

## 新しく開発されたセファマイシン系抗生物質 T-1982 に関する細菌学的評価

西野武志・大槻雅子・千田尚人・内藤睦子

南場 勲・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

新しく開発されたセファマイシン系抗生物質 T-1982 に関する細菌学的評価を既知抗生物質と比較検討し、以下の結果を得た。

T-1982 の抗菌スペクトラムは比較薬として用いた Cefmetazole, Cefotetan と同様、グラム陽性菌、陰性菌に幅広く分布し、その抗菌力は Cefotetan とほぼ同等であった。また *Bacteroides fragilis* に対しても抗菌力を示したが *Pseudomonas aeruginosa* には抗菌力を示さなかった。T-1982 は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* に対して作用濃度に応じた殺菌作用を示した。しかし MIC と 3 時間 MLC の間には大きな差が認められた。マウス実験的感染症に対する T-1982 の治療効果は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* で Cefotetan と同等かそれ以上であったが、*Proteus morganii* に対しては Cefmetazole よりも劣っていた。T-1982 を *Escherichia coli* に作用させた時の形態変化を観察したところ、菌体は著しく伸長化した。*Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* のペニシリン結合蛋白質に対する親和性について検討を行なったところ、T-1982 は PBP 3 に対して強い親和性を示した。

T-1982 は新しく開発されたセファマイシン系抗生物質で Fig. 1 に示す構造式を有している。化学名は Sodium 7β-[(2R,3S)-2-(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)-3-hydroxybutanamido]-7α-methoxy-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl) thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylate 分子式  $C_{22}H_{28}N_9NaO_9S_2$ 、分子量 649.6 の白色粉末である。

本薬はグラム陽性菌、陰性菌に対し広範囲の抗菌力を示し、β-lactamase に対して安定であると報告されている<sup>1)</sup>。

今回、われわれは Cefmetazole<sup>2)</sup>, Cefotetan<sup>3)</sup> を比較薬として T-1982 の細菌学的評価を検討した。

### I. 実験材料および実験方法

#### 1) 使用菌株および使用薬

教室保存の標準株と臨床分離株を用いた。T-1982, Cefmetazole (CMZ), Cefotetan (CTT) はいずれも力

価の明らかな標品を用いた。

#### 2) 感受性測定法

前培養には sensitivity test broth (栄研)、測定用培地には sensitivity test agar (栄研) を用いる日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂法<sup>4)</sup> に従って行なった。なお *Streptococcus* 属, *Corynebacterium diphtheriae* には 10% 馬脱繊維血液を添加した同培地を用いて測定した。*Bacteroides fragilis* には GAM agar (ニッスイ) を用い、嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法<sup>5)</sup> に従って測定した。*Clostridium* 属には thioglycolate medium (ニッスイ), *Neisseria* 属には 1% の割合にサブプリメントを加えた *Gonococcus medium* (栄研) を用い、37°C, 48 時間培養後の MIC を求めた。ただし、*Neisseria* 属の培養にはローソク培養法を用いた。

#### 3) 抗菌作用に及ぼす諸因子の影響

##### (a) 馬血清添加の影響

Sensitivity test broth 中の馬血清量を 0, 10, 25, 50% の割合とした場合の MIC を液体希釈法により測定した。

##### (b) 接種菌量の影響

種々の割合に調製した菌液を用いて MIC を測定した。また heart infusion broth (ニッスイ) 中で増殖させた対数期の菌数の異なる時点で 5 MIC に相当する濃度の薬を作用させ、生菌数を測定することにより、接種

Fig. 1 Chemical structure of T-1982

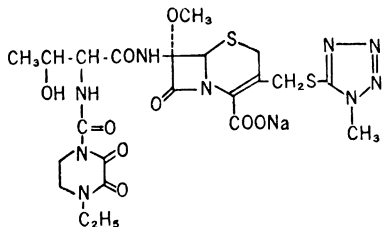


Table 1 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Gram-positive bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC-1	12.5	0.78	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	12.5	0.78	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	12.5	0.78	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	12.5	0.78	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	12.5	0.78	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80(PCr)	12.5	1.56	6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	1.56	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	1.56	0.39	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK	3.13	0.78	3.13
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	50	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	50	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	1.56	0.39	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	1.56	0.39	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	1.56	0.39	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	1.56	0.39	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.56	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	100	1.56	12.5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6.25	0.78	6.25

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

菌量と殺菌効果との関係を検討した。

#### 4) 殺菌作用

Heart infusion broth で増殖させた対数期の菌に種々の濃度の薬を作用させ、4時間までの生菌数を測定した。

#### 5) MIC と MLC

最小発育阻止濃度測定用平板から経時的に薬剤無添加の平板にレプリカを行ない、3, 6, 20時間に接種時の菌が99.9%殺菌されるに要する濃度を求めた。

#### 6) マウス実験的感染症に対する治療効果

ddY 系雄性マウス (体重  $18 \pm 1\text{g}$ ) 1群10匹を用い、6% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik A/S) と等量混合した菌液の 0.5 ml をマウス腹腔内に接種した。接種2時間後に1回皮下投与を行ない、7日目のマウスの生存率から LITCHFIELD WILCOXON法<sup>6)</sup>により ED<sub>50</sub> (mg/mouse) およびその95%信頼限界値を算出し、治療効果を求めた。

#### 7) 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬を含ませたフィルム寒天培地を作製する。一方、対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天培地にかぶせ、パラフィンで封入する。この標本を倒立位相差顕微鏡 (Nikon) で観察した。

Table 2 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Gram-negative bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.05	0.78	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.05	0.20	0.20
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.20	1.56	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.20	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.05	0.78	0.20
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	12.5	50	25
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	0.20	0.05
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.05	0.39	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.10	0.20	0.05
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.20	0.39	0.10
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.20	0.39	0.05
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.20	0.78	0.39
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.10	0.78	0.20
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	0.78	0.20
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.10	0.39	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.05	0.78	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.10	0.78	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.78	>100	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.20	100	1.56
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.78	>100	100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.78	6.25	1.56
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.20	6.25	0.20
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.10	1.56	0.39
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.10	1.56	0.20
<i>Proteus morgani</i> KONO	3.13	6.25	3.13
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.05	6.25	0.10
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.78	50	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	100	>100	>100

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

#### 8) ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) への親和性

SPRATTの方法<sup>7)</sup>により *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* の膜画分を調製し、<sup>14</sup>C]-penicillin G [PCG] とのコンペティションによりおのおの PBPs への T-1982の親和性を検討した。T-1982は<sup>14</sup>C]PCGに対し、モル比で25から0.008までの5倍希釈で作用させた。またX線フィルム上の<sup>14</sup>C]PCGによる感光度を Dual-wavelength TLC scanners 90 (Shimazu Co.) で測定し、この値から50%阻害濃度を求めた。

#### 9) Ethylenediaminetetraacetic acid 併用時の抗菌力

$10^8$  cells/ml の *Escherichia coli* を含む heart infusion

Table 3 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Gram-positive bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC-1	6.25	0.39	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	6.25	0.39	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	12.5	0.78	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	3.13	0.78	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	6.25	0.78	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PCr)	6.25	0.78	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5	1.56	50
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	1.56	0.39	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	1.56	0.39	1.56
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	25	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	25	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	1.56	0.39	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	1.56	0.39	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	1.56	0.39	1.56
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.78	0.20	3.13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	0.20	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	100	0.78	6.25
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6.25	0.78	6.25

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

broth を用いて 1/2 MIC に相当する ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) を併用した場合としない場合の T-1982 の MIC を液体希釈法により測定した。

## II. 実験結果

### 1) 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌, グラム陰性菌に対する試験管内抗菌力を測定した結果を Table 1~6 に示した。Table 1, 2 は  $10^8$  cells/ml, Table 3, 4 は  $10^6$  cells/ml 接種時の成績を示している。Table 5, 6 は嫌気性菌に対する成績である。T-1982 は CMZ, CTT 同様嫌気性菌を含むグラム陽性菌, 陰性菌に広範囲に抗菌力を有していた。T-1982 の抗菌力は CTT とほぼ同等であり, グラム陽性菌では CMZ に若干劣る効果を示したが, グラム陰性菌に対しては CMZ より優れた効果を示した。*Bacteroides fragilis* には 3 薬とも同程度の効果を示したが, *Pseudomonas aeruginosa* には抗菌力を有していなかった。

