

Ceftriaxone (Ro 13-9904) に関する細菌学的検討

関根 譲・三橋 進
群馬大学医学部微生物学教室
井上 松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

要 旨

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) の *in vitro* および *in vivo* における抗菌活性について cefmenoxime (CMX), cefotaxime (CTX), cefoperazone (CPZ) を対照薬剤として比較検討を行った。

その結果 CTRX はグラム陽性菌およびグラム陰性菌両菌種にわたり広範囲な抗菌スペクトラムを有しておりその抗菌力は非常に強く、おおむね CPZ より優れ、CMX, CTX と同程度ないしは優れていた。特に *Proteus* species, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* 等に非常に強い抗菌力を示した。

殺菌力については MBC と MIC 値との差および増殖菌線に及ぼす影響による比較の結果、対照薬剤と同程度ないしは優れた成績であった。

β -lactamase に対する安定性の検討の結果、R 因子支配の各種 penicillinase (PCase) 全てに安定であり、また *P. vulgaris*, *P. cepacia*, *B. fragilis* の産生する cefuroximase (CXase) を除く全ての cephalosporinase (CSase) に対しても安定であった。さらにこれら β -lactamase 産生菌に対しても本剤は優れた抗菌力を示した。

E. coli の penicillin binding proteins (PBPs) に対する CTRX の親和性を検討したところ、細胞分裂の隔壁形成に関与する PBP-3 に最も強い親和性を示し、次いで PBP-1A, -1Bs, -2 の順に強い親和性を有していたが PBP-4, -5, -6 に対する親和性は低かった。

マウス実験感染症における CTRX の *in vivo* 抗菌力は *in vitro* での強い抗菌力から期待される以上の良好な成績であり CTX, CPZ より優れた治療効果を得た。

緒 言

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) (Z)-(6R, 7R)-7-[(2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxyimino) acetamido)-3-[(2,5-dihydro-6-hydroxy-2-methyl-5-oxo-as-triazin-3-yl)-thio)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-[4,2,0]-oct-2-ene-2-carboxylic acid disodium salt はロシュ社により合成された新しいセファロsporin系抗生物質¹⁾で極めて強い抗菌力と広範囲の抗菌スペクトラムを有している²⁻⁴⁾。

今回臨床分離株に対する抗菌力、殺菌力、 β -lactamase に対する安定性、penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性およびマウス感染治療効果等に関して、対照薬剤として cefmenoxime (CMX), cefotaxime (CTX), cefoperazone (CPZ) を用いて比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CTRX は日本ロシュより提供された粉末を用いた。Cefmenoxime (CMX) は武田薬品より、cefotaxime (CTX) はヘキストジャパン社、日本ルセル社より、cefoperazone (CPZ) は富山化学より、cephaloridine (CER) は鳥居薬品より、cephalothin (CET) は塩野義製薬より、cefazolin (CEZ), carbenicillin (CBPC), cloxacillin (MCIPC) は藤沢薬品より、cefuroxime (CXM) は新日本実業より、penicillin G (PCG) は明治製菓より、ampicillin (ABPC) はビーチャム薬品よりそれぞれ分与を受けた。

2. 使用菌株

標準菌株、臨床分離株は全て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

Minimum inhibitory concentration (MIC)測定には Muller Hintone (MH) agar (ニッスイ), Brain heart infusion (BHI) agar (栄研), Protease No. 3 medium (Difco), GAM agar (ニッスイ) を用いた。Minimum bactericidal concentration (MBC)と Bactericidal activity の測定には, antibiotic medium 3 (ABM 3) (Difco) を用いた。

その他, GAM 液体培地, ペプトン水, 菌液の希釈には buffer saline gelatin (BSG)液を用いた。

4. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法⁹⁾に準じ寒天平板希釈法により行った。すなわち, 被検菌のペプトン水, 37°C18時間培養液 (10^{8-9} cells/ml) を 10^5 cells/ml となるように BSG 溶液で希釈し, その 5 μ l をマイクロプランター (佐久間製作所) により薬剤含有寒天培地に接種し 37°C18時間培養被検菌の発育の認められない最小濃度をもって minimum inhibitory concentration (MIC)とした。なお *Pseudomonas* sp.の前培養には 0.3% KNO₃ 添加ペプトン水を用いた。

S. pyogenes は前培養に BHI 液体培地を用い感受性測定には BHI 寒天培地を用いた。*H. influenzae* には 10 μ g/ml Hemin と 2 μ g/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 添加 BHI 液体および寒天培地, *C. jejuni* には 7% 馬脱繊維血添加 MH agar, 他の嫌気性菌には GAM 液体および寒天培地を用いた。

5. 殺菌力測定

増殖曲線に及ぼす影響については被検菌を ABM-3 broth で 37°C overnight 培養後新しい ABM-3 に 10^4 cells/ml となる様に接種し 37°C で振とう培養し菌数が 10^5 cells/ml となったときに各濃度の薬剤を添加し経時的に生菌数を測定した。

MBC の測定については被検菌を ABM-3 broth に植菌し overnight 培養後, これを最終濃度 10^4 cells/ml となる様に新たに ABM 3 broth に接種すると同時に各濃度の薬剤を添加して 37°C18時間培養後外観上発育の認められなかった濃度を MIC とした。さらにこれより MH 寒天培地に一白金耳接種し 37°C18時間培養してコロニーの全く認められなかった薬剤濃度をもって MBC とした。

6. β -lactamase に対する安定性

用いた β -lactamase は Medium B (酵母エキス 2 g, ポリペプトン 10g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 8 g, KH₂PO₄ 2 g, (NH₂)₂SO₄ 1.2g, グルコース 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4g, 蒸留水 1 l, pH7.4) にて培養して得られた菌体を超音波破砕後, 10万 × g, 30min 遠心しその上清を SM 処理, イオン

交換クロマトグラフィー, ゲル濾過等で精製した酵素標品を用いた。タンパク量の定量は Lowry 法⁶⁾を用いた。

β -lactamase 活性は spectrophotometric 法^{7,8)}で測定し 1 μ mole の基質を 1 分間に分解する酵素量を 1 単位とした。薬剤の Vmax, Km, Ki 値は Lineweaver Burk の plot より求めた。

β -lactamase に対する安定性は, PCase の場合は, PCG を 100, CSase の場合は CER を 100 とした相対加水分解速度で表した。

7. PBPs に対する親和性

E. coli JE1011 より調製した膜標品を用いた^{9,10)}。無標識の CTRX と膜標品を preincubation 後, ¹⁴C-PCG を添加し PBPs に対する CTRX と ¹⁴C-PCG の competition を SDS-PAGE, フルオログラフィーにより検出し, それを densitometer で定量した。

8. マウス感染治療実験

ICR 系雄マウス (体重 20 ± 2 g) を 1 薬剤 1 濃度当り, 1 群 10 匹使用した。

試験菌には *E. coli* ML4707, *S. marcescens* GN7577, *P. vulgaris* GN5737, *P. aeruginosa* IX190 の 4 菌種を用い腹腔内感染後直ちに薬剤を皮下注射した。*E. coli* ML4707 は mucin 無添加, 他の 3 菌種は mucin を添加 (5%) して用いた。感染後 7 日後の生存率から ED₅₀ 値を求めた。算定法は Litchfield-Wilcoxon 法¹¹⁾に基づき 95% 信頼限界値を計算により算出した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

