

T-1982 の細菌学的評価

才川 勇・保田 隆・福岡義和・高畑正裕
 松原信之・四辻 彰・岡本直子
 富山化学工業株式会社総合研究所

新しく開発された Cephamicin 系抗生剤 T-1982 の細菌学的評価を行なった結果、次の成績が得られた。

1) T-1982 は Cephalosporin 系抗生剤に耐性な菌を含むグラム陽性およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有していた。特に *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* および *Proteus* 属に対して優れた抗菌力を有し、また嫌気性菌である *Bacteroides fragilis* に対しても優れた抗菌力を有していた。

2) T-1982 の抗菌力は培地の変動、血清の共存、接種菌量の多少などの影響を比較的受け難く、MIC 付近で殺菌的に作用した。

3) T-1982 は penicillinase および cephalosporinase に対して、他の Cephamicin 系抗生剤同様、非常に安定であった。

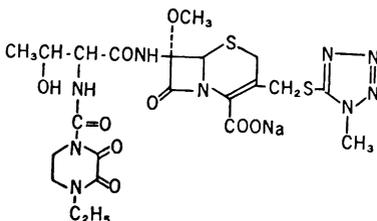
4) *E. coli* の penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性は、PBP-3 に対する親和性が最も強く、次いで PBP-1B, PBP-1A であった。

5) 実験のマウス感染症に対しては、T-1982 の治療効果が比較薬剤中最も優れていた。また CEZ 耐性菌に対して優れた治療効果を示した。

T-1982 は富山化学工業(株)総合研究所において開発された新規な注射用半合成セフェム系抗生剤である¹⁾。化学名は Sodium β -[(2R, 3S)-2-(4-ethyl-2, 3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)-3-hydroxybutanamido]-7 α -methoxy-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylate でその構造は先に開発された Piperacillin²⁾ および Cefoperazone³⁾ が有する 4-ethyl-2, 3-dioxo-1-piperazine-carbonyl moiety をスレオニルの NH₂基に導入した 7 α -メトキシセファロsporin系化合物である (Fig. 1)。

T-1982 はグラム陽性および陰性菌群に対し、広範囲な抗菌スペクトラムを有し、なかでも Penicillin や Cephalosporin に耐性な *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* 属, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* などに優れた抗菌力を有する。

Fig. 1 Chemical structure of T-1982



今回著者らは、T-1982 に関する *in vitro* および *in vivo* での細菌学的評価を既知のセフェム系薬剤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

T-1982 は当社総合研究所で製造された凍結乾燥品を用い、その他 Cefmetazole (CMZ: 三共), Cefoxitin (CFX: 第一製薬), Latamoxef (LMOX: 塩野義製薬), Cefazolin (CEZ: 藤沢薬品), Cephaloridine (CER: 鳥居薬品) および Benzyl penicillin (PCG: 明治製薬) を用いた。

2) 試験菌株

標準菌株は当社研究所保存株を使用した。臨床材料由来の菌株は主として 1977年 6月~1978年 4月までに分離されたものである。

3) 抗菌力測定法

日本化学療法学会標準法⁴⁾ 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 tryptic soy broth (TSB: 栄研) 中で 37°C 18時間培養した菌液 (約 10⁸ cells/ml) およびその 100倍希釈液 (約 10⁶ 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、*Pseudomonas aeruginosa* の場合は前培養液に0.4% KNO_3 を添加し、*Streptococcus pyogenes* では前培養液に todd hewitt broth (Difco社) を用い、MIC 測定平板に10%羊血液を添加した。*Haemophilus influenzae* では、前培養液にヘミン(シグマ社)を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 β -NAD(シグマ社)を2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた brain heart infusion broth (BHIB: 栄研) を用い、MIC 測定平板に FILDES のペプシン消化血液を5% 添加した。また *Bacteroides fragilis* の場合は前培養液に GAM ブイオン(日水)、MIC 測定用平板に GAM 寒天培地(日水) を使用し、嫌気条件下で培養した。

4) 殺菌力の測定法

(1) MBC

TSB で37 $^{\circ}\text{C}$ 1夜培養した菌液を適宜希釈し、最終菌量が10⁶ および10⁴ cells/ml となるよう薬剤の倍数希釈濃度を含む nutrient broth (NB: 栄研) に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 18時間培養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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 1夜培養した菌液を、NB に接種し37 $^{\circ}\text{C}$ で振とう培養した。生菌数が約10⁶ cells/ml になった時点で薬剤を添加し、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10⁶ cells/ml として MIC を測定した。

(2) 培地 pH の影響

10% HCl または10% NaOH で pH 調整した HIA を用い、接種菌量は約10⁶ 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10⁴ 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 $^{\circ}\text{C}$ で18時間培養した菌液とその100倍および10,000倍希釈液を接種して MIC を測定した。

6) β -lactamase に対する安定性

BHIB で37 $^{\circ}\text{C}$ 1夜培養した菌液50 ml を、Medium

B² 1L に接種し37 $^{\circ}\text{C}$ 5時間振とう培養した後、遠心により集菌した。ただし *Proteus vulgaris* GN76 では PCG 0.5mg/ml を振とう培養時に添加した。菌体を0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) の適量に懸濁し、20 kHz 5分間水冷下で超音波処理した破砕液を12,000 \times G 20分間遠心し、その上清を酵素液とした。 β -lactamase による加水分解速度は PERRET のヨード法⁹⁾ に基づいて測定した。

7) 位相差顕微鏡による菌の形態変化の観察

TSB で37 $^{\circ}\text{C}$ 1夜培養した菌液を、HIB で100倍希釈して37 $^{\circ}\text{C}$ で約2時間振とう培養を行ない対数増殖期となった菌液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。カバーガラスをかぶせ、パラフィンで封じた後、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温装置付の位相差顕微鏡(日本光学)によって形態観察を行なった。

8) Penicillin binding proteins (PBPs) に対する T-1982 の親和性

PBPs に対する T-1982 の親和性は SPRATT⁹⁾ の方法に従って調べた。*Escherichia coli* JE1011 の膜分画に84m mole の ¹⁴C-PCG (The Radio Chemical Centre: 51mCi/m mole) とモル比で0.2, 1, 5, 25, 125 倍の T-1982 を拮抗的に結合させ、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動で PBPs を分離した。フルオログラフィーによって X線フィルムに14日間乾燥ゲルを密着させ、PBPs に結合した ¹⁴C-PCG を検出した。T-1982 の添加で ¹⁴C-PCG と PBPs との結合が阻害される程度から、T-1982 の各 PBPs に対する親和性を比較した。

9) マウス実験的感染症に対する治療効果

マウスは SLC/ICR 系、雄、体重19 \pm 1g、1群5匹を用いた。感染菌は HIA 上で37 $^{\circ}\text{C}$ 1夜培養した後5% gastric mucin (半井化学) に懸濁し、腹腔内に接種した。薬剤は感染1時間後に1回背部皮下投与した。治療効果は7日後のマウス生存匹数から VAN DER WAERDEN 法により算出し、ED₅₀ 値 (mg/mouse) で示した。