### 2) 臨床分離株に対する感受性分布

臨床分離株に対する感受性分布と累積分布を  $10^6$  cells/ml と  $10^8$  cells/ml について検討した結果を Fig. 2~19 に示した。

#### (a) *Staphylococcus aureus* の場合

Table 4 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Gram-negative bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.05	0.39	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.05	0.20	0.40
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.20	0.78	0.20
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.05	0.39	0.20
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.05	0.39	0.40
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.20	25	0.39
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	0.10	0.025
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.05	0.20	0.05
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.025	0.20	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.025	0.20	0.025
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.05	0.20	0.025
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.10	0.78	0.20
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.10	0.78	0.20
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.05	0.39	0.10
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.05	0.39	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.05	0.39	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.05	0.78	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.78	>100	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.05	100	0.20
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.78	>100	50
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.20	1.56	0.39
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.10	3.13	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.05	1.56	0.39
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.10	0.78	0.20
<i>Proteus morgani</i> KONO	1.56	6.25	0.78
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.025	0.20	0.05
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.39	1.56	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	50	>100	100

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

Fig. 2, 3 に示すように  $10^8$  cells/ml では T-1982 は  $12.5 \mu\text{g/ml}$ , CTT は  $6.25 \mu\text{g/ml}$ , CMZ は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  にピークを有する 1 峰性の分布を示した。CMZ の抗菌力が良好で, T-1982 は CTT とほぼ同等の抗菌力を示した。 $10^6$  cells/ml でも同様な傾向であった。

#### (b) *Escherichia coli* の場合

Fig. 4, 5 に示す結果を得た。すなわち  $10^8$  cells/ml 接種時では T-1982 のピークは  $0.2 \mu\text{g/ml}$  に, CTT では  $0.39 \mu\text{g/ml}$ , CMZ では  $0.78 \mu\text{g/ml}$  にあり, T-1982 は CMZ, CTT に比べ良好な感受性を示した。 $10^6$  cells/ml 接種でも同様な傾向が認められた。

#### (c) *Klebsiella pneumoniae* の場合

Fig. 6, 7 に示すように  $10^8$  cells/ml 接種時には T-

Table 5 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Anaerobic bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Clostridium tetani</i>	1.56	0.39	0.39
<i>Clostridium perfringens</i>	0.78	1.56	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	6.25	6.25	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	3.13	6.25	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	6.25	12.5	6.25

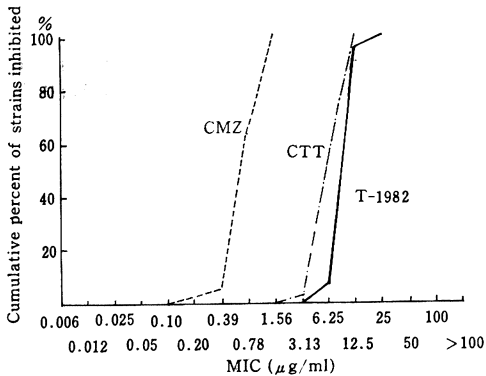
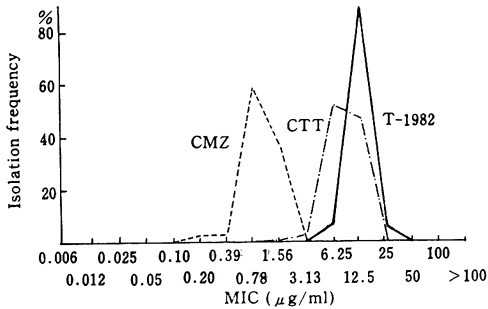
MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )

Table 6 Antibacterial spectra of T-1982, CMZ and CTT  
Anaerobic bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	T-1982	CMZ	CTT
<i>Clostridium tetani</i>	0.78	0.19	0.39
<i>Clostridium perfringens</i>	0.39	0.39	0.78
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	1.56	3.13	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1.56	3.13	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	3.13	6.25	3.13

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

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates  
*Staphylococcus aureus* 43 strains ( $10^8$  cells/ml)

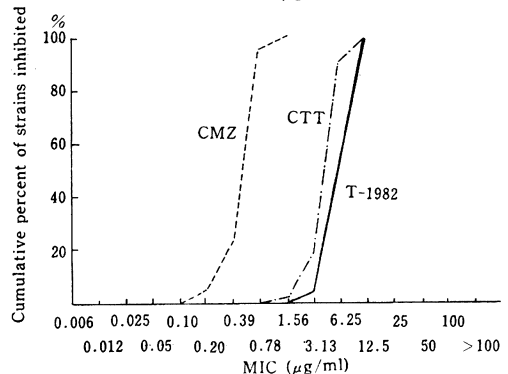
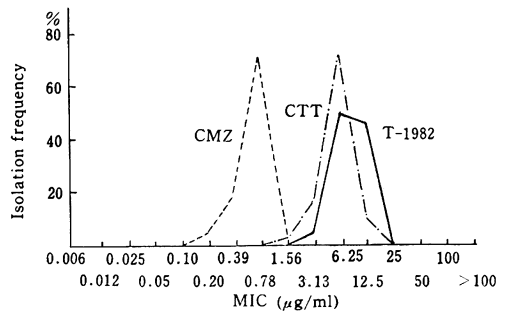


1982, CTTのピーク値は0.20  $\mu\text{g/ml}$  で、CMZは1.56  $\mu\text{g/ml}$  であった。T-1982の抗菌力はCTTと同等で、CMZに比べ優れていた。 $10^8$  cells/ml接種時にも同様な傾向を示した。

(d) *Enterobacter* spp. の場合

*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* の場合、Fig. 8, 9に示す結果を得た。 $10^8$  cells/mlでは約90%の株がCMZに $>100$   $\mu\text{g/ml}$ であった。T-1982は0.20  $\mu\text{g/ml}$ から $>100$   $\mu\text{g/ml}$ に感受性を示したがピーク値は0.39  $\mu\text{g/ml}$ であり、3剤を比較するとT-1982の抗菌力が優れ、CTT, CMZの順であった。 $10^8$  cells/ml

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates  
*Staphylococcus aureus* 43 strains ( $10^6$  cells/ml)



でも同様な傾向が認められた。

(e) *Serratia marcescens* の場合

Fig. 10, 11に示すように $10^8$  cells/ml接種時のT-1982の感受性は0.2  $\mu\text{g/ml}$ から $>100$   $\mu\text{g/ml}$ にあり、CTTとはほぼ同等の抗菌力を示し、CMZに比べると優れていた。 $10^8$  cells/mlでも同様な傾向を示した。

(f) *Proteus mirabilis* の場合

Fig. 12, 13に示すように $10^8$  cells/ml接種ではT-1982のピーク値は、0.78  $\mu\text{g/ml}$ , CTTでは0.2  $\mu\text{g/ml}$ , CMZでは3.13  $\mu\text{g/ml}$ にあり、T-1982はCTTとCMZの中間的な抗菌力を示した。 $10^8$  cells/mlでも同様な傾

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* 54 strains(10<sup>8</sup> cells/ml)

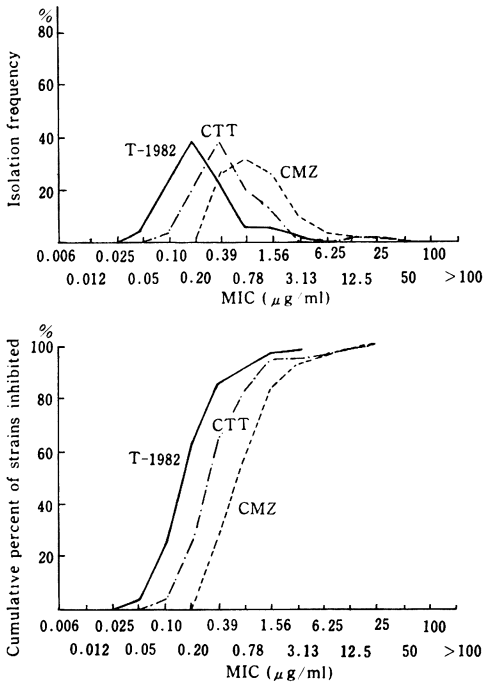


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* 54 strains (10<sup>6</sup> cells/ml)

