

T-2588 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

西野武志・池田 靖・尾花芳樹・後藤季美・谷野輝雄
京都薬科大学微生物学教室

T-2525 (T-2588 の活性体) はグラム陽性菌およびグラム陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、特に cephalixin (CEX) あるいは cefaclor (CCL) の抗菌力の及ばないインドール陽性の *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* に対しても優れた抗菌力を示した。また、T-2525 は今回用いた *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, あるいは *S. marcescens* に対して低い濃度でも強い殺菌作用を示したが、*Staphylococcus aureus* に対する殺菌作用は CEX, CCL とほぼ同等であった。各種 β -lactamase に対する T-2525 の安定性は CEX, CCL に比べて優れていた。

マウス実験の腹腔内感染症に対する治療効果では、T-2588 は *S. aureus* に対して CEX および CCL に比べて劣った効果を示したが、*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* などのグラム陽性球菌やグラム陰性桿菌に対しては比較薬に比べて優れた治療効果を示した。さらに T-2588 は CEX あるいは CCL の治療効果の及ばなかった β -lactamase 産生 *E. coli* 感染マウスに対しても優れた治療効果を示した。各薬剤の 50 mg/kg をマウスに投与した時の6時間後の尿中回収率は、T-2588 が 32.3% であり、CEX が 84.9% で、CCL が 50.8% であった。

近年、幅広い抗菌スペクトルを有し、また β -lactamase に安定な多くのセフェム系抗生剤が研究開発されてきている¹⁻³⁾。しかし、経口用セフェム系抗生剤の抗菌力は未だ十分ではなく、その抗菌スペクトルも狭い⁴⁻⁶⁾。

T-2588 はセフェム環の7位 acyl 側鎖に amino-thiazol 基を導入した抗菌活性をもつ親化合物 T-2525 の4位のカルボン酸を pivaloyloxymethyl エステルとすることによって、経口よりの良好な吸収をめざした経口用のセフェム系抗生剤であり、腸管などに存在する esterase により分解され、T-2525 として吸収される (Fig. 1)。

T-2525 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを有し、特に、既存の経口用セフェム系抗生剤に感受性の低い *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* あるいはインドール陽性の *Proteus* に対しても優れた抗菌力を示すことが知られている⁷⁾。

今回、私どもは T-2588 および T-2525 の *in vitro* と *in vivo* 抗菌作用について、cephalexin, cefaclor および amoxicillin と比較検討したので報告する。

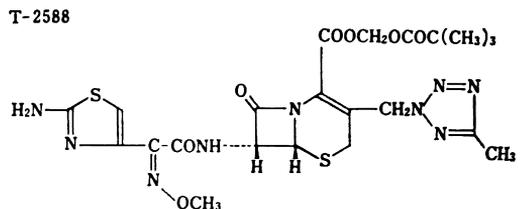
I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株および使用薬剤

菌株は教室保存の標準株および臨床より分離された *Staphylococcus aureus* 41株, *Staphylococcus epidermidis* 13株, *Streptococcus pyogenes* 26株, *Escherichia*

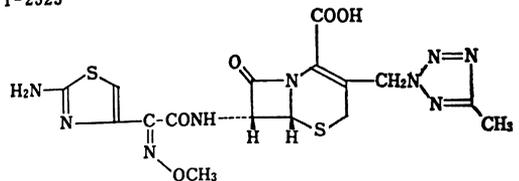
coli 42株, *Klebsiella pneumoniae* 42株, *Proteus mirabilis* 27株, *Proteus vulgaris* 37株, *Morganella morganii* 28株, *Providencia rettgeri* 16株, *Enterobacter cloacae* 22株, *Enterobacter aerogenes* 22株,

Fig. 1 Chemical structure of T-2588 and T-2525



pivaloyloxymethyl (+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

T-2525



(+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

Serratia marcescens 43 株, *Acinetobacter calcoaceticus* 21 株, *Pseudomonas aeruginosa* 17 株および *Haemophilus influenzae* 41 株を用いた。また使用薬剤はいずれも力価の明らかな T-2588, T-2525, cephalexin (CEX), cefaclor (CCL) および amoxicillin (AMPC) を用いた。

2. 感受性測定法

日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁹⁾に従って sensitivity test agar (STA; 栄研) を用いた寒天平板希釈法により MIC を測定した。なお, *Streptococcus* 属あるいは *Corynebacterium diphtheriae* には 10% 馬脱繊維血液を添加した培地を用いて測定した。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH (6, 7, 8), 馬血清添加 (0, 10, 25%) および接種菌量 (10^6 , 10^8 , 10^7 , 10^8 cells/ml) の影響を *S. aureus* 10 株および *E. coli* 9 株を被検菌とした寒天平板希釈法により検討した。

4. 殺菌作用

Nutrient broth (NB; ニッスイ) で培養した対数期の菌液 (*S. aureus* Smith, *E. coli* 444, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55) を 10^6 cells/ml に調製し, 各薬剤添加 4 時間後までの生菌数を常法により測定した。

5. β -lactamase に対する安定性

Brain heart infusion broth (BHI; Difco) で 1 夜培養後, 同培地で 4 時間振とう培養し, 遠心分離により集菌した。これを 0.05 M リン酸緩衝液で 2 回洗浄した後, 0.1 M リン酸緩衝液に懸濁し, 超音波破碎した。その後 10,000 G 60 分間冷却遠心し, 上清を粗酵素液として用いた。 β -lactamase の誘導は培養 3 時間後に cefmetazole $10 \mu\text{g/ml}$ を添加することにより行なった。各薬剤の加水分解速度はマイクロード法⁹⁾に基づいて測定し, PCase は penicillin G (PCG) を 100 とした, CSase は cephaloridine を 100 とした相対加水分解速度で示した。

6. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上に種々の濃度の薬剤を添加したフィルム寒天培地を作成し, これに対数期の *E. coli* K-12 を塗抹後, カバークラスをかぶせてパラフィンで封入した。これを恒温装置付の倒立位相差顕微鏡 (Nikon) を用いて経時的に形態変化を観察した。

7. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する親和性

SPRATT の方法¹⁰⁾により *E. coli* K-12 の膜画分を調製し, ^{14}C -benzylpenicillin (^{14}C -PCG) との競合により T-2525 あるいは CCL の PBPs に対する親和性を検討した。また X 線フィルム上の ^{14}C -PCG の感光度を Dual-

wavelength TLC scanner 90 (Shimadzu Co.) で測定し, この値から 50% 阻害濃度を求めた。

8. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

3% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik) に浮遊した菌液の 0.5 ml を 1 群 10 匹の ddY 系雄性マウス (体重 $18 \pm 1 \text{g}$) の腹腔内に接種し, 感染を惹起した。治療は感染 2 時間後に, 各薬剤の 0.5% sodium carboxymethyl cellulose 懸濁液の 0.25 ml を 1 回経口投与することにより行なった。感染 7 日後のマウスの生存率より, LITCHFIELD-WILCOXON 法¹¹⁾により ED₅₀ 値を算出した。

9. マウス血中濃度および尿中回収率

1 群 5 匹のマウスに各薬剤の 50 mg/kg (T-2588 の場合は T-2525 力価として 50 mg/kg) を経口投与し, 投与 4 時間後までの血清と, 6 時間後までの尿を採取した。薬剤濃度は T-2525 は *K. pneumoniae* ATCC 10031 を, CEX および CCL は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を被検菌とした薄層ペーパードイスク法により測定した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

T-2525 の抗菌スペクトルを Table 1~4 に示した。T-2525 はグラム陽性菌やグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し, 特に *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* あるいはグラム陰性桿菌に対して非常に優れた抗菌力を示した。すなわち 10^8 cells/ml 接種では, T-2525 は *S. aureus* に対して $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ の抗菌力を示し, CEX とほぼ同様の抗菌力であった。一方 *S. pyogenes* および *S. pneumoniae* に対しては T-2525 は AMPC と同様 $0.012 \mu\text{g/ml}$ の抗菌力を示し, CEX や CCL よりも優れていた。またグラム陰性の *E. coli* に対して T-2525 は $0.2 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ の抗菌力を示し, 比較薬よりも優れていた。さらに T-2525 は CEX や CCL が抗菌力を示さなかった *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *P. inconstans*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* に対しても優れた抗菌力を示した。 10^8 cells/ml 接種でもほぼ同様の傾向を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