II. 結果および考察

1) 抗菌スペクトラム

T-1982 の抗菌スペクトラムを既知セフェム系抗生剤の CMZ, LMOX, CFX, CEZ を対照薬剤として比較検討し、その結果を Table 1 に示した。T-1982 の抗菌力はグラム陽性菌に対して弱いが、グラム陰性菌に対して強い抗菌力を示し、特に *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *S. marcescens*, *Proteus*, *Enterobacter* に対し CMZ, CFX, CEZ より優れ LMOX と同程度であ

Table 1 Antibacterial spectrum of T-1982, CMZ, LMOX, CFX and CEZ ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	T-1982		CMZ		LMOX		CFX		CEZ	
	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	12.5	12.5	1.56	0.78	6.25	3.13	3.13	3.13	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Terashima	25	12.5	1.56	0.78	6.25	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	25	12.5	1.56	0.78	6.25	6.25	3.13	3.13	0.78	0.39
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IID 866	3.13	0.78	0.78	0.39	3.13	0.78	0.78	0.39	0.2	≤ 0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	3.13	1.56	0.78	0.78	3.13	1.56	1.56	0.78	0.2	0.2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> D-163	1.56	0.78	0.39	0.39	1.56	0.78	0.78	0.78	≤ 0.1	≤ 0.1
<i>Streptococcus faecalis</i> D-117	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25	50
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6.25	3.13	0.78	0.78	3.13	3.13	0.78	0.39	0.2	0.2
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	1.56	3.13	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.39	0.2	1.56	1.56	0.39	0.39	12.5	6.25	6.25	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IID 875	0.78	0.39	6.25	6.25	1.56	0.78	50	25	6.25	1.56
<i>Salmonella typhosa</i> IID 611	≤ 0.1	≤ 0.1	0.78	0.78	0.2	0.2	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> IID 605	0.2	0.2	0.78	0.78	≤ 0.1	≤ 0.1	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>Salmonella schottmuelleri</i> IID 607	≤ 0.1	≤ 0.1	0.39	0.39	≤ 0.1	≤ 0.1	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i> IID 604	0.39	0.2	0.78	0.39	0.2	0.2	0.78	1.56	1.56	0.78
<i>Shigella flexneri</i> IID 642	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	0.39	0.39	3.13	3.13	1.56	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW28	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	0.2	0.2	6.25	3.13	1.56	1.56
<i>Serratia marcescens</i> IID 620	0.2	≤ 0.1	6.25	1.56	0.2	0.2	12.5	12.5	>200	>200
<i>Proteus morgani</i> IID 602	1.56	0.78	12.5	6.25	0.2	0.2	12.5	12.5	>200	>200
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	25	12.5	>200	>200	12.5	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>Enterobacter aerogenes</i> IID 972	0.39	0.2	200	200	0.2	0.2	>200	>200	>200	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1001	>200	>200	>200	>200	100	50	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1002	>200	200	>200	>200	12.5	12.5	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	100	50	>200	>200	6.25	3.13	>200	>200	>200	>200

Inoculum size : One loopful of bacterial suspension (10^6 and 10^8 cells/ml)
 : Heart infusion agar (HIA : Eiken)
 Medium
 (*HIA supplemented with 10% sheep blood)

Fig. 2 Antibacterial activity against *Staphylococcus* sp. (25 strains)

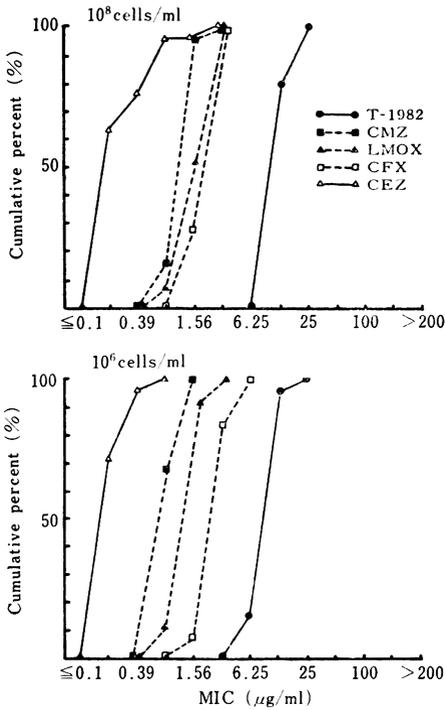


Fig. 3 Antibacterial activity against *E. coli* (25 strains)

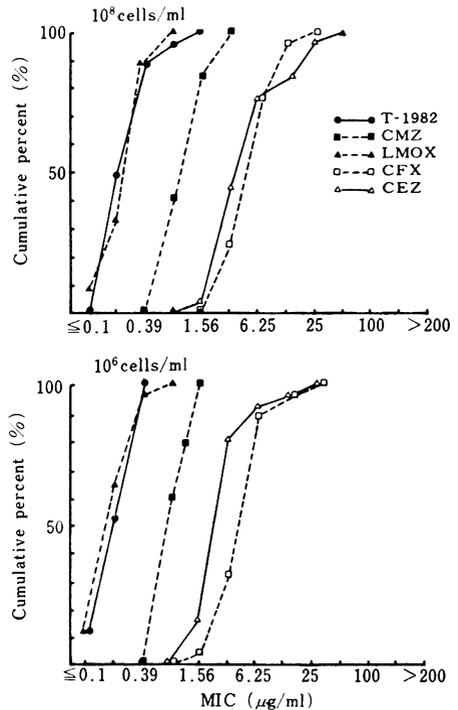


Fig. 4 Antibacterial activity against *K. pneumoniae* (15 strains)

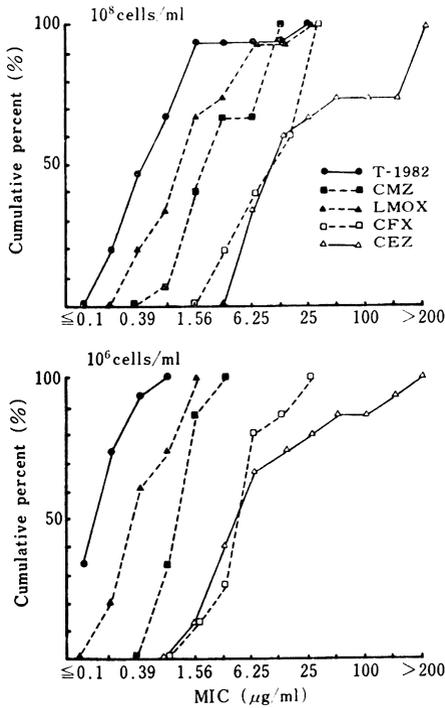


Fig. 5 Antibacterial activity against *S. marcescens* (20 strains)

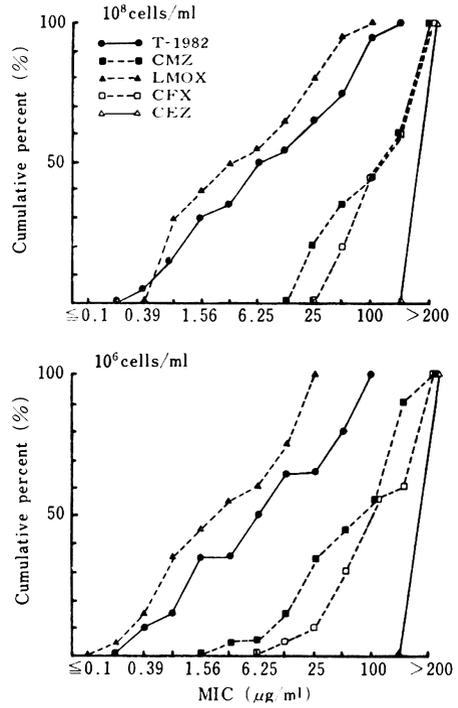


Fig. 6 Antibacterial activity against *P. mirabilis* (25 strains)

