

Ceftriaxone (Ro 13-9904)に関する細菌学的検討

大島 純子・鬼塚 光子・鳥越 俊恵
山崎 敏和・有沢 幹雄・丸山 博巳
日本ロシュ研究所微生物学化学療法部

要 旨

広域抗菌スペクトラムを有する ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)の臨床分離株に対する分布を調べたところ、いわゆる第3世代セフェムの特徴を示し、グラム陽性菌、特に *S. faecalis* には効力が低いが、グラム陰性菌に対しては概して強い抗菌力を示した。総じて、CTRX は *Proteus* 属や *H. influenzae* に極めて強い活性を有しており、他のグラム陰性菌に対しては cefotaxime (CTX)と同程度で、cefmetazole (CMZ), cefazolin (CEZ)より優れた抗菌活性を示した。

その抗菌力は培地の種類、pH、血液添加の有無に影響されず、主な形態変化はフィラメント化であった。

*E. coli*のペニシリン結合蛋白質(PBP)に対する親和性は、PBP 3に対して最も強く、次いで PBP1A, 1Bs, 2の順であった。*P. vulgaris*のPBPに対しても、*E. coli*のPBP 3に対応すると思われるものに対して最も強く結合した。

また、 β -ラクタマーゼによる加水分解に対して強い抵抗性を示し、 β -ラクタマーゼ産生株に対しても優れた抗菌活性を有していた。

結 言

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)は広域抗菌スペクトラムを有し、 β -ラクタマーゼに安定な、いわゆる第3世代のセファロスポリン剤である¹⁻³⁾。我々は各種臨床分離株に対するCTRXの抗菌活性、殺菌作用、ペニシリン結合蛋白質に対する親和性、 β -ラクタマーゼに対する安定性について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 959 μ g/mg は、F. Hoffmann-La Roche (スイス)で合成したものを用いた。Cefotaxime (CTX 932 μ g/mg, ヘキストジャパン), cefazolin (CEZ 944 μ g/mg, 藤沢), cefmetazole (CMZ 959 μ g/mg, 三共), cephaloridine (CER 910 μ g/mg, 塩野義), ceftizoxime (CZX, 813 μ g/mg, 藤沢), cefmenoxime (CMX 743 μ g/mg, 武田), benzyl-penicillin (PCG 910 μ g/mg, 明治製菓)を比較薬剤として用いた。

2. 使用菌株

保存標準菌株46株および、1981, 1982年に各種臨床材料から分離した *E. coli* 72株, *K. pneumoniae* 27株, *K.*

oxytoca 16株, *Enterobacter* sp. 26株, *C. freundii* 21株, *Proteus* sp. 37株, *S. marcescens* 34株, *S. liquefaciens* 14株, *H. influenzae* 8株, *Acinetobacter* sp. 26株, *P. aeruginosa* 81株, *P. cepacia* 16株, *S. aureus* 29株, *S. epidermidis* 54株, *Streptococcus* sp. 45株, *S. faecalis* 54株, *Micrococcus* sp. 22株を用いた。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法⁴⁾に準じた寒天平板希釈法に従って、MICを測定した。薬剤濃度は100 μ g/mlから2倍希釈し、培地は通性嫌気性菌には Mueller-Hinton Agar (M. H., Difco) または Heart Infusion Agar (HIA, 栄研) を、嫌気性菌には GAM 培地 (栄研) を用い、*Streptococcus* sp., *H. influenzae* では5%馬脱線維素血液を加えたチョコレート寒天を用いた。接種菌液は10⁶ cells/mlとし、37℃で20~24時間培養後判定した。

培地検討には HI, Brain Heart Infusion Agar (BHI, 栄研), MH, トリプトソイ寒天 (TSA, 栄研), 普通寒天 (NA, 栄研) の5種類の培地を用いた。

4. 形態の観察

各薬剤を含む TSA に約3 $\times$ 10³の菌を接種し、37℃で培養した。寒天平板上における細菌の形態変化は位相差顕微鏡下で直接観察し、各形態の占める割合は写真によ

り判定した。

5. ペニシリン結合蛋白質 (PBP) に対する親和性

松橋らの方法⁵⁾に従って行った。PBPとCTRXとの結合はブレインキュベーション法で調べ、¹⁴C-PCG (Amersham, 54 mCi/m mol) の結合を50%阻害するCTRX濃度(IC₅₀, μ g/ml)は島津二波長クロマトスキャナーCS-910でフィルムの黒化度を測定して求めた。

6. β -ラクタマーゼの調製

試験菌はトリプトソイブロス(栄研)で一夜培養後同培地に1/40量植菌し、37°Cで2時間培養し、 β -ラクタマーゼ誘導のためPCG(200 μ g/ml)を添加し、さらに2時間培養した。菌体は集菌、洗浄後0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、超音波により破碎した。100,000 $\times$ g, 30分遠心の上澄を2%ストレプトマイシン処理、透析し、再度超遠心(100,000 $\times$ g, 30分)して得られた上澄を粗酵素液として用いた。粗酵素液は5~10mg/mlの蛋白質を含み、-20°Cまたは-70°Cで1年以上安定であった。ただし、*B. fragilis*の酵素は-20°Cでは半減期約4ヶ月で失活した。

7. β -ラクタマーゼ活性の測定

β -ラクタマーゼの活性はG. W. RossとC. H. O'CALLAGHANの方法⁶⁾に準拠し、紫外線吸光度分析法により37°Cで測定した。緩衝液として0.1Mリン酸(pH 7.0)、基質濃度0.1mM、粗酵素液10 μ lを含む2 mlの反応液中で反応させた。 β -ラクタマーゼ阻害活性は、CERを基質として酵素添加により反応を開始する方法で測定した。活性はCERのみの反応液の分解率を100として相対的な値で示した。

