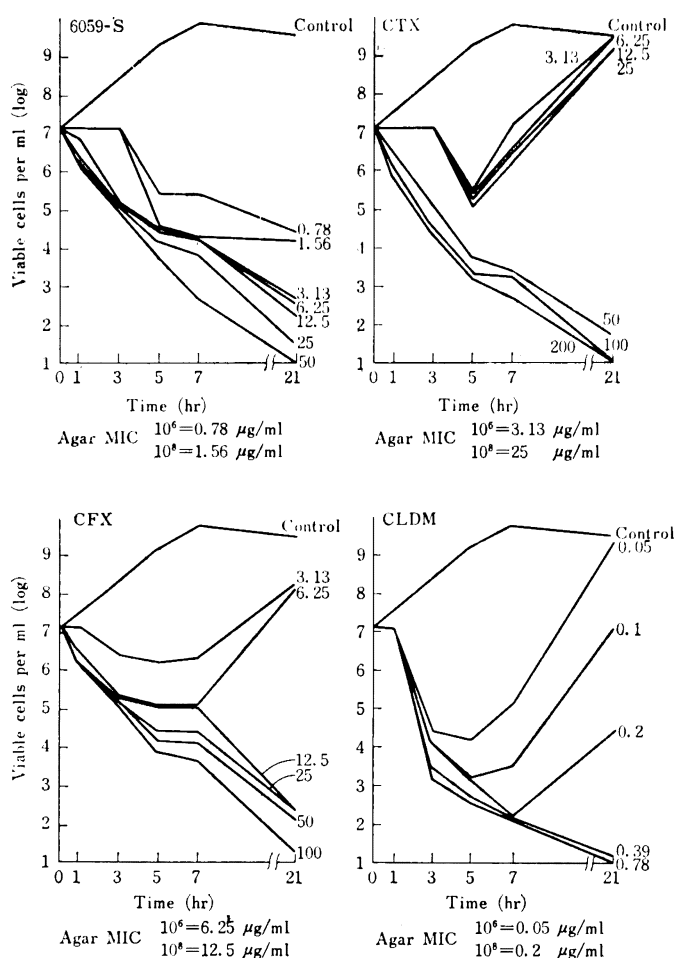
は exposure 5 時間ではほとんど cells の存在が認められなかった $6.25 \mu\text{g/ml}$ で多くの僅かに伸長した cells が認められた。CTX の場合は, exposure 5 時間ではほとんど normal morphology を示す cells が認められなかった $12.5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ において, 多くの normal morphology を示す cells が認められた。Fig. 15 に薬剤に対する菌の exposure time 5 時間の時点における各薬剤の各濃度による形態変化, 特に, lysed cells の形成が開始される濃度と殺菌作用の発現が開始される濃度との関係を示した。6059-S と CFX では, 両者の関係がほぼ一致する結果を示したが, CTX の場合は, 殺菌作用の発現開始濃度が lysed cells の形成が開始さ

れる濃度よりも若干低いことが認められた。

6. *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* の β -lactamase 活性の有無と β -lactam 系抗生物質の MIC との相関について

成績は Table 7 に示したとおりである。菌体粗酵素液に β -lactamase 活性の認められた 19 株のうち, strains W-1, V-299-2 及び R-1-23 の 3 株を除く 16 株は, すべて CTX, CEZ 及び ABPC に対しては耐性を示したが, 6059-S 及び CFX に対してはすべて感受性を示した。逆に, β -lactamase 活性の認められなかった 10 株は, CTX, CEZ 及び ABPC に対してもすべて感受性ないし感受性の傾向を示した。すなわち, *B.*

Fig. 9 Bactericidal activity of 6059-S, CTX CFX and CLDM against *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* R-1-20 *in vitro* (1.3×10^7 cells/ml)



