

L-105 の細菌学的評価

疋田宗生・三橋 進

エビゾーム研究所

井上松久

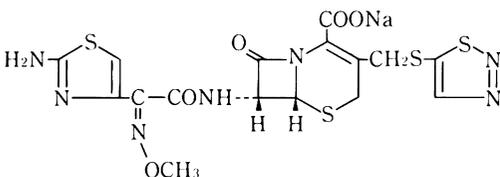
群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

3位側鎖に 1,2,3-thiadiazol 基を導入した新しい注射用セフェム系抗生物質 L-105 の抗菌力を cefmenoxime (CMX), cefoperazone (CPZ) および cefazolin (CEZ) を対照薬として比較検討した。グラム陽性菌に対して L-105 は CMX および CPZ に比べ明らかに高い抗菌活性を示した。とくに *S. aureus* に対し L-105 は CEZ とほぼ同等の抗菌力を示し、また methicillin 耐性 *S. aureus* に対しても抗菌活性がみられた。本剤のグラム陰性菌に対する抗菌力は CMX とほぼ同等であった。

殺菌力の検討では *S. aureus*, *E. coli* および *K. pneumoniae* に対し、L-105 は 1/2~1 MIC 濃度で殺菌的に作用した。また *E. coli* の形態変化の観察では、L-105 1/16 MIC 濃度においてさえ、菌の filament 化が認められた。*E. coli* の penicillin binding proteins (PBPs) に対する L-105 の親和性は、PBP 3, 1A, 1Bs, 2 の順に高かった。 β -lactamase に対する安定性を検討した結果、本剤はプラスミド支配の penicillinase (PCase) および菌種特有の酵素である cephalosporinase (CSase) に対し安定であった。しかし、本剤は *P. vulgaris*, *P. cepacia* および *X. maltophilia* 由来の oxyiminocephalosporinase (CXase) によって少し分解された。*S. aureus* および *E. coli* によるマウス実験的感染症に対する本剤の治療効果を検討し、治療効果のあることを認めた。

L-105 は日本レダリー株式会社で合成、開発された新しい半合成セファロスピリンの注射剤である。7位側鎖に aminothiazolyl-methoxyiminoacetamido 基を、3位側鎖には thiadiazolyl-thiomethyl 基を有している (Fig. 1)。今回 L-105 の標準菌株および臨床分離株に対する抗菌力、殺菌作用、形態変化の観察、penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性、 β -lactamase に対する安定性およびマウス感染治療実験などについて検討を行ったので報告する。なお、比較薬剤として主に cefmenoxime (CMX), cefoperazone (CPZ) を用いた。

Fig. 1 Chemical structure of L-105



I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

L-105 は日本レダリーから提供された粉末を用いた。CMX, cefotiam (CTM) は武田薬品, CPZ は富山化学, cefazolin (CEZ) は藤沢薬品, cephaloridine (CER) は鳥居薬品, penicillin G (PCG) は明治製菓, methicillin (DMPPC) は萬有製薬からそれぞれ分与を受け、対照薬として用いた。

2. 使用菌株

標準菌株¹⁾ および各種臨床分離細菌は群馬大学医学部付属薬剤耐性菌実験施設で昭和56~59年に集めた保存株を用いた。

3. 使用培地

感受性測定には、Mueller-Hinton (MH) 寒天培地 (栄研) および Proteose No. 3 寒天培地 (Difco) を使用した。Minimum bactericidal concentration (MBC) の測定と殺菌曲線の検討には Antibiotic medium 3 (ABM 3, Difco), MH 液体培地 (BBL) をそれぞれ使用した。菌液の希釈には、Buffered saline gelatin (BSG) 溶液²⁾ を用いた。PBPs に対する親和性の検討に用いる膜標品調製のための菌の培養には、ABM 3 を使用し、また菌の形態変化観察ならびに β -lactamase の調製のためには

Sensitivity test (ST) 寒天培地 (日水, Medium B³⁾) をおのおの用いた。

マウス感染治療実験に用いる感染菌の培養には Brain heart infusion (BHI) 液体培地 (Difco) を使用した。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

L-105 の抗菌力に及ぼす諸因子として培地の種類, 培地 pH, ウマ血清添加および接種菌量の影響について検討を行った。

5. 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た。すなわち, 被検菌の MH 液体培地 37°C, 一夜培養液 (10⁸~10⁹ cells/ml) を約 10⁶ cells/ml になるように BSG 溶液で希釈し, ミクロプランター (佐久間製作所) を用い, 薬剤含有 MH 寒天培地に約 5 μ l 接種し, 37°C, 18時間培養後, 被検菌の発育が認められない最小濃度をもって Minimum inhibitory concentration (MIC) とした。なお, *Streptococcus* 属の前培養には BHI 液体培地を用い, 薬剤含有寒天培地として10%ウマ脱繊維血液加 MH 寒天培地を使用した。*H. influenzae* は Hemin 10 μ g/ml, Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 2 μ g/ml 加 MH 液体培地を前培養液とし, Hemin, NAD 加 MH 寒天培地にて感受性測定を行った。*N. gonorrhoeae* の場合は 1% Hemoglobin, 1% Difined supplement 加 Proteose No. 3 寒天培地で培養後, MH 液体培地に菌を浮遊させ約 10⁷ cells/ml とし, 薬剤含有同寒天培地に接種し, MIC を求めた。また, *P. aeruginosa* の前培養には, 0.3% KNO₃ 加 MH 液体培地を用いた。

6. 殺菌力測定

殺菌効果の判定には以下の2項目について検討を行った。

1) MBC の測定

標準菌株26株, 感染防御試験菌株3株, 計29株を被検菌とした。ABM 3 で 37°C, 一夜培養した菌液を希釈し, 2倍希釈系列の薬剤を含む同液体培地に接種菌量が約 10⁶ cells/ml となるように接種した。37°C, 18時間培養後 MIC を求め, これらの薬剤を含有する液体培地からミクロプランターを用い薬剤無添加の ABM 3 寒天培地に接種し, 37°C, 18時間培養後, 菌の生育の認められない最小薬剤濃度を MBC とした。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus Smith, *E. coli* ML 4707 および *K. pneumoniae* GN 6445 の3株を被検菌とした。MH 液体培地にて 37°C, 一夜培養した菌液を同新鮮液体培地に接種し 37°C で振盪培養した。菌数が約 10⁴ cells/ml に達したときに最終濃度が 1/2, 1, 2, 4×MIC になるように各薬

剤を加えた。さらに振盪培養を続け, 薬剤添加後 2, 4, 8, 24各時間後の生菌数を測定した。

7. 形態変化の観察

被検菌として *E. coli* ML 4707 を用いた。スライドグラス上で各種薬剤を含有させたフィルム ST 寒天培地を作製し, 対数期の菌液を塗抹後, その上にカバーグラスをのせ, パラフィンでまわりを封じた。そして経時的に菌体の変化を位相差顕微鏡下で観察した。

8. PBPs に対する親和性

E. coli K 12 JE 1011 を被検菌として用い, 膜画分の調整は SPRATT-PARDEE の方法^{5,6)} に準じた。L-105 の PBPs に対する結合親和性は無標識の本剤と ¹⁴C-PCG との競合結合法で検討した。

9. β -lactamase に対する安定性

20 ml の Medium B にて一夜培養した菌液を新鮮な10倍量の同液体培地に接種し, 37°C にて (*X. maltophilia* GN 12893 については 30°C) 3時間振盪培養後集菌し, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後, 同一緩衝液に懸濁し超音波破碎した。その後 100,000×g 40分間超遠心し, その上清を粗酵素液とした。Penicillinase (PCase) 産生株, および *E. coli* GN 5482 を除いた cephalosporinase (CSase), oxyiminocephalosporinase (CXase) 産生株の場合は3時間振盪培養後に PCG (50~100 μ g/ml) を加えてさらに1時間振盪培養した菌体から同様にして酵素を抽出した。 β -lactamase 活性測定は spectrophotometric 法^{7,8)} により求めた。各薬剤の加水分解速度は LINEWEAVER-BURK の逆数 plot⁹⁾ より求めた。各薬剤の基質濃度は 100 μ M で, 用いた緩衝液は 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 反応測定温度は 30°C であった。L-105 の加水分解速度は 275 nm における吸光度の減少により求めた。CSase, CXase では CER を100とし, PCase では PCG を100とした相対加水分解速度で各薬剤の加水分解速度を表示した。

