

L-105 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

西野武志・尾花芳樹・後藤季美・大槻雅子
北川英男・田中和重・中るり子・谷野輝雄
京都薬科大学微生物学教室

新しい注射用 cephem 系抗生物質 L-105 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について cefotiam (CTM) と ceftazidime (CAZ) を比較薬として検討し、以下の結果を得た。

L-105 は教室保存標準株の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示した。また臨床分離株に対する感受性分布ではグラム陽性菌に対して L-105 は CTM や CAZ よりも良好な感受性を示した。一方、グラム陰性菌に対しては *Proteus vulgaris* を除き L-105 は CAZ とほぼ同等かあるいは優れていた。

殺菌作用について検討したところ、L-105 は使用したいずれの菌種に対しても dose response のある殺菌作用を示した。

抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、ウマ血清添加の影響をほとんど受けなかったが、接種菌量および培地 pH の影響を受け、培地 pH ではアルカリ側で抗菌力が良好となった。

位相差顕微鏡による形態観察を行ったところ、*Escherichia coli* K-12 に対して L-105 は 0.006~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の幅広い濃度域で菌のフィラメント化が観察された。また *E. coli* のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対して L-105 は PBPs の 3 に良好な親和性を示し、次いで 1A, 1Bs の順であった。一方、*Staphylococcus aureus* の場合は PBPs 2, 1, 3 の順に親和性を示した。

マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果では、*S. aureus* や *Streptococcus pneumoniae* の場合、CTM より劣るが CAZ より優れていた。一方、*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* では CTM より優れ、CAZ とほぼ同等か若干優れていた。

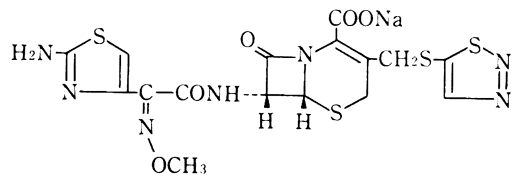
マウス実験的局所感染症に対する治療効果では *K. pneumoniae* による肺感染の場合、L-105 の効果は CAZ より劣っていたが、CTM より優れていた。また *E. coli* による尿路感染では CTM より優れており、CAZ とほぼ同等であった。

L-105 は日本レダリー株式会社で合成、開発された新しい注射用 cephem 系抗生物質であり、化学名は sodium 7 β -[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylate で分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}_4\text{Na}$ 、分子量 535.56 の白色ないし淡黄白色の結晶または結晶性粉末であり、その構造式を Fig. 1 に示した。

本物質は好気性、嫌気性の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する。また各種細菌の産生する β -lactamase に対して安定であり、グラム陰性菌に対しては既存の第三世代 cephem 剤とほぼ同様の抗菌力を示し、さらに *S. aureus* に対しても良好な抗菌力を示すといわれている¹⁾。

今回私どもは cefotiam²⁾ および ceftazidime³⁾ を比較薬とし、L-105 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について検討を行ったので報告する。

Fig. 1 Chemical structure of L-105



I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬物

L-105, cefotiam (CTM), ceftazidime (CAZ), cefazolin (CEZ), cefotaxime (CTX), latamoxef (LMOX), cefmenoxime (CMX) および penicillin G (PCG) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. 抗菌スペクトラム

教室保存の標準株に対する試験管内抗菌力を、前培養に感受性ピジョン (STB; 栄研)、測定用に感受性ディ

Table 1 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^9 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	L-105	CTM	CAZ
<i>S. aureus</i> 209-PJC	0.78	0.78	12.5
<i>S. aureus</i> Smith	0.78	0.78	6.25
<i>S. aureus</i> Neumann	0.78	0.78	12.5
<i>S. aureus</i> Terashima	0.78	1.56	12.5
<i>S. aureus</i> E-46	0.78	1.56	12.5
<i>S. aureus</i> No. 80	0.39	0.39	6.25
<i>S. epidermidis</i>	3.13	1.56	12.5
<i>S. pyogenes</i> S-23	0.013	0.1	0.2
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.013	0.1	0.2
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.006	0.025	0.1
<i>S. faecalis</i>	>100	>100	>100
Viridans group <i>Streptococcus</i>	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> I	0.013	0.2	0.2
<i>S. pneumoniae</i> II	0.013	0.2	0.2
<i>S. pneumoniae</i> III	0.013	0.2	0.2
<i>C. diphtheriae</i>	0.05	1.56	25
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.78	0.2	0.78
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.78	0.39	3.13
<i>B. anthracis</i>	12.5	3.13	100

Table 2 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	L-105	CTM	CAZ
<i>S. aureus</i> 209-PJC	0.39	0.2	6.25
<i>S. aureus</i> Smith	0.78	0.39	6.25
<i>S. aureus</i> Neumann	0.39	0.39	6.25
<i>S. aureus</i> Terashima	0.78	0.78	12.5
<i>S. aureus</i> E-46	0.1	0.78	6.25
<i>S. aureus</i> No. 80	0.39	0.39	3.13
<i>S. epidermidis</i>	3.13	0.78	12.5
<i>S. pyogenes</i> S-23	0.006	0.025	0.2
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.013	0.1	0.2
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.006	0.013	0.1
<i>S. faecalis</i>	>100	>100	>100
Viridans group <i>Streptococcus</i>	100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> I	0.013	0.2	0.2
<i>S. pneumoniae</i> II	0.013	0.2	0.39
<i>S. pneumoniae</i> III	0.013	0.2	0.2
<i>C. diphtheriae</i>	0.39	0.78	6.25
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.013	0.025	0.39
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.2	0.78
<i>B. anthracis</i>	1.56	0.39	25

スク用培地 (STA ; 栄研) を用いて, 日本化学療法学会
最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁴⁾ に準じて求めた。な
お *Streptococcus* 群および *Corynebacterium diphtheriae* につ
いては10%ウマ脱繊維血液加 STA を用いた。

3. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離された *Staphylococcus aureus* 37 株,
cephem 耐性の *S. aureus* 40株, *Streptococcus pyogenes* 39
株, *Escherichia coli* 45 株, *Klebsiella pneumoniae* 40 株,
Enterobacter cloacae 21 株, *Enterobacter aerogenes* 22 株,
Serratia marcescens 43 株, *Proteus mirabilis* 29 株, *Proteus*
vulgaris 36株, *Providencia rettgeri* 17株, *Morganella morganii*
26株, *Haemophilus influenzae* 39 株について, 前培養に
STB, 感受性測定に STA を用いて, 日本化学療法学会

最小発育阻止濃度測定法⁴⁾ に準じて, 感受性測定を行っ
た。なお, *H. influenzae* は3% bacto-fildes enrichment
(Difco) を含んだ STA を用いた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, ウマ血清添加, 接種菌量の影
響について, *S. aureus* Smith, *E. coli* 444, *K. pneumoniae*
KC-1 および *S. marcescens* T-55 を被験菌種として STA
を用いた寒天平板希釈法により検討を行った。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

普通ブイヨン (NB ; ニッスイ) で前培養した *S. aureus*
Smith, cephem 耐性の *S. aureus* 84, *S. aureus* 209-PJC,
E. coli 444 および *K. pneumoniae* KC-1 を同新鮮培地に
接種し, 対数期中期まで振盪培養した後, 所定の濃度にな

Table 3 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10^8 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	L-105	CTM	CAZ
<i>E. coli</i> NIHJC-2	0.2	0.2	0.39
<i>E. coli</i> NIH	0.2	0.39	0.39
<i>E. coli</i> K-12	0.39	0.2	0.39
<i>C. freundii</i> NIH 10018-68	6.25	50	12.5
<i>S. typhi</i> T-287	0.05	0.05	0.2
<i>S. typhi</i> O-901	0.78	0.2	0.78
<i>S. paratyphi</i> A	0.05	0.1	0.1
<i>S. paratyphi</i> B	0.05	0.05	0.2
<i>S. enteritidis</i>	0.2	0.78	0.39
<i>S. dysenteriae</i> EW-7	0.1	0.1	0.39
<i>S. flexneri</i> 2aEW-10	0.2	0.2	0.2
<i>S. boydii</i> EW-28	0.1	0.1	0.2
<i>S. sonnei</i> EW-33	0.2	0.2	0.1
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	0.1	0.39	0.2
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	3.13	>100	3.13
<i>E. aerogenes</i> NCTC 10006	6.25	>100	1.56
<i>H. alvei</i> NCTC 9540	0.78	>100	0.78
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	0.78	>100	1.56
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.1	0.78	0.2
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.2	>100	0.39
<i>P. rettgeri</i> NIH 96	0.012	50	0.05
<i>P. inconstans</i> NIH 118	0.78	>100	3.13
<i>M. morganii</i> Kono	1.56	>100	12.5
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	25	>100	3.13
<i>P. aeruginosa</i> IAM 1095	50	>100	3.13
<i>P. cepacia</i> ATCC 25416	25	>100	25
<i>P. maltophilia</i> ATCC 13637	12.5	>100	1.56
<i>A. calcoaceticus</i> IFO 12552	25	>100	6.25
<i>A. faecalis</i> IFO 1311	3.13	6.25	3.13