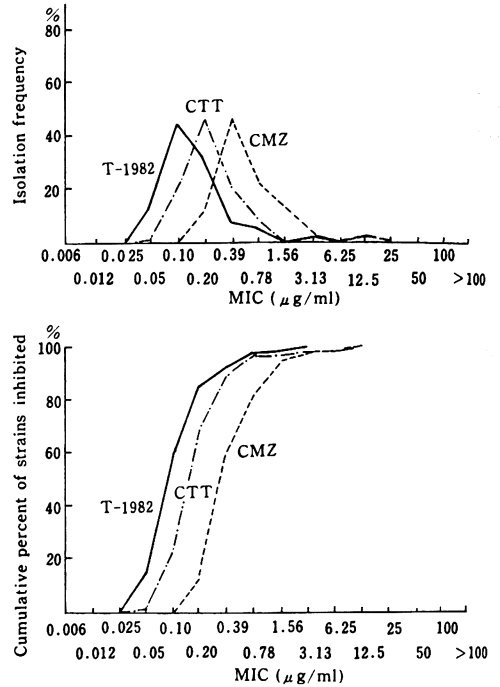


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* 41 strains(10<sup>8</sup>cells/ml)

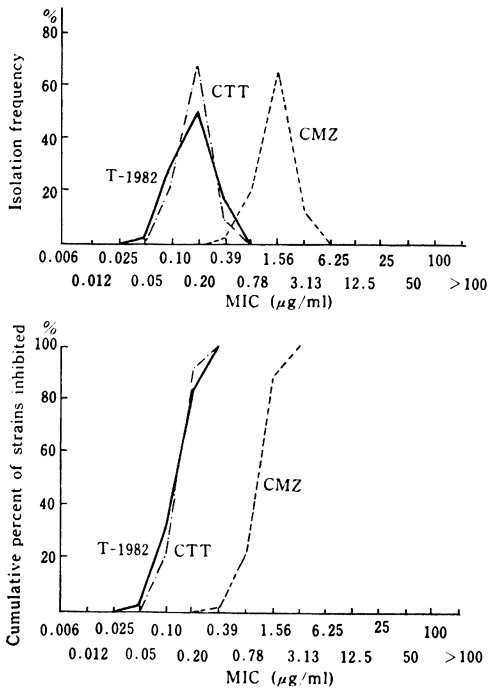


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* 41 strains(10<sup>6</sup> cells/ml)

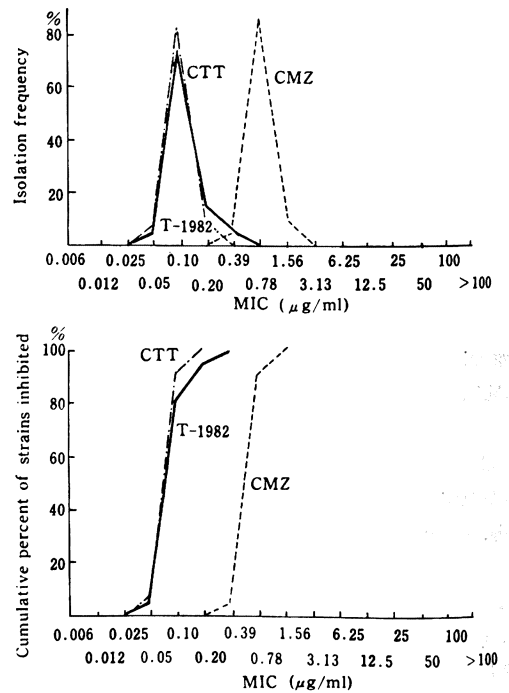


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates *Enterobacter* spp. 44 strains ( $10^8$  cells/ml)

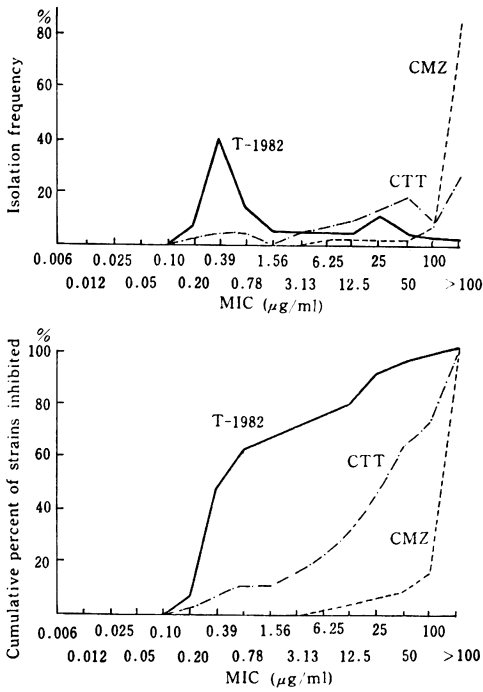


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates *Enterobacter* spp. 44 strains ( $10^6$  cells/ml)

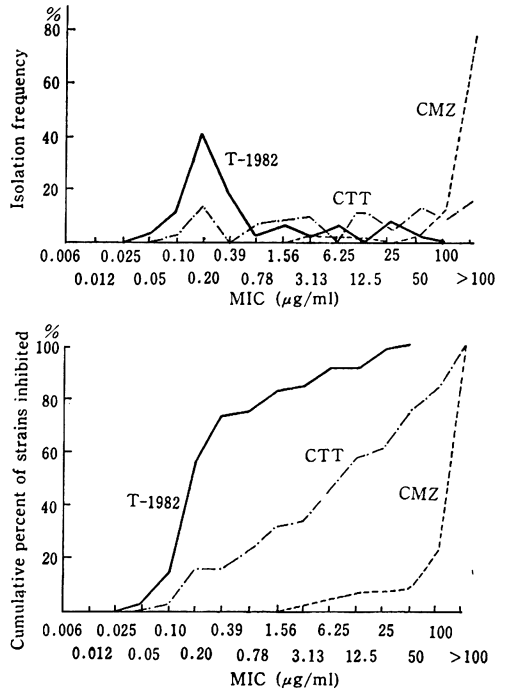


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates *Serratia marcescens* 53 strains ( $10^8$  cells/ml)

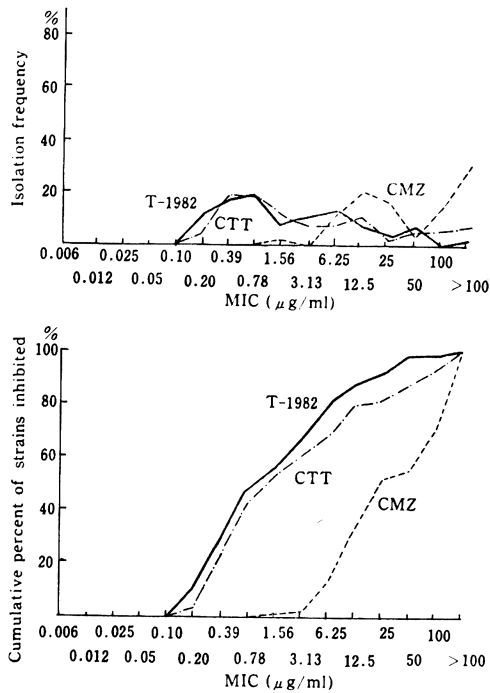
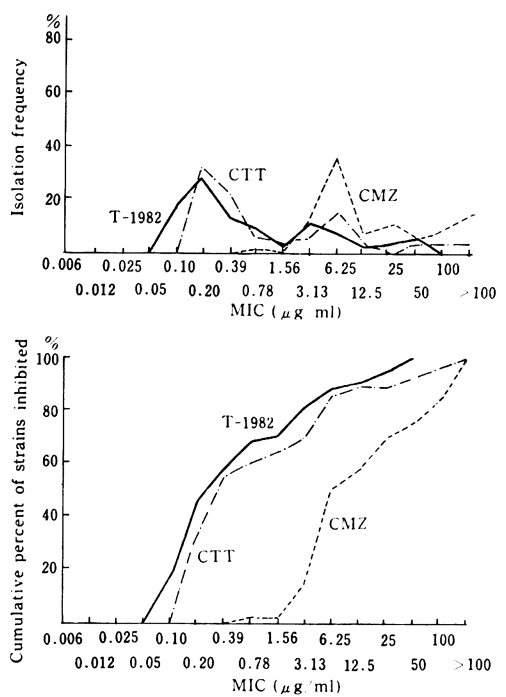
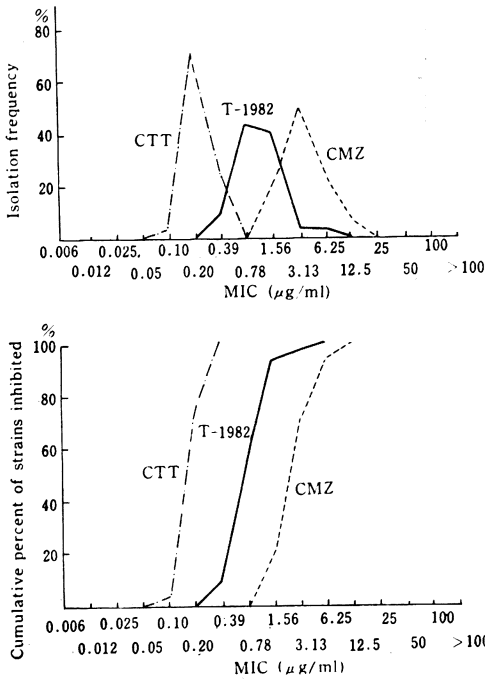


