

Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の *in vitro* 抗菌作用

亀田康雄・永田 弘・元川清司・深尾 孝

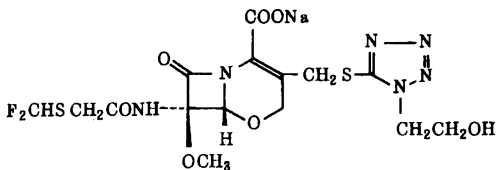
中本省三・渡辺芳浩・吉田 正

塩野義製薬株式会社研究所

Oxacephem 系で新しく合成された注射用抗生物質 6315-S (Flomoxef) の抗菌作用の評価を行なった。6315-S は好気性・嫌気性を通じて、グラム陽性および陰性菌に広範囲の抗菌スペクトルを示した。1012 株の臨床分離菌株に対する抗菌力を Cefazolin (CEZ), Cefotiam (CTM), Cefmetazole (CMZ), Cefotaxime (CTX), Latamoxef (LMOX) を対照薬剤として比較した。

グラム陽性菌は、*E. faecalis* に無効であったが *S. aureus*, *S. pneumoniae* などに第三世代 cephalosporin より遙かに強く、CEZ と同等の強い抗菌力を示した。とくにメチシリン・セファゾリン耐性の *S. aureus* に対しては、現在繁用されている cephalosporin, penicillin のどれよりも強い抗菌力を示した。グラム陰性菌では、*B. catarrhalis*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* 群, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *H. influenzae* に MIC < 1  $\mu$ g/ml を示し、ブドウ糖非発酵菌を除く大部分の菌種において、LMOX と同等の抗菌力を示し CTM, CMZ に比べて強かった。嫌気性菌では *B. fragilis* に LMOX と同等で、*C. difficile* にも抗菌力を有する。多くの菌種について培地種、pH, 接種菌量、血清添加が MIC 値に与える影響は少なく、作用は殺菌的であった。

6315-S (Flomoxef sodium : FMOX) は、Latamoxef (LMOX) と同じ骨格をもつ oxacephem 系の注射用抗生物質で、塩野義製薬研究所で創製された<sup>1)</sup>。化学名は、(6R, 7R)-7-[2-(difluoromethylthio)acetamido]-7-methoxy-3-[1-(2-hydroxyethyl)-1H-tetrazol-5-yl]thiomethyl]-8-oxo-5-oxa-1-azabicyclo [4. 2. 0] oct-2-ene-2-carboxylic acid sodium salt である。



Oxacephem 誘導体に対応する cephalosporin 誘導体よりもグラム陽性菌に 2~4 倍、グラム陰性菌に 4~16 倍強い抗菌活性を有することが知られている<sup>2)</sup>。本薬はこの性質を生かし、LMOX をはじめ、いわゆる第三世代に属する cephalosporin 類の通性として、*Staphylococcus aureus* に抗菌力が弱い欠点<sup>3)</sup>を改良して、第一世代と同等の強い活性をもつように化学修飾して完成されたものである。その結果メチシリンやセファゾリンに耐性の *S. aureus* の大部分に抗菌活性を

有し、しかも、腸内細菌群にも強い抗菌力を発揮する特性が賦与された<sup>4)</sup>。また、本薬のもう一つの特性は、化学構造中 3 位側鎖を N-methyltetrazolethio 基から hydroxyethyltetrazolethio 基に換えることによって、LMOX で認められた disulfiram 様作用をなくしたことである<sup>5)</sup>。本報は、本薬の試験管内抗菌作用を検討し、他の既存  $\beta$ -lactam 系抗生剤との比較を行なったものである。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

6315-S は、塩野義製薬研究所で合成された標準品を用いた。そのほか対照薬剤として Latamoxef (LMOX), Cefotaxime (CTX), Cefotiam (CTM), Cefmetazole (CMZ), Cefazolin (CEZ), Cephaloridine (CER), Cefamandole (CMD), Cefoxitin (CFX), Cefoperazone (CPZ), Benzylpenicillin (PCG), Ampicillin (ABPC), Amoxicillin (AMPC), Piperacillin (PIPC), Methicillin (DMPPC), Cloxacillin (MCIPC), Vancomycin (VCM) は市販品を力価濃度で使用した。

## 2. 試験菌株

標準菌株は、塩野義製薬研究所保存株を使用した。臨床材料由来の菌株は、主として 1979 年 1 月から 1983 年

10月までに分離同定されたものを用いた。

### 3. 抗菌力測定法

日本化学療法学会により定められた最小発育阻止濃度測定法<sup>6,7)</sup>にしたがってMICを測定した。

増菌用培地には, trypto-soy broth (TSB, 栄研)を用いたが, streptococciにはこれに非働化馬血清(東洋血清)を, *Haemophilus influenzae*には Bacto-Fildes enrichment (Difco) また, *Branhamella catarrhalis* は Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) に非働化馬血清をそれぞれ5%濃度に添加した。また, 臨床分離 *S. aureus* は MHB を, 嫌気性菌には GAM broth (日水) を使用した。感受性測定用培地は sensitivity test agar (STA, 日水) を使用したが, Streptococci と *B. catarrhalis* には非働化馬血清を, *H. influenzae* には Bacto-Fildes enrichment をそれぞれ5%に添加した。また, *S. aureus* には Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) を, 嫌気性菌には GAM agar (日水) を使用した。接種菌液は増菌用培地で37°C, 18~20時間培養した菌液を, 好気性菌はグラム陽性菌と *H. influenzae* を  $10^8$  cfu/ml, グラム陰性菌を  $10^9$  cfu/ml として, また嫌気性菌は *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula* を  $10^8$  cfu/ml, その他の嫌気性菌を  $10^9$  cfu/ml として, それぞれ増菌用培地で  $10^6$  cfu/ml になるように調製した。菌液の接種は, 接種装置を用いて一白金耳(約1  $\mu$ l) 点滴塗抹し, 37°Cで20~22時間培養後MIC値を測定した。なお, 嫌気性菌の希釈と接種は好気的条件下で行なうため, 30分以内に処理し直ちに嫌気培養装置(テーハー式 アネロボックス, 平澤製作所)で37°C 24時間培養しMIC値を測定した。ただし, 発育の遅い *Bacteroides melaninogenicus* については48時間培養した。

### 4. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

7株の標準株を用いて, 抗菌力に及ぼす各種因子の影響を寒天平板希釈法により検討した。試験培地には STA (日水), MHA (栄研), heart infusion agar (HIA, 栄研), trypto-soy agar (TSA, 栄研) を使用した。培地 pH は, 滅菌後の STA 培地に 1N HCl および 1N NaOH を加えて 5.5, 7.0, 8.5 にそれぞれ修正した。接種菌量の影響は,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  および  $10^5$  cfu/ml の菌液を一白金耳接種した。馬血清は 56°C, 30分非働化して, STA 培地に 50%濃度に添加した。

### 5. 殺菌作用の測定

1) 生菌数変化: 37°Cで一晩培養した菌を, MHB でグラム陽性菌は20倍に陰性菌は50倍に希釈し, さらに1.5時間静置培養して対数増殖期の菌液を調製した。こ

の菌液を37°Cに温めた新鮮MHBで適宜希釈して, 所定の菌数を得るようにした。なお, *Streptococcus pyogenes* の培養には馬血清を5%濃度に添加した。試験薬の2倍希釈系列は最終濃度の10倍濃度に調製し, その1容を培養菌液9容に加えて37°Cで静置培養した。生菌数の測定は経時的にその一部を採取し, 通常の混釈法により行った。

2) 最小殺菌濃度(MBC値): Microtiter用U-plate(96 wells, Cooke)中で, TSBを用いて薬剤の2倍希釈系列(50  $\mu$ l)を作製する。所定の初菌数を含む対数増殖期の菌液を各wellに50  $\mu$ l添加し, 充分混和したのち37°Cで培養する。培養中のU-plateは, 各wellから定量的に約0.5  $\mu$ l採取できるように工夫した装置を用いて, 6時間および24時間後に培養液の一部を採取し, nutrient agar (NA, 日水)の寒天濃度を2%に調製した平板上に点滴塗抹した。移植後平板は37°Cで20時間培養し, 接種位置に発育してきた集落数が1個以下になる最低濃度をMBC値として判定した。また, U-plateからは24時間培養のMIC値を求めた。

3) Biophotometerによる増殖阻止曲線: 初菌数が  $10^6$  cfu/ml になるようにTSBで調製した菌液を, BIO-LOG II (Jouan-Quetin)で37°C振とう培養し, 濁度がT%80になった時点で2倍希釈系列の薬剤を加え, その後の濁度変化を調べた。

4) MS-2による増殖阻止曲線: 初菌数  $10^7$  cfu/ml になるようにTSBで調製した菌液をキューベットに1ml加え, 薬剤の連続2倍希釈液を添加し, MS-2 (Abbott)で37°C培養する。

### 6. 位相差顕微鏡による作用菌の形態観察

試験薬の2倍希釈系列を含む sensitivity disk agar (SDA, 日水) 平板を, *S. pyogenes* にはこれに馬血清を5%濃度に添加した平板を準備し, 対数増殖期の菌液 ( $10^7$  cfu/ml) 一白金耳を点滴塗抹する。塗抹部に cover glass をのせて37°Cで培養し, *S. pyogenes* と *Escherichia coli* は2時間後, *Klebsiella pneumoniae* は3時間後に位相差顕微鏡(日本光学, 倍率 $\times$ 1,000)で作用菌の形態を観察した。

### 7. 試験管内耐性獲得試験

試験管内耐性獲得については, 標準株の *S. aureus* 209P JC-1 と *E. coli* NIHJ JC-2 を用いて, 6315-S, CEZ, CMZ をそれぞれ単独に所要濃度を含む sensitivity test broth (STB, 日水) で, 継代法によって比較検討した。

### 8. 殺菌作用と作用中の残存力価測定

Biophotometer (BIO-LOG II) を用いて, 培地 pH

Table 1 Antibacterial spectrum of 6315-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics against Gram-positive bacteria by agar dilution method

