

新しいエステル型経口用セフェム剤 T-2588 の実験的感染症 に対する治療効果について

才川 勇・保田 隆・四辻 彰・高畑正裕

渡辺泰雄・西田亨子・柿澤裕美

富山化学工業株式会社総合研究所

マウスおよびラットを用いて各種感染モデルを作製し、これらに対する T-2588 の治療効果を既存の経口剤を対照として比較検討したので報告する。

1) マウス全身感染に対する T-2588 の治療効果をセフェム剤以外の経口剤と比較したところ、T-2588 は ofloxacin (OFLX) とほぼ同等で、pipemidic acid (PPA) や fosfomycin (FOM) より優れた効果を示した。

2) Cyclophosphamide または azathioprine 投与であらかじめ免疫を低下させたマウスを用いた全身感染に対する T-2588 の治療効果は cephalexin (CEX), cefaclor (CCL) および cefroxadine (CXD) より優れていた。

3) マウス尿路感染に対する T-2588 の治療効果を CEX, CCL および CXD と比較したところ T-2588 は *S. aureus* F-31 感染に対しては他剤とほぼ同等、グラム陰性菌感染に対しては他剤より優れていた。

4) マウス肺炎に対する T-2588 の治療効果は *K. pneumoniae* 感染に対しても *S. pneumoniae* 感染に対しても CEX, CCL より優れていた。

5) ラット子宮内感染に対して T-2588 は治療効果が認められたが CEX, amoxicillin (AMPC) は治療効果が認められなかった。

T-2588 は富山化学工業(株)総合研究所で開発された新しいエステル型経口用セフェム剤 (Fig. 1) である。T-2588 は腸管から吸収され酵素的に加水分解を受け抗菌活性を有する T-2525 となる。T-2525 は嫌気性菌を含むグラム陽性菌、グラム陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを有し、特に従来の経口セフェム剤に対し感受性が低い *Citrobacter* 属, *Enterobacter* 属, indole (+) *Proteus* 属, *Serratia* 属に対して強い抗菌力を示す。また T-2525 は各種細菌の産生する β -lactamase に対して従来の経口セフェム剤よりも強い抵抗性を示す。

著者らは先に T-2588 の *in vivo* における有効性の検討としてマウス実験感染に対する治療効果について報告したり、今回 T-2588 についてセフェム剤以外の経口抗菌剤を対照としたマウス全身感染に対する治療効果、免疫低下時のマウス全身感染に対する治療効果、更に局所感染系としてマウス尿路感染に対する治療効果、マウス肺炎に対する治療効果、およびラット子宮内感染に対する治療効果を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

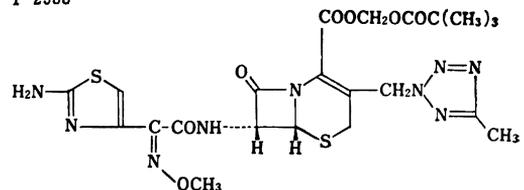
1) 使用薬剤

T-2588 および T-2525 は当社総合研究所で合成され

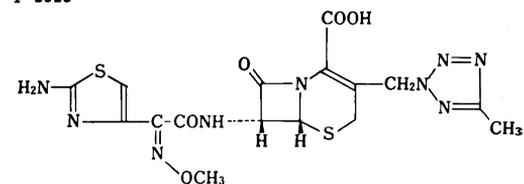
たものを使用した。なお感染治療実験における T-2588 の投与量は T-2525 換算とした。対照薬剤として cephalexin (CEX: 富山化学), cefaclor (CCL: 塩野義製薬), cefroxadine (CXD: 日本チバガイギー), amoxicillin (AMPC: ビーチャム薬品), fosfomycin (FOM: 明治製薬), pipemidic acid (PPA: 大日本製薬), およ

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

T-2588



T-2525



び ofloxacin (OFLX: 第一製薬) を用いた。また免疫抑制剤として cyclophosphamide (CP: 塩野義製薬) および azathioprine (AZ: 住友化学), またラット子宮内感染のために progesterone (帝國臓器) を用いた。