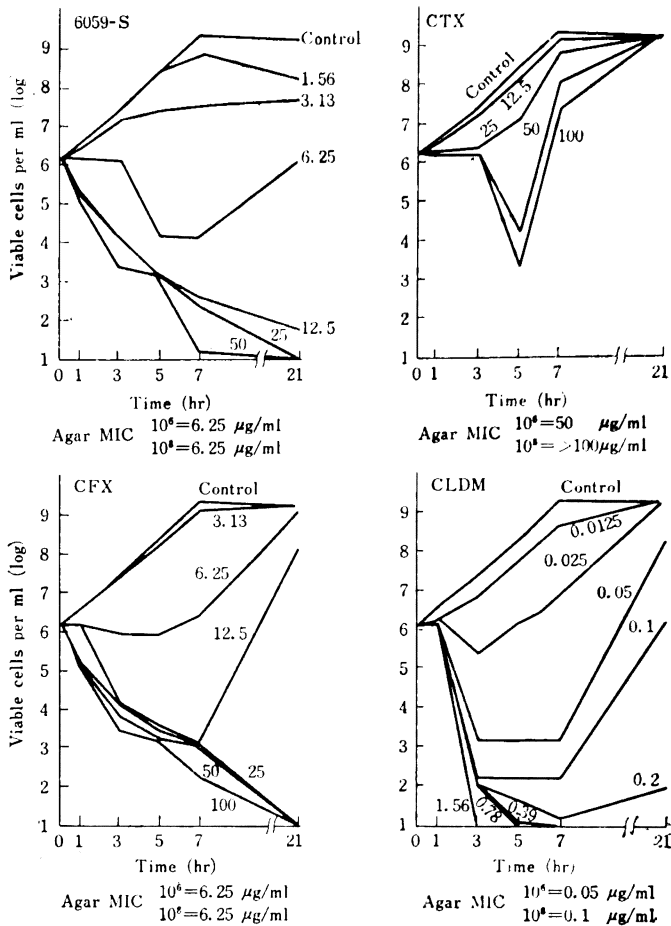
fragilis ss *fragilis* においては、全体を通して見れば、 β -lactamase 活性の有無と、それらの菌に対する β -lactam 系抗生物質の MIC との間には相関性が存在することが認められた。しかし、より詳細に見れば、前述した 3 株のように、 β -lactamase を産生するにもかかわらず、非産生株と同様、CTX、CEZ 及び ABPC に対しても感受性ないし感受性傾向を示し、6059-S に対しても非産生株と同様の感受性を示した。従って、一部には相関性の認められない菌株も存在することが示された。また、CFX に対しては、 β -lactamase 産生株も非産生株も同様の MIC を示したが、後述するように、CFX と同様に、 β -lactamase に対して高い安定性を示した

6059-S に対しては、 β -lactamase 産生株（前述の 3 株を除く）は、感受性ではあるが、非産生菌よりも平均約 8 倍程度大きい MIC 値を示した点が注目された。

7. *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* の産生する β -lactamase に対する β -lactam 系抗生物質の安定性について

成績は Table 8 に示したとおりである。 β -lactamase を産生する 19 株のすべての酵素が CER 及び CEZ を比較的よく分解するのに対し、ペニシリン系抗生物質である ABPC、CBPC 及び PCG の分解率は低く、従って、これらの基質特異性から見て、これらの β -lactamase は Cephalosporinase 型と推定された。また、対

Fig. 10 Bactericidal activity of 6059-S against *B. fragilis* ss *fragilis* V-283 resistant to CTX (1.9×10^6 cells/ml)



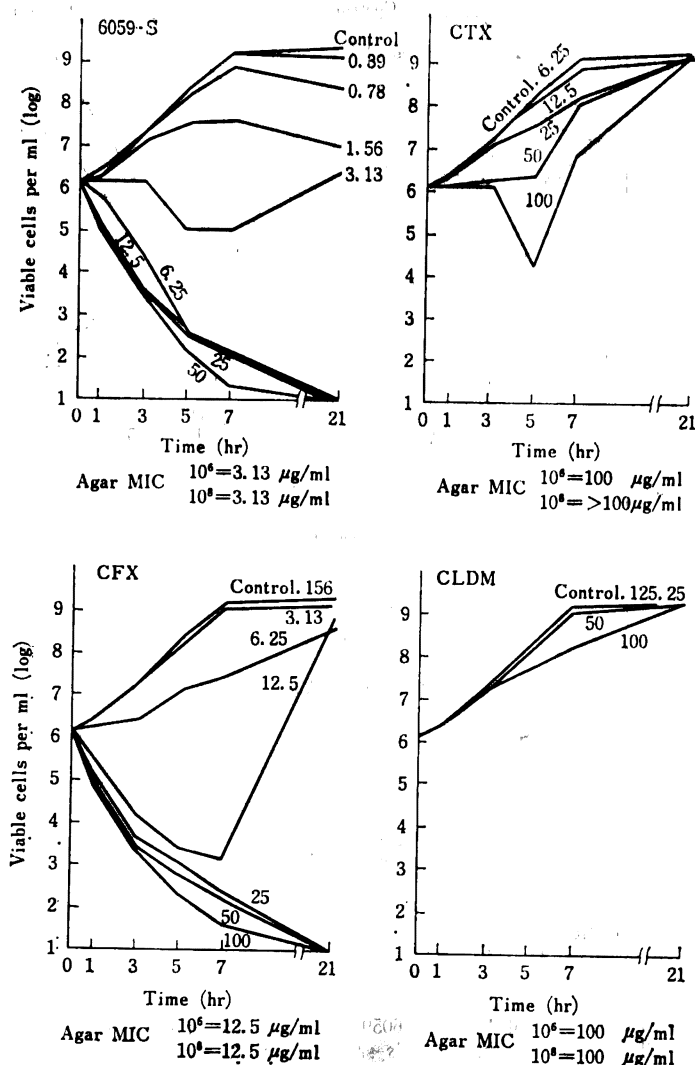
照に用いた *Klebsiella pneumoniae* 363 の酵素は既知の Penicillinase 型であり、Cephalosporins よりも Penicillins を明らかによく分解することが認められた。これら 19 株が産生する β -lactamase に対して、6059-S 及び CFX は同様にほとんど不活化されず、極めて高い安定性を示したのに対し、CTX ではある程度の不活化が見られた。