II. 実験結果および考察

1. 抗菌スペクトラム (Table 1)

標準菌46株を用い、CTX, CZX, CEZを対照薬として抗菌スペクトラムを調べTable 1にまとめた。

CTRXはグラム陰性菌に非常に強い抗菌活性を示し、ほとんどの菌株に対し0.1 μ g/ml以下のMICを示した。一方、グラム陽性菌、嫌気性菌に対する活性はグラム陰性菌に対する活性よりは弱かったが、*S. faecalis*や一部の嫌気性菌を除いては1.56 μ g/ml以下のMICを示し、CTRXが広い抗菌スペクトラムを有する抗菌剤であることが分った。

対照薬との比較では、CTX, CZXとはスペクトラムは酷似しており、CEZよりは広いスペクトラムを示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離されたグラム陽性およびグラム陰性通性嫌気性菌582株のCTRX, CTX, CEZ, およびCMZに対する感受性分布をTable 2~18に示した。

1) *S. aureus*

Table 2に示したように、CTRXのMIC₅₀, MIC₇₀値は3.13 μ g/ml, 12.5 μ g/mlで抗菌力はCTX, CEZ, CMZよりやや劣っていた。

2) *S. epidermidis*

Table 3に示したように、CTRXのMIC₅₀, MIC₇₀値は6.25 μ g/ml, 25 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXよりやや劣り、CEZ, CMZよりやや優れていた。

3) *Streptococcus* sp.

Table 4に示したように、CTRXのMIC₅₀, MIC₇₀値は6.25 μ g/ml, 25 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXよりやや劣り、CEZ, CMZよりやや優れていた。

4) *S. faecalis*

Table 5に示したように、CTRXのMIC₅₀, MIC₇₀値は25 μ g/ml, 100 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXよりやや劣り、CEZ, CMZより優れていた。

5) *Micrococcus* sp.

Table 6に示したように、CTRXのMIC₅₀, MIC₇₀値は6.25 μ g/ml, 25 μ g/mlで、その抗菌力はCTX, CEZ, CMZよりやや劣っていた。

6) *E. coli*

Table 7に示したように、*E. coli* 72株に対するCTRXのMIC₅₀およびMIC₇₀は0.05 μ g/mlでMIC₉₀は0.1 μ g/mlとなり、CTRXの抗菌力はCTXよりやや強く、CEZ, CMZより優れていた。

7) *K. pneumoniae*

Table 8に示したように、*K. pneumoniae* 27株に対するCTRXのMIC₅₀およびMIC₇₀は0.05 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXと同等でCEZ, CMZより優れていた。

8) *K. oxytoca*

Table 9に示したように、*K. oxytoca* 16株に対するCTRXのMIC₅₀およびMIC₇₀は0.05 μ g/mlおよび0.1 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXよりやや劣り、CEZ, CMZより優れていた。

9) *Enterobacter* sp.

Table 10に示したように、CTRXのMIC₅₀およびMIC₇₀は12.5 μ g/mlおよび>100 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXと同等でCEZ, CMZより優れていた。

10) *C. freundii*

Table 11に示したように、CTRXのMIC₅₀およびMIC₇₀は50 μ g/mlおよび100 μ g/mlで、CTRXの抗菌力はCTXとはほぼ同等で、CEZ, CMZより優れていた。

11) *Proteus* sp.

Table 12に示したように、*Proteus* sp. (インドール陰性株27株、インドール陽性株10株)のCTRX, CTX, CEZ,

Table 1 Antibacterial spectrum comparison using type culture strains

Type culture strains	MIC (μg/ml)			
	CTR _X	CZ _X	CT _X	CE _Z
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	3.13	6.25	3.13	0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.56	3.13	0.78	0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	1.56	0.39	0.78	-0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 10389	0.012	≤0.006	≤0.006	0.05
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3826	100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.2	1.56
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.05	0.1	0.05	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	0.05	0.012	0.025	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> IFO 12681	0.2	0.2	0.05	100
<i>Shigella flexneri</i> 2a CPA4807-62	0.012	0.012	0.012	1.56
<i>Shigella flexneri</i> Y NCTC 9730	0.05	0.1	0.025	3.13
<i>Shigella boydii</i> I CPC2064-59	0.012	0.012	0.012	0.78
<i>Shigella sonnei</i> I SH72-415	0.025	0.025	0.025	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> A 144-12-93	0.1	0.05	0.1	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> B 333-76	0.05	0.025	0.1	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> C	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.78
<i>Salmonella newport</i> 563	0.05	0.025	0.05	1.56
<i>Salmonella anatum</i> 677-69	0.1	0.025	0.1	1.56
<i>Salmonella typhi</i> 1099-77	0.05	0.025	0.05	0.78
<i>Salmonella schottmülleri</i> ATCC 8759	0.1	0.025	0.1	0.78
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0.05	0.025	0.1	0.78
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 12529	0.1	0.025	0.1	1.56
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0.025	0.012	0.1	12.5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	0.025	≤0.006	0.025	>100
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6898	0.012	≤0.006	0.012	>100
<i>Proteus rettgeri</i> ATCC 14505	0.1	0.012	0.1	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	0.78	0.2	0.78	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	25	25	25	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9721	1.56	6.25	3.13	>100
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	100	>100	50	
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 25416	50	25	12.5	
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ATCC 13673	50	50	50	
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	50	50	50	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3.13	12.5	3.13	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	3.13	3.13	3.13	12.5
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11828	0.2	0.2	0.39	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	50	100	25	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15705	0.1	0.2	0.1	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15706	0.2	0.39	0.2	
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	0.39	6.25	0.78	
<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	>100	>100	>100	
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 8501	25	100	100	
<i>Bacteroides praeacutus</i> ATCC 25539	0.39	3.13	0.78	
<i>Peptococcus saccharolyticus</i> ATCC 14953	0.78	0.78	0.78	
<i>Peptococcus variabilis</i> ATCC 14956	1.56	3.13	1.56	
<i>Peptococcus variabilis</i> ATCC 14955	1.56	1.56	1.56	