2) 使用菌株

Staphylococcus aureus F-31, *Streptococcus pneumoniae* D-289, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *E. coli* TK-16, *E. coli* TK-264, *Klebsiella pneumoniae* Y-41, *K. pneumoniae* Y-50, *Proteus mirabilis* T-111, *P. mirabilis* T-287, *Proteus vulgaris* T-181 および *Serratia marcescens* IID 620 を用いた。各菌は Heart infusion agar (HIA: 栄研) 上で1夜培養した後、菌体をかき取り生理食塩液に懸濁浮遊させて用いた。なお *S. pneumoniae* D-289 はチョコレート平板で培養し、1/15 M リン酸塩緩衝液に懸濁浮遊して用いた。

3) 使用動物

マウスは SLC/ICR 系, 雄または雌, 体重 20 ± 1 g, 1群 5~28 匹を用いた。ラットは Wistar 系, 雌, 体重 220 ± 20 g, 1群 3 匹を用いた。

4) 抗菌力測定

日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法²⁾ に従って抗菌力を測定した。なお感受性測定用培地には Mueller-Hinton agar (MHA: 栄研) を用い、*S. pneumoniae* D-289 の場合は羊血液を 10% 添加した。

5) マウス全身感染

感染菌は 5% gastric mucin (半井化学薬品) に懸濁し腹腔内接種した。なお *E. coli* TK-16 は生理食塩液に懸濁して用いた。免疫低下マウスの作製には cyclophosphamide (CP) または azathioprine (AZ) を用いた。CP を用いる場合は 1 mg/mouse を1回腹腔内に投与し、4日後に菌の接種を行ない、また AZ を用いる場合は 2 mg/mouse を4日間経口投与し最終投与翌日に菌の接種を行った。治療は感染1時間後におのおの1回経口投与した。治療効果は感染7日後の生存匹数から LITCHFIELD WILCOXON 法または VAN DER WAERDEN 法により算出した ED₅₀ (mg/mouse) 値で示した。

6) マウス尿路感染³⁾

マウスの尿道口から膀胱へ直接菌液を 0.1 ml 注入しクレンメにて4時間尿道口を閉鎖し感染させた。治療は感染翌日から1日 50 mg/kg 2回3日間経口投与した。治療効果は最終投与翌日の腎内生菌数で測定した。なお腎内生菌数はマウスの腎臓を摘出し生理食塩液を加えてホモジナイズ後平板塗抹法にて測定した。

7) マウス肺炎⁴⁾

K. pneumoniae Y-41 はネブライザーを用いる噴霧感染とし治療は感染4時間後に初回投与を行なった後、1

日 0.1 mg/mouse または 1 mg/mouse 2回7日間経口投与した。

S. pneumoniae D-289 は上気道付近を切開し気道気管支に菌液 0.1 ml を注入する経気道感染とし、治療は感染4時間後に 0.001 mg~1 mg/mouse 1回経口投与した。治療効果は治療開始後8日間の生存率および肺内生菌数の消失率で判定した。なお肺内生菌数はマウスの肺を摘出し生理食塩液を加えてホモジナイズ後平板塗抹法にて測定した。

8) ラット子宮内感染⁵⁾

ラットは菌感染前日から progesterone 1 mg/rat を1日2回筋肉内投与し、内分泌学的に progesterone 優位にして用いた。ラットを背位に固定して開腹し動脈を避けて子宮頸を結紮した。2本の子宮角に 5% gastric mucin に懸濁した菌液を 0.1 ml ずつ注入し子宮内感染を惹起させた。治療は感染1時間後に 10 mg/kg 1回経口投与した。治療効果は経時的に子宮内生菌数を測定して判定した。なお子宮内生菌数は、ラットの子宮を摘出し生理食塩液を加えてホモジナイズ後平板塗抹法にて測定した。