T-2525 の臨床分離株に対する感受性分布と累積分布を Fig. 2~16 に示した。

a) *S. aureus*

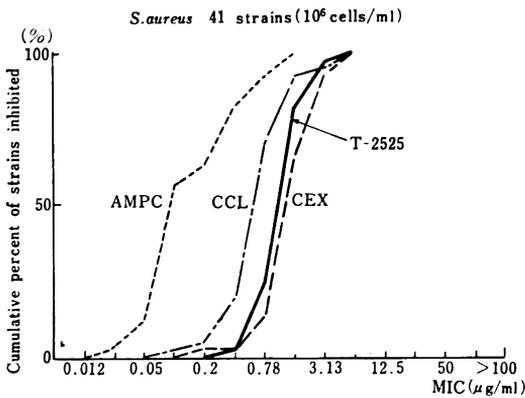
S. aureus 41 株に対する T-2525 の抗菌力は Fig. 2 に示すように, $1.56 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示し, AMPC に比較して弱かったが, CEX あるいは CCL とほぼ同程度の抗菌力を示した。

Table 1 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^8 cells/ml)

Organism	T-2525	CEX	CCL	AMPC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	3.13	3.13	0.78	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	1.56	1.56	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	1.56	1.56	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	3.13	12.5	3.13	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	3.13	3.13	1.56	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80(PC-R)	1.56	3.13	1.56	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5	6.25	1.56	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.012	0.78	0.20	0.012
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.012	0.78	0.20	0.012
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.012	0.39	0.10	0.012
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	25	0.39
Viridans group <i>Streptococcus</i>	>100	>100	25	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I	0.012	3.13	0.39	0.012
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II	0.012	1.56	0.39	0.012
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III	0.012	3.13	0.78	0.012
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.56	0.78	0.39	0.20
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.20	0.025	\leq 0.006
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.78	0.10	0.39
<i>Bacillus anthracis</i>	6.25	6.25	0.78	0.78

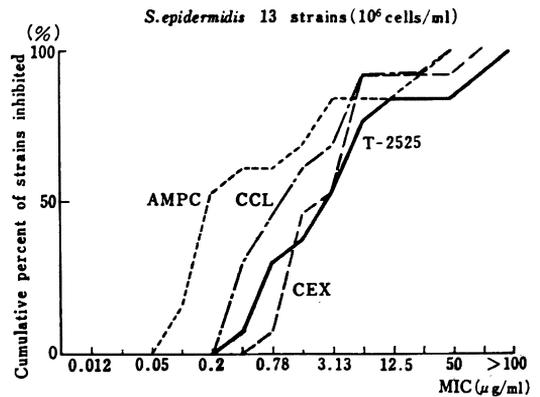
MIC (μ g/ml)

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC (μ g/ml)															
	\leq 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
T-2525						1	9	24	6	1						
CEX					1		5	21	11	3						
CCL			1	1	6	21	9	1	2							
AMPC		1	4	18	3	8	4	3								

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC (μ g/ml)															
	\leq 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
T-2525							1	3	1	2	3	1			1	1
CEX								1	5	1	5					1
CCL							4	2	2	1	3			1		
AMPC						2	5	1		1	2			1	1	

Table 2 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10^8 cells/ml)

Organism	T-2525	CEX	CCL	AMPC
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.39	12.5	12.5	12.5
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.20	25	6.25	6.25
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.39	12.5	3.13	6.25
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	100	>100	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	3.13	0.39	0.20
<i>Salmonella typhi</i> 0-901	0.05	3.13	0.78	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.05	6.25	0.78	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.10	6.25	0.78	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.20	6.25	0.78	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.20	6.25	1.56	3.13
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.20	6.25	1.56	3.13
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	12.5	6.25	6.25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.10	6.25	3.13	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.78	>100	50	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	6.25	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	6.25	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	3.13	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	1.56	>100	>100	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.012	25	6.25	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.05	100	100	>100
<i>Morganella morganii</i> Kono	12.5	>100	>100	>100
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	≤ 0.006	>100	>100	12.5
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.05	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	50	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1095	100	>100	>100	>100

MIC ($\mu\text{g/ml}$)b) *S. epidermidis*

S. epidermidis 13 株の T-2525 に対する感受性分布は $0.39 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ と広範囲な分布を示した。しかしその抗菌力は *S. aureus* の場合と同様、AMPC に劣るものの CEX とほぼ同程度であった (Fig. 3)。

c) *S. pyogenes*

Fig. 4 に示すように T-2525 は *S. pyogenes* 26 株に対して AMPC, CEX, CCL に比べて優れた抗菌力を示し、 $0.025 \mu\text{g/ml}$ 以下で全ての株の発育を阻止した。

d) *E. coli*

E. coli 42 株に対する抗菌力を Fig. 5 に示した。T-2525 の MIC は $0.2 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示し、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全ての株の発育を阻止した。またその抗菌力は比較薬に比べ優れていた。

e) *K. pneumoniae*

T-2525 の *K. pneumoniae* 42 株に対する MIC は

$0.1 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ に集中し、その抗菌力は CEX, CCL あるいは AMPC に比べて優れていた (Fig. 6)。

f) *P. mirabilis*

P. mirabilis 27 株に対して T-2525 は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全ての株の発育を阻止し、CEX, CCL, AMPC に比べて優れた抗菌力を示した (Fig. 7)。

g) *P. vulgaris*

P. vulgaris 37 株は CEX, CCL, AMPC に対して多数の耐性株が認められたが、T-2525 は $0.05 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ に感受性のピークを持ち、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下で全ての株の発育を阻止した (Fig. 8)。

h) *M. morganii*

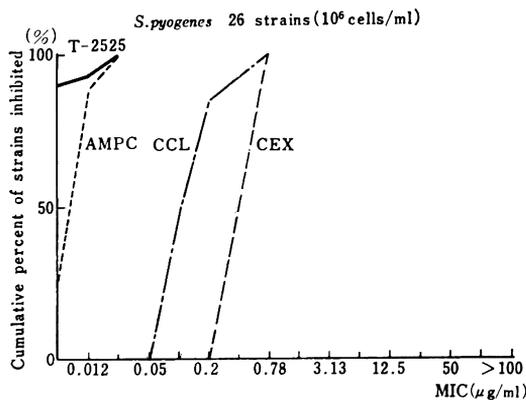
M. morganii 28 株に対して *P. vulgaris* の場合と同様 CEX, CCL, AMPC はほとんど抗菌力を示さなかったが、T-2525 は $0.05 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを有するやや広い感受性分布を示した (Fig. 9)。

Table 3 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)

Organism	T-2525	CEX	CCL	AMPC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	1.56	3.13	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	1.56	1.56	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	1.56	≤ 0.006	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	3.13	12.5	3.13	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	1.56	1.56	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80(PC-R)	1.56	1.56	1.56	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5	6.25	1.56	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	≤ 0.006	0.78	0.20	0.012
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	≤ 0.006	0.78	0.20	0.012
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.012	0.20	0.10	≤ 0.006
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	25	0.39
Viridans group <i>Streptococcus</i>	>100	>100	25	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I	0.012	3.13	0.39	0.012
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II	0.012	1.56	0.39	0.025
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III	0.012	3.13	0.39	0.012
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.78	0.78	0.39	0.20
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.05	0.025	≤ 0.006
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.78	0.10	0.012
<i>Bacillus anthracis</i>	0.78	1.56	0.39	0.05

