

L-105 の嫌気性菌に対する抗菌作用

渡辺邦友・沢 赫代・青木 誠

宮内正幸・小林とよ子・上野一恵

岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設

新しく開発された半合成セフェム剤である L-105 の嫌気性菌に対する抗菌力を、類似した構造を有する cefotaxime および cefmenoxime を対照薬剤として *in vitro* および *in vivo* で検討した。

L-105 の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムは、cefotaxime, cefmenoxime とほぼ同様で *B. fragilis* group の一部、*Clostridium difficile* を除く広い範囲にわたった。抗菌力は強力で、上記の菌種を除き、 10^6 cells/ml 接種時では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ で、 10^8 cells/ml 接種時では 12.5 $\mu\text{g/ml}$ でほとんどの菌株の発育を阻止した。

L-105 は、*B. fragilis* の産生する β -lactamase に対し、cefazolin, cefoperazone よりはるかに安定であったが、わずかに分解され、cefotaxime, cefmenoxime とほぼ同様であった。また L-105 には、*B. fragilis* と autoclaved caecal content の同時接種によって起こる膿瘍形成の阻止能は認められなかった。

L-105 は、7 β -methoxyiminoacetamide cephalosporin group に属する新しく開発された半合成セフェム剤である。

著者らは、L-105 の嫌気性菌に対する抗菌力を、同系の cefmenoxime, cefotaxime を含めたセフェム剤を対照として、*in vitro* および *in vivo* にて検討した。また L-105 を、実験動物に投与した場合の盲腸内細菌叢に与える影響について、とくに antibiotic associated colitis または diarrhea の原因菌として知られている *Clostridium difficile* に着目して検討した。

Laboratory, California, U.S.A.), GM (Department of Microbiology, Gifu University, Gifu, Japan) および GAI (Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, Gifu, Japan) 由来の株である。また、臨床材料由来株の内訳は、

Bacteroides fragilis 48 株, *Bacteroides vulgatus* 4 株, *Bacteroides distasonis* 7 株, *Bacteroides thetaiotaomicron* 23 株, *Bacteroides ovatus* 5 株, *Bacteroides uniformis* 8 株, *Bacteroides bivius* 7 株, 黒色集落形成性 *Bacteroides* 8 株, *Clostridium perfringens* 14 株, *Clostridium difficile* 16 株, および嫌気性球菌 12 株である。

これらは、すべてスキムミルクを保護剤として -80°C に凍結保存されていたものである。

2. 使用薬剤

力価の明白な下記の 7 薬剤を用いた。

L-105: 日本レダリー, 862 $\mu\text{g/mg}$

cefmenoxime: CMX 武田薬品, 945 $\mu\text{g/mg}$

cefotaxime: CTX ヘキスト, 912.8 $\mu\text{g/mg}$

cefazolin: CEZ 藤沢薬品, 945 $\mu\text{g/mg}$

cefoperazone: CPZ 富山化学, 930 $\mu\text{g/mg}$

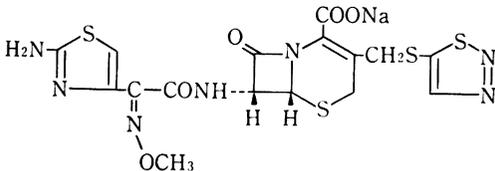
cefoxitin: CFX メルク萬有, 936.5 $\mu\text{g/mg}$

cephaloridine: CER 塩野義, 971 $\mu\text{g/mg}$

3. 最小発育阻止濃度の測定

薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC, minimal inhibitory concentration) の測定は、日本化学療法学会標準法に準

Fig. 1 Structural formula of L-105



I. 実験方法

1. 使用菌株

施設保存の参考菌株 34 株と臨床分離株 155 株の合計 189 株を用いた。使用した参考菌株内訳は、Table 1 に示した。ATCC (American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.), VPI (Virginia Polytechnic Institute, Virginia, U.S.A.), WAL (Wadsworth Anaerobic

じて行った¹⁾。

増菌用培地には、GAM ブイヨン (ニッスイ) を用い、メナディオンを 0.1 $\mu\text{g/ml}$ に添加した。感受性測定用培地には、GAM 寒天 (ニッスイ) を用い、メナディオンを 10 $\mu\text{g/ml}$ に添加した。