10. マウス感染治療実験

使用マウスは ddY 系, 雄, 4週齢, 体重 20±1g を用いた。感染菌として, *S. aureus* Smith, *E. coli* ML 4707 を用いた。*S. aureus* Smith については BHI 液体培地にて前培養後, 同培地で希釈し, 8% mucin (Difco) と等量混合した菌液の 0.5 ml をマウス腹腔内に接種した。*E. coli* ML 4707 に対しては mucin を使用せず直接 BHI 液体培地で希釈した菌液を同量接種した。2菌株とも菌接種後1時間および3時間後に各薬剤を皮下投与し, 治療を行った。各投与群15匹のマウスを用いた。投与後5日間生死を観察し, 各薬剤の50%有効投与量 (ED₅₀) 値を求めた。算定法は LITCHFIELD-WILCOXON

Table 1 Antibacterial activity of L-105 against standard strains of bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	L-105	CMX	CPZ	CEZ
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	0.39	0.78	0.78	0.2
<i>S. aureus</i> Terajima	0.025	0.05	0.1	0.05
<i>S. aureus</i> MS 353	0.2	0.39	0.39	0.1
<i>S. pyogenes</i> Cook	≤ 0.006	≤ 0.006	0.1	0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.2	0.39	0.1
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	≤ 0.006	≤ 0.006	0.05	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.05	0.1	0.78
<i>E. coli</i> K 12 C 600	0.1	0.05	0.1	0.78
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	≤ 0.006	≤ 0.006	0.025	0.78
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.1	0.1	0.39	0.78
<i>S. typhi</i> 901	0.1	0.05	0.2	0.78
<i>S. paratyphi</i> 1015	≤ 0.006	≤ 0.006	0.05	1.56
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.05	0.05	0.2	0.78
<i>S. enteritidis</i> G 14	≤ 0.006	≤ 0.006	0.1	0.78
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.05	0.025	0.39	>100
<i>M. morgani</i> IFO 3848	≤ 0.006	≤ 0.006	0.025	25
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.2	0.05	0.78	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	≤ 0.006	≤ 0.006	≤ 0.006	6.25
<i>P. vulgaris</i> HX-19	≤ 0.006	≤ 0.006	≤ 0.006	6.25
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	3.13	3.13	12.5	12.5
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.2	0.2	0.2	>100
<i>E. cloacae</i> 963	0.2	0.1	0.39	>100
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	12.5	12.5	3.13	>100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	3.13	1.56	0.39	>100

Inoculum size: 10^6 cells/ml

法¹⁰⁾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

治療標準菌株に対する L-105 の抗菌力を CMX, CPZ, CEZ と比較検討し、その結果を Table 1 に示した。L-105 はグラム陽性菌、陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力は CMX とほぼ同程度、CPZ よりやや優れた値を示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離 *S. aureus* 97株, DMPPC 耐性 *S. aureus* 22株, CEZ 耐性 *S. aureus* 33株, コアグラゼ (-) *Staphylococcus* 54株, *E. faecalis* 53株, *S. pyogenes* 81株, *S. pneumoniae* 24株, *E. coli* 95株, *K. pneumoniae* 56株, *K. oxytoca* 34株, *P. mirabilis* 81株, *P. vulgaris* 39株, *P. rettgeri* 54株, *E. cloacae* 81株, *C. freundii* 100株, *S. marcescens* 100株, *N. gonorrhoeae* 14株, *H. influenzae* 21

株, *A. calcoaceticus* 78株, *P. aeruginosa* 80株の 18 菌種 1,197株について L-105 の抗菌力を CMX, CPZ, CEZ と比較検討した。Fig. 2~21 に約 10^6 cells/ml $5 \mu\text{l}$ 接種時における各菌種の薬剤感受性分布と累積百分率を示した。

S. aureus では L-105 $0.39 \mu\text{g/ml}$ で供試菌 97 株中 96 株の菌の発育を阻止した。本剤の抗菌力は CMX に比べ 2 倍, CPZ に対しては 4 倍強く, CEZ よりも若干劣っていた (Fig. 2)。

37°C 培養で DMPPC に $12.5\sim 100 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示す *S. aureus* に対して L-105 は $25 \mu\text{g/ml}$ ですべての菌の発育を阻止したが、同濃度で CEZ, CMX は約 90% の発育阻止率であり L-105 の抗菌活性は 5 剤の中でもっとも優れていた (Fig. 3)。

CEZ に対する MIC 値が $6.25\sim 100 \mu\text{g/ml}$ の *S. aureus* に対しても L-105 は $25 \mu\text{g/ml}$ で菌株のすべてを発育阻

Fig. 2 Antibacterial activity of L-105
S. aureus (97 strains)

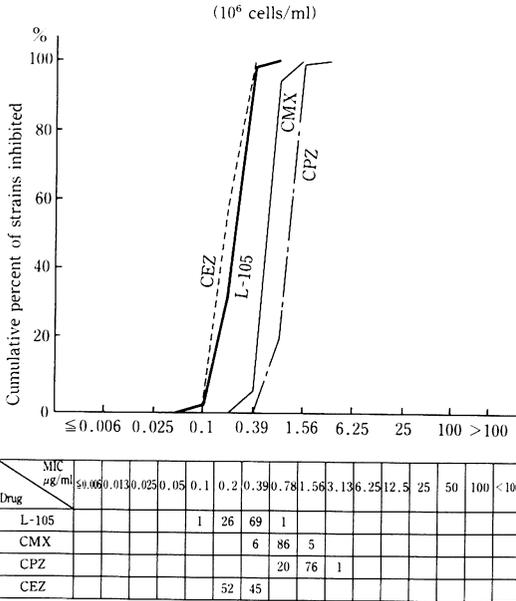


Fig. 4 Antibacterial activity of L-105
Cefazolin-resistant *S. aureus* (33 strains)

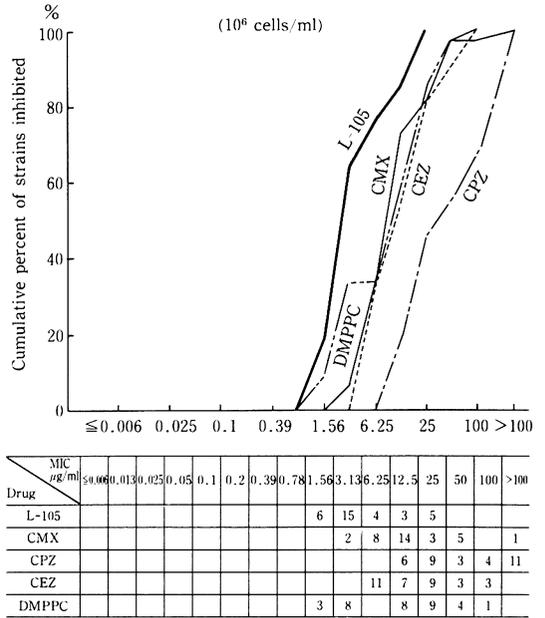


Fig. 3 Antibacterial activity of L-105
Methicillin-resistant *S. aureus* (22 strains)

