

Cefotetan (YM09330) に関する細菌学的検討

戸田 正人・斎藤 武・井上松久・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

要 旨

新しい Cephamycin 系抗生物質である Cefotetan (CTT, YM09330) は、グラム陽性、グラム陰性菌に対し幅広い抗菌力を有していた。臨床分離株に対する感受性分布を15菌種1,557株を用いて検討し、MIC₅₀, MIC₇₀ を求めた。Cefotetan はグラム陰性菌に対し Cefmetazole, Cefoxitin, Cefazolin に比べ非常に低い濃度で優れた抗菌力を有していた。特に indole positive *Proteus*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *C. freundii* 等に対しても、強い抗菌力を示した。また β -lactamase の加水分解に対して Cefmetazole, Cefoxitin と同様に強い抵抗性を示し、 β -lactamase 産生株に対しても、優れた感受性値を有していた。さらに多くの β -lactamase に強い阻害作用を示した。

殺菌力について *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* の増殖曲線に及ぼす影響、MIC と MBC との比較により検討した結果、Cefotetan は Cefmetazole よりも低い濃度で殺菌的に作用し、MIC と MBC の差も少なかった。またヒトに500mg 静注した場合の血中濃度推移に simulate した *in vitro* の model system での殺菌力を検討し、*S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens* に対する Cefotetan の殺菌効果を確認した。

E. coli の penicillin binding protein (PBP) に対する親和性を検討し、Cefotetan は PBP 3 に対して最も強い親和性を示し、ついで PBP 1A, 1Bs および 5/6 の順であることが確認された。

マウス実験感染症における治療効果も Cefotetan は低い MIC を反映して、*E. coli* に対し Cefoxitin の約30倍、*K. pneumoniae* では約45倍、*S. marcescens* では約30倍良好な成績を示した。

結 言

Cefotetan (CTT, YM09330) (Disodium (6R, 7S)-7-[(4-(carbamoylcarboxylatomethylene)-1,3-dithietan-2-yl)carboxamido]-7-methoxy-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4. 2. 0]oct-2-ene-2-carboxylate) は、山之内製薬株式会社で開発された広域スペクトラムを有する新しい Cephamycin 系抗生物質である¹⁾。

今回、臨床分離株に対する抗菌力、殺菌作用、penicillin binding protein (PBP) に対する親和性、 β -lactamase に対する安定性、およびマウス感染治療効果等について検討を行ったので報告する。なお、比較薬剤として Cefmetazole (CMZ), Cefoxitin (CFX), Cefazolin (CEZ) を用いた。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

CTT は山之内製薬株式会社から提供された粉末を用いた。CMZ は三共から、CFX は第一製薬から、CEZ, Ceftizoxime (CZX), Carbenicillin (CBPC), Cloxacillin

(MCIPC) は藤沢薬品から、Cephalothin (CET), Lata-moxef (LMOX), Gentamicin (GM) は塩野義製薬から、Cephaloridine (CER) は鳥居薬品から、Cefuroxime (CXM) は新日本実業から、Penicillin G (PCG) は明治製薬から、Ampicillin (ABPC) は富山化学から、Streptomycin (SM) は協和醗酵から、Spectinomycin は日本アップジョンから分与を受けた。

2. 使用菌株

標準菌株25株、臨床分離株15菌種1,557株は、群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設の stock culture を用いた。

3. 使用培地

標準菌株に対する感受性測定には、Mueller Hinton (MH) 寒天培地(ニッスイ)、臨床分離株に対する感受性測定には、heart infusion (HI) 寒天培地(栄研)、brain heart infusion (BHI) 寒天培地(栄研)、proteose No. 3 寒天培地(Difco) および GAM 寒天培地(ニッスイ)を使用した。Minimum bactericidal concentration (MBC) と bactericidal activity の測定には antibiotic medium 3 (ABM 3) (Difco) を使用した。その他に、ペプトン水、

BHI 液体培地(榮研), buffered saline gelatin (BSG) 溶液, trypticase soy 液体培地 (BBL), medium B, GAM 液体培地(ニッスイ)を用いた。

4. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法²⁾に準じた寒天平板希釈法にしたがった。すなわち、被検菌のペプトン水 37℃ 18時間培養液($10^8 \sim 10^9$ cells/ml)を 10^6 cells/ml になるよう BSG 溶液で希釈し、その一白金耳を薬剤含有 HI 寒天培地に接種し、37℃ 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。なお *S. pyogenes* は BHI 液体培地を前培養液とし、感受性測定には BHI 寒天培地を用いた。*H. influenzae* は $10 \mu\text{g/ml}$ の hemin と $2 \mu\text{g/ml}$ の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 添加 BHI 液体培地を前培養液とし、hemin と NAD 添加 BHI 寒天培地にて感受性測定を行った。*N. gonorrhoeae* の場合は、1% hemoglobin (Difco), 1% defined supplement 加 proteose No. 3 寒天培地で培養後、trypticase soy 溶液に菌を浮遊させ 10^6 cells/ml とし、薬剤含有同寒天培地に一白金耳接種し培養、MIC を求めた。*B. fragilis* は GAM 液体培地を前培養液とし、感受性測定には GAM 寒天培地を用いた。また、*Pseudomonas* spp. の前培養には 0.3% KNO_3 添加ペプトン水を使用した。

5. 殺菌力測定

殺菌効果の判定には増殖曲線に及ぼす影響および MBC を検討した。

増殖曲線に及ぼす影響では ABM3 を使い、試験菌の overnight culture を新しい培地に接種し、振盪培養した。菌数が 10^6 cells/ml になったとき薬剤を添加し、以後経時的に生菌数を測定した。

また、試験菌を ABM3 で 37℃ 18時間培養後、新しい ABM3 に接種し、培養を行い菌量を $10^5 \sim 10^6$ cells/ml とした時点で CTT の 500mg 静注時における健常成人の血中濃度に simulate した *in vitro* model system を作成した。すなわち濃度を低下させるために、薬剤を含まない ABM3 を stepwise に加えた。この系により経時的に sampling を行い生菌数を測定した。また薬剤を除去する場合は冷却高速遠心器にて遠心し、上清を除去した。沈澱した菌体は速やかに薬剤を含まない新しい培地に懸濁した。

MBC の測定には次の方法を用いた。ABM3 にて一夜培養した菌液を希釈し、薬剤添加同培地に最終細菌濃度が 10^6 cells/ml となるように接種した。37℃ 18時間培養後 MIC を求め、これらの薬剤を含有する培地から一白金耳とり薬剤無添加の HI 寒天培地に接種し、37℃ 18時間培養後、菌の全く認められない最小薬剤濃度を MBC

とした。

6. MIC, MBC に及ぼす接種菌量の影響

被験菌を ABM3 で一夜培養後、10倍希釈系の菌懸濁液を調製し、それぞれの菌量において液体希釈法にて MIC を求め、さらに MBC を測定した。

7. PBP に対する親和性

E. coli JE1011 を用いて CTT の PBP に対する結合親和性を検討した^{3,4)}。無標識の CTT を ^{14}C -標識 PCG と一緒に置いて、 ^{14}C -標識 PCG の結合 protein との結合を妨害する程度を測定する competition 実験、および ^{14}C -標識 CTT を用いて CTT と結合する protein を検出する実験を行った。細胞質膜 sample は ABM3 にて培養した菌体より分画し、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動上の PBP をフルオログラフィーにより検出した。

8. β -Lactamase の調製

Medium B にて培養した菌体を 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) にて洗浄後、同緩衝液にて懸濁し、超音波破碎した。その後 10,000G, 30分間冷却遠心して得た上清(粗酵素液)を SM 処理、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等を用いて精製し、 β -lactamase sample とした。なお *B. fragilis* の培養には GAM 液体培地を使用した。

9. β -Lactamase 活性の測定

β -Lactamase 活性は spectrophotometric method^{5,6)} によって測定し、酵素液の蛋白量は Lowry 法⁷⁾により求めた。活性単位は $1 \mu\text{mole}$ の基質を 1 分間に分解する酵素量を 1 単位とし、反応は 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて 30℃ で行った。Km, Vmax, Ki は LINEWEAVER-BURK の plot により求めた。

10. マウス感染治療実験

ICR 系雄マウス $20 \pm 1 \text{ g}$, 1 薬剤 1 濃度あたり 1 群 10 匹を使用した。試験菌には *E. coli* ML4707 2.5×10^6 cells/mouse (25LD₅₀), *K. pneumoniae* GN6445 7.3×10^6 cells/mouse (5LD₅₀), *S. marcescens* GN7577 1.0×10^5 cells/mouse (90LD₅₀) を用い、腹腔内感染後、1 および 4 時間目に薬剤を皮下注射した。なお、*E. coli* ML4707, *K. pneumoniae* GN6445 は mucin 無添加, *S. marcescens* GN7577 は 5% mucin に懸濁し用いた。感染 5 日後の生存率から ED₅₀ 値を LITCHFIELD-WILLCOXON 法⁸⁾に基づき算定した。