CTX の抗菌スペクトラムを標準菌株 25 株を用いて, CTX, CMX, CPZ と比較した結果を Table 1 に示した。

CTX はグラム陽性および陰性菌群に対し CTX, CMX 同様広範囲にわたり強い抗菌力を示した。特に *Proteus* sp., *E. coli*, *K. pneumoniae* 等に非常に強い抗菌力を有していた。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離の *S. aureus* 99 株, *S. epidermidis* 62 株, *E. coli* 98 株, *K. pneumoniae* 107 株, *C. freundii* 57 株, *S. marcescens* 100 株, *E. cloacae* 97 株, *P. mirabilis* 99 株, *P. morganii* 53 株, *P. rettgeri* 43 株, *P. vulgaris* 52 株, *P. inconstans* 21 株, *P. aeruginosa* 100 株, *P. cepacia* 59 株, *P. maltophilia* 22 株, *A. calcoaceticus* 100 株, *H. influenzae* 27 株, *N. gonorrhoeae* 48 株, *B. fragilis* 41 株, *C. jejuni* 17 株, *C. difficile* 28 株, *C. perfringens* 17 株の 22 菌種 1,347 株について CTRX の抗菌力を CTX, CMX, CPZ と比較検討した。Fig. 1 ~ 20 に約 10^5 cells/ml 5 μ l 接種時における各菌種の薬剤感受性分布と累積百分率

Table 1 Antibacterial activity of CTRX against standard strains

Standard strains	MIC (μg/ml)			
	CTRX	CMX	CTX	CPZ
<i>S. aureus</i> FDA209P JC-1	3.13	1.56	3.13	1.56
<i>S. aureus</i> Terajima	3.13	0.78	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> MS-353	1.56	0.39	0.78	0.78
<i>S. pyogenes</i> COOK	0.012	0.012	0.012	0.05
<i>E. coli</i> .NIHJ JC-2	0.05	0.1	0.1	0.1
<i>E. coli</i> K12 C600	0.025	0.025	0.025	0.05
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	≤0.006	≤0.006	0.012	0.012
<i>S. typhimurium</i> IID-971	0.1	0.2	0.1	0.39
<i>S. typhi</i> 901	0.05	0.1	0.1	0.2
<i>S. paratyphi</i> 1015	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.05
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.05	0.05	0.05	0.2
<i>S. enteritidis</i> G14	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.05	0.1	0.1	0.39
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.2	0.2	0.2
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	25	12.5	12.5	3.13
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	25	25	25	12.5
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	50	25	12.5	3.13
<i>P. morganii</i> IFO 3848	≤0.006	0.012	0.012	0.012
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.012	0.1	0.05	0.78
<i>P. vulgaris</i> OX-19	≤0.006	≤0.006	≤0.006	≤0.006
<i>P. vulgaris</i> IIX-19	≤0.006	≤0.006	≤0.006	≤0.006
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.2
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.2	0.2	0.1	0.2
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	0.2	0.2	0.78
<i>M. luteus</i> ATCC 9340	0.1	0.012	0.05	0.1

で示した。また、Table 2には各菌種ごとに用いた菌株の50%および90%の発育阻止濃度 MIC₅₀、MIC₉₀をそれぞれ示した。

S. aureus に対する CTRX の感受性分布のピークは 1.56~3.13μg/ml で他の 3 剤に比しわずかに高い値であるが、そのピークは鋭く、MIC₉₀でも3.13μg/ml であった (Fig. 1)。

S. epidermidis に対しては他剤と同様の感受性分布を示し MIC₉₀は25μg/ml であった (Fig. 2)。

一方グラム陰性菌に対しては全般にわたって強い抗菌力を有し *E. coli* に対しては CTRX は0.05μg/ml にシャープな MIC ピークを有し MIC₉₀も0.05μg/ml と非常に強い抗菌力を示した。この時、CTX、CMX、CPZ の MIC₉₀は、それぞれ0.1、0.1、1.56μg/ml であった (Fig. 3)。

K. pneumoniae に対し CTRX は CTX、CMX と同様

0.05μg/ml に感受性ピークを有し、MIC₉₀も0.1μg/ml と強い抗菌力を示した。この時の CPZ の感受性ピークは0.2μg/ml で MIC₉₀は3.13μg/ml であった (Fig. 4)。

C. freundii に対しては CTRX は他剤同様幅広い感受性分布を示し MIC₉₀も25μg/ml と、抗菌力もほぼ同程度であった (Fig. 5)。

S. marcescens は従来の β-lactam 剤に対し比較的感受性の低い菌種であるが、これに対しても CTRX は 0.05μg/ml に主なる感受性ピークを有し CTX、CMX と同等、CPZ より優れた抗菌力を示した (Fig. 6)。

E. cloacae に対しても CTRX は0.1μg/ml に感受性ピークを有し他の 3 剤とはほぼ同程度の強い抗菌力を示した (Fig. 7)。

Indole-negative および positive *Proteus* sp.に対して CTX、CMX は非常に強い抗菌力を示すが、CTRX はこれらの薬剤に比べ *Proteus* のいずれの菌種に対しても最

