

グラム陰性桿菌に対するCeftazidime の抗菌力の検討

高田直樹・浜 正純・小川道雄・神前五郎

大阪大学医学部第二外科学教室

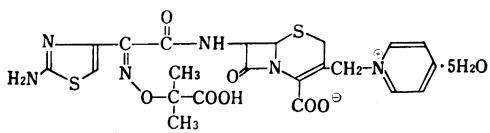
杉 中秀寿

広島大学歯学部口腔細菌学教室

新しく合成されたセファロスボリン系抗生物質である Ceftazidime (CAZ, SN401) に関して細菌学的検討を行なった。CAZ は各種臨床分離グラム陰性桿菌に対し、強い抗菌力を示した。特に、*P. aeruginosa*, *S. marcescens* に対し優れた抗菌力を発揮し、さらに従来のセファロスボリン剤が無効であったインドール陽性の *Proteus* spp., *E. cloacae*, *C. diversus*, *C. freundii* に対しても抗菌力を有していた。グラム陰性菌外膜に障害を与える Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下での MIC 測定では、CAZ は *P. aeruginosa* に対してやや MIC の低下がみられたが、*S. marcescens* では変化がなかった。一方、対照薬剤の Cefazolin (CEZ), Benzylpenicillin (PCG) では EDTA 添加により、両菌種に対して著明に MIC が低下した。のことより、CAZ が *P. aeruginosa*, *S. marcescens* に対して強い抗菌力を発揮する一要因として、外膜透過性に優れていることが関与していると思われた。

Ceftazidime (CAZ, SN401) は、英國グラクソ社において開発された新しいセファロスボリン系抗生物質であり、その構造式は Fig. 1 に示したとおりである。本剤は従来のセファロスボリン系抗生物質に比べ、広い抗菌スペクトルと優れた抗菌力を有し、特に *P. aeruginosa* や *S. marcescens* にまで有効である¹⁾。また各種細菌の產生する β -lactamase に強い抵抗性をもつとされている²⁾。今回われわれは、この CAZ の臨床分離グラム陰性桿菌に対する抗菌力と、グラム陰性菌外膜の透過程度について検討を行なったので報告する。

Fig. 1 Structural formula of CAZ



I. 実験材料および方法

1. 臨床分離グラム陰性桿菌の CAZ に対する感受性
昭和 56 年 1 月から昭和 56 年 3 月までに当科および関連施設において膿、尿、喀痰、その他から分離したグラム陰性桿菌 13 菌種 136 株に対して、CAZ の感受性を測定した。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定方法は、日本化学療法学会標準法³⁾に準じて Mueller-Hinton 培地 (Difco) を用い、寒天平板希釈法によって行なった。接種菌量は 10^6 cells/ml と 10^8 cells/ml で、対照薬剤として Cefazolin (CEZ), Cefmetazole (CMZ), Cefotiam

(CTM), Latamoxef (LMOX), Cefmenoxime (CMX) を使用した。*P. aeruginosa* に対しては Cefaclor (CFS) も加え検討した。

2. CAZ のグラム陰性菌外膜透過性の検討

グラム陰性菌外膜に障害を与える Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下での CAZ の MIC を測定し、未添加の場合と比較することによって CAZ の外膜透過程度を CEZ, Benzylpenicillin (PCG) のそれと比較した。使用菌株は *P. aeruginosa* KH 338, *S. marcescens* IFO 12648 および *E. coli* K 12 で、対照菌株として *S. aureus* FDA 209 P を用いた。培地は Trypticase soy broth (BBL 社, USA) を用い、薬剤の希釈は 2 倍数列希釈法で行ない、接種菌量は終末菌量が 10^6 cells/ml となるように、被検菌を接種し、37°C, 18 時間培養後に判定した。EDTA 存在下での MIC の測定には、1/2 MIC 濃度の EDTA を添加した。

II. 結 果

1. 感受性分布

(1) *E. coli* (Fig. 2)

CAZ は 10^6 cells/ml, 10^8 cells/ml 接種の場合とともに $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ すべての株の発育を阻止した。この濃度で発育が阻止された菌株は CEZ, CMZ, CTM では $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高濃度でも発育は阻止されなかった。LMOX, CMX は CAZ とほぼ同等の抗菌力を示した。