実験結果

1. 抗菌スペクトラム

グラム陽性、陰性菌群に対する CTT の抗菌スペクトラムを CMZ, CFX, CEZ と比較検討した結果を Table 1 に示した。CTT はグラム陽性、陰性菌に対し幅広い抗菌

Table 1 Antibacterial spectrum

Organisms	MIC (μg/ml)			
	CTT	CMZ	CFX	CEZ
<i>S. aureus</i> FDA 209 PJC-1 (MS-1)	6.25	0.39	3.13	0.1
<i>S. aureus</i> TERAJIMA (MS-1)	6.25	0.78	6.25	0.1
<i>S. aureus</i> MS 353 (MS-1)	3.13	0.39	1.56	0.1
<i>S. pyogenes</i> Cook (MS-1)	1.56	0.78	0.2	0.1
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2 (MS-1)	0.05	0.78	12.5	0.78
<i>E. coli</i> K 12 C 600 (MS-1)	0.05	0.39	6.25	0.78
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602 (MS-1)	≤0.013	0.2	1.56	0.39
<i>S. typhimurium</i> IID 971 (MS-1)	0.05	0.2	3.13	0.78
<i>S. typhi</i> 901 (MS-1)	≤0.013	0.2	3.13	0.78
<i>S. paratyphi</i> 1015 (MS-1)	0.05	0.39	1.56	1.56
<i>S. schottmuelleri</i> 8006 (MS-1)	0.05	0.2	3.13	0.78
<i>S. enteritidis</i> G 14 (MS-1)	≤0.013	0.2	1.56	0.78
<i>S. marcescens</i> IAM 1184 (MS-1)	0.05	1.56	12.5	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (MS-1)	0.78	0.39	1.56	0.1
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445 (MS-1)	50	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1 (MS-1)	50	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490 (MS-1)	>100	>100	>100	>100
<i>P. morganii</i> IFO 3848 (MS-1)	0.1	1.56	3.13	25
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849 (MS-1)	0.1	1.56	12.5	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19 (MS-1)	0.1	0.78	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> HX-19 (MS-1)	0.1	1.56	6.25	3.13
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850 (MS-1)	0.025	0.39	1.56	0.39
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 (MS-1)	100	>100	>100	100
<i>E. cloacae</i> 963 (MS-1)	0.78	>100	>100	>100
<i>M. luteus</i> ATCC 9341 (MS-1)	1.56	0.05	0.78	0.78

10⁶ cells/ml

力を有していた。特に、グラム陰性の *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *S. marcescens*, *Proteus* spp., *E. cloacae* では ≤0.013~0.78μg/ml に MIC を有し、CMZ, CFX, CEZ に比べ優れていた。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床分離の *S. aureus* 200 株, *S. pyogenes* 175 株, *N. gonorrhoeae* 8 株, *E. coli* 160 株, *K. pneumoniae* 200 株, *E. cloacae* 81 株, *C. freundii* 65 株, *S. marcescens* 241 株, *P. mirabilis* 100 株, *P. vulgaris* 54 株, *P. morganii* 54 株, *P. rettgeri* 31 株, *P. cepacia* 79 株, *H. influenzae* 58 株, *B. fragilis* 51 株に対する CTT の抗菌力を検討した。Fig. 1~15 に 10⁶cells/ml 一白金耳の接種時における各菌種の薬剤感受性を累積百分率で示し、Table 2 には菌種ごとに 50%, 70% の株の発育を阻止す

る薬剤濃度 MIC₅₀, MIC₇₀ をまとめた。

S. aureus : CTT の MIC₇₀ は 4.7μg/ml であり、4 薬剤のなかでは CEZ が良好な分布を示した (Fig. 1)。

S. pyogenes : CTT の MIC₇₀ は 1.13μg/ml, *S. aureus* の場合と同様に CEZ が良好であった (Fig. 2)。

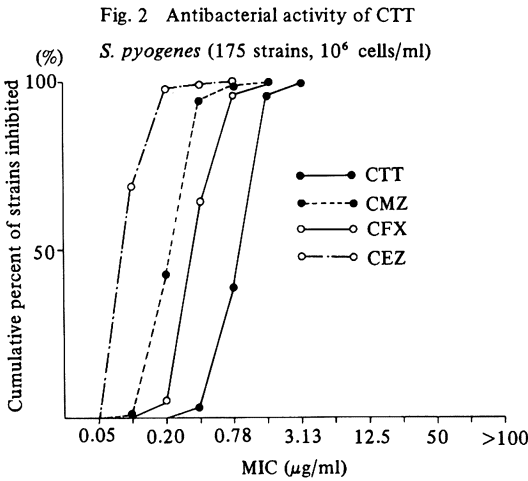
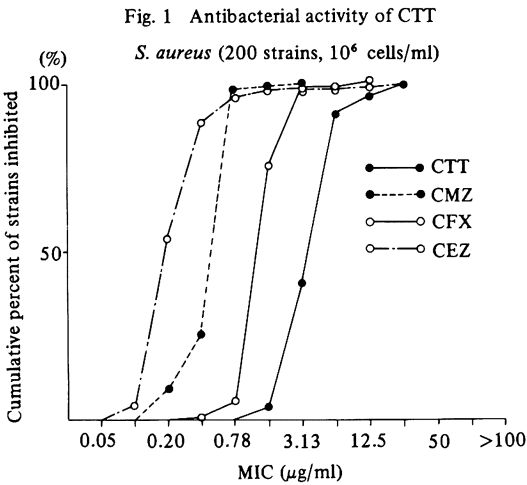
N. gonorrhoeae : 8 株に対し、CTT の MIC₇₀ は 0.67 μg/ml となり、PCG の 0.24μg/ml について良好な成績であった (Fig. 3)。

E. coli : CTT は 160 株に対する感受性のピークを 0.39 μg/ml に有し、他の薬剤に比べて最も良好な抗菌力を示した。また MIC₇₀ は 0.35μg/ml, MIC₉₀ でも 0.58μg/ml となり、CMZ, CFX, CEZ がほとんど抗菌力を示さない濃度で、約 90% の菌株の発育を阻止した (Fig. 4)。

K. pneumoniae : CTT の MIC₇₀ は 0.16μg/ml で、

Table 2 Comparative activity of CTT and other β -lactam antibiotics against clinical isolates

Species	Number of strains	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)							
		CTT		CMZ		CFX		CEZ	
		MIC ₅₀	MIC ₇₀	MIC ₅₀	MIC ₇₀	MIC ₅₀	MIC ₇₀	MIC ₅₀	MIC ₇₀
<i>S. aureus</i>	200	3.60	4.70	0.51	0.62	1.20	1.45	0.19	0.27
<i>S. pyogenes</i>	175	0.90	1.13	0.22	0.28	0.33	0.44	0.08	0.10
<i>N. gonorrhoeae</i>	8	0.39	0.67	1.10	2.35	0.49	0.71	0.78	1.35
<i>E. coli</i>	160	0.28	0.35	1.17	1.46	5.15	7.00	1.80	2.80
<i>K. pneumoniae</i>	200	0.13	0.16	1.10	1.34	4.10	5.15	2.35	3.30
<i>E. cloacae</i>	81	2.95	27.5	60.0	>100	80.0	>100	>100	>100
<i>C. freundii</i>	65	0.32	16.5	19.0	45.0	44.0	92.0	11.0	>100
<i>S. marcescens</i>	241	1.28	4.30	13.8	41.0	24.5	60.0	>100	>100
<i>P. mirabilis</i>	100	0.17	0.23	2.60	3.30	5.00	6.10	5.60	8.40
<i>P. vulgaris</i>	54	0.19	0.26	2.09	2.68	4.00	5.05	>100	>100
<i>P. morganii</i>	54	2.95	4.20	6.70	10.3	10.0	12.4	>100	>100
<i>P. rettgeri</i>	31	0.19	0.90	3.50	19.0	5.20	28.5	71.0	>100
<i>P. cepacia</i>	79	5.90	13.3	32.5	58.0	62.0	80.0	>100	>100
<i>H. influenzae</i>	58	0.48	0.62	1.58	2.32	1.12	1.40	6.60	9.30
<i>B. fragilis</i>	51	5.60	12.1	—	—	8.20	11.9	13.9	>100



CMZは $1.34\mu\text{g/ml}$, CFXは $5.2\mu\text{g/ml}$, CEZは $3.3\mu\text{g/ml}$ であった。他の薬剤が抗菌力を全く示さない $0.39\mu\text{g/ml}$ でも90%以上の菌株の発育阻止が認められ、最も強い抗菌力を有していた (Fig. 5)。

E. cloacae : 4薬剤ともに幅広い分布を示した。MIC₇₀はCTTが $27.5\mu\text{g/ml}$, 他はすべて $>100\mu\text{g/ml}$ であり, CTTが最も良好であった (Fig. 6)。

C. freundii : *E. cloacae*と同様に幅広い分布を示したが, MIC₇₀はCTTが $16.5\mu\text{g/ml}$ と最も良好であった

(Fig.7)。
S. marcescens : 241株に対するCTTのMIC₇₀は $4.3\mu\text{g/ml}$ であり, CMZ, CFX, CEZに比べ, 優れた抗菌力を示した。またCTTは $3.13\mu\text{g/ml}$ で約60%の菌株の発育を阻止したが, 他の薬剤ではほとんど抗菌力を示さなかった (Fig. 8)。