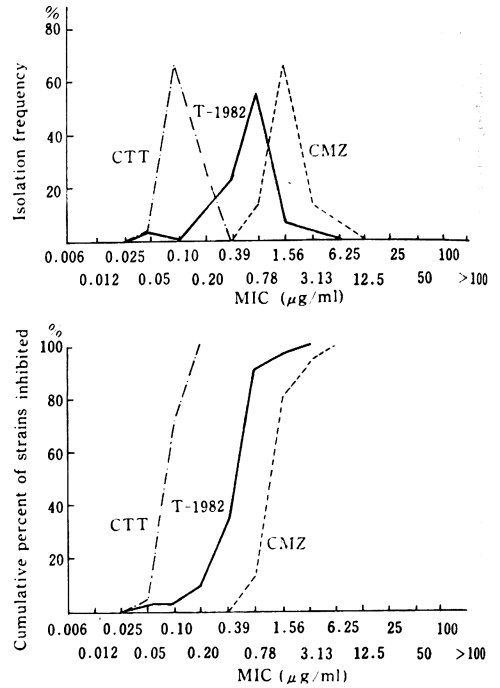
Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates *Serratia marcescens* 53 strains ( $10^8$  cells/ml)



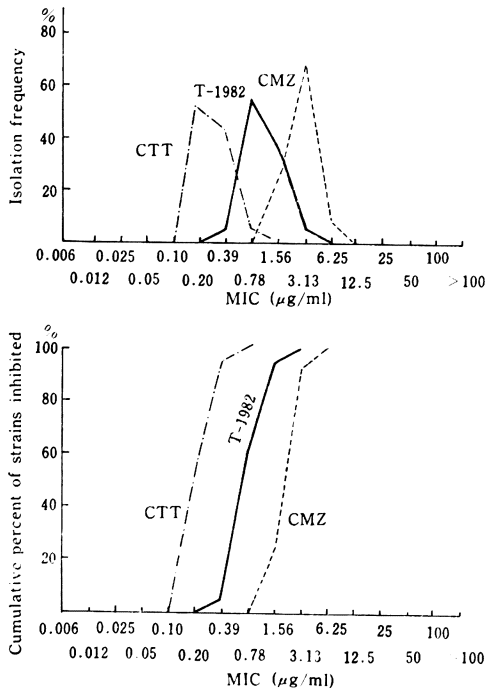
**Fig. 12** Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus mirabilis* 30 strains ( $10^8$  cells/ml)



**Fig. 13** Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus mirabilis* 30 strains ( $10^6$  cells/ml)



**Fig. 14** Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus vulgaris* 37 strains ( $10^8$  cells/ml)



**Fig. 15** Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus vulgaris* 37 strains ( $10^6$  cells/ml)

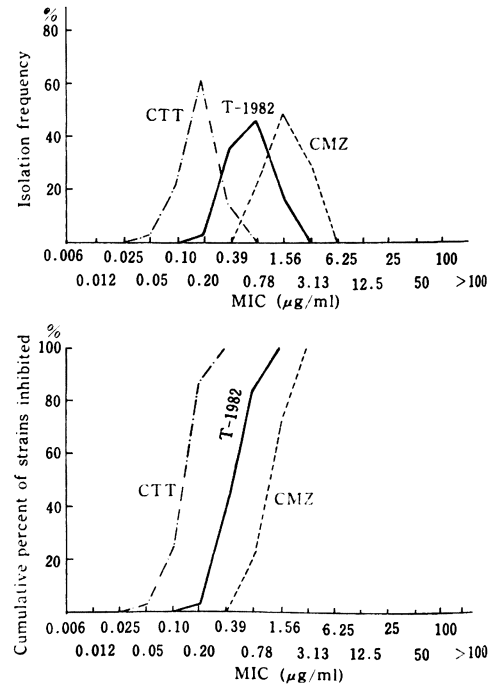


Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus morganii* 28 strains ( $10^8$  cells/ml)

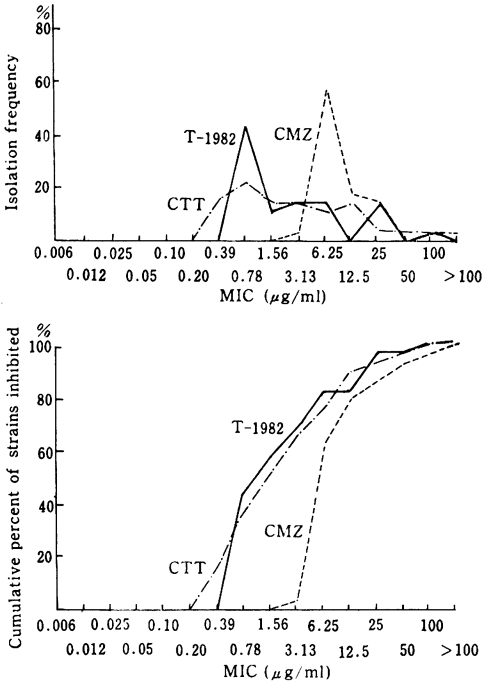


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus morganii* 28 strains ( $10^6$  cells/ml)

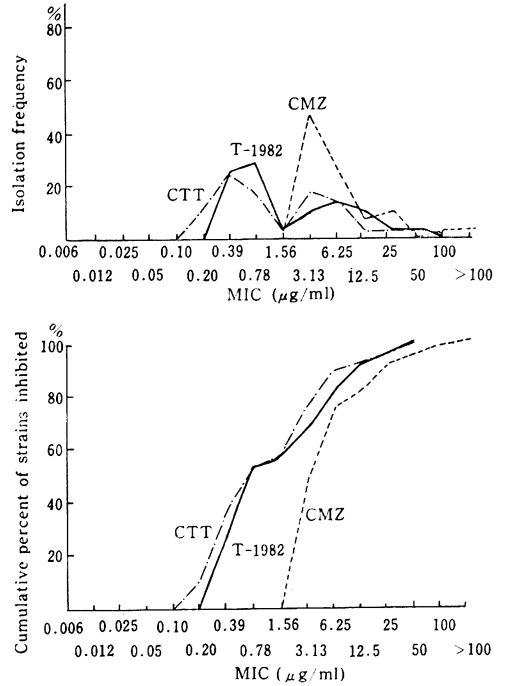


Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus rettgeri* 15 strains ( $10^8$  cells/ml)