Fig. 1 Antibacterial activity of CTRX

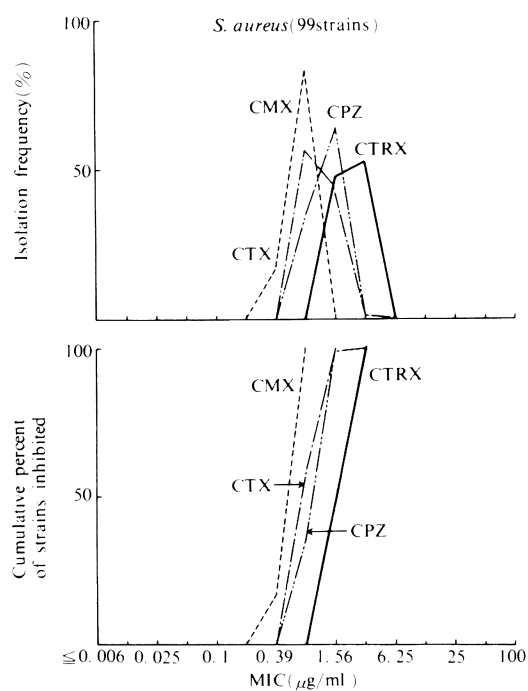


Fig. 2 Antibacterial activity of CTRX

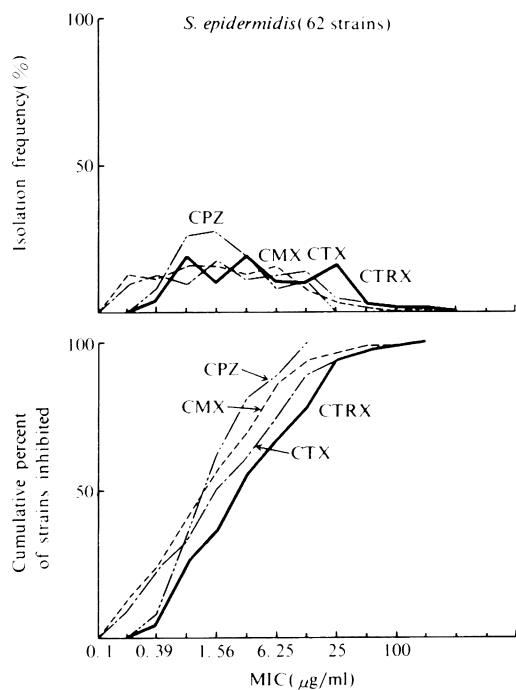


Fig. 3 Antibacterial activity of CTRX

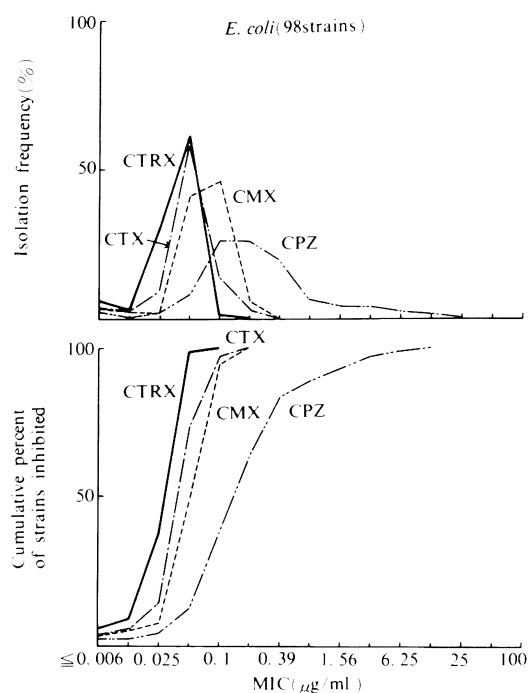


Fig. 4 Antibacterial activity of CTRX

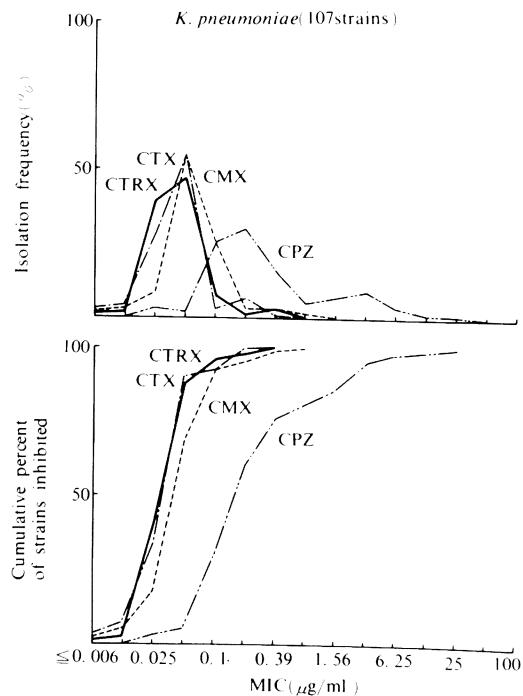


Fig. 5 Antibacterial activity of CTRX

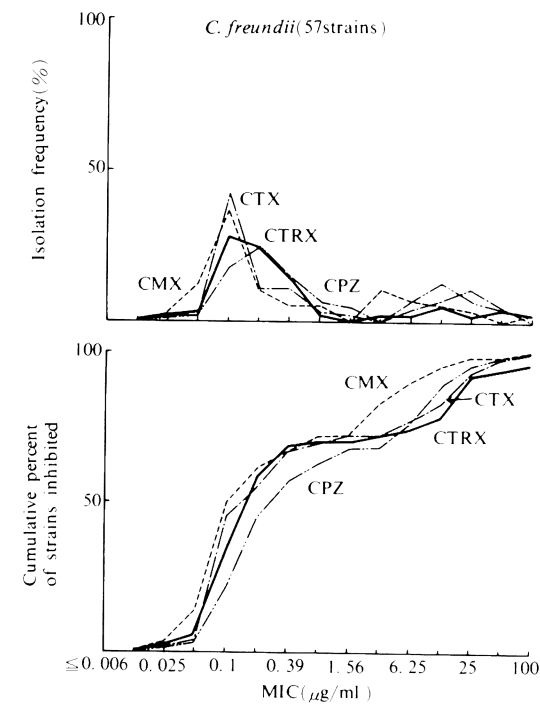


Fig. 6 Antibacterial activity of CTRX

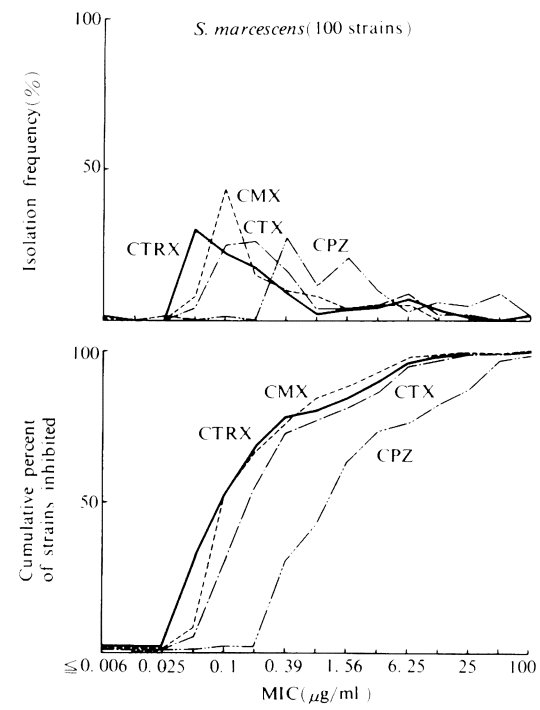


Fig. 7 Antibacterial activity of CTRX

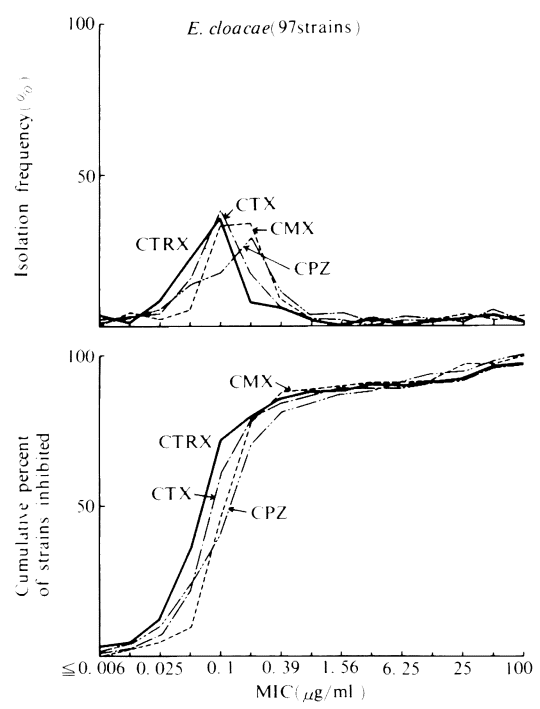


Fig. 8 Antibacterial activity of CTRX

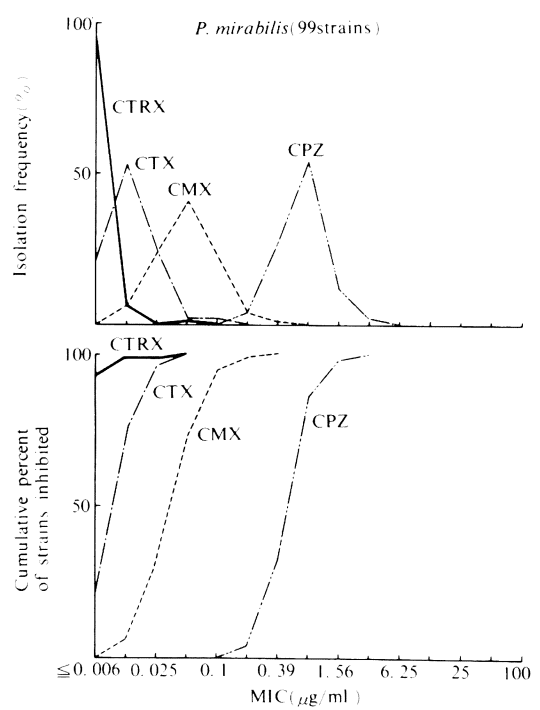


Fig. 9 Antibacterial activity of CTRX

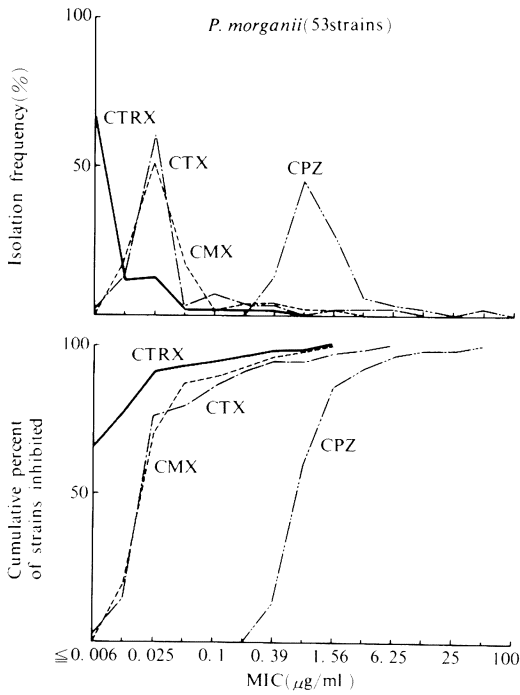


Fig. 11 Antibacterial activity of CTRX

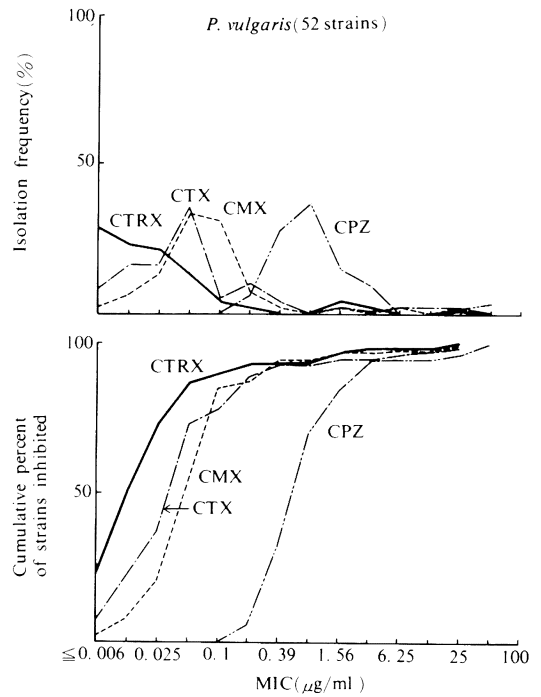


Fig. 10 Antibacterial activity of CTRX

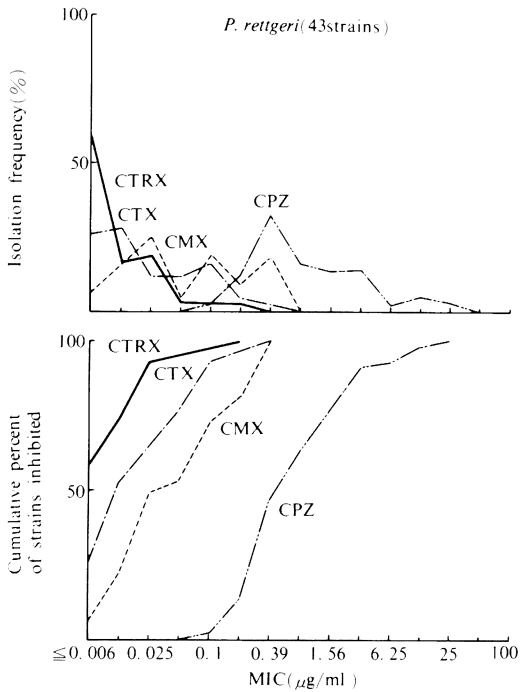


Fig. 12 Antibacterial activity of CTRX

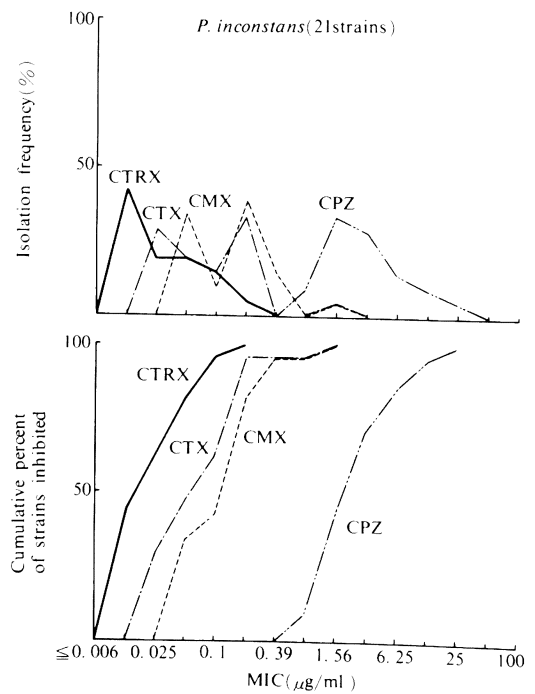


Fig. 13 Antibacterial activity of CTRX

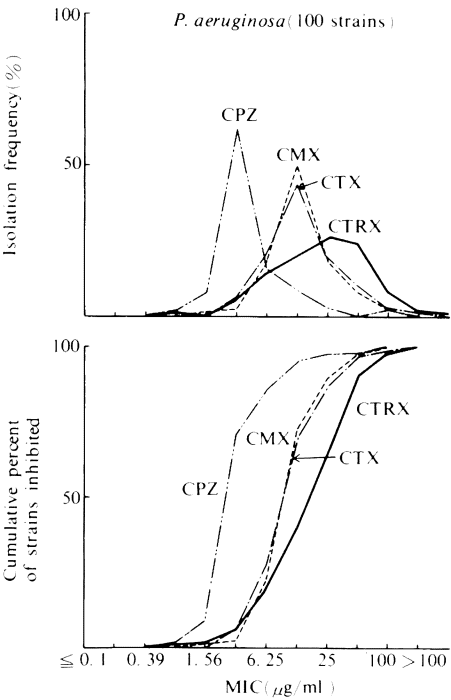