P. mirabilis : CTTは $0.39\mu\text{g/ml}$ で約95%の株の発育を阻止し, MIC₇₀も $0.23\mu\text{g/ml}$ となり, CMZの $3.3\mu\text{g/ml}$, CFXの $6.1\mu\text{g/ml}$, CEZの $8.4\mu\text{g/ml}$ と比べると非常

Fig. 3 Antibacterial activity of CTT

N. gonorrhoeae (8 strains, 10^6 cells/ml)

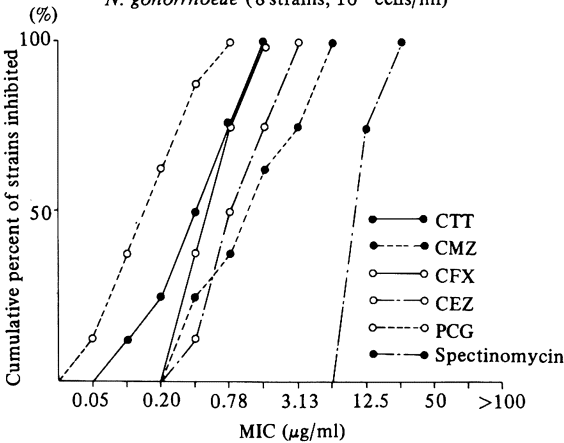


Fig. 6 Antibacterial activity of CTT

E. cloacae (81 strains, 10^6 cells/ml)

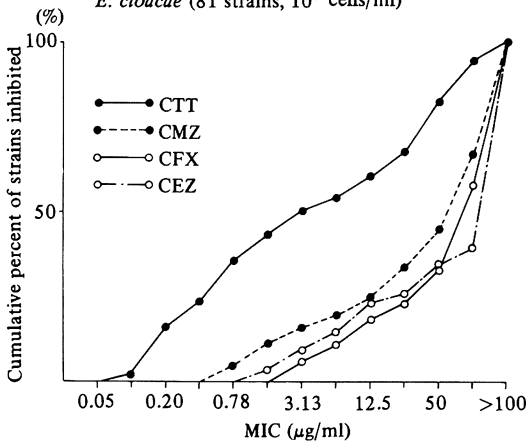


Fig. 4 Antibacterial activity of CTT

E. coli (160 strains, 10^6 cells/ml)

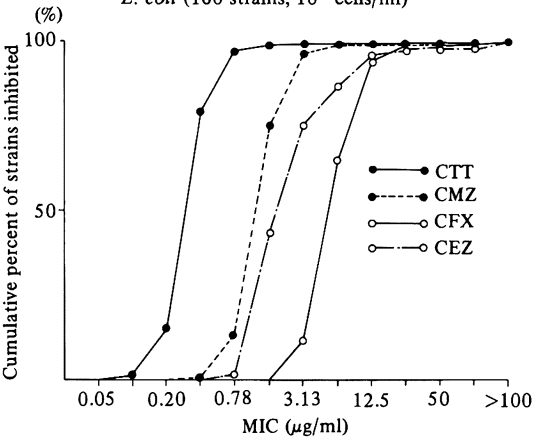


Fig. 7 Antibacterial activity of CTT

C. freundii (65 strains, 10^6 cells/ml)

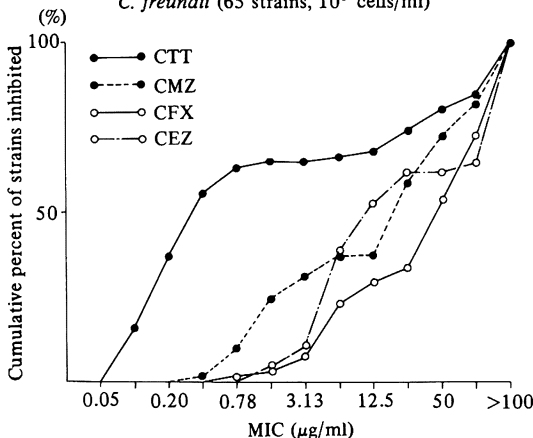


Fig. 5 Antibacterial activity of CTT

K. pneumoniae (200 strains, 10^6 cells/ml)

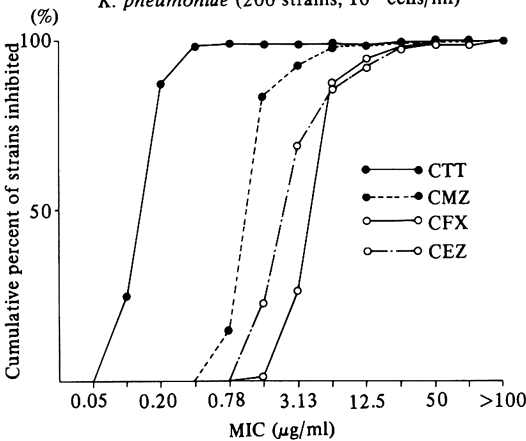


Fig. 8 Antibacterial activity of CTT

S. marcescens (241 strains, 10^6 cells/ml)

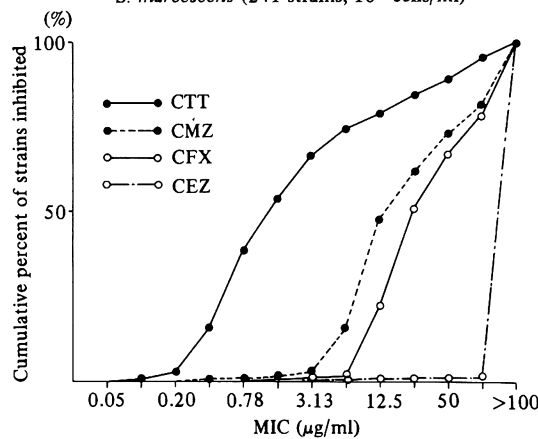


Fig. 9 Antibacterial activity of CTT

P. mirabilis (100 strains, 10⁶ cells/ml)

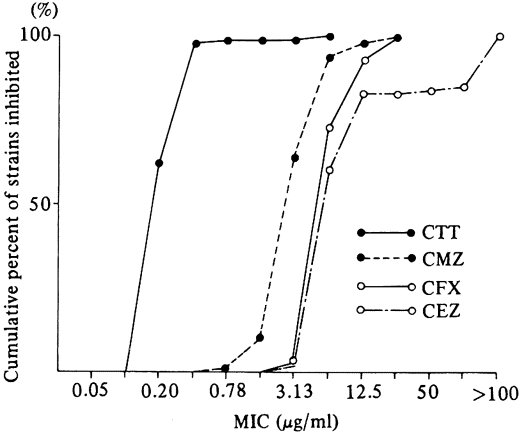


Fig. 12 Antibacterial activity of CTT

P. rettgeri (31 strains, 10⁶ cells/ml)

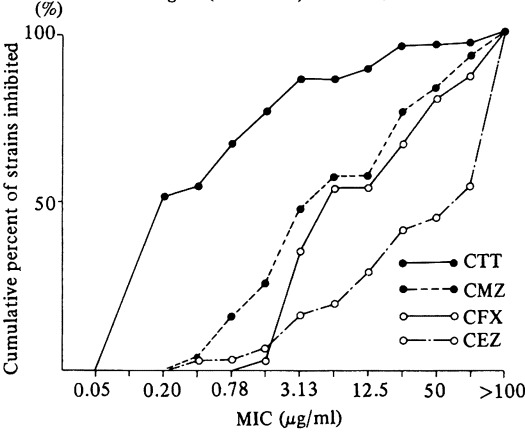


Fig. 10 Antibacterial activity of CTT

P. vulgaris (54 strains, 10⁶ cells/ml)

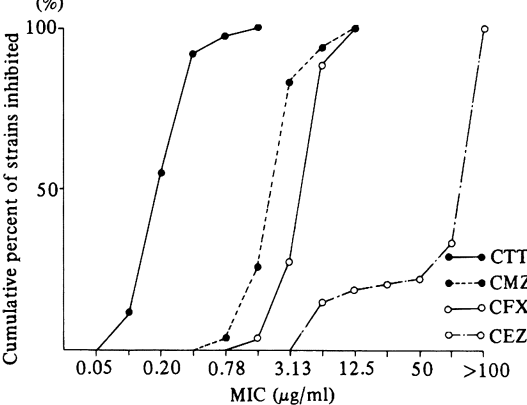


Fig. 13 Antibacterial activity of CTT

P. cepacia (79 strains, 10⁶ cells/ml)

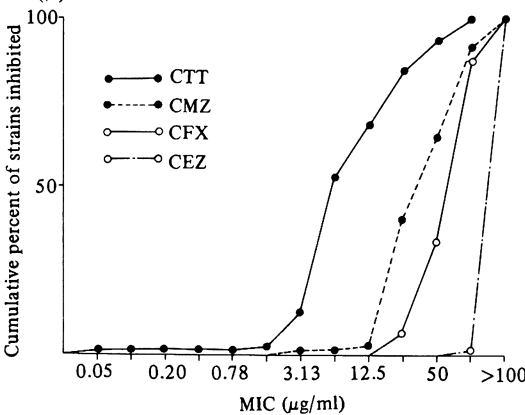


Fig. 11 Antibacterial activity of CTT

P. morganii (54 strains, 10⁶ cells/ml)

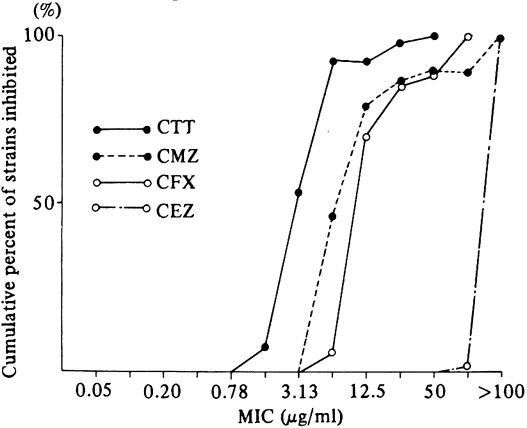


Fig. 14 Antibacterial activity of CTT