Inoculation: a loopful of 10⁶ cells/ml
Media: HI agar for aerobic and facultatively anaerobic strains, GAM agar for anaerobic strains

Table 2 Susceptibility of 29 strains of *S. aureus* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (µg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX										2	17	1	3	1	3		2
CTX								2	1	16	1	2		5			2
CEZ							4	15			3	1	1	2	2		1
CMZ									8	11	1	4	1	2			2

Table 3 Susceptibility of 54 strains of *S. epidermidis* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (µg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX					1		1	1	5	9	3	6	8	7	3		10
CTX					1		1	9	5	8	4	6	5	2	2		11
CEZ						1	11	4	8	9	3		4	5		1	8
CMZ									8	15	4	4	5	2	2		14

Table 4 Susceptibility of 45 strains of *Streptococcus* sp. against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (µg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX			2	2	5	2	2		1	4		6	3	9	5	2	2
CTX	1		2	2	6	1	1	1	2	1	5	7	3	5	1	3	4
CEZ					1	7	4	4	1	5	2	3	5	7	2		4
CMZ				1			1	3	3	6	4	4	4	2	2	3	12

Table 5 Susceptibility of 54 strains of *S. faecalis* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (µg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX					1					2	5	8	8	5	2	10	13
CTX					1		1	1	4	4	5	6	3	4	1	6	18
CEZ						1					1		8	26	4	3	11
CMZ								1					1	1	1	3	47

Table 6 Susceptibility of 22 strains of *Micrococcus* sp. against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX	1				2			2			4	2	5	3		1	2
CTX			1	1	1	1		3	1	5	2	4		1			2
CEZ				1			1	4	1	9	1	1		1		1	2
CMZ					1				2	5	7	4	1		2		

Table 7 Susceptibility of 72 strains of *E. coli* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX	2			6	42	17	4				1						
CTX	2			4	32	26	3	4				1					
CEZ								1	9	36	7	9	5	2		1	2
CMZ						1	1	6	29	27	2	4	1				1

Table 8 Susceptibility of 27 strains of *K. pneumoniae* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX				2	17	4	1	1		1			1				
CTX				5	14	5	2						1				
CEZ								4	15	3	1	1	1	1	1		1
CMZ								13	10	1	1						1

Table 9 Susceptibility of 16 strains of *K. oxytoca* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX				2	8	2	1					1	1	1			
CTX			1	6	4		1		1	1		1					
CEZ										8	2		2				4
CMZ									12	2							2

Table 10 Susceptibility of 26 strains of *Enterobacter* sp. against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX					1	2	1	2	2	1	1	2	2		2	1	9
CTX					1	2	1	3	2		1		3	1	5		7
CEZ										1				1	2	1	21
CMZ								1	1						1	1	22

Table 11 Susceptibility of 21 strains of *C. freundii* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX					2	2	3	2						1	4	6	1
CTX					2	2	1	3	1					1	9	1	1
CEZ										2				2	3	1	13
CMZ									1	1		1		2	2		14

Table 12 Susceptibility of 37 strains of *Proteus* sp. against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX	11		6	2	5	1		1	5		1		3				2
CTX	2	2	8	5	1	4	4	1	1	1	2	3	1			1	1
CEZ										3	2	4				2	26
CMZ										7	11	7	6		1		5

CMZに対するMIC₅₀はそれぞれ0.025μg/ml, 0.1μg/ml, >100μg/ml, 6.25μg/ml, MIC₇₀はそれぞれ0.39μg/ml, 0.39μg/ml, >100μg/ml, 12.5μg/mlであった。また、CTRXのMICが0.006μg/ml以下である菌株は11株であるのに対してCTXのMICが0.006μg/ml以下である菌株は4株であり、CTRXの*Proteus* sp.に対する抗菌力はCTX, CEZ, CMZより優れていた。イントール陰性、陽性でこの抗菌力傾向に差は認められなかった。

12) *S. marcescens*

Table 13, Fig. 1に示したように、CTRXとCTXのMIC₅₀, MIC₇₀, MIC₉₀値はそれぞれ6.25μg/mlと6.25μg/ml, 25μg/mlと12.5μg/ml, 50μg/mlと100μg/ml