Ⅲ. 考 察

Oxacephem 系抗生物質である 6059-S は、嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* に対して、従来報告の β -lactam 系抗生物質のなかでは最も高い活性評価がなされてきた CFX または CTX よりも明らかに強い活性を示す特長

が認められた。この点に関しては、NEU¹¹⁾、BARZA¹²⁾ 及び WISE¹³⁾ らによっても同様の成績が報告されているが、何故、6059-S が *B. fragilis* に対して特異的に有効な活性を示すのかの原因については未だ明かにされていない。この点に関して、今回、著者らの得た実験成績 (Table 7 及び Table 8) から見ると、この菌種の産生する β -lactamase に対する安定性が重要な一因として寄与していることは明かである。一方、少数例とはいえ、一部の β -lactamase 産生株に対して、6059-S では、同様に高い β -lactamase に対する安定性を示す CFX よりも明らかに強い活性を示す例が存在すること、また、 β -lactamase 非産生株 (10 株) に対しては、例外なく 6059-S の活性は CFX よりも明らかに強い点

Fig. 11 Bactericidal activity of 6059-S against *B. fragilis* ss *fragilis* V-290-1 resistant to CTX and CLDM (1.5×10^6 cells/ml)



を併せ考えると、 β -lactamase に対する高い安定性がその理由のすべてとは考え難い。更に、Fig. 14 に示したように、6059-S と CFX 及び CTX とは、*B. fragilis* に及ぼす形態変化、作用濃度域の広さ、lysis 発現の濃度等において明らかに異なる点が認められる事実を併せ考察するに、*B. fragilis* に対する 6059-S の有する特異的構造に由来する特異的な作用機構の存在の可能性が考えられる。例えば、 β -lactam 系抗生物質の主要な作用標的とされている Penicillin Binding Protein との親和性に関する特異性の存在、あるいは、透過性に関

する特異性の存在、または、その他の原因による可能性等が考えられるが、これらの点に関しては今後の検討に待ちたい。

殺菌作用の検討成績に関し、各薬剤処理後の re-growth 菌の出現について見ると、殺菌作用の経時的推移全般の検討成績、特に Fig. 9 に見られるように、CTX で最も顕著に認められ、次いで、CLDM 及び CFX でも若干見られるが、6059-S では最も少ないことが認められた。この様な現象は、図表には示していないが、形態に及ぼす作用の経時的推移における 21 時間ま

Fig. 12 Bactericidal activity of 6059-S, CTX and CFX against *B. fragilis* ss *fragilis* 2509 (1.6×10^6 cells/ml)