H. influenzae (58 strains, 10⁶ cells/ml)

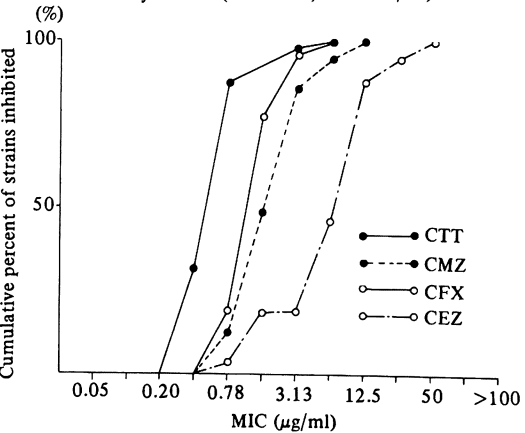
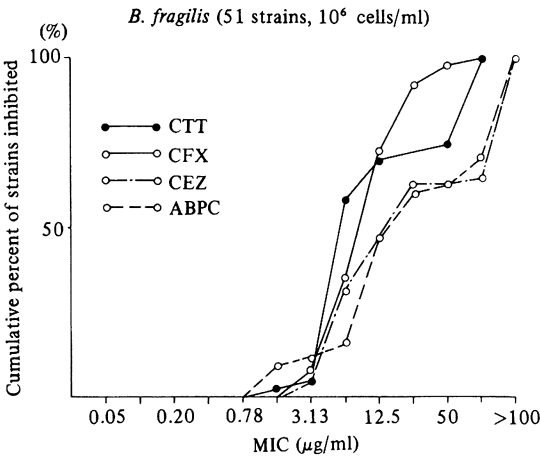


Fig. 15 Antibacterial activity of CTT



に良好であった (Fig. 9)。

P. vulgaris : indole positive の *P. vulgaris* に対しても、CTT は CMZ, CFX, CEZ が全く抗菌力を示さない $0.39\mu\text{g/ml}$ で約90%の株の発育を阻止し、優れた抗菌力を有していた (Fig.10)。

P. morganii : CTT の MIC_{70} は $4.2\mu\text{g/ml}$ で、菌株の約90%が $6.25\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止され、優れていた (Fig. 11)。

P. rettgeri : *P. vulgaris*, *P. morganii* よりは幅の広い感受性分布となったが、 MIC_{70} は $0.9\mu\text{g/ml}$ であり CMZ, CFX, CEZ よりはかなり低い値であった (Fig. 12)。

P. cepacia : 79株に対し、CTT の MIC_{70} は $13.3\mu\text{g/ml}$ となった。CMZ は $58\mu\text{g/ml}$, CFX は $80\mu\text{g/ml}$, CEZ は $>100\mu\text{g/ml}$ で、CTT が最も優れていた (Fig. 13)。

H. influenzae : CTT の MIC_{70} は $0.62\mu\text{g/ml}$ であり、 $0.78\mu\text{g/ml}$ で約90%の菌株の発育を阻止し、強い抗菌力を示した (Fig. 14)。

Fig. 16 Bactericidal activity of CTT and CMZ against *E. coli* ML4707

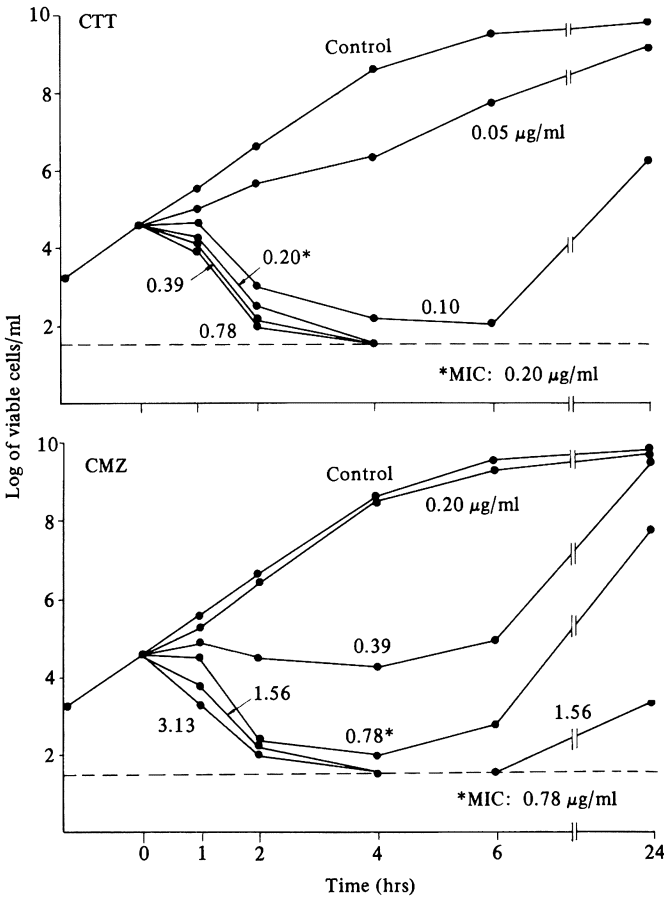
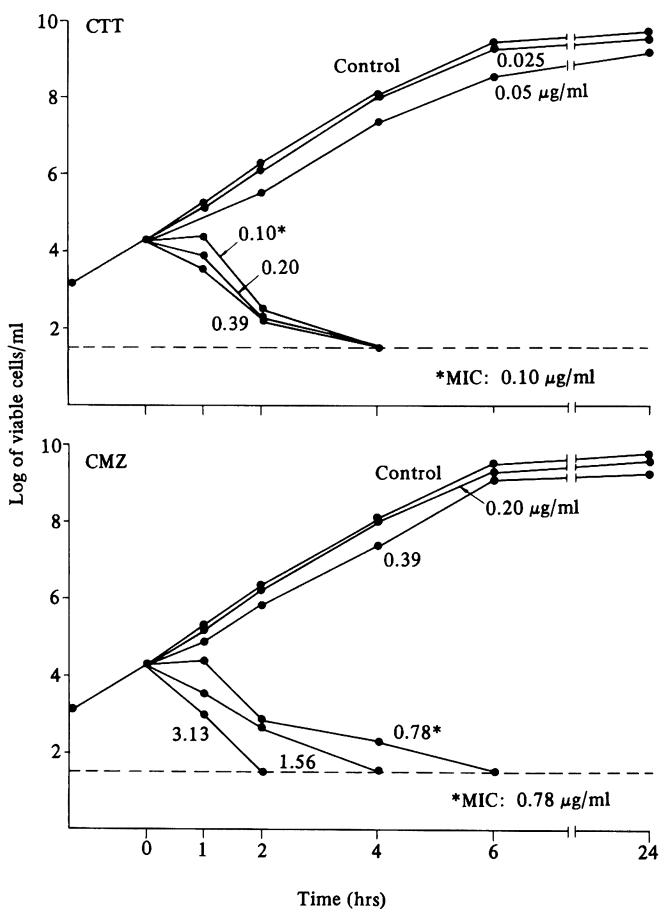


Fig. 17 Bactericidal activity of CTT and CMZ against *E. coli* GN6370

B. fragilis: CTTはMIC₇₀を12.1 μ g/mlに有し, CFXの11.9 μ g/mlとはほぼ同等, CEZよりも優れていた (Fig. 15)。

以上より CTTは, グラム陰性桿菌, 特に CEZが無効である菌に対しても CMZ, CFXよりもはるかに低い MIC値を示し, 強力な抗菌力を有していた。

3. 殺菌効果

E. coli ML4707, *E. coli* GN6370, *K. pneumoniae* GN5605, *S. marcescens* No. 6の増殖曲線に及ぼす CTTの影響を CMZと比較検討した。

E. coli ML4707に対し, CTTは0.1 μ g/mlで殺菌的に作用し, 0.2 μ g/ml以上では完全な菌の消失をみた。CMZは0.78 μ g/mlで殺菌的であり, 1.56 μ g/mlでも24時間後には再増殖が認められた (Fig. 16)。