Fig. 14 Antibacterial activity of CTRX

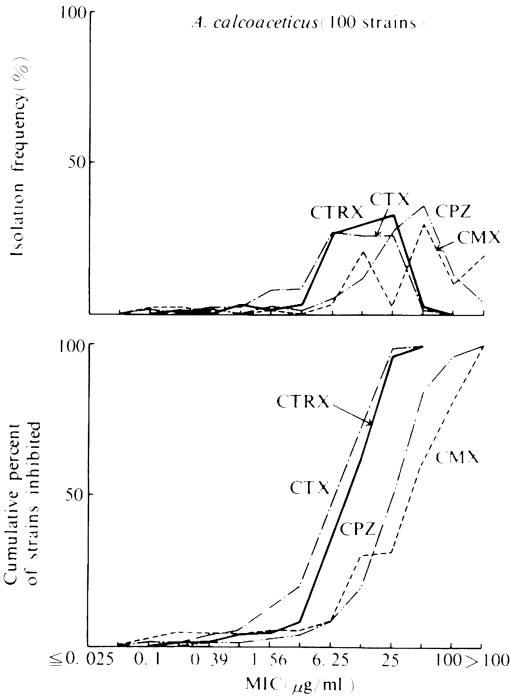


Fig. 15 Antibacterial activity of CTRX

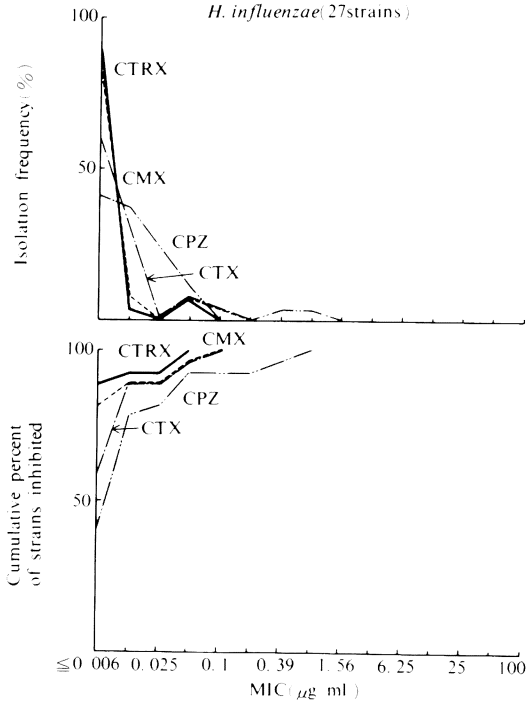


Fig. 16 Antibacterial activity of CTRX

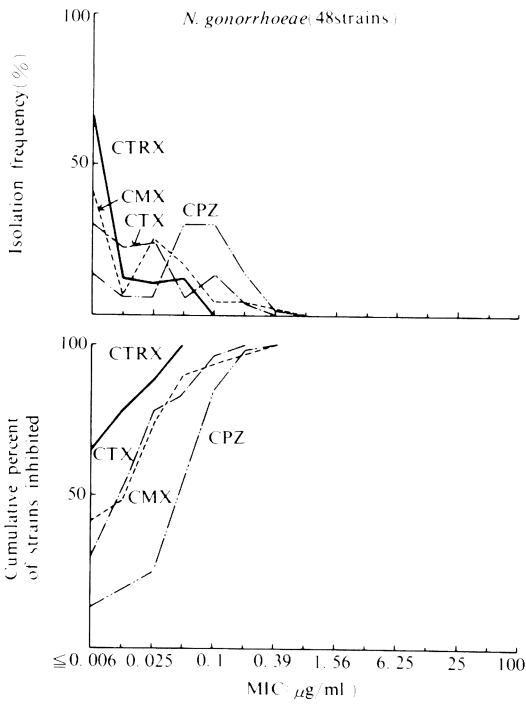


Fig. 17 Antibacterial activity of CTRX

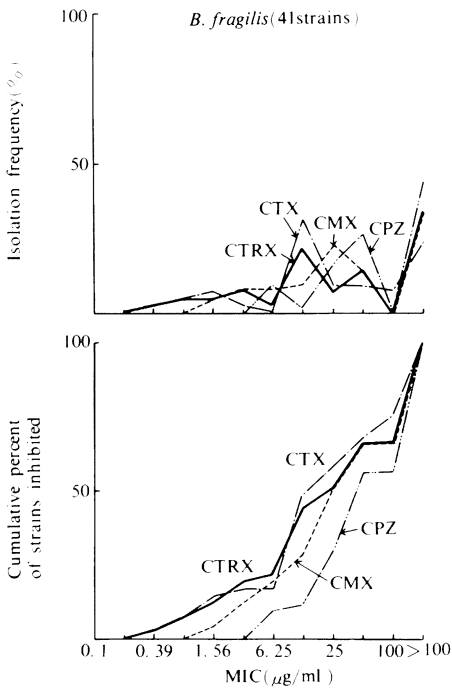


Fig. 19 Antibacterial activity of CTRX

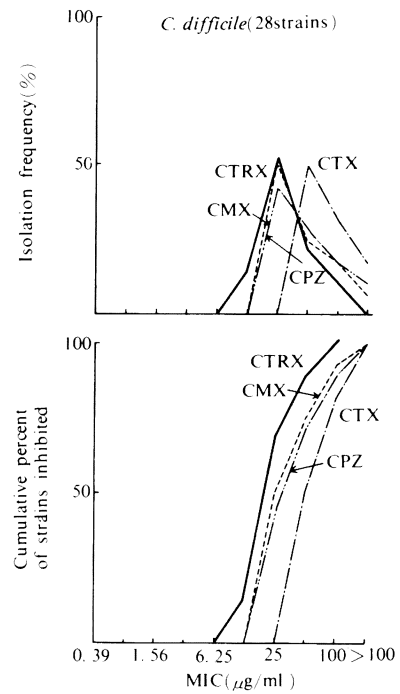


Fig. 18 Antibacterial activity of CTRX

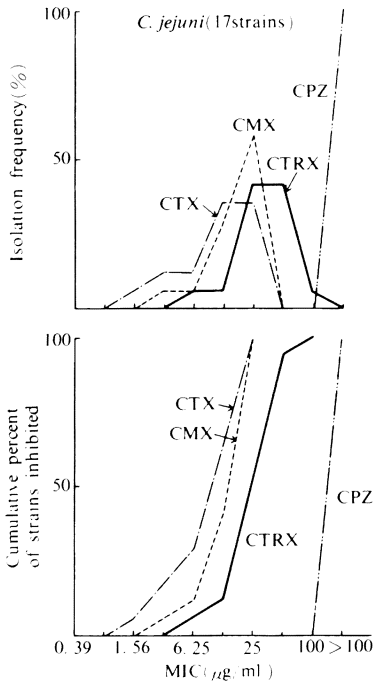


Fig. 20 Antibacterial activity of CTRX

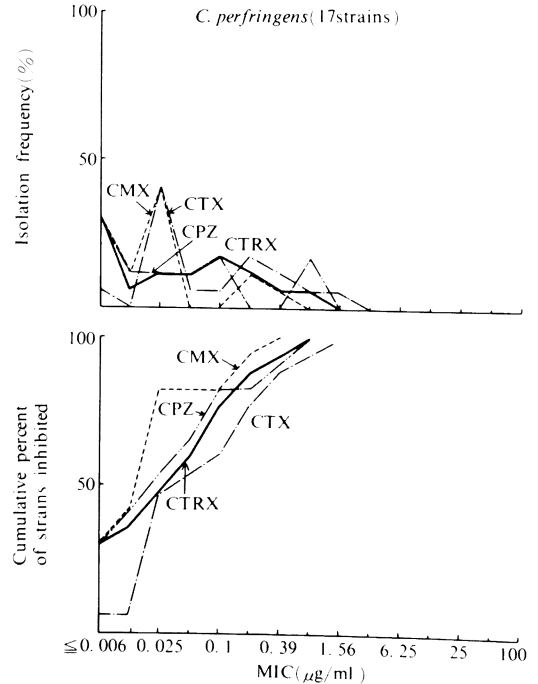


Table 2 Antibacterial activity of CTRX

Test strains	No. of strains tested	MIC (μg/ml) for							
		50% Inhibition				90% Inhibition			
		CTRX	CMX	CTX	CPZ	CTRX	CMX	CTX	CPZ
<i>S. aureus</i>	99	3.13	0.78	0.78	1.56	3.13	0.78	1.56	1.56
<i>S. epidermidis</i>	62	3.13	1.56	1.56	1.56	25	12.5	25	12.5
<i>E. coli</i>	98	0.05	0.1	0.05	0.2	0.05	0.1	0.1	1.56
<i>K. pneumoniae</i>	107	0.05	0.05	0.05	0.2	0.1	0.1	0.1	3.13
<i>C. freundii</i>	57	0.2	0.1	0.2	0.39	25	12.5	25	25