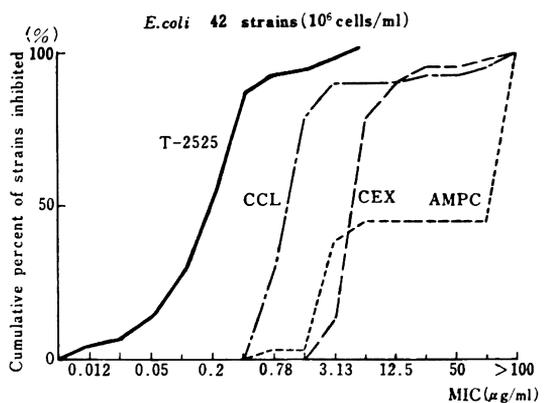
MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)															
	≤ 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
T-2525	23	1	2													
CEX							14	12								
CCL					12	10	2	2								
AMPC	7	16	3													

Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)															
	≤ 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
T-2525		2	1	3	6	11	14	2	1	1	1					
CEX										6	27	5	1		1	2
CCL								12	21	5		2		1	1	
AMPC								1		15	3					23

Table 4 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10^6 cells/ml)

Organism	T-2525	CEX	CCL	AMPC
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.39	6.25	1.56	6.25
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.05	6.25	1.56	3.13
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.20	6.25	1.56	3.13
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.39	>100	25	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.025	1.56	0.20	0.20
<i>Salmonella typhi</i> 0-901	0.05	3.13	0.78	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.05	6.25	0.78	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.05	3.13	0.39	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.20	3.13	0.78	0.39
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.20	6.25	1.56	3.13
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.10	6.25	0.78	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.05	6.25	1.56	3.13
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.05	3.13	1.56	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.10	25	0.78	50
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.39	>100	50	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.39	>100	100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	1.56	>100	25	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.78	>100	>100	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	≤ 0.006	6.25	0.78	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.012	12.5	12.5	6.25
<i>Morganella morgani</i> Kono	0.39	>100	>100	>100
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	≤ 0.006	6.25	0.78	0.20
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.025	12.5	1.56	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	1.56	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1095	25	>100	>100	>100

MIC ($\mu\text{g/ml}$)i) *P. rettgeri*

T-2525 は *P. rettgeri* 16 株に対して $\leq 0.006 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の幅広い感受性分布を示したが、CEX, CCL, AMPC に比べて感受性株は多かった (Fig. 10)。

j) *E. cloacae*

E. cloacae 22 株に対して CEX, CCL および AMPC では $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性株が多く認められたが、T-2525 は優れた抗菌力を示し、3 株を除き $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で発育を阻止した (Fig. 11)。

k) *E. aerogenes*

T-2525 は $0.39 \mu\text{g/ml}$ と $25 \mu\text{g/ml}$ の 2 峰性の感受性ピークを示し、耐性菌も認めたが、CEX, CCL あるいは AMPC に比べて優れた抗菌力を示した (Fig. 12)。

l) *S. marcescens*

CEX, CCL, AMPC は *S. marcescens* 43 株に対してほとんど抗菌力を示さなかったが、T-2525 は $0.78 \sim 1.56$

$\mu\text{g/ml}$ に感受性ピークを示した。しかし少数の耐性株が認められた (Fig. 13)。

m) *A. calcoaceticus*

A. calcoaceticus 21 株に対して T-2525 は CCL, AMPC と同程度の抗菌力を示し、その感受性ピークは $25 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 14)。

n) *P. aeruginosa*

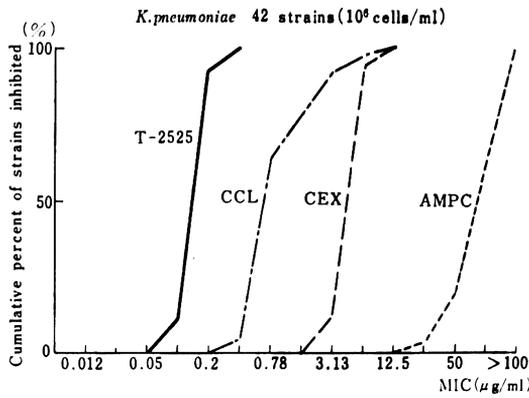
P. aeruginosa 17 株に対して CEX, CCL, AMPC は全く抗菌力を示さなかった。一方 T-2525 は本菌に対して若干の抗菌力を示したが、その MIC は $25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ であり、抗菌力は弱かった (Fig. 15)。

o) *H. influenzae*

H. influenzae 41 株に対して T-2525 は比較薬に比べ優れた抗菌力を示しており、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全ての株の発育を阻止した (Fig. 16)。

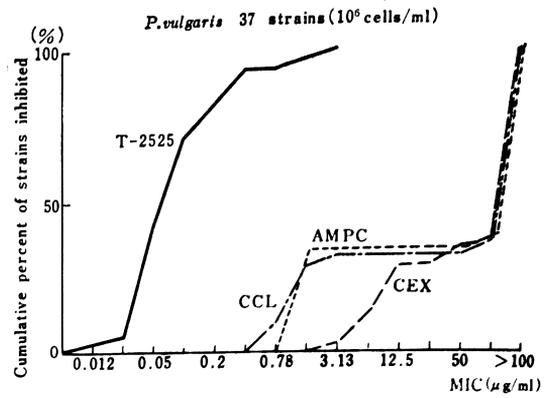
3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates



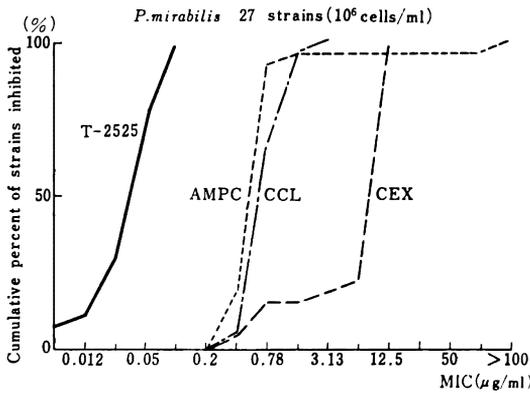
Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
	\leq	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525					5	34	3										
CEX										5	35	2					
CCL							2	25	6	6	2	1					
AMPC													1	7	18	16	

Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates



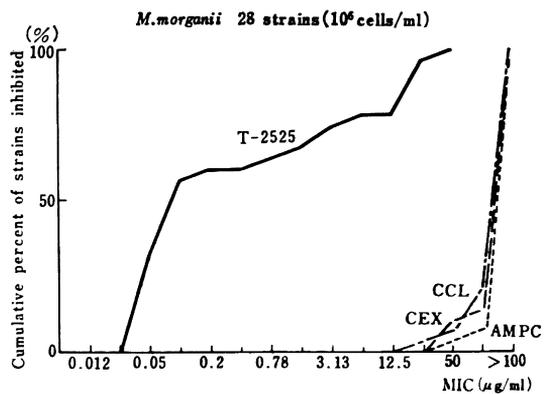
Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
	\leq	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525		1	1	14	11	4	4			1	1						
CEX											1	4	6		2	1	23
CCL									4	7	1				2	3	20
AMPC											12					2	23

Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates



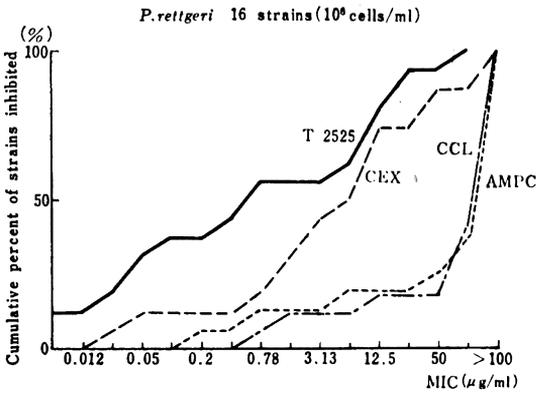
Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
	\leq	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525	2	1	5	12	7												
CEX						1	3		1	1	21						
CCL						1	17	8	1								
AMPC						5	20	1									1

Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates



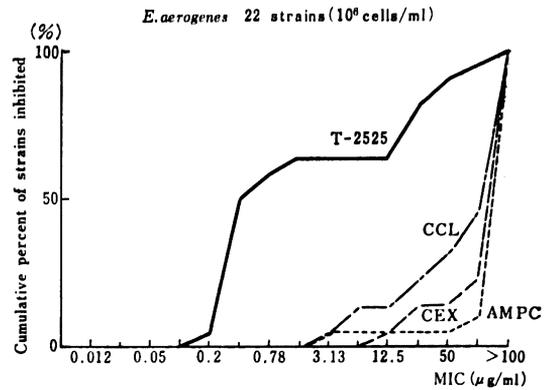
Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
	\leq	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525					9	7	1		1	1	2	1		5	1		
CEX															3	1	24
CCL														1	1	4	22
AMPC														1	1	26	

Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates



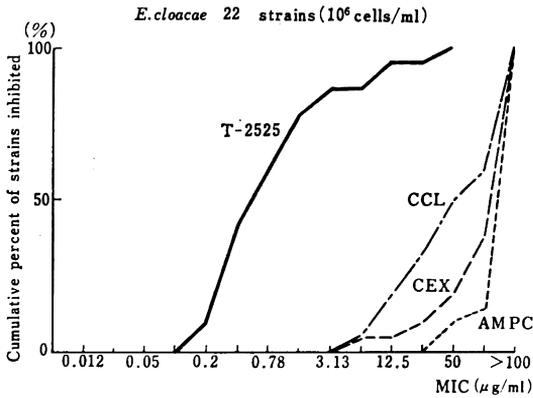
Drug	MIC (μg/ml)															
	≤ 0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525	2	1	2	1		1	2			1	3	2			1	
CEX			2				1	2	2	1	4		2			2
CCL							1	1			1			4	9	
AMPC						1	1				1		1	2	10	

Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates



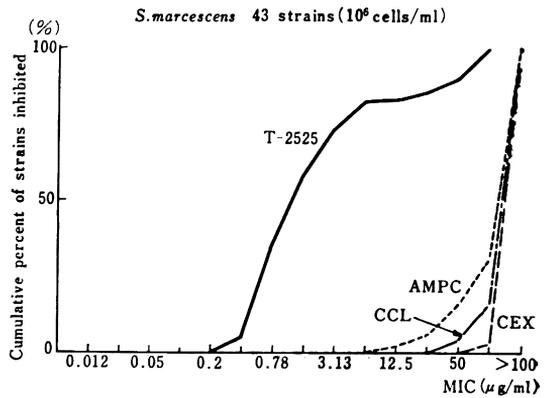
Drug	MIC (μg/ml)															
	≤ 0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525						1	10	2	1				4	2	1	1
CEX												1	2		2	17
CCL									1	2		2	2	3	12	
AMPC									1						1	20

Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates



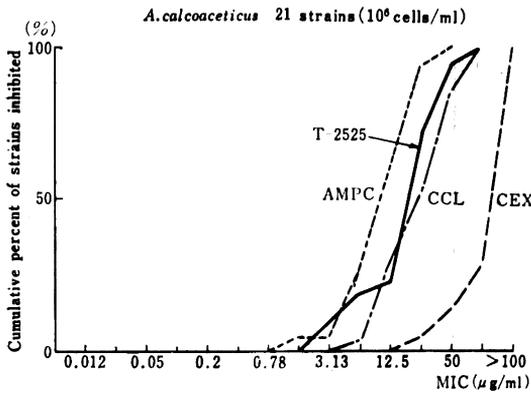
Drug	MIC (μg/ml)															
	≤ 0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525						2	7	4	4	2		2		1		
CEX										1		1	2	4	14	
CCL										1	3	3	4	2	9	
AMPC													2	1	19	

Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates



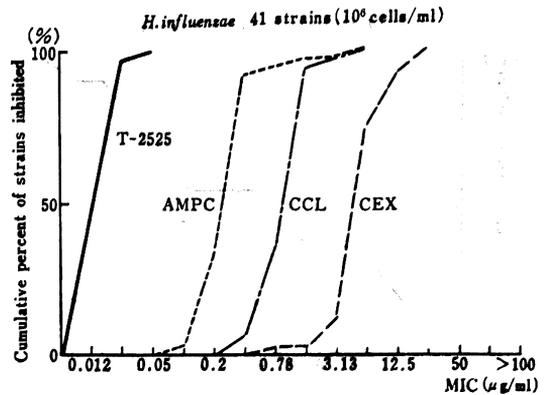
Drug	MIC (μg/ml)															
	≤ 0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
T-2525						2	13	10	7	4		1	2	4		
CEX															1	42
CCL													2	5	36	
AMPC											1	2	4	6	30	

Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates



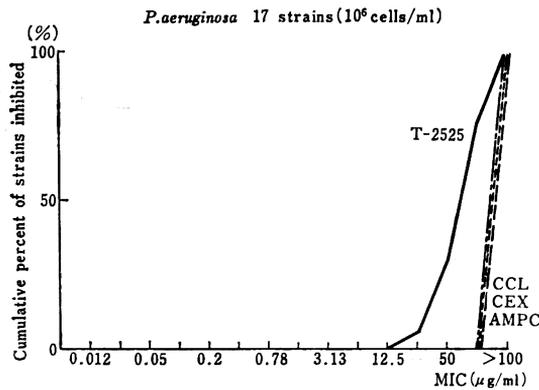
Drug	MIC (μg/ml)																	
	≤	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
T-2525											2	2	1	10	5	1		
CEX															1	2	3	15
CCL											1	5	5	7	3			
AMPC									1	5	7	7	1					

Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC (μg/ml)																
	≤	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
T-2525		21	19	1													
CEX										1	4	26	7	3			
CCL									3	12	24	1	1				
AMPC						1	13	24	1	1	1						

Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates



Drug	MIC (μg/ml)																
	≤	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
T-2525														1	4	8	4
CEX																	17
CCL																	17
AMPC																	17

培地 pH 6, 7, 8 における T-2525 の *S. aureus* および *E. coli* に対する感受性を Fig. 17, 18 に示した。 *S. aureus* の場合いずれの薬剤もアルカリ側よりも酸性側の方が抗菌力が良好であった。一方 *E. coli* の場合 T-2525 は酸性側よりもアルカリ側で抗菌力が良好となり、CCL では中性および酸性側で抗菌力が良好であった。

T-2525 は *S. aureus* の場合、血清の添加により 1 管程度の抗菌力低下を認めたが、その程度は CEX あるいは CCL に比べて低かった。また *E. coli* の場合 CEX や CCL では血清の影響が若干認められたが、T-2525 では影響が認められなかった (Fig. 19, 20)。

接種菌量の影響を Fig. 21, 22 に示した。各薬剤とも、菌量の増加により 1~4 管程度の抗菌力低下を示したが、T-2525 は CEX, CCL に比べて菌量の影響を受けにくかった。特にこの傾向は *S. aureus* で顕著であった。

4. 殺菌作用

T-2525, CEX および CCL の *S. aureus* Smith, *E. coli* 444, *K. pneumoniae* KC-1 および *S. marcescens* T-55 に対する殺菌作用について検討した結果を Fig. 23~26 に示した。

各薬剤とも、いずれの菌株に対しても dose response のある殺菌作用を示し、生菌数を減少させたが、CEX

Fig. 17 Effect of medium pH on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