E. coli GN6370では CTTの0.1 μ g/ml以上, CMZの0.78 μ g/ml以上の濃度で, 完全な菌の消失が認められた

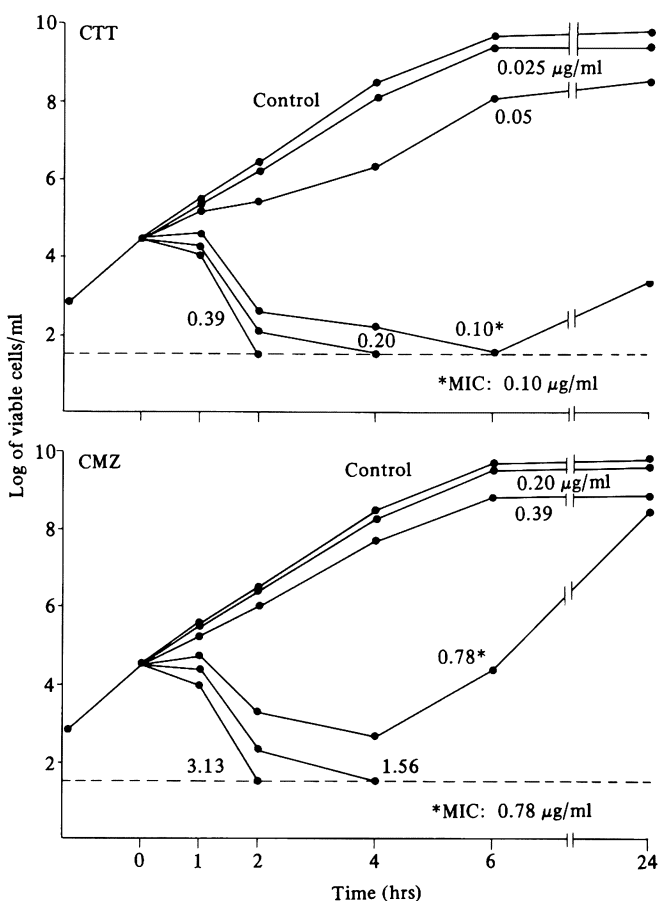
(Fig. 17)。

K. pneumoniae GN5605に対し, CTTは0.1 μ g/ml, CMZは0.78 μ g/mlで殺菌的に作用し, おおの0.2 μ g/ml以上, 1.56 μ g/ml以上で完全な菌の消失が認められた (Fig. 18)。

S. marcescens No. 6に対し, CTTは0.2 μ g/ml以上, CMZは6.25 μ g/ml以上で殺菌的に作用した (Fig. 19)。

以上のことより, CTTはCMZに比べ低い濃度で, 強力な殺菌作用を有していることが確認された。

CTTは血中濃度の持続時間が長く, ヒトに静注した時の血中半減期が Fig. 20に示すように約3時間と, 従来の β -Lactam系薬剤の中で最も持続的であると報告されている⁹⁾。今回, 血中濃度にしたがい CTTを作用させた場合の菌の消長を観察した。実線が血中濃度, 点線が simulated model systemでの薬剤濃度である (Fig. 20)。

Fig. 18 Bactericidal activity of CTT and CMZ against *K. pneumoniae* GN5605

S. aureus TERAJIMA, *E. coli* NIHJ JC-2 では、8 時間まで MIC 以上の濃度が維持され、薬剤添加直後より菌の著しい減少が認められた (Fig. 21)。

S. marcescens は MIC₇₀(4.3 µg/ml) 以上に位置する臨床分離株を選択した。菌数は 4 時間まで著しく減少したが、濃度が MIC 以下になるに従い、再増殖する傾向にあった (Fig. 21)。

臨床分離の *E. coli* (25 株), *K. pneumoniae* (25 株), *S. marcescens* (22 株) を用いて、CTT の MIC と MBC を比較検討した (Fig. 22~24)。対照薬剤として CFX, CEZ を用い、*S. marcescens* に対しては CEZ の代わりに GM を使用した。

E. coli, *K. pneumoniae* では 3 薬剤ともに、MIC と MBC はほぼ一致していた。*S. marcescens* では 3 薬剤ともに 1 管程度 MBC が MIC よりも高い値を示したが、CTT は *E. coli*, *K. pneumoniae* の場合と同様、対照薬

剤より低い濃度にて殺菌効果が認められた。

4. MIC 値と MBC 値に対する接種菌量の影響

接種菌量の変動が、CTT の抗菌力にどのような影響を与えるかを検討した (Table 3)。

E. coli NIHJ JC-2 では 10~10⁷ cells/ml, *S. marcescens* IAM1184 では 10~10⁶ cells/ml の接種菌量における MIC 値と MBC 値を求め Table 3 に示した。両菌株において、4 薬剤とも MIC 値, MBC 値に変動がみられたが、その変動は *S. marcescens* において顕著であった。

5. PBP に対する親和性

CTT と ¹⁴C-標識 PCG を用いた competition 実験より、CTT は *E. coli* PBP として知られている 7 個の PBP3 と 4 の間に 2 個の CTT が親和性を有する protein し、ついで PBP1A, 1Bs および 5/6 の順であり、PBP4, 2, 4' に対する親和性は弱いことが確認された (Fig. 25)。PBP3^{10,11} が阻害されると隔壁のないフィラメント状細

Fig. 19 Bactericidal activity of CTT and CMZ against *S. marcescens* No. 6

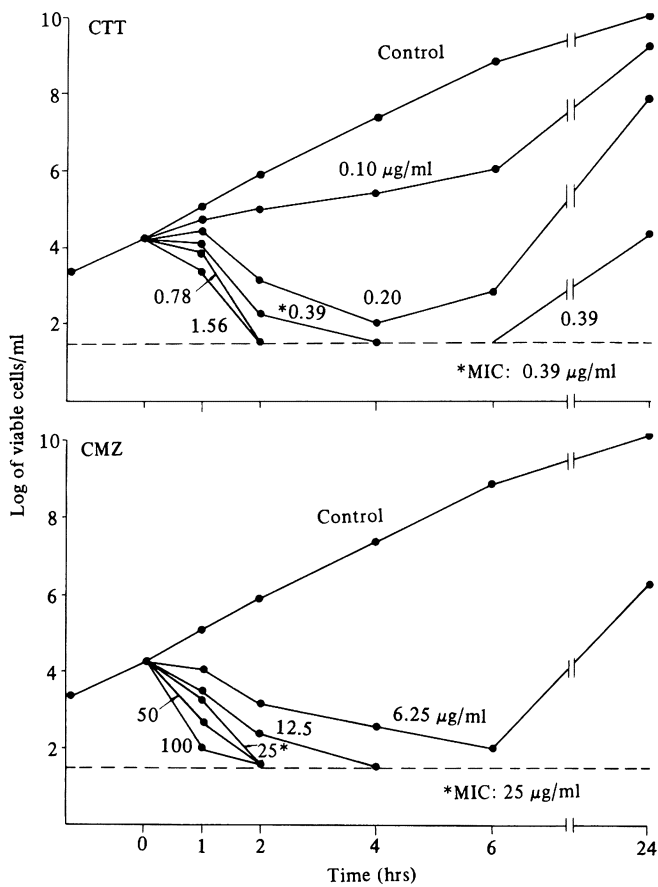
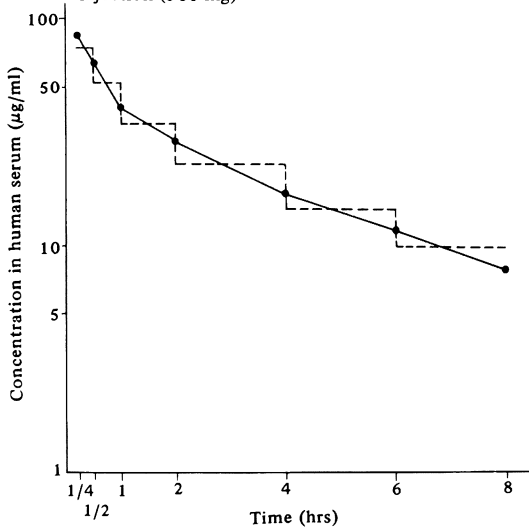


Fig. 20 Concentrations of CTT used *in vitro* experiments simulating human serum levels after intravenous injection (500 mg)



胞を形成、後に溶菌、また PBP1A,1Bs^{4,12)}はペプチドグリカン生成に関与し、阻害されると溶菌することが報告されているが、CTT の PBP s に対する親和性の結果は CTT を *E. coli* に作用させた時の菌の形態学的変化¹⁾と一致した。

¹⁴C-標識 CTT を用いた実験からも、上記の結果が再確認された。PBP1Bs と 2 との間に PBP1C が、PBP3 と 4 の間に PBP3 等が見出されることがあるという報告もあるが、今回の実験において PBP1Bs と 2 の間に 2 個、PBP3 と 4 の間に 2 個の CTT が親和性を有する protein が認められ、CTT の形態学的変化との関連性に興味をもたれた (Fig. 25)。