接種菌用菌液は、*B. fragilis* など発育の良好な菌群の場合には、37°C で24時間程度培養した菌液を、*Bacteroides melaninogenicus* など発育の遅い菌群の場合には48時間培養した菌液を GAM ブイヨンで必要に応じて希釈し、 10^8 cells/ml および 10^6 cells/ml の2段階に調整した。菌液の希釈、感受性測定用平板の作成および平板への菌の塗抹は、すべて好氣的条件下で行われた。菌の塗抹は、ミクロプランター (佐久間製作所) で行い、嫌気培養は anaerobic glove box (N_2 80%, H_2 10%, CO_2 10%) のなかで行われた。また MIC の決定は、24時間培養後に行った。

4. 最小殺菌濃度の測定

GAM ブイヨンでの 37°C 24時間培養菌液を希釈し、2倍希釈系列の薬剤 (L-105 および CMX) を含む GAM ブイヨン中に接種菌量が 10^4 cells/ml となるように接種した。

37°C で24時間嫌気培養し、肉眼で菌の発育が認められない最小の濃度すなわち broth dilution MIC を求めた後、各チューブの1白金耳量を、薬剤を含まない GAM 寒天平板上に画線塗抹した。平板は、37°C で24時間嫌気培養された。平板上に成育菌のみられない一番低い薬剤濃度をもって MBC とした。

5. β -lactamase の調整および測定法

β -lactamase は、*B. fragilis* 3株 (GAI-0558, GAI-0543 および GAI-6306) から調整した。

GAM ブイヨンでの 37°C 24時間培養菌液を、新しい GAM ブイヨンで10倍に希釈し、さらに6時間培養を続けたあとの対数増殖期後期の菌体を、4°C での遠心分離により集菌し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて2回洗浄、次いで同緩衝液に浮遊させ、氷冷しながら超音波処理により菌体を破壊後、再度遠心分離 (8000 \times g, 30分間) し得られた上清を粗酵素液として用いた。

β -lactamase 活性は、macroiodometric method により測定した²⁾。

6. 実験的マウス皮下膿瘍に対する効果

マウスは、ddy系、雄、体重約18gを用いた。1群10匹とした。

感染株には、*B. fragilis* (GAI-5088) を用いた。本菌は、 β -lactamase 産生株であった。本菌株の prereduced anaerobically sterilized BHIS media (PRAS BHIS

media, SCOTT, U.S.A.) での24時間培養菌液に auto-claved caecal contents (ACC) を等量混和したものを接種菌液とし、その 0.4 ml をマウス皮下に接種した。ACC は、K.A. JOINER らの方法により作製した³⁾。0.4 ml の接種菌液中には、 10^7 ~ 10^8 cells の *B. fragilis* が含まれる。

菌液接種後、2, 24, 48時間の計3回 L-105 と CMX の 0.5 mg および 1 mg を皮下に注射し、96時間後に屠殺、皮下を剝離し、膿瘍の形成の有無と膿汁の量を測定した。膿汁の量は、10 μl のプラスチックループを用いて、10 μl 以上の膿汁が採取できる場合 2+, 10 μl 以下であるが、明らかに膿汁が採取できる場合 1+, そしてほとんど膿汁を採取できない場合を 0 と 3 段階に分けて判定した。

7. 薬剤投与マウス盲腸内容物中の *Clostridium difficile* の検出

マウスは ICR 系、体重 19 ± 1 g の雄を用いた。L-105 および CTX を1日1回 2 mg 7日間皮下投与した。投与終了日の投与後6時間目と1週間後にマウスを屠殺、盲腸を切り出し、anaerobic glove box (N_2 80%, H_2 10%, CO_2 10%) 中に搬入してこのなかですべての培養操作を行った。

C. difficile の選択分離培地には、CCMA 培地を用い、anaerobic glove box 中で24時間以上保存し表面を十分還元させた。盲腸内容物は、嫌気性希釈液で10倍段階希釈され、それらの 0.1 ml が培地表面に塗抹された⁴⁾。

II. 成 績

1. 抗菌スペクトラム

L-105 の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムを、CMX, CTX, CEZ, CPZ および CFX のセフェム5剤と比較検討した。

供試薬剤の嫌気性菌に対する MIC を 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml の接種菌量別に、グラム陰性桿菌、グラム陽性桿菌および球菌の3群に分けて Table 1, 2, 3, 4, 5 および 6 に示した。