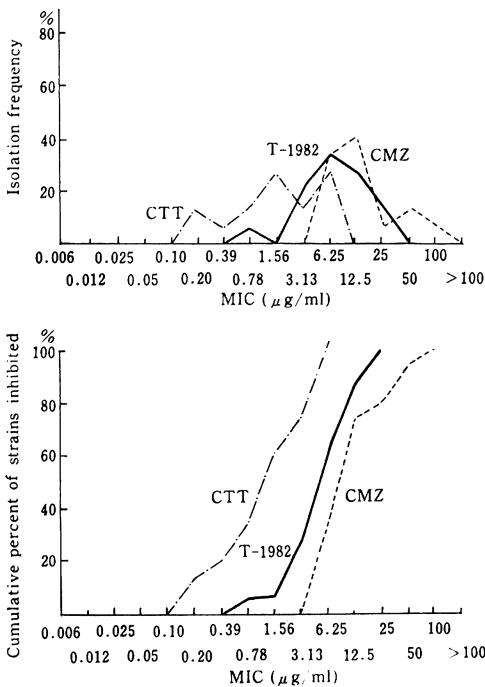


Fig. 19 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus rettgeri* 15 strains ( $10^6$  cells/ml)

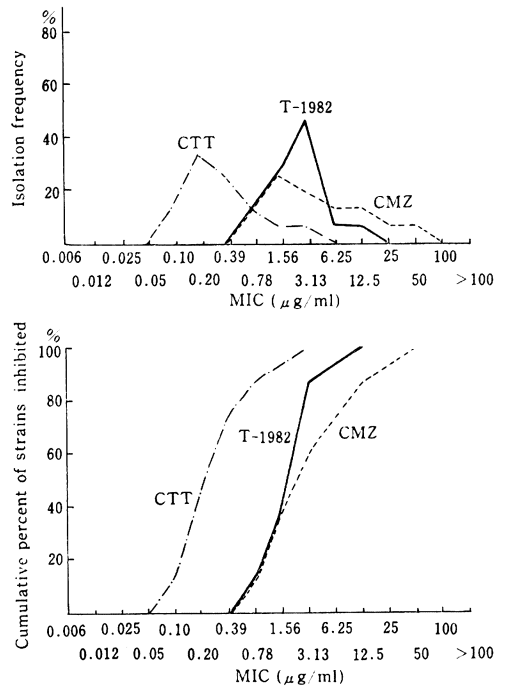




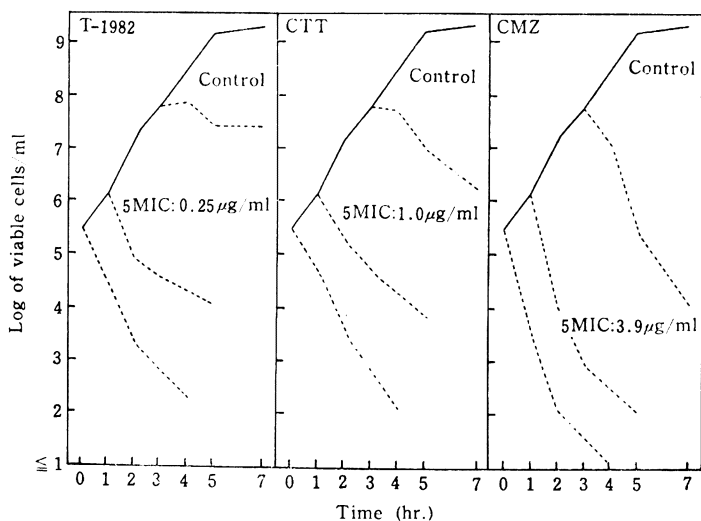
Table 7 Influence of horse serum on the antibacterial activity

Organism	Horse serum (%)	T-1982	CTT	CMZ
<i>S. aureus</i> 209-P JC-1	0	12.5	6.25	0.39
	10	12.5	6.25	0.78
	25	12.5	6.25	0.78
	50	12.5	6.25	0.78
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0	0.20	0.39	1.56
	10	0.20	0.39	1.56
	25	0.10	0.20	0.78
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0	0.05	0.10	0.78
	10	0.05	0.10	0.78
	25	0.05	0.10	0.78
<i>P. mirabilis</i> 1287	0	0.10	0.20	3.13
	10	0.10	0.20	3.13
	25	0.10	0.20	3.13
	50	0.10	0.20	3.13

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

Table 8 Influence of inoculum size on the antibacterial activity

Organism	Inoculum size (cells/ml)	T-1982	CTT	CMZ
<i>S. aureus</i> 209-P JC-1	$2.0 \times 10^8$	12.5	12.5	0.39
	$2.0 \times 10^7$	6.25	6.25	0.39
	$2.0 \times 10^6$	6.25	6.25	0.20
	$2.0 \times 10^5$	3.13	6.25	0.20
	$2.0 \times 10^4$	3.13	3.13	0.20
<i>E. coli</i> NIH JC-2	$3.1 \times 10^8$	0.20	0.39	1.56
	$3.1 \times 10^7$	0.20	0.20	1.56
	$3.1 \times 10^6$	0.10	0.20	0.78
	$3.1 \times 10^5$	0.10	0.20	0.78
	$3.1 \times 10^4$	0.10	0.10	0.78
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	$5.0 \times 10^7$	0.05	0.10	0.78
	$5.0 \times 10^6$	0.05	0.10	0.39
	$5.0 \times 10^5$	0.025	0.05	0.39
	$5.0 \times 10^4$	0.025	0.05	0.39
<i>P. mirabilis</i> 1287	$4.2 \times 10^8$	0.10	0.20	1.56
	$4.2 \times 10^7$	0.10	0.20	0.78
	$4.2 \times 10^6$	0.10	0.10	0.78
	$4.2 \times 10^5$	0.05	0.10	0.78
	$4.2 \times 10^4$	0.05	0.05	0.39

MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )Fig. 20 Effect of T-1982, CTT and CMZ on viability of *E. coli* K-12

向であった。

(g) *Proteus vulgaris* の場合

Fig. 14, 15 に示すように  $10^8$  cells/ml 接種では T-1982 は  $0.78 \mu\text{g/ml}$ , CTT は  $0.2 \mu\text{g/ml}$ , CMZ は  $3.13$

$\mu\text{g/ml}$  にピークを有する 1 峰性の分布を示した。T-1982 の抗菌力は CTT と CMZ の中間に位置し、この傾向は  $10^6$  cells/ml でも同様であった。

(h) *Proteus morgani* の場合

Fig. 21 Effect of T-1982, CTT and CMZ on viability of *K. pneumoniae* KC-1

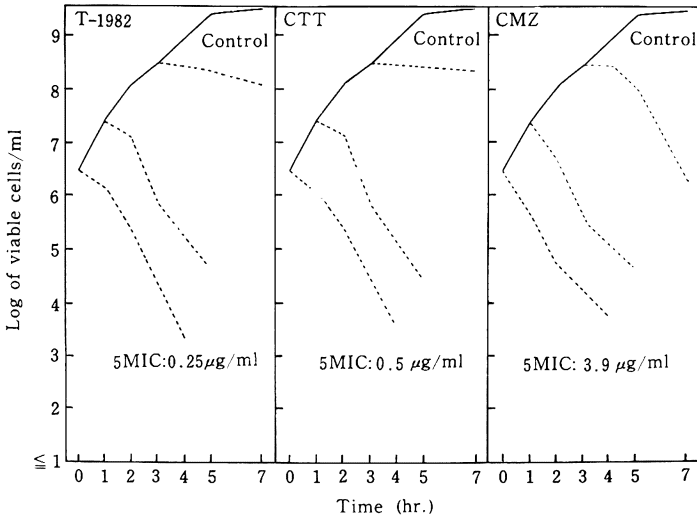


Fig. 22 Effect of T-1982, CTT and CMZ on viability of *E. coli* K-12

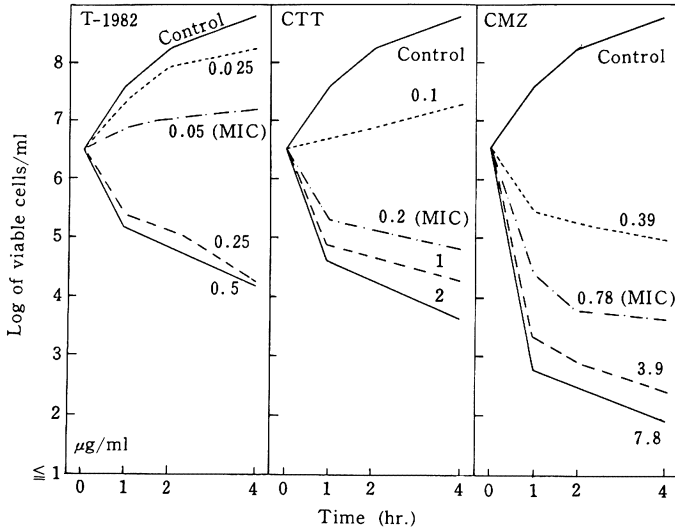


Fig. 16, 17に示すように $10^8$  cells/mlの場合、T-1982では $0.78 \mu\text{g/ml}$ から $100 \mu\text{g/ml}$ に感受性分布を示した。T-1982はCTTと同等の抗菌力を有し、CMZに比べ良好であった。 $10^6$  cells/mlでも同様な傾向を示した。