(2) *K. aerogenes* (Fig. 3)

CAZ は 10^6 cells/ml の場合で $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、 10^8

cells/ml の場合では $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で発育を完全に阻止した。80% 発育阻止濃度は、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で CAZ $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$, CEZ $200\mu\text{g}/\text{ml}$, CMZ $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$, CTM $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$, LMOX $0.39\mu\text{g}/\text{ml}$, CMX $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(3) *P. aeruginosa* (Fig. 4)

従来のセファロスボリン剤では無効であった本菌に対し、CAZ は強力な抗菌力を示し、その感受性は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の場合ともに、 $0.78\sim6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ に分布し、他剤に比べてもっとも優れた抗菌力を示した。また本菌に対して特異的に抗菌力を示す CFS よりも優れた感受性を示した。 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の場合の 80% 発育阻止濃度は CAZ $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$, CFS $25\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(4) *P. vulgaris* (Fig. 5)

CAZ はもっとも優れた抗菌力を示し $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ で全菌株の発育を完全に阻止し、80% 発育阻止濃度は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ 接種のいずれも $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。他剤の 80% 発育阻止濃度は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の場合、CEZ $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, CMZ $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$, CTM $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, LMOX $0.39\mu\text{g}/\text{ml}$, CMX $50\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(5) *P. mirabilis* (Fig. 6)

CAZ は CMX と同様に優れた抗菌力を示し、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ のいずれの接種菌量でも $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で 90% の菌株が発育阻止され、接種菌量による変化を受けなかった。 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の 80% 発育阻止濃度は、CAZ $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, CEZ $25\mu\text{g}/\text{ml}$, CMZ $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$, CTM $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$, LMOX $0.39\mu\text{g}/\text{ml}$, CMX $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。

(6) *P. morganii* (Fig. 7)

CAZ は優れた抗菌力を示し、80% 発育阻止濃度は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $0.39\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(7) *P. rettgeri* (Fig. 8)

CAZ の感受性は二峰性を示したが、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の接種菌量のいずれも $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で全菌株の発育を阻止した。

(8) *P. inconstans* (Fig. 9)

CAZ は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ で全菌株の発育を阻止し、その 80% 発育阻止濃度は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ で $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(9) *S. marcescens* (Fig. 10)

CAZ は他剤に比べてもっとも優れた抗菌力を示し、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ 接種では $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ で全菌株の発育を完全に阻止した。 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$

の 80% 発育阻止濃度は、CAZ $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$ で、次に CMX が $25\mu\text{g}/\text{ml}$, LMOX が $50\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、CEZ, CMZ, CTM は $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。

(10) *C. freundii* (Fig. 11)

菌株数は少ないが、CAZ の感受性は二峰性を示し、CAZ 耐性株は CEZ, CMZ, CTM, LMOX に対しても耐性であった。CAZ の 80% 発育阻止濃度は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ 接種とともに $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(11) *C. diversus* (Fig. 12)

CAZ は $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ で全菌株の発育を阻止し、接種菌量による影響はほとんど受けなかつた。

(12) *E. cloacae* (Fig. 13)

CAZ の感受性は二峰性を示し、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ において全菌株を発育阻止した。CAZ に耐性を示す株は、対照薬剤にも耐性を示した。80% 発育阻止濃度は、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ において CAZ $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$, CEZ, CMZ, CTM では $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、LMOX $50\mu\text{g}/\text{ml}$, CMX $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では CAZ $25\mu\text{g}/\text{ml}$, CEZ, CMZ, CTM では $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、LMOX $50\mu\text{g}/\text{ml}$, CMX $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

(13) *E. aerogenes* (Fig. 14)

CAZ は広い感受性分布を示し、 $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ の 80% 発育阻止濃度は $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $10^8\text{ cells}/\text{ml}$ では $50\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2. CAZ の外膜透過性