II. 実験結果

1) マウス全身感染に対する治療効果—セフェム剤以外の経口剤との比較—

マウス全身感染に対する T-2588 の治療効果を FOM, PPA および OFLX と比較しその結果を Table 1 に示した。

E. coli TK-16 感染に対し T-2588 の ED₅₀ 値は 0.17 mg/mouse で OFLX より劣るが FOM, PPA より優れた治療効果を示した。

K. pneumoniae Y-41 感染に対し T-2588 の ED₅₀ 値は 0.17 mg/mouse で OFLX よりやや劣っていた。なお FOM, PPA は無効であった。

S. marcescens IID 620, *P. vulgaris* T-181, *P. mirabilis* T-111 感染に対し T-2588 の ED₅₀ 値は 0.012~0.014 mg/mouse で OFLX とほぼ同等で FOM, PPA より優れた治療効果を示した。

2) 免疫低下時のマウス全身感染に対する治療効果

Cyclophosphamide (CP) 投与または azathioprine (AZ) 投与であらかじめ免疫を低下させたマウスを用いた全身感染に対する T-2588 の治療効果を CEX, CCL および CXD と比較しその結果を Table 2 に示した。*E. coli* TK-16 感染に対し T-2588 の ED₅₀ 値は非投与群で 0.025 mg/mouse, CP 投与群で 0.105 mg/mouse, AZ 投与群で 0.12 mg/mouse といずれの群においても CEX, CCL および CXD より優れた治療効果を示した。

3) マウス尿路感染に対する治療効果

Table 1 *In vivo* antibacterial activity of T-2588, FOM, PPA and OFLX against systemic infection

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
				10 ⁶ cells/ml	10 ⁸ cells/ml	
<i>E. coli</i> TK-16	2.6×10 ⁷	-	T-2588*	0.2	0.2	0.17
			FOM	200	200	4.67
			PPA	1.56	1.56	1.02
			OFLX	0.025	0.025	0.018
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	1.7×10 ⁸	+	T-2588	0.39	0.78	0.17
			FOM	>200	>200	>10
			PPA	6.25	6.25	>10
			OFLX	0.2	0.39	0.096
<i>S. marcescens</i> IID620	1.8×10 ⁷	+	T-2588	0.2	0.39	0.014
			FOM	12.5	100	1.77
			PPA	0.78	0.78	0.44
			OFLX	0.2	0.2	0.018
<i>P. vulgaris</i> T-181	2.8×10 ⁷	+	T-2588	0.1	0.2	0.012
			FOM	6.25	25	0.19
			PPA	1.56	3.13	0.39
			OFLX	0.05	0.05	0.010
<i>P. mirabilis</i> T-111	2.8×10 ⁷	+	T-2588	0.1	0.2	0.013
			FOM	0.78	6.25	0.22
			PPA	6.25	6.25	0.29
			OFLX	0.39	0.39	0.032

Therapy : Oral administration at 1 hr after i.p. infection

Animal : SLC/ICR strain mice, 20±1 g, ♂, 5 mice/group

Calculation of ED₅₀ : VAN DER WAERDEN method

* MIC of T-2588 represents as MIC of T-2525

Table 2 *In vivo* antibacterial activity of T-2588, CEX, CCL and CXD against systemic infection

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)		
	10 ⁶ cells/ml	10 ⁸ cells/ml	Control	+CP ^{a)}	+AZ ^{b)}
T-2588*	0.2	0.2	0.025	0.105	0.12
CEX	12.5	12.5	1.12	5.80	3.80
CCL	3.13	25	0.16	1.43	0.63
CXD	6.25	25	0.39	2.18	1.16

Strain : *E. coli* TK-16

Challenge dose : ^{a)} 1.67×10⁷ cells/mouse i.p. infection at 4th day after
i.p. administration of 1 mg/mouse ×1 day cyclophosphamide (CP)

^{b)} 1.67×10⁷ cells/mouse i.p. infection at 1st day after
p.o. administration of 2 mg/mouse×4 days azathioprine (AZ)