Organism	Strain	M I C ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		6315-S	LMOX	CTX	CTM	CMZ	CEZ	PIPC	AMPC
<i>S. aureus</i>	209P JC-1	0.2	6.25	1.56	0.39	0.78	0.2	0.39	0.2
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	0.2	3.13	0.78	0.39	0.78	0.2	0.39	0.2
<i>S. aureus</i>	Smith	0.39	6.25	3.13	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78
<i>S. aureus</i>	*C-14	0.39	6.25	1.56	0.78	1.56	0.39	6.25	3.13
<i>S. aureus</i>	**3131M	1.56	25	25	6.25	6.25	12.5	>100	100
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	0.39	6.25	0.39	0.39	1.56	0.2	0.2	0.1
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 10389	0.39	1.56	0.025	0.1	0.78	0.1	0.05	0.025
<i>S. pyogenes</i>	C203	0.39	1.56	$\leq 0.013$	0.1	0.78	0.1	0.05	0.025
<i>S. pneumoniae</i>	Type I	0.1	0.78	0.025	0.2	0.39	0.1	0.025	0.025
<i>S. pneumoniae</i>	Type II	0.2	1.56	0.025	0.2	0.78	0.2	0.05	0.05
<i>S. pneumoniae</i>	Type III	0.2	1.56	0.025	0.2	0.78	0.2	0.05	0.05
<i>E. faecalis</i>		100	>100	>100	>100	>100	50	6.25	1.56
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	0.39	3.13	0.78	0.39	0.78	0.39	0.2	0.05
<i>B. cereus</i>	IFO 3001	1.56	12.5	6.25	25	6.25	3.13	0.78	1.56
<i>B. anthracis</i>		0.39	6.25	12.5	3.13	3.13	0.39	0.78	0.025
<i>M. luteus</i>	ATCC 9341	0.1	1.56	0.1	0.78	0.39	0.78	0.1	$\leq 0.013$
<i>C. diphtheriae</i>	Toront	0.1	0.39	0.1	0.1	0.2	0.1	0.78	0.025

\* Penicillin-resistant strain

\*\* Methicillin-resistant strain

を6.0に修正したTSBで*S. aureus* 1621の培養を始める。薬剤の連続2倍希釈液は終濃度の10倍濃度に調製し、濁度がT%80になった時、培養液9容に薬剤液1容を加え、濁度変化を自動的に記録した。また、0, 1, 2, 3, 4, 5および6時間後に培養液の一部を採取し、培地中の生菌数と薬剤濃度を測定した。残存力価は採取した培養液に等量のアセトンを加え殺菌したのち、TSAを1/2濃度にした検定培地で、*E. coli* 7437を検定菌としたband culture法<sup>8)</sup>で測定した。

## II. 実験成績

### 1. 抗菌スペクトル

好気性グラム陽性菌17株、グラム陰性菌40株に対する抗菌力をLMOX, CTX, CTM, CMZ, CEZ, PIPC, AMPCと比較してTable 1, 2に示した。また偏性嫌気性菌に対する抗菌力をLMOX, CMZ, CEZと比較してTable 3に示した。

6315-Sはグラム陽性菌に対して抗菌力が強く、*Enterococcus faecalis*を除く多くの菌種で0.1~0.39  $\mu\text{g/ml}$ のMICを示した。対照薬のAMPC, PIPCに比べてやや劣るが、その他のcephem系に比べると同程度かそれ以上の強い抗菌力を示した。特に注目されるのは、メチシリン耐性*S. aureus*として知られる

*S. aureus* 3131 Mに対して他剤よりも強い抗菌力を示したことである(Table 1)。

グラム陰性菌に対しても強い抗菌力が認められ、多くの腸内細菌群の菌種に対して0.05~0.78  $\mu\text{g/ml}$ のMICを示しLMOX, CTMと同等であった(Table 2)。

しかし、*Enterobacter* sp. やブドウ糖非発酵菌には抗菌力が弱くなる傾向を示し、*Pseudomonas aeruginosa*に無効であるなど、グラム陰性菌に対する抗菌域はLMOXやCTXより狭い。さらに、6315-Sは偏性嫌気性菌に広範囲の抗菌域を有し、試験した被検菌に0.05~6.25  $\mu\text{g/ml}$ でMICが得られ、3種の対照薬に比べて明らかに強い抗菌力をもっていた(Table 3)。

### 2. 臨床分離株の感受性分布と交差感受性

臨床由来の分離株1012株のMIC測定を行ない分布および交差感受性相関(Fig. 1~40)を調べた。試験菌は偏性嫌気性菌2種50株、グラム陽性菌12種485株、グラム陰性球菌1種43株、グラム陰性菌20種434株を使用した。

#### 1) *S. aureus* 264株 (Fig. 1, 2)

最近の臨床材料より分離される*S. aureus*には、penicillin剤のみでなくcephem剤にも耐性を示す株が多く検出されるようになった。今回検討した264株中には、CEZに0.78  $\mu\text{g/ml}$ 以下のMICを示すCEZ感

Table 2 Antibacterial spectrum of 6315-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics against Gram-negative bacteria by agar dilution method

Organism	Strain	M I C ( $\mu$ g/ml)							
		6315-S	LMOX	CTX	CTM	CMZ	CEZ	PIPC	AMPC
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.1	0.2	1.56	1.56	3.13	12.5
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0.1	0.2	0.1	0.2	0.78	1.56	3.13	12.5
<i>E. coli</i>	EC-14	0.05	0.1	0.05	0.2	0.78	1.56	0.78	3.13
<i>E. coli</i>	*377	0.2	0.1	0.39	0.39	3.13	6.25	3.13	100
<i>E. coli</i>	**73	0.1	0.39	0.2	0.78	1.56	25	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i>	SRL-1	0.05	0.1	0.025	0.2	0.78	1.56	0.78	0.78
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	0.1	0.2	0.1	0.39	1.56	1.56	6.25	100
<i>Klebsiella</i> sp.	**363	0.05	0.1	0.39	12.5	0.39	>100	>100	>100
<i>K. oxytoca</i>	ATCC 13182	0.05	0.1	0.05	0.2	0.39	3.13	3.13	50
<i>K. pneum. ozaenae</i>		0.05	0.1	0.025	0.2	0.39	1.56	1.56	100
<i>S. dysenteriae</i>		0.1	0.2	$\leq$ 0.013	0.2	0.78	1.56	0.78	3.13
<i>S. flexneri</i>	Var Y	0.1	0.1	0.025	0.1	0.78	1.56	0.78	3.13
<i>S. sonnei</i>	ATCC 11060	0.39	0.39	0.2	0.78	3.13	3.13	3.13	12.5
<i>S. typhi</i>		0.05	0.1	0.025	0.1	0.39	1.56	0.2	0.39
<i>S. paratyphi</i> A		0.1	0.1	0.025	0.2	0.39	3.13	0.78	1.56
<i>S. schottmuelleri</i>	NCTC 0925	0.05	0.1	$\leq$ 0.013	0.1	0.39	1.56	0.2	1.56
<i>P. mirabilis</i>	PR-4	0.2	0.1	0.025	0.39	1.56	3.13	0.39	0.78
<i>P. mirabilis</i>	IFO 3849	0.2	0.2	0.05	0.78	3.13	12.5	0.78	1.56
<i>M. morgani</i>	IFO 3848	0.39	0.1	$\leq$ 0.013	0.2	1.56	25	$\leq$ 0.013	3.13
<i>M. morgani</i>	*MOR-9	0.78	0.2	0.05	0.78	6.25	>100	0.78	>100
<i>P. vulgaris</i>	CN-329	0.39	0.2	0.025	0.78	1.56	50	0.39	>100
<i>P. vulgaris</i>	*V-3	0.78	0.39	6.25	>100	6.25	>100	6.25	>100
<i>P. rettgeri</i>	IFO 3850	0.1	0.05	$\leq$ 0.013	0.05	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>Providencia</i> sp.	IFO 12930	0.1	0.05	$\leq$ 0.013	0.025	0.39	0.78	0.025	0.78
<i>C. freundii</i>	IFO 12681	0.39	0.1	0.39	1.56	1.56	25	6.25	50
<i>E. cloacae</i>	NCTC 9394	0.78	0.1	0.2	0.78	100	100	1.56	100
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	50	3.13	3.13	>100	>100	>100	6.25	>100
<i>E. cloacae</i>	233	12.5	0.1	0.2	3.13	>100	>100	1.56	>100
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	3.13	0.2	0.2	1.56	>100	100	6.25	>100
<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880	0.78	0.2	0.2	6.25	6.25	>100	1.56	50
<i>H. alvei</i>	H-1	0.1	0.1	0.2	0.39	1.56	100	0.39	50
<i>Ed. tarda</i>	ATCC 15947	0.025	0.05	$\leq$ 0.013	0.025	0.2	0.39	0.1	0.39
<i>Y. enterocolitica</i>	Knapp-1	0.2	0.2	0.05	0.78	1.56	25	1.56	100
<i>A. faecalis</i>	NCTC 655	0.1	0.1	1.56	6.25	-1.56	25	1.56	25
<i>A. calcoaceticus</i>	NCTC 7844	>100	50	50	>100	>100	>100	50	>100
<i>F. meningosepticum</i>	NCTC 0925	25	50	25	>100	25	>100	6.25	>100
<i>P. cepacia</i>	ATCC 15416	25	25	12.5	>100	25	>100	12.5	>100
<i>X. maltophilia</i>	TB-127	50	3.13	50	>100	>100	>100	25	>100
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 25619	>100	6.25	1.56	>100	>100	>100	0.78	>100
<i>P. aeruginosa</i>	D	>100	25	50	>100	>100	>100	12.5	>100

\* Cephalosporinase-producing strain

\*\* Penicillinase-producing strain

受性菌が57%だったが、耐性度の高い株が幅広く分布し25  $\mu$ g/ml以上の耐性菌が25%も含まれていた。6315-SのMIC値は0.39と1.56  $\mu$ g/mlにピークが認められ、3.13  $\mu$ g/ml以下で95%の菌株が感受性を示した (Fig. 1)。

3.13  $\mu$ g/ml以下のMICを示す菌の頻度は6315-

Sの95%に対して、他剤では低くCEZ, CTMが61%, CMZが64%, CTXが58%にすぎない。6315-Sは、ほとんど全ての分離株について、他剤よりも強い抗菌力をもっていた。とくに、他薬剤に耐性傾向の強い菌株にも、6315-Sは低濃度で抗菌力を示した点、他剤より優れていることが感受性相関図から明らかである (Fig. 2)。

Table 3 Antibacterial spectrum of 6315-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics against anaerobic bacteria by agar dilution method