6. β-Lactamase に対する安定性

E. coli GN5482¹³⁾, *E. cloacae* GN7471, *C. freundii* GN7391, *S. marcescens* GN10857, *P. aeruginosa* GN10362, *P. rettgeri* GN4430¹⁴⁾, *P. morganii* GN5407, *P. vulgaris* GN7919, *P. cepacia* GN11164¹⁵⁾, *B. fragilis*

Fig. 21 Bactericidal activity of CTT against *S. aureus* TERAJIMA, *E. coli* NIHJ JC-2 and *S. marcescens* L-73 determined by the kinetic model

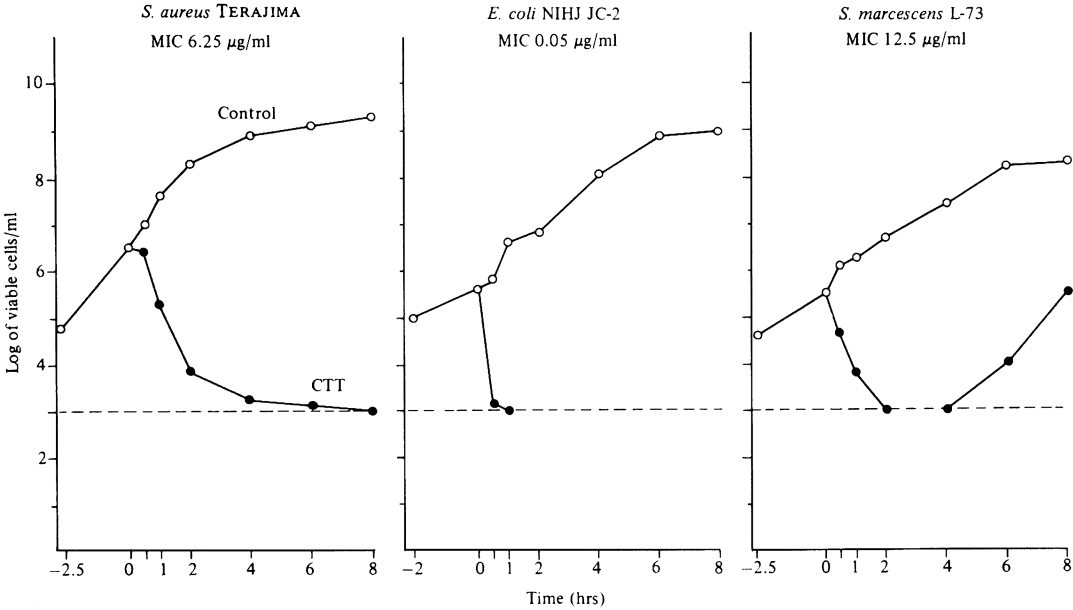


Fig. 22 Bactericidal activity of CTT, CFX and CEZ against 25 strains of *E. coli*

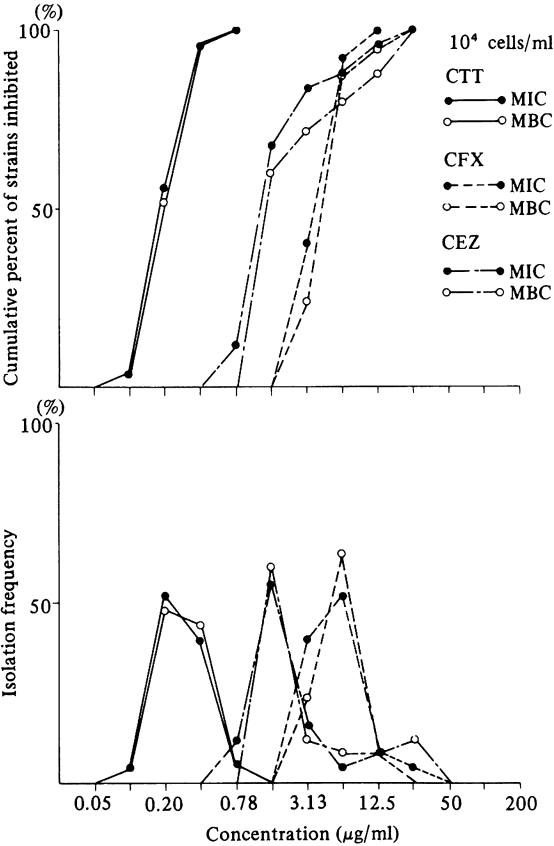


Fig. 23 Bactericidal activity of CTT, CFX and CEZ against 25 strains of *K. pneumoniae*

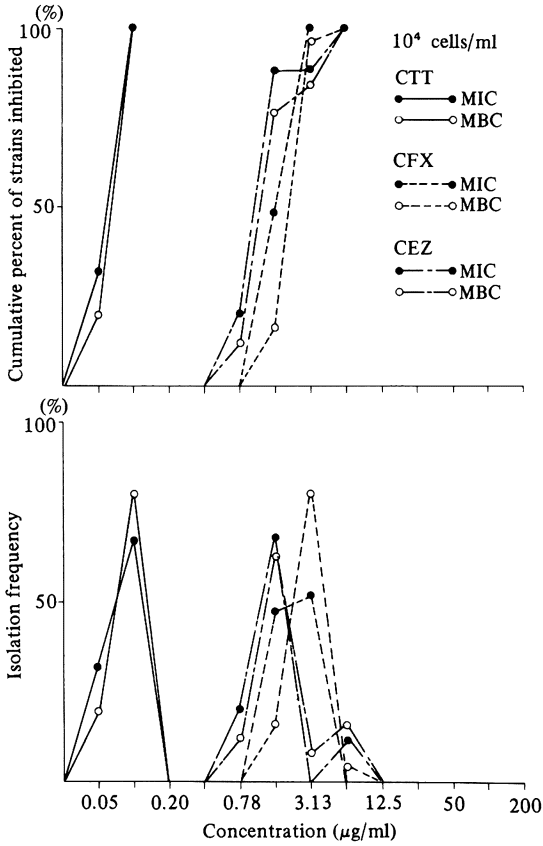
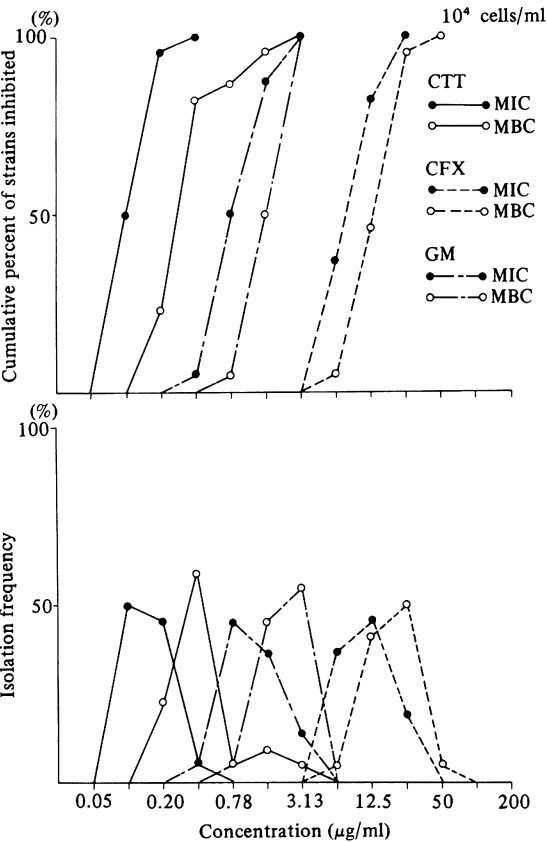


Fig. 24 Bactericidal activity of CTT, CFX and GM against 22 strains of *S. marcescens*



GN11477¹⁶⁾より cephalosporinase (CSase)を抽出、精製し、R 因子支配の penicillinase (PCase) I, II, III^{17~19)}, IV型²⁰⁾を精製し、CTT の安定性を 6 種類の cephalosporin 剤、4 種類の penicillin 剤を対照において比較検討した。

CTT は上記の各種 β -lactamase 産生株に強い抗菌力を示し、その感受性値は同じ Cephamycin 系抗生物質である CMZ, CFX より優れていた (Table 4)。

β -Lactamase に対する安定性を Vmax 値を用いた相対加水分解速度にて検討した結果、CTT は、CMZ, CFX と同様に各種グラム陰性桿菌の産出する CSase および R 因子支配の PCase により加水分解を受けず、きわめて安定であることが確認された (Table 5)。

次に、これらの酵素について CSase の場合には CET, PCase の場合には CER を基質として、CTT, CMZ, CFX の阻害活性を検討した (Table 6)。CTT は *P. cepacia* からの酵素を除く 9 菌種からの CSase に CFX と同程度の Ki 値で酵素活性を阻害した。PCase I, IV 型も *P. cepacia* が産生する CSase と同様 CTT, CMZ, CFX により阻害されなかったが、PCase II, III 型は阻害され、CTT の Ki 値は他の 2 剤よりかなり小さかった。

7. マウス感染治療実験

E. coli ML4707, *K. pneumoniae* GN6445, *S. marcescens* GN7577 を用い CTT の生体内抗菌力を検討し、結果を Table 7 に示した。比較薬剤として *E. coli* ML4707, *K. pneumoniae* GN6445 では CFX, CEZ, LMOX, CZX,