<i>S. marcescens</i>	100	0.1	0.1	0.2	1.56	6.25	3.13	6.25	50
<i>E. cloacae</i>	97	0.1	0.2	0.1	0.2	12.5	3.13	12.5	6.25
<i>P. mirabilis</i>	99	≤0.006	0.05	0.012	0.78	≤0.006	0.1	0.025	1.56
<i>P. morganii</i>	53	≤0.006	0.025	0.025	0.78	0.025	0.2	0.2	3.13
<i>P. vulgaris</i>	52	0.012	0.05	0.05	0.78	0.1	0.2	0.39	3.13
<i>P. rettgeri</i>	43	0.006	0.05	0.012	0.78	0.025	0.39	0.1	3.13
<i>P. inconstans</i>	21	0.025	0.2	0.1	3.13	0.1	0.39	0.2	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	100	25	12.5	12.5	3.13	50	25	50	12.5
<i>P. cepacia</i>	59	25	50	25	50	100	100	50	100
<i>P. maltophilia</i>	22	100	25	25	3.13	100	100	100	25
<i>A. calcoaceticus</i>	100	12.5	50	12.5	50	25	100	25	100
<i>H. influenzae</i>	27	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.012	≤0.006	0.05	0.025	0.025
<i>N. gonorrhoeae</i>	48	≤0.006	0.025	0.012	0.05	0.05	0.05	0.1	0.2
<i>B. fragilis</i>	41	25	25	12.5	50	>100	>100	>100	>100
<i>C. difficile</i>	28	25	25	50	50	100	100	>100	>100
<i>C. perfringens</i>	17	0.05	0.025	0.05	0.025	0.39	0.2	0.78	0.39
<i>C. jejuni</i>	17	25	25	12.5	>100	50	25	25	>100