(i) *Proteus rettgeri* の場合

Fig. 18, 19に示すように $10^8$  cells/ml接種時にT-1982は $0.78 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ に感受性分布を示した。T-1982はCTTとCMZの間に位置する抗菌力を有していたが、 $10^6$  cells/ml接種ではCMZに近い分布を示した。

3) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす馬血清添加の影響を検討した成績がTable 7である。*Staphylococcus aureus* 209-P JC-1, *Escherichia coli* NIH JC-2, *Klebsiella pneumoniae* KC-1, *Proteus mirabilis* 1287ではT-1982, CTT, CMZいずれも馬血清添加量が増しても抗菌力にほとんど変動がみられなかった。

Table 8は接種菌量と抗菌力についての結果である。T-1982の抗菌力は*Staphylococcus aureus* 209-P JC-1の場合を除きほとんど変動がみられなかった。Fig. 20, 21は接種菌量と殺菌効果について検討した成績である。

Fig. 23 Effect of T-1982, CTT and CMZ on viability of *K. pneumoniae* KC-1

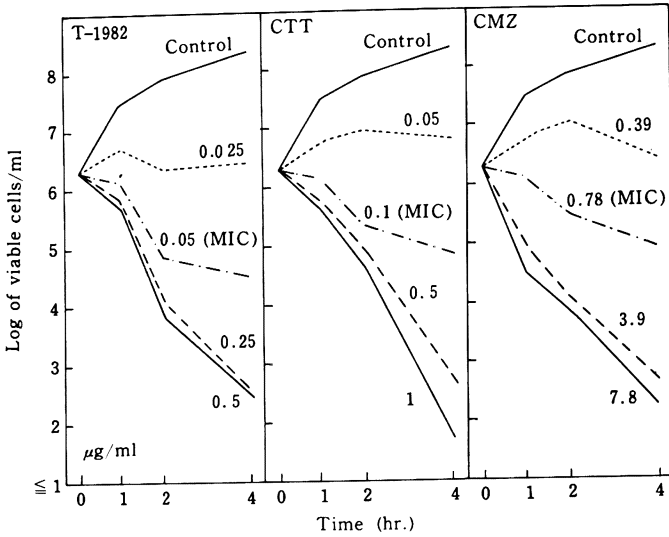
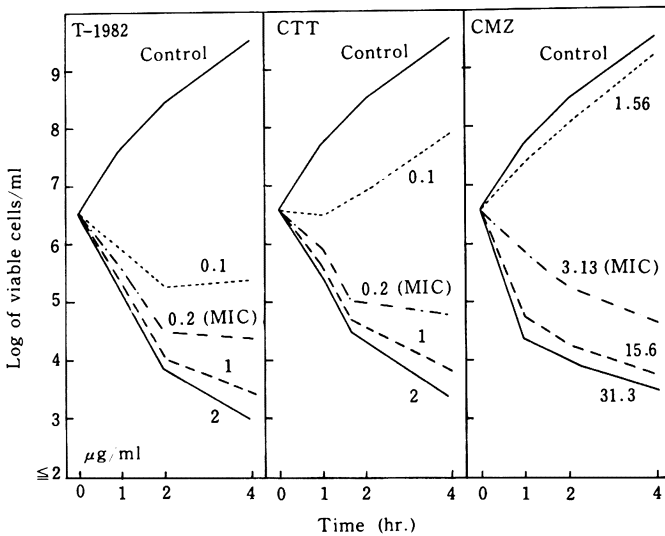


Fig. 24 Effect of T-1982, CTT and CMZ on viability of *S. marcescens* T-55



*Escherichia coli* K-12 株の場合には  $10^6$  cells/ml で T-1982 を作用させると 1 時間目で生菌数の減少が認められた。しかし、 $5.2 \times 10^7$  cells/ml で同濃度の T-1982 を作用させても静菌的な効果しか認められなかった。*Klebsiella pneumoniae* KC-1 の場合にも接種菌量が  $2.3 \times 10^8$  cells/ml では静菌的な効果しか認められなかった。

4) 殺菌作用

Fig. 22 は *Escherichia coli* K-12, Fig. 23 は *Klebsiella pneumoniae* KC-1, Fig. 24 は *Serratia marcescens* T-55 に対する T-1982 の殺菌効果を検討した結果を示してい

る。いずれも  $10^6$  cells/ml で薬を作用させたもので、作用濃度に応じた殺菌作用が認められた。しかし、5 MIC に相当する濃度以上を作用させても殺菌効果に大きな差は認められなかった。*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* では T-1982 の 1 時間目の殺菌効果は CTT と同様 CMZ に比べ弱いようであった。

5) MIC と MLC

MIC と 3, 6, 20 時間目の 99.9% 殺菌に要する濃度 MLC (MBC) との関係を検討した結果が Fig. 25, 26 である。Fig. 25 は *Escherichia coli* の場合で、Fig. 26 は *Serratia marcescens* の場合であるが、MIC 値と 20 時間