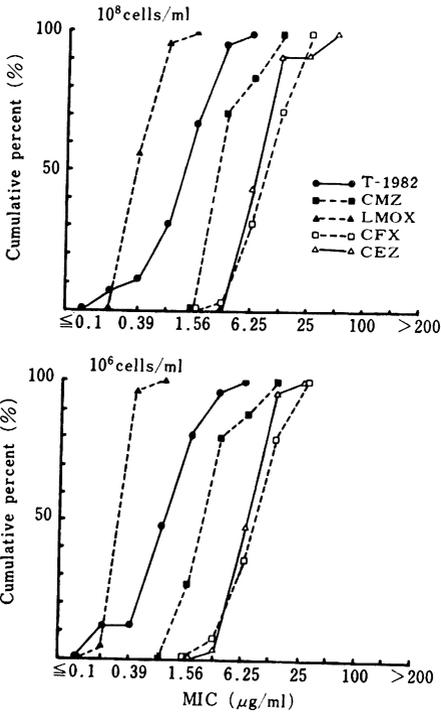


Fig. 7 Antibacterial activity against *P. vulgaris* (20 strains)

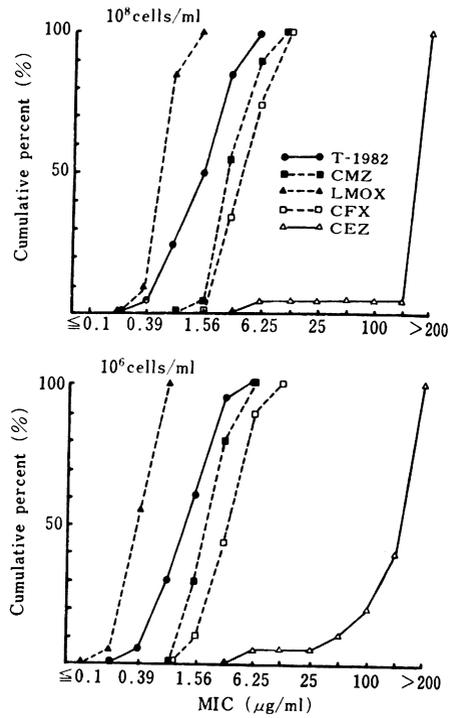


Fig. 8 Antibacterial activity against *P. rettgeri* (25 strains)

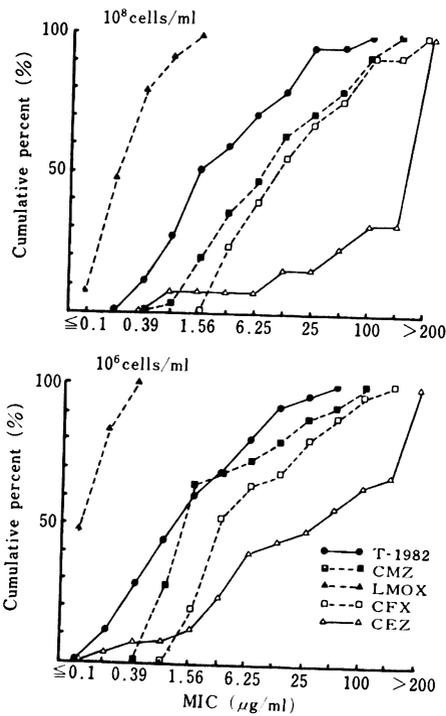


Fig. 9 Antibacterial activity against *P. morganii* (25 strains)

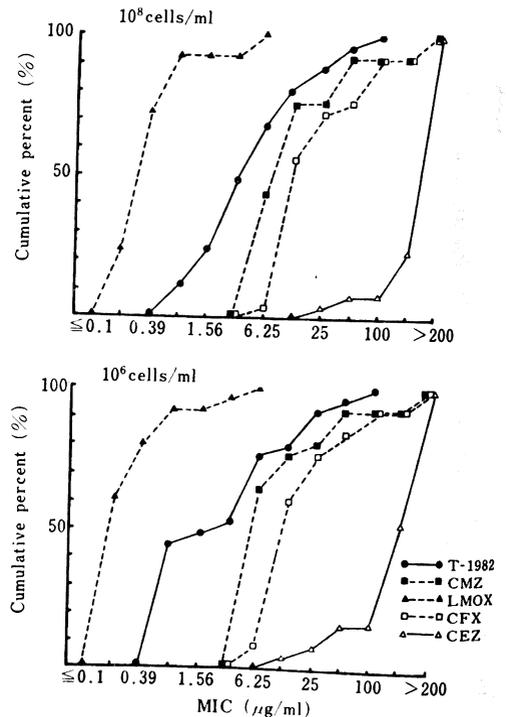
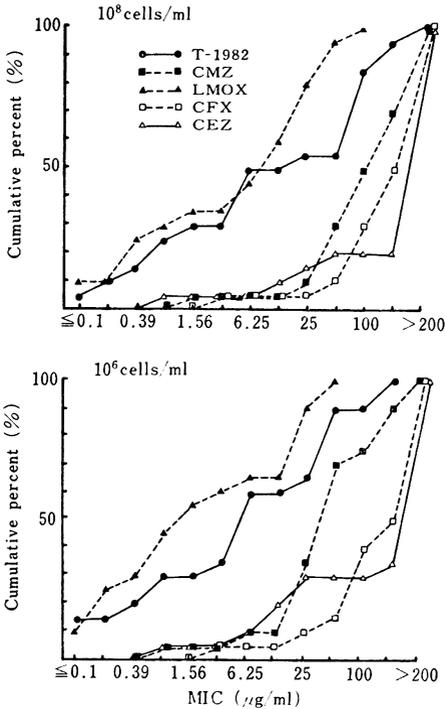
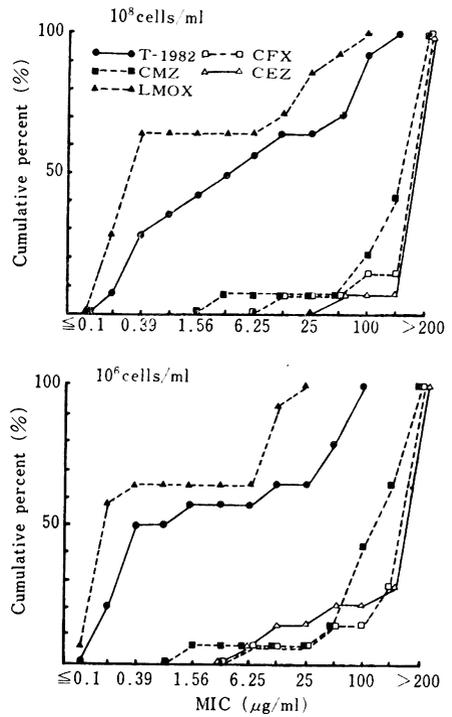