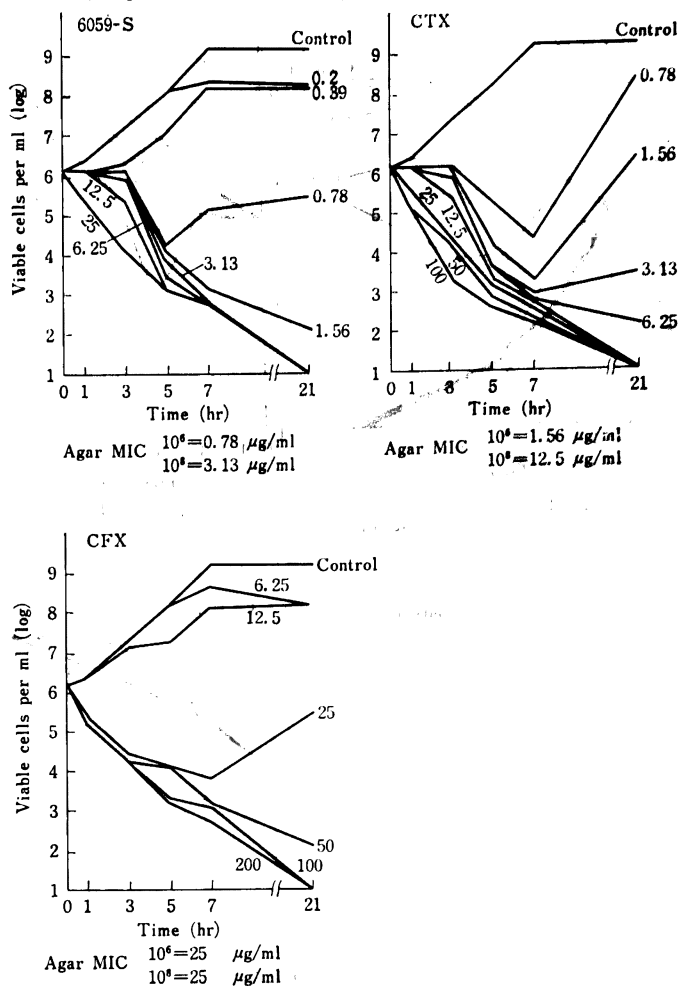


Fig. 13 Comparison of MBC of 6059-S with those of CTX, CFX and CLDM against *B. fragilis* ss *fragilis* (39 strains)