となり、相関図でもCTRXの抗菌力はCTXよりやや優れ、CMZより優れている事が明らかになった。

13) *S. liquefaciens*

Table 14に示したように、CTRXの抗菌力はCTXと同等でCEZ, CMZより優れていた。

14) *H. influenzae*

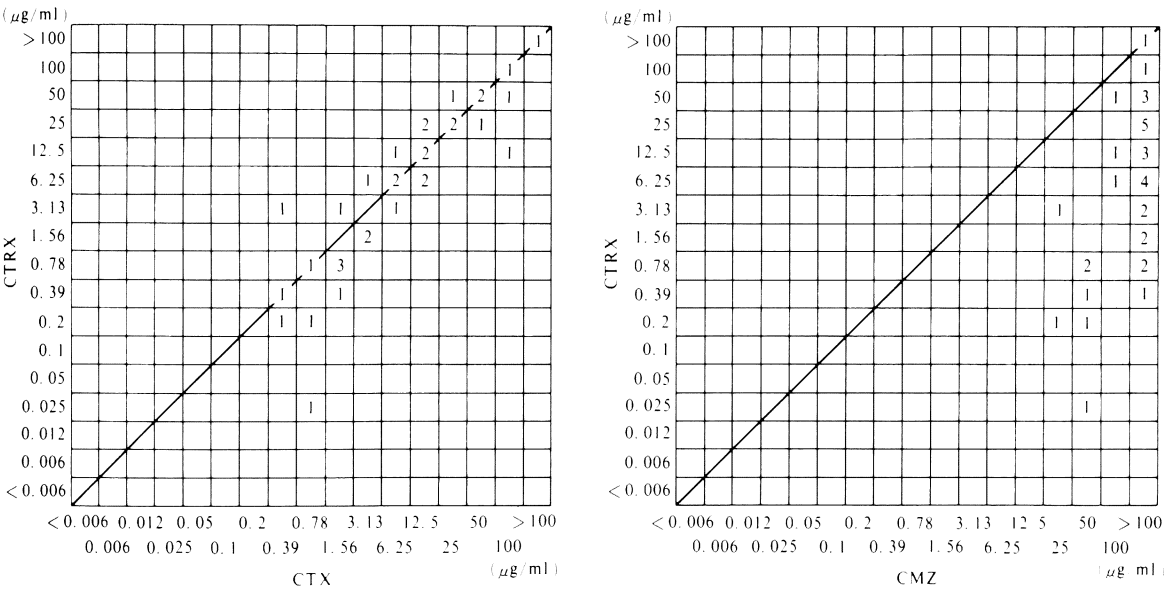
Table 15に示したように、CTRX, CTX, CEZ, CMZのMIC₅₀はそれぞれ0.006μg/ml, 0.012μg/ml, 25μg/ml, 3.13μg/ml, MIC₇₀はそれぞれ0.006μg/ml, 0.025μg/ml, 25μg/ml, 6.25μg/mlとなり、CTRXの抗菌力は、CTX, CEZ, CMZより優れていた。

15) ブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌

Table 13 Susceptibility of 34 strains of *S. marcescens* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX				1			2	2	4	2	3	5	4	5	4	1	1
CTX								3	3	5	3	4	6	3	3	3	1
CEZ																	34
CMZ													2	5		3	24

Fig. 1 Correlogram of MICs between CTRX and CTX or CMZ *S. marcescens*, 34 strains



Acinetobacter sp. 26株について Table 16 に、*P. aeruginosa* 81株について Table 17, Fig. 2 に、また *P. cepacia* 16株について Table 18 に示したように、CTRX の抗菌力は CTX と同等で、CEZ, CMZ より優れていた。なお、*P. aeruginosa* に対する CTRX の MIC₅₀, MIC₇₀, MIC₉₀ 値はそれぞれ 25μg/ml, 50μg/ml, および >100μg/ml であった。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響 (Table 19, 20)

培地の種類、培地 pH、馬血清 (HB) 添加の有無および接種菌量が CTRX の抗菌力に及ぼす影響を標準菌株 10 株を用いて調べた。

Table 19 に示す通り、5 種類の培地で全被験菌とも

MIC の変動は小さく、培地による抗菌力への影響は認められなかった。HIA の pH を 6 から 9 に変えて pH の影響を検討したが、この場合も影響はなかった。馬血清 10%, 25% 添加培地でも MIC に変動はなく、血液も抗菌力に大きな影響を与えない事が分った。

Table 20 に、接種菌量による MIC 変動を調べた結果をまとめた。10⁷ cells/ml の菌液 1 白金耳接種で、*E. cloacae*, *C. freundii* で MIC が若干高くなったが、他の株では変動は小さかった。しかし、10⁸ cells/ml の菌液を接種した場合は *P. vulgaris* に対する MIC が 2 株とも 1,000 倍以上上昇した。この結果は、CTRX が *P. vulgaris* 由来の β-ラクタマーゼに対する安定性に劣るという性

Table 14 Susceptibility of 14 strains of *S. liquefaciens* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX					1		1	2		2	3		1	2			2
CTX						1		1	2	2	1	3	1	1			2
CEZ															1		13
CMZ												1	1				12

Table 15 Susceptibility of 8 strains of *H. influenzae* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX	2	4								1	1						
CTX	1		3	2					1		1						
CEZ										1			2	4	1		
CMZ										1	3	2	2				

Table 16 Susceptibility of 26 strains of *Acinetobacter* sp. against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX										1	3	4	3	6	3		6
CTX										1	1	5	9	4	2	2	2
CEZ														1	1	3	21
CMZ														1	7	8	10

質を反映すると思われるが、一般にβ-ラクタム剤は接種菌量によって抗菌活性が変動することが知られており^{7,8)}、第3世代セフェムにおいてもCTX⁹⁾で報告されている。

4. 抗菌活性と殺菌活性 (Table 21)

8菌種59株を用いてMICとMBCの関係を調べた。対照薬として、CZX, CTX,およびCEZを用いた。

Table 21に何株がMICの何倍のMBCを示したかをまとめ、右欄にはそれらの幾何平均値を示した。CTRXは*P. aeruginosa*以外の全菌種に対しMBC/MIC値の平均が3以下であり、平均してMICの3倍以下の濃度で殺菌されることが分った。つまり、CTRXは他のβ-ラ

クタム剤と同様殺菌的に作用する。他剤との比較では、*C. freundii*に対してCZXより、*P. mirabilis*に対してCZXおよびCTXより優れていたが、*P. aeruginosa*に対してはCZX, CTXより若干劣っていた。

5. 形態変化の観察 (Fig. 3)

Fig. 3にまとめた様に、37℃、4時間培養後の主な形態変化はフィラメント化であった。MICより低濃度でのフィラメント形成が全被験株で認められ、特に*Proteus* sp.においてはMICの1/32の濃度でも形態変化を惹起することが示された。*P. mirabilis*以外ではスフェロプラストの形成がほとんど観察されず、さらに、形態の経時的観察 (data not shown) においてもスフェロプラスト