Fig. 10 Antibacterial activity against *C. freundii* (20 strains)Fig. 11 Antibacterial activity against *Enterobacter* sp. (14 strains)

った。*Streptococcus faecalis* および *P. aeruginosa* に対して、T-1982 は CMZ および CFX と同様ほとんど感受性を示さなかった。

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*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *H. influenzae* および *B. fragilis* に対する T-1982 の抗菌力を接種菌量 10⁸ cells/ml と 10⁶ cells/ml で検討し、CMZ, LMOX, CFX および CEZ と比較してその結果を Fig. 2~13 に示した。

(1) *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus sp. 25株に対する抗菌力は、Fig. 2 に示すように対照薬剤に比較して弱かったが接種菌量の影響はあまり認められず 25 μg/ml 以下で100%阻止した。

(2) *E. coli*

E. coli 25株に対する抗菌力を Fig. 3 に示した。

10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml のいずれにおいても T-1982 は CMZ, CFX, CEZ より優れ、LMOX と同程度であった。10⁸ cells/ml では 1.56 μg/ml, 10⁶ cells/ml では 0.39 μg/ml で100%阻止した。

(3) *K. pneumoniae*

K. pneumoniae 15株に対する抗菌力を Fig. 4 に示した。

T-1982 は 10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml のいずれにおいても最も優れた抗菌力を示した。10⁸ cells/ml においてその MIC 値は ≤0.1 ~ 0.78 μg/ml に分布し、LMOX および CMZ より1~2管優れていた。また接種菌量による影響がやや見受けられた。

(4) *S. marcescens*

S. marcescens 20株に対する抗菌力を Fig. 5 に示した。

T-1982 は 10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml のいずれにおいても CMZ, CFX および CEZ よりはるかに優れていたが、LMOX より一管ほど劣っていた。その MIC 値分布は 10⁸ cells/ml で 0.39 ~ 200 μg/ml, 10⁶ cells/ml で 0.39 ~ 100 μg/ml と広く分布し、50% 阻止濃度は両接種菌量ともに 6.25 μg/ml を示した。

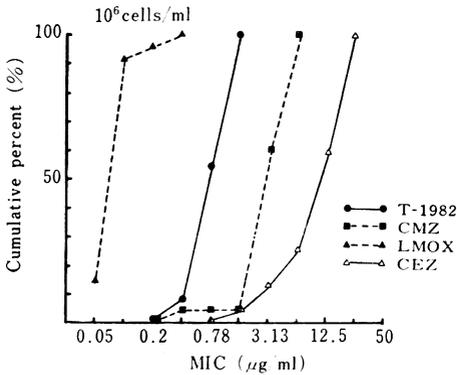
(5) *P. mirabilis*

P. mirabilis 25株に対する抗菌力を Fig. 6 に示した。

T-1982は 10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml のいずれにおいても CMZ, CFX および CEZ より優れていたが、LMOX より1~2管劣っていた。しかし T-1982 は両接種菌量においても 6.25 μg/ml で100%阻止し接種菌量の影響を受けなかった。

(6) Indole positive *Proteus* sp.

Fig. 12 Antibacterial activity against *H. influenzae* (24 strains)



P. vulgaris 20株, *P. rettgeri* 25株, *P. morganii* 25株の indole positive *Proteus* 70株に対する抗菌力を Fig. 7~9 に示した。

いずれの菌種においても LMOX が最も優れた抗菌力を示し、次いで T-1982, CMZ, CFX, CEZ の順であった。T-1982 はいずれの菌種においても接種菌量の影響は受けにくく、 10^6 cells/ml における 50% 阻止濃度は *P. rettgeri* で $0.78 \mu\text{g/ml}$, *P. vulgaris* で $1.56 \mu\text{g/ml}$ および *P. morganii* で $1.56 \mu\text{g/ml}$ と低値を示した。

(7) *C. freundii*

C. freundii 20株に対する抗菌力を Fig. 10 に示した。 10^6 cells/ml において T-1982 の MIC 値は $\leq 0.1 \sim > 200 \mu\text{g/ml}$ に広く分布し、LMOX と比較して $6.25 \mu\text{g/ml}$ までは同等であるがそれ以上の濃度では 1 管ほど劣っていた。T-1982 および LMOX の 50% 阻止濃度はともに $6.25 \mu\text{g/ml}$ で CMZ, CFX および CEZ より優れていた。

10^6 cells/ml では 10^8 cells/ml と同様に T-1982 の MIC 値は $\leq 0.1 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ と広く分布し、LMOX より 1 管ほど劣ったが他の薬剤より優れていた。

(8) *Enterobacter* sp.

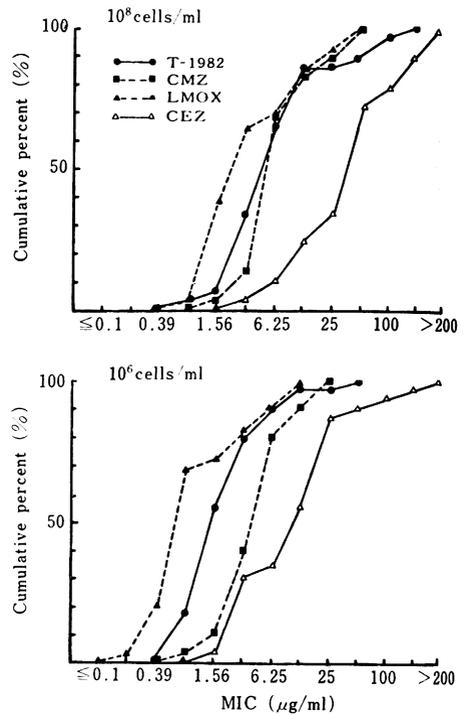
Enterobacter sp. 14株に対する抗菌力を Fig. 11 に示した。

C. freundii と同様、T-1982 の MIC 値は両接種菌量ともに、 $0.2 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ に広く分布した。しかし T-1982 は 50% 阻止濃度が 10^8 cells/ml で $3.13 \mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml で $0.39 \mu\text{g/ml}$ と低値を示し、CMZ, CFX および CEZ よりはるかに優れ LMOX に次ぐ抗菌力を示した。

(9) *H. influenzae*

H. influenzae 24株に対する抗菌力を Fig. 12 に示した。

Fig. 13 Antibacterial activity against *Bacteroides fragilis* (29 strains)



累積百分率は 10^6 cells/ml のみを示したが LMOX, T-1982, CMZ, CEZ の順に優れた結果を示し、T-1982 は $1.56 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で 100% 阻止し優れた抗菌力を有していた。

(10) *B. fragilis*

B. fragilis 29株に対する抗菌力を Fig. 13 に示した。

T-1982 は CMZ, CEZ より優れ、LMOX に次ぐ強い抗菌力を有していた。また T-1982 は 10^6 cells/ml 接種において 50% 阻止濃度が $1.56 \mu\text{g/ml}$ と低値を示したことより好気性菌のみならず嫌気性菌に対しても期待される抗生剤と思われる。

3) 殺菌作用

T-1982 の殺菌作用について、MIC と MBC の関係および菌の増殖に及ぼす影響について検討した。

(1) MIC と MBC の関係

標準株として *S. aureus* FDA 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* IID 620 の 3 株と、臨床分離株として、*E. coli* TK-16, *K. pneumoniae* Y-50 および *P. vulgaris* GN 3027 の 3 株を用い、接種菌量 10^6 cells/ml および 10^4 cells/ml で各薬剤の MIC および MBC を比較し、その結果を Table 2 に示した。T-1982 は他の薬剤と同様 MIC と MBC がよく一致し、殺菌的に作用した。しか