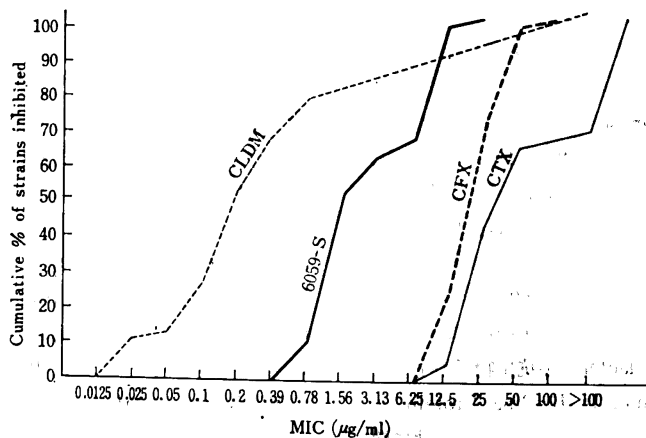
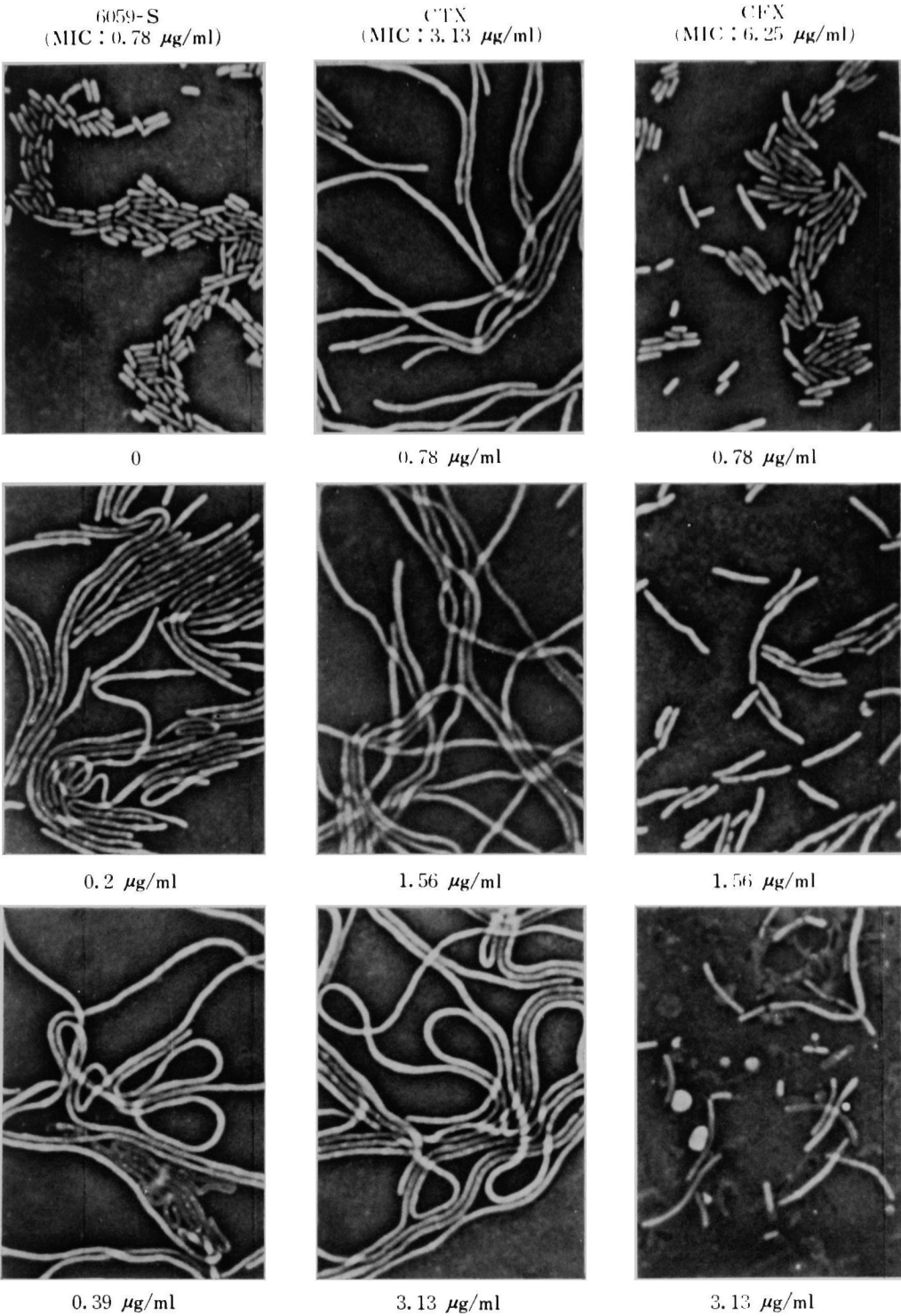
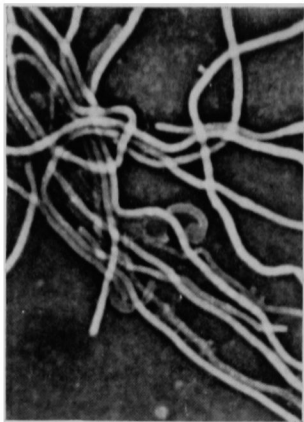


Fig. 14 Morphological effects of 6059-S, CTX and CFX on *B. fragilis* ss *fragilis* R-1-20
(Exposure: 5 hr, Medium: GAM broth)