グラム陰性菌の外膜の構築には、二価陽イオンが重要な働きをしており⁴⁾、ここにキレーターである EDTA を作用させると、外膜が障害され透過障害をうけた薬剤がペリプラスマに入り、薬剤の感受性が高まることが明らかにされている^{5,6)}。そこで EDTA 存在下で MIC を測定し、未添加の場合の MIC と比較することによって、それらの透過障害の程度を検討した。それぞれの菌株に対する EDTA 単独の MIC は、*P. aeruginosa* KM 338 では $3.8\mu\text{mol}/\text{ml}$, *S. marcescens* IFO 12648 は $7.6\mu\text{mol}/\text{ml}$, *E. coli* K 12 は $3.8\mu\text{mol}/\text{ml}$ および対照菌株である外膜をもたない *S. aureus* FDA 209P では $1.9\mu\text{mol}/\text{ml}$ であった。それぞれの菌株に対する CAZ の MIC は、 $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$, $3.13\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また、EDTA 添加により *P. aeruginosa* では CAZ の感受性は 8 倍上昇し、やや透過障害があると思われたが、CEZ では 16 倍、PCG では 32 倍感受性が上昇し、これら薬剤と比較すると CAZ は透過性に優れていると思われた。

S. marcescens では、EDTA を添加しても CAZ の感受性はまったく変わらず、*E. coli* では 2 倍感受性が上

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolate *E. coli* (10 strains)

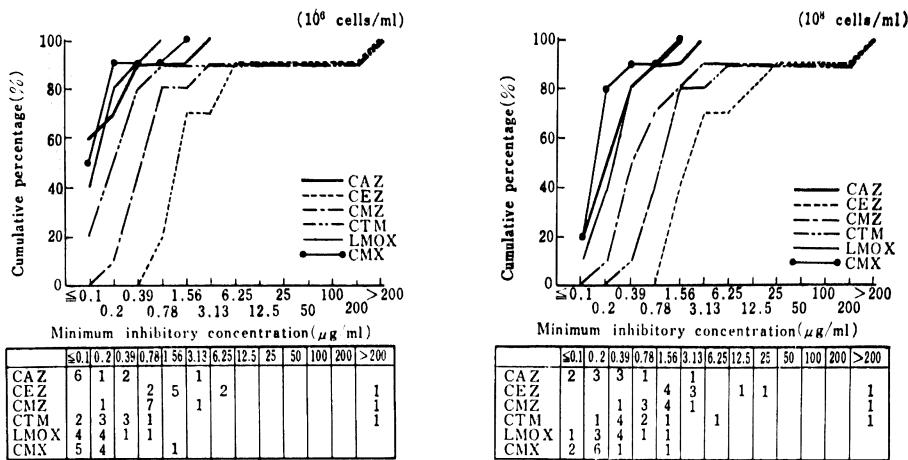


Fig.3 Sensitivity distribution of clinical isolate *K. aerogenes* (10 strains)

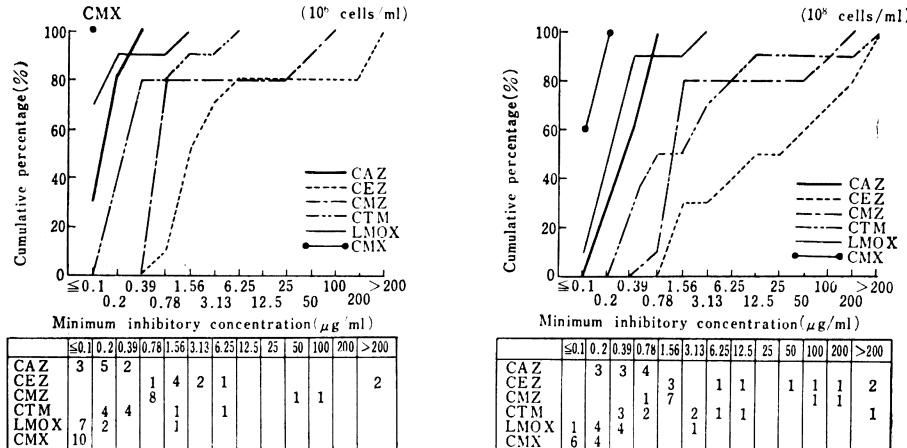


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. aeruginosa* (10 strains)