Table 2 Correlation between MICs and MBCs of T-1982 (MBC/MIC)

Organism	Inoculum size (cells/ml)	T-1982	CMZ	LMOX	CFX	CEZ
<i>S. aureus</i> FDA 209P	1.0×10^4	25/12.5	1.56/1.56	12.5/12.5	3.13/3.13	0.39/0.2
	1.0×10^6	>100/12.5	>200/6.25	>100/12.5	>200/3.13	100/0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.8×10^4	0.39/0.39	1.56/1.56	0.78/0.78	12.5/12.5	1.56/1.56
	1.8×10^6	0.39/0.39	6.25/3.13	0.78/0.78	25/25	3.13/3.13
<i>E. coli</i> TK-16	5.4×10^4	0.2/0.1	0.39/0.39	0.2/0.2	3.13/3.13	1.56/1.56
	5.4×10^6	0.2/0.1	0.78/0.78	0.2/0.2	6.25/6.25	6.25/3.13
<i>K. pneumoniae</i> Y-50	1.04×10^4	$\leq 0.1/\leq 0.1$	0.78/0.78	0.2/0.2	1.56/1.56	1.56/1.56
	1.04×10^6	$\leq 0.1/\leq 0.1$	0.78/0.78	1.56/0.78	3.13/3.13	3.13/3.13
<i>S. marcescens</i> IID 620	1.24×10^4	$\leq 0.1/\leq 0.1$	1.56/1.56	0.2/0.2	12.5/6.25	>200/200
	1.24×10^6	0.39/ ≤ 0.1	12.5/6.25	0.39/0.39	50/25	>200/>200
<i>P. vulgaris</i> GN 3027	1.08×10^4	$\leq 0.1/\leq 0.1$	0.78/0.78	$\leq 0.1/\leq 0.1$	1.56/1.56	100/50
	1.08×10^6	0.2/0.2	1.56/1.56	0.78/0.2	3.13/3.13	>200/>200

Fig. 14 Bactericidal effect against *E. coli* NIHJ JC-2

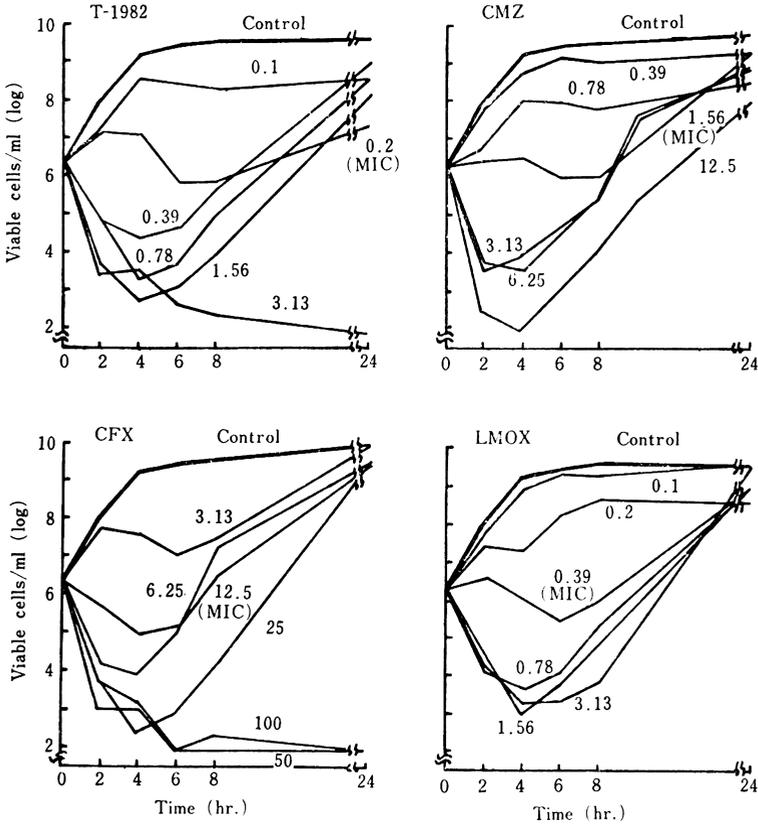
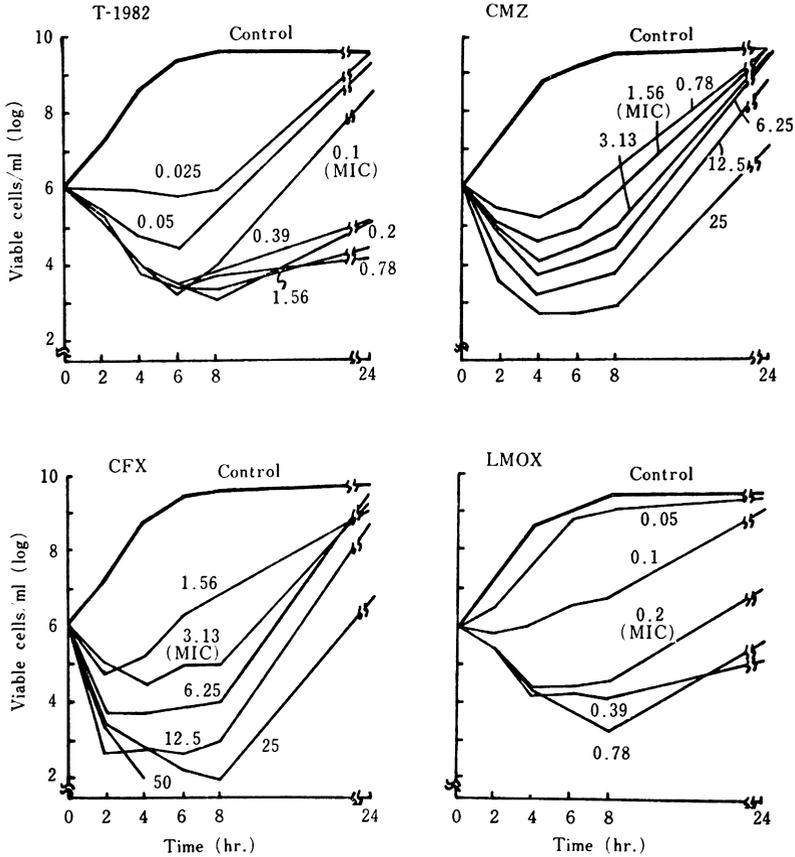


Fig. 15 Bactericidal effect against *S. marcescens* IID 620

し *S. aureus* FDA 209 P においてのみ 10^6 cells/ml で MIC $12.5 \mu\text{g/ml}$ に対し MBC が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上と大きな差を示したが、この傾向は他剤においても同様に認められた。

(2) 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli NIHJ JC-2 および *S. marcescens* IID 620 の対数増殖期途中の菌に薬剤を作用させ、その後の生菌数の変化を 24 時間まで観察しその結果を Fig. 14 および Fig. 15 に示した。