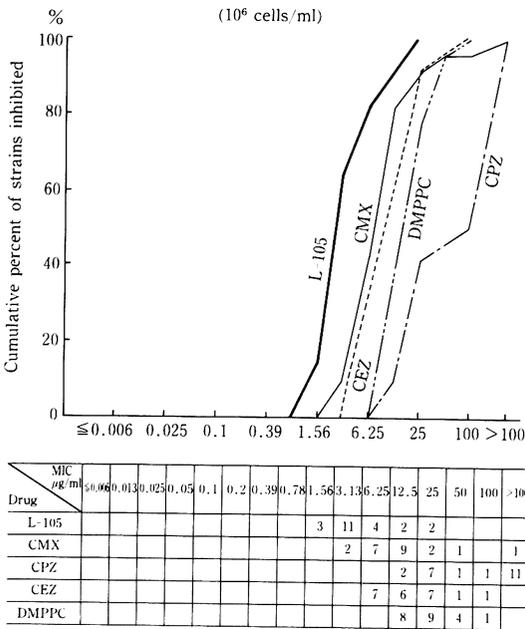
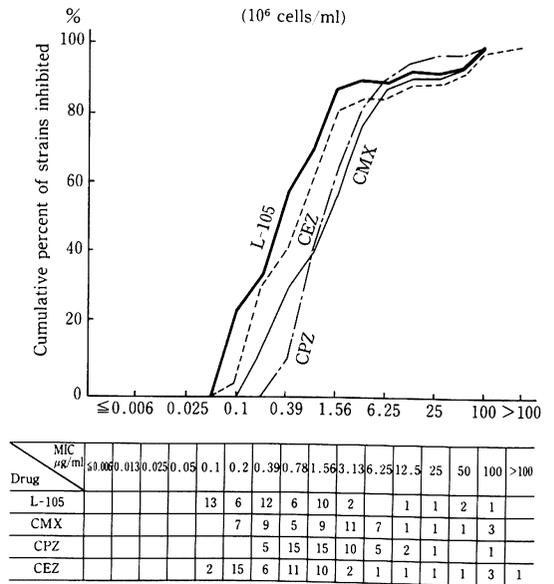


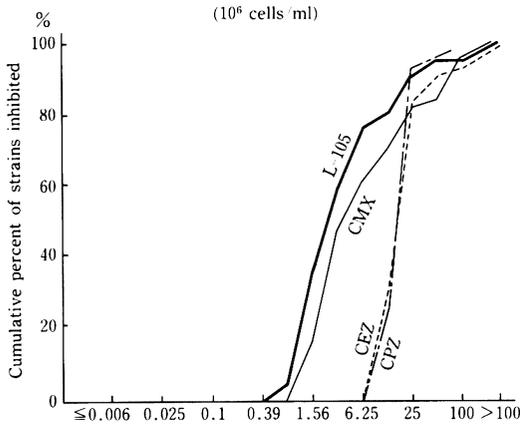
Fig. 5 Antibacterial activity of L-105
Coagulase (-) *Staphylococcus* (54 strains)



止したのに比べ、同濃度において CEZ, CMX, DMPPC では約80%の発育阻止率がみられ、本剤は他剤よりも強い抗菌力を示した (Fig. 4)。

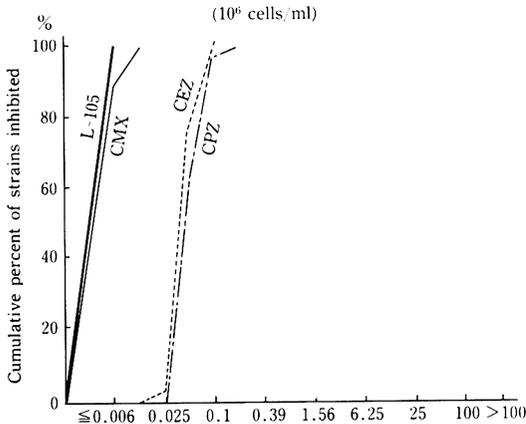
コアグラゼ (-) *Staphylococcus* に対して L-105 は 3.13 µg/ml で、その約90%の菌株の発育を阻止する抗菌活性を有し、同濃度において80%前後の発育阻止率を

Fig. 6 Antibacterial activity of L-105 *E. faecalis* (53 strains)



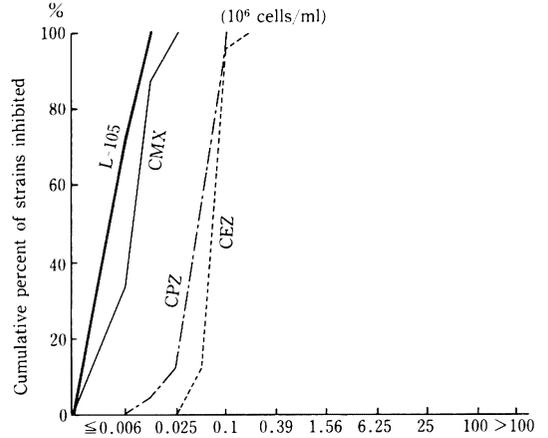
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105							2	16	13	9	2	5	3			3	
CMX								8	16	8	4	7	2	6	2		
CPZ													12	36	4	1	
CEZ												14	30	3	3	3	

Fig. 7 Antibacterial activity of L-105 *S. pyogenes* (81 strains)



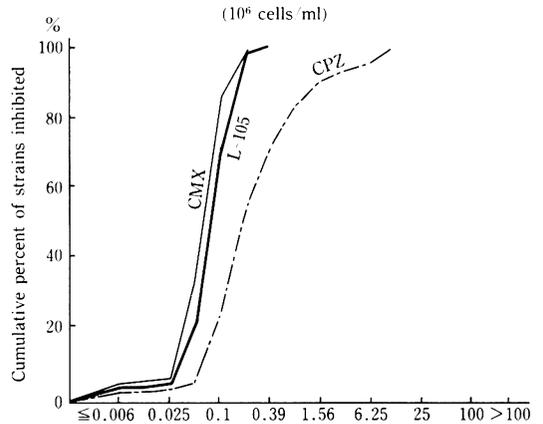
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105		81															
CMX		72	9														
CPZ				50	29	2											
CEZ			2	58	21												

Fig. 8 Antibacterial activity of L-105 *S. pneumoniae* (24 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105		17	7														
CMX		8	13	3													
CPZ			1	2	10	10	1										
CEZ					3	21											

Fig. 9 Antibacterial activity of L-105 *E. coli* (95 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105		2	1	1	16	44	29	2									
CMX		2	2	1	26	50	12	2									
CPZ		1	1	2	18	29	15	11	8	3	4	3					

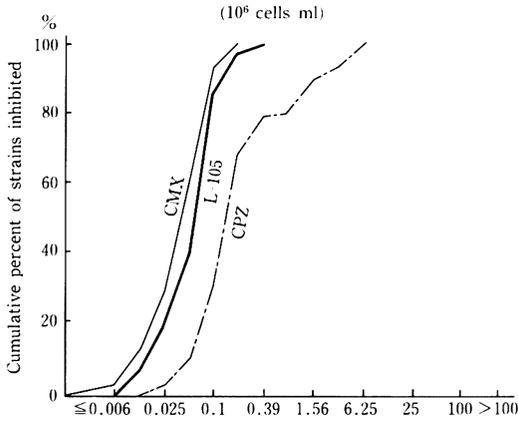
示す他剤よりも優れていた (Fig. 5)。

E. faecalis における L-105 の感受性ピークは 1.56 µg/ml にみられ、本剤の抗菌力は他の 3 剤より優れており CMX に比べ 2 倍、CEZ、CPZ に比べ 8 倍程度であ

たが、50 µg/ml 以上の耐性菌も約 10% 認められた (Fig. 6)。

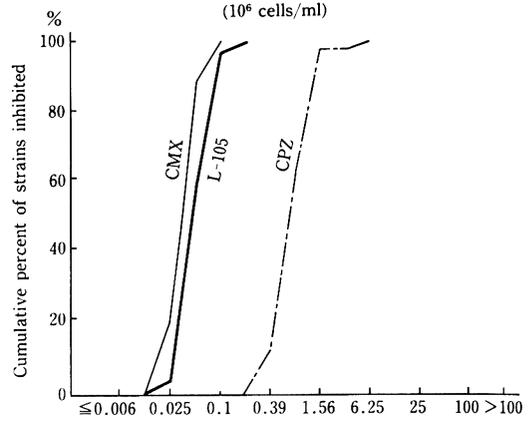
S. pyogenes では L-105 0.006 µg/ml 以下ですべての菌の発育を阻止した。本剤の抗菌力は CMX と同様、CEZ、CPZ より 8 倍優れていた (Fig. 7)。

Fig. 10 Antibacterial activity of L-105
K. pneumoniae (56 strains)