L-105 は、CMX, CTX と同様 *B. fragilis* group の一部に抗菌力がやや悪い点を除き、他のほとんどの菌種に対し、強い抗菌力を示した。すなわち、 10^8 cells/ml の接種菌液を使用した場合、L-105 は、3.13 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、*B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *F. mortiferum* を除く、すべての菌種の発育を抑制した。しかし、 10^6 cells/ml の接種菌液を使用した場合には、これらの菌の発育抑制に、12.5 $\mu\text{g/ml}$ を必要とした。たとえば、L-105 の *B. fragilis* ATCC-25285 に対する 10^6 cells/ml 接種時の MIC は、3.13 $\mu\text{g/ml}$ と CFX の 6.25 $\mu\text{g/ml}$ より

Table 1 Antibacterial spectra of L-105 against gram negative anaerobic rods

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC-25285	3.13	3.13	1.56	12.5	3.13	6.25
<i>B. fragilis</i> GM-7000	1.56	1.56	0.78	6.25	3.13	6.25
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	25	25	12.5	12.5	25	12.5
<i>B. vulgatus</i> ATCC 29327	0.39	0.39	0.10	0.78	3.13	0.78
<i>B. uniformis</i> ATCC 8503	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>B. uniformis</i> ATCC 8492	0.78	1.56	0.39	0.39	1.56	0.78
<i>B. distasonis</i> GM 7007	1.56	1.56	0.78	6.25	3.13	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	25	25	12.5	25	25	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 3304	25	25	25	25	25	25
<i>B. asaccharolyticus</i> GAI-0412	≤ 0.025	0.05	≤ 0.025	0.05	0.39	0.10
<i>B. asaccharolyticus</i> GAI-0415	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>B. capillosus</i> ATCC 29799	≤ 0.025	3.13	3.13	0.78	1.56	0.39
<i>Fusobacterium mortiferum</i> VPI 4249	25	12.5	100	0.78	0.78	0.78
<i>F. mortiferum</i> VPI 5696	1.56	12.5	25	1.56	0.78	1.56
<i>F. mortiferum</i> B-1083	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	3.13
<i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	0.10	0.20	0.20	≤ 0.025	≤ 0.025	0.10
<i>F. nucleatum</i> F-1	0.05	0.05	0.05	≤ 0.025	0.05	0.10
<i>F. nucleatum</i> Fev-1	0.05	0.10	0.10	≤ 0.025	≤ 0.025	0.10
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>F. varium</i> ATCC 8501	3.13	3.13	1.56	3.13	6.25	3.13

Inoculum 10^6 cells/ml

優れたが、 10^8 cells/ml 接種時の MIC は、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ となり、CFX の $6.25 \mu\text{g/ml}$ より劣った。L-105 の *F. nucleatum* に対する抗菌力は、CMX, CTX と同様、CEZ, CPZ よりも劣った。

2. 臨床分離株の感受性分布

L-105 の臨床分離株に対する 10^6 cells/ml 接種での抗菌力を Table 7 に示した。対照薬には、CMX, CTX, CPZ, CFX および CEZ を用い、MIC の最大値と最小値の幅 (Range) と対象菌株の 50%あるいは90%の菌株の発育を阻止するのに必要な MIC (MIC_{50} および MIC_{90}) を比較した。

L-105 の *B. fragilis* 48 株に対する MIC は $0.78 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の間に分布した。 MIC_{90} は、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ となり、他剤と比較すると、CTX, L-105, CFX, CMX, CPZ, CEZ の順で抗菌力が優れていた。*B. vulgatus* 4 株、*B. distasonis* 7 株に対する MIC の分布域は、それぞれ $3.13 \sim 12.5$, $0.78 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ であり、 MIC_{90} はいずれも $6.25 \mu\text{g/ml}$ であった。他剤との比較の結果は、*B. fragilis* とほぼ同等であった。

B. thetaiotaomicron 23株、*B. ovatus* 5株、および *B.*

uniformis 8 株の合計 36 株に対する MIC は、 $6.25 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の間に分布し、 MIC_{90} も $25 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であった。これは、CTX とほぼ同等の成績であった。

B. bivius 7 株に対する MIC は、 $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ に集中し、CTX と同様の成績であった。

C. perfringens 14株に対する MIC は、 $\leq 0.025 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ に分布し、 MIC_{90} は $0.39 \mu\text{g/ml}$ と低値であった。L-105 は、CMX と CTX の中間に位置した。