E. coli NIHJ JC-2 に対して $3.13 \mu\text{g/ml}$ で T-1982 は殺菌的に作用したが、CMZ, CFX および LMOX は菌の再増殖が認められた。また、*S. marcescens* IID 620 に対して T-1982 は低濃度で殺菌的に作用し、LMOX と類似したパターンを示したが、CMZ, CFX の両剤は高濃度においても 24 時間内に菌の再増殖が認められた。

4) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

T-1982 の抗菌力に及ぼす培地の種類、培地 pH、ヒト血清添加および接種菌量の影響について、CMZ, CFX

を対照として検討した。

培地の影響については Table 3 に示す通り、T-1982 は各種菌株において全く影響を受けなかった。一方、CMZ, CFX は *E. coli* NIHJ, *S. marcescens* IID 620 において若干の MIC の変動が認められた。

pH の影響については Table 4 に示す通り、T-1982 は各種菌株において全く pH の影響を受けなかったが CMZ は *S. aureus* FDA 209P と *K. pneumoniae* Y-4 で CFX は *S. aureus* FDA 209P と *E. coli* TK-16 でわずかに影響を受けたが有意の差はなかった。

ヒト血清添加の影響については Table 5 に示す通り、T-1982 は *E. coli* NIHJ と *S. marcescens* IID 620 において 1 管以内の抗菌力の低下が認められた。一方、CMZ, CFX についても *S. aureus* FDA 209P と *E. coli* NIHJ において抗菌力の低下がわずかに認められた。

接種菌量の影響については Table 6 に示す通り、いずれの薬剤においても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。

Table 3 Effect of various medium on antibacterial activity of T-1982

Drug	Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>S. aureus</i> FDA209P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>K. pneumoniae</i> Y-4	<i>S. marcescens</i> IID 620
T-1982	HIA	12.5	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	BHIA	12.5	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	NA	12.5	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	TSA	12.5	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	MHA	12.5	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
CMZ	HIA	0.78	0.78	1.56	1.56
	BHIA	0.78	0.39	1.56	1.56
	NA	0.78	0.78	1.56	1.56
	TSA	0.78	0.39	1.56	1.56
	MHA	0.78	0.78	1.56	1.56
CFX	HIA	3.13	1.56	6.25	6.25
	BHIA	3.13	1.56	6.25	12.5
	NA	3.13	1.56	6.25	6.25
	TSA	3.13	1.56	6.25	6.25
	MHA	3.13	1.56	6.25	3.13

Inoculum size : One loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

Medium : HIA ; Heart infusion agar (Eiken)
 BHIA ; Brain heart infusion agar (Eiken)
 NA ; Nutrient agar (Eiken)
 TSA ; Trypto-soy agar (Eiken)
 MHA ; Mueller-Hinton agar (Eiken)

Table 4 Effect of medium pH on antibacterial activity of T-1982

Drug	pH	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>E. coli</i> TK-16	<i>K. pneumoniae</i> Y-41	<i>K. pneumoniae</i> Y-4	<i>S. marcescens</i> IID 620
T-1982	6.0	12.5	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	7.0	12.5	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
	8.0	12.5	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1
CMZ	6.0	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56
	7.0	1.56	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56
	8.0	1.56	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
CFX	6.0	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25
	7.0	3.13	1.56	1.56	3.13	6.25	6.25
	8.0	3.13	1.56	1.56	3.13	6.25	6.25

Inoculum size : One loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

Medium : Heart infusion agar (Eiken)

Table 5 Effect of human serum on antibacterial activity of T-1982

Human serum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
	T-1982			CMZ			CFX		
	<i>S. aureus</i> FDA209P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. marcescens</i> IID 620	<i>S. aureus</i> FDA209P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. marcescens</i> IID 620	<i>S. aureus</i> FDA209P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. marcescens</i> IID 620
0%	12.5	0.05	0.05	0.78	0.39	1.56	1.56	0.78	3.13
10	12.5	0.05	0.1	0.78	0.39	1.56	1.56	0.78	3.13
25	12.5	0.05	0.1	1.56	0.78	1.56	1.56	0.78	3.13
50	12.5	0.1	0.1	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56	3.13

Inoculum size : *S. aureus* FDA 209P (5.0×10^4 cells/ml)

E. coli NIHJ (7.5×10^4 cells/ml)

S. marcescens IID 620 (5.5×10^4 cells/ml)

Medium : Heart infusion broth (Eiken)

Table 6 Effect of inoculum size on antibacterial activity of T-1982

Organism	Initial size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
		T-1982			CMZ			CFX		
		$\times 10^0$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^0$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^0$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-4}$
<i>S. aureus</i> FDA 209P	1.2×10^8	12.5	12.5	12.5	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13	1.56
<i>E. coli</i> NIHJ	6.1×10^8	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	1.56
<i>E. coli</i> TK-16	5.2×10^8	0.2	≤ 0.1	≤ 0.1	0.78	0.78	0.78	3.13	1.56	1.56
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	5.0×10^8	0.2	≤ 0.1	≤ 0.1	1.56	0.78	0.78	6.25	3.13	3.13
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	5.6×10^8	0.39	0.39	0.2	3.13	3.13	1.56	12.5	6.25	6.25
<i>S. marcescens</i> IID 620	4.3×10^8	0.2	≤ 0.1	≤ 0.1	6.25	1.56	0.78	12.5	3.13	3.13

Inoculum size : One loopful of bacterial suspension Medium : Heart infusion agar (Eiken)

Table 7 Stability against β -lactamase

Enzyme source		Substrate						
		CER	PCG	T-1982	CMZ	LMOX	CFX	CEZ
Cephalosporinase	<i>E. coli</i> GN 5482	100*(90)**	22	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	130
	<i>C. freundii</i> GN 346	100 (2,900)	15	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	150
	<i>S. marcescens</i> W-8	100 (2,200)	21	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	94
	<i>P. vulgaris</i> GN 76	100 (300)	9	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	440
Penicillinase	<i>E. coli</i> TK-3	115	100(330)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	21
	<i>K. pneumoniae</i> Y-4	41	100(230)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	4
	<i>P. aeruginosa</i> GN 3379	18	100(100)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	2

Method : Iodometric assay *Hydrolysis of each substrate by PCase and CSase is expressed as relative rate of hydrolysis taking the absolute rate of PCG and CER hydrolysis as 100, respectively

**Specific activity ; Units per mg protein

Table 8 Antibacterial activity against β -lactamase producing strains

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	T-1982	CMZ	LMOX	CFX	CEZ
<i>E. coli</i> TK-3	≤ 0.1 0.2	1.56 3.13	0.39 0.39	3.13 3.13	25 >200
<i>E. coli</i> GN 5482	6.25 6.25	50 50	3.13 3.13	50 100	50 >200
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	0.2 0.78	0.78 6.25	0.39 0.39	6.25 12.5	12.5 50
<i>C. freundii</i> GN 346	50 100	>200 >200	12.5 12.5	>200 >200	>200 >200
<i>S. marcescens</i> W-8	50 100	>200 >200	25 25	100 200	>200 >200
<i>P. vulgaris</i> GN 76	1.56 3.13	3.13 6.25	0.39 0.78	6.25 6.25	>200 >200
<i>P. aeruginosa</i> GN 3379	>200 >200	>200 >200	50 50	>200 >200	>200 >200