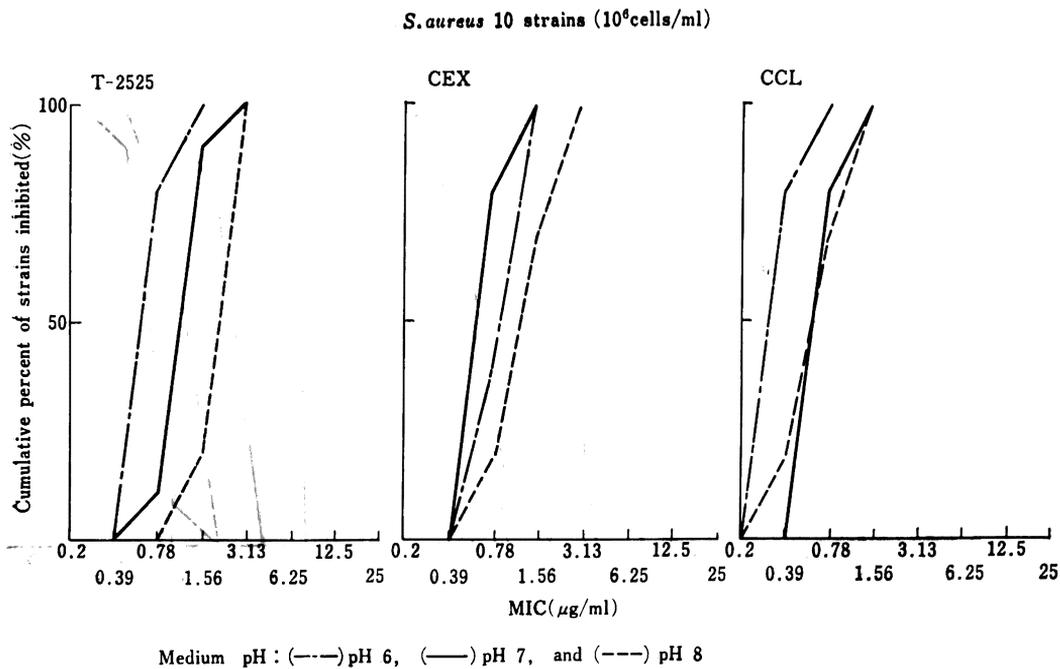


Fig. 18 Effect of medium pH on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

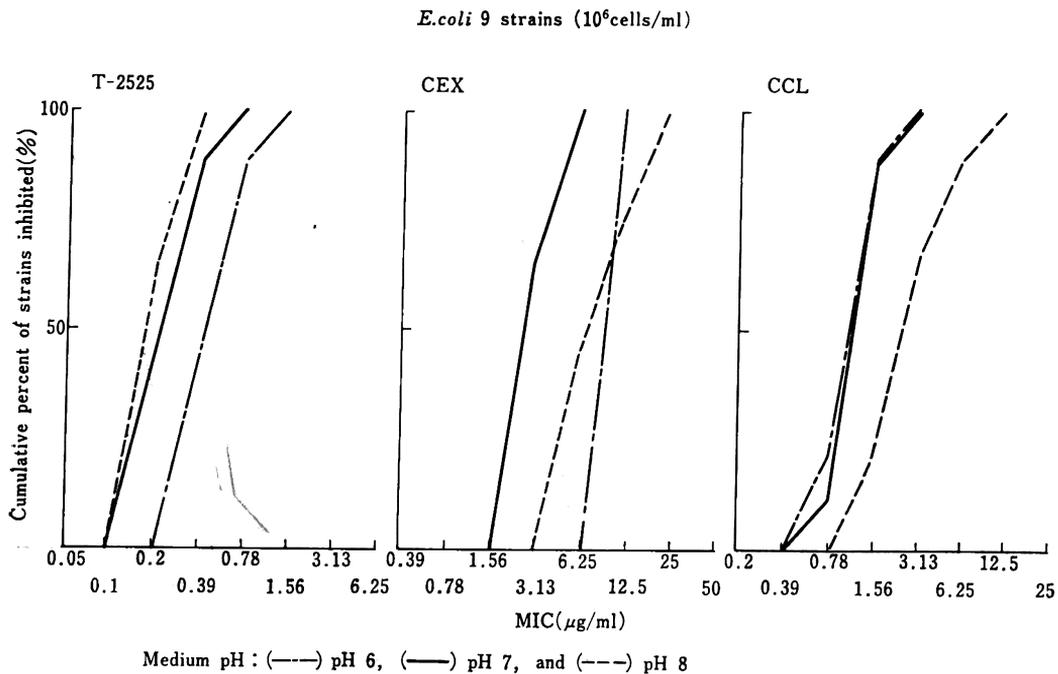


Fig. 19 Effect of serum concentration on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

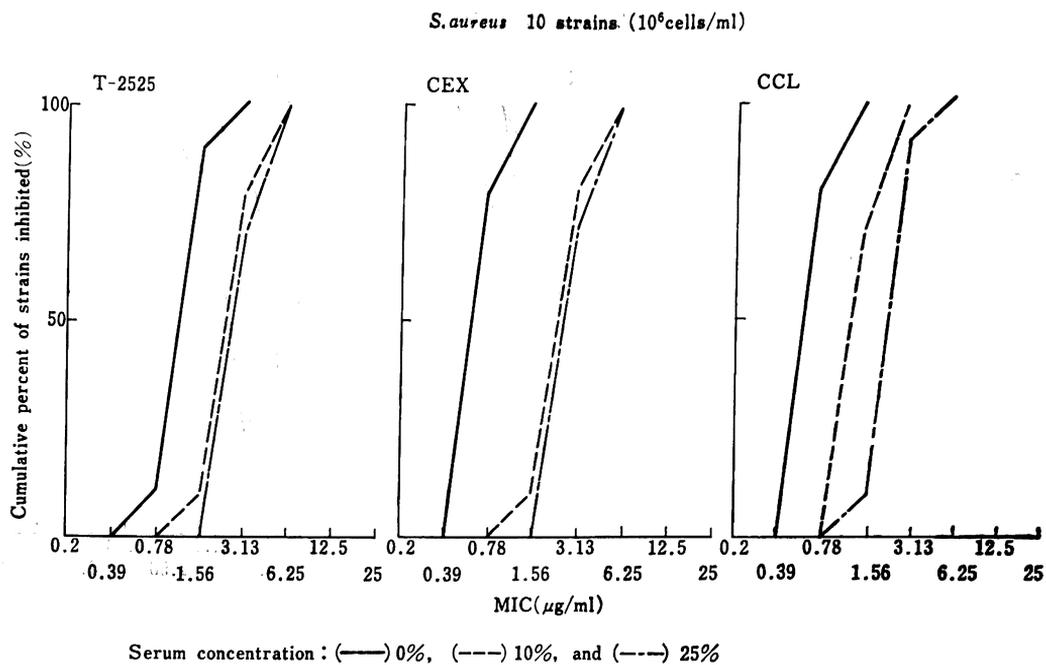


Fig. 20 Effect of serum concentration on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