C. difficile に対する MIC は、 $25 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ と悪く、black pigmented *Bacteroides* と球菌に対する MIC_{90} は $0.05 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ と良好であった。

3. MIC と MBC の比較

B. fragilis 5株 (GAI-0625, GAI-6268, GAI-6297, GAI-6299 および GAI-4999), *C. perfringens* 2株 (GAI-2812, および GAI-2813), *C. difficile* 2株 (GAI-5415, GAI-5416) および *Peptostreptococcus magnus* (GAI-2815, GAI-2921) の合計11株の broth dilution MIC と MBC を比較検討した。*Peptostreptococcus magnus* の1株を除き、両値は全く同一であった (Table 8)。

4. *B. fragilis* 由来の β -lactamase に対する安定性

Table 2 Antibacterial spectra of L-105 against gram negative anaerobic rods

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC-25285	12.5	25	25	50	25	6.25
<i>B. fragilis</i> GM-7000	3.13	3.13	1.56	6.25	6.25	6.25
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	25	50	50	25	25	25
<i>B. vulgatus</i> ATCC 29327	1.56	0.78	0.10	0.78	3.13	0.78
<i>B. uniformis</i> ATCC 8503	0.39	0.78	0.20	3.13	1.56	0.78
<i>B. uniformis</i> ATCC 8492	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	0.78
<i>B. distasonis</i> GM 7007	6.25	12.5	6.25	25	3.13	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	25	25	12.5	25	25	25
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 3304	50	100	50	50	50	25
<i>B. asaccharolyticus</i> GAI-0412	0.10	0.05	0.05	0.10	0.39	0.20
<i>B. asaccharolyticus</i> GAI-0415	0.05	0.10	0.05	≤ 0.025	≤ 0.025	0.39
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	0.10	0.10	0.20	0.78	0.05	0.20
<i>B. capillosus</i> ATCC 29799	12.5	12.5	3.13	3.13	3.13	25
<i>Fusobacterium mortiferum</i> VPI 4249	25	50	100	6.25	3.13	3.13
<i>F. mortiferum</i> VPI 5696	100	25	>100	25	1.56	1.56
<i>F. mortiferum</i> B-1083	6.25	6.25	6.25	3.13	12.5	3.13
<i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	0.20	0.20	0.20	≤ 0.025	≤ 0.025	0.20
<i>F. nucleatum</i> F-1	0.20	0.20	0.39	0.025	0.05	0.39
<i>F. nucleatum</i> Fev-1	0.20	0.10	0.39	≤ 0.025	≤ 0.025	0.20
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	≤ 0.025	≤ 0.025	0.10	≤ 0.025	≤ 0.025	0.10
<i>F. varium</i> ATCC 8501	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25

Inoculum 10^8 cells/ml

Table 3 Antibacterial spectra of L-105 against gram positive anaerobic rods

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Propionibacterium granulosum</i> ATCC 25564	0.20	0.20	0.20	0.78	0.20	0.78
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	≤ 0.025	≤ 0.025	0.05	6.25	0.20	0.78
<i>E. cylindroides</i> ATCC 27803	≤ 0.025	0.39	0.39	1.56	3.13	3.13
<i>E. plauti</i> VPI 0311	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.20	0.05	0.20	0.10	1.56	0.10
<i>Clostridium tertium</i> ATCC 19405	1.56	3.13	6.25	0.78	3.13	0.78
<i>C. perfringens</i> ATCC 3624	1.56	3.13	25	≤ 0.025	3.13	0.39
<i>C. perfringens</i> ATCC 13123	3.13	0.39	1.56	0.78	3.13	0.78
<i>C. ramosum</i> ATCC 25582	0.10	0.20	0.39	0.78	0.39	6.25
<i>C. histolyticum</i> ATCC 19401	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>C. sporogenes</i> ATCC 3584	1.56	1.56	3.13	0.20	0.78	0.39
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	1.56	1.56	1.56	0.20	0.78	0.39
<i>C. novyi</i> (type 1) ATCC 19402	≤ 0.025	0.10	0.05	≤ 0.025	≤ 0.025	0.10
<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	0.05	0.20	0.20	0.39	0.39	0.20