Inoculum size : upper ; One loopful of 10^6 cells/ml
lower ; One loopful of 10^8 cells/ml

Fig. 16 Morphological changes at various concentrations of T-1982

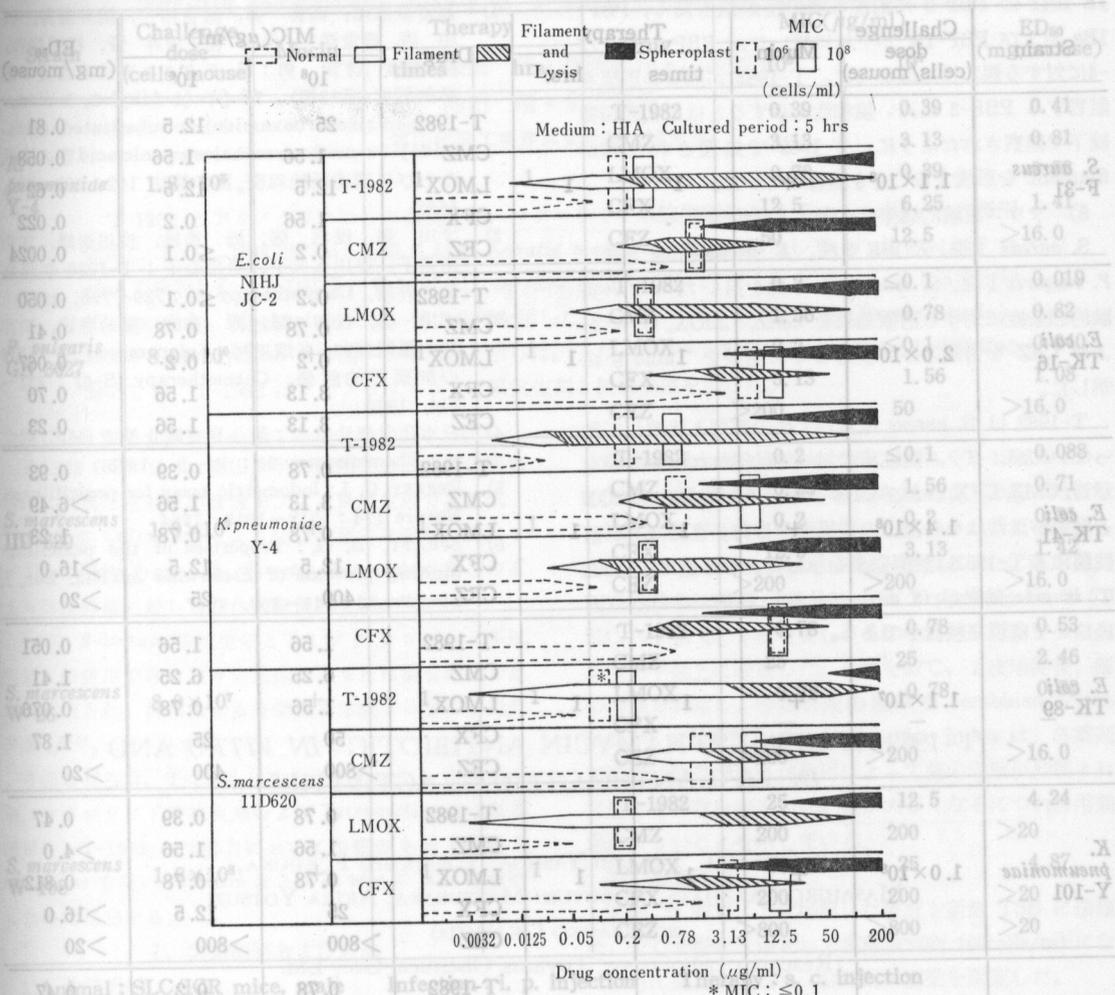


Fig. 17 Affinity of T-1982 to *E. coli* JE 1011 PBP's

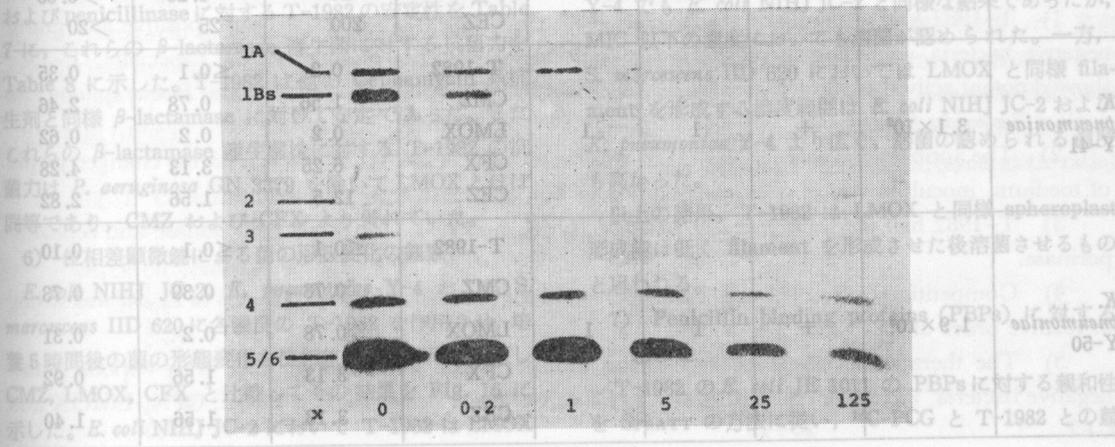


Table 9 *In vivo* antibacterial activity of T-1982 against systemic infections

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Therapy		Drug	MIC($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
			times	hrs.		10 ⁸	10 ⁶	
<i>S. aureus</i> F-31	1.1 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	25	12.5	0.81
					CMZ	1.56	1.56	0.058
					LMOX	12.5	12.5	0.62
					CFX	1.56	0.2	0.022
					CEZ	0.2	\leq 0.1	0.0024
<i>E. coli</i> TK-16	2.0 \times 10 ⁷	-	1	1	T-1982	0.2	\leq 0.1	0.050
					CMZ	0.78	0.78	0.41
					LMOX	0.2	0.2	0.067
					CFX	3.13	1.56	0.70
					CEZ	3.13	1.56	0.23
<i>E. coli</i> TK-41	1.4 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	0.78	0.39	0.93
					CMZ	3.13	1.56	>6.49
					LMOX	0.78	0.78	1.23
					CFX	12.5	12.5	>16.0
					CEZ	400	25	>20
<i>E. coli</i> TK-89	1.1 \times 10 ⁷	+	1	1	T-1982	1.56	1.56	0.051
					CMZ	6.25	6.25	1.41
					LMOX	1.56	0.78	0.076
					CFX	50	25	1.87
					CEZ	>800	400	>20
<i>K. pneumoniae</i> Y-101	1.0 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	0.78	0.39	0.47
					CMZ	1.56	1.56	>4.0
					LMOX	0.78	0.78	0.812
					CFX	25	12.5	>16.0
					CEZ	>800	>800	>20
<i>K. pneumoniae</i> Y-114	1.2 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	0.78	0.2	0.47
					CMZ	3.13	1.56	3.73
					LMOX	1.56	0.39	1.23
					CFX	25	6.25	>5.65
					CEZ	200	25	>20
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	3.1 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	0.2	\leq 0.1	0.35
					CMZ	1.56	0.78	2.46
					LMOX	0.2	0.2	0.62
					CFX	6.25	3.13	4.28
					CEZ	12.5	1.56	2.82
<i>K. pneumoniae</i> Y-50	1.9 \times 10 ⁸	+	1	1	T-1982	\leq 0.1	\leq 0.1	0.10
					CMZ	0.78	0.39	0.73
					LMOX	0.78	0.2	0.31
					CFX	3.13	1.56	0.92
					CEZ	3.13	1.56	1.40