Organism	Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		6315-S	LMOX	CMZ	CEZ
<i>P. asaccharolyticus</i>	WAL 3218	0.2	0.39	0.2	0.39
<i>P. anaerobius</i>	B-38	0.78	6.25	1.56	0.78
<i>E. lentum</i>	H-1	6.25	100	12.5	25
<i>E. limosum</i>	ATCC 8486	0.78	12.5	0.39	6.25
<i>P. acnes</i>	ATCC 11827	0.2	3.13	0.39	0.39
<i>V. parvula</i>	10790	0.05	1.56	0.1	0.1
<i>B. fragilis</i>	GM 7000	0.39	0.78	6.25	6.25
<i>B. fragilis</i>	ATCC 25285	0.39	0.39	6.25	25
<i>B. thetaiotaomicron</i>	WAL 3304	6.25	6.25	50	25
<i>B. vulgatus</i>	ATCC 29327	0.78	0.39	3.13	1.56
<i>B. distasonis</i>	Ju-11-1	3.13	1.56	25	>100
<i>B. ovatus</i>	2505	3.13	6.25	50	>100
<i>F. varium</i>	ATCC 8501	1.56	6.25	25	6.25
<i>F. necrophorum</i>	S-45	0.05	0.2	-	-
<i>F. nucleatum</i>	K-3	0.05	0.78	0.05	0.025
<i>F. mortiferum</i>	F-1-9	0.78	3.13	1.56	0.78
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13123	$\leq 0.006$	0.05	0.05	0.025
<i>C. perfringens</i>	Sakai	0.78	0.1	-	-
<i>C. difficile</i>	ATCC 17859	6.25	>100	12.5	12.5

2) Coagulase-negative Staphylococci 80 株 (Fig. 3~8)

Coagulase-negative Staphylococci に含まれる 4 菌種 80 株についてまとめると、6315-S の MIC は 0.39 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$  に広く分布するが、最頻値は 0.78  $\mu\text{g/ml}$  と 3.13  $\mu\text{g/ml}$  に認められ、被検菌の 90% 以上が 0.39 ~ 3.13  $\mu\text{g/ml}$  の範囲に分布した (Fig. 3)。これは *S. aureus* でみられたと同様の強い抗菌力であり、CEZ, CTM とほぼ同程度、CTX, CMZ より 2~4 倍強く LMOX より遙かに強い活性である。4 菌種の中では *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis* に 6315-S は他剤より強い抗菌力を示した (Fig. 7, 8)。*Staphylococcus epidermidis* と *Staphylococcus haemolyticus* には CEZ>6315-S=CTM, CMZ, CTX の順位であった (Fig. 5, 6)。

3) Streptococci 109 株 (Fig. 9~15)

Streptococci 5 菌種 *S. pyogenes* 22 株, *Streptococcus pneumoniae* 24 株, *Streptococcus agalactiae* 28 株, *Streptococcus sanguis* 19 株および *Streptococcus mitis* 16 株の 109 株について調べた。

*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* では、6315-S の MIC 値は全株が 0.1~0.78  $\mu\text{g/ml}$  に認められた (Fig. 11, 12, 13)。*S. sanguis*, *S. mitis* の一部で 6315-S に MIC  $\geq 12.5$   $\mu\text{g/ml}$  の耐性を示す株がみられたが、これらは CTX を除く他剤に対しても交差耐性を示した。*Streptococcus* 群に対する抗菌力は CTX が最も強い。6315-S の抗菌力は *S. pyogenes* で CTM に、*S. agalactiae* で CEZ にやや劣ったが、その他の組合せについては同等かまたは強かった。

4) その他のグラム陽性菌

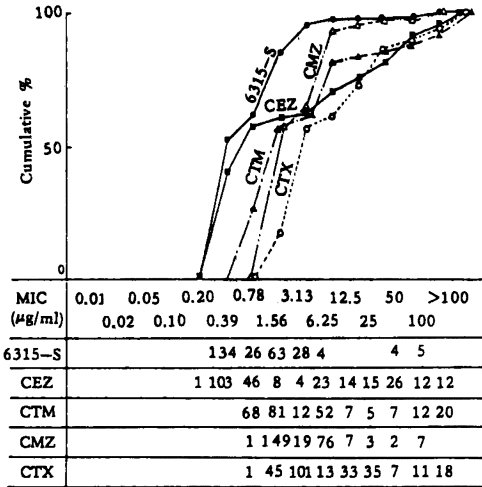
6315-S は、*E. faecalis* 20 株には他剤と同様に無効であった (Fig. 16)。

また、*Corynebacterium* sp. 12 株では 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以下の MIC を示し CTX と同等で、他剤より強い抗菌力を示した (Fig. 17)。

5) Enterobacteriaceae 326 株 (Fig. 18~29)

6315-S は *E. coli* (Fig. 18), *Klebsiella* 属 (Fig. 19), *Klebsiella oxytoca* (Fig. 20), *Proteus mirabilis* (Fig. 21) に対して、著しく強い抗菌力を示した。すなわち、*E. coli* 30 株に対する MIC 値は、0.05~0.2

Fig. 1 Susceptibility distribution of clinical isolates *Staphylococcus aureus*, 264 strains



μg/ml と分布幅が狭く被検薬中最も強い活性を示した。 *Klebsiella* 属 30 株に対しては 0.05~1.56 μg/ml に分布するが、被検菌の 29/30 株 (97%) が 0.05~0.39 μg/ml に分布した。 *K. oxytoca* 12 株では MIC 値は 0.05~0.1 μg/ml に集まった。このような強い抗菌力は *P. mirabilis* に対しても認められ、分布幅も 0.2~0.39 μg/ml と狭く一峰性を示した。これら菌種に対する 6315-S の抗菌力を対照薬とで比較すると、 *P. mirabilis* において CTX の MIC より 8 倍程度高いが、他菌種に対しては CTX や LMOX と有意差なく同等の強さを示し、CTM, CMZ, CEZ よりそれぞれ 2, 8, 16 倍強いものであった。

6315-S は *Proteus vulgaris* 30 株 (Fig.22), *Morganella morganii* 20 株 (Fig.23), *Providencia rettgeri* 29 株 (Fig.24), *Providencia* 属 29 株 (Fig.25) のいわゆるインドール陽性の *Proteus* 類に対しても強い抗菌力を示し、被検菌の 90% を阻害する MIC<sub>90</sub> はそれぞれ 1.56 μg/ml, 3.13 μg/ml, 1.56 μg/ml, 0.39 μg/ml で認められた。これ等菌種に対する抗菌力は LMOX が最も強く、ついで CTX, 6315-S の順になり、6315-S は CTM, CMZ, CEZ より明らかに優れていた。

*Enterobacter cloacae* 30 株 (Fig.26), *Enterobacter aerogenes* 28 株 (Fig.27), *Serratia marcescens* 29 株 (Fig.28), *Citrobacter freundii* 29 株 (Fig.29) に

Fig. 2 Correlations of MICs of 6315-S versus either of CEZ, CTM or CTX against 264 strains of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

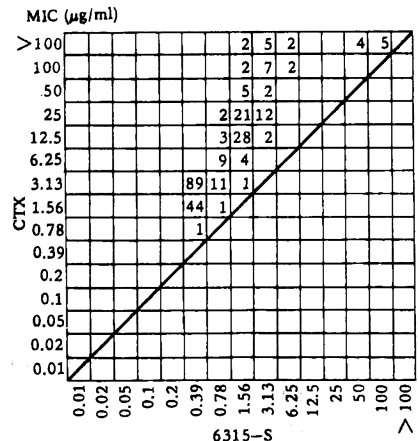
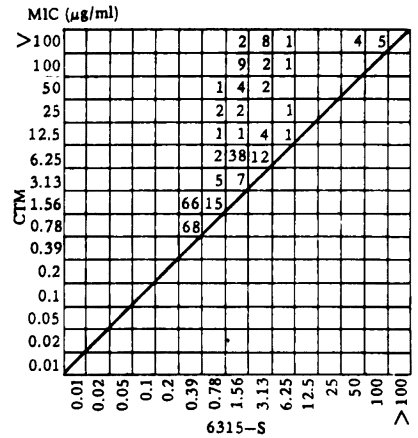
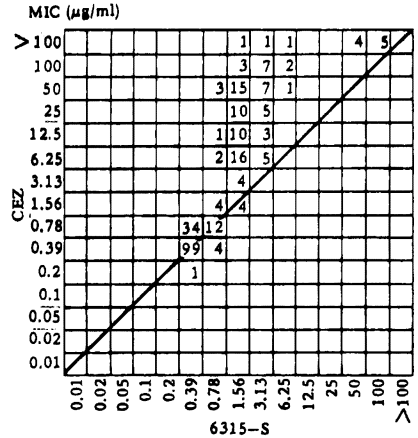


Fig. 3 Susceptibility distribution of clinical isolates (combined Fig. 5, 6, 7 and 8) Coagulase negative *Staphylococci*, 80 strains

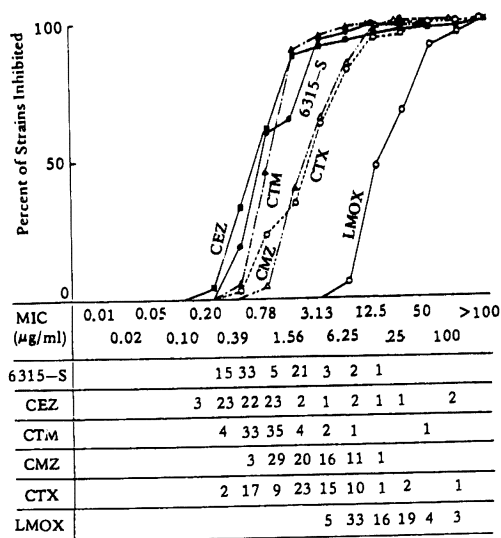
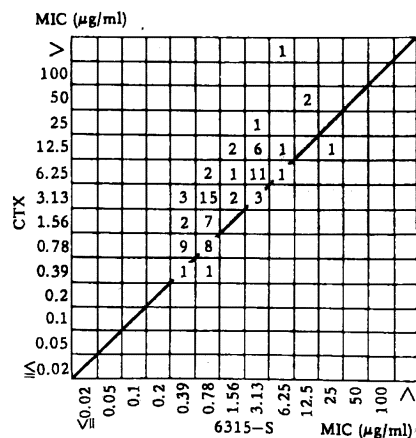
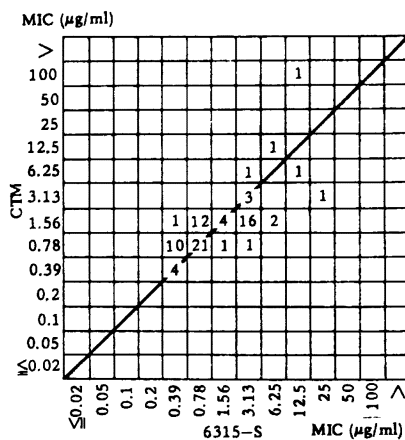
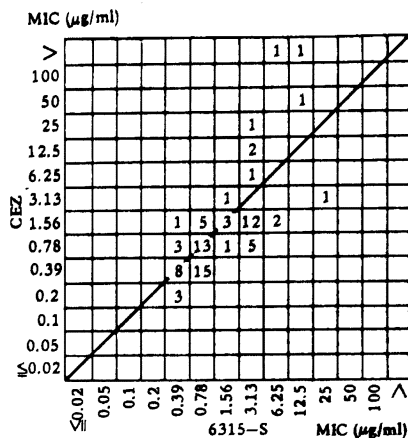