るように薬物を添加し、以後経時的に生菌数を測定した。

6. 位相差顕微鏡による形態観察

E. coli K-12 に L-105 を作用させた時の形態変化について検討を行った。すなわち、スライドガラス上で、薬を含ませたフィルム寒天を作製し、一方約3時間振盪培養を行った対数期途中の菌液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天上にかぶせ、パラフィンで封入した。これを 37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡（日本光学）により観察した。

7. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する親和性

B.G. SPRATT の方法⁵⁾ により *E. coli* K-12 株の膜画分を調製した。一方、*S. aureus* 209-PJC 株の膜画分は酸化アルミニウムを用いて破碎して調製し、これらの膜

と ¹⁴C-PCG との競合実験により、*E. coli* および *S. aureus* のおのおの PBPs への L-105 の親和性を検討した。X線フィルム上の ¹⁴C-PCG による感光度は Dualwave-length TLC Scanners 90 (Shimazu) を用いて測定し、この測定値をもとに50%阻害濃度を求めた。

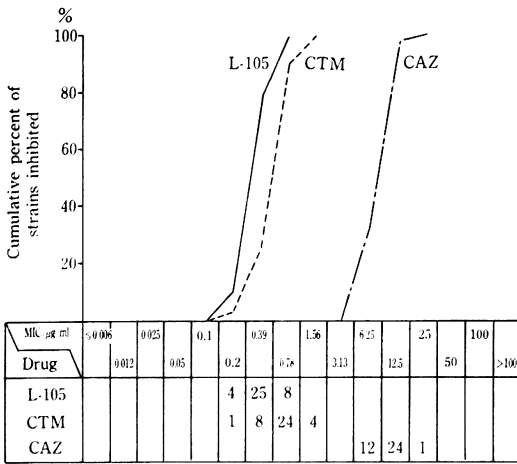
8. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

S. aureus Smith, *E. coli* 444, *K. pneumoniae* KC-1 および *S. marcescens* T-55 の各菌株を NB で 37°C 18時間培養後、同培地で希釈し、6% hog gastric mucin (Orthana Kemisk Fabrik A/S) と等量混合した。また *S. pneumoniae* III は10%ウマ血清含有 NB で 37°C 18時間培養後、生理的食塩水で希釈した。これらの菌液を1群8匹の Std-ddY 系雄マウス (体重 17~18 g) の腹腔

Table 4 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10⁸ cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)		
	L-105	CTM	CAZ
<i>E. coli</i> NIHJC-2	0.1	0.1	0.2
<i>E. coli</i> NIH	0.025	0.1	0.2
<i>E. coli</i> K-12	0.1	0.1	0.1
<i>C. freundii</i> NIH 10018-68	0.1	0.39	0.39
<i>S. typhi</i> T-287	0.025	0.05	0.1
<i>S. typhi</i> O-901	0.025	0.05	0.05
<i>S. paratyphi</i> A	0.05	0.1	0.1
<i>S. paratyphi</i> B	0.05	0.05	0.1
<i>S. enteritidis</i>	0.2	0.2	0.2
<i>S. dysenteriae</i> EW-7	0.1	0.1	0.2
<i>S. flexneri</i> 2aEW-10	0.05	0.1	0.05
<i>S. boydii</i> EW-28	0.05	0.1	0.2
<i>S. sonnei</i> EW-33	0.1	0.1	0.05
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	0.1	0.2	0.1
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	0.39	3.13	0.39
<i>E. aerogenes</i> NCTC 10006	0.39	3.13	0.39
<i>H. alvei</i> NCTC 9540	0.78	3.13	0.78
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	0.2	12.5	0.2
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.012	0.2	0.05
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.2	1.56	0.2
<i>P. rettgeri</i> NIH 96	0.012	≤0.006	0.025
<i>P. inconstans</i> NIH 118	0.05	0.1	0.2
<i>M. morgani</i> Kono	0.78	6.25	1.56
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	3.13	>100	1.56
<i>P. aeruginosa</i> IAM 1095	25	>100	1.56
<i>P. cepacia</i> ATCC 25416	12.5	>100	0.78
<i>P. maltophilia</i> ATCC 13637	12.5	>100	0.39
<i>A. calcoaceticus</i> IFO 12552	25	100	6.25
<i>A. faecalis</i> IFO 1311	1.56	6.25	6.25

Fig. 2 Sensitivity distribution of 37 strains of *S. aureus* (10^6 cells/ml)



内に接種し、感染2時間後に1回、生理的食塩水に溶解した薬物を皮下投与した。その後7日間、マウスの生死の観察を行い、LITCHFIELD-WILCOXON法⁶⁾によりED₅₀値を算出した。

9. マウス実験の呼吸器感染症に対する治療効果

K. pneumoniae DT-Sを普通寒天培地 (NA; ニュッスイ) で37°C 18時間培養後、NBに浮遊させ、nebulizerを用いて噴霧吸入感染を惹起させた⁷⁾。噴霧終了15時間後に薬物を1回皮下投与し、以後経時的に肺を摘出し、ホモジナイズ後、生菌数測定を行った。なお1群5匹のマウスを用いた。

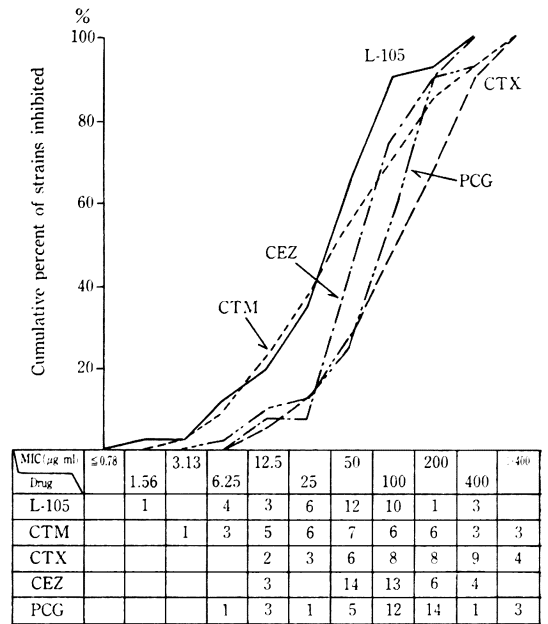
10. マウス実験の上行性尿路感染症に対する治療効果
E. coli 444をNBで37°C 18時間培養後、同培地で希釈した。この菌液を経尿道的に接種し腎盂腎炎を惹起させた⁸⁾。菌接種4時間後に、各薬物を皮下投与し、24時間後腎臓を摘出し、ホモジナイズ後、生菌数測定を行った。なお1群5匹のマウスを用いた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対する感受性について検討した結果をTable 1~4に示した。グラム陽性菌、陰性菌に対して、接種菌量 10^6 および 10^8 cells/mlにおいて、L-105は*P. aeruginosa*を除き比較薬物と同等かあるいは優れた抗菌力を示した。すなわち 10^6 cells/mlにおけるL-105の*S. aureus*に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は0.1~0.78 μg/mlであり、CTMとはほぼ同等で、CAZより優れていた。また*S. pyogenes*や*S. pneumoniae*に対して、L-105は0.006~0.013 μg/mlの感受性を示し、CTMやCAZよりも

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates Cephem^r *S. aureus* 40 strains (10^8 cells/ml)



