

6059-S の抗菌力について

三橋 進・井上 松久

群馬大学医学部微生物学教室耐性菌実験施設

6059-S の *in vitro* 抗菌力を各種標準株と臨床分離の *Escherichia coli* 29 株, *Klebsiella pneumoniae* 30 株, *Proteus mirabilis* 49 株, *Proteus morgani* 50 株, *Proteus vulgaris* 27 株, *Enterobacter* sp. 122 株, *Citrobacter freundii* 64 株, *Serratia marcescens* 33 株, *Pseudomonas aeruginosa* 100 株に対する MIC を, 日本化学療法学会感受性測定法に準じて, 100 倍希釈液 (10^6 cells/ml) 接種で測定し, 他の抗菌薬と比較検討した。抗菌スペクトラムでは従来の Cefazolin (CEZ) よりもはるかにすぐれ, また Cefoxitin (CFX) にくらべてスペクトラムがより広範囲となった。特に, グラム陰性桿菌では極めて低い MIC 値を示した。臨床分離株においては, *P. aeruginosa* を除くすべての菌株で 6059-S の抗菌力がきわだって優れていた。さらに, 本薬の β -lactamase に対する安定性を O' CALLAGHAN らによる photometric assay によって検討したが, 6059-S は各種 penicillinase (PCase) および cephalosporinase (CSase) に極めて安定であった。

6059-S は広範囲スペクトラムを有する Oxacephem 系の構造上ユニークな抗生物質である¹⁻³⁾。今回, 標準株, 臨床分離グラム陰性菌に対する抗菌力および β -lactamase に対する安定性を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1) 使用抗菌薬

6059-S は塩野義製薬から提供された原末を用いた。対照薬も各社よりそれぞれ分与を受けたものを使用した。

2) 使用菌株

使用菌株は, すべてヒト病巣由来株で群馬大学医学部耐性菌実験施設の stock culture を用いた。

3) 使用培地

感受性測定には heart infusion 寒天培地 (HIA 栄研) を使用した。

4) 抗菌力測定

HIA を用い日本化学療法学会標準法⁴⁾記載の寒天平板希釈法によった。すなわち, 被験薬のペプトン水 18 時間培養原液を希釈してつくった 10^6 cells/ml 菌液を一白金耳, 薬物含有平板培地に接種し, 37°C , 18 時間培養後, 被験菌の発育が認められない最小濃度をもって minimal inhibitory concentration (MIC) とした。

5) β -actamase sample の調整と β -lactamase 活性の測定

培養菌液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗滌後, 同緩衝液に懸濁し, 超音波破砕し, $10,000\times\text{g}$ 30 分間, 冷却下遠心し, その上澄液を粗酵素液とした。

β -lactamase 活性の測定は O' CALLAGHAN らによる photometric assay⁵⁾ によった。

6) 感染治療試験

動物は 4~5 週令の ICR 系マウスの雌雄を各薬物投与量に対し 1 群 10~25 匹を用い, 感染方法は生理食塩液に適当な濃度に浮遊させた菌液 0.1 ml を腹腔内に接種した。治療は 1, 4 時間後に各 1 回生理食塩液に溶解した試験薬を 0.2 ml ずつ皮下注射して行なった。2 倍希釈系列ないしその間の濃度もとった数段階の投与により, 7 日後の生存率からプロビット法によって ED_{50} 値を算出し評価した。

II. 実験成績

1) 抗菌スペクトラム

各種標準株に対して 6059-S, CFX, CEZ の MIC を測定した (Table 1)。

6059-S の抗菌スペクトラムは, *M. luteus*, *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *S. marcescens* におおむね $0.10\sim 0.19$ $\mu\text{g/ml}$, *P. aeruginosa* には $1.56\sim 12.5$ $\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示した。CFX 耐性の *M. luteus*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* にも抗菌力をもち, 6059-S は著しく広範囲の抗菌活性を示した。