Table 17 Susceptibility of 81 strains of *P. aeruginosa* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX									2	1	5	4	24	8	16	8	13
CTX									1	2	1	10	22	11	13	10	11
CEZ														1		1	79
CMZ														1	1		79

Fig. 2 Correlogram of MICs between CTRX and CTX or CMZ
P. aeruginosa, 81 strains

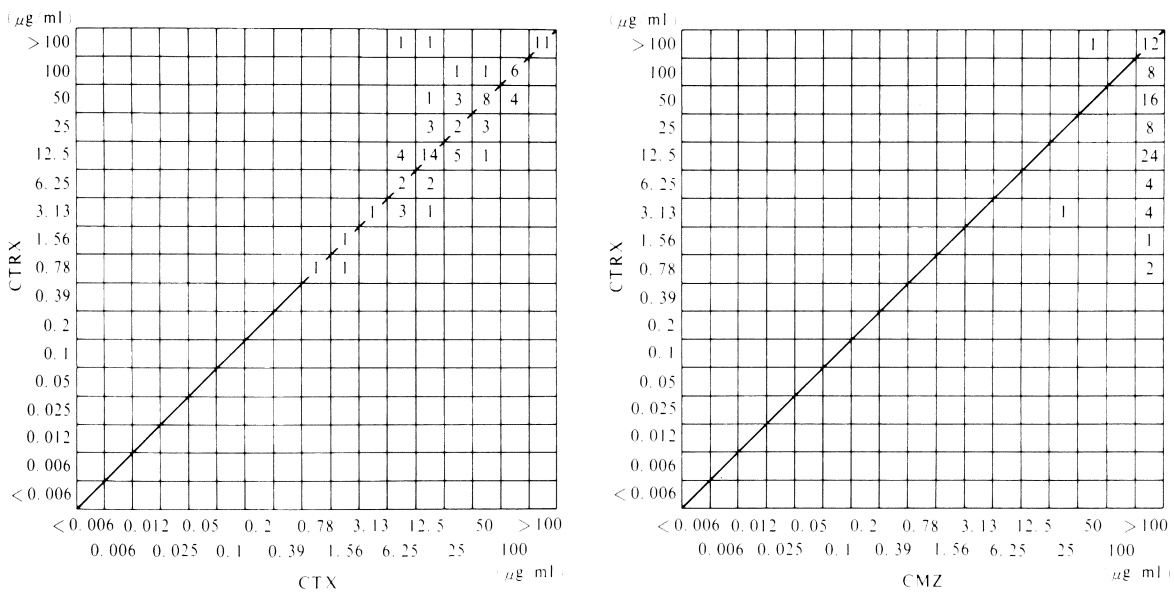


Table 18 Susceptibility of 16 strains of *P. cepacia* against CTRX, CTX, CEZ and CMZ

Drug	MIC (μg/ml)																
	<0.006	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
CTRX						1			1	3	2	1	3		2	1	2
CTX							1		1	2	2	4	1	1	3		1
CEZ																	16
CMZ													2	1	4	2	7

Table 19 Effect of medium, pH and serum on the MIC of CTRX

Organism	MIC (μg/ml) ^{a)} with given medium										
	Heart infusion agar							BHI	MH	TSA	NA
	pH7.4	pH9	pH8	pH7	pH6	pH7.4 + 10% HB	pH7.4 + 25% HB	pH7.2	pH7.4	pH7.3	pH7.0
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	3.13	6.25	3.13	3.13	0.78	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.05	0.2	0.1	0.1	0.1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.05	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025	0.025
<i>C. freundii</i> IFO 12681	0.78	1.56	0.39	0.2	0.2	0.78	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	0.025	0.025	0.025	≤0.012	≤0.012	≤0.012
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6898	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	0.025	≤0.012	≤0.012
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	0.39	0.78	1.56	0.78	0.2	0.78	0.78	0.1	0.78	0.2	0.39
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	12.5	0.78	1.56	12.5	25	25	12.5	12.5	25	6.25	25
<i>P. aeruginosa</i> IFO 12689	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	25	12.5	25	50	25	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	6.25	3.13	6.25	6.25

a) Inoculum : 10⁶ cells/ml

Table 20 Effect of the inoculum size on the MIC of CTRX

Strain	MIC (μg/ml) in HI agar at inoculum size (cells/ml)				
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	1.56	3.13	3.13	3.13	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.025	0.025	0.05	0.05	0.39
<i>C. freundii</i> IFO 12681	0.2	0.2	0.78	1.56	3.13
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	≤0.012	≤0.012	≤0.012	0.025	25
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6898	≤0.012	≤0.012	≤0.012	≤0.012	12.5
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	0.2	0.2	0.39	0.78	50
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	3.13	6.25	12.5	50	50
<i>P. aeruginosa</i> IFO 12689	12.5	25	12.5	50	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	3.13	3.13	3.13	6.25	12.5

の出現率は低かった。この結果は、*P. mirabilis* 以外では CTRX により惹起される。フィラメントから溶菌に至る過程において、安定なスフェロプラストが形成されにくく、巨視的にはフィラメントより直接溶菌に進むものと考えられる。対照薬との形態変化のパターンの比較では、CTX と似ており、CEZ とは異なっていた。他の第3世代のセフェム、CZX¹⁰⁾、CFP¹¹⁾、CMX¹²⁾も主な形態変化はフィラメント化と報告されており、次に述べる PBP に対する親和性の結果と合わせ、各薬剤の間に作用機作

に大きな差はないと思われる。

6. ペニシリン結合蛋白質(PBP)への親和性 (Fig. 4)
CTRX の *E. coli* PBP への親和性をブレインキューベーション法にて調べた。フルオログラフイーで得た結果を Fig. 4 に示した。*E. coli* W 3110 の PBP に対する親和性は PBP3 に対して最も高く、1A、1Bs、2 がそれに続いた。また、*P. vulgaris* 5D63-1 (臨床株) を用いて同様の研究を行った (データ不掲載) が、*E. coli* の PBP3 に相当する蛋白質に最も強く結合した。以上の結