Inoculum 10^8 cells/ml

Table 4 Antibacterial spectra of L-105 against gram positive anaerobic rods

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Propionibacterium granulosum</i> ATCC 25564	0.78	0.39	0.78	1.56	0.20	1.56
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	0.05	0.025	0.05	6.25	0.39	0.78
<i>E. cylindroides</i> ATCC 27803	0.78	1.56	0.78	1.56	6.25	50
<i>E. plauti</i> VPI 0311	3.13	3.13	3.13	1.56	12.5	12.5
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.39	0.39	0.20	0.20	1.56	0.20
<i>Clostridium tertium</i> ATCC 19405	12.5	12.5	12.5	3.13	3.13	1.56
<i>C. perfringens</i> ATCC 3624	25	12.5	25	12.5	12.5	25
<i>C. perfringens</i> ATCC 13123	3.13	3.13	6.25	0.78	6.25	3.13
<i>C. ramosum</i> ATCC 25582	0.10	0.20	0.39	1.56	0.39	6.25
<i>C. histolyticum</i> ATCC 19401	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>C. sporogenes</i> ATCC 3584	6.25	12.5	12.5	0.20	1.56	0.78
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	6.25	6.25	12.5	0.20	1.56	0.39
<i>C. novyi</i> (type 1) ATCC 19402	0.10	0.20	0.10	0.025	0.05	0.10
<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	0.20	0.20	0.20	0.78	0.39	0.39

Inoculum 10^6 cells/ml

Table 5 Antibacterial spectra of L-105 against anaerobic cocci

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	0.10	0.39	0.39	0.20	0.20	0.10
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 13953	≤ 0.025	≤ 0.025	0.20	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.10	0.20	0.10	0.78	0.10	0.20
<i>P. micros</i> VPI-5464-1	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>P. anaerobius</i> ATCC 27337	≤ 0.025	0.05	0.10	1.56	0.10	1.56
<i>Streptococcus parvulus</i> VPI-0546	0.10	0.10	0.20	0.05	0.05	0.20
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	0.10	0.10	0.20	0.39	0.39	6.25
<i>S. intermedius</i> ATCC 27735	≤ 0.025	0.10	0.20	0.39	0.39	6.25
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	≤ 0.025	0.10	0.10	0.20	0.39	1.56

Inoculum 10^6 cells/ml

Table 6 Antibacterial spectra of L-105 against anaerobic cocci

Reference strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	L-105	CMX	CTX	CEZ	CPZ	CFX
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	0.78	1.56	1.56	0.39	0.78	0.20
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 13953	0.20	0.39	0.39	0.10	0.20	0.78
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.20	0.39	0.20	0.78	0.20	0.39
<i>P. micros</i> VPI-5464-1	≤ 0.025	0.20	0.05	≤ 0.025	≤ 0.025	0.39
<i>P. anaerobius</i> ATCC 27337	0.05	≤ 0.025	0.20	1.56	0.20	3.13
<i>Streptococcus parvulus</i> VPI-0546	0.39	0.20	0.20	0.10	0.20	0.78
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	0.10	0.20	0.20	0.39	0.78	6.25
<i>S. intermedius</i> ATCC 27735	0.05	0.10	0.20	0.39	0.39	6.25
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0.20	0.10	0.10	0.20	0.39	1.56