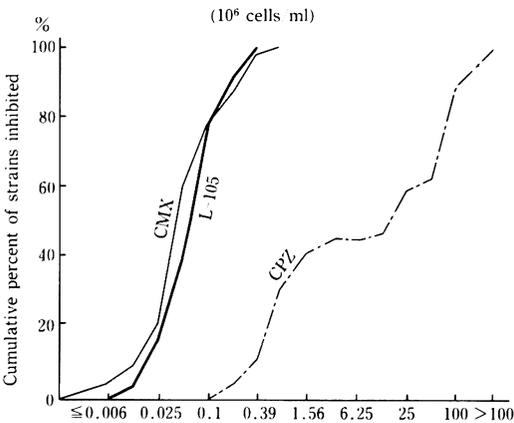
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105			4	6	11	27	7	1									
CMX		1	6	8	19	19	3										
CPZ				1	5	12	20	6	1	5	2	4					

Fig. 12 Antibacterial activity of L-105
P. mirabilis (81 strains)



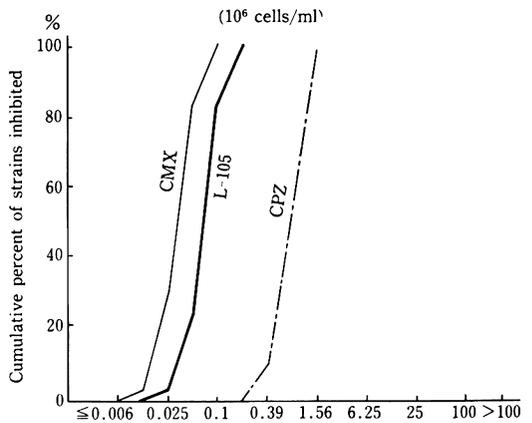
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105				2	42	35	2										
CMX				14	57	10											
CPZ								10	41	29		1					

Fig. 11 Antibacterial activity of L-105
K. oxytoca (34 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105			1	4	8	13	5	3									
CMX		1	2	4	13	6	3	4	1								
CPZ						1	3	6	4	1		1	4	1	9	4	

Fig. 13 Antibacterial activity of L-105
P. vulgaris (39 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105			1	8	24	6											
CMX		1	10	22	6												
CPZ								4	16	19							

S. pneumoniae に対して L-105 は 0.013 µg/ml ですべての菌の発育を阻止したのに比べ、CMX では約88%、CPZ では約4%の発育阻止率にとどまった。本剤の抗菌活性は4剤のなかでもっとも優れていた (Fig. 8)。

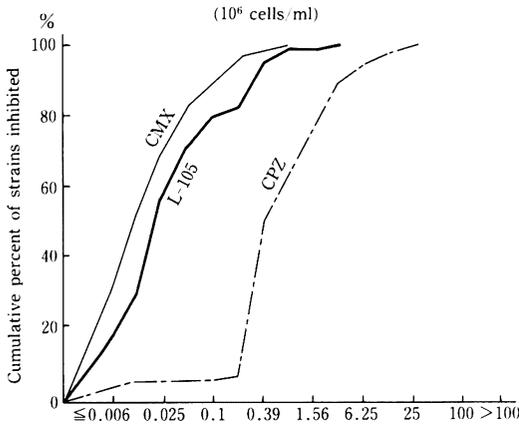
E. coli に対して L-105 は CMX と同様 0.39 µg/ml ですべての菌の発育を阻止したが、CPZ のそれは 12.5

µg/ml であった (Fig. 9)。

K. pneumoniae では L-105 は CMX よりやや劣るものの 0.1 µg/ml に感受性ピークが認められ、本剤は 0.2 µg/ml で菌の98%が、CMX では100%の菌の発育が阻止された (Fig. 10)。

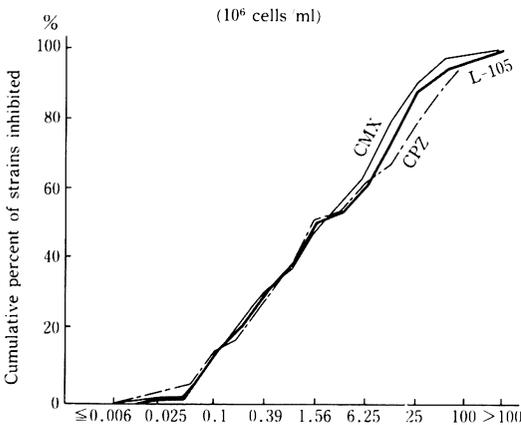
K. oxytoca における L-105 の抗菌力は *K. pneumoniae*

Fig. 14 Antibacterial activity of L-105
P. rettgeri (54 strains)



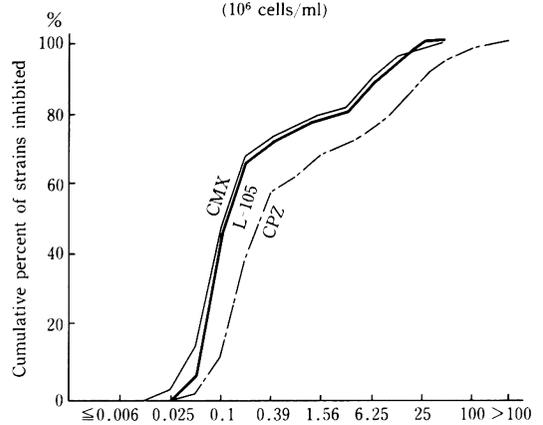
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105		9	6	15	8	5	1	7	2		1						
CMX		16	13	8	8	3	4	1	1								
CPZ		1	1				1	23	9	6	7	3	2	1			

Fig. 15 Antibacterial activity of L-105
E. cloacae (81 strains)



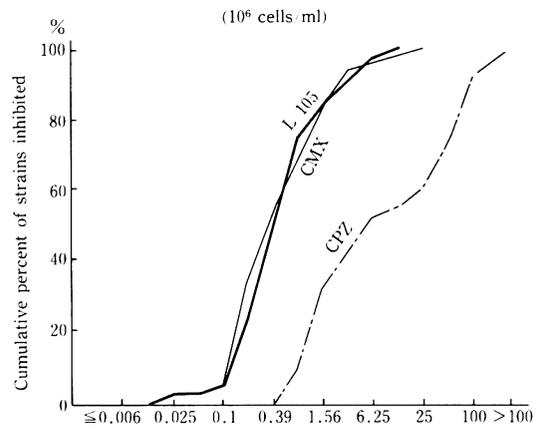
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105				1		9	13	9	6	2	2	8	9	13	3	2	4
CMX		1		1	7	14	9	3	4	6	7	12	9	4	2	2	
CPZ			1	1	2	6	10	11	6	4	1	8	5	10	7	5	4

Fig. 16 Antibacterial activity of L-105
C. freundii (100 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105					6	39	19	7	5	2	2	5	7	7	1		
CMX				1	13	31	20	6	5	3	2	7	6	4	2		
CPZ					1	11	26	17	8	5	3	4	7	7	5	5	1

Fig. 17 Antibacterial activity of L-105
S. marcescens (100 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105				1		2	21	26	23	13	8	4	2				
CMX			1		2	30	23	11	17	10	3	2	1				
CPZ									11	22	10	9	4	5	13	18	8

と同様の傾向を示した。本剤 0.39 µg/ml ですべての菌の発育を阻止したが、CMX においては MIC 0.78 µg/ml の菌株が 1 株みられた。CPZ では 12.5 µg/ml 以上の耐性菌が約 50% 程度認められた (Fig. 11)。

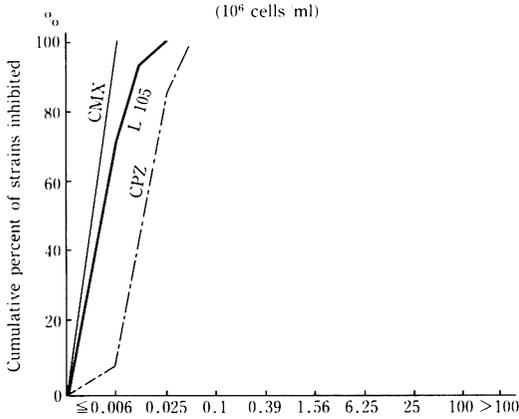
P. mirabilis では L-105, CMX の感受性ピークはともに 0.05 µg/ml であったが、本剤の抗菌活性は CMX

より若干劣っていた (Fig. 12)。

P. vulgaris における L-105, CMX の感受性ピークはそれぞれ 0.1 µg/ml, 0.05 µg/ml であり、L-105 は CMX より 2 倍程度低い値を示したが、CPZ の 1.56 µg/ml に比べ 16~32 倍強い抗菌力を示した (Fig. 13)。