Fig. 4 Correlations of MICs of 6315-S versus either of CEZ, CTM or CTX against 80 strains of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci (*S. epidermidis* (41), *S. haemolyticus* (19), *S. warneri* (13), *S. hominis* (7))



対する 6315-S の MIC 値は、0.05~>100  $\mu\text{g/ml}$  の広い範囲に分布しピーク値も不明確である。被検菌の 50% を阻害する MIC<sub>50</sub>は、それぞれ 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 3.13  $\mu\text{g/ml}$  で得られ抗菌力は弱い。これら菌種に対する抗菌力の弱さは対照薬でも同様に認められるが、LMOX と CTX が比較的強く 6315-S と CTM がこれに次ぎ、CMZ と CEZ は明らかに劣った。

#### 6) *Pseudomonas* sp. (Fig.30~32)

6315-S は *Pseudomonas cepacia* 8 株 (Fig.30) に 25~50  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示したほか、*Xanthomonas maltophilia* 15 株 (Fig.31), *P. aeruginosa* 18 株 (Fig.32), に対してほとんどの株が無効であった。*P. cepacia* には CTX が強く、*X. maltophilia* には LMOX が強いことが注目される。

#### 7) その他のグラム陰性菌 (Fig.33~38)

6315-S は陰性球菌の *B. catarrhalis* 43 株 (Fig.33) に対して MIC は 0.01~0.39  $\mu\text{g/ml}$  に分布し、LMOX に劣ったが他剤に比べて強い抗菌力を示した。陰性桿菌の *H. influenzae* 29 株 (Fig.34), *Moraxella* sp. 12 株 (Fig.35), *Alcaligenes* sp. 9 株 (Fig.36) に対して 6315-S は著しく強い抗菌力を示し、最頻値はそれぞれ 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$  で認められた。*H. influenzae* に対する 6315-S の





Fig. 9 Susceptibility distribution of clinical isolates (combined Fig.11, 12, 13, 14 and 15) Streptococci, 109 strains

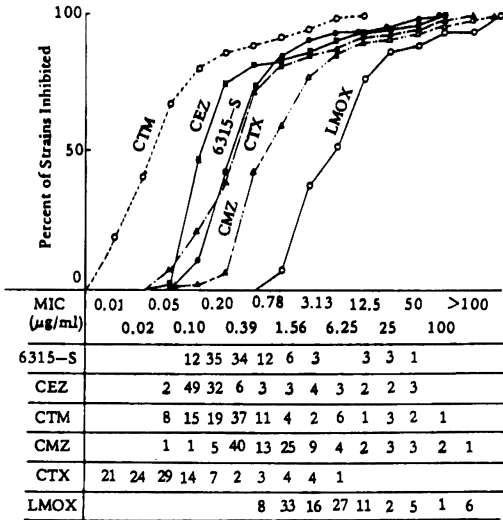
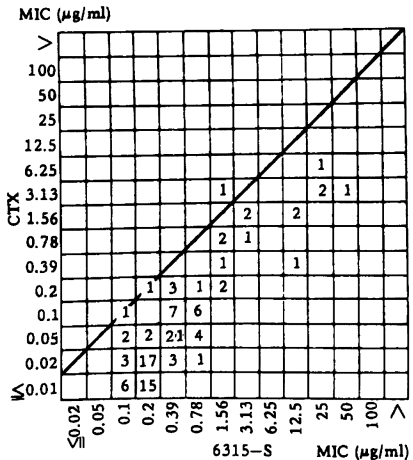
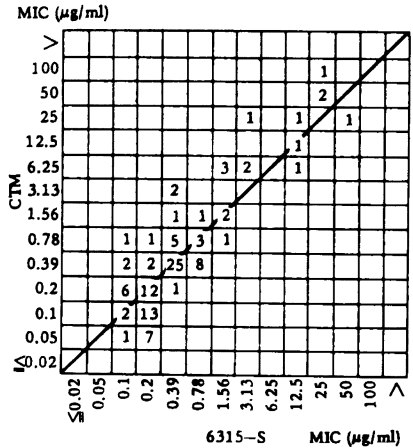
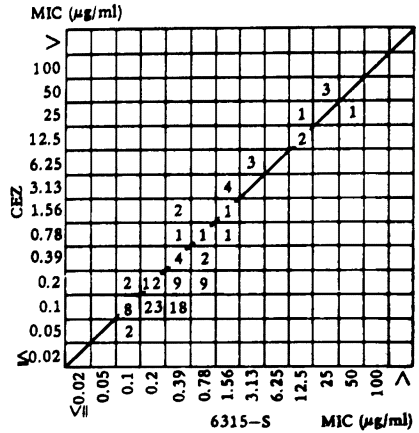


Fig.10 Correlation of MICs of 6315-S versus either of CEZ, CTM, or CTX against 109 strains of clinical isolates of streptococci (*S. pyogenes* (22), *S. pneumoniae* (24), *S. agalactiae* (28), *S. sanguis* (19), *S. mitis* (16))



抗菌力は CTX, LMOX に劣るもの他剤より強く, *Alcaligenes* sp. に対しては LMOX と同程度であり, 他剤より明らかに強い抗菌力を示した。しかし, *Flavobacterium* sp. 8 株 (Fig.37) や *Acinetobacter calcoaceticus* 9 株 (Fig.38) には対照薬と同様に 6315-S の抗菌力は弱い。

8) 偏性嫌気性菌 (Fig.39, 40)

嫌気性菌については, *Bacteroides fragilis* 30 株 (Fig.39) と *Clostridium difficile* 20 株 (Fig.40) で 6315-S の抗菌力を調べた。*B. fragilis* に対する 6315-S の MIC 値は 0.39~6.25 μg/ml に分布し, 0.78 μg/ml をピークとする一峰性分布を示した。他剤との比較では LMOX よりやや強く, 3.13 μg/ml と 50 μg/ml との二峰性に分布する CTX より 4~32 倍強い抗菌力が認められた。6315-S は *C. difficile* に対しても抗菌力は強く, MIC は 3.13~12.5 μg/ml に分布した。対照薬の LMOX や CTX は本菌種に対して抗菌力が弱く, 6315-S の MIC は対照薬に比べて 1/16 も低く優れた抗菌活性を示した。

以上の感受性分布の成績から, 菌種別に 6315-S の MIC 幾何平均値を求め Fig.41 に示した。6315-S は *E. faecalis*, *Pseudomonas* sp. に無効, *Enterobacter* sp., *S. marcescens*, *C. freundii* の各菌種に抗菌力は弱い, その他の好気性グラム陽性菌, 陰性菌に対して, 対照薬ではみられない平均した抗菌力を発揮し, これ等

Fig.11 Susceptibility distribution of clinical isolates *Streptococcus pyogenes*, 22 strains

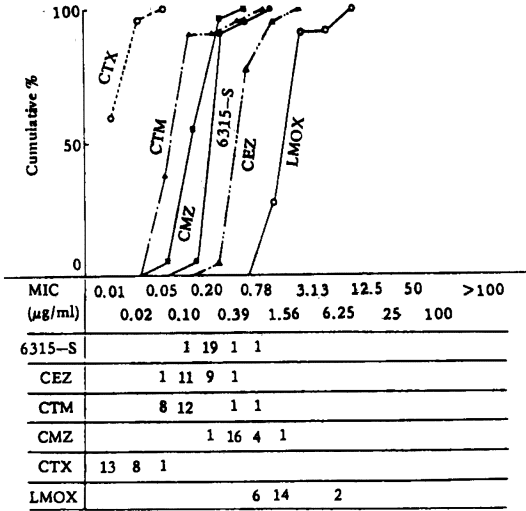


Fig.13 Susceptibility distribution of clinical isolates *Streptococcus agalactiae*, 28 strains

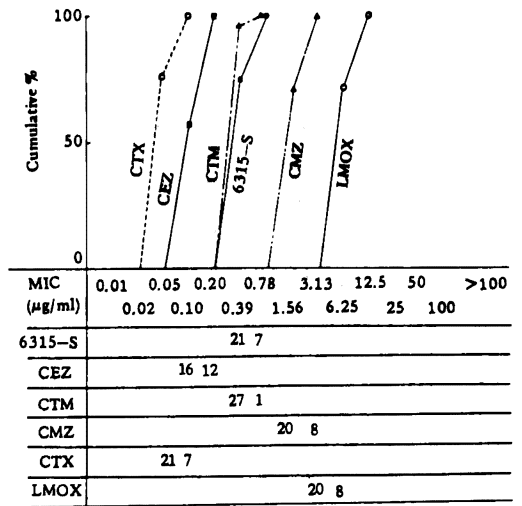


Fig.12 Susceptibility distribution of clinical isolates *Streptococcus pneumoniae*, 24 strains

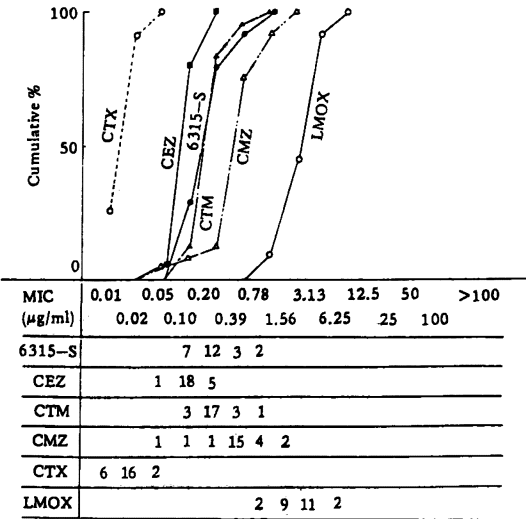


Fig.14 Susceptibility distribution of clinical isolates *Streptococcus sanguis*, 19 strains

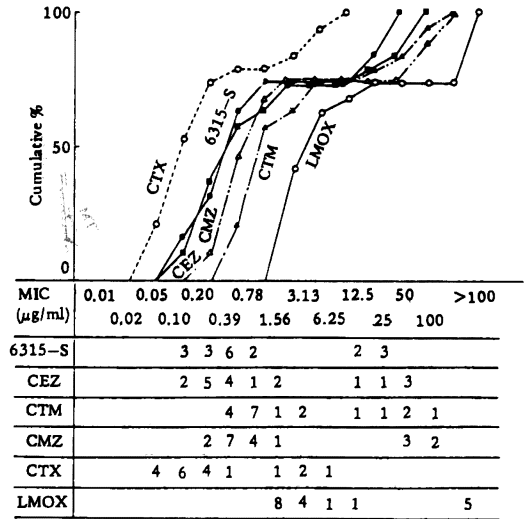


Fig.15 Susceptibility distribution of clinical isolates *Streptococcus mitis*, 16 strains