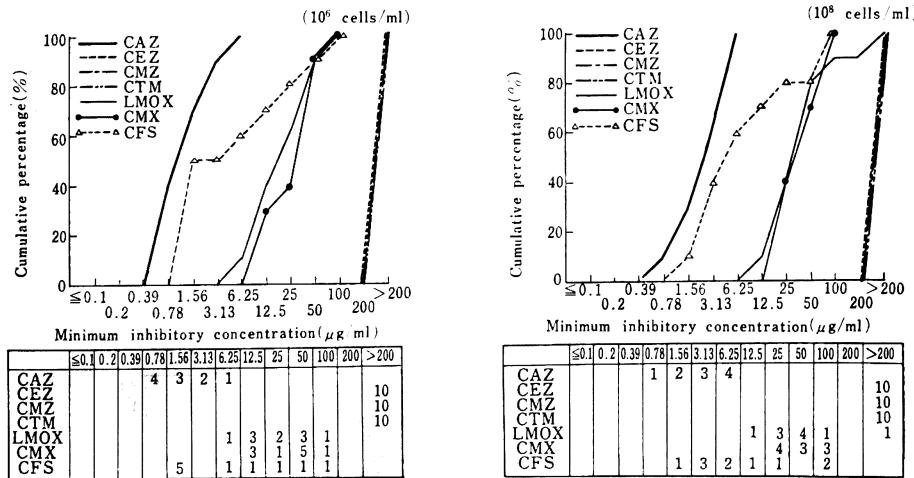


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. vulgaris* (10 strains)

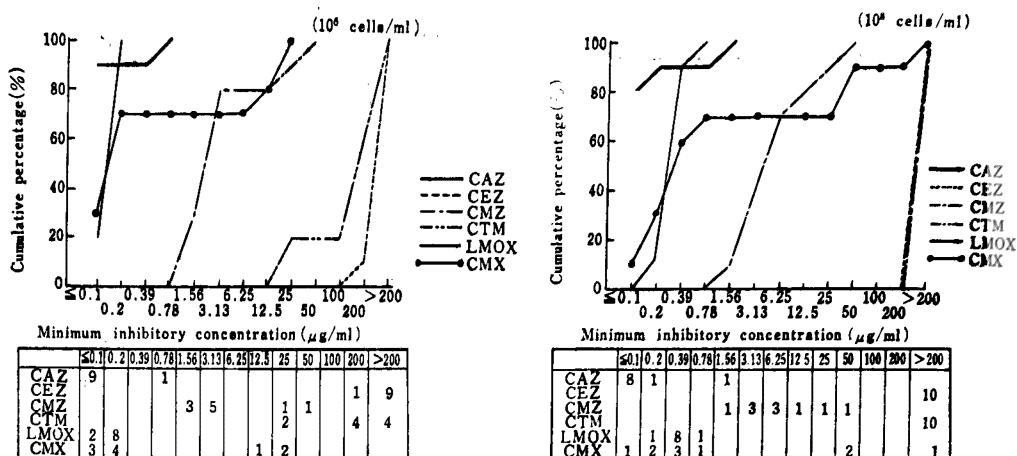


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. mirabilis* (10 strains)

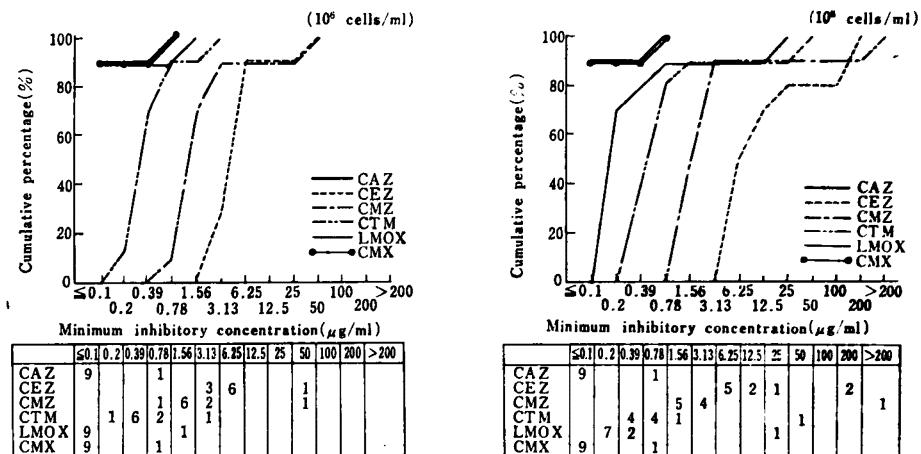


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. morganii* (10 strains)