2) 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離の *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* sp. *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* について調べた。

E. coli 10^6 cells/ml 接種時の MIC の累積曲線から, 6059-S は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ で 100% を阻止し, Cefmetazole

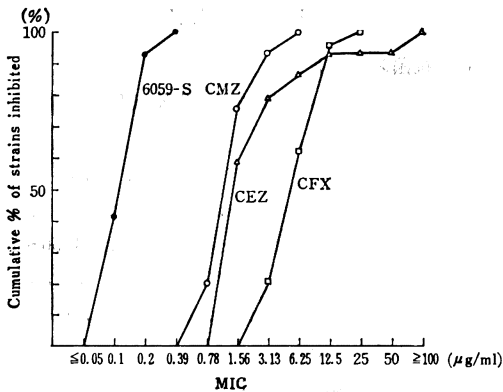
Table 1 MICs of 6059-S for standard strains

Strain		6059-S	CFX	CEZ
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	(MS-1)	6.25	1.56	0.05
<i>S. aureus</i> E-46	(MS-1)	6.25	3.13	0.39
<i>S. aureus</i> TERAJIMA	(MS-1)	3.13	0.78	0.05
<i>S. aureus</i> 1200 A	(MS-1)	3.13	1.56	0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	(MS-1)	0.78	3.13	0.05
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	(MS-1)	0.10	100	>400
<hr/>				
<i>E. coli</i> NIH J-JC-2	(MS-1)	0.19	6.25	1.56
<i>S. typhimurium</i> IID 971	(MS-1)	0.10	3.13	1.56
<i>S. typhi</i> 901	(MS-1)	0.05	0.78	0.78
<i>S. paratyphi</i> 1015	(MS-1)	0.10	1.56	1.56
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	(MS-1)	0.05	0.78	0.78
<i>S. enteritidis</i> G14	(MS-1)	0.10	1.56	0.78
<i>S. marcescens</i> IAMI 184	(MS-1)	0.19	12.5	>400
<i>S. marcescens</i> IID 620	(MS-1)	0.19	12.5	200
<i>P. aeruginosa</i> IPO 3445	(MS-1)	12.5	100	>400
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	(MS-1)	1.56	100	>400
<i>P. mirabilis</i> IPO 3849	(MS-1)	0.10	3.13	25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	(MS-1)	0.19	6.25	>400
<i>P. vulgaris</i> HX-19	(MS-1)	0.19	6.25	50
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	(MS-1)	0.19	3.13	50
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	(MS-1)	0.10	1.56	1.56
<i>E. cloacae</i> 963	(MS-1)	0.19	100	50

MS-1: Maebashi strain 1

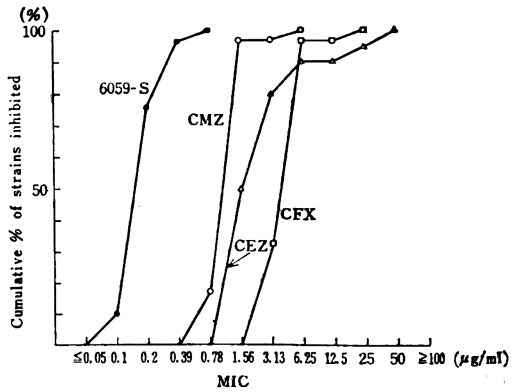
(Inoculum size 10^6)

Fig. 1 Antibacterial activity of 6059-S *E. coli* 29 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



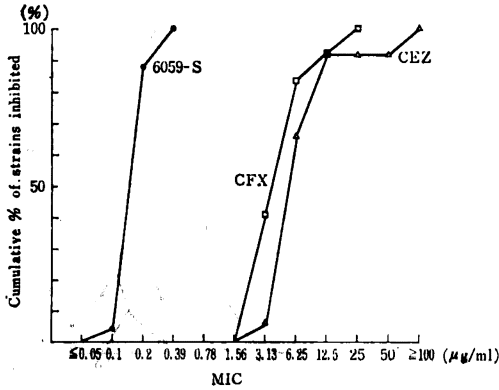
Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	29		12	15	2								
CEZ	29						17	6	2	2			2
CFX	29							3	15	10	1		
CMZ	29					3	19	5	2				