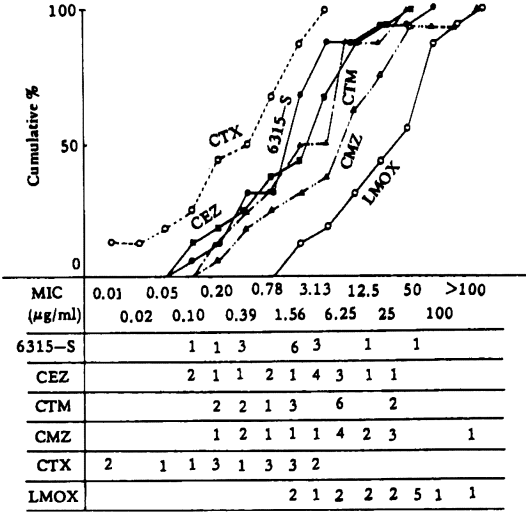


Fig.17 Susceptibility distribution of clinical isolates *Corynebacterium* sp., 12 strains

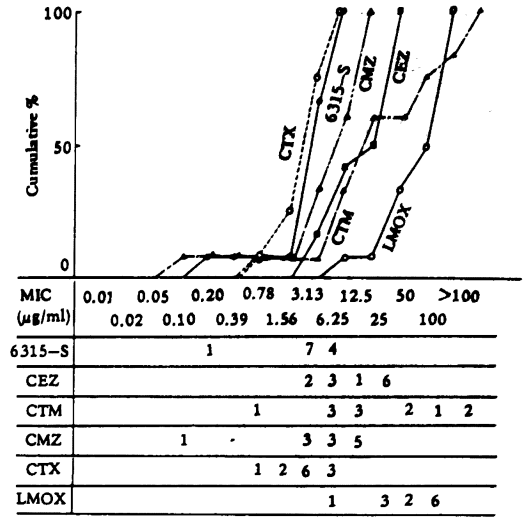


Fig.16 Susceptibility distribution of clinical isolates *Enterococcus faecalis*, 20 strains

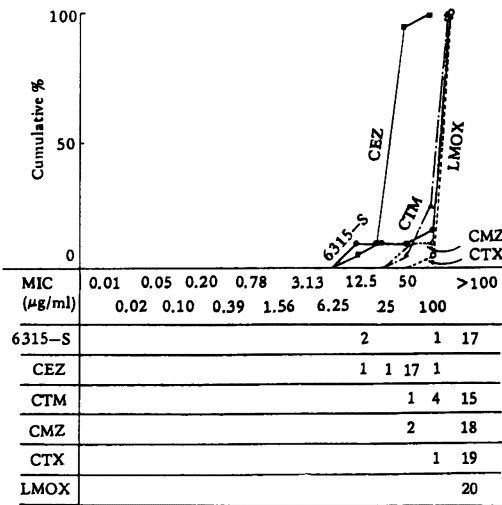


Fig.18 Susceptibility distribution of clinical isolates *Escherichia coli*, 30 strains

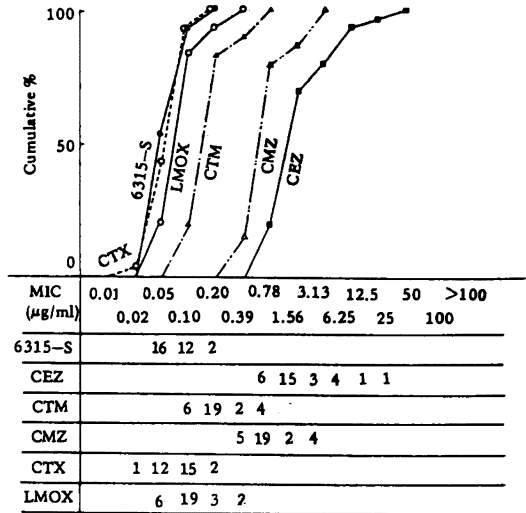


Fig.19 Susceptibility distribution of clinical isolates *Klebsiella sp.*, 30 strains

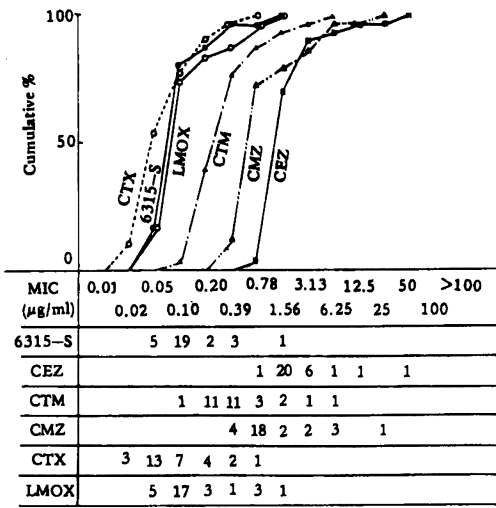


Fig.21 Susceptibility distribution of clinical isolates *Proteus mirabilis*, 30 strains

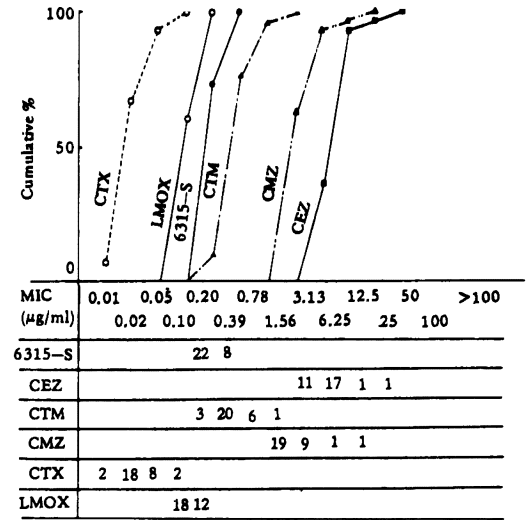


Fig.20 Susceptibility distribution of clinical isolates *Klebsiella oxytoca*, 12 strains

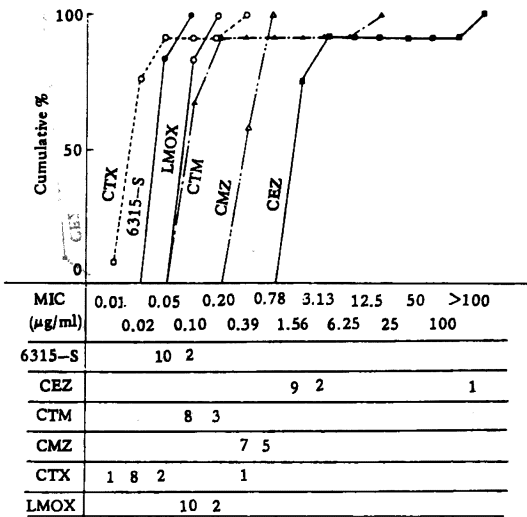


Fig.22 Susceptibility distribution of clinical isolates *Proteus vulgaris*, 30 strains

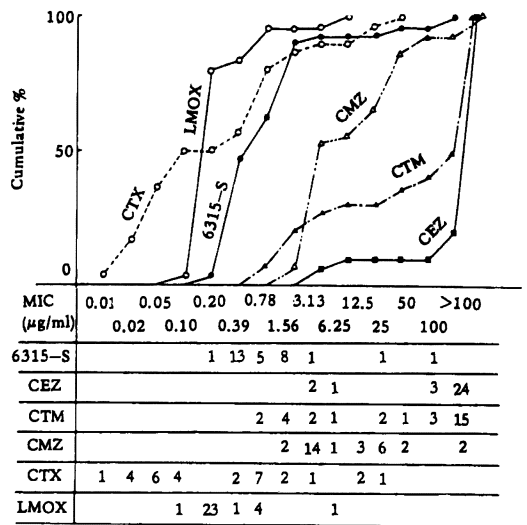


Fig.23 Susceptibility distribution of clinical isolates *Morganella morganii*, 20 strains

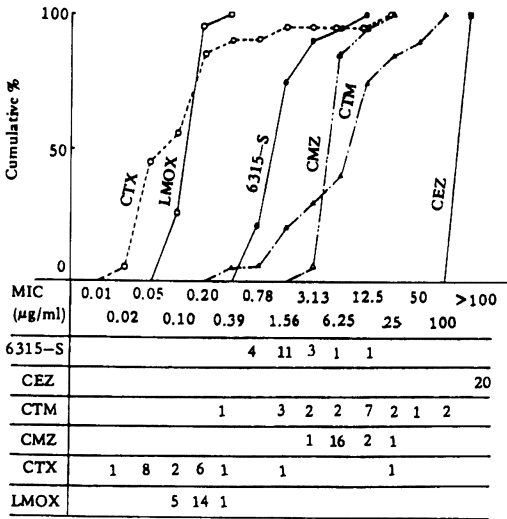


Fig.25 Susceptibility distribution of clinical isolates *Providencia sp.*, 29 strains

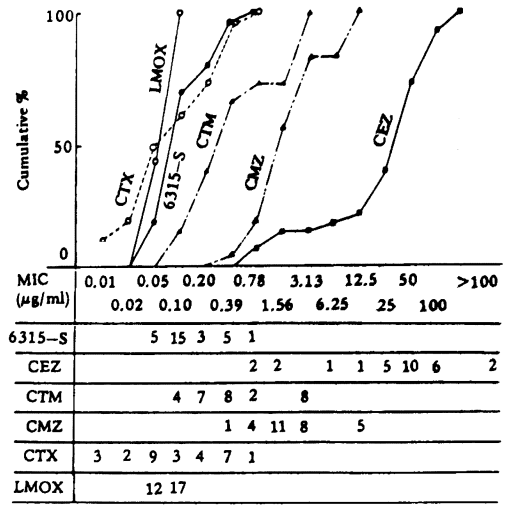


Fig.24 Susceptibility distribution of clinical isolates *Providencia rettgeri*, 29 strains

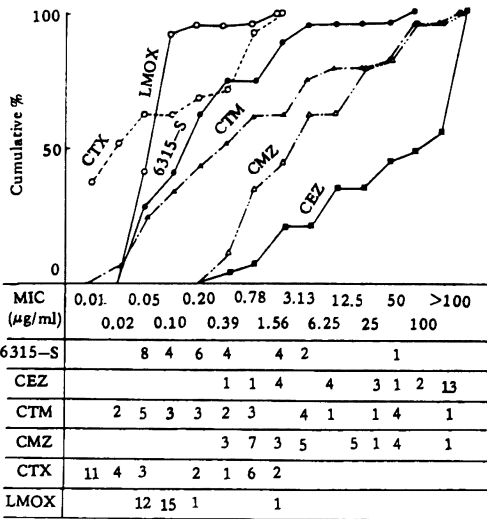


Fig.26 Susceptibility distribution of clinical isolates *Enterobacter cloacae*, 30 strains