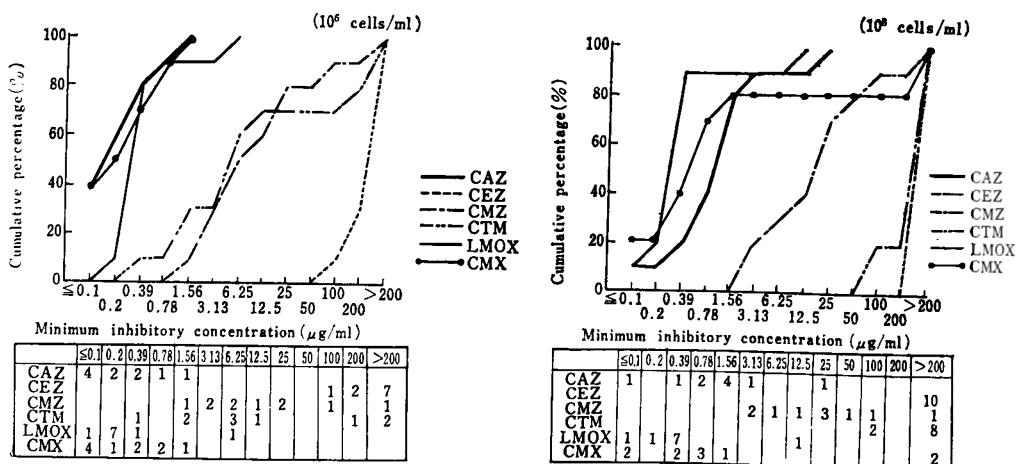


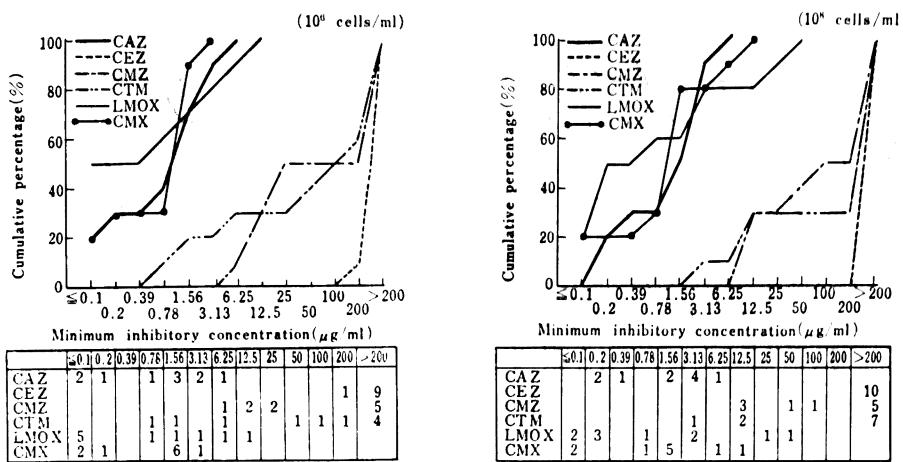
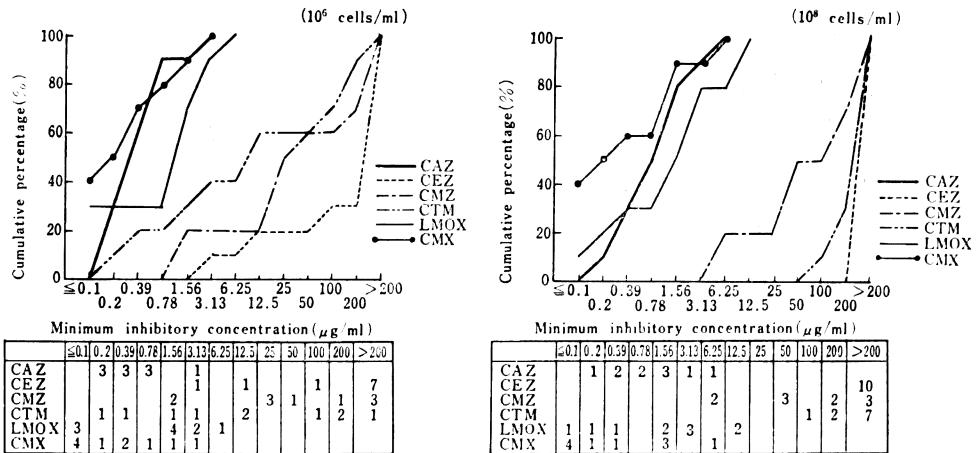
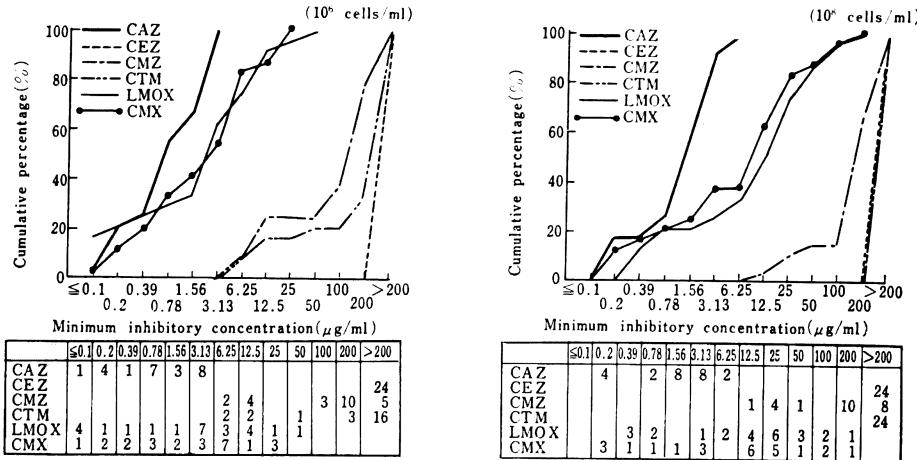
Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. rettgeri* (10 strains)Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolate *P. inconstans* (10 strains)Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolate *S. marcescens* (24 strains)

Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolate *C. freundii* (8 strains)

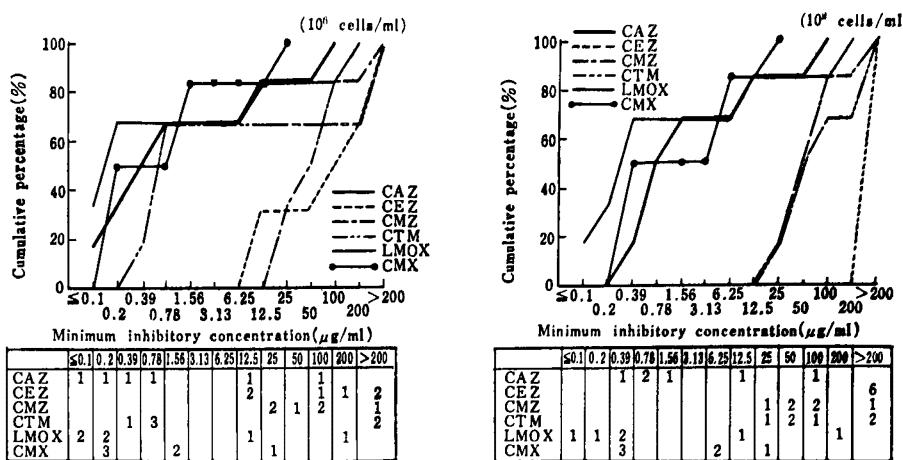


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolate *C. diversus* (10 strains)

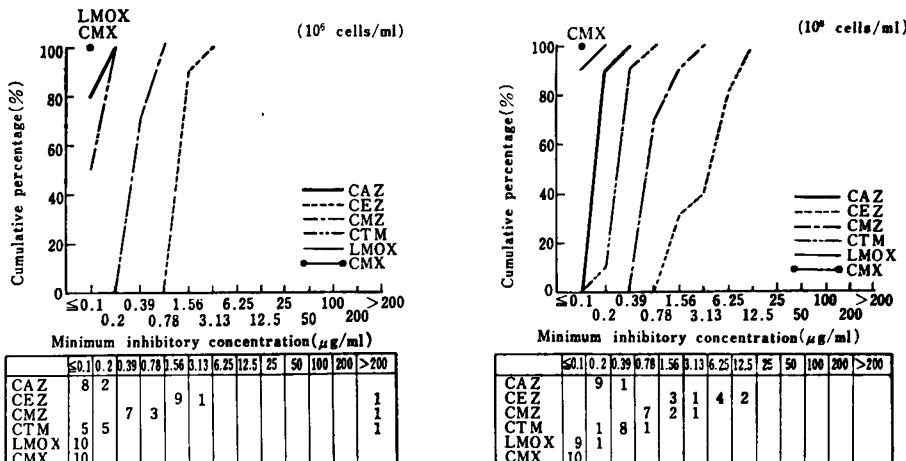


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolate *E. cloacae* (9 strains)