Fig. 2 Antibacterial activity of 6059-S *K. pneumoniae* 30 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



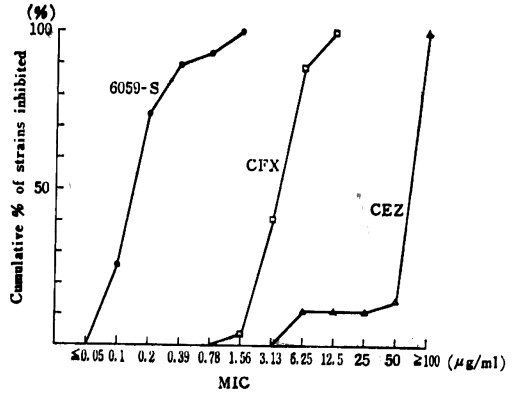
Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	30		3	20	6	1							
CEZ	30						15	9	3		1	2	
CFX	30							10	19		1		
CMZ	30					5	24		1				

Fig. 3 Antibacterial activity of 6059-S *P. mirabilis* 49 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



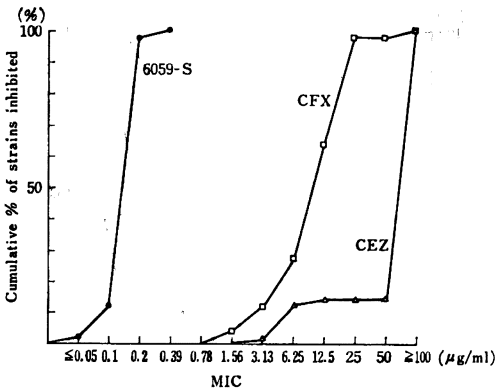
Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	49		2	41	6								
CEZ	49							3	29	13			4
CFX	49							20	21	4	4		

Fig. 5 Antibacterial activity of 6059-S *P. vulgaris* 27 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



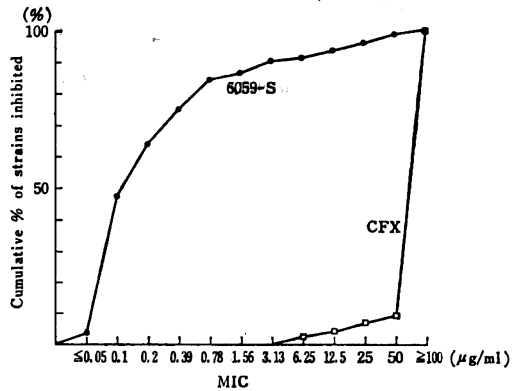
Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	27		7	13	4	2	1						
CEZ	27									3		1	23
CFX	27							1	10	13	3		

Fig. 4 Antibacterial activity of 6059-S *P.morganii* 50 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	50	1	5	43	1								
CEZ	50							1	5	1			43
CFX	50						2	4	8	18	17		1

Fig. 6 Antibacterial activity of 6059-S *Enterobacter* sp. 122 strains. Inoculum size, one loopful of 10^6 cells/ml



Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	122	5	54	20	13	11	2	5	1	3	3	4	1
CFX	122									3	2	4	2