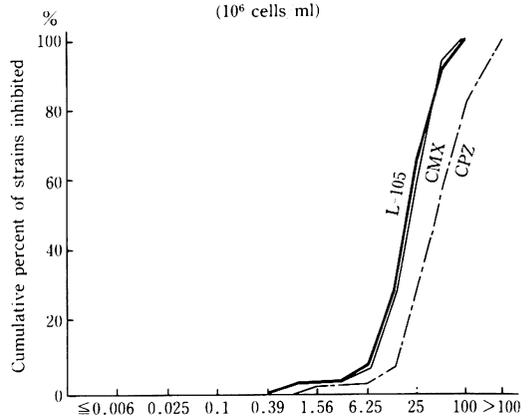
P. rettgeri に対する抗菌力は CMX > L-105 > CPZ の

Fig. 18 Antibacterial activity of L-105
N. gonorrhoeae (14 strains)



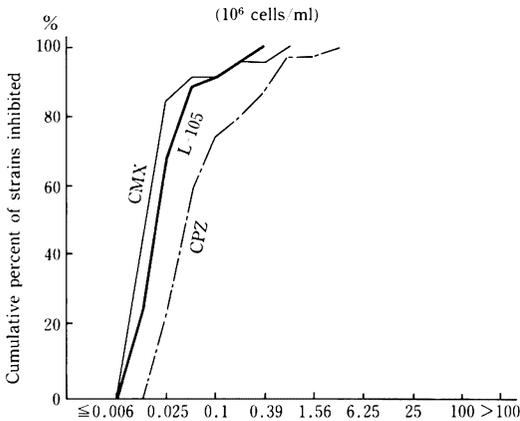
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105		10	3	1													
CMX						14											
CPZ			1	5	6	2											

Fig. 20 Antibacterial activity of L-105
A. calcoaceticus (78 strains)



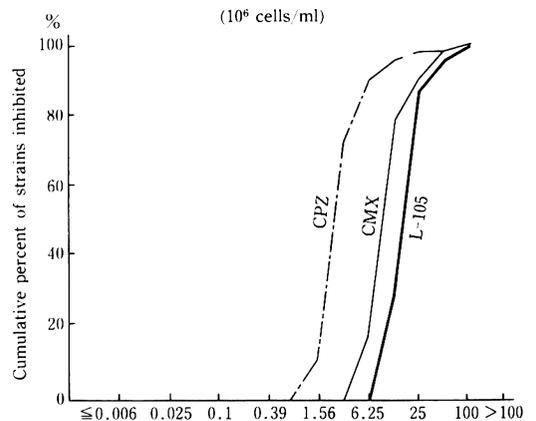
Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105										1	3	15	32	20	6		
CMX									1	2	15	28	26	5			
CPZ										1	1	3	17	23	19	14	

Fig. 19 Antibacterial activity of L-105
H. influenzae (21 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105			5	9	4	1	1	1									
CMX			9	9	1		1		1								
CPZ				5	7	4	1	1	2		1						

Fig. 21 Antibacterial activity of L-105
P. aeruginosa (80 strains)



Drug	MIC µg/ml	≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
L-105														22	48	7	3
CMX													13	50	10	6	1
CPZ										9	50	13	5	2			1

順であった。本剤は 3.13 µg/ml, CMX 0.78 µg/ml ですべての菌の発育を阻止した (Fig. 14)。

E. cloacae では L-105 の抗菌力は CMX, CPZ とほぼ同程度であり, L-105, CMX および CPZ における 90% の菌株の発育を阻止する薬剤濃度 (MIC₉₀) はそれぞれ 25 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml で, 40% の菌が

すべての薬剤に MIC 12.5 µg/ml 以上の耐性を示した (Fig. 15)。

C. freundii に対する L-105 の抗菌力は *E. cloacae* と同様の傾向を示した。本剤, CMX とともに 50 µg/ml ですべての菌の発育が阻止されたが, CPZ は >100 µg/ml であり, 12.5 µg/ml 以上の耐性菌が 25% 認められた

Table 2 Effect of inoculum size on MIC

Test strain	Inoculum size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		L-105	CMX	CPZ
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	10^8	0.78	1.56	1.56
	10^7	0.39	1.56	1.56
	10^6	0.39	1.56	1.56
	10^5	0.39	1.56	0.78
<i>E. coli</i> K 12 C 600	10^8	0.1	0.05	0.1
	10^7	0.05	0.025	0.05
	10^6	0.05	0.025	0.05
	10^5	0.05	0.025	0.05
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	10^8	0.006	0.006	0.05
	10^7	0.006	0.006	0.025
	10^6	0.006	0.006	0.025
	10^5	0.006	0.006	0.006
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	10^8	0.1	0.1	0.78
	10^7	0.1	0.05	0.78
	10^6	0.1	0.05	0.39
	10^5	0.1	0.05	0.39
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	10^8	25	12.5	3.13
	10^7	25	12.5	3.13
	10^6	12.5	12.5	3.13
	10^5	12.5	12.5	3.13
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	10^8	0.2	0.1	0.78
	10^7	0.2	0.1	0.78
	10^6	0.1	0.1	0.78
	10^5	0.1	0.05	0.78

Medium: Mueller-Hinton agar

(Fig. 16)。

S. marcescens における L-105, CMX の感受性ピークはそれぞれ $0.39 \mu\text{g/ml}$, $0.2 \mu\text{g/ml}$ であり, MIC_{100} はそれぞれ L-105: $12.5 \mu\text{g/ml}$, CMX: $25 \mu\text{g/ml}$, CPZ: $>100 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 17)。

N. gonorrhoeae では MIC_{90} は L-105: $0.013 \mu\text{g/ml}$, CMX: $\leq 0.006 \mu\text{g/ml}$, CPZ: $0.025 \mu\text{g/ml}$ で, すべての薬剤が強い抗菌力を示した (Fig. 18)。

H. influenzae に対し L-105, CMX とともに $0.1 \mu\text{g/ml}$ で 90% 以上の菌が, $0.78 \mu\text{g/ml}$ ですべての菌が発育阻止され, 両剤ともほぼ同等の抗菌力を示した。一方, CPZ は $3.13 \mu\text{g/ml}$ ですべての菌の発育を阻止した (Fig. 19)。

A. calcoaceticus における L-105, CMX の感受性分布のピークはともに $25 \mu\text{g/ml}$ で, 両剤の抗菌力を MIC_{90}

と比較すると, とともに $50 \mu\text{g/ml}$ であり, 他の菌種に比べその抗菌活性は弱かった (Fig. 20)。

P. aeruginosa に対する MIC_{90} は L-105: $50 \mu\text{g/ml}$, CMX: $25 \mu\text{g/ml}$, CPZ: $6.25 \mu\text{g/ml}$ であり, 本剤は CPZ, CMX に比べ明らかに弱い抗菌活性を示した (Fig. 21)。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

1) 培地の影響

Heart infusion 寒天培地 (栄研), BHI 寒天培地 (栄研), 普通寒天培地 (栄研), Trypticase soy 寒天培地 (栄研) および MH 寒天培地 (栄研) を用い, 4 菌種の MIC の変動を検討した。しかし, いずれの培地を用いても MIC の大きな変動は認められなかった。