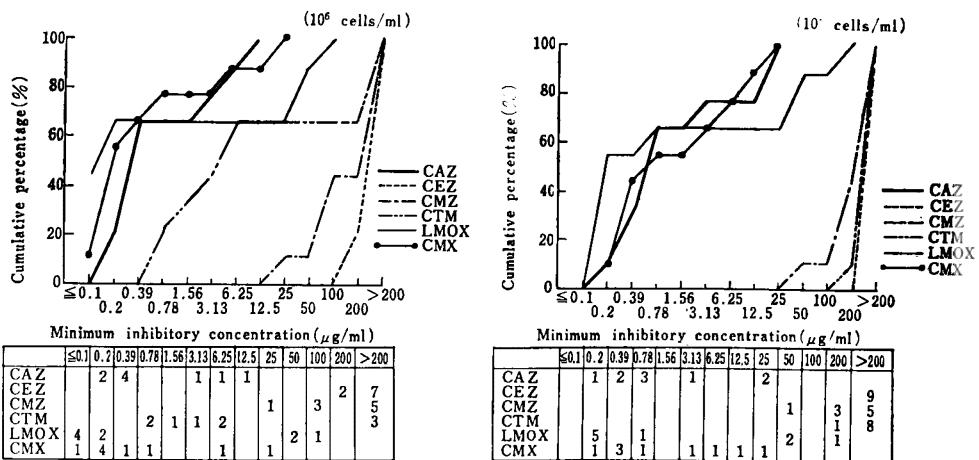
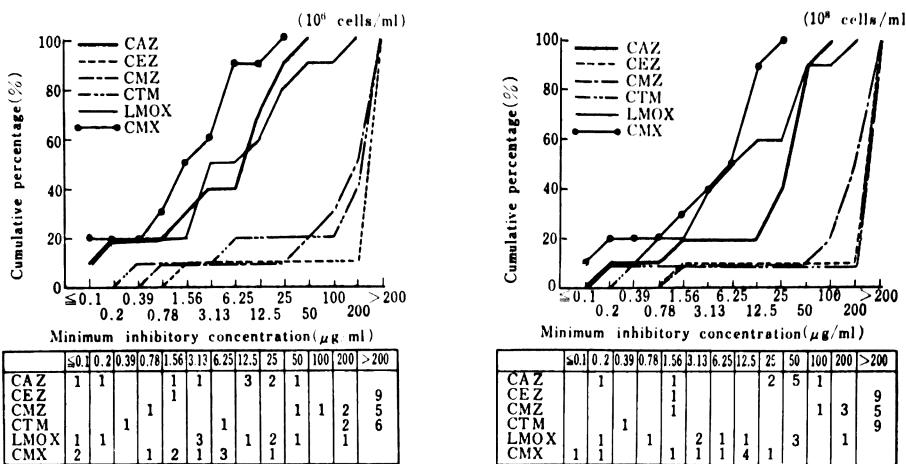


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolate *E. aerogenes* (10 strains)Table 1 Effects of ethylenediaminetetraacetic acid on the minimum inhibitory concentrations of various β -lactam antibiotics for *P. aeruginosa* KM 338, *S. marcescens* IFO 12648, *E. coli* K 12 and *S. aureus* FDA 209P

Antibiotic addition	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
CAZ					
None	6.25	0.2	0.1		3.13
EDTA	0.78	0.2	0.05		3.13
CEZ					
None	51,200	6,400	1.56		0.39
EDTA	3,200	100	0.78		0.39
PCG					
None	12,800	1,600	12.5		0.0125
EDTA	400	50	6.25		0.0125

昇した。これらの菌種に対して CAZ の外膜透過性は非常に優れていると考えられた。対照菌株として用いた外膜をもたない *S. aureus* では当然 MIC に変化は受けなかった。