優れていた。一方グラム陰性の*E. coli*に対するL-105のMICは0.025~0.1 μg/mlであり、CTM, CAZとほぼ同等の抗菌力を有しており、その他の enterobacteriaceae に対しても強い抗菌力を示した。とくに 10^8 cells/ml 接種でCTMが抗菌力を示さなかった*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens* などに対しても良好な抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離した*S. aureus* 37株, cephem^r *S. aureus* 40株, *S. pyogenes* 39株, *E. coli* 45株, *K. pneumoniae* 40株, *E. cloacae* 21株, *E. aerogenes* 22株, *S. marcescens* 43株, *P. mirabilis* 29株, *P. vulgaris* 36株, *P. rettgeri* 17株, *M. morgani* 26株および*H. influenzae* 39株の感受性について接種菌量 10^6 cells/mlで測定し、その成績を累積分布としFig. 2~15に示した。

a) *S. aureus* の場合

L-105のMICは0.2~0.78 μg/mlに分布しており、0.39 μg/mlにピークを有する一峰性の分布を示した。その抗菌力はCTMより2倍、CAZより約32倍優れていた。またL-105のMIC₅₀およびMIC₉₀はそれぞれ0.39, 0.78 μg/mlであり、CTMは0.78, 1.56 μg/mlで、CAZはいずれも12.5 μg/mlであった。

b) Cephem^r *S. aureus* の場合

10^8 cells/ml 接種でCEZに対するMICが ≥ 12.5

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates Cephem^r *S. aureus* 40 strains (10⁶ cells/ml)

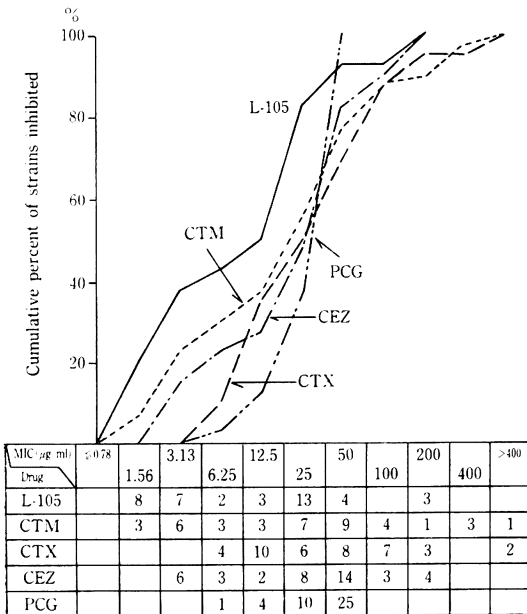
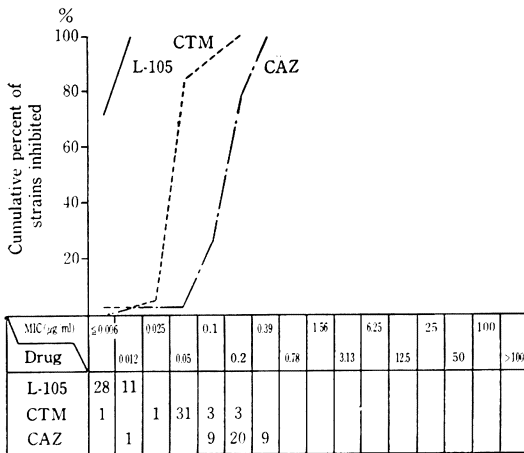


Fig. 5 Sensitivity distribution of 39 strains of *S. pyogenes* (10⁸ cells/ml)



μg/ml である *S. aureus* 40 株に対する L-105 の感受性を 10⁸ および 10⁶ cells/ml 接種で検討し、Fig. 3, 4 に示した。

10⁸ cells/ml 接種の場合 L-105 の MIC は 1.56~400 μg/ml に分布し、その MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 50, 100 μg/ml であり、良好な抗菌力を示さなかった。10⁶ cells/ml 接種の場合 L-105 は比較薬よりも優れ

Fig. 6 Sensitivity distribution of 45 strains of *E. coli* (10⁶ cells/ml)

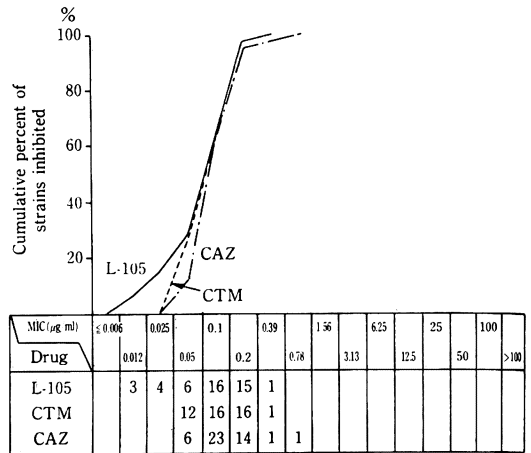
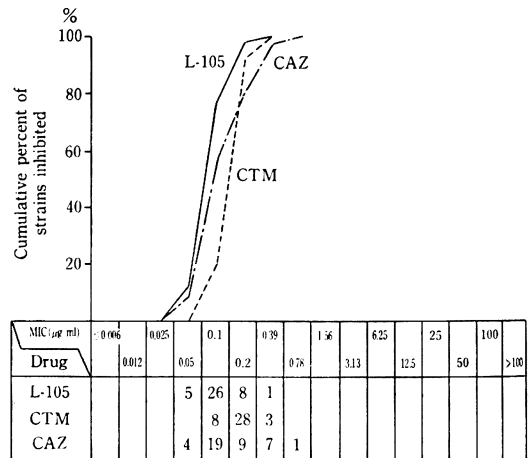


Fig. 7 Sensitivity distribution of 40 strains of *K. pneumoniae* (10⁶ cells/ml)



ていたが、前述の cephem 感受性の *S. aureus* に対する MIC と比較すると、その MIC₅₀ は 12.5 μg/ml であり約 32 倍劣っていた。

c) *S. pyogenes* の場合

L-105 は 10⁶ cells/ml の接種の場合 0.012 μg/ml 以下ですべての株の発育を阻止し、CTM や CAZ よりも明らかに優れた抗菌力を示した。

d) *E. coli* の場合

L-105 の MIC は 0.012~0.39 μg/ml に分布し、そのピーク値は 0.1~0.2 μg/ml であった。また L-105, CTM および CAZ の MIC₅₀ と MIC₉₀ はすべて同じ値を示し、それぞれ 0.1, 0.2 μg/ml であった。

Fig. 8 Sensitivity distribution of 21 strains of *E. cloacae* (10^6 cells/ml)

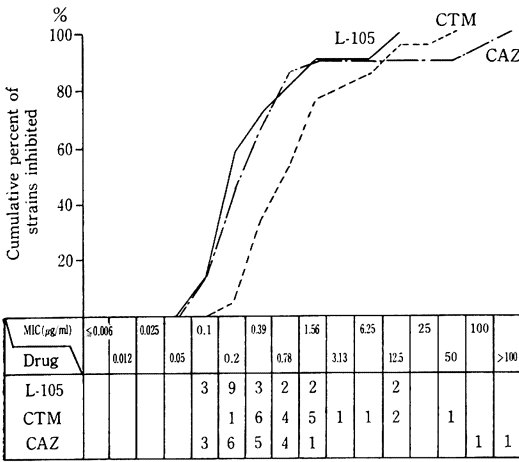


Fig. 10 Sensitivity distribution of 43 strains of *S. marcescens* (10^6 cells/ml)

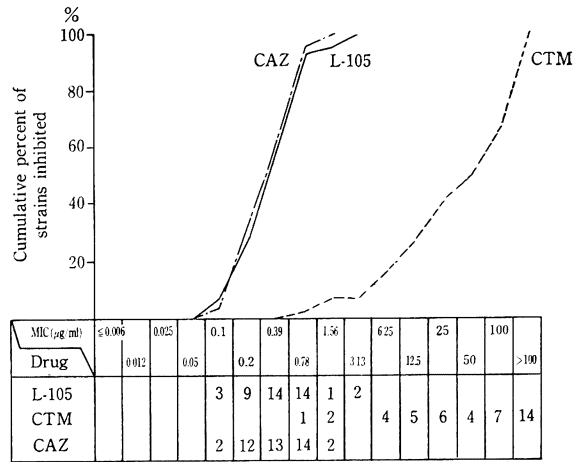


Fig. 9 Sensitivity distribution of 22 strains of *E. aerogenes* (10^8 cells/ml)