Inoculum 10^6 cells/ml

Table 7 Comparative *in vitro* activity of L-105 against clinical isolates

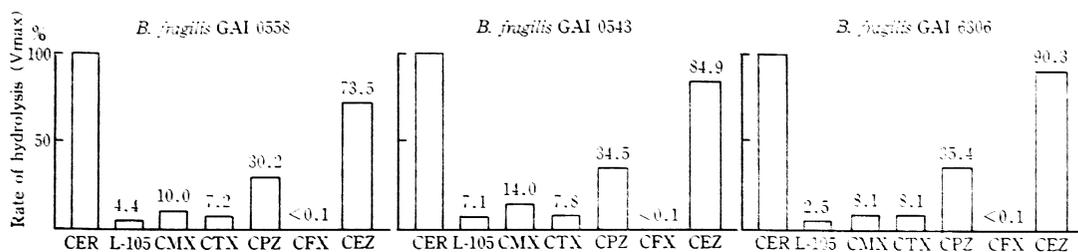
Strain	(No.)	Antibiotic	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for the following % of strains	
				50	90
<i>B. fragilis</i>	(48)	L-105	0.78~100	3.13	6.25
		CMX	0.78~100<	3.13	25
		CPZ	1.56~100<	6.25	25
		CTX	0.78~100<	1.56	3.13
		CFX	6.25~25	12.5	12.5
		CEZ	6.25~100<	25	100
<i>B. vulgatus</i>	(4)	L-105	3.13~12.5	6.25	6.25
		CMX	6.25~12.5	12.5	12.5
		CPZ	25	25	25
		CTX	1.56~6.25	3.13	3.13
		CFX	1.56~6.25	6.25	6.25
		CEZ	12.5~25	12.5	12.5
<i>B. distasonis</i>	(7)	L-105	0.78~25	6.25	6.25
		CMX	3.13~50	6.25	12.5
		CPZ	6.25~50	12.5	25
		CTX	0.78~25	3.13	6.25
		CFX	25	25	25
		CEZ	6.25~50	25	25
<i>B. thetaiotaomicron</i>	(23)	L-105	6.25~100<	25	50
		CMX	12.5~100<	25	50
		CPZ	12.5~100<	25	50
		CTX	6.25~100<	25	25
		CFX	12.5~100<	25	25
		CEZ	12.5~100<	25	50
<i>B. ovatus</i>	(5)	L-105	12.5~25	25	25
		CMX	25~50	50	50
		CPZ	12.5~50	25	50
		CTX	12.5~25	25	25
		CFX	1.56~25	25	25
		CEZ	12.5~100<	25	50
<i>B. uniformis</i>	(8)	L-105	6.25~100<	12.5	25
		CMX	6.25~100<	25	50
		CPZ	6.25~100<		25
		CTX	3.13~100<		25
		CFX	1.56~100<		25
		CEZ	6.25~100<	12.5	50
<i>B. bivius</i>	(7)	L-105	1.56~3.13	3.13	3.13
		CMX	1.56~25	6.25	6.25
		CPZ	1.56~12.5	3.13	3.13
		CTX	1.56~12.5	6.25	3.13
		CFX	0.78~6.25	6.25	6.25
		CEZ	6.25~25	25	25

Table 7 (Continued)

Strain	(No.)	Antibiotic	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for the following % of strains	
				50	90
<i>B. ascharolyticus</i> and <i>B. melanogenicus</i>	(8)	L-105	$\leq 0.025 \sim 0.1$	0.05	0.05
		CMX	$\leq 0.025 \sim 0.39$	≤ 0.025	0.05
		CPZ	$\leq 0.025 \sim 0.2$	0.05	0.2
		CTX	$\leq 0.025 \sim 0.05$	0.05	0.05
		CFX	0.05 \sim 0.39	0.2	0.39
		CEZ	$\leq 0.025 \sim 3.13$	≤ 0.025	1.56
<i>C. perfringens</i>	(14)	L-105	$\leq 0.025 \sim 1.56$	0.39	0.39
		CMX	$\leq 0.025 \sim 0.78$	0.05	0.2
		CPZ	$\leq 0.025 \sim 6.25$	0.78	3.13
		CTX	0.1 \sim 3.13	0.39	0.78
		CFX	0.78 \sim 3.13	0.78	1.56
		CEZ	0.05 \sim 0.39	0.1	50
<i>C. difficile</i>	(16)	L-105	25 \sim 50	50	25
		CMX	6.25 \sim 25	25	25
		CPZ	12.5 \sim 25	50	50
		CTX	25 \sim 50	50	50
		CFX	25 \sim 100	100	100
		CEZ	12.5 \sim 25	12.5	12.5
Anaerobic cocci* (<i>Peptostreptococcus</i>)	(15)	L-105	$\leq 0.025 \sim 25$	0.2	0.39
		CMX	$\leq 0.025 \sim 25$	0.1	0.39
		CPZ	$\leq 0.025 \sim 3.13$	0.2	0.78
		CTX	0.05 \sim 25	0.39	0.39
		CFX	0.05 \sim 6.25	0.39	1.56
		CEZ	0.05 \sim 50	0.2	0.39

Inoculum: 10^8 cells/ml except in case of Black pigmented Bacteria and anaerobic cocci (10^5 cells/ml)

* *P. magnus* (8 isolates), *P. micros* (3 isolates), *P. ascharolyticus* (2 isolates), *P. prevotii* (one isolate), *P. anaerobius* (one isolate)

Fig. 2 Stability of L-105 to the β -lactamases derived from three *B. fragilis* isolates

Note: Rate of hydrolysis are relative to an arbitrary value of 100 for cephaloridine

B. fragilis 3株 (GAI-0558, GAI-0543, および GAI-6306)の産生する β -lactamase に対する L-105 の安定性を CMX, CTX, CPZ, CEZ, CFX, CER を比較薬剤として検討した。