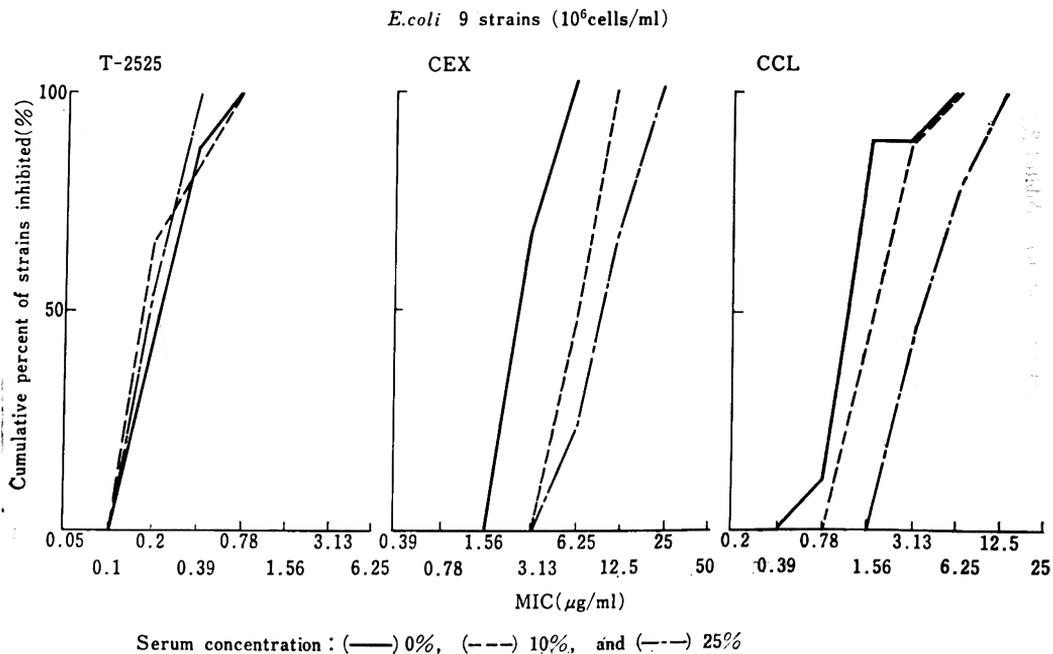


Fig. 21 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

S. aureus 10 strains

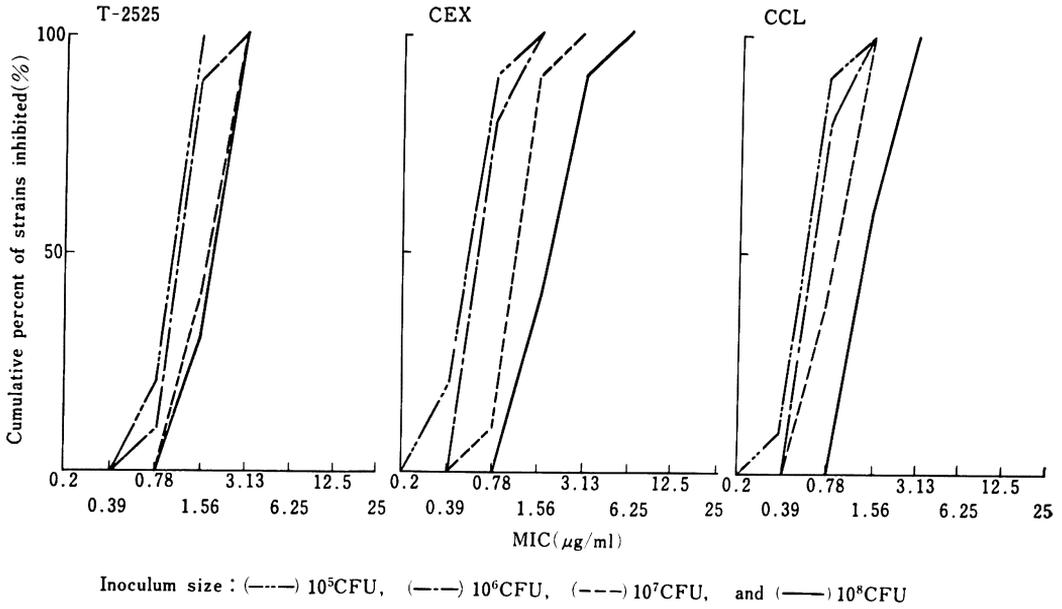


Fig. 22 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of T-2525, CEX, and CCL

E. coli 9 strains

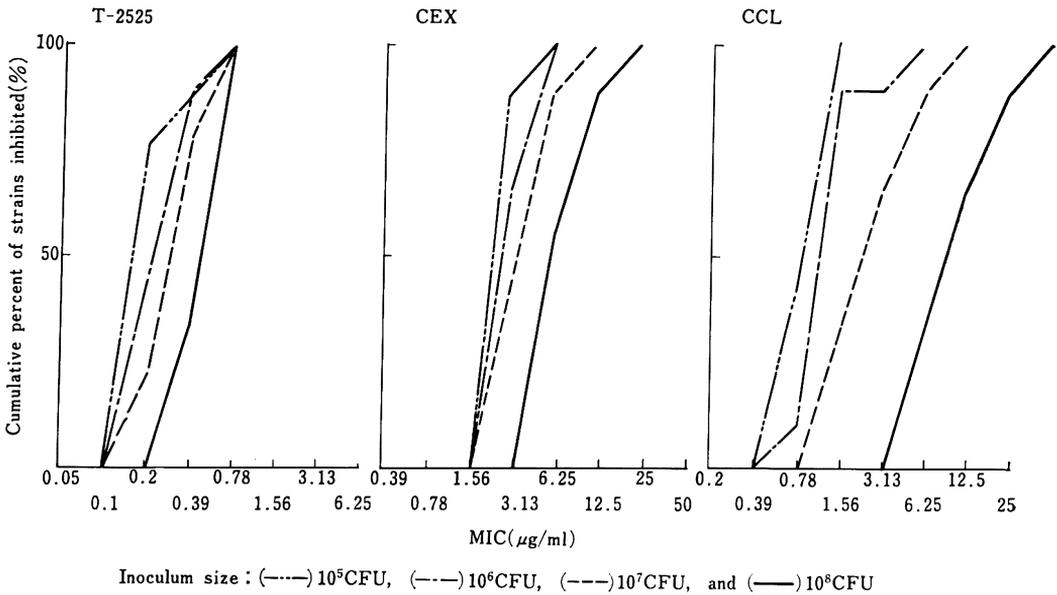


Fig. 23 Effect of T-2525, CEX, and CCL on the viability of *S. aureus* Smith

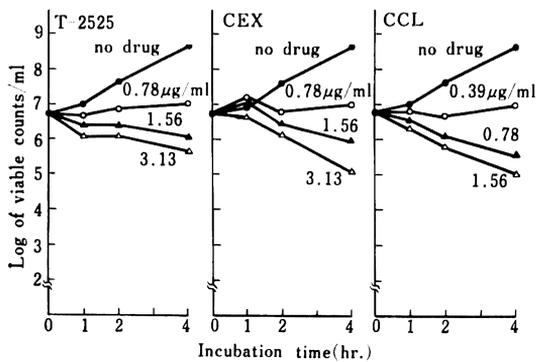


Fig. 25 Effect of T-2525, CEX, and CCL on the viability of *K. pneumoniae* KC-1

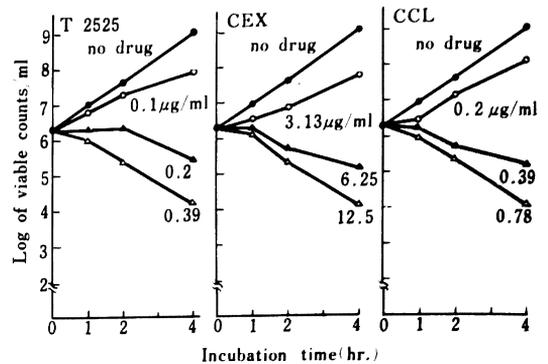


Fig. 24 Effect of T-2525, CEX, and CCL on the viability of *E. coli* 444

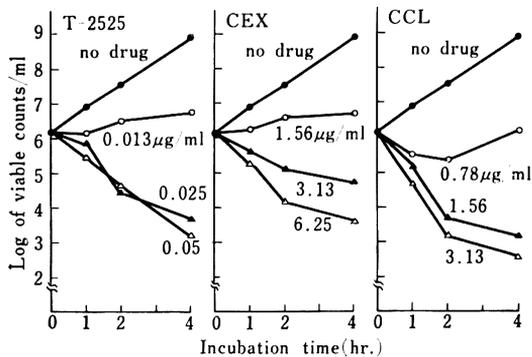


Fig. 26 Effect of T-2525, CEX, and CCL on the viability of *S. marcescens* T-55

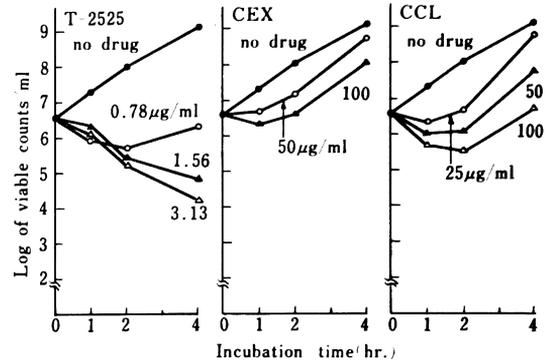


Table 5 Stability of T-2525 to β -lactamase

Enzyme source		Relative rate of hydrolysis ^{a)}				
		T-2525	CEX	CCL	CER	PCG
<i>E. coli</i> 106	PCase	0.2	3.7	10.0	66.7	100
<i>E. coli</i> 113	CSase	1.3	59.3	28.6	100	46.0
<i>E. coli</i> 139	PCase	0.01	2.6	9.2	80.6	100
<i>E. coli</i> 148	PCase	0.02	0.6	11.2	18.7	100
<i>K. pneumoniae</i> 120	PCase	0.1	0.2	4.2	10.8	100
<i>B. catarrhalis</i> 3	PCase	1.5	1.3	47.0	0.9	100
<i>P. vulgaris</i> 11	CSase	19.2	100	338	100	7.1
<i>E. cloacae</i> 45	CSase	0.03	26.8	43.8	100	1.1
<i>S. marcescens</i> K-13	CSase	1.4	48.2	134	100	30.9

^{a)} Hydrolysis of each substrate by CSase and PCase is expressed as relative rate of hydrolysis, based on a rate of 100 for CER and PCG.