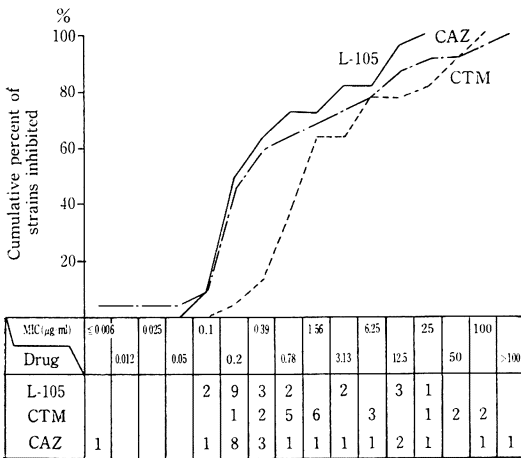
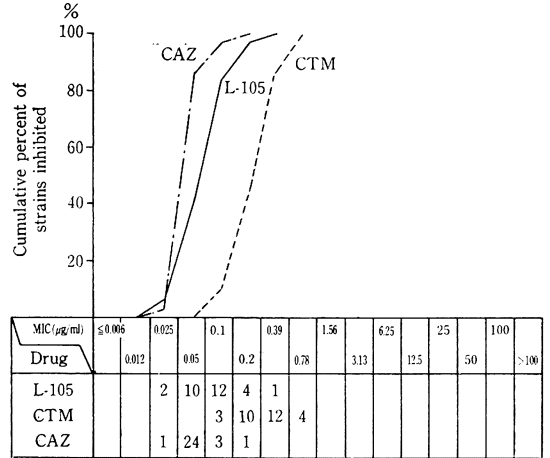


Fig. 11 Sensitivity distribution of 29 strains of *P. mirabilis* (10^6 cells/ml)



e) *K. pneumoniae* の場合

L-105 は 0.1 μg/ml にピークを有する一峰性の分布を示し、その抗菌力は CAZ とほぼ同等であり、CTM より若干優れていた。

f) *E. cloacae* の場合

L-105 の MIC は 0.1~12.5 μg/ml に分布し、CAZ とほぼ同等の抗菌力であり、CTM よりは優れていた。また *E. cloacae* に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ は、L-105 ではそれぞれ 0.2 と 1.56 μg/ml であり、CTM では 0.78 と 12.5 μg/ml であり、CAZ では 0.39 と 1.56 μg/ml であった。

g) *E. aerogenes* の場合

L-105 の MIC は 0.1~25 μg/ml に幅広く分布し、その抗菌力は CAZ とほぼ同等であり、CTM よりも優れていた。

h) *S. marcescens* の場合

L-105 は 0.39~0.78 μg/ml にピークを有する分布を示し、その抗菌力は CAZ と同等であり、CTM よりも優れていた。また L-105、CTM および CAZ の MIC₅₀ はそれぞれ 0.39、50、0.39 μg/ml であった。

i) *P. mirabilis* の場合

L-105 の MIC は 0.025~0.39 μg/ml に分布し、その抗菌力は CAZ より若干劣っていたが、CTM よりも優れていた。また L-105、CTM および CAZ の MIC₉₀

Fig. 12 Sensitivity distribution of 36 strains of *P. vulgaris* (10^6 cells/ml)

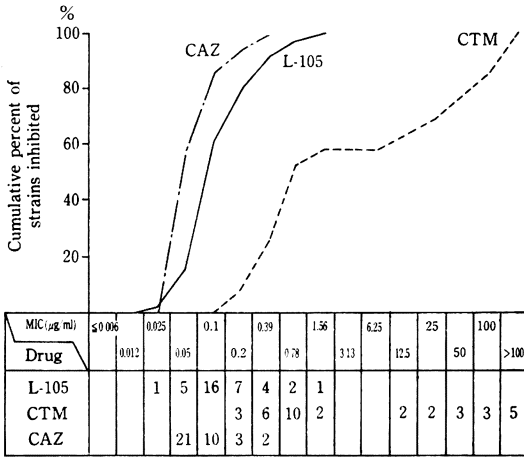


Fig. 14 Sensitivity distribution of 26 strains of *M. morgani* (10^6 cells/ml)

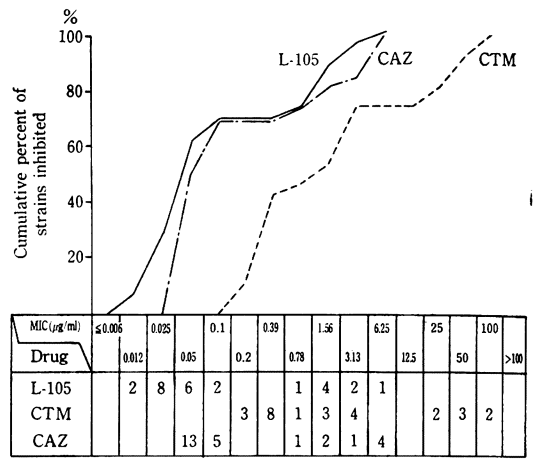


Fig. 13 Sensitivity distribution of 17 strains of *P. rettgeri* (10^8 cells/ml)

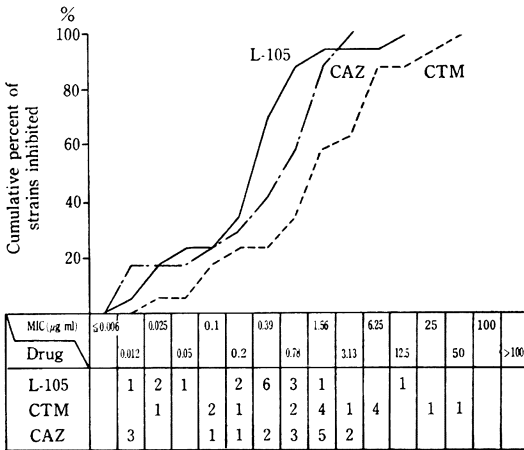
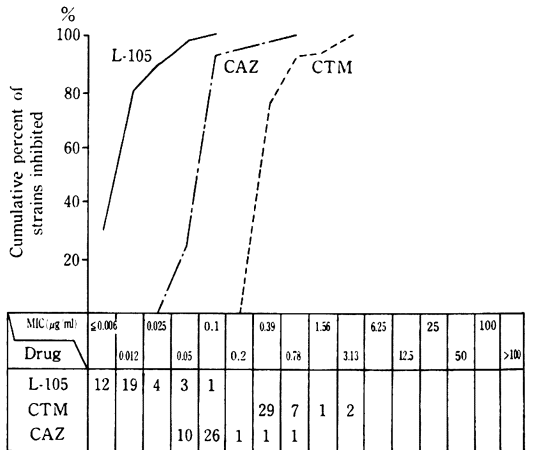


Fig. 15 Sensitivity distribution of 39 strains of *H. influenzae* (10^6 cells/ml)



はそれぞれ 0.2, 0.78, 0.1 µg/ml であった。

j) *P. vulgaris* の場合

L-105 は 0.1 µg/ml にピークを有する分布を示し、その抗菌力は CAZ より若干劣っていたが、CTM よりは優れていた。また L-105, CTM, CAZ の MIC₅₀ はそれぞれ 0.05, 1.56, 0.05 µg/ml であった。

k) *P. rettgeri* の場合

L-105 の MIC は 0.012~12.5 µg/ml に幅広く分布し、その抗菌力は CAZ より若干優れ、CTM より優れていた。また L-105, CTM, CAZ の MIC₉₀ はそれぞれ 1.56, 25, 3.13 µg/ml であった。

l) *M. morgani* の場合

L-105 の抗菌力は CAZ とほぼ同等であり、その MIC は 0.012~6.25 µg/ml に幅広く分布したが、CTM よりは優れていた。L-105, CTM, CAZ の MIC₅₀ はそれぞれ 0.05, 1.56, 0.05 µg/ml であった。

m) *H. influenzae* の場合

L-105 の MIC は ≤0.006~0.1 µg/ml に分布し、比較薬の CAZ や CTM よりも優れた抗菌力を示した。L-105, CTM, CAZ の MIC₅₀ はそれぞれ 0.012, 0.39, 0.1 µg/ml であった。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus Smith, *E. coli* 444, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55 を用いて、培地 pH, ウマ血清添加,

Table 5 Effect of medium pH on the antibacterial activity of L-105, CTM, and CAZ

Organism	Medium pH	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		L-105	CTM	CAZ
<i>S. aureus</i> Smith	6.0	1.56	0.39	6.25
	7.0	0.78	0.39	6.25
	8.0	0.39	0.39	6.25
<i>E. coli</i> 444	6.0	≤ 0.025	0.05	0.1
	7.0	≤ 0.025	0.05	0.1
	8.0	≤ 0.025	0.05	0.1
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	6.0	0.1	0.2	0.1
	7.0	0.05	0.1	0.05
	8.0	≤ 0.025	0.1	0.05
<i>S. marcescens</i> T-55	6.0	1.56	50	0.39
	7.0	0.78	25	0.39
	8.0	0.39	25	0.39