Table 9 (Continued)

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Therapy		Drug	MIC($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
			times	hrs.		10 ⁸	10 ⁶	
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	1.8 × 10 ⁸	+	1	1	T-1982	0.39	0.39	0.41
					CMZ	3.13	3.13	0.81
					LMOX	0.78	0.39	0.53
					CFX	12.5	6.25	1.41
					CEZ	50	12.5	>16.0
<i>P. vulgaris</i> GN 3027	8.0 × 10 ⁶	+	1	1	T-1982	0.2	≤0.1	0.019
					CMZ	1.56	0.78	0.82
					LMOX	0.2	≤0.1	0.040
					CFX	3.13	1.56	1.08
					CEZ	>200	50	>16.0
<i>S. marcescens</i> IID 620	1.0 × 10 ⁷	+	1	1	T-1982	0.2	≤0.1	0.088
					CMZ	6.25	1.56	0.71
					LMOX	0.2	0.2	0.31
					CFX	12.5	3.13	1.42
					CEZ	>200	>200	>16.0
<i>S. marcescens</i> W-26	8.0 × 10 ⁷	+	1	1	T-1982	0.78	0.78	0.53
					CMZ	25	25	2.46
					LMOX	0.78	0.78	0.53
					CFX	—	—	—
					CEZ	>200	>200	>16.0
<i>S. marcescens</i> W-108	1.2 × 10 ⁸	+	1	1	T-1982	25	12.5	4.24
					CMZ	200	200	>20
					LMOX	50	25	4.87
					CFX	200	200	>20
					CEZ	>800	>800	>20

Animal : SLC/ICR mice, male Infection : i. p. injection Therapy : s. c. injection

5) β -lactamase に対する安定性

臨床分離菌7株の菌体から得られた cephalosporinase および penicillinase に対する T-1982 の安定性を Table 7 に、これらの β -lactamase 産生菌に対する抗菌力を Table 8 に示した。T-1982 は他の Cepharmycin 系抗生剤と同様 β -lactamase に対して安定であった。またこれらの β -lactamase 産生菌株に対する T-1982 の抗菌力は *P. aeruginosa* GN 3379 を除いて LMOX とほぼ同等であり、CMZ および CFX より優れていた。

6) 位相差顕微鏡による菌の形態変化の観察

E. coli NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* Y-4 および *S. marcescens* IID 620 に各濃度の T-1982 を作用させ、培養5時間後の菌の形態変化を位相差顕微鏡下に観察し CMZ, LMOX, CFX と比較してその結果を Fig. 16 に示した。*E. coli* NIHJ JC-2 において T-1982 は LMOX

と同様広い濃度範囲で filament を形成したが、MIC 以上では filament を形成した後溶菌した。*K. pneumoniae* Y-4 でも *E. coli* NIHJ JC-2 と同様な結果であったが、MIC 以下の濃度においても溶菌が認められた。一方、*S. marcescens* IID 620 においては LMOX と同様 filament を形成する濃度範囲は *E. coli* NIHJ JC-2 および *K. pneumoniae* Y-4 より広く、溶菌の認められる濃度も高かった。

以上の結果、T-1982 は LMOX と同様 spheroplast 形成能は低く filament を形成させた後溶菌させるものと思われる。

7) Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性

T-1982 の *E. coli* JE 1011 の PBPs に対する親和性を SPRATT の方法に従い、¹⁴C-PCG と T-1982 との競

合によって調べ、その結果を Fig. 17 に示した。E. coli JE 1011 の PBP-3 に対する親和性が最も高く、PBP-1Bs および PBP-1A がそれに続いたが PBP-2 および -4 に対する親和性は低かった。T-1982 が隔壁の形成を阻害する PBP-3 に高い親和性を示すことは位相差顕微鏡下で観察されたように、T-1982 で処理された菌が filament を形成することを裏付けていた。

8) マウス実験的感染症に対する治療効果

S. aureus 1株, E. coli 3株, K. pneumoniae 5株, P. vulgaris 1株, S. marcescens 3株を用いたマウス実験的感染症に対する治療効果を CMZ, LMOX, CFX および CEZ を対照として検討しその結果を Table 9 に示した。

T-1982 は S. aureus に対して他の薬剤と比較して劣っていたが、グラム陰性菌に対しては優れた治療効果を示し、CMZ, CFX および CEZ よりはるかに優れ LMOX と同等かまたはそれ以上の効果を示した。また CEZ 耐性菌にも T-1982 は治療効果を示した。この様に T-1982 の in vivo 効果が in vitro に比較して優れている原因については現在検討中である。

文 献

- 1) 高野俊太郎, 高倉 勇, 落合裕一, 桃井海秀, 田中 清, 藤堂洋三, 保田 隆, 田井 賢, 福岡義和, 滝 秀雄, 才川 勇: β -ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第13報)。7 β -[α -(4-Alkyl-2, 3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)- α -substituted acetamido]-7 α -methoxycephalosporanic acid 類の合成ならびに構造活性相関。薬学雑誌 102: 629~645, 1982
- 2) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 加須屋興子, 安川久美子, 金川心子: T-1220 の細菌学的評価。Chemotherapy 25: 789~796, 1977
- 3) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 田井賢, 福岡義和, 高畑正裕: Cefoperazone (T-1551) の細菌学的評価。Chemotherapy (S-6): 131~144, 1980
- 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) FERRET, C. J.: Iodometric assay for penicillinase. Nature 174: 1012~1013, 1954
- 6) SPRATT, B. G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. 72: 341~352, 1977

T-1982, A NEW CEPHAMYCIN ANTIBIOTIC: *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, YOSHIKAZU FUKUOKA,
MASAHIRO TAKAHATA, NOBUYUKI MATSUBARA, AKIRA YOTSUZI
and NAOKO OKAMOTO

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-1982 were compared with those of cefmetazole (CMZ), latamoxef (LMOX), cefoxitin (CFX) and cefazolin (CEZ). The following results were obtained.

1) T-1982 had a broad spectrum with a high degree of activity against gram-positive and gram-negative bacteria, including those which are resistant to the other cephalosporins. Especially, T-1982 showed potent activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Proteus* sp. and also against *Bacteroides fragilis*.

2) The antibacterial activity of T-1982 was bactericidal at the MIC, and was hardly changed by pH of medium, inoculum size of cells and addition of human serum into the medium.

3) T-1982 had the same stability as CMZ, CFX and LMOX against penicillinase and cephalosporinase.

4) Competition of T-1982 with benzylpenicillin for penicillin-binding proteins of *E. coli* was strong in relative order of PBP-3 > 1A > 1Bs.

5) The therapeutic effects of T-1982 on intraperitoneal infections in mice with various gram-negative bacteria, including resistant strains to CEZ, were superior to those of CMZ, CFX, LMOX and CEZ.