Therapy : Oral administration at 1 hr after i.p. infection

Animal : SLC/ICR strain mice, 20±1 g, ♂, 10 mice/group

Calculation of ED₅₀ : LITCHFIELD WILCOXON method

* MIC of T-2588 represents as MIC of T-2525

マウス尿路感染に対する T-2588 の治療効果を CEX, CCL および CXD と比較しその結果を Fig. 2 に示した。

S. aureus F-31 感染の場合の腎内生菌数は、無治療群では 1.74×10^8 cells/kidney であった。T-2588 投与群では 3.80×10^8 cells/kidney に減少し対照薬剤とほぼ同等の治療効果を示した。

E. coli TK-16, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* Y-50 および *P. mirabilis* T-287 感染の場合の腎内生菌数は無治療群では $8.51 \times 10^5 \sim 1.05 \times 10^7$ cells/kidney であった。T-2588 投与群では $4.57 \times 10^5 \sim 1.31 \times 10^4$ cells/kidney に減少し、ほとんどの菌株において対照薬剤より優れた治療効果を示した。

4) マウス肺炎に対する治療効果

マウス肺炎に対する T-2588 の治療効果を CEX, CCL と比較しその結果を Table 3 に示した。

K. pneumoniae Y-41 感染に対し T-2588 の 1mg/

mouse 連投群の効果は生存率、肺内生菌数の消失率共 100% と優れていた。なお CCL の生存率が 40% を示した以外対照薬剤の効果は認められなかった。また T-2588 の 0.1 mg/mouse 連投群では生存率 53%、菌消失率 13.3% と T-2588 の投与量を下げても効果が認められた。しかし対照薬剤の効果は全く認められなかった。

S. pneumoniae D-289 感染に対し T-2588 の 1mg/mouse 1 回投与群の効果は、生存率、菌消失率共 100% と優れていた。なお CEX, CCL の生存率は 36%, 50%、菌消失率は共に 21.4% であった。また T-2588 の 0.1 mg/mouse 1 回投与でも生存率 86%、菌消失率 78.6% と優れた効果が認められた。しかし対照薬剤の効果はほとんど認められなかった。

5) ラット子宮内感染に対する治療効果

ラット子宮内感染に対する T-2588 の治療効果を CEX, AMPC と比較しその結果を Fig. 3 に示した。

E. coli TK-264 2.69×10^8 cells/uterine 接種した後無

Fig. 2 *In vivo* antibacterial activity of T-2588, CEX, CCL and CXD against urinary kidney-bladder infection in mice (n=6~8)

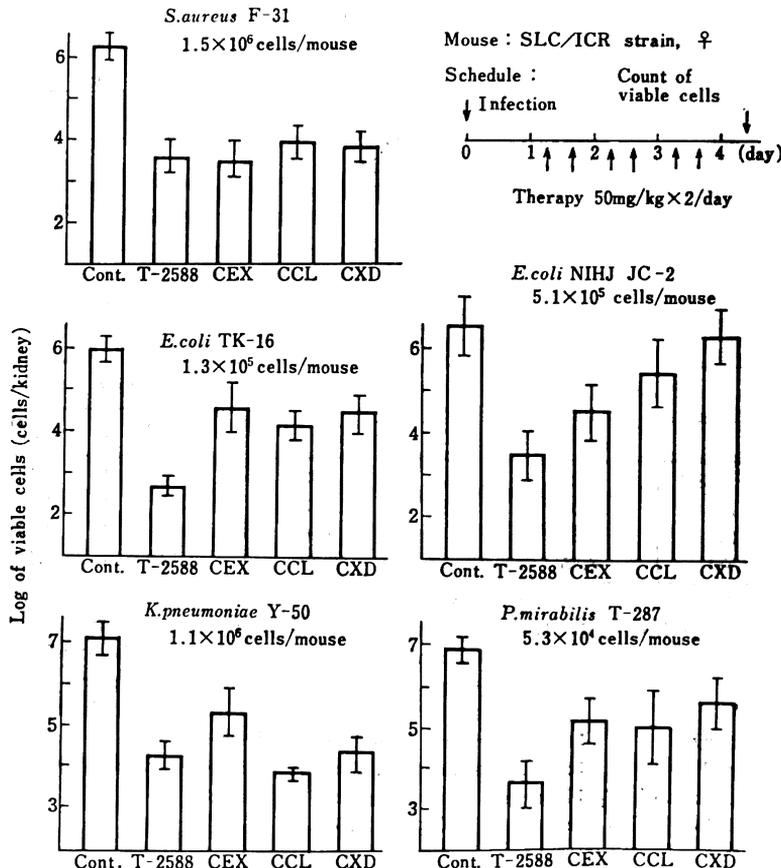


Table 3 *In vivo* antibacterial activity of T-2588, CEX and CCL against pneumonic infection in mice (n = 15)