Table 21 Relation of MBC to MIC

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MBC/MIC (fold)					Mean
		1	2	4	8	≥16	
<i>E. coli</i> (8)	CTRX	5	3				1.38
	CZX	6	2				1.25
	CTX	8					1.00
	CEZ	7	1				1.13
<i>K. pneumoniae</i> (8)	CTRX	7	1				1.13
	CZX	5	2		1		2.13
	CTX	6	2				1.25
	CEZ	6		1	1		2.25
<i>C. freundii</i> (6)	CTRX	2	3	1			2.00
	CZX	4	1			1	6.33
	CTX	4	2				1.33
<i>P. mirabilis</i> (8)	CTRX	3	2	2	1		2.88
	CZX	3		2	1	2	8.38
	CTX	1	4			3	13.13
	CEZ	1	4	3			2.71
<i>P. morganii</i> (5)	CTRX	5					1.00
	CZX	2	2	1			2.00
	CTX	4	1				1.20
<i>S. marcescens</i> (8)	CTRX	7	1				1.13
	CZX	3	2	2	1		2.88
	CTX	3	4		1		2.38
<i>E. cloacae</i> (8)	CTRX	2	4	1	1		2.75
	CZX	6		2			1.75
	CTX	1	3	2	2		3.88
<i>P. aeruginosa</i> (8)	CTRX		3	1	4		5.25
	CZX	2	4		2		3.25
	CTX	2	5		1		2.50

果は、 ^{14}C -CTRXを用いた実験でも確認できた。PBP3への強い親和性は、CTRXがフィラメント化を惹起するという形態変化の観察結果と一致する。

7. β -ラクタマーゼに対する安定性と阻害活性

(Table 22, 23)

CTRXの β -ラクタマーゼに対する安定性、阻害活性をCMX, CTX, CZXを対照薬として比較検討した。

Table 22にまとめた通り、CTRXは12菌種24株の β -ラクタマーゼに対して非常に安定であり、*P. vulgaris*, *B. fragilis*を除いてはほとんど加水分解されなかった。

この点はCMX, CTX, CZXと同様であった。ただし、*P. vulgaris*の β -ラクタマーゼ産生株に対する抗菌力は、5D63-1株にみられるごとく強い場合もあり、このCTRXの β -ラクタマーゼ不安定性が直接抗菌力の低下を意味しない事が示された。

一方、CTRXの各種 β -ラクタマーゼ阻害活性をTable 23に示したが、*C. freundii*, *S. marcescens*, *Enterobacter* sp., *P. morganii*, *E. aerogenes*の β -ラクタマーゼに強い活性を、*E. coli*, *K. pneumoniae*等の酵素に対しては弱い活性を示した。阻害パターン、強さともに

Fig. 3 Effect of CTRX on morphology (37°C, 4 hr)