(CMZ), CEZ, CFX がこれについて (Fig. 1)。

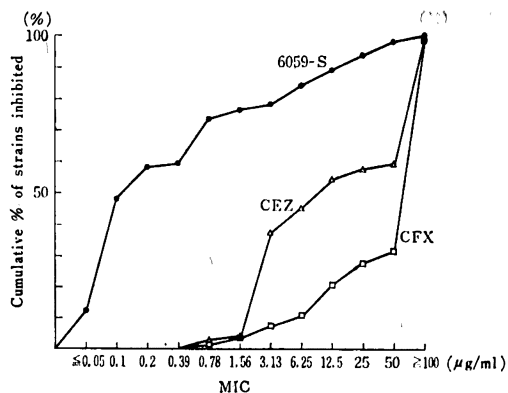
K. pneumoniae では 6059-S は同じく 0.39 µg/ml で 97% を阻止し, CMZ, CEZ, CFX がこれについて (Fig. 2)。

P. mirabilis, *P.morganii* では 0.39 µg/ml で, *P. vulgaris* では 1.56 µg/ml の濃度で 100% を阻止した (Fig. 3~5)。

Enterobacter sp., *C. freundii*, *S. marcescens* の 70% を阻止する 6059-S の濃度はそれぞれ約 0.3 µg/ml, 0.6 µg/ml, 1.0 µg/ml であった。特に, *S. marcescens* に対しては CMZ (25 µg/ml), CFX (50 µg/ml), CEZ (> 100 µg/ml) で, 6059-S の抗菌力は極めてすぐれていた (Fig. 6~8)。

最後に, *P. aeruginosa* の MIC 分布のピークは 25

Fig. 7 Antibacterial activity of 6059-S *C. freundii* 64 strains. Inoculum size, one loopful of 10⁸ cells/ml



Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	64	8	23	6	1	9	2	1	4	3	3	3	1
CEZ	64				2	1	21	5	6	2	1		26
CFX	64					1	2	2	2	6	5	2	44

Fig. 9 Antibacterial activity of 6059-S *P. aeruginosa* 100 strains. Inoculum size, one loopful of 10⁸ cells/ml

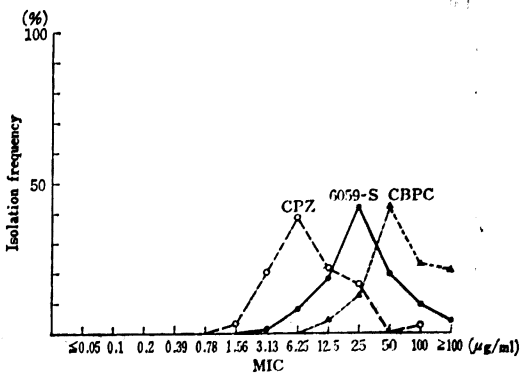
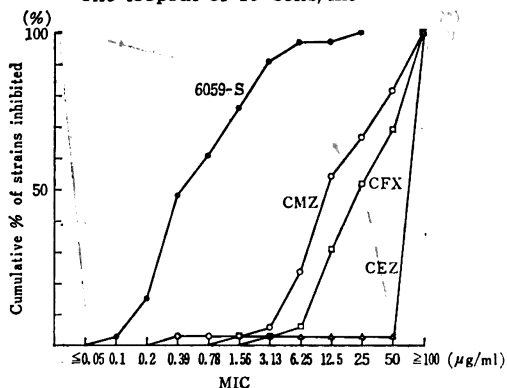
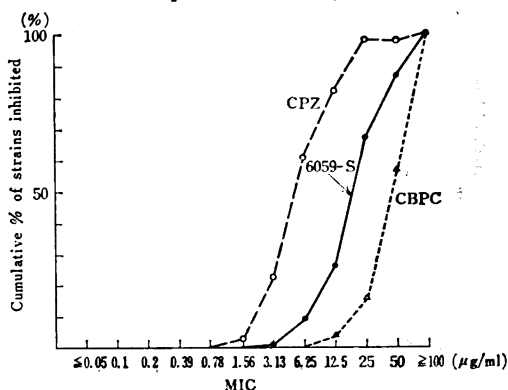


Fig. 8 Antibacterial activity of 6059-S *S. marcescens* 33 strains. Inoculum size, one loopful of 10⁸ cells/ml



Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	33		1	4	11	4	5	5	2		1		
CEZ	33							1					32
CFX	33						1		1	8	7	6	10
CMZ	33				1			1	6	10	4	5	6

Fig. 10 Antibacterial activity of 6059-S *P. aeruginosa* 100 strains. Inoculum size, one loopful of 10⁸ cells/ml



Drug	Total	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
6059-S	100							1	8	18	41	19	13
CBPC	100									4	12	41	43
CPZ	100						3	20	38	21	16		2

µg/ml であり、Cefoperazone (CPZ) の 6.25 µg/ml、Carbencillin (CBPC) の 50 µg/ml の中間であった (Fig. 9~10)。

3) β-actamase に対する安定性

Table 2 に penicillinase (PCase) に対する安定性を示した。R 因子支配による I 型、II 型、IV 型 PCase および chromosome 支配による *K. pneumoniae* の PC-

ase に対しては、6059-S は対照の Cephalexin (CER)、CEZ よりはるかに強い安定性を示した。

Chromosome 支配の cephalosporinase (CSase) に対する安定性を Table 3 に示した。各種菌の CSase に対し 6059-S は極めて強い抵抗性を示した。

Table 4 に各種 CSase に対する Ki 値を示した。6059-S は対照の CMZ、CFX とほぼ同等の強い CSase

Table 2 Stability of 6059-S against various penicillinases

Enzyme source	Type	Specific activity (U/mg protein)	Substrate				
			6059-S	CER	CEZ	ABPC	PCG
<i>E. coli</i> W3630 Rms212	I	80	0.13	70	24	105	100
<i>E. coli</i> W3630 Rms213	II	4.5	0.06	43	33	841	100
<i>P. aeruginosa</i> ML4759 Rms139	IV	0.4	0.13	19	4	135	100
<i>K. pneumoniae</i> GN69	<i>Kleb.</i> PCase	116	0.13	26	17	218	100

Photometric assay

Table 3 Stability of 6059-S against various cephalosporinases

Enzyme source	Specific activity (U/mg protein)	Substrate							
		6059-S	CER	CEZ	CET	CEX	CMD	CTM	CXM
<i>E. coli</i> GN5482	50	0.06	100	70	370	54	0.02	42	0.04
<i>C. freundii</i> GN346	870	0.13	100	117	125	80	0.3	6	0.06
<i>P. vulgaris</i> GN76	154	0.13	100	375	240	52	276	170	156
<i>P. vulgaris</i> GN7919	—	0.13	100	555	182	48	226	150	219
<i>P. rettgeri</i> GN5284	—	0.06	100	41	125	0.8	2	6	0.04
<i>E. cloacae</i> GN7471	6,353	0.63	100	50	402	55	1.7	75	0.04
<i>P. cepacia</i> NO103	—	0.06	100	153	314	95	204	130	112

Photometric assay

Table 4 Kinetics of hydrolysis of CET, CEZ, CFX, CMZ and 6059-S by CSases

Organism	Km (μ M)		Ki (μ M)*		
	CET	CEZ	6059-S	CMZ	CFX
<i>E. coli</i> GN5482	63	400	0.86	0.57	0.11
<i>E. cloacae</i> GN7471	105	800	0.81	0.64	0.50
<i>S. marcescens</i> 48	44	286	13.0	0.39	0.15
<i>P. rettgeri</i> GN4430	125	150	0.49	1.0	0.49
<i>P. morgani</i> GN5407	37	83	0.16	0.40	0.22
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	200	667	0.39	0.10	0.23

* Values of Ki were determined by using CET as the substrate.