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cells/ml	Dose (mg/mouse) \times times*	8 days' survival (%)	Eradication*** (%)
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	4×10^4	T-2588**	0.39	1 \times 15	100	100
		CEX	12.5		0	0
		CCL	1.56		40	0
		T-2588	0.39	0.1 \times 15	53	13.3
		CEX	12.5		0	0
		CCL	1.56		0	0

Oral administration at 4 hr after infection

* Two times per day

** MIC of T-2588 represents as MIC of T-2525

*** Bacterial negative/Total

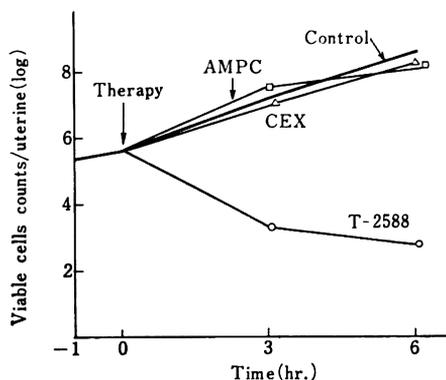
In vivo antibacterial activity of T-2588, CEX and CCL against pneumonic infection in mice

Strain	Challenge dose (cells/mouse)	Drug	Number of mice	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cells/ml	Dose (mg/mouse)	8 days' survival (%)	Eradication** (%)
<i>S. pneumoniae</i> D-289	8×10^5	T-2588*	7	0.0125	1	100	100
		CEX	14	1.56		36	21.4
		CCL	14	0.39		50	21.4
		T-2588	14	0.0125	0.1	86	78.6
		CEX	21	1.56		19	9.5
		CCL	21	0.39		33	9.5
		T-2588	28	0.0125	0.01	61	28.6
		T-2588	14	0.0125	0.001	36	14.2

Oral administration at 4 hr after infection

* MIC of T-2588 represents as MIC of T-2525

** Bacterial negative/Total

Fig. 3 Bactericidal effects of T-2588, CEX and AMPC against intrauterine infection with *E. coli* TK-264MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Drug	10^6 cells/ml	10^8 cells/ml
T-2588*	0.025	0.05
CEX	6.25	6.25
AMPC	3.13	6.25

Animal: Wistar strain rat
220 \pm 20 g, ♀, (n = 3)

Drug: Oral administration of
10 mg/kg at 1 hr after
intrauterine infection

* MIC of T-2588 represents
as MIC of T-2525

治療群の子宮内生菌数は漸増し、治療開始6時間後には 4.57×10^8 cells/uterine となった。T-2588 投与群の子宮内生菌数は漸減し、治療開始6時間後には 6.31×10^8 cells/uterine となった。しかし、CEX, AMPC 投与群の子宮内生菌数は無治療群と近似した推移を示し治療効果は認められなかった。

III. 考 察

多くの経口用セフェム剤が開発され臨床応用されているが、そのグラム陰性菌に対する抗菌力の弱さゆえ、その使用には限界があり、グラム陰性菌にも幅広く効く経口用セフェム剤の開発が望まれていた。

T-2588 は T-2525 の prodrug であり、経口投与により腸管より吸収され、酵素的に加水分解されて T-2525 となる。T-2525 はグラム陽性菌をはじめ、従来の経口セフェム剤の弱点であるグラム陰性菌に対しても広範囲な抗菌スペクトラムを示し、また各種 β -lactamase に対しても強い抵抗性を示した。この T-2525 の *in vitro* における優れた抗菌作用が臨床にいかん反映されるかを予測するため種々の実験感染系を用いて T-2588 の治療効果を各種経口剤を対照として比較した。