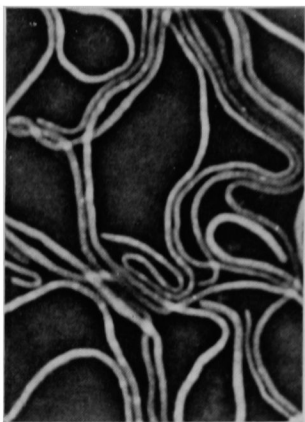


6059-S



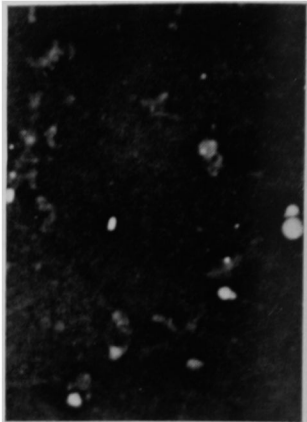
0.78 µg/ml

CTX



6.25 µg/ml

CFX



6.25 µg/ml



1.56 µg/ml



25 µg/ml

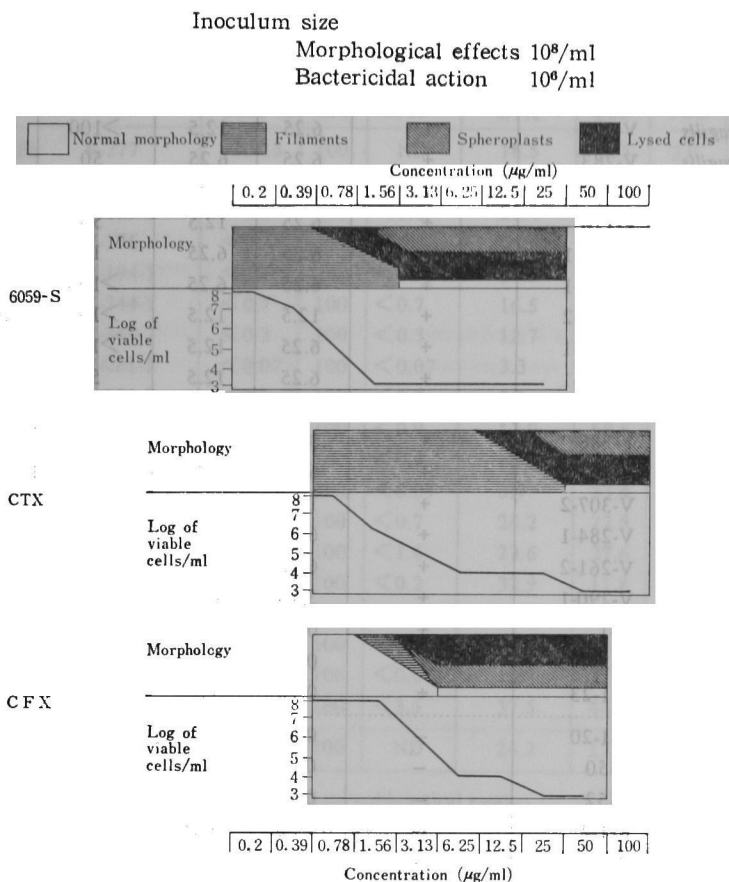


3.13 µg/ml



50 µg/ml

Fig. 15 Correlation between morphological effects and bactericidal action on *B. fragilis* ss *fragilis* R-1-20 after 5 hr exposure to each drug



での処理条件での形態観察の結果からも同様の結果が認められた。なお、この際の broth 中における薬剤濃度の経時的推移は測定していないが、CTX の場合、 β -lactamase 非産生菌の場合 (Fig. 9) でも薬剤処理 5 時間以降において、顕著な regrowth が認められる点を考慮すれば、broth 中の薬剤の短時間での分解による失活とは考え難く、従って、このような現象は恐らく各薬剤の有する特徴の一つと考えられる。このような現象が直ちに臨床効果に反映されるとは早計には結論し難いが、6059-S の場合に regrowth 菌の出現が最も少ないことは、それだけ殺菌作用の持続性において他剤よりも優れていることを示すものであり、6059-S のメリットの一つと考えられる。

また、Table 7 の成績に見られるように、 β -lactamase 産生株である *B. fragilis* はすべて 6059-S に対し

て感受性を示したが、これら大部分の菌株に対する 6059-S の MIC 値は β -lactamase 非産生株の MIC に較べると約 8 倍程度大きい値を示すことが認められた。このことは、Fig. 1 の成績に見られた *B. fragilis* ss *fragilis* の臨床分離株の 6059-S に対する感受性分布が二峰性を示したことに関係していると考えられ、興味深い事実である。しかし、6059-S の β -lactamase に対する高い安定性から見て、直接的な β -lactamase による酵素的不活化とは考え難く、むしろ、他の原因によるものと考えられるが、この点についての詳細は今後の検討に待ちたい。

更に、6059-S の特性を総括的に見ると、6059-S はグラム陽性及びグラム陰性の嫌気性菌全般に対し抗菌活性を示すことが認められ、特に、従来報告の β -lactam 系抗生物質が最も効きにくく、かつ臨床で最も重要な原因菌

Table 7 Comparison of MICs of 6059-S with other β -lactam antibiotics against β -lactamase producing and non-producing *Bacteroides fragilis* ss *fragilis**