2) pH の影響

MH 寒天培地の pH を $6.0 \sim 8.0$ まで変え, 各菌種に

Table 3 Correlation between MICs and MBCs

Organism	L-105		CMX		CPZ		CTM	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	0.78	1.56	3.13	3.13	1.56	3.13	0.39	1.56
<i>S. aureus</i> Terajima	0.1	0.39	0.2	0.78	0.78	1.56	0.2	0.78
<i>S. aureus</i> MS 353	0.39	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78
<i>S. aureus</i> Smith	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78
<i>S. pyogenes</i> Cook	≤0.006	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.1	0.2	0.1	0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.2	0.39	0.78	0.78	1.56	0.39	0.39
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.013	0.025	≤0.006	≤0.013	0.05	0.2	0.39	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.39	0.39		
<i>E. coli</i> K 12 C 600	0.1	0.1	0.05	0.05	0.2	0.39		
<i>E. coli</i> ML 4707	0.1	0.2	0.05	0.05	0.05	0.1		
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	≤0.006	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.2	1.56		
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	0.2	0.2	0.1	0.1	0.39	0.39		
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.2	0.39	0.2	0.39	0.78	1.56		
<i>S. typhi</i> 901	0.1	0.1	0.1	0.1	0.78	0.78		
<i>S. paratyphi</i> 1015	≤0.006	0.013	≤0.006	0.013	0.05	0.1		
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	≤0.006	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.05	0.1		
<i>S. enteritidis</i> G 14	≤0.006	≤0.006	0.013	0.013	0.2	0.2		
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.1	0.2	0.05	0.1	0.39	3.13		
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	50	50	25	50	12.5	25		
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	3.13	3.13	1.56	6.25	0.78	1.56		
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	25	>100	12.5	100	3.13	>100		
<i>M. morgani</i> IFO 3848	≤0.006	0.013	≤0.006	0.013	0.1	0.39		
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.2	0.2	0.1	0.1	0.78	1.56		
<i>P. mirabilis</i> GN 4754	0.025	0.05	0.013	0.025	0.39	0.78		
<i>P. vulgaris</i> OX-19	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.013	0.013	0.025		
<i>P. vulgaris</i> HX-19	≤0.006	≤0.006	≤0.006	0.025	≤0.006	0.1		
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.013	0.013	≤0.006	≤0.006	0.1	0.78		
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.39	1.56	0.39	0.39	0.78	3.13		
<i>E. cloacae</i> 963	0.39	1.56	0.39	0.39	0.78	6.25		

Numbers indicate the $\mu\text{g/ml}$

Inoculum size: 10^6 cells/ml

対する MIC の変化を調べた。*S. aureus* においては、pH 6.0 が pH 7.0, 8.0 に比べ低い MIC 値を示し、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* では逆に pH 7.0, 8.0 に比べ高い値を示したが、いずれの薬剤においても 1~2 管程度の MIC 値の変動がみられたにすぎなかった。

3) ウマ血清添加の影響

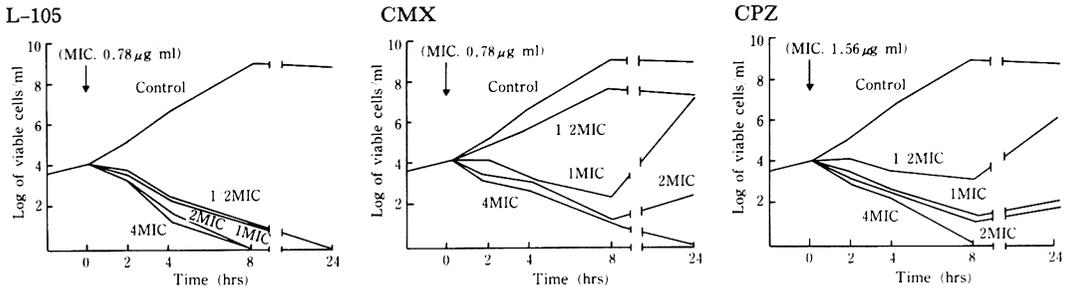
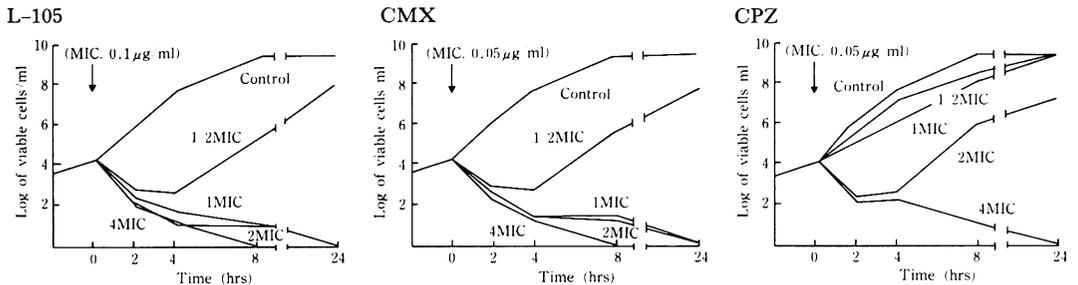
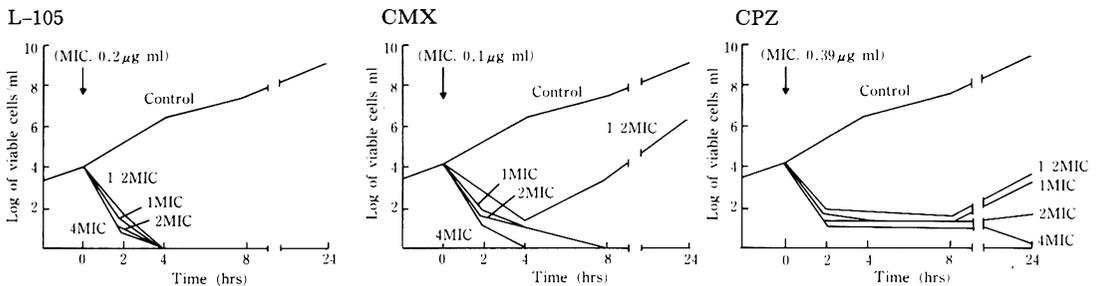
Heart infusion 寒天培地中の ウマ血清濃度を 0, 10, 20, 40% とし、MIC の変動を調べた。この血清添加による MIC の変動は、3 薬剤とも 1 管程度の差がみられたにすぎなかった。

4) 接種菌量の影響

10^8 cells/ml~ 10^5 cells/ml 接種菌量を用い L-105 の MIC の変動について調べた。Table 2 に示したように 3 薬剤とも接種菌量によって MIC が不変の場合と 1 管程度変動が認められる場合とが観察され、とくに菌数の差による大きな MIC の変動は認められなかった。

4. MIC と MBC

29 菌株に対する MIC, MBC を Table 3 に示した。L-105 の MIC と MBC は 4 薬剤のなかでもっともよく一致した。すなわち MBC が MIC と同じ値を示したものが本剤では 29 菌株中 17 株、CMX では 29 菌株中 15 株、また CTM では 7 菌株中 3 株であり、CPZ については

Fig. 22 Bactericidal activity of L-105 against *S. aureus* SmithFig. 23 Bactericidal activity of L-105 against *E. coli* ML 4707Fig. 24 Bactericidal activity of L-105 against *K. pneumoniae* GN 6445

29菌株中6株というきわめて低い値を示した。MBCがMICの2倍以内であった株の割合をみると、L-105, CMXでとも86%, CTMで71%, CPZで69%であった。以上のことより、本剤のMICとMBCにはほとんど差がなく、対照薬CMX, CPZ, CTMに比べ優れた殺菌力が推測され、次に殺菌曲線について検討した。