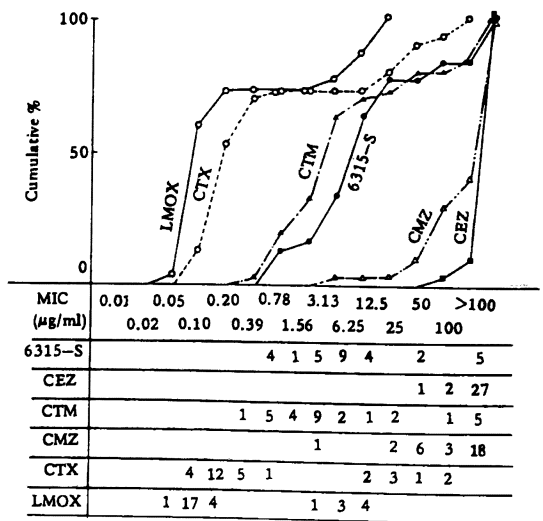


Fig.27 Susceptibility distribution of clinical isolates *Enterobacter aerogenes*, 28 strains

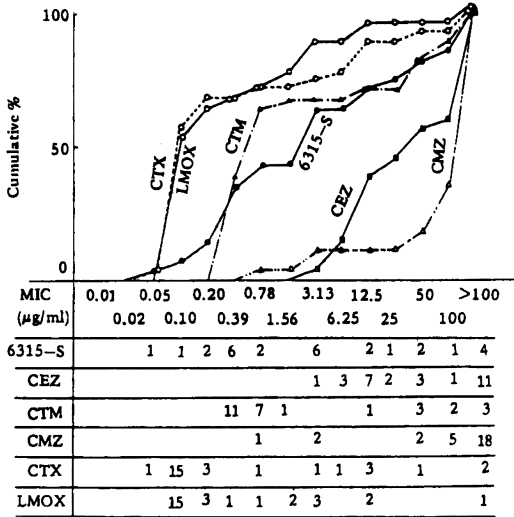


Fig.29 Susceptibility distribution of clinical isolates *Citrobacter freundii*, 29 strains

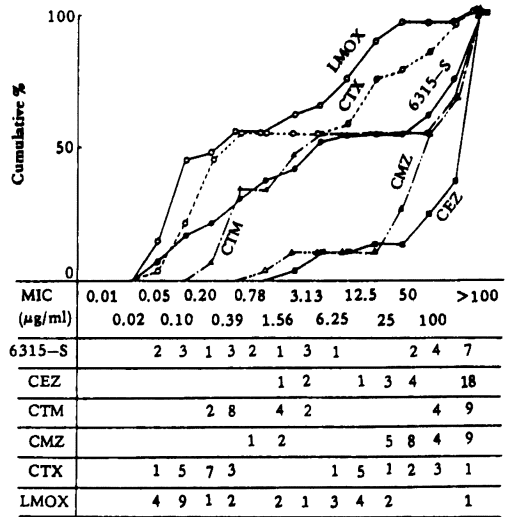


Fig.28 Susceptibility distribution of clinical isolates *Serratia marcescens*, 29 strains

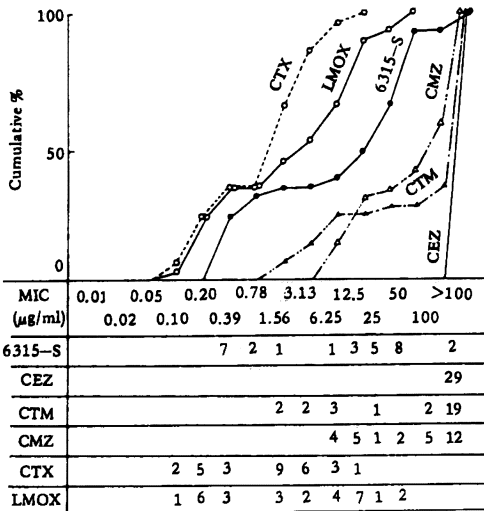


Fig.30 Susceptibility distribution of clinical isolates *Pseudomonas cepacia*, 8 strains

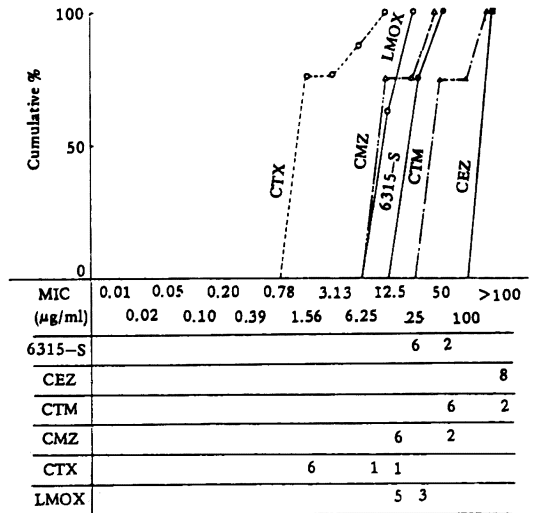


Fig.31 Susceptibility distribution of clinical isolates *Xanthomonas maltophilia*, 15 strains

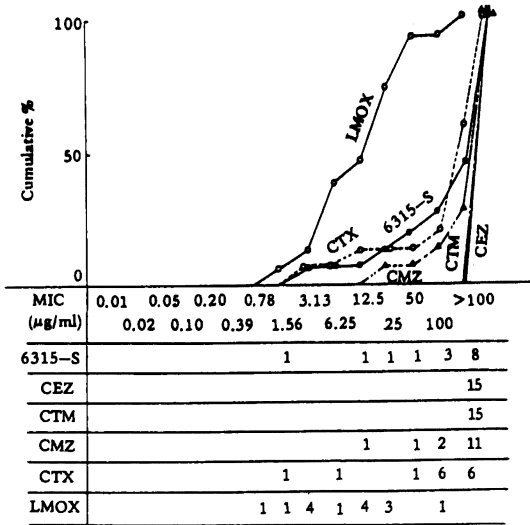


Fig.38 Susceptibility distribution of clinical isolates *Branhamella catarrhalis* 43 strains

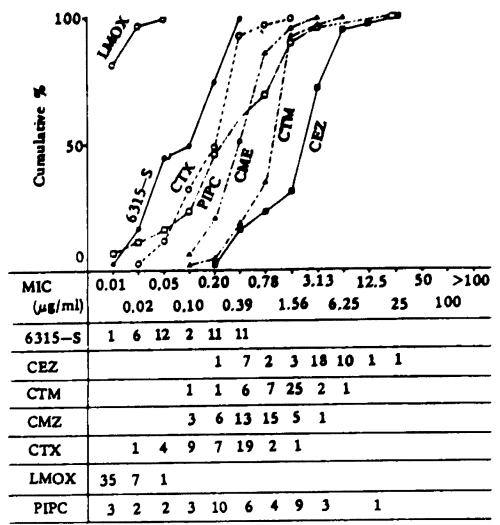


Fig.32 Susceptibility distribution of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa*, 18 strains

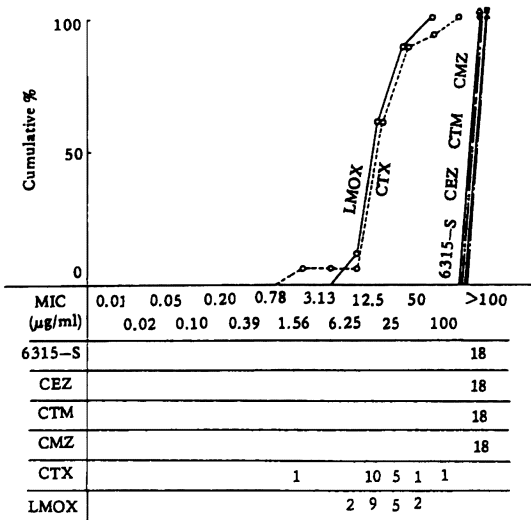


Fig.34 Susceptibility distribution of clinical isolates *Haemophilus influenzae*, 29 strains

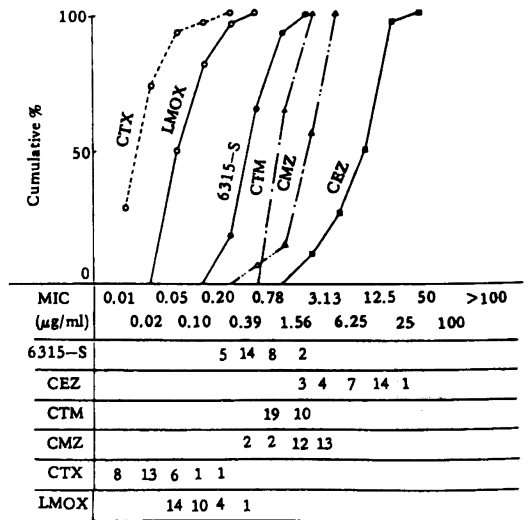


Fig.35 Susceptibility distribution of clinical isolates *Moraxella* sp., 12 strains

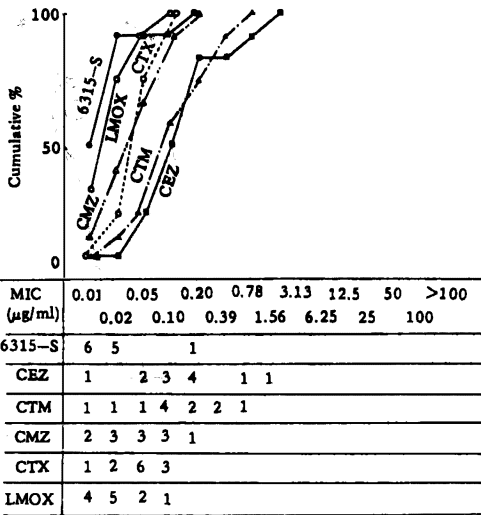


Fig.37 Susceptibility distribution of clinical isolates *Flavobacterium* sp., 8 strains

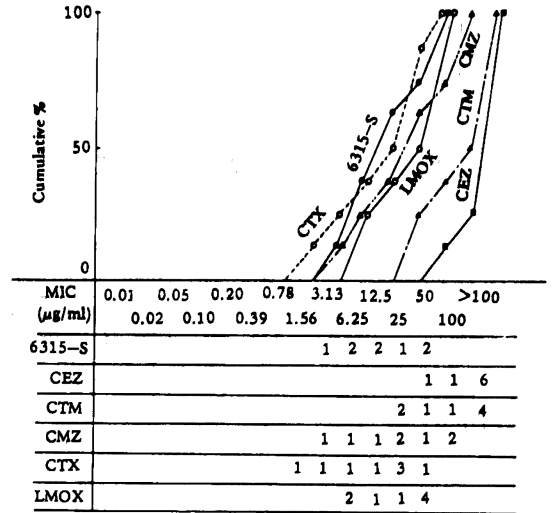


Fig.36 Susceptibility distribution of clinical isolates *Alcaligenes* sp., 9 strains