III. 考 按

新しい半合成セファロスボリン剤である CAZ は、広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有していた。菌交代症の原因菌として外科領域で問題となる *P. aeruginosa* や *S. marcescens* に対して、CAZ は特に強い抗菌力を有し、また従来のセファロスボリン剤で無効であったインドール陽性の *Proteus* spp., *C. diversus*, *C. freundii*, *E. cloacae* に対しても強い抗菌力を示した。CAZ は、いわゆる第三世代セファロスボリン系抗生物質と呼ばれる LMOX, CMX とはほぼ同等かそれ以上の抗菌力を有していた。

グラム陰性菌外膜の透過程度の検討では、CAZ は *P.*

aeruginosa に対してやや透過障壁があると思われるものの、CEZ, PCG に比べて外膜を透過しやすかった。特に *S. marcescens* に対しては、CAZ は透過障壁をほとんど受けずに外膜の barrier を透過することがわかった。このグラム陰性菌外膜の透過性が良いことが、CAZ が *S. marcescens* に対して優れた抗菌力を示す一つの要因であると考えられた。

以上のことより CAZ は広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有しており、その一因として CAZ が外膜透過性に優れていることが示唆され、このような抗菌力が臨床成績にもよく反映していると考えられる。なお、 β -lactam 剤がグラム陰性菌に抗菌力を示すには、外膜の透過性が良好なだけでなく、さらに Periplasm に存在する β -lactamase に対する強い抵抗性があり、また内膜上に存在する標的酵素への感受性に優れている必要がある。われわれの研究では CAZ は β -lactamase に対して安

定であり、また架橋ペプチドグリカン合成酵素に対する親和性に優れていることが明らかになっている。この詳細については別に報告している⁷⁾。

文 献

- 1) VERBIST, L. & J. VERHAEGEN : GR20263 : a new aminothiazolyl cephalosporin with high activity against *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17 : 807~812, 1980
- 2) O'CALLAGHAN, C. H.; P. ACRED, P. B. HARPER, D. M. RYAN, S. M. KIRBY & S. M. HARDING : GR20263, a new broad-spectrum cephalosporin with antipseudomonal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17 : 876~883, 1980
- 3) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。*Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 4) LEIVE, L. : The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 235 : 109~129, 1974
- 5) HAMILTON-MILLER, J. M. T. : Effect of EDTA upon bacterial permeability to benzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20 : 688~691, 1965
- 6) WEISER, R.; A. W. ASSCHER & J. WIMPENNY : *In vitro* reversal of antibiotic resistance by ethylenediaminetetraacetic acid. *Nature (London)* 219 : 1365~1366, 1968
- 7) 杉中秀寿, 三宅洋一郎, 野上龍造, 高田直樹, 浜正純, 小川道雄, 神前五郎 : *Pseudomonas aeruginosa* KM 338, *Serratia marcescens* IFO 12648 および *Escherichia coli* K 12 の細菌壁ペプチドグリカンの生合成におよぼす Ceftazidime の影響。*Chemotherapy* 31(S-3) : 119~124, 1983

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFTAZIDIME ON GRAM-NEGATIVE BACILLI

NAOKI TAKATA, MASAYOSHI HAMA, MICHIO OGAWA and GORO KOSAKI

Second Department of Surgery, Osaka University Medical School

HIDEKAZU SUGINAKA

Department of Microbiology and Oral Bacteriology,
Hiroshima University School of Dentistry

Laboratory investigations were carried out on ceftazidime (CAZ, SN 401), a new semisynthetic cephalosporin.

CAZ showed a potent activity against clinically isolated gram-negative bacilli. Especially, it showed excellent antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *S. marcescens*. Moreover, it was active against indole-positive *Proteus* spp., *E. cloacae*, *C. diversus* and *C. freundii*.

The addition of subinhibitory concentration (1/2 MIC) of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) caused little change in the MIC of CAZ for *P. aeruginosa* and no change in the MIC of CAZ for *S. marcescens*, whereas marked reduction in MICs of CEZ and benzylpenicillin for both strains was observed by the addition of subinhibitory concentration of EDTA.

The potent activity of CAZ against both strains is considered, at least in part, to be due to the higher permeability of the outer membrane of these organisms.