Table 3 Effect of inoculum size on the MIC and MBC

Organism	Inoculum size (cells/ml)	CTT		CMZ		CFX		CEZ		GM	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.2×10^7	0.39	0.39	3.13	3.13	12.5	12.5	3.13	6.25	—	—
	10^6	0.39	0.39	3.13	3.13	12.5	12.5	3.13	3.13	—	—
	10^5	0.39	0.39	3.13	3.13	12.5	12.5	1.56	3.13	—	—
	10^4	0.39	0.39	3.13	3.13	6.25	6.25	1.56	1.56	—	—
	10^3	0.19	0.19	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	1.56	—	—
	10^2	0.19	0.19	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	1.56	—	—
	10	0.19	0.19	0.78	0.78	6.25	6.25	0.78	1.56	—	—
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	8.9×10^6	0.19	6.25	3.13	25	12.5	12.5	—	—	3.13	6.25
	10^5	0.10	0.39	3.13	12.5	12.5	12.5	—	—	1.56	6.25
	10^4	0.10	0.19	1.56	6.25	6.25	6.25	—	—	0.78	1.56
	10^3	0.05	0.19	1.56	3.13	6.25	6.25	—	—	0.78	0.78
	10^2	0.05	0.05	1.56	1.56	3.13	6.25	—	—	0.78	0.78
	10	0.025	0.05	1.56	1.56	3.13	6.25	—	—	0.78	0.78

(µg/ml)

Fig. 25 Competition of unlabeled CTT with [¹⁴C]-PCG for binding to PBPs and binding patterns of [¹⁴C]-CTT to PBPs in *E. coli*

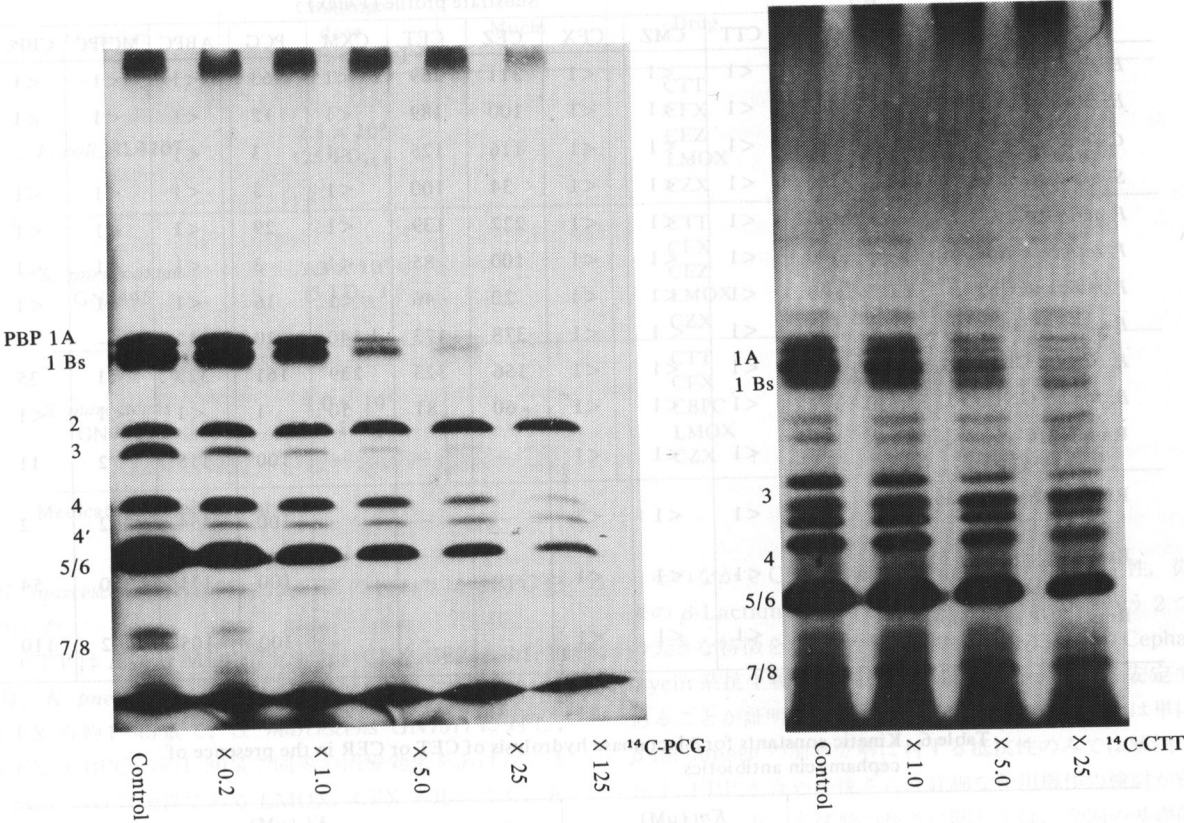


Table 4 Comparative activity of β -lactam antibiotics against β -lactamase producing organisms

Organism	Enzyme ^a activity (Units/mg protein)	Inducible or constitutive	MIC (μ g/ml) of following antibiotics				
			CTT	CMZ	CFX	CET	ABPC
<i>E. coli</i> GN5482	0.2	C	0.78	6.25	25	25	100
<i>E. cloacae</i> GN7471	4.3	C	12.5	400	200	>800	800
<i>C. freundii</i> GN7391	6.0	I	200	400	800	>800	>800
<i>S. marcescens</i> GN10857	0.8	I	25	200	200	>800	>800
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	0.16	I	400	>800	>800	>800	>800
<i>P. rettgeri</i> GN4430	0.9	I	0.05	0.78	3.13	50	12.5
<i>P. morgani</i> GN5407	0.5	I	0.78	6.25	12.5	>800	200
<i>P. vulgaris</i> GN7919	3.2	I	0.39	3.13	3.13	800	>800
<i>P. cepacia</i> GN11164	1.2	I	1.56	25	50	>800	800
<i>B. fragilis</i> GN11477	0.5	C	6.25	12.5	12.5	400	800
Rms 212/ <i>E. coli</i> W3630	3.5	C	0.20	0.78	3.13	6.25	400
Rms 213/ <i>E. coli</i> W3630	0.11	C	0.10	0.78	1.56	3.13	100
Rte 16/ <i>E. coli</i> W3630	0.18	C	0.20	0.39	3.13	3.13	200
Rms 139/ <i>P. aeruginosa</i> M1	5.9	C	25	>800	800	>800	>800

^a: Crude β -lactamase preparations were used.

Table 5 Stability of CTT and other β -lactam antibiotics to β -lactamase

β -Lactamase source	Substrate profile (V_{max})										
	CER	CTT	CMZ	CFX	CEZ	CET	CXM	PCG	ABPC	MCIPC	CBPC
<i>E. coli</i> GN5482	100	<1	<1	<1	311	269	<1	63	<1	<1	<1
<i>E. cloacae</i> GN7471	100	<1	<1	<1	100	189	<1	12	<1	<1	<1
<i>C. freundii</i> GN7391	100	<1	<1	<1	116	125	<1	3	<1	—	—
<i>S. marcescens</i> GN10857	100	<1	<1	<1	34	100	<1	3	<1	<1	<1
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	100	<1	<1	<1	222	139	<1	29	<1	<1	<1
<i>P. rettgeri</i> GN4430	100	<1	<1	<1	100	85	<1	3	<1	<1	<1
<i>P. morgani</i> GN5407	100	<1	<1	<1	20	46	<1	16	<1	<1	<1
<i>P. vulgaris</i> GN7919	100	<1	<1	<1	378	173	1,140	20	12	—	—
<i>P. cepacia</i> GN11164	100	<1	<1	<1	156	323	239	161	323	<1	35
<i>B. fragilis</i> GN11477	100	<1	<1	<1	60	81	50	1	<1	<1	<1
Rms 212/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type I)	130	<1	<1	<1	—	—	—	100	115	2	11
Rms 213/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type II)	263	<1	<1	<1	—	—	—	100	454	292	2
Rte 16/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type III)	23	<1	<1	<1	—	—	—	100	131	310	54
Rms 139/ <i>P. aeruginosa</i> M1 (PCase type IV)	20	<1	<1	<1	—	—	—	100	105	2	110

Table 6 Kinetic constants for β -lactamase hydrolysis of CET or CER in the presence of cephamycin antibiotics

β -Lactamase source	K_m (μ M)	K_i (μ M)		
	CET	CTT	CMZ	CFX
<i>E. coli</i> GN5482	63	0.22	0.57	0.11
<i>E. cloacae</i> GN7471	105	0.22	0.64	0.50
<i>C. freundii</i> GN7391	16	0.09	0.19	0.33
<i>S. marcescens</i> GN10857	44	0.44	0.39	0.15
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	71	0.15	0.10	0.23
<i>P. rettgeri</i> GN4430	105	3.64	4.31	0.34
<i>P. morgani</i> GN5407	20	0.11	0.40	0.22
<i>P. vulgaris</i> GN7919	57	13.3	5.22	12.4
<i>P. cepacia</i> GN11164	71	N.I. ^b	N.I.	N.I.
<i>B. fragilis</i> GN11477	100	0.20	0.20	0.50
Rms 212/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type I)	400 ^a	N.I.	N.I.	N.I.
Rms 213/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type II)	333 ^a	8.53	116	245
Rte 16/ <i>E. coli</i> W3630 (PCase type III)	81 ^a	1.02	2.74	16.7
Rms 139/ <i>P. aeruginosa</i> M1 (PCase type IV)	111 ^a	N.I.	N.I.	N.I.