Organism	Inoculum size	Production of β -lactamase**	MIC (μ g/ml)				
			6059-S	CFX	CTX	CEZ	ABPC
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-277		+	6.25	12.5	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-283		+	6.25	6.25	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-287-1		+	6.25	6.25	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-176		+	6.25	12.5	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-194-1		+	6.25	6.25	100	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-224-1		+	6.25	6.25	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-240-2		+	12.5	12.5	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-261-1		+	6.25	12.5	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-271-1		+	6.25	12.5	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-284-3		+	6.25	6.25	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-288		+	3.13	6.25	50	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-302-2		+	6.25	6.25	100	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-307-2		+	12.5	6.25	100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-284-1		+	6.25	6.25	25	>100	100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-261-2		+	6.25	6.25	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-290-1		+	3.13	12.5	100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> W-1		+	0.78	6.25	6.25	25	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-299-2		+	0.78	6.25	1.56	50	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-23		+	0.78	6.25	6.25	25	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-20		-	0.78	6.26	3.13	25	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 5550		-	0.78	6.25	3.13	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 2552		-	0.78	12.5	6.25	12.5	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-2		-	1.56	6.25	12.5	50	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> R-1-18		-	0.78	6.25	6.25	25	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-231		-	0.78	12.5	3.13	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-233		-	0.78	6.25	3.13	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> V-289		-	0.78	12.5	6.25	12.5	25
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 2508		-	0.78	25	1.56	12.5	0.78
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i> 2509		-	0.78	25	1.56	12.5	12.5
<i>K. pneumoniae</i> 363 (Control strain)		+	0.05	1.56	0.78	>100	>100

* : Agar dilution method, Inoculum size: 10^6 CFU/ml

** : Activity was determined by color reaction using the chromogenic cephalosporin (87/312) as substrate.

+: β -Lactamase producing strain, -: Non producing strain

の一つと見做されている *B. fragilis* に対して, Cephalosporin 系抗生物質のなかでは従来までに最も高い活性評価がなされてきた CFX に比べ, それよりも明らかに強い活性を示すことが認められた。また, 殺菌作用及び溶菌作用においても, CFX, CTX よりも明らかに強い活性を示し, 薬剤処理後の regrowth 菌の出現は最も少く, 更に, *B. fragilis* の産生する β -lactamase に対

しても, CFX と同様に最も高い安定性を示すことが認められた。一方, CLDM に較べると, 6059-S の活性は弱い, CLDM に対する耐性菌を初めとし, CTX 及び CFX の耐性菌に対しても有効な活性を示すことが認められた。従って, これらの諸特性を総合して考察すると, 6059-S は, 従来報告の β -lactam 系抗生物質のなかでは嫌気性菌一般を含め, 特に, *B. fragilis* に対して

Table 8 Relative stability of β -lactam antibiotics against β -lactamases prepared from *Bacteroides fragilis* ss *fragilis*

Source of β -lactamase		Relative rate of hydrolysis*							
		Substrate							
		6059-S	CER	CFX	CTX	CEZ	PCG	ABPC	CBPC
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-277	<0.15	100	ND**	16.5	66.5	3.0	1.8	2.7
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-283	<0.07	100	<0.07	14.8	91.1	3.0	1.5	0.8
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-287-1	<0.6	100	<0.6	22.4	50.4	8.3	17.2	6.3
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-176	<0.35	100	<0.35	49.6	75	9.9	5.6	7.0
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-194-1	<0.06	100	<0.06	11.5	90.5	0.73	5.1	4.6
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-244-1	<0.7	100	<0.7	16.5	53.5	8.8	14.0	7.2
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-240-2	<0.3	100	<0.3	12.7	51.9	14.7	7.0	14.2
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-261-1	<0.07	100	<0.07	3.3	73.1	2.2	0.88	0.86
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-271-1	<0.2	100	<0.2	2.1	18.9	2.3	0.78	0.96
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-284-3	<0.9	100	<0.9	17.0	58.6	9.8	2.6	2.4
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-288	<0.4	100	<0.4	18.0	58.2	4.4	1.6	1.4
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-302-2	<0.09	100	<0.09	3.9	33.4	1.4	0.73	0.51
<i>R. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-307-2	<0.7	100	<0.7	26.2	72.8	4.7	2.6	1.9
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-284-1	<1.6	100	<1.6	23.6	27.6	3.9	2.3	3.3
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-261-2	<0.2	100	<0.2	32.9	11.8	76.7	1.76	1.94
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	V-290-1	<6.9	100	ND	12.0	42.1	8.6	11.0	9.7
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	W-1	<0.3	100	<0.3	19.9	28.7	1.65	1.2	1.04
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	W-299-2	<0.08	100	<0.08	1.2	21.0	1.25	0.51	1.65
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	R-1-23	<3.5	100	<3.5	37.5	44.8	10.9	5.6	<3.5
<i>K. pneumoniae</i> 363 (Control strain)		<0.3	100	ND	24.2	132	280	413	132

*: The rate of hydrolysis was determined by the microbiological assay.
** ND : Not done