Inoculum size: 10^6 cells/ml

接種菌量の抗菌力に及ぼす影響について検討した結果を Table 5~7 に示した。

培地 pH の影響では、L-105 の場合、*E. coli* 444 を除きアルカリ側で抗菌力が良好となる傾向がみられた。一方、CTM や CAZ では培地 pH による抗菌力の変動はほとんど認められなかった。ウマ血清添加の場合、3 薬剤ともあまり大きな影響を受けなかった。接種菌量の影響では、*S. marcescens* の場合を除き、菌量による抗菌力の変動は 3 薬剤ともほとんど認められなかった。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus, *E. coli* および *K. pneumoniae* を用いて殺菌作用を検討した結果を Fig. 16~22 に示した。

a) *S. aureus* Smith の場合

Fig. 16 に示すように L-105 の $0.39 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度において殺菌作用が認められたが、その作用は顕著なものではなかった。一方、CTM では $0.39 \mu\text{g/ml}$ で明らかな殺菌作用が認められるものの、それ以上の高い濃度ではむしろ殺菌作用が弱くなる、すなわち反転現象が認められた。また CAZ では $6.25 \mu\text{g/ml}$ 作用ではほぼ静菌的な作用が、そして $25 \mu\text{g/ml}$ 作用で殺菌作用がみられた。

b) *S. aureus* 84 の場合

Cephem 耐性の *S. aureus* 84 の濁度および生菌数に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 17, 18 に示した。すなわち Fig. 17 に示すように L-105 では薬剤濃度に応じた増殖抑制効果がみられたが、溶菌作用は認められ

Table 6 Effect of serum concentration on the antibacterial activity of L-105, CTM, and CAZ

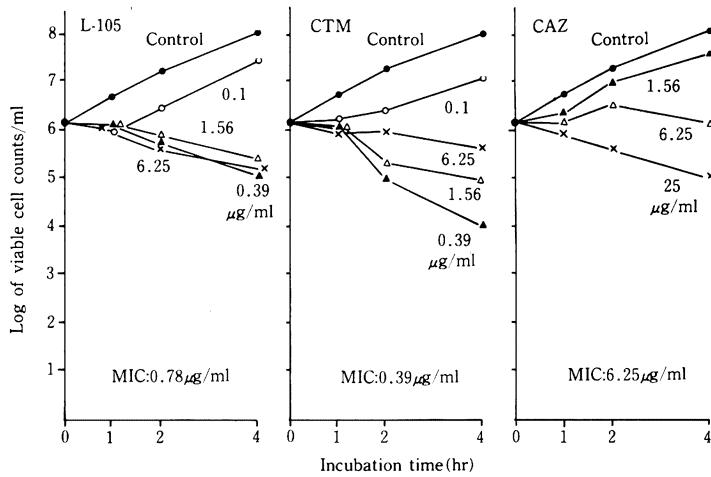
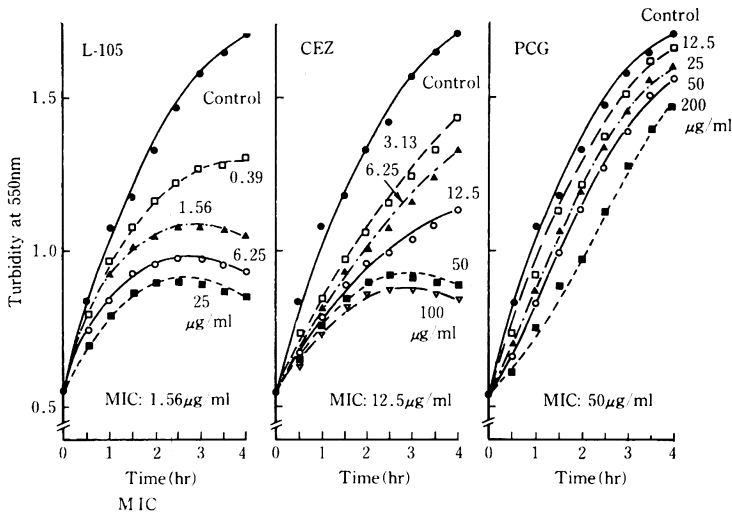
Organism	Serum conc. (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		L-105	CTM	CAZ
<i>S. aureus</i> Smith	0	0.78	0.39	6.25
	10	0.78	0.39	6.25
	25	0.78	0.39	6.25
<i>E. coli</i> 444	0	≤ 0.025	0.05	0.1
	10	≤ 0.025	≤ 0.025	0.05
	25	≤ 0.025	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0	0.05	0.1	0.05
	10	≤ 0.025	0.1	0.05
	25	0.05	0.1	0.05
<i>S. marcescens</i> T-55	0	0.78	25	0.39
	10	0.39	12.5	0.39
	25	0.39	50	0.2

Inoculum size: 10^6 cells/ml

Table 7 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of L-105, CTM, and CAZ

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		L-105	CTM	CAZ
<i>S. aureus</i> Smith	10^8	0.78	0.78	6.25
	10^7	0.78	0.39	6.25
	10^6	0.78	0.39	6.25
	15^5	0.39	0.39	3.13
<i>E. coli</i> 444	10^8	0.05	0.05	0.1
	10^7	0.05	0.05	0.1
	10^6	≤ 0.025	0.05	0.1
	10^5	≤ 0.025	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	10^8	0.1	0.2	0.1
	10^7	0.1	0.2	0.05
	10^6	0.05	0.1	0.05
	10^5	≤ 0.025	0.1	0.05
<i>S. marcescens</i> T-55	10^8	1.56	>100	0.78
	10^7	1.56	>100	0.78
	10^6	0.78	25	0.39
	10^5	0.39	6.25	0.39

なかった。CEZ でも同様な傾向が観察された。一方 PCG では $200 \mu\text{g/ml}$ 作用でも control と同様に増殖した。生菌数測定の結果 L-105 では $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以上の

Fig. 16 Effect of L-105, CTM, and CAZ on the viability of *S. aureus* SmithFig. 17 Effect of L-105, CEZ, and PCG on the growth of *S. aureus* 84

濃度で薬剤濃度に応じた殺菌作用が観察され、CEZでは50 µg/mlではほぼ静菌的な作用がみられたが、PCGでは50 µg/mlでもcontrolと同様の増殖を認めた。

c) *S. aureus* 209-PJC の場合

S. aureus に β -lactam 系抗生物質を作用させた場合、いわゆる反転現象が起こることが知られているが^{9,10}、L-105でもこのような現象がみられるかどうかを検討するために、反転現象が起こることが判明しているCEZを対照として検討し、その結果をFig. 19, 20に示した。CEZではFig. 20に示すように0.39 µg/mlと1.56 µg/mlの間で反転現象が観察されたが、L-105では薬剤濃度に応じた殺菌作用がみられ、反転現象を認めることができなかった。

d) *E. coli* 444 の場合

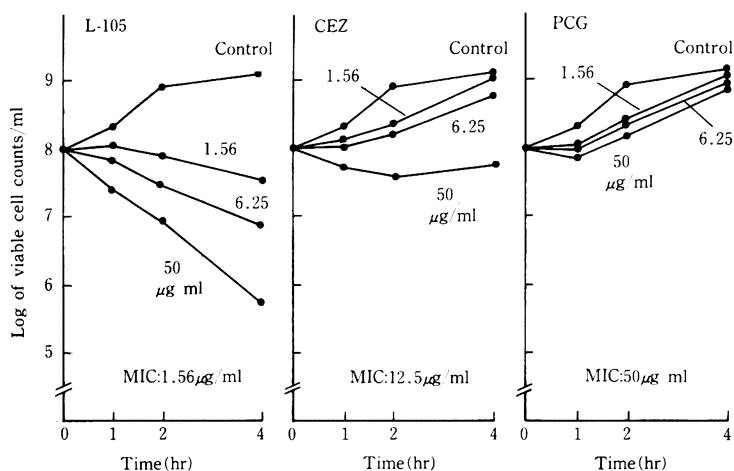
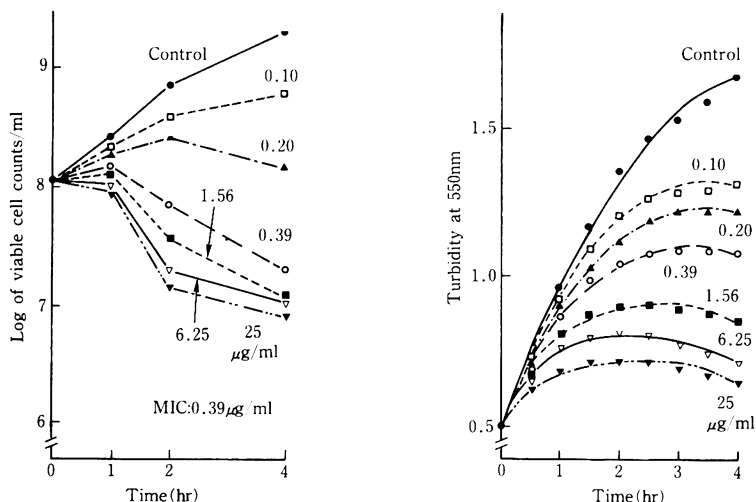
Fig. 21に示すようにL-105は0.0063 µg/ml、CTMは0.025 µg/mlそしてCAZは0.1 µg/ml以上の濃度において、薬剤濃度に応じた殺菌作用が観察された。

e) *K. pneumoniae* KC-1 の場合

3薬剤とも0.05 µg/ml以上の濃度において薬剤濃度に応じた殺菌作用が認められた。

5. 位相差顕微鏡による形態観察

位相差顕微鏡による観察結果をFig. 23に、またそれらの観察結果をまとめたものをFig. 24に示した。L-105の0.0015 µg/ml作用ではcontrolと同様の形態が観察され、0.006~0.39 µg/ml作用では菌のフィラメント化および溶菌像が観察された。また、1.56, 6.25 µg/ml作