阻害活性を示した。

Table 5 には *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* のマウスの実験的感染症に対する 6059-S の治療効果を各比較薬と比較検討した成績を示した。6059-S は *E. coli*, *K. pneumoniae* 感染症に対して, ED₅₀ 値 1.43, 1.13 mg/kg を与え, CFX, CEZ より有効であった。また *S. marcescens* 感染症では対照の CFX, CBPC よりも優れていたが, *P. aeruginosa* 感染

症では ED₅₀ 値で Cefsulodin (CFS) の約 5 倍, CBPC の約 1/12 倍であった。

III. 考 察

Oxacephem 系抗生物質 6059-S は, 抗菌スペクトラムは従来の Cephalosporin 剤では効かなかったインドール陽性 *Proteus*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* まで拡大し, 現在開発中のものも含めて一番広範囲のも

Table 5 Protective effect against experimental mice infections

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Drug	ED ₅₀ (mg/kg)	MIC (μg/ml)
<i>E. coli</i> ML4707	2.5 × 10 ⁶ (25LD ₅₀)	-	6059-S	1.43	0.10
			CFX	37.0	3.13
			CEZ	34.0	1.56
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	7.3 × 10 ⁶ (5LD ₅₀)	-	6059-S	1.13	0.20
			CFX	62.5	3.13
			CEZ	6.10	1.56
<i>S. marcescens</i> GN7577	1.0 × 10 ⁵ (90LD ₅₀)	+	6059-S	16.0	0.39
			CFX	425.0	12.5
			CBPC	420.0	12.5
<i>P. aeruginosa</i> GN3315	1.2 × 10 ⁵ (15LD ₅₀)	+	6059-S	82.0	50
			CFS	17.0	1.56
			CBPC	1,000	100

Medication time: 1, 4 hr. (s.c.)

のとなった。臨床分離株での多くのグラム陰性菌のうち、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* sp. では 0.39 μg/ml でほぼ 100%, *Enterobacter* sp., *C. freundii*, *S. marcescens* では 0.3~1.0 μg/ml で 70% が阻止され、極めて強い抗菌力を示した。*P. aeruginosa* では MIC 分布のピーク値が 25 μg/ml で、この濃度で約 65% が阻止されたが、CPZ と CBPC の中間の抗菌力を示した。また、6059-S は各種 β-lactamase に対して極めて安定であり、CMZ, CFX とほぼ同等の強い CSase 阻害活性を示した。また、マウスにおける実験的感染症の治療においても *in vitro* 抗菌力を反映した良好な成績であった。

以上のように 6059-S は抗菌力の面からみて極めて優れた抗菌薬の 1 つといえる。

文 献

1) 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 & Chemother.* 16: 341~345, 1979

2) NEU, H. C.; N. ASWAPOKKE, K. P. FU & P. ASWAPOKKE: Antibacterial activity of a new 1-oxa cephalosporin compared with that of other β-lactam compounds. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 16: 141~149, 1979

3) FU, K. P. & H. C. NEU: The comparative β-lactamase resistance and inhibitory activity of 1-oxa cephalosporin, cefoxitin and cefotaxime. *J. Antibiot.* 32: 909~914, 1979

4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 23: 1~2, 1975

5) O' CALLAGHAN, C. H.; P. W. MUGGLETON & G. W. ROSS: Effects of β-lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1968: 57~63

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 6059-S

SUSUMU MITSUHASHI and MATSUHISA INOUE

Department of Microbiology, Laboratory of Bacterial Resistance, School of Medicine Gunma University

Antibacterial activity of 6059-S was studied using standard strains and clinical isolates of gram-negative bacteria.

The results are summarized as follows:

1. The antibacterial spectrum of this substance was much broader than those of cefazolin (CEZ) and cefoxitin (CFX).
2. The MIC levels of 6059-S against gram-negative bacteria except *P. aeruginosa* were much lower than those of CEZ, CFX and cefmetazole.
3. 6059-S was stable against both R-plasmid mediated penicillinase and chromosome mediated penicillinase, cephalosporinase.
4. Therapeutic effect of 6059-S against experimental infection of mice was more active than that of CFX, CEZ and carbenicillin except cefsulodin.