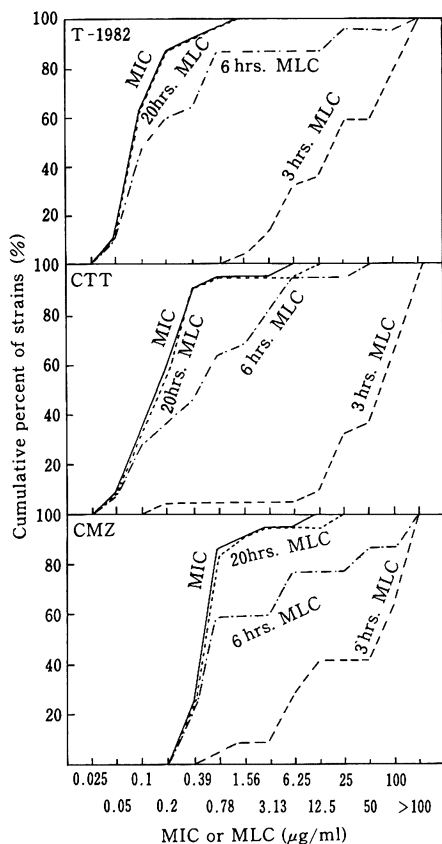
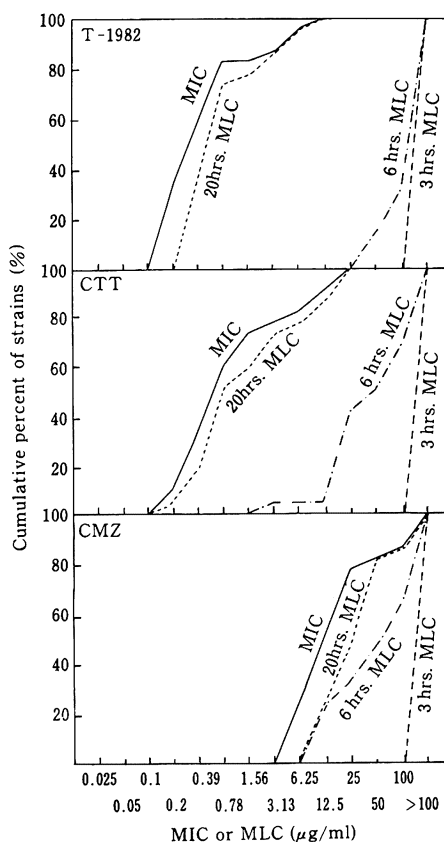
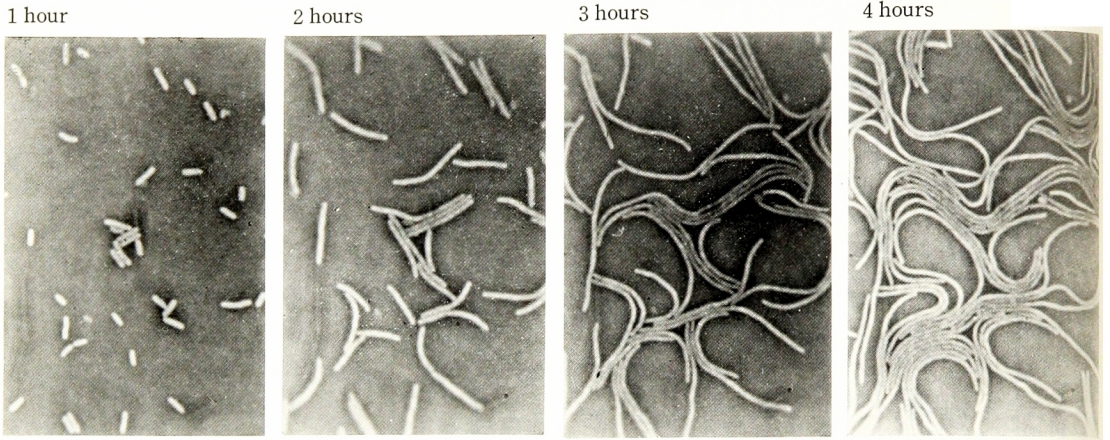
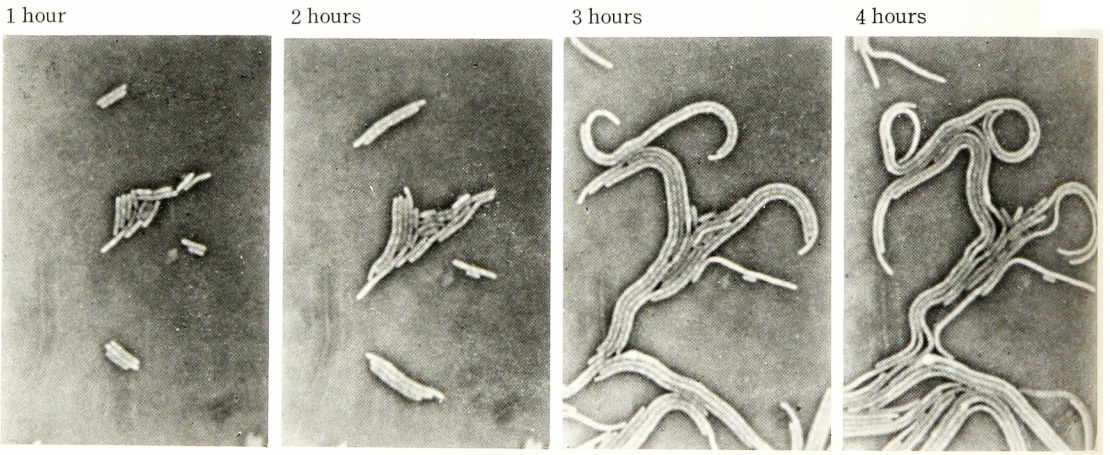
Fig. 25 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. coli* 22 strains ( $10^8$  cells/ml)Fig. 26 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* 22 strains ( $10^8$  cells/ml)

Table 9 Protecting effect of T-1982, CTT and CMZ on experimental infection in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotics	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
				10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> KC-14	300 LD <sub>50</sub> 1.1 × 10 <sup>4</sup>	T-1982	0.0019 (0.0014 ~ 0.0027)	0.20	0.10
		CTT	0.0026 (0.0020 ~ 0.0033)	0.20	0.10
		CMZ	0.058 (0.037 ~ 0.091)	0.78	0.78
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	1400 LD <sub>50</sub> 4.5 × 10 <sup>8</sup>	T-1982	0.085 (0.054 ~ 0.13)	0.05	0.05
		CTT	0.61 (0.42 ~ 0.8)	0.10	0.05
		CMZ	1.5 (0.94 ~ 2.4)	0.78	0.39
<i>S. marcescens</i> T-55	1700 LD <sub>50</sub> 3.5 × 10 <sup>6</sup>	T-1982	0.13 (0.074 ~ 0.21)	0.20	0.10
		CTT	0.30 (0.19 ~ 0.48)	0.20	0.10
		CMZ	6.6 (4.1 ~ 11)	3.13	1.56
<i>P.morganii</i> 101	29 LD <sub>50</sub> 3.3 × 10 <sup>6</sup>	T-1982	0.89 (0.52 ~ 1.5)	1.56	0.39
		CTT	0.07 (0.053 ~ 0.11)	1.56	0.39
		CMZ	0.18 (0.14 ~ 0.23)	6.25	3.13

Fig. 27 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to 0.05  $\mu\text{g/ml}$  of T-1982Fig. 28 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of T-1982

MLC 値はほとんど同じであった。しかし3時間目の  $\text{MLC}_{50}$  と20時間目の  $\text{MLC}_{50}$  の差は大きく、*Escherichia coli* では T-1982 の20時間  $\text{MLC}_{50}$  が  $0.1 \mu\text{g/ml}$  であり、3時間  $\text{MLC}_{50}$  は  $25 \mu\text{g/ml}$  であった。6時間 MLC は3時間 MLC より20時間 MLC に近い傾向がみられた。*Serratia marcescens* では6時間 MLC は3時間 MLC に近い値を示したがやはり20時間と3時間の MLC に大きな差が認められた。

#### 6) マウス実験的感染症に対する治療効果

*Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1, *Serratia marcescens* T-55, *Proteus morganii* 101 などによる実験的感染症に対する T-1982 の治療効果を検討した成績が Table 9 である。*Proteus morganii* の場合を除いて T-1982 は CMZ より17~50倍優れた治療効果を示した。*Klebsiella pneumoniae* KC-1 では T-1982 は CTT

の7倍程度良好な効果を示したが、*Escherichia coli* KC-14, *Serratia marcescens* T-55 では T-1982 は CTT とほぼ同等の効果であった。*Proteus morganii* 101 での治療効果は CTT, CMZ, T-1982 の順で MIC の順序との間に差がみられた。

#### 7) 位相差顕微鏡による観察

*Escherichia coli* K-12 に MIC ( $0.05 \mu\text{g/ml}$ ), 10 MIC に相当する T-1982 を作用させた場合の変化を、Fig. 27, 28 に示した。これらの濃度では時間の経過とともに菌体の伸長化が認められたが、作用4時間目では溶菌像は観察されなかった。

#### 8) PBP<sub>s</sub> への親和性

*Escherichia coli* K-12 および *Pseudomonas aeruginosa* E-2 の PBP<sub>s</sub> への T-1982 の親和性を検討したのが Fig. 29, 30 である。図中の濃度は [ $^{14}\text{C}$ ] PCG に対する T-1982



Fig. 29 Fluorography showing competition of T-1982 with <sup>14</sup>C-labeled penicillin G for binding to PBPs in *E. coli* K-12