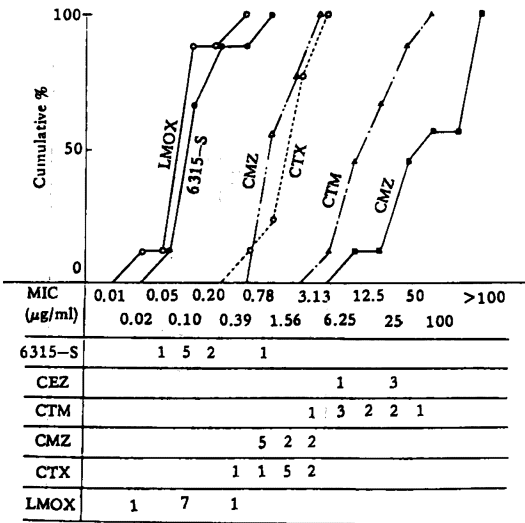
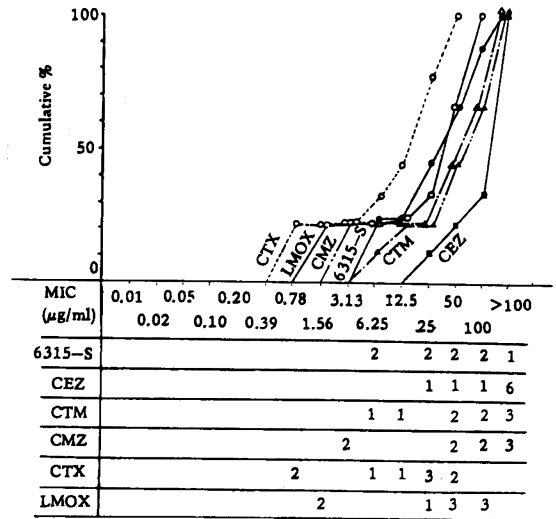
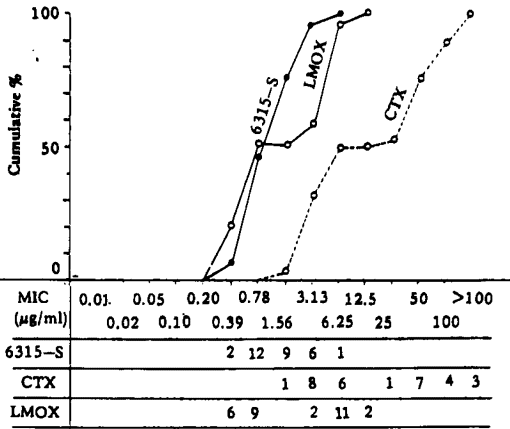


Fig.38 Susceptibility distribution of clinical isolates *Acinetobacter calcoaceticus*, 9 strains

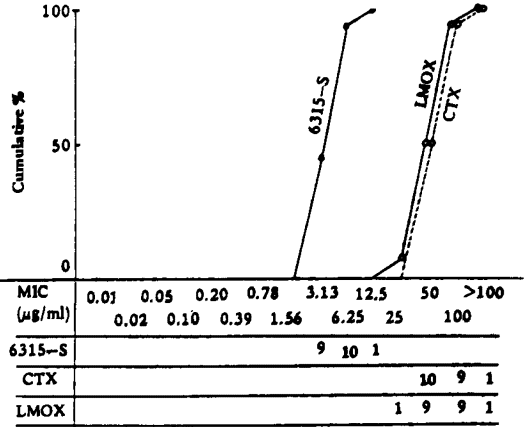




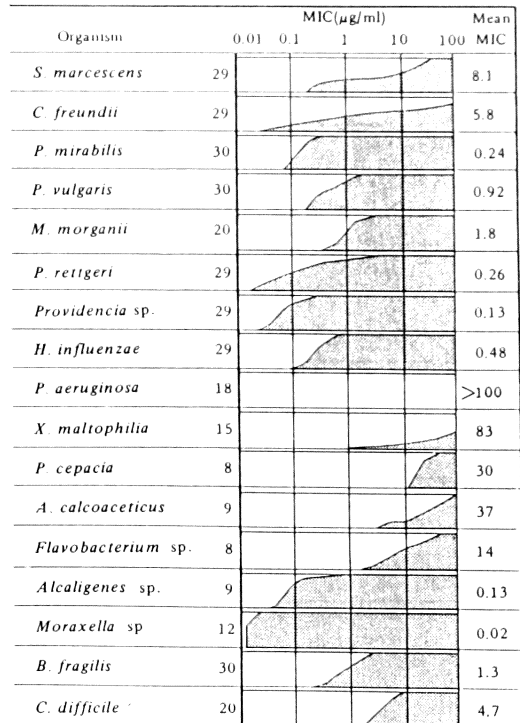
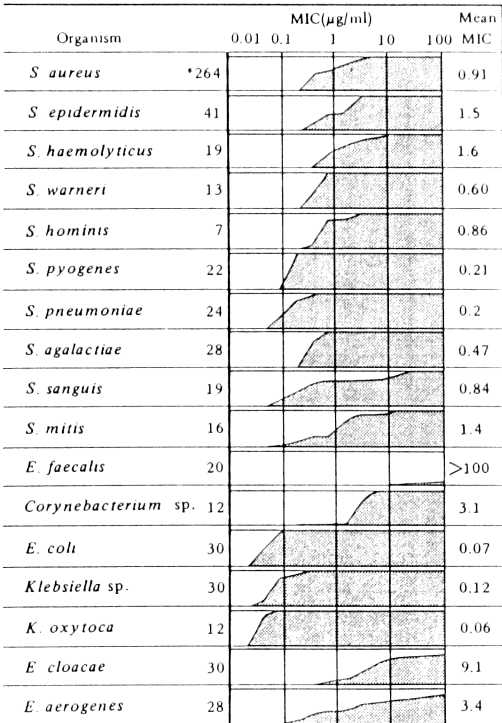
**Fig.39** Susceptibility distribution of clinical isolates *Bacteroides fragilis*, 30 strains



**Fig.40** Susceptibility distribution of clinical isolates *Clostridium difficile*, 20 strains



**Fig.41** Distribution of agar dilution MICs of 6315-S against clinical isolates of various bacterial species and geometrical means of MICs



\* Number of strains tested (length of vertical axis in each column indicates 100% for strains inhibited.)

Table 4 Effect of agar medium on antibacterial activity of 6315-S by agar dilution method

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of 6315-S			
	STA	MHA	HIA	TSA
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	12.5	12.5	12.5	50
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	0.78	0.39	0.78	1.56
<i>M. morgani</i> IFO 3848	0.39	0.39	0.39	0.39

Inoculum size = one loopful of  $10^6$  cells/ml

Medium : STA = Sensitivity test agar (Nissui)

MHA = Mueller-Hinton agar (Eiken)

HIA = Heart infusion agar (Eiken)

TSA = Trypto soy agar (Eiken)

Table 5 Effect of medium pH on antibacterial activity of 6315-S by agar dilution method

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of 6315-S		
	pH5.5	pH7.0	pH8.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.1	0.2	0.2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.2	0.39	0.2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.2	0.05	0.1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.78	0.05	0.1
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	12.5	6.25	1.56
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	6.25	0.39	0.78

Medium = STA, Inoculum size = One loopful of  $10^6$  cells/ml

菌種に対する MIC の幾何平均値は  $2 \mu\text{g/ml}$  以下であった。

### 3. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

#### 1) 培地の種類の影響 (Table 4)

7 菌種に対する 6315-S の MIC 値は培地間で有意の差は認めなかった。

#### 2) 培地 pH の影響 (Table 5)

グラム陽性菌の *S. aureus*, *S. epidermidis* では、培地 pH が 5.5~8.5 の範囲で MIC の変動は 2 倍以内に収まり、有意の差は認めなかった。グラム陰性菌 4 菌種では、菌株によって一様ではないが、pH 5.5 の酸性培地で抗菌力は  $1/2 \sim 1/16$  に減弱した。

#### 3) 接種菌量の影響 (Table 6)

$10^5 \sim 10^7$  cfu/ml の菌液の接種では、6315-S の MIC に変動はなかった。 $10^8$  cfu/ml 菌液では、*E. aerogenes* で MIC 上昇が大きかったが、その他は MIC の変動は 2 倍以内に収まり、6315-S は菌量の影響は受けにくい性質を示した。

#### 4) 馬血清添加の影響 (Table 7)

STA に馬血清を 50% に添加しても無添加に比べて MIC の変動は 2 倍以内に収まり、有意の差は認めなかった。

#### 4. 生菌数変化による殺菌作用 (Fig.42)

6315-S を *S. aureus* 209P JC-1 に作用させた時、1 MIC 濃度の  $0.2 \mu\text{g/ml}$  で生菌数は低下し、4 時間で初菌数の  $1/100$  にまで減少した。 $0.39 \mu\text{g/ml}$  では 6 時

Table 6 Effect of inoculum size on antibacterial activity of 6315-S by agar dilution method

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	$10^8$ *	$10^7$	$10^6$	$10^5$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.39	0.2	0.2	0.2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.78	0.39	0.39	0.39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.1	0.1	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	>100	12.5	6.25	6.25
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	1.56	0.78	0.39	0.39
<i>M. morgani</i> IFO 3848	0.39	0.39	0.39	0.39

Medium = STA

\* A loopful bacterial suspension ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$  cells/ml) was inoculated

Table 7 Effect of horse serum on antibacterial activity of 6315-S by agar dilution method

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	0%	50%*
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.2	0.39
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.39	0.2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.05	0.1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	0.05	0.1
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	6.25	3.13
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	0.39	0.78
<i>M. morgani</i> IFO 3848	0.39	0.78

Medium = STA, Inoculum size = one loopful of  $10^6$  cells/ml

\* Supplement of horse serum (v/v)%

間以降も生菌数は減少し続け、24時間後の生菌数は $10^4$  cfu/ml以下に減少し、強い殺菌活性を示した。

*S. pyogenes* C-203に作用した時、1 MIC濃度の $0.39 \mu\text{g/ml}$ で生菌数は低下し、6時間で初菌数の $1/1,000$ に低下し、24時間後には完全に殺菌されていた。

*E. coli* NIHJ JC-2に作用した時、1 MIC濃度の $0.1 \mu\text{g/ml}$ で生菌数は低下し、6時間で初菌数の $1/10,000$ まで減少した。しかし、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ では24時間後にcontrolとはほぼ同程度まで再増殖した。2~4 MIC濃度でも24時間後に僅かに再増殖の傾向がみられたが、生菌数は初菌数よりも $1/100$ 以下に保たれた。