も優れた抗菌力を示した。

P. mirabilis に対して CTRX は MIC₉₀ でも ≤0.006 μg/ml で CMX, CTX, CPZ の MIC₉₀ はそれぞれ 0.1, 0.025, 1.56 μg/ml と CTRX が著しく強い抗菌力を有し、最も優れていた (Fig. 8)。

Indole-positive *Proteus* sp. では *P. morganii* に対しては CTRX は ≤0.006 μg/ml に感受性ピークを有し MIC₉₀ も 0.025 μg/ml と非常に強い抗菌力を示し、CMX, CTX, CPZ の MIC₉₀ 0.2, 0.39, 3.13 μg/ml と比較しても最も優れていた (Fig. 9)。

P. rettgeri に対しては CTRX は ≤0.006 μg/ml の濃度で約60%の菌の発育を阻止し MIC₉₀ でも 0.025 μg/ml と CMX, CTX, CPZ の 0.39, 0.1, 3.13 μg/ml より10倍以上優れていた (Fig. 10)。

P. vulgaris に対しても CTRX は ≤0.006 μg/ml に感受性ピークを有しており CMX, CTX, CPZ のそれぞれの感受性ピークは 0.025, 0.025, 0.78 μg/ml であり、や

はり 4 剤の中で最も優れた強い抗菌力を有していた (Fig. 11)。

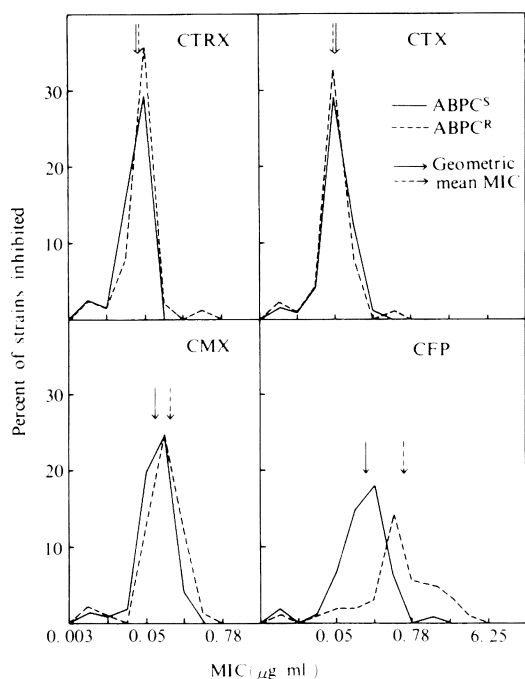
P. inconstans に対しては CTRX は 0.012 μg/ml に感受性ピークを有し MIC₉₀ は 0.1 μg/ml と強い抗菌力を示し、CMX, CTX, CPZ の MIC₉₀ 0.39, 0.2, 12.5 μg/ml と比べても優れていた (Fig. 12)。

しかしながら *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia* および *A. calcoaceticus* に対して本剤は他の 3 剤と同様、これまでに述べたグラム陰性菌群に対する強い抗菌力に比べると劣っていた。

P. aeruginosa に対しては CTRX の MIC₉₀ は 50 μg/ml であり CMX, CTX, CPZ のそれは、それぞれ 25, 50, 12.5 μg/ml で CPZ よりやや劣っていた (Fig. 13)。

A. calcoaceticus に対しては CTRX は 6.25~25 μg/ml に感受性ピークを示し、ほぼ CTX と同等で MIC₉₀ が 25 μg/ml であり CMX, CPZ の 100 μg/ml と比べ 4 倍優れていた (Fig. 14)。

Fig. 21 Antibacterial activity of CTRX against Ampicillin-resistant *E. coli*



H. influenzae に対して CTRX は $0.006\mu\text{g/ml}$ 以下で約90%の菌株を発育阻止する非常に強い抗菌力を有し、他剤と比較しても最も優れていた (Fig. 15)。

N. gonorrhoeae に対しても CTRX は $0.05\mu\text{g/ml}$ で菌株の全てを発育阻止しており、やはり他剤よりもさらに強い抗菌力であった (Fig. 16)。

嫌気性菌では、*B. fragilis* に対して CTRX は $0.39\sim 100\mu\text{g/ml}$ に広範囲な感受性分布を有し、その抗菌力は CTX とほぼ同等であった (Fig. 17)。

C. jejuni および *C. difficile* に対しては CTRX は $25\mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを有し、その抗菌力は CMX と同等であった (Fig. 18, 19)。

C. perfringens に対しても MIC_{90} $0.39\mu\text{g/ml}$ と他剤とほぼ同等の抗菌力であった (Fig. 20)。

3. ABPC 耐性菌に対する抗菌力

ABPC に $25\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性をもつ *E. coli* 54 株について CTRX の抗菌力を検討した。その結果 ABPC 感受性菌 (69株) および耐性菌に対する geometric mean MIC は CPZ の場合 4 倍差があるのに対し CTRX は $0.033\mu\text{g/ml}$ および $0.039\mu\text{g/ml}$ とほとんど差は認められなかった (Fig. 21)。

4. MIC と MBC の比較

Table 3 Relation of MBC to MIC of CTRX

Test strains	MBC/MIC (fold)			
	CTRX	CMX	CTX	CPZ
<i>E. coli</i> (4)	1	1	1.4	1
<i>E. cloacae</i> (3)	11.33	8.67	16.67	8.33
<i>K. pneumoniae</i> (4)	1.25	1.75	1.5	2.5
<i>S. marcescens</i> (3)	4.33	4.67	8	22.67
<i>P.morganii</i> (3)	1.33	1.67	2.33	2.33
<i>P. mirabilis</i> (4)	1	2	2	1.25
<i>P. vulgaris</i> (3)	3.33	2.33	4.67	1
<i>P. rettgeri</i> (1)	1	1	1	2
<i>P. aeruginosa</i> (4)	1.75	1.75	1.25	1.5
<i>S. aureus</i> (5)	1.4	2.4	1.6	1.2

() : The number of strains tested

10菌種については MIC と MBC との関係について検討した。その結果、4 剤共にはほぼ同様の傾向を示した。*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.morganii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* においては MIC と MBC との間に差は認められず、強い抗菌作用を示した。一方、*P. vulgaris* では CTRX および CTX に若干の差が、そして *S. marcescens* では 4 剤共にはっきりした差が MIC と MBC の間に認められた (Table 3)。

5. 殺菌効果

P.morganii IFO 3848, *E. coli* NIHJ JC-2 について CTRX の殺菌効果を検討した。

CTRX は *P.morganii* に対し $0.003\mu\text{g/ml}$ ($1/2\text{MIC}$) で殺菌的に作用しかつ24時間後でも再増殖は認められなかった。一方 CTX は $0.012\mu\text{g/ml}$ (2 MIC) では再増殖は認められなかったが、しかし $0.006\mu\text{g/ml}$ (1 MIC) では24時間後には再増殖が認められた (Fig. 22)。

E. coli に対しては CTRX は $0.05\mu\text{g/ml}$ では殺菌的に作用するが CTX は4時間目ですでに再増殖が認められた。 $0.1\mu\text{g/ml}$ では両剤共に24時間後でも再増殖はなかった (Fig. 23)。

6. β -lactamase に対する安定性

CTRX の各種 β -lactamase に対する安定性を PCG および CER, CMX, CTX, CPZ, CET, CXM の6種 cephalosporin 剤を基質として用いこれらの薬剤との相対加水分解速度をもって比較検討した。CTRX は CMX, CTX と同様に R-plasmid mediated の I, II, III, IV の¹²⁻¹⁵⁾各 type PCase 全てに安定であり、また CSase に対しては *P. vulgaris*, *P. cepacia*, *B. fragilis* の産生する cefuroximase (CXase)¹⁶⁾を除き、*E. coli*, *E. cloacae*, *C.*