CER の加水分解率を 100 として比較すると、本剤は β -lactamase にかなり安定であった (Fig. 2)。

5. マウス実験的皮下膿瘍形成に対する予防効果

L-105 の 0.5 mg および 1 mg/mouse 3 回投与は、マウス実験的皮下膿瘍形成に対して顕著な予防効果を示さなかった (Table 9)。

6. L-105 投与マウス盲腸内容物中の *C. difficile* の出現

L-105 の 2 mg を 1 日 1 回 7 日間皮下投与し、7 日目に盲腸内容物中の *C. difficile* を検索した結果 10 匹中 10 匹に $2 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^7$ cells/g の *C. difficile* が検出された。対照とした CTX 2 mg 投与群でも、10 匹中 8 匹から $60 \sim 4 \times 10^3$ cells/g 菌数で *C. difficile* が検出された (Table 10)。

Ⅲ. 考 察

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ポリンの注射剤であり、7 β -methoxyiminoacetamido cephalosporin group に分類される。同系統の薬剤には、CTX, CMX, ceftizoxime (CZX) などが知られている。

CTX, CMX および CZX の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムや *B. fragilis* の産生する β -lactamase に対する安定性についてはすでに検討が行われており、これらは共通して嫌気性菌全般に幅広い抗菌スペクトラムを有するが、*B. fragilis* が産生する β -lactamase にやや不安定であり、したがって *B. fragilis* に対する抗菌力がやや弱いことが知られている⁵⁻⁹⁾。

上記の実験成績から、L-105 の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムは、CTX, CMX とほぼ同等であると考えられ、また *B. fragilis* の産生する β -lactamase に対

Table 8 Comparison of MIC and MBC

Organism	L-105		CMX	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. fragilis</i> GAI 0625	25	25	25	25
<i>B. fragilis</i> GAI 6268	25	25	25	25
<i>B. fragilis</i> GAI 6297	25	25	25	25
<i>B. fragilis</i> GAI 6299	25	25	25	25
<i>B. fragilis</i> GAI 4999	25	25	25	25
<i>C. perfringens</i> GAI 2812	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>C. perfringens</i> GAI 2813	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>C. difficile</i> GAI 5415	50	50	50	50
<i>C. difficile</i> GAI 5416	50	50	50	50
<i>P. magnus</i> GAI 2815	25	50	50	100
<i>P. magnus</i> GAI 2921	3.13	25	6.25	50

MIC, MBC (μ g/ml)

Table 9 Protective effect of L-105 and CMX to subcutaneous abscess formation due to *B. fragilis* GAI-0558

Group	Incidence of abscess formation
L-105 0.5 mg/mouse	9/10 (90%)
L-105 1.0 mg/mouse	7/10 (70%)
CMX 0.5 mg/mouse	7/10 (70%)
CMX 1.0 mg/mouse	4/10 (40%)
Control	8/10 (80%)

Table 10 The effect of L-105 on the microflora of cecum of mice

Group	On the 7th days of administration		on the 7th days after withdrawal of drug	
	Isolation frequency of <i>C. difficile</i> (%)	Number of <i>C. difficile</i> detected (cells/g)	Isolation frequency of <i>C. difficile</i> (%)	Number of <i>C. difficile</i> detected (cells/g)
L-015	100%	$2 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^7$	0	0
CTX	80%	$60 \sim 4 \times 10^3$	0	0
Controls	0	0	0	0

Note; Mice; ICR male 19 ± 1 g

Drug administration; 10 mice were given 1×2 mg L-105 s.c. at 24 hourly intervals for 7 days. 10 other mice were given 1×2 mg cefotaxime s.c. Another 10 mice were controls.

Caecal content; Caecal contents were collected from sacrificed mice on the 1st day on 7th days after the antibiotic was withdrawn and transported to the anaerobic chamber as soon as possible.

Processing specimens; the specimens were suspended in anaerobic diluent and properly diluted. Each dilution was then inoculated onto modified CCMA plates.