あるいは CCL は *S. marcescens* に対して 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加時においてもほとんど殺菌作用を示さず、1~2 時間以後に再増殖が観察された。

5. β -lactamase に対する安定性

T-2525 の各種グラム陰性菌由来 β -lactamase に対する安定性を Table 5 に示した。T-2525 は各種 β -lactamase に対して極めて高い安定性を示し、とりわけ CEX および CCL が比較的的不安定であった CSase に対しても良好な安定性を示した。また T-2525 は *P. vulgaris* 11 由来の CSase にやや加水分解を受けたが、CEX や CCL に比べて安定であった。

6. 形態変化および PBP_s に対する親和性

T-2525 の *E. coli* K-12 に及ぼす形態変化を Fig. 27 に、PBP_s への親和性を Fig. 28 と Table 6 に示した。

T-2525 は 1/16 MIC 濃度の 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 添加においてフィラメント化を、0.1 $\mu\text{g/ml}$ でバブル化を引き起こし、0.99~1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で溶菌が観察された。なお Fig. 27 には薬剤作用 4 時間後の結果を示した。

このような位相差顕微鏡による観察結果は PBP_s への親和性と相関し、T-2525 は PBP_s 3 に対して特に親和性が強く、次いで 1A, 1Bs, 2 の順であった。またこの親和性を ID₅₀ 値で比較すると、CCL は 1A に強い親和性を示したものの、各分画への親和性はいずれも T-2525 が優れていた。

7. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

T-2588 の *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. vulgaris* および *S. marcescens* を用いたマウス実験的腹腔内感染症に対

Fig. 27 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to T-2525

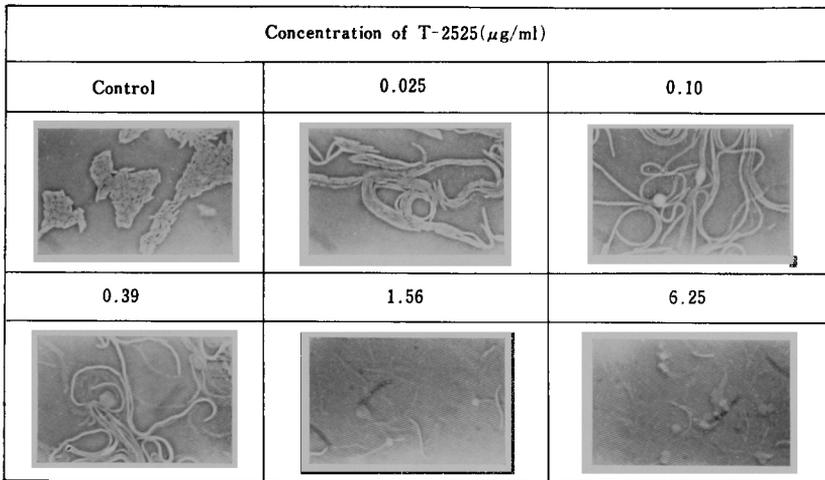


Fig. 28 Competition of T-2525 and CCL with ¹⁴C-labeled penicillin G for binding to PBP_s in *E. coli* K-12

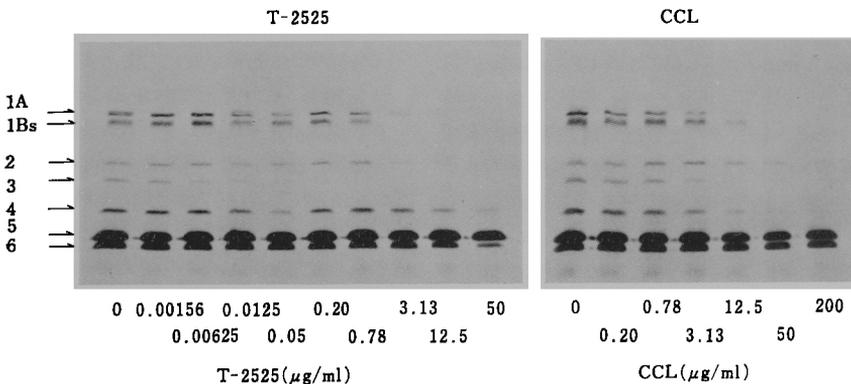


Table 6 Competition of T-2525 and CCL with ^{14}C labeled penicillin G for binding to PBPs in *E. coli* K-12

Proteins	1A	1Bs	2	3	4	5	6
T-2525	0.28	0.39	1.08	0.0078	6.50	> 50	27
CCL	1.47	9.5	19.8	3.5	12.0	>200	>200

ID₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)

Table 7 Protective effects of T-2588, CEX and CCL on experimental infection in mice (n = 10)

Strains	Inoculum size (cells/mouse)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/mouse)
<i>S. aureus</i> Smith	6.0×10 ⁵ 25 LD ₅₀	T-2588	1.56*	1.61 (1.06–2.28)**
		CEX	0.78	0.0050 (0.0037–0.0067)
		CCL	0.39	0.0025 (0.0019–0.0032)
<i>S. pyogenes</i> C-203	2.1×10 ³ 120 LD ₅₀	T-2588	0.012*	0.0053 (0.0040–0.0060)
		CEX	0.20	0.067 (0.050–0.089)
		CCL	0.10	0.023 (0.016–0.033)
<i>S. pneumoniae</i> III	6.5×10 ¹ 10 LD ₅₀	T-2588	0.012*	0.032 (0.022–0.048)
		CEX	3.13	1.30 (1.00–1.69)
		CCL	0.39	0.40 (0.26–0.63)
<i>E. coli</i> ST 0198	1.5×10 ⁴ 500 LD ₅₀	T-2588	0.10*	0.042 (0.035–0.050)
		CEX	3.13	0.38 (0.31–0.46)
		CCL	0.39	0.034 (0.026–0.044)
<i>E. coli</i> 444	3.0×10 ⁴ 10 LD ₅₀	T-2588	0.013*	0.019 (0.014–0.027)
		CEX	3.13	0.100 (0.069–0.145)
		CCL	1.56	0.030 (0.018–0.049)
<i>E. coli</i> No.29	1.1×10 ⁶ 32 LD ₅₀	T-2588	0.10*	0.0061 (0.0038–0.0097)
		CEX	6.25	0.11 (0.068–0.170)
		CCL	1.56	0.076 (0.053–0.110)

* MIC of T-2525, ** 95% confidence limits

する治療効果を Table 7, 8 に示した。

T-2588 は *S. aureus* Smith 株に対して CEX や CCL より劣る治療効果を示したが, *S. pyogenes* C-203 および *S. pneumoniae* III に対してはこれら比較薬物に比べて非常に優れた治療効果を示した。またグラム陰性桿菌に対しても, 比較薬物として用いた CEX や CCL よりも優れた治療効果を示し, 特に Table 8 に示したように, CEX や CCL の治療効果が弱かった PCase あるいは CSase 産生の *E. coli*, *E. cloacae* 113, *P. vulgaris* 6 および *S. marcescens* T-55 に対しても T-2588 は優れた治療効果を示し, *in vitro* の抗菌力が *in vivo* にも反映された結果が得られた。

8. T-2588 の体内動態

T-2588, CEX および CCL の 50 mg/kg をマウスに投与した時の血中濃度および尿中回収率を Table 9 に示した。

T-2588 (T-2525) の血中濃度は投与 0.5 時間後に約

12 $\mu\text{g/ml}$ を示し, CEX より低く, CCL とほぼ同等であった。また T-2588 の血中濃度は投与 4 時間後までに比較的ゆるやかに減少した。一方 T-2588 の尿中回収率は投与 6 時間において約 32% であり, CEX の 85%, CCL の 51% に比べて低かった。