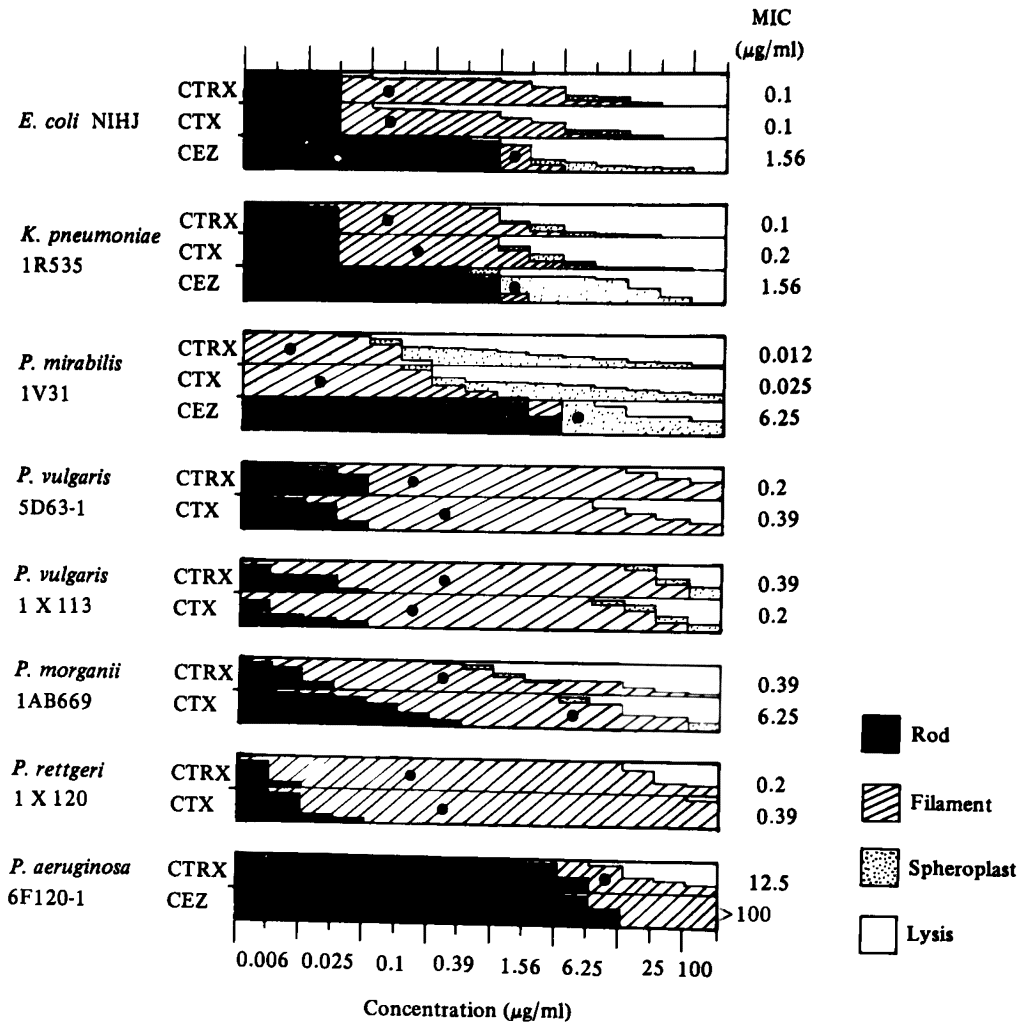


Fig. 4 Affinity of CTRX to *E. coli* PBPs

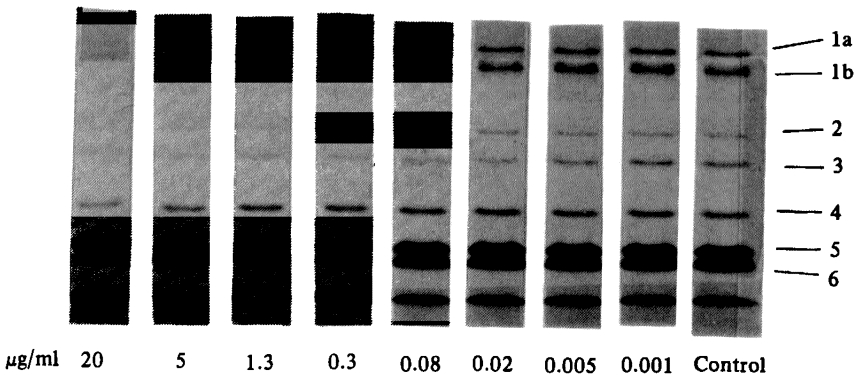


Table 22 Stability to various β -lactamases

β -Lactamases	β -Lactamase stability (CER = 100)				MIC (μ g/ml)			
	CTRX	CMX	CTX	CZX	CTRX	CMX	CTX	CZX
<i>E. coli</i> 1U585	0	0	0	0	0.1	0.2	0.2	0.1
<i>E. coli</i> 1U591	14	6	9	<2	0.39	0.39	0.39	0.05
<i>K. pneumoniae</i> 1X 165	0	0	0	0	0.39	0.2	0.2	0.05
<i>K. pneumoniae</i> 1R535	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.012
<i>C. freundii</i> 5D60-1	0	0	0	1	100	25	100	100
<i>C. freundii</i> 1R523	0	0	0	0	100	25	100	100
<i>S. marcescens</i> 5A405-1	0	0	2	8	50	25	50	25
<i>S. marcescens</i> 1T9	0	0	2	7	50	12.5	50	25
<i>E. cloacae</i> 6D63-2	0	0	0	1	50	25	50	50
<i>E. cloacae</i> 6P381-1	0	0	0	0	50	100	100	100
<i>E. cloacae</i> 1U599	11	1	9	1	>100	100	>100	3.13
<i>E. aerogenes</i> 5I497-0	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.1
<i>E. aerogenes</i> 1U595	0	0	0	2	50	12.5	50	50
<i>P. vulgaris</i> 5D63-1	82	38	40	4	0.05	0.05	0.1	≤ 0.006
<i>P. vulgaris</i> 5E78-1	107	36	46	4	50	12.5	25	0.39
<i>P. vulgaris</i> 1X113	0	1	0	0	0.78	0.2	0.1	0.025
<i>P.morganii</i> 1V39	0	0	0	2	12.5	6.25	50	100
<i>P. rettgeri</i> 1X120	0	1	0	1	0.1	0.39	0.2	0.05
<i>P. rettgeri</i> 1R547	2	2	1	1	0.39	0.78	0.39	0.025
<i>P. inconstans</i> 1X360	0	0	0	0	0.025	—	0.1	0.025
<i>P. aeruginosa</i> 6F120-1	0	0	2	4	12.5	25	25	25
<i>P. aeruginosa</i> 6E300-1	0	0	0	0	12.5	12.5	25	12.5
<i>B. fragilis</i> 1X97	33	15	33	0	12.5	6.25	3.13	25
<i>B. fragilis</i> 1X100	30	27	34	0	50	50	25	25

CTRX は 3 対照薬と酷似していた。

以上、CTRX は臨床分離株を用いた *in vitro* 抗菌活性試験で広い抗菌スペクトラムを示した。抗グラム陽性菌活性を、対照薬と比較すると、*Staphylococci* に対しては CTRX の MIC ピーク値が 3.13 μ g/ml で CTX、CMZ (MIC ピーク値 1.56 μ g/ml) と大きな差はなかったが、CEZ (MIC ピーク値 0.39 μ g/ml) より劣っていた。*Streptococci* に対する活性は CTRX、CTX、CEZ が同等の活性を示し、CMZ より優れていた。一方、抗グラム陰性菌活性は、*Proteus* sp.や *H. influenzae* に極めて強く、他

のグラム陰性菌に対しても CTX と同等の強い活性を示し、他の 2 剤 CEZ、CMZ より明らかに優れていた。

抗菌活性以外にも、PBP への強い親和性、フィラメント形成能の点において、CTX と酷似しており、両剤の作用機作が同じである事を強く示唆した。CTRX の β -ラクタマーゼに対する安定性は、*P. vulgaris*、*B. fragilis* からの β -ラクタマーゼ、いわゆるセフトキシメース¹³⁾ 以外には極めて安定で、 β -ラクタマーゼ産生株に対しても強い抗菌力を発揮した。