Fig. 18 Effect of L-105, CEZ, and PCG on the viability of *S. aureus* 84Fig. 19 Effect of L-105 on the growth curve of *S. aureus* 209-P JC

用では一部の菌体にフィラメント化が観察されるが、大部分の菌体はあまり伸長化せずにスフェロプラストを形成し、溶菌した。25 $\mu\text{g/ml}$ 作用ではフィラメント化した菌体は全く観察されず、スフェロプラスト形成や溶菌像が観察された。このように L-105 では幅広い濃度域で菌体のフィラメント化が観察されたが、Fig. 24 に示すように LMOX でも 0.012~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の広い濃度域でフィラメント化が観察された。

6. PBPs に対する親和性

E. coli K-12 および *S. aureus* 209-PJC のおのおの PBPs への L-105 の親和性を検討した結果を Fig. 25, 26に、またこれらの結果よりおのおの PBPs への 50%阻害濃度を算出した結果を Table 8 に示した。

E. coli の場合 PBP 3 への親和性をもっとも強く、次いで 1A, 1Bs, 2, 4 の順であり、PBP 5 と 6 への親和性はほとんど認められず、形態変化を裏づける PBPs への親和性を示していた。

一方、*S. aureus* の場合、PBP 2 への親和性が高く、次いで 1, 3 の順であり、PBP 4 への親和性は低かった。

7 マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

グラム陽性菌 2 菌種、グラム陰性菌 3 菌種を用いた腹腔内感染症に対する L-105 の効果について検討した結果を Table 9 に示した。

S. aureus Smith の場合、L-105 の ED₅₀ 値は 0.072 mg/mouse であり、CTM より劣ったが、CAZ より約 5 倍優れていた。また *S. pneumoniae* III の場合、L-105

Fig. 20 Effect of CEZ on the growth curve of *S. aureus* 209-P JC

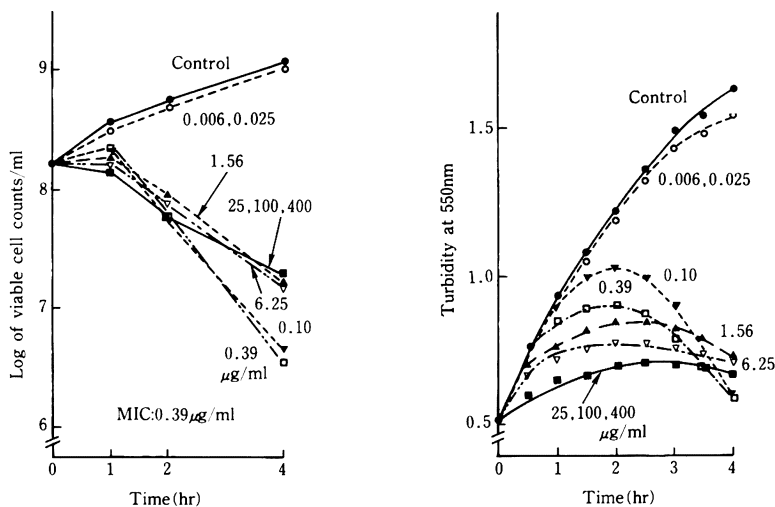


Fig. 21 Effect of L-105, CTM, and CAZ on the viability of *E. coli* 444

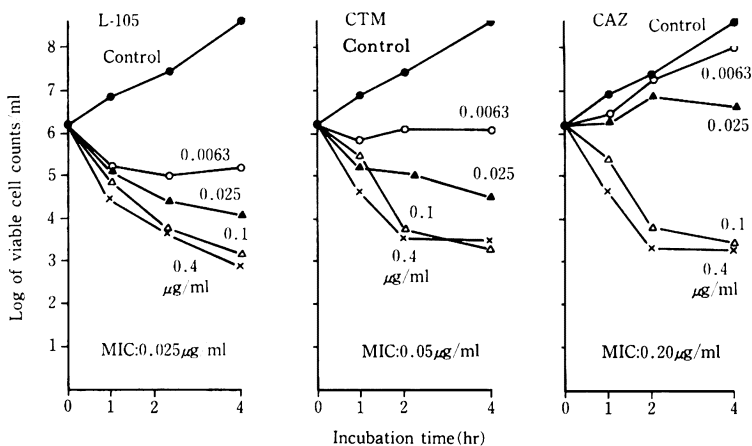


Table 8 Competition of L-105 with ¹⁴C-labeled penicillin G for binding to PBPs in cytoplasmic membrane of *E. coli* K-12 and *S. aureus* 209-PJC *in vitro*

Membrane	ID ₅₀ (µg/ml)						
	1A or 1	1Bs	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i> K-12	0.064	0.63	1.0	0.013	8.0	>25	>25
<i>S. aureus</i> 209-PJC	0.095		0.022	0.12	13.8		

の ED₅₀ 値は 0.7 mg/mouse であり、CTM とほぼ同等か若干劣るが、CAZ より 3 倍優れていた。

グラム陰性の *E. coli* 444 の場合 L-105 の治療効果は CAZ とほぼ同等で、その ED₅₀ 値は 0.0024 mg/mouse であり、CTM より若干優れていた。*K. pneumoniae* KC-

1 の場合、L-105 の ED₅₀ 値は 0.047 mg/mouse であり、CAZ より若干優れ、CTM より優れていた。*S. marcescens* T-55 の場合、感受性を示さない CTM の ED₅₀ 値は >4 mg/mouse であり、効果を示さなかったが、L-105 は CAZ とほぼ同等の治療効果を示し、その

Fig. 22 Effect of L-105, CTM, and CAZ on the viability of *K. pneumoniae* KC-1

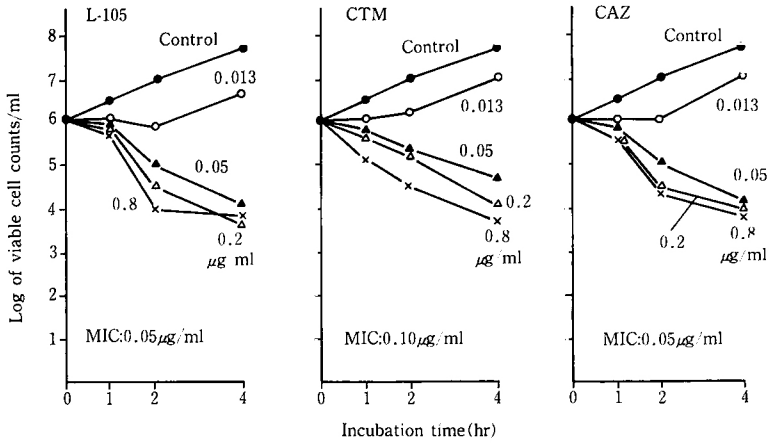


Fig. 23 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to L-105 for 3 hours