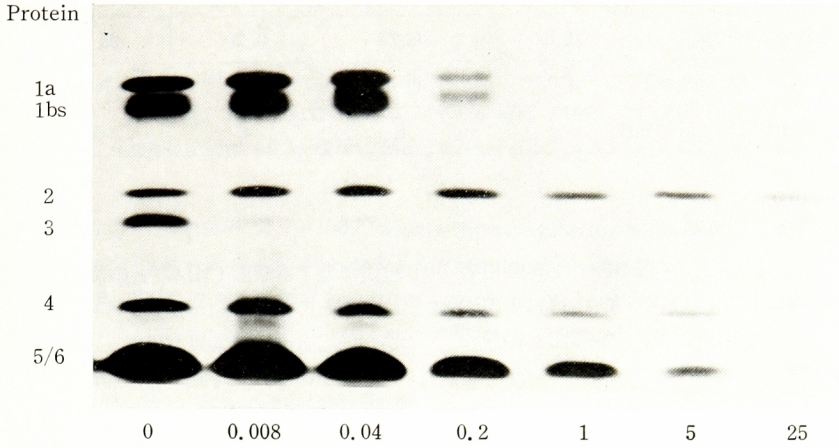


Fig. 30 Fluorography showing competition of T-1982 with <sup>14</sup>C-labeled penicillin G for binding to PBPs in *P. aeruginosa* E-2

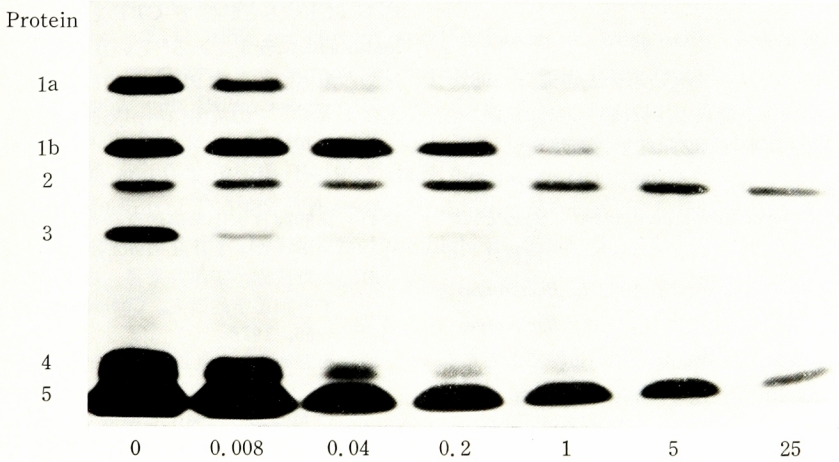


Table 10 Competition of T-1982 with <sup>14</sup>C-labeled penicillin G for binding to PBPs in cytoplasmic membranes of *E. coli* K-12 and *P. aeruginosa* E-2 *in vitro*

<i>E. coli</i> K-12	PBP	ID <sub>50</sub> *					
		1a	1bs	2	3	4	5/6
T-1982		0.076	0.079	1.10	<0.008	0.053	0.074
<i>P. aeruginosa</i> E-2	PBP	ID <sub>50</sub> *					
		1a	1b	2	3	4	5
T-1982		<0.008	0.13	≥25	<0.008	≤0.008	0.038

\*Concentration as a molar ratio to <sup>14</sup>C-labeled penicillin G required for 50% inhibition of labeled penicillin G binding

Table 11 Effect of EDTA on antibacterial activity of T-1982, CMZ, CTT and PCG

Organisms		T-1982	CMZ	CTT	PCG	EDTA*
<i>E. coli</i> K-12	None treated	0.10	0.78	0.20	25	12.5
	EDTA** treated	0.025	0.10	0.05	0.39	
	Fold	4	8	4	64	

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

\*\* : treated with 1/2 MIC

のモル比で示している。おのおののPBPへの50%阻害濃度を求めた結果がTable 10である。T-1982はPBP3に対する親和性が強く、PBPIa, 1bs, 4, 5/6への親和性も認められた。

#### 9) EDTA 併用時の抗菌力

*Escherichia coli* に EDTA を併用した場合と併用しない場合の抗菌力を測定した結果が Table 11 である。EDTA を併用することによって T-1982, CTT では4倍, CMZ では8倍, PCG では64倍 MIC が良好となった。

### III. 考 察

新しく開発されたセファマイシン系抗生物質 T-1982 の細菌学的評価を既知抗生物質と比較検討した。抗菌スペクトラムは比較薬とした CMZ, CTT と同様で、グラム陽性菌、陰性菌に広く分布していた。またその抗菌力は CTT と同等で、*Pseudomonas aeruginosa* に対しては抗菌力を示さなかった。セファマイシン系抗生物質は一般に嫌気性菌に有効であるが、T-1982 も *Bacteroides fragilis* に抗菌力を示した。ここで使用した *Bacteroides fragilis* は  $\beta$ -lactamase 産生能を有している株であることから、また Cefazolin 耐性菌や *Enterobacter* spp. に抗菌力を示すことから、T-1982 の  $\beta$ -lactamase に対する安定性が考えられる。三橋ら<sup>8)</sup>の各種  $\beta$ -lactamase に対し T-1982 は安定であるという報告もこれらを裏付けていると思われる。

マウスを用いた実験的感染症に対する治療効果は Cefazolin 感性の *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* に対して T-1982 は CTT と同等かそれ以上であった。しかし、*Proteus morganii* に対しては CMZ に劣っていた。表には示さなかったが、Cefazolin 耐性 *Escherichia coli* に対する効果は CMZ と同等であった。このような治療効果の差は菌の産生する  $\beta$ -lactamase に対する安定性の差によるものか、それ以外の因子によるものか現在不明である。

接種菌量と殺菌効果の関係で、T-1982は接種時の菌量が多くなると殺菌効果が減弱することや、MIC と99.9%

殺菌に要する濃度 (MLC) との関係で、T-1982の MLC は薬剤との接触時間が長くなるほど低くなり、接触時間が短い場合同等の効果を得ようとする、作用濃度を増す必要があり、短時間の殺菌能が弱いということから、*in vivo* での治療においてこれらのことを考慮し、扱わなければならないと思われる。

また、T-1982のグラム陰性菌に対する良好な抗菌力は、例えば *Escherichia coli* において、 $\beta$ -lactam 剤の抗菌作用に影響する外膜の透過性は若干の阻害はうけるが、PCG に比べると軽度で CTT と同程度であること、 $\beta$ -lactamase に安定である<sup>8)</sup>ということ、さらに  $\beta$ -lactam 剤の作用標的の中で PBP3 に特に親和性が強いということによって、その抗菌作用が発揮されていると考えられる。

### 文 献

- 1) 第29回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム I, T-1982 抄録集, 1981
- 2) 西野武志, 宇津井幸男, 中沢昭三: CS-1170 に関する細菌学的研究. *Chemotherapy* 26 (S-5): 40~56, 1978
- 3) 西野武志, 斉藤正人, 尾花芳樹, 小崎智子, 吉崎雅枝, 谷野輝雄: Cepharmycin 系抗生物質 Cefotetan (YM09330) に関する細菌学的評価. *Chemotherapy* 30 (S-1): 65~81, 1982
- 4) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29 (1): 76~79, 1981
- 5) 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
- 6) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99~113, 1949
- 7) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 2999~3003, 1975
- 8) 熊野克彦, 三上秀志, 井上松久, 三橋 進: T-1982 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について. *Chemotherapy* 30 (S-3): 1~19, 1982

## BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF T-1982, A NEW CEPHAMYCIN ANTIBIOTIC

TAKESHI NISHINO, MASAKO OHTSUKI, HISATO SENDA,  
MUTSUKO NAITO, ISAO NANBA and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The bacteriological evaluation of T-1982, a new cephamycin antibiotic, was studied in comparison with that of cefmetazole and cefotetan. The following results were obtained.

T-1982 showed a broad antibacterial spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria as well as cefmetazole and cefotetan, and its antibacterial activity was almost the same as cefotetan in the sensitivity distribution to various clinical isolates.

Moreover, T-1982 was active against *Bacteroides fragilis*, but was not active against *Pseudomonas aeruginosa*.

T-1982 showed a dose-response bactericidal activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.

The correlation between MICs and MLCs of T-1982 against *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* was similar to that of cefmetazole and cefotetan.

Therapeutic effect of T-1982 on experimental infection in mice with *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* was somewhat superior to that of cefotetan, but inferior to that of cefmetazole on infection with *Proteus morganii*.

The morphological change in *Escherichia coli* K-12 was observed by a phase contrast microscope. At concentrations of 0.05 and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , T-1982 made the bacteria elongated.

A study on the binding of T-1982 to the penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* E-2 revealed that T-1982 had the highest affinity for PBP 3.