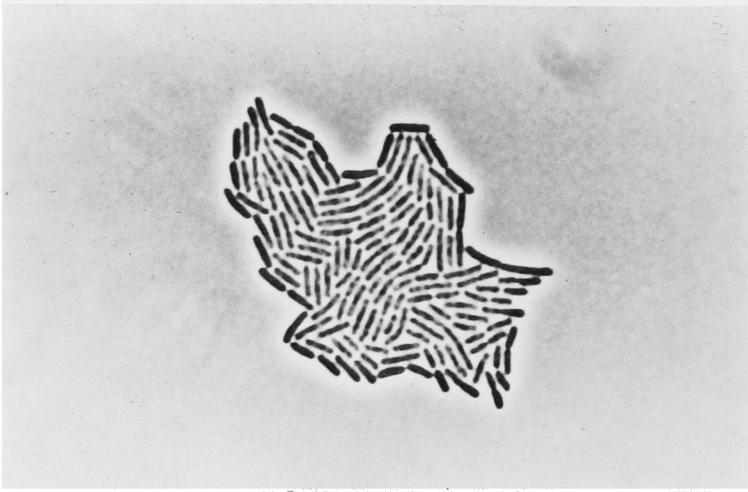
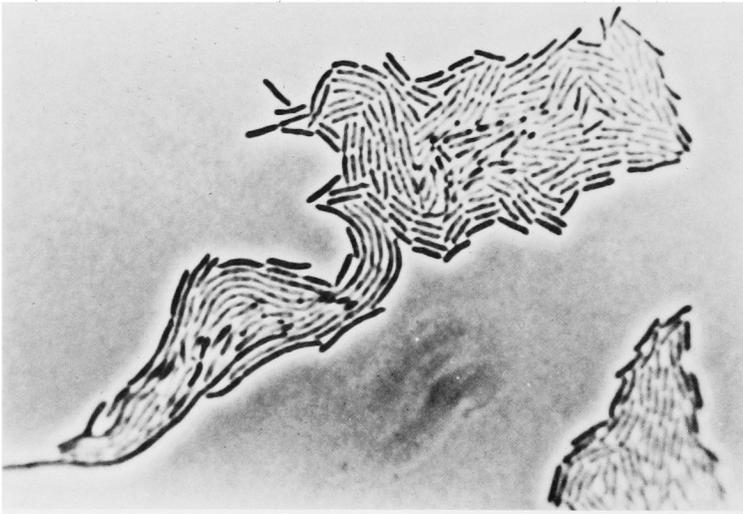
5. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus Smith に対する殺菌効果を Fig. 22 に示した。L-105 は薬剤添加後いずれの濃度においても強い殺菌力を示し、1/2 MIC 濃度において24時間後でも菌の再増殖が全く認められなかった。一方 CMX, CPZ においては 2 MIC 濃度においても弱い再増殖が認められた。

E. coli ML 4707 については Fig. 23 に示したように

本剤は CMX と同様 1/2 MIC 濃度では4時間目から再増殖が認められたが MIC 濃度以上では殺菌的に作用した。一方 CPZ においては 2 MIC 濃度でも、わずかに菌数の減少が認められたものの4時間目から再増殖がみられた。

Fig. 24 に示したように *K. pneumoniae* GN 6445 では本剤は *S. aureus* Smith と同様に 1/2 MIC 濃度においてさえも殺菌的に作用し再増殖も認められなかったが、CMX については 1/2 MIC 濃度で、また CPZ では 1/2, 1, 2 MIC 濃度において再増殖がみられた。以上の点および MIC, MBC の結果より、本剤は *S. aureus* Smith, *K. pneumoniae* GN 6445 に対し、他剤よりも比較的強い殺菌力を示したが、*E. coli* ML 4707 に対しては CMX とほぼ同程度の活性を示した。

Fig. 25 Untreated *E. coli* ML 4707 (Control)Fig. 26 *E. coli* ML 4707, L-105 1/16 MIC (0.003 µg/ml), 3 hr

6. 形態変化の観察

E. coli ML 4707 に L-105 を種々の薬剤濃度で作用させたさいの菌の形態変化を位相差顕微鏡下で3時間後に観察した。本剤を作用させると、薬剤無添加のコントロール (Fig. 25) に比べ、1/16 MIC 濃度でも菌の filament 像が観察された (Fig. 26)。また、1/4 MIC 濃度においてはバルジを形成した長糸状形態以外に filament 化した菌からすでに溶菌している細胞もみられた (Fig. 27)。一方 CMX 1/16 MIC 濃度や CPZ 1/8 MIC 濃度では filament 化は認められなかった。

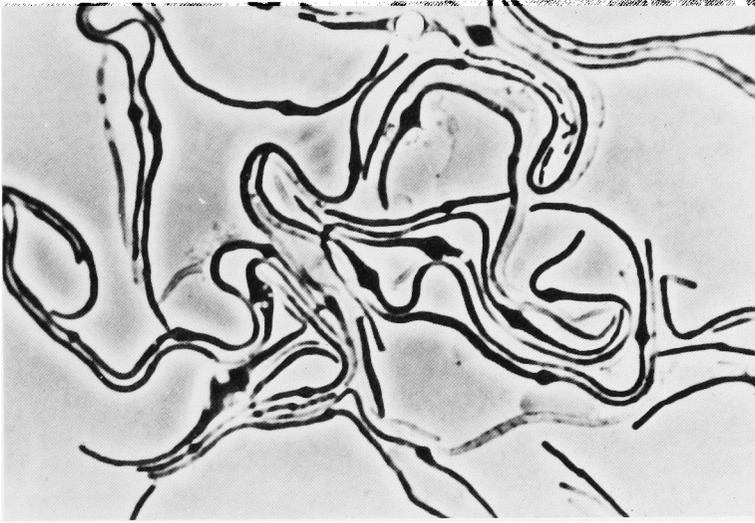
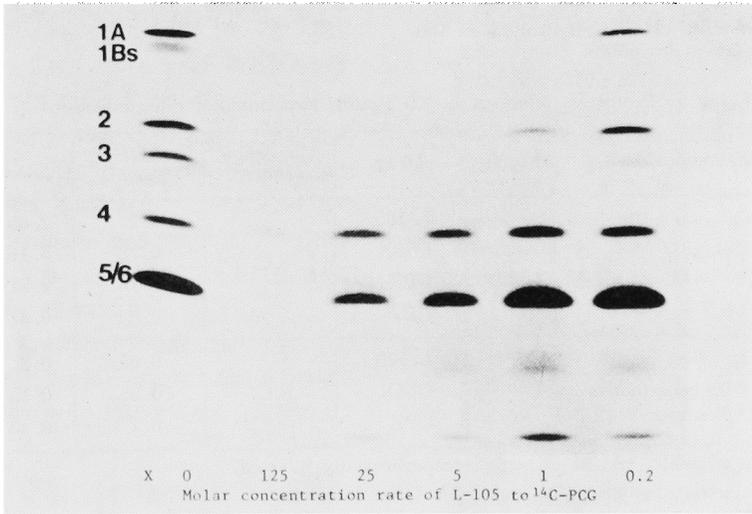
7. PBPs に対する親和性

E. coli PBPs に対する L-105 の結合親和性を ^{14}C -PCG

を用いた competition 実験により検討した。本剤は PBP 3, 1A, 1Bs, 2 に強い親和性を示したが、PBP 4, 5, 6 に対する結合は弱かった (Fig. 28)。これらの結果より、形態変化と PBPs に対する親和性との間によく一致した関連性が認められた。

8. β -lactamase に対する安定性

プラスミド支配の4種類の PCase と菌種固有の6種 CSase および3種 CXase に対する L-105 の安定性を Table 4 に示した。本剤は *E. cloacae*, *E. coli*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* 由来の CSase に対してはほとんど分解されなかった。しかし、CXase に属する *P. cepacia*, *X. maltophilia* および *P. vulgaris* 由来

Fig. 27 *E. coli* ML 4707, L-105 1/4 MIC (0.013 $\mu\text{g/ml}$), 3 hrFig. 28 Affinity of L-105 to *E. coli* PBPs

の酵素には CMX 同様ある程度分解された。また PCase I, IV, V 型に対しては、本剤はきわめて安定であったが、II 型の酵素に CMX の約 1/3 の速度で分解された。

9. マウス感染治療実験

S. aureus Smith, *E. coli* ML 4707 の 2 株についてマウス感染症に対する治療効果を検討した (Table 5)。*S. aureus* Smith の感染に対する L-105 の ED_{50} は 2.85 mg/kg であり、CMX の 5.16 mg/kg, CPZ の 2.91 mg/kg と大差は認められなかったが、*in vitro* で本剤と同等の抗菌力を有する CEZ より明らかに大きい ED_{50} であった。

次に *E. coli* ML 4707 のモデル感染症に対しては、L-

105 の ED_{50} 値は CPZ よりやや小さい 0.3 mg/kg であり、CMX の 0.15 mg/kg より大きい ED_{50} であった。

以上のことより、マウスにおける実験的感染症の治療において、本剤の *in vitro* 抗菌力を反映した良好な結果は得られなかった。

Ⅲ. 考 察

今日抗菌剤のなかで広く用いられている薬剤としては周知のごとく、ペニシリン系やセフェム系の β -ラクタム系抗生物質で、なかでも第三世代セフェム剤の開発には目をみはるものがある。第三世代セフェム系薬剤の特徴はグラム陽性菌に比べ、とくにグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有する点であるが、これらの薬剤は