^a: CER as a substrate.^b: Not inhibited.

Table 7 Protective effect against experimental mice infections

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Drug	ED ₅₀ (mg/kg)	MIC (μg/ml) 10 ⁶ cells/ml
<i>E. coli</i> ML4707	2.5 × 10 ⁶ (25 LD ₅₀)	—	CTT	1.18	0.20
			CFX	37.0	3.13
			CEZ	34.0	1.56
			LMOX	1.43	0.10
			CZX	1.13	0.05
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	7.3 × 10 ⁶ (5 LD ₅₀)	—	CTT	1.40	0.10
			CFX	62.5	3.13
			CEZ	6.10	1.56
			LMOX	1.13	0.20
			CZX	0.34	0.05
<i>S. marcescens</i> GN7577	1.0 × 10 ⁵ (90 LD ₅₀)	+	CTT	13.0	1.56
			CFX	425	12.5
			CBPC	420	12.5
			LMOX	16.0	0.39
			CZX	35.0	0.10

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

S. marcescens GN7577 では CEZ の代わりに CBPC を用いた。

CTT は *E. coli* ML4707 に対し、CFX, CEZ の約1/30 量、*K. pneumoniae* GN6445 に対しては、CEZ の約1/4, CFX の約1/45 量で、*S. marcescens* GN7577 に対し、CFX, CBPC の約1/30 量で同等の治療効果をあげた。また新しい抗生物質である LMOX, CZX と比べても、*E. coli* ML4707 ではほぼ同等、*S. marcescens* GN7577 では CTT の MIC 値が高いにもかかわらず、逆に良好な治療効果を示した。

考 察

CTT はグラム陽性、陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトラムを有していた。なかでもグラム陰性菌に対しては従来の Cephalosporin, Cephamycin 系抗生物質に比べ、非常に低い濃度で有効であり、indole positive *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens* 等に対しても、*in vitro*, *in vivo* ともに他の Cephamycin 系抗生物質より強い抗菌力を示した。

β-Lactam 系抗生物質はその抗菌力の拡大という目的のため改良が重ねられ、近年、種々の薬剤が開発されている。新薬の開発と同時に、各研究機関ではその作用機作の研究が盛んに行われ、その結果致死標的である PBP への親和性、細菌細胞表層透過性^{21,22)}、β-lactamase の加水分解に対する抵抗性等の性質の改善が抗菌力に貢献していると考えられるようになった。また、より臨床に近付けるために、生体内動態^{23,24)}や生体が本来備えている種々の防御機構等への影響が検討されている。

そのなかで CTT は β-lactamase に対する安定性、従来の β-Lactam 剤に比し長い半減期を持つという 2 つの大きな特徴を有し、今回の実験においても他の Cephamycin 系抗生物質と同様に β-lactamase に対し安定であることが証明された。しかし、その強い抗菌力は単に β-lactamase の加水分解に対する抵抗性のみでは解決されず、PBP を含め今後さらに詳細な作用機作の検討が望まれる。一方、半減期の長さに関しては、今回の基礎的な実験から試験管内以上の抗菌力が生体内にて予測され、臨床使用においてさらに複雑な因子がからんでくるものの、良好な結果が期待できることと思われた。

文 献

1) TODA, M.; T. SAITO, K. YANO, K. SUZAKI, M. SAITO & S. MITSUHASHI : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM09330, a new cephamycin derivative. Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. vol. 1, pp. 280~281, 1980

2) MIC 測定委員会：最小発育阻止濃度（MIC）測定法。Chemotherapy 23：1~2, 1975

3) SPRATT, B. G. & A. B. PARDEE : Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. Nature 254：516~517, 1975

4) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI : Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in

- vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 : 5472~5476, 1977
- 5) ROSS, G. W.; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. M. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O' CHALLAGHAN : Comparison of assay technique for beta-lactamase activity. Anal. Biochem. 54 : 9~16, 1973
- 6) WALEY, S. G. : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139 : 780~789, 1974
- 7) LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
- 8) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92 : 99~113, 1948
- 9) TACHIBANA, A.; M. KOMIYA, Y. KIKUCHI, K. YANO & K. MASHIMO : Pharmacological studies on YM09330, a new parenteral cephamycin derivative. Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. vol. 1, pp. 273~275, 1980
- 10) SUZUKI, H.; Y. NISHIMURA & Y. HIROTA : On the process of cellular division in *Escherichia coli* : a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 : 664~668, 1978
- 11) SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72 : 2999~3003, 1975
- 12) MITSUHASHI, M.; S. TAMAKI, S. NAKAJIMA, J. NAKAGAWA, S. TOMIOKA & Y. TAKAGAKI : Properties and functions of penicillin-binding proteins and related enzymes in *Escherichia coli*. Microbial Drug Resistance vol. 2 (MITSUHASHI, S., ed.) Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 389~404, 1979
- 13) MINAMI, S.; M. INOUE & S. MITSUHASHI : Purification and properties of cephalosporinase in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 18 : 77~80, 1980
- 14) MATSUURA, M.; H. NAKAZAWA, M. INOUE & S. MITSUHASHI : Purification and biochemical properties of β -lactamase produced by *Proteus rettgeri*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 18 : 687~690, 1980
- 15) HIRAI, K.; S. IYOBE, M. INOUE & S. MITSUHASHI : Purification and properties of a new β -lactamase from *Pseudomonas cepacia*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 17 : 355~358, 1980
- 16) SATO, K.; M. INOUE & S. MITSUHASHI : Activity of β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis* against newly introduced cephalosporins. Antimicrob. Agents & Chemoth. 17 : 736~737, 1980
- 17) SAWAI, T.; K. TAKAHASHI, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI : Variant of penicillinase mediated by an R factor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 104 : 620~629, 1970
- 18) YAGINUMA, S.; N. TERAKADO, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI : Biochemical properties of a penicillin beta-lactamase mediated by R factor from *Bordetella bronchiseptica*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8 : 238~242, 1975
- 19) YAMAGISHI, S.; K. O'HARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI : The purification and properties of penicillin β -lactamases mediated by transmissible R factor in *Escherichia coli*. J. Biochem. (Tokyo) 66 : 11~20, 1969
- 20) SAWADA, Y.; S. YAGINUMA, M. TAI, S. IYOBE & S. MITSUHASHI : Plasmid-mediated penicillin beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9 : 55~60, 1976
- 21) ZIMMERMANN, W. & A. ROSSELET : Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents & Chemoth. 12 : 368~372, 1977
- 22) SAWAI, T.; K. MATSUBA, A. TAMURA & S. YAMAGISHI : The bacterial outer-membrane permeability of β -lactam antibiotics. J. Antibiotics 32 : 59~65, 1979
- 23) GRASSO, S.; G. MEINARDI, I. DE CARNERI & V. TAMASSIA : New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob. Agents & Chemoth. 13 : 570~576, 1978
- 24) RANDOLPH, J. A.; R. E. BUCK, K. E. PRICE & F. LEITNER : Comparative bactericidal effect of ceforanide (BL-S786) and five other cephalosporins in an *in vitro* pharmacokinetic model. J. Antibiotics 32 : 727~733, 1979

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFOTETAN (YM09330)

MASATO TODA, TAKESHI SAITO, MATSUHISA INOUE and SUSUMU MITSUHASHI

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

Cefotetan (CTT, YM09330) is a new cephamycin-type antibiotic with a broad spectrum of antibacterial activities. The antibacterial activity of cefotetan against gram-positive and gram-negative organisms was compared with cefmetazole, cefoxitin and cefazolin. The results are summarized as follows.

1) Cefotetan was more effective than cefmetazole, cefoxitin and cefazolin against gram-negative bacteria including indole-positive *Proteus*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *C. freundii* and *B. fragilis*. Its activity against gram-positive bacteria was slightly less than that of cefoxitin. The concentrations of cefotetan which required to inhibit 70% of clinical isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *P. vulgaris* were between 0.20 and 0.40 $\mu\text{g/ml}$.

2) Bactericidal activity of cefotetan against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. marcescens* was confirmed by counting viable cells and determining the minimum bactericidal concentration (MBC).

3) Cefotetan was resistant to hydrolysis by various bacterial β -lactamases as well as cefmetazole and cefoxitin. Moreover, cefotetan was found to possess not only antibacterial activity against β -lactamase-producing organisms, but also inhibitory activity against a number of types of β -lactamases.

4) Cefotetan showed a high affinity for almost all PBPs, with a stronger affinity for PBP 3, with a strong affinity for PBPs 1A, 1Bs, 4 and 5/6 and with little affinity for PBP 2.

5) Cefotetan showed much higher antibacterial activity than cefoxitin and cefazolin against systemic infections of mice with *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. marcescens*.