III. 考 察

T-2588 は腸管などに存在する esterase により加水分解を受け, 抗菌力を有する T-2525 として血中に移行するいわゆるプロドラッグである⁷⁾。また, T-2525 はセフェム環の 7 位 acyl 側鎖に aminothiazol 基を持ち, 第 3 世代のセフェム系抗生剤といわれている cefmenoxime²⁾, cefotaxime³⁾ あるいは ceftizoxime¹²⁾ などと共通の構造を有している。

今回の私どもの実験において T-2525 はこれら第 3 世代のセフェム系抗生剤と同様にグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し, かつ強い抗菌力を示した。特に比較薬物として用いた CEX

Table 8 Protective effects of T-2588, CEX and CCL on experimental infection in mice
(n=10)

Strains	Inoculum size (cells/mouse)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/mouse)	
<i>E. coli</i> 106 (PCase)	1.6×10 ⁷ 26 LD ₅₀	T-2588	0.39*	0.96	(0.63-1.46)**
		CEX	100	>16	—
		CCL	100	>16	—
<i>E. coli</i> 113 (PCase)	1.3×10 ⁷ 28 LD ₅₀	T-2588	0.39*	0.38	(0.21-0.67)
		CEX	25	>16	—
		CCL	25	>16	—
<i>E. coli</i> 148 (PCase)	1.3×10 ⁷ 10 LD ₅₀	T-2588	0.39*	0.39	(0.19-0.81)
		CEX	25	>16	—
		CCL	50	>16	—
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	3.5×10 ² 250 LD ₅₀	T-2588	0.10*	0.34	(0.26-0.44)
		CEX	6.25	2.00	(1.66-2.40)
		CCL	0.39	0.21	(0.15-0.29)
<i>E. cloacae</i> 113 (CSase)	2.6×10 ⁶ 40 LD ₅₀	T-2588	0.39*	0.097	(0.067-0.141)
		CEX	50	1.00	(0.68-1.47)
		CCL	12.5	0.93	(0.66-1.32)
<i>P. vulgaris</i> 6 (CSase)	1.5×10 ⁷ 71 LD ₅₀	T-2588	0.05*	0.072	(0.046-0.112)
		CEX	100	4.00	(2.60-5.96)
		CCL	100	0.26	(0.17-0.39)
<i>S. marcescens</i> T-55 (CSase)	3.0×10 ⁵ 15 LD ₅₀	T-2588	0.78*	0.12	(0.06-0.22)
		CEX	100	> 4	—
		CCL	50	1.20	(0.68-2.12)

* MIC of T-2525, ** 95% confidence limits

Table 9 Serum levels and urine excretion of T-2588, CEX and CCL in mice
(n=5)

Drugs	Serum levels ($\mu\text{g/ml}$)				Urine excretion (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
T-2588	11.94±1.61	9.78±2.23	5.55±1.04	1.75±0.85	32.27±2.55
CEX	26.17±6.31	17.38±2.18	3.82±1.18	1.92±0.74	84.91±7.21
CCL	8.86±0.96	4.08±0.69	2.00±0.19	0.66±0.33	50.75±2.38

50 mg/kg of cepheps were orally administrated.

(Mean±SE)

および CCL の抗菌力が及ばなかった *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, インドール陽性の *Proteus* あるいは *Serratia* に対しても良好な抗菌力を示した。また T-2525 は β -lactamase に対して優れた安定性を示し, CEX や CCL が分解を受け易かった CSase に対しても高い安定性を示した。T-2525 の *in vitro* における優れた抗菌力は, これら β -lactamase に対する安定性と作用部位である PBP_s, 特に PBP_s 3 に対する高い親和性に起因するものと考えられる。

T-2588 の実験的マウス腹腔内感染症に対する治療効果は *S. aureus* に対して CEX や CCL に劣ったものの,

S. pyogenes, *S. pneumoniae* あるいはグラム陰性桿菌に対してはいずれも優れた治療効果を示し, 特に CEX や CCL が治療効果を示さなかった β -lactamase 産生菌に対しても優れた治療効果を示し, *in vitro* の抗菌力が *in vivo* の治療効果にも反映されていた。また T-2588 のマウスにおける尿中回収率は CEX や CCL に及ばなかったものの, 血中濃度は比較的良好な値を示し, MIC に比べて高い血中濃度が持続した。以上の結果より T-2588 の優れた *in vivo* 効果は T-2525 の強い抗菌力に起因するものと考えられる。

近年, 既存の経口用セフェム剤に感受性を示さない,

いわゆる弱毒菌による感染症が多くなってきており、一方、呼吸器感染症における *S. pneumoniae*, *H. influenzae* あるいは尿路感染における *E. coli* などはおお起炎菌として重要な位置を占めている。T-2588 (T-2525) は幅広い抗菌スペクトルを有しており、*in vivo* においてもその抗菌力の特徴を発揮するものと考えられる。

文 献

- 1) 西野武志, 大槻雅子, 宮川行正, 大井麻実子, 平野葉子, 谷野輝雄: セファロsporin系抗生物質 Cefoperazone (T-1551) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 28 (S-6): 45~67, 1980
- 2) 西野武志, 大槻雅子, 宮川行正, 大藪有子, 田頭洋子, 西本佳夫, 谷野輝雄: Cefmenoxime (SCE-1365) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 29 (S-1): 57~88, 1981
- 3) 西野武志, 大槻雅子, 宮川行正, 谷野輝雄: 新しいセファロsporin系抗生物質 Cefotaxime に関する細菌学的評価。Chemotherapy 28 (S-1): 42~64, 1980
- 4) BILL, N. J. & J. A. WASHINGTON.: Comparison of *in vitro* activity of cephalixin, cephradine, and cefaclor. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 470~471, 1977
- 5) NEU, H. C. & K. P. FU: Cefaclor: *in vitro*

- spectrum of activity and beta-lactamase stability. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 584~588, 1978
- 6) NEU, H. C. & K. P. FU: Cefatrizine activity compared with that of other cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 209~212, 1979
- 7) 第33回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, T-2588 抄録集, 1985
- 8) 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
- 9) PERRT, C. J.: Iodometric assay for penicillinase. Nature 174: 1012~1013, 1954
- 10) SPRATT, B. G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. 72: 341~352, 1977
- 11) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiment. J. Pharmacol. Exp. Therap. 96: 99~113, 1949
- 12) 西野武志, 横田好子, 谷野輝雄: 新合成セファロsporin系抗生物質 Ceftizoxime (CZX) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 28 (S-5): 58~82, 1980

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF T-2588, A NEW ORAL CEPHEM ANTIBIOTIC

TAKESHI NISHINO, YASUSHI IKEDA, YOSHIKI OBANA,
TOSHIMI GOTOH and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-2588, a new oral cephem antibiotic, were compared with those of cephalixin (CEX) and cefaclor (CCL).

T-2525 (the active form of T-2588) had a broad antibacterial spectrum against Gram-positive and Gram-negative organisms, and was especially active against indole-positive *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, and *Enterobacter cloacae* which were not susceptible to CEX or CCL. T-2525 showed the high bactericidal activity at low concentrations against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *S. marcescens* used in this study. The bactericidal activity of T-2525 against *Staphylococcus aureus* was similar to that of CEX and CCL. The β -lactamase stability of T-2525 was superior to that of CEX and CCL.

The therapeutic effects of T-2588 against experimental intraperitoneal infections caused by Gram-positive cocci, such as *Streptococcus pyogenes* and *S. pneumoniae*, and Gram-negative bacilli in mice were superior to those of CEX and CCL, but were less active against *S. aureus* than those of reference agents. In addition, T-2588 was active against experimental infections in mice caused by β -lactamase producing *E. coli*, which CEX and CCL were not effective.

The 6 hr urinary recovery in mice was 32.3% for T-2588, 84.9% for CEX, and 50.8% for CCL after a single oral dosing with 50 mg/kg.