Table 4 Stability of L-105 to various β -lactamases

Source of enzyme	Substrate profile (relative V_{max})				
	L-105	CER	CMX	CPZ	PCG
CSase <i>E. cloacae</i> GN 7471	< 1	100	< 1	2	
<i>E. coli</i> GN 5482	< 1	100	< 1	< 1	
<i>M. morgani</i> GN 5407	< 1	100	< 1	< 1	
<i>P. rettgeri</i> GN 4430	2	100	1	1	
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362	< 1	100	< 1	< 1	
<i>S. marcescens</i> L-48	2	100	< 1	70	
CXase <i>P. cepacia</i> GN 11164	26	100	40	2	
<i>X. maltophilia</i> GN 12893	4	100	2	1	
<i>P. vulgaris</i> GN 7919	36	100	36	3	
PCase					
type I <i>E. coli</i> W 3630 (Rms 212)	< 1		< 1	7	100
type II <i>E. coli</i> W 3630 (Rms 213)	7		22	5	100
type IV <i>E. coli</i> JM 83 (Rms 433)	< 1		< 1	< 1	100
type V <i>S. aureus</i> MS 258	< 1		< 1	< 1	100

Hydrolysis of each substrate by CSase, CXase, and PCase is expressed as a relative rate of hydrolysis taking the absolute rate of CER or PCG hydrolysis as 100.

Table 5 Protective effect of L-105 against experimental mice infections

Organism	Challenge dose	Mucin	Drug	Challenge route	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>S. aureus</i> Smith	2.85 \times 10 ⁴ cells/mouse	+	L-105	S.C.	0.2	2.85 (2.18~3.74)
			CMX		0.78	5.16 (4.12~6.46)
			CPZ		0.78	2.91 (1.99~4.26)
			CEZ		0.2	0.27 (0.22~0.34)
<i>E. coli</i> ML 4707	1.25 \times 10 ⁶ cells/mouse	-	L-105	S.C.	0.05	0.3 (0.23~0.39)
			CMX		0.05	0.15 (0.11~0.2)
			CPZ		0.1	0.43 (0.33~0.55)

Mice (ddY strain, 4 w, male, 19~21 g) were intraperitoneally infected.

Drugs were administered subcutaneously 1 and 3 hr after infection.

MICs were estimated by agar dilution method.

いずれもグラム陽性菌に対する抗菌活性が第一、第二世代セフェム剤に比べ低いという欠点がある。前項でみてきたように L-105 はグラム陽性、陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトラムを有していた。なかでもグラム陽性菌に対しては従来の第三世代セフェム剤に比べ同等か、やや強い抗菌力を示した。とくに *S. aureus* に対する L-105 の抗菌力は第一世代の CEZ と同等の優れた活性を示した。また近年話題になりつつあるメチシリン耐性 *S. aureus* に対しても他の β -ラクタム系薬剤より強い抗菌活性がみられ、さらに一般にセフェム剤に対し耐性であるとされている *E. faecalis* にもある程度の抗菌力を

示した。しかし本菌種に対する各種セフェム剤の MIC 値が MH 培地の製品間で異なることが報告されており、とくにわれわれが使用した栄研培地においてオキシミノセフェム誘導体の MIC 値はかなり感受性側に移行することが認められている¹¹⁾。今回他施設における感受性分布より全薬剤において左にシフトしている結果が得られたが、この相違は単に MIC 測定上の技術的な問題に起因しているのではなく、使用した培地の種類によると考えられる。上述したような本剤のグラム陽性菌に対する優れた抗菌活性は従来の aminothiazolyl cephalosporin 剤の 3 位側鎖に thiazidazolyl-thiomethyl 基を導入

したことに起因するものと思われる。

グラム陰性菌に対しては既存の第三世代のなかでもとくに広い抗菌域を有する CMX に相当する抗菌活性を示していた。しかし、*P. aeruginosa* に対する本剤の抗菌力は他の菌種に対するそれより、はるかに劣っていた。本菌種に対する抗菌力の弱さは薬剤の透過性の減少によるとされている¹²⁾。また、Enterobacteriaceae である *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* に対する本剤の抗菌力は非常に強いとはいえず、他のセフェム剤でみられるような緩やかな立ち上がりの累積百分率曲線を示した。これらの菌種の産生する β -lactamase には本剤を含め第三世代セフェム剤は安定であるため、耐性メカニズムとして薬剤の透過性の減少、標的部位の変異などが考えられるが、詳しい解析結果は今後の課題であろう。

本剤は *S. aureus*, *E. coli* および *K. pneumoniae* に対して各薬剤の MIC を基準に比較した場合、CMX, CPZ より強い殺菌作用を示し、 $1/2 \sim 1$ MIC 濃度で菌の増殖を完全に阻止した。とくに *S. aureus* に対し、本剤は強い殺菌作用を有しており、このことは本剤のグラム陽性菌に対する抗菌力を反映しているものと思われる。 β -lactamase に対する安定性では本剤は CSase, PCase に対して安定でほとんど分解されなかった。しかし、*P. vulgaris*, *P. cepacia* および *X. maltophilia* から分離した CXase によりある程度分解された。このことからこの種の oxyiminocephalosporin 剤の使用によって CXase 産生菌が選択され、新たな感染の起因菌として臨床問題になる可能性もないわけではない。

以上の結果から、L-105 は従来の第三世代セフェム剤に共通の弱点であるグラム陽性菌に対する抗菌力の弱さを補った新しい薬剤であり、臨床効果が十分期待できよう。

文 献

1) 三橋 進, 井上松久: MIC 測定用標準菌株。Che-

motherapy 27: 561, 1979

- 2) CURTISS III, R.: Chromosomal aberrations associated with mutations to bacteriophage resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 89: 28~40, 1965
- 3) OKUBO, T.; M. INOUE & S. MITSUHASHI: Antibacterial activity of combinations of cefazolin and semisynthetic penicillins. J. Antibiot. 28: 804~808, 1975
- 4) 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
- 5) SPRATT, B.G. & A.B. PARDEE: Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. Nature 254: 516~517, 1975
- 6) 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
- 7) ROSS, G.W.; K.V. CHANTER, A.M. HARRIS, S.M. KIRBY, M.J. MARSHALL & C.H. O'CALLAGHAN: Comparison of assay techniques 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: 789~790, 1974
- 9) LINEWEAVER, H. & D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56: 658~663, 1934
- 10) LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92: 99~113, 1948
- 11) 小林寅吉, 池田文昭, 西田 実, 五島嗟智子: 7 位 Oxyimino-cephem 誘導体の *Streptococcus faecalis* および *faecium* に対する抗菌活性の培地による変動と *In vivo* 効果。Chemotherapy 33: 1047~1053, 1985
- 12) YOKOTA, T.; R. YOSHIDA & E. SUZUKI: L-105, a new cephem antibiotic effective on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 24th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, D.C., Abstract No. 736, 1984

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF L-105

MUNEO HIKIDA and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute

MATSUHISA INOUE

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

L-105, a new injectable cephalosporin, is characterized by the presence of 1,2,3-thiadiazol radical at the 3-side chain of aminothiazole cephalosporins. *In vitro* antibacterial activity of L-105 was compared with that of cefmenoxime (CMX), cefoperazone (CPZ), and cefazolin (CEZ). The results are summarized as follows:

1) L-105 had a broad spectrum, showing a strong antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria. Its *in vitro* activity against gram-negative bacteria was similar to that of CMX. Moreover, against gram-positive bacteria, L-105 was more potent than the other cephalosporins. Especially, against *S. aureus*, it was about equal in potency to CEZ.

2) L-105 was much more stronger in terms of bactericidal activity than CMX on *S. aureus* and *K. pneumoniae* tested.

3) Microscopic examination of cultures of *E. coli* and *K. pneumoniae* treated with L-105 at 1/16 MIC revealed that L-105 gave rise to filamentation. However, no morphological change was observed at the concentration of 1/16 MIC for CMX or CPZ.

4) L-105 showed a high affinity for *E. coli* PBPs 3, 1A, 1Bs, and 2.

5) L-105 was resistant to hydrolysis by various bacterial β -lactamases. However, it was slightly hydrolyzed by chromosome-mediated oxyiminocephalosporinase (CXase).

6) L-105 was effective against experimental mice infections caused by *S. aureus* and *E. coli*.