最も優れた抗菌活性を示すことが認められ、その活性は極めて高く評価し得るものと考えられる。
加うるに、6059-Sは、吉田ら^{10,15)}、Neuら¹¹⁾、BARZA¹²⁾及びWISEら¹³⁾の報告に見られるように、通性嫌気性菌を含め、好気性菌に対しても広域抗菌スペクトラムを示し、かつ、極めて強い抗菌活性を示すことから考え、好気性菌及び嫌気性菌各単独の感染症のみならず、両者の混合感染に対しても高い臨床効果を発揮し得る可能性が推測される。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の実施に際し、使用菌株の分与と、種々有益なる御助言を頂いた岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設、上野一恵教授並びに渡辺邦友博士に深謝致します。また、 β -lactamase活性の測定に関して、種々助力を頂いた当研究所、吉田正博士並びに村上和久氏に深謝致します。

文 献

1) 三和敏夫, 望月 泉, 江崎孝行, 甲畑俊郎, 今村博務, 小

林とよ子, 渡辺邦友, 二宮敬宇, 上野一恵, 鈴木祥一郎: Cefoxitinの嫌気性菌に対する抗菌作用. *Chemotherapy* 26 (S-1): 71~77, 1978
2) 佐藤謙一, 光岡知足: Cefoxitinの偏性嫌気性菌に対する試験管内抗菌活性について. *Chemotherapy* 26 (S-1): 64~70, 1978
3) SUTTER, V. L. & S. M. FINEGOLD: Susceptibility of anaerobic bacteria to carbenicillin, cefoxitin, and related drugs. *J. Infect. Dis.* 131: 417~422, 1975
4) FRANCIS, P. T.; N. V. JACOBUS, J. G. BARTLETT & S. L. GORBACH: Susceptibility of anaerobes to cefoxitin and other cephalosporins. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 7: 128~132, 1975
5) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について。第1報 MICに影響する因子. *Chemotherapy* 22: 1459~1465, 1974
6) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について。第2報再現性について. *Chemotherapy* 22: 1495~1501, 1974
7) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。

- Chemotherapy 22:1126~1128, 1974
- 8) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会：嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 27:559~560, 1979
 - 9) O' CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY, & A. H. SHINGLER: Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1:283~288, 1972
 - 10) ROSS, C. W.; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. M. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O'CALLAGHAN: Comparison of assay techniques for β -lactamase activity. Analyst. Biochem. 54:9~16, 1973
 - 11) NEU, H. C.; N. ASWAPOKEE, K. P. FU & P. ASWAPOKEE: Antibacterial activity of a new 1 oxa cephalosporin compared with that of other β -lactam compounds. Antimicrob. Agents & Chemoth. 16:141~149, 1979
 - 12) BARZA, M.; E. P. TALLY, N. V. JACOBUS & S. L. GORBACH: *In vitro* activity of LY 127935. Antimicrob. Agents & Chemoth. 16:287~292, 1979
 - 13) WISE, R; J. M. ANDREWS & K. A. BEDFORD: LY 127935, a novel oxa β lactam: an *in vitro* comparison with other β lactam antibiotics. Antimicrob. Agents & Chemoth. 16:341~345, 1979
 - 14) YOSHIDA, T.; M. NARISADA, S. MATSUURA, W. NAGATA, & S. KUWAHARA: 6059-S, a new parenterally active 1 oxacephalosporin (1) Microbiological studies. 18th ICAAC, Oct. 2, 1978 (Atlanta)
 - 15) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司: Oxacephem 系抗生物質 6059 S の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 28 (S 7) 86~131, 1980

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 6059-S AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

MIKAO MAYAMA, HIROSHI NAGATA and MASUYO OSE

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

In vitro antibacterial activity of 6059-S was studied on 165 clinical isolates of gram-positive and gram-negative anaerobes and was compared with those of cefoxitin (CFX), cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX), piperacillin (PIPC) and clindamycin (CLDM).

6059-S has a wide antibacterial spectrum against representative gram-negative and gram-positive anaerobes, and is particularly more active than CFX, CTX, CMZ and PIPC against clinical isolates of *Bacteroides fragilis*, though it is less active than CLDM. Moreover, 6059-S is active against resistant strains to CLDM, CTX and CFX.

Bactericidal action and lytic action of 6059-S against *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* are more active than that of CFX and CTX.

6059-S is very as stable as CFX against β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* and is more active than CTX, CEZ and ABPC against β -lactamase producing strains of *Bacteroides fragilis* ss *fragilis*.