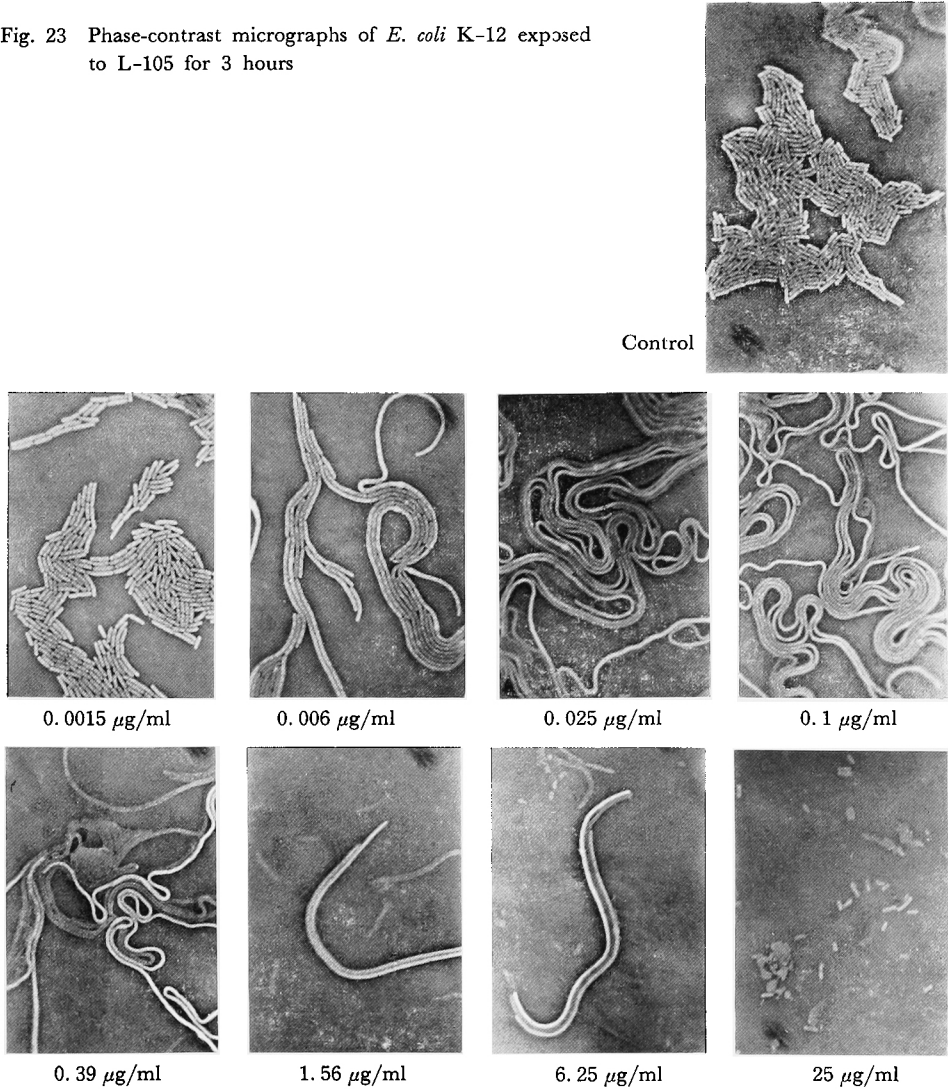


Fig. 24 Morphological effects of L-105 on *E. coli* K-12 after 3 hours exposure

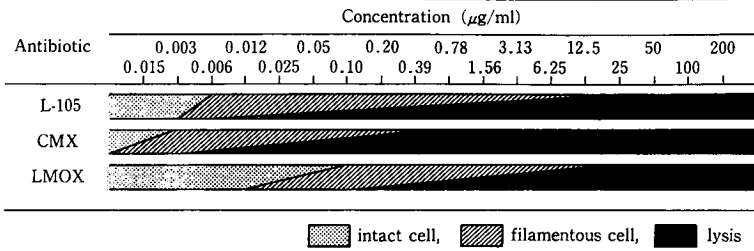


Fig. 25 Fluorography showing competition of L-105 for ^{14}C -labeled penicillin G binding in *S. aureus* 209-PJC

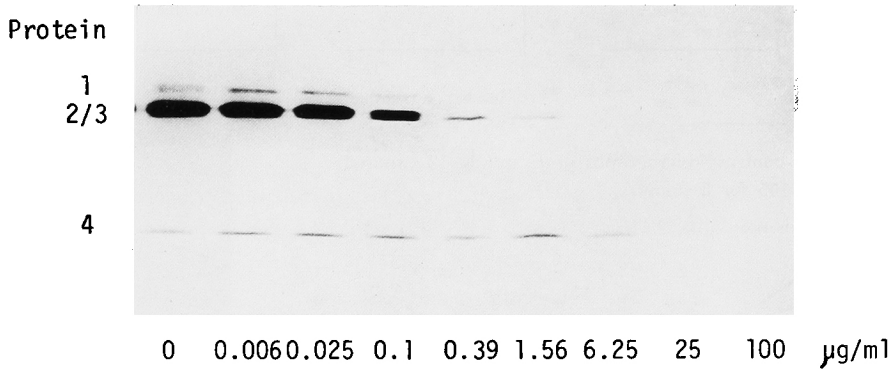
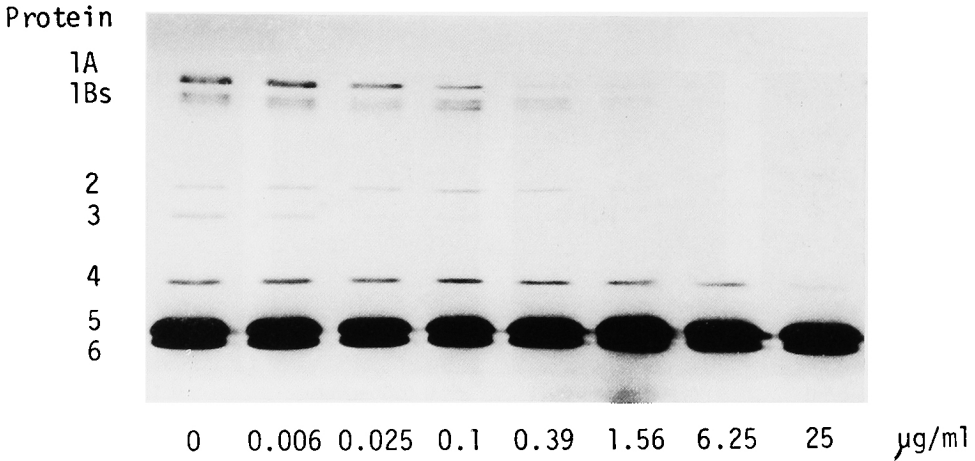


Fig. 26 Fluorography showing competition of L-105 for ^{14}C -labeled penicillin G binding in *E. coli* K-12



ED₅₀ 値は 0.080 mg/mouse であった。

8. マウス実験的呼吸器感染症に対する治療効果

K. pneumoniae DT-S による呼吸器感染症に対する L-105 の効果について検討した結果を Fig. 27 に示した。4 mg/mouse 投与群において L-105 は投与後漸次菌数の減少が認められたが、除菌効果は CAZ および CTM より劣っていた。また再増殖抑制効果も CAZ より劣り、投与24時間後には投与時の菌数レベルに達していた。ま

た 1 mg/mouse 投与群においては、いずれの薬物も菌数の減少は認められるものの、6 時間以後は再増殖が認められ、24 時間では 10⁷ cells/lung レベルに達していた。

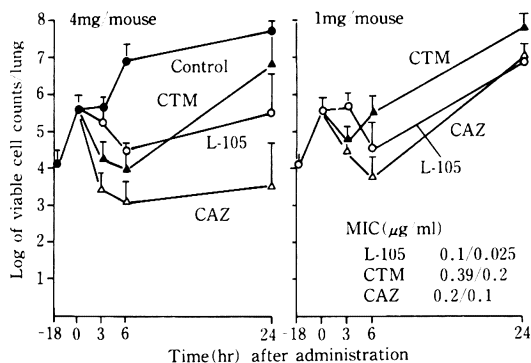
9. マウス実験的上行性尿路感染症に対する治療効果

E. coli 444 による尿路感染症に対する L-105 の治療効果について検討した結果を Fig. 28 に示した。L-105 の治療効果は CAZ とほぼ同等であり、CTM より優れていた。しかしながら腎内菌数は L-105, CAZ の 0.2

Table 9 Protective effect of L-105, CTM and CAZ on experimental infections in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotic	ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10 ⁵ 10 ⁶
<i>S. aureus</i> Smith	2.1 × 10 ⁷ (250 LD ₅₀)	L-105	0.072 (0.047 ~0.11)*	0.78 0.78
		CTM	0.011 (0.0070~0.018)	0.78 0.39
		CAZ	0.38 (0.28 ~0.52)	6.25 6.25
<i>S. pneumoniae</i> III	1.3 × 10 ³ (700 LD ₅₀)	L-105	0.70 (0.44 ~1.1)	0.013 0.013
		CTM	0.53 (0.34 ~0.82)	0.20 0.20
		CAZ	2.1 (1.3 ~3.4)	0.20 0.20
<i>E. coli</i> 444	1.8 × 10 ⁶ (70 LD ₅₀)	L-105	0.0024 (0.0010~0.0080)	0.05 0.025
		CTM	0.0076 (0.0030~0.010)	0.10 0.05
		CAZ	0.0030 (0.0010~0.0080)	0.20 0.20
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	2.5 × 10 ⁴ (1000 LD ₅₀)	L-105	0.047 (0.023 ~0.096)	0.10 0.05
		CTM	0.43 (0.27 ~0.68)	0.20 0.10
		CAZ	0.097 (0.063 ~0.15)	0.10 0.05
<i>S. marcescens</i> T-55	6.0 × 10 ⁶ (600 LD ₅₀)	L-105	0.080 (0.050 ~0.13)	0.78 0.78
		CTM	>4	100 25
		CAZ	0.085 (0.051 ~0.14)	0.39 0.20