先に著者らはマウス全身感染に対して T-2588 が優れた治療効果を示したことを報告した¹⁾。今回、マウス全身感染に対する治療効果をセフェム剤以外の経口剤と比較した。T-2588 はピリドンカルボン酸系抗生剤で優れた抗菌力を有する OFLX とほぼ同等、PPA より優れ、また経口抗生剤の FOM より優れた効果を示した。また cyclophosphamide や azathioprine 投与であらかじめ免疫を低下させた状態においても T-2588 は優れた治療効果を示した。このことは近年注目されている compromised host⁶⁾ への適用を考える上で興味ある知見である。

ところでマウス全身感染系は急性で激烈な感染系であるため、臨床効果を想定しての *in vivo* 試験法としては問題であるとの指摘もある。そこで臨床に近い感染系であるマウス尿路感染、マウス肺炎、およびラット子宮内

感染に対する T-2588 の有効性を検討した。T-2588 はマウス尿路感染に対してグラム陰性菌をはじめ、*S. aureus* にも優れた治療効果を示した。またマウス実験的肺炎においては感染菌としてグラム陰性菌またはグラム陽性菌を用いた場合、いずれも良好な効果が認められた。さらにラット子宮内感染に対しても T-2588 は効果が認められた。このように T-2588 はマウスやラットを用いた局所感染系にも有効性が認められた。

T-2588 の種々の実験感染系での優れた治療効果は T-2588 の原体である T-2525 の優れた抗菌力、幅広い抗菌スペクトラムと同時に T-2588 の比較的ゆるやかな血中からの消失および感染病巣への良好な移行のためと考えられる。今後さらに各種感染モデルについて検討し臨床応用領域の拡大の可能性について追求する予定である。

文 献

- 1) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 福岡義和, 四辻 彰, 南新三郎, 山城芳子, 荒木春美, 大懸直子: 新しいエステル型経口用セフェム剤 T-2588 の抗菌作用について。Chemotherapy 34 (S-2): 66~84, 1986
- 2) 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(1): 76~79, 1981
- 3) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島瑛智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研究。Chemotherapy 30: 1237~1249, 1982
- 4) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 穴戸春美, 鈴木 寛, 野口行雄, 玉置公俊, 罹 士易, 井手政利: 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日胸疾会誌 16: 581~587, 1978
- 5) 館野政也, 西田亨子, 黒津幸雄, 保田 隆, 才川 勇: 実験的子宮内感染症ラットの作製とセファロsporin系抗生剤による治療効果について。Chemotherapy 29: 68~75, 1981
- 6) 螺良英郎, 福山興一: Immunocompromised host. 日本臨牀 43 春季臨時増刊号: 107~112, 1985

THERAPEUTIC EFFECT OF T-2588, A NEW ORAL
CEPHEM ANTIBIOTIC ON VARIOUS
EXPERIMENTAL INFECTIONS

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, AKIRA YOTSUJI, MASAHIRO TAKAHATA,
YASUO WATANABE, NAGAKO NISHIDA and HIROMI KAKIZAWA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The therapeutic effects of T-2588 on various experimental infections in mice and in rats were studied in comparison with other oral antimicrobial agents.

1) The therapeutic effect of T-2588 was equal to that of ofloxacin and was superior to those of pipemidic acid and fosfomycin against systemic infection in mice.

2) The therapeutic effect of T-2588 was superior to those of cephalexin (CEX), cefaclor (CCL) and cefroxadine (CXD) against systemic infection in mice treated with immunosuppressive cyclophosphamide or azathioprine.

3) On pyelonephritis with *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria in mice, the therapeutic effect of T-2588 was equal or superior to those of CEX, CCL and CXD.

4) On pneumonia with *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus pneumoniae* in mice, the therapeutic effect of T-2588 was superior to those of CEX and CCL.

5) On intrauterine infection with *Escherichia coli* in rats, the therapeutic effect of T-2588 was superior to those of CEX and amoxicillin.