CTRX は、他の 3 世代セフェムと同等の活性を細菌学

Table 23 Inhibitory activity against various β -lactamases

β -Lactamases	Inhibition % in the presence of			
	CTR _X	CM _X	CT _X	CZ _X
<i>E. coli</i> 1U585	0	14	8	13
<i>E. coli</i> 1U591	13	2	0	0
<i>K. pneumoniae</i> 1X165	6	10	0	5
<i>K. pneumoniae</i> 1R535	15	19	12	14
<i>C. freundii</i> 5D60-1	100	100	100	94
<i>C. freundii</i> 1R523	53	45	50	47
<i>C. freundii</i> 1U589	100	100	100	89
<i>S. marcescens</i> 5A405-1	91	81	64	20
<i>S. marcescens</i> 1T9	83	78	56	24
<i>E. cloacae</i> 6D63-2	100	100	100	93
<i>E. cloacae</i> 6P381-1	43	41	43	39
<i>E. cloacae</i> 1U599	7	10	4	2
<i>E. aerogenes</i> 51497-0	13	16	11	8
<i>E. aerogenes</i> 1U595	100	100	100	66
<i>P. vulgaris</i> 5D63-1	0	0	3	0
<i>P. vulgaris</i> 5E78-1	7	6	0	5
<i>P. vulgaris</i> 1X113	4	32	8	22
<i>P.morganii</i> 1V39	98	98	100	94
<i>P. rettgeri</i> 1X120	0	0	0	0
<i>P. rettgeri</i> 1R547	49	35	9	4
<i>P. inconstans</i> 1X360	92	97	93	6
<i>P. aeruginosa</i> 6F120-1	93	94	94	58
<i>P. aeruginosa</i> 6E300-1	0	1	9	0
<i>B. fragilis</i> 1X97	12	35	0	57
<i>B. fragilis</i> 1X100	16	38	7	43

的には有しており、本剤の特徴である長い血中半減期¹⁴⁾という薬動力学的性質が臨床で、どのように反映されるか興味を持たれる。

文 献

1) REINER, R. ; U. WEISS, U. BROMBACHER, P. LANZ, M.

MONTAVON, A. FURLLENMEIER, 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) THEN, R. L. : Properties of Ro 13-9904 as a substrate and inhibitor of β -lactamases. Chemotherapy 27 (S-1) : 25 ~ 31, 1981
- 4) MIC 測定委員会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 Chemotherapy 23 : 1 ~ 2, 1975
- 5) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫 : ペニシリン結合蛋白質——理論と実際——. Chemotherapy 27 : 827 ~ 840, 1979
- 6) ROSS, G. W. & C. H. O' CALLAGHAN : β -Lactamase assay. Methods Enzymol. 43 : 68 ~ 73, 1973
- 7) SABATH, L. D. ; C. GARNER, C. WILCOX & M. FINLAND : Effect of inoculum and of β -lactamase on the antistaphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 8 : 344 ~ 349, 1975
- 8) NOGUCHI, H. ; M. KUBO, S. KURASHIGE & S. MITSUHASHI : Antibacterial activity of aparcillin (PC-904) against gram-negative bacilli, especially ampicillin, carbenicillin, and gentamicin-resistant clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 13 : 745 ~ 752, 1978
- 9) 益吉真次, 新井 進, 三橋 進 : 新しいセファロsporin Cefotaxime の抗菌作用および β -lactamase に対する態度. Chemotherapy 28 (S-1) : 1 ~ 11, 1980
- 10) 浅野英夫, 村川武雄, 西田 実 : Cefprozime の subinhibitory concentration による *E. coli* の形態変化について. Chemotherapy 28 (S-5) : 104 ~ 109, 1980
- 11) 大槻雅子, 西野武志, 谷野輝雄 : Cefoperazone (T-1551) による緑膿菌の形態変化について. Chemotherapy 28 (S-6) : 68 ~ 78, 1980
- 12) 中尾雅文, 近藤正熙, 土屋皖司 : Cefmenoxime (SCE-1365) による *Escherichia coli* および *Serratia marcescens* の形態学的変化について. Chemotherapy 29 (S-1) : 171 ~ 187, 1981
- 13) MITSUHASHI, S. & M. INOUE : " β -Lactam Antibiotics" ed. by M. SALTON & G. D. SHOCKMAN, Academic Press, New York, 1981, pp. 361 ~ 375
- 14) STOECKEL, K. : Pharmacokinetics of Rocephin[®], a highly active new cephalosporin with an exceptionally long biological half-life. Chemotherapy (Basel) 27 (S-1) : 42 ~ 46, 1981

BACTERIOLOGICAL STUDY ON CEFTRIAXONE (Ro 13-9904)

JUNKO OSHIMA, MITSUKO ONIZUKA, TOSHIE TORIGOE,
TOSHIKAZU YAMAZAKI, MIKIO ARISAWA and HIROMI B. MARUYAMA
Department of Microbiology & Chemotherapy, Nippon Roche Research Center

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904), an antibiotic with a broad antibacterial spectrum, was studied about the distribution of its activity against various clinical isolates. CTRX has characteristics of a 3rd generation cephalosporin with a low effectiveness to Gram-positive bacteria, especially to *S. faecalis* and a strong activity to Gram-negative bacteria. CTRX generally showed a high activity against *Proteus* species and *H. influenzae*, while it was equally active to CTX and superior to CMZ and CEZ against other Gram-negative bacteria.

The antibacterial activity was not affected by the type of medium, pH or addition of blood, and the main morphological change was filamentation.

The affinity of CTRX for *E. coli* penicilin-binding-protein (PBP) was strongest to PBP 3, followed by PBP 1A, 1Bs and 2. It was also strongest to *P. vulgaris* PBP which was considered to correspond to *E. coli* PBP 3.

CTRX showed a high resistance against hydrolysis with β -lactamase and was highly active against β -lactamase-producing strains.