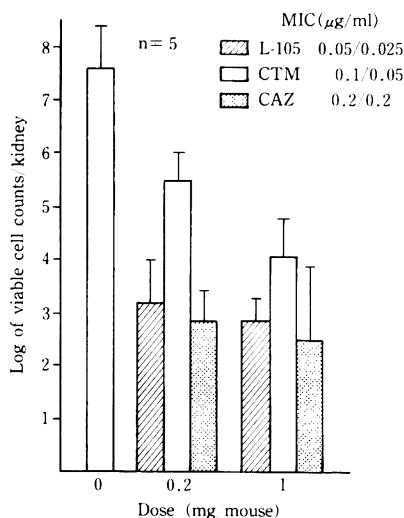
* 95% confidence limits

Fig. 27 Therapeutic efficacy of L-105, CTM, and CAZ on number of bacteria in the lung of mice infected with *K. pneumoniae* DT-S

mg および 1 mg 投与群ともほぼ同レベルであり、これらの投与量では薬剤濃度に応じた治療効果を得ることはできなかった。

Ⅲ. 考 察

L-105 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ラムを有し、その抗菌力は第三世代の cephem 系抗生物質に匹敵するものと思われるが、第三世代の cephem 系抗生物質が良好な抗菌力を示さない *S. aureus* に対しても優れた抗菌力を示したのが注目され

Fig. 28 Therapeutic efficacy of L-105, CTM, and CAZ on number of bacteria in the kidney of mice infected with *E. coli* 444

* Viable cell counts were measured at 24h after administration

る。

一般的に β -lactam 系抗生物質のグラム陰性菌に対する抗菌力は、(1) 細胞壁外膜の透過性、(2) β -lactamase に対する安定性、(3) PBP₃ に対する親和性、これら三つの因子により影響を受けることが知られている。

L-105 は β -lactamase に安定であり、また私どもが行った結果より *E. coli* の PBP 3 に良好な親和性を示す。このことが L-105 のグラム陰性菌に対する優れた抗菌力に反映されているものと考えられる。また β -lactam 系抗生物質のグラム陽性菌に対する抗菌力は、(1) β -lactamase に対する安定性、(2) PBPs に対する親和性、これら二つの因子により影響を受けるものと考えられる。*S. aureus* の PBPs としては 1, 2, 3, 4 の 4 種類存在することが知られており、このなかで PBPs 1, 4 はそれぞれの欠損変異株が正常に分裂増殖できることより^{11,12)}、 β -lactam 系抗生物質の標的部位としてはあまり意味がなく、PBPs 2 および 3 に対する親和性が抗菌力に反映されてくるものと考えられる。L-105 はここに結果を示していないが、latamoxef, ceftizoxime, cefmenoxime および ceftriaxone などの第三世代の cephem 系抗生物質よりも PBPs 2 および 3 に対して良好な親和性を示し、このことが L-105 の *S. aureus* に対する良好な抗菌力に反映されているものと思われる。しかし methicillin や cephem 耐性の *S. aureus* に対して L-105 はあまり良好な抗菌力を示さなかった。Methicillin 耐性の *S. aureus* では新たに PBP の 2' または 2a が誘導されてくる、あるいは PBP の 3 が過剰に産生されてくるものが報告されており^{13,14)}、この新しく誘導された PBPs に対する親和性の悪さが methicillin 耐性の一原因であると考えられており、L-105 もこのように新しく誘導された PBPs に対して良好な親和性を示さないのかもしれない。詳しい解析結果は今後の研究課題と思われる。

またマウス実験の腹腔内感染症あるいは局所感染症に対して L-105 は *in vitro* の抗菌力を反映して良好な治療効果を示した。このような L-105 の *in vitro* および *in vivo* における効果が臨床的にも反映されてくるものと予測される。

文 献

- 1) 第33回日本化学療法学会総会、新薬シンポジウム、L-105 抄録集、1985
- 2) 西野武志、岩日朋幸：新合成セフェロスポリン Cefotiam (SCE-963) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 27(S-3) : 45~66, 1977
- 3) 西野武志、尾花芳樹、平田収正、山村宜弘、大槻雅子、谷野輝雄：Ceftazidime (SN 401) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 31(S-3) : 80~101, 1983
- 4) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会：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. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Nat. Acad. Sci. 72 : 2999~3003, 1975
- 6) LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99~113, 1949
- 7) OBANA, Y. ; T. NISHINO & T. TANINO : Therapeutic efficacy of β -lactam and aminoglycoside antibiotics on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* B-54 in diabetic mice. J. Antibiotics 38 : 941~947, 1985
- 8) OBANA, Y. ; T. NISHINO & T. TANINO : *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Antimicrob. Chemother. 15 : 441~448, 1985
- 9) EAGLE, H. & A.D. MUSSELMAN : The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. J. Exp. Med. 86 : 99~131, 1948
- 10) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA : Bacteriological study on effects of beta-lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 1033~1042, 1976
- 11) CURTIS, N.A.C. & M.V. HAYES : A mutant of *Staphylococcus aureus* H deficient in penicillin-binding protein 1 is viable. FEMS Microbiol. Lett. 10 : 227~229, 1981
- 12) CURTIS, N.A.C. ; M.V. HAYES, A.W. WYKE & J.B. WARD : A mutant of *Staphylococcus aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity *in vitro*. FEMS Microbiol. Lett. 9 : 263~266, 1980
- 13) UBUKATA, K. ; N. YAMASHITA & M. KONNO : Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 27 : 851~857, 1985
- 14) ROSSI, L. ; E. TONIN, Y.R. CHENG & R. FONTANA : Regulation of penicillin-binding protein activity : Description of a methicillin-inducible penicillin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 27 : 828~831, 1985

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF L-105,
A NEW SEMISYNTHETIC CEPHEM ANTIBIOTIC

TAKESHI NISHINO, YOSHIKI OBANA, TOSHIMI GOTOH, MASAKO OHTSUKI, HIDEO KITAGAWA,
KAZUSHIGE TANAKA, RURIKO NAKA and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of L-105, a new parenteral cephem antibiotic, were compared with those of cefotiam (CTM) and ceftazidime (CAZ).

The following results were obtained. L-105 had a broad antibacterial spectrum against gram-positive and gram-negative standard organisms in our laboratory.

In the sensitivity distribution of clinical isolates, the antibacterial activity of L-105 against gram-positive bacteria was more potent than that of CTM and CAZ.

On the other hand, the antibacterial activity of L-105 against gram-negative bacteria except for *Proteus vulgaris* was almost equal or superior to that of CAZ.

L-105 showed dose-related bactericidal activity against all the bacteria tested.

The antibacterial activity of L-105 was not affected by the addition of horse serum, but was influenced by the inoculum size and the pH of the medium. The antibacterial activity of L-105, that is, was enhanced in alkaline medium.

Morphological observation with phase-contrast microscope revealed *Escherichia coli* K-12 becoming filamentous by L-105 at the wide range of concentrations of 0.006~0.78 $\mu\text{g/ml}$. The affinity of L-105 to penicillin-binding proteins (PBPs) of *E. coli* was 3 at best followed by 1A, than, 1Bs. On the other hand, in *Staphylococcus aureus* the affinity of L-105 to PBPs was in the order of PBP 2, 1, 3.

For experimental intraperitoneal infections caused by *S. aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in mice, the therapeutic efficacy of L-105 was superior to that of CAZ and inferior to that of CTM. Against *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* infections, the therapeutic efficacy of L-105 was greater than that of CTM and similar to or a little greater than that of CAZ.

In experimental local infections in mice, the therapeutic efficacy of L-105 against pulmonary infection caused by *K. pneumoniae* was inferior to that of CAZ and superior to that of CTM. Moreover, the therapeutic efficacy of L-105 against experimental urinary tract infection caused by *E. coli* was superior to that of CTM and almost equal to that of CAZ.