Fig. 22 Bactericidal activity of CTRX against *P. morganii* IFO 3848

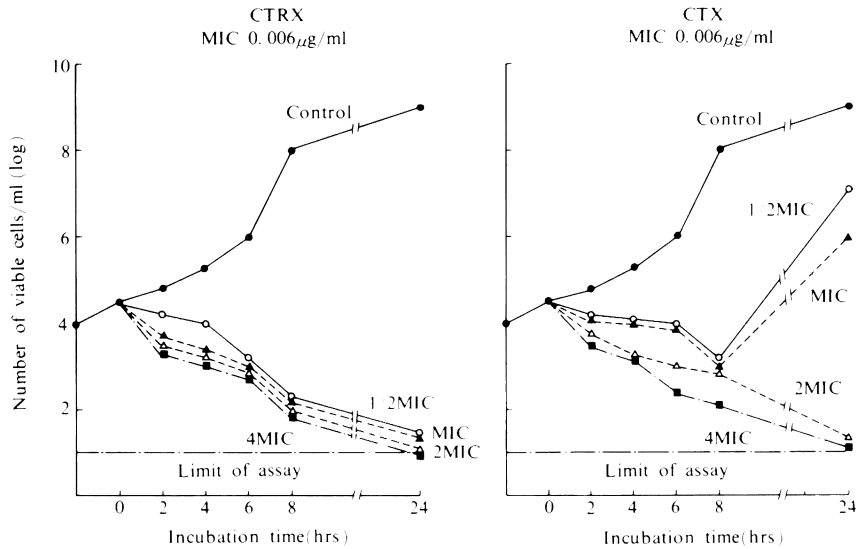
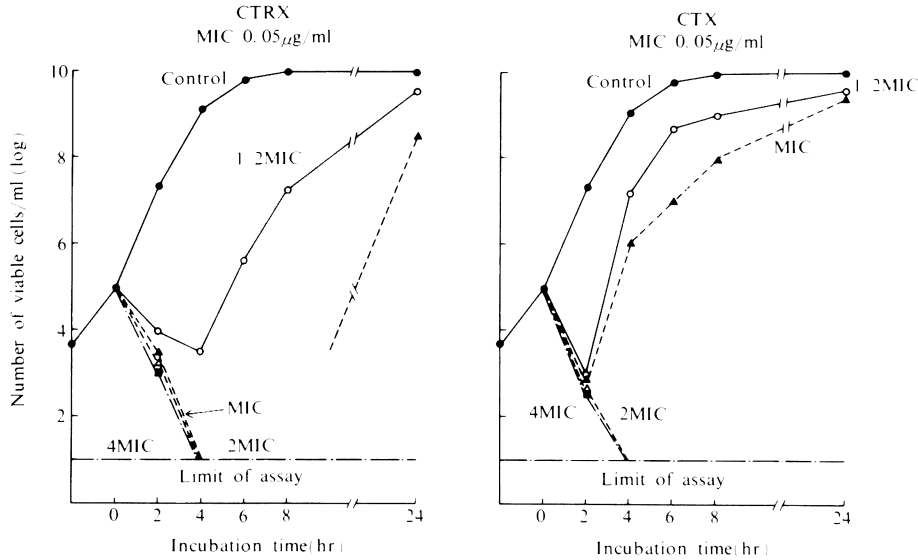


Fig. 23 Bactericidal activity of CTRX against *E. coli* NIHJ JC-2



freundii, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. rettgeri*, *P. morganii* の典型的 CSase 全てに対し安定であった (Table 4)。

なお、CTRX は上記の β -lactamase 産生株に対しても強い抗菌力を示していた。

7. Penicillin binding proteins に対する親和性
E. coli PBPs に対する CTRX の親和性を¹⁴C-PCG を用いた competition により検討し、得られた結果をフル

オログラフィーにかけ求めた。
その結果 CTRX は PBP-3、-1A、1Bs、2 の順に強い親和性を示した。また PBP-4 に対する本剤の結合は弱く、PBP-5、6 にはほとんど親和性を示さなかった (Fig. 24)。PBP-3^{17,18)}の阻害は隔壁のないフィラメント細胞を形成し溶菌させ、PBP-1 A、-1Bs^{19,20)}はペブチドクリカン生合成に関与している酵素であり阻害をうけると溶菌する。また PBP-2 は細胞壁伸長の開始

Table 4 β -Lactamase stability of CTRX compared with β -lactam antibiotics

Enzyme source	Type of β -lactamase		Relative velocity of hydrolysis ^a							
			CER	CTRX	CMX	CTX	CPZ	CET	CXM	PCG
<i>E. coli</i> GN5482 ^d	CSase	(c) ^b	100	<1	<1	<1	4	269	<1	63
<i>E. cloacae</i> GN7471 ^d	CSase	(i) ^c	100	<1	<1	<1	1	189	<1	12
<i>C. freundii</i> GN7391 ^d	CSase	(i)	100	<1	<1	<1	1	125	<1	3
<i>S. marcescens</i> GN10857 ^d	CSase	(i)	100	<1	<1	<1	2	88	<1	3
<i>P. aeruginosa</i> GN10362 ^d	CSase	(i)	100	<1	<1	<1	5	139	<1	29
<i>P. rettgeri</i> GN4403 ^d	CSase	(i)	100	<1	<1	<1	<1	85	<1	3
<i>P. morganii</i> GN5407 ^d	CSase	(i)	100	<1	<1	<1	<1	46	<1	16
<i>P. vulgaris</i> GN7919 ^d	CXase	(i)	100	112	39	84	15	173	1,140	20
<i>P. cepacia</i> GN11164 ^d	CXase	(i)	100	171	98	174	10	323	238	161
<i>B. fragilis</i> GN11478 ^d	CXase	(c)	100	8	3	7	7	81	50	3
<i>E. coli</i> W3630 (Rms212) ^e	PCase type I	(c)	70	<1	<1	<1	58	7.3	<1	100
<i>E. coli</i> W3630 (Rms213) ^e	PCase type II	(c)	45	<1	<1	<1	29	9.2	<1	100
<i>E. coli</i> W3630 (Rte16) ^e	PCase type III	(c)	50	<1	<1	<1	2	10	<1	100
<i>P. aeruginosa</i> ML4259 (Rms139) ^e	PCase type IV	(c)	9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100

a Hydrolysis of each substrate by PCase and CSase is expressed as a relative rate of hydrolysis
Taking the absolute rate of PC-G or CER hydrolysis as 100
b Constitutive β -lactamase, c Inducible β -lactamase, d Chromosome-mediated, e R-plasmid mediated

Fig. 24 Affinity of CTRX for *E. coli* PBPs

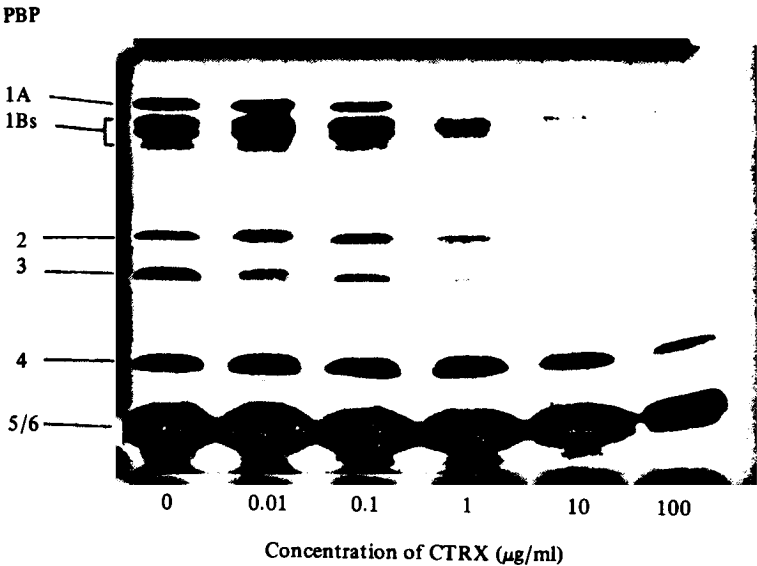


Table 5 Comparative *in vivo* activity of CTRX, CTX and CPZ

Strain	MIC (μg/ml)			Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/kg)		
	CTRX	CTX	CPZ		CTRX	CTX	CPZ
<i>E. coli</i> ML 4707	0.05	0.05	0.1	9.7 × 10 ⁶	0.086 (0.05 ~ 0.15)	13.0 (5.5 ~ 31)	15 (7.2 ~ 31)
<i>S. marcescens</i> GN 7577	0.1	0.39	1.56	1.3 × 10 ⁵	0.13 (0.09 ~ 0.19)	0.31 (0.11 ~ 0.84)	7.1 (3.9 ~ 13)
<i>P. vulgaris</i> GN 5737	0.05	0.39	3.13	1.2 × 10 ⁵	1.0 (0.54 ~ 1.9)	19.0 (9.7 ~ 37)	170 (57 ~ 550)
<i>P. aeruginosa</i> IX 190	25	12.5	6.25	1.7 × 10 ⁵	32 (23 ~ 45)	>250	240 (120 ~ 450)