する安定性も CTX, CMX とほぼ同等で, CER, CEZ, CPZ よりはかなり安定であるが, CFX には及ばないことが明らかとなった。

さて, JOINER らは, *B. fragilis* を autoclaved caecal contents (ACC) と混じてマウス皮下に接種することにより高率に皮下膿瘍を生じせしめることを報告した³⁾。著者らは, この方法を追試した。*B. fragilis* GAI-0588 の brain heart infusion supplemented broth (BHIS, SCOTT, U.S.A.) での24時間培養菌液と ACC の1:1 混合液の 0.4 ml をマウス皮下に接種すると, 4日目には, 80~100% に膿瘍が形成された。この膿瘍は, 厚い被膜に囲まれ, 膿汁中からは, *B. fragilis* が $10^8 \sim 10^9$ cells 回収された。この系を利用し, 菌と ACC の混液接種後2時間, 24時間, 48時間の3回, 化学療法剤を投与し, 膿瘍形成をどの程度阻止できるかを検討した。L-105 の1 mg 3回投与は, 膿瘍形成に対して, ほとんど阻止効果を示さなかった。この系統の他の薬剤と同様 *B. fragilis* による膿瘍に対する治療効果は, 期待しにくいと考えられた。ただ, 小林らは, *E. coli* と *B. fragilis* によって作製した皮下感染症に対して CMX が有効であると報告しており, このような複数菌感染に対する治療効果の検討が必要であろう⁸⁾。

青木らは, 中部科学資材から購入している ICR 系マウスの盲腸内には, 正常では検出できない菌数で *C. difficile* が存在しており, 抗生剤投与が引き金になり *C. difficile* が盲腸内に多数検出される現象を報告した⁴⁾。テストした29薬剤中 cefotetan, minocycline を除く27薬剤

で *C. difficile* が分離されている。

L-105 も CTX 同様マウス盲腸内での *C. difficile* の異常増加を起こす引き金になりえた。L-105 の *C. difficile* に対する MIC は, 25~50 $\mu\text{g/ml}$ (10^6 cells/ml 接種) と高く, 本剤の化学療法中, 消化管内で *C. difficile* が選択的に増殖する可能性が少なくないことが考えられ, この点を注意すべきであろう。

文 献

- 1) 嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 27(3): 559~560, 1979
- 2) PERRET, C.: Iodometric assay of penicillinase. Nature (London) 174: 1012~1013, 1954
- 3) JOINER, K.A. et al.: A quantitative model for subcutaneous abscess formation in mice. Br. J. Exp. Path. 61: 97~107, 1980
- 4) 青木 誠, 他: 化学療法剤投与によるマウス盲腸内 *Clostridium difficile* の変動について。Chemotherapy 33(7): 617~623, 1985
- 5) 村田加寿美, 他: Cefotaxime の嫌気性菌に対する抗菌力。Chemotherapy 28(S-1): 33~41, 1980
- 6) 渡辺邦友, 他: Ceftizoxime (CZX) の嫌気性菌に対する抗菌力。Chemotherapy 28(S-5): 50~57, 1980
- 7) 小林とよ子, 他: Cefmenoxime (SCE-1365) の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用について。Chemotherapy 29(S-1): 42~52, 1981
- 8) 小林とよ子, 他: Cefmenoxime (SCE-1365) の実験的嫌気性菌マウス感染症に対する治療効果について。Chemotherapy 29(S-1): 53~56, 1981

IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITY OF L-105 AGAINST
ANAEROBIC BACTERIA

KUNITOMO WATANABE, KAKUYO SAWA, MAKOTO AOKI,
MASAYUKI MIYAUCHI, TOYOKO KOBAYASHI and KAZUE UENO
Institute of Anaerobic Bacteriology,
School of Medicine, Gifu University

L-105, a newly developed semisynthetic cephem, was examined *in vitro* and *in vivo* of its activity against anaerobic bacteria, with analogous cefotaxime (CTX) and cefmenoxime (CMX) used as controls.

The spectrum of the antibacterial activity of L-105 on anaerobic bacteria was similar to that of CTX and CMX covering a wide range, with the exception of a part of *B. fragilis* group and *Clostridium difficile*. The antibacterial activity of L-105 was strong, showing the MIC of 3.13 $\mu\text{g/ml}$ at inoculation of 10^8 CFU/ml, and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ at 10^8 CFU/ml on almost all the strains tested, except for the above mentioned bacteria.

L-105 was far more stable than cefazolin and cefoperazone against beta-lactamase produced by *B. fragilis*, but showed somewhat hydrolysis which was similar to CTX and CMX.

L-105 showed no inhibitory effect on pus formation caused by simultaneous inoculation of *B. fragilis* and autoclaved caecal contents.