Mouse : ICR, SPF 20 ± 2 g
Challenge : i.p.
Time of treatment : s.c., 0 hr after challenge

反応の酵素であり阻害されると球形細胞を形成し溶菌すると報告されている。そして CTRX の PBP_s に対する親和性の結果から考えられる形態学的変化と実際 CTRX を *E. coli* に作用させた時の形態学的変化²¹⁾は一致した。

8. マウス感染治療効果

E. coli ML 4707, *S. marcescens* GN 7577, *P. vulgaris* GN 5737, *P. aeruginosa* IX 190 の4菌種を用い CTRX の生体抗菌力を CTX および CPZ を対照薬として比較検討した (Table 5)。

CTRX は *E. coli* ML 4707 に対し CTX, CPZ のそれぞれ約1/150量および1/170量で, *S. marcescens* GN 7577 に対しては CTX の1/2~1/3量, CPZ の約1/55量で, また *P. vulgaris* GN 5737 に対しては CTX の1/19量, CPZ の1/170量で, さらに *P. aeruginosa* IX 190 に対しても CTX の1/8量以下, CPZ の約1/8量で同等の治療効果を示しており, 生体内においても *in vitro* の強い抗菌力から期待される以上の優れた抗菌力を有していた。特に *P. aeruginosa* IX 190 においては MIC 値が CTX, CPZ より2~4倍高い値であるにもかかわらず治療効果では逆に8倍あるいはそれ以上に優れていた。

III. 考 察

CTRX 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ており, 特にグラム陰性菌群に対し強い抗菌力を示すがその中でも Indole 陽性および陰性 *Proteus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* 等に対し, 非常に強い抗菌力を有していた。これらの要因として CTRX が各種 β-lactamase に安定

であることはもちろん, PBP_sへの親和性の強さなどが考えられる。

また, CTRX は *in vitro* での強い抗菌力から期待される以上に生体内でも優れた抗菌力を有していたか, これは前述した要因に加え CTRX がこれまでの β-lactam 剤の中で最も長い血中半減期²²⁾を有することが関係しているものと思われる。

これらの要因についてはさらに詳細な検討が望まれるが, 基礎的結果と合わせて CTRX が臨床的にも良好な結果をもたらすことが期待できることを示唆している。

文 献

1) REINER, R.; U. WEISS, U. BROMBACHER, P. LANZ, M. MONTAVON, A. FURLENMEIER, P. ANGEHRN & P. J. PROBST : Ro 13-9904/001, a novel potent and long-acting parenteral cephalosporin. *J. Antibiot.* 33 : 783 ~ 786, 1980
2) ANGEHRN, P.; P. J. PROBST, R. REINER & R. L. THEN : Ro 13-9904, a long-acting broad-spectrum cephalosporin : *In vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 : 913 ~ 921, 1980
3) SHANNON, K.; A. KING, C. WARREN & I. PHILLIPS : *In vitro* antibacterial activity and susceptibility of the cephalosporin Ro 13-9904 to β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 : 292 ~ 298, 1980
4) SHELTON, S.; J. D. NELSON & G. H. MC CRACKEN, JR : *In vitro* susceptibility of gram-negative bacilli from pediatric patients to moxalactam, cefotaxime, Ro 13-9904, and other cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 : 476 ~ 479, 1980
5) 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
- 6) LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
 - 7) ROSS, G. W.; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. M. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O' CHALLAGHAN : Comparison of assay technique for β -lactamase activity. Anal. Biochem. 54 : 9~16, 1973
 - 8) WALEY, S. G. : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139 : 780~789, 1974
 - 9) SPRATT, B. G.; Properties of penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. Eur. J. Biochem. 72 : 341~352, 1977
 - 10) NOGUCHI, H.; M. MATSUHASHI & S. MITSUHASHI : Comparative studies of Penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 100 : 41~49, 1979
 - 11) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92 : 99~113, 1948
 - 12) 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
 - 13) YAGINUMA, S.; N. TERAOKA, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI : Biochemical properties of penicillin beta-lactamase mediated by R factor from Bordetella bronchiseptica. Antimicrob. Agents Chemother. 8 : 238~242, 1975
 - 14) 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
 - 15) SAWADA, Y.; S. YAGINUMA, M. TAI, S. IYOBE & S. MITSUHASHI : Plasmid-mediated penicillin β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 55~60, 1976
 - 16) MITSUHASHI, S. & M. INOUE : β -Lactam antibiotics. Academic Press, New York, pp. 361~375, 1981
 - 17) SUZUKI, H.; Y. NISHIMURA & Y. HIROTA : On the process of cellular division in *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 : 664~668, 1978
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) MATSUHASHI, 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
 - 21) MITSUHASHI, S.; Y. SEKINE, M. ARISAWA, M. INOUE, J. OHSHIMA & H. B. MARUYAMA : Ceftriaxone (Ro 13-9904), a Long-Lasting Cephalosporin Further studies on the mode of antibacterial action. Current Chemotherapy & Immunotherapy, Proceeding of the 12th International Congress of Chemotherapy, Florence, Italy 19~24 July, pp. 445~446, 1981
 - 22) SEDDON, M.; R. WISE, A. P. GILLET & LIVINGSTON : Pharmacokinetics of Ro 13-9904, a broad-spectrum cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 18 : 240~242, 1980

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFTRIAXONE (Ro 13-9904)

YUZURU SEKINE and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

MATSUHISA INOUE

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) is a new semisynthetic cephalosporin. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of CTRX were compared with those of cefmenoxime (CMX), cefotaxime (CTX) and cefoperazone (CPZ) using clinical isolates and some standard strains stocked in our laboratories.

Main results obtained can be summarized as follows:

1) CTRX had a broad spectrum, showing a strong antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria. Its *in vitro* activity was in general superior to that of CPZ a little higher than those of CTX and CMX. Especially, CTRX exhibited an extraordinarily high activity against *Proteus* species, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *E. coli* and *K. pneumoniae* inhibiting more than 90% of all strains at less than 0.1 µg/ml.

2) CTRX was much more stronger in terms of bactericidal activity than CTX on *P. morganii* and *E. coli* tested.

3) CTRX was found very stable to any penicillinases and cephalosporinases except to cefuroximases produced by *B. fragilis*, *P. cepacia* and *P. vulgaris*. Increase in MIC values were not observed even when tested with β-lactamase-producing bacteria.

4) CTRX had the highest affinity for PBP-3 of *E. coli*, an enzyme responsible for septum formation, followed by 1A, 1Bs and 2.

5) CTRX exhibited higher activity than CTX and CPZ in the experimental infection model with *E. coli*, *S. marcescens*, *P. vulgaris* and *P. aeruginosa*. The superiority of CTRX in activity to the others was much larger in *in vivo* than in *in vitro*, emerging a pretty difference in activity *in vivo* even with strains having the same *in vitro* susceptibility to all the drugs used.