##### 5. 作用菌の形態観察 (Fig.43~45)

6315-Sの2倍希釈系列濃度を含むSDA平板上に、対数増殖期の*S. pyogenes* C-203, *E. coli* NIHJ JC-2および*K. pneumoniae* SRL-1を作用させ、2時

間後(*K. pneumoniae*は3時間後)に形態変化を位相差顕微鏡下で観察した。

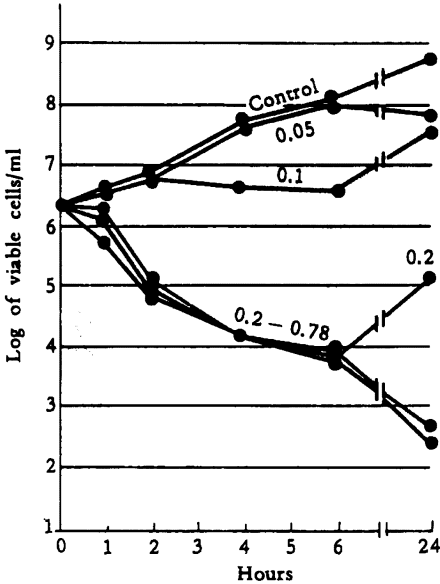
*S. pyogenes*に作用した時、 $0.1\sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ でわずかに卵形および紡錘形に肥大したcellが多く一部には溶菌像も認められた。 $0.78 \mu\text{g/ml}$ になると、膨化せぬままに溶菌像がみられた (Fig.43)。

*E. coli*に作用した時の形態変化はFig.44に示すように、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で全てのcellはfilamentを形成し、中央部にbulge formが観察された。作用濃度を上げるにしたがって、細胞内容が漏出したghost cellが多くなり、さらに濃度を上げるとfilamentを作らずに溶菌した残滓のみが認められた。

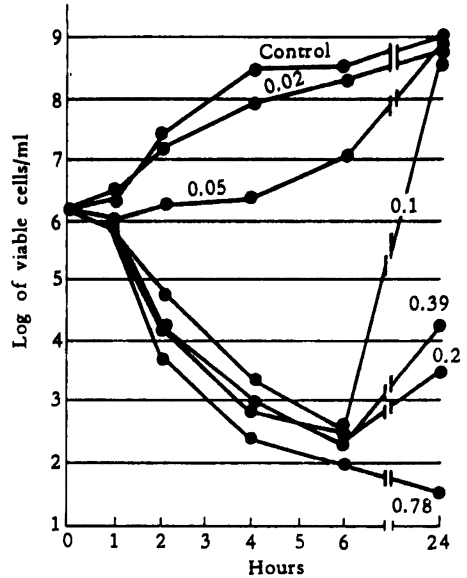
*K. pneumoniae*に作用した時の形態変化はFig.45に示すように、作用3時間後 $0.1 \mu\text{g/ml}$ で特徴的なS字状filamentを形成し溶菌も始めている。作用濃度を

Fig.42 Time-kill curves of *S. aureus* (A), *S. pyogenes* (B), and *E. coli* (C) by 6315-S with concentrations indicated

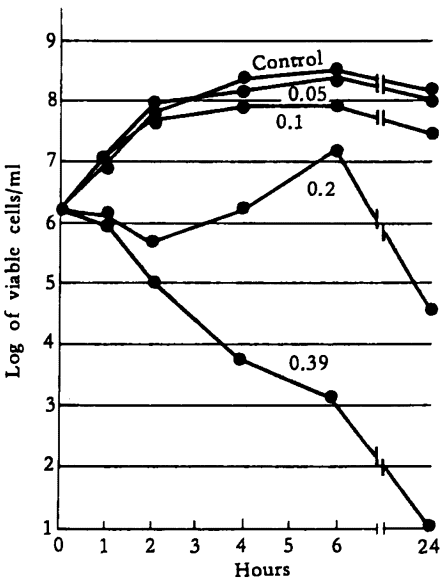
(A) *S. aureus* 209P JC-1  
MIC = 0.2  $\mu\text{g/ml}$



(C) *E. coli* NIHJ JC-2  
MIC = 0.1  $\mu\text{g/ml}$



(B) *S. pyogenes* C-203  
MIC = 0.39  $\mu\text{g/ml}$



上げると溶菌は一層顕著に観察され、3.13  $\mu\text{g/ml}$ ではとんだの cell は filament 形成を中断され溶菌した残滓のみが認められた。

*E. coli* と *K. pneumoniae* については形態変化の特徴から、filament 形成濃度と溶菌が始まる濃度に分けて帯グラフに示した (Fig.46)。

6315-S の filament 形成濃度は共に 1/4 MIC で、溶菌開始濃度は MIC 付近で観察され、作用短時間ですぐれた溶菌効果を示した。

6. 試験管内耐性獲得 (Fig.47)

*S. aureus* 209P JC-1 の 6315-S に対する耐性獲得は CMZ と同様に速く、20 継代後に 6.25  $\mu\text{g/ml}$  の MIC 値に止まった。*E. coli* NIHJ JC-2 に対しては、これよりも速かったが CMZ に比べると遅い。10 継代で 400  $\mu\text{g/ml}$  に達し 18 継代まで 800  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示した。

7. CEZ 耐性 *S. aureus* に対する抗菌作用

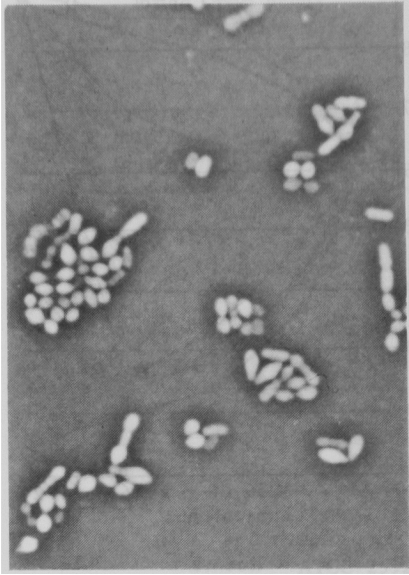
6315-S は CEZ 耐性 *S. aureus* に対しても感性菌とほぼ同程度の低い MIC を示したので、その特異性を調べた。

1) 感受性分布 (Fig.48)

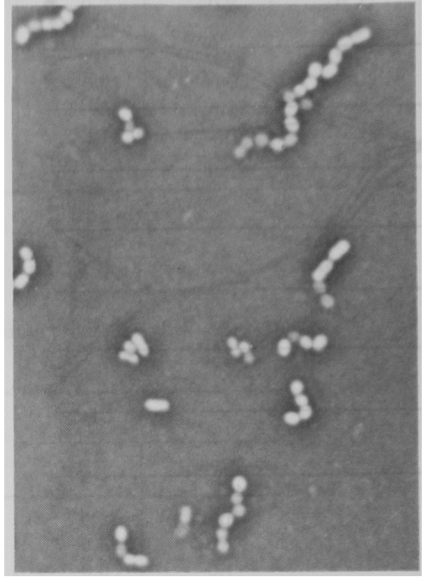
臨床分離 CEZ 耐性 *S. aureus* 36 株 (MIC :  $\geq 12.5$

Fig.43 Phase contrast micrographs of *S. pyogenes* C-203 at 2 hours after treatment with 6315-S (Agar MIC : 0.39) concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

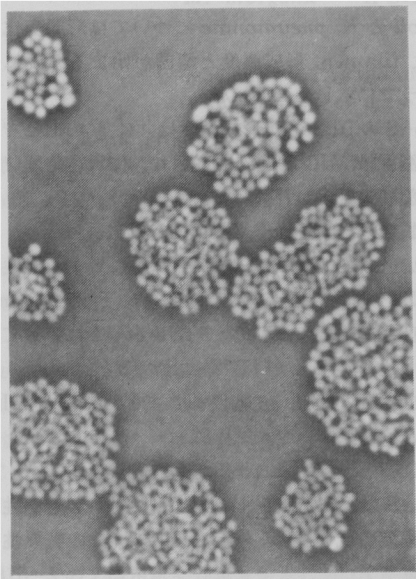
0.2



0.78



0



0.1

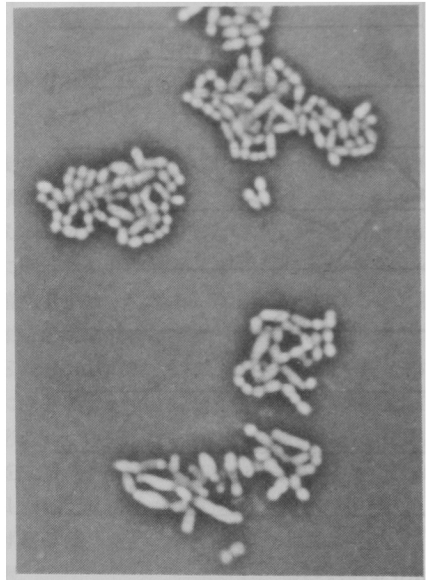
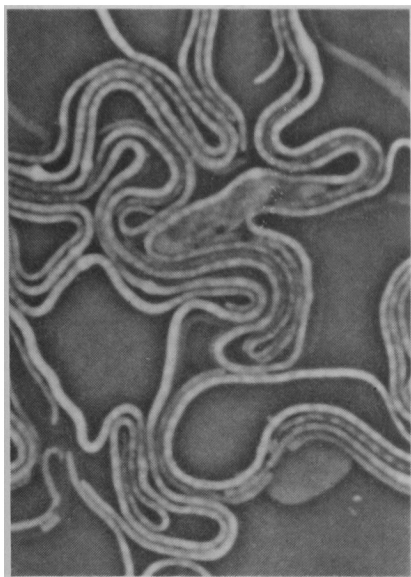


Fig.44 Phase contrast micrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 at 2 hours after treatment with 6315-S

(Ager MIC : 0.1)

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

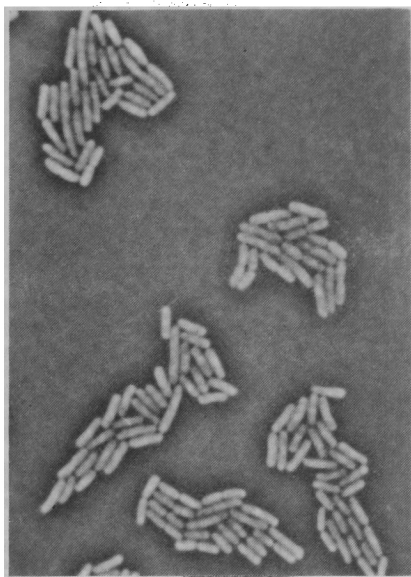
0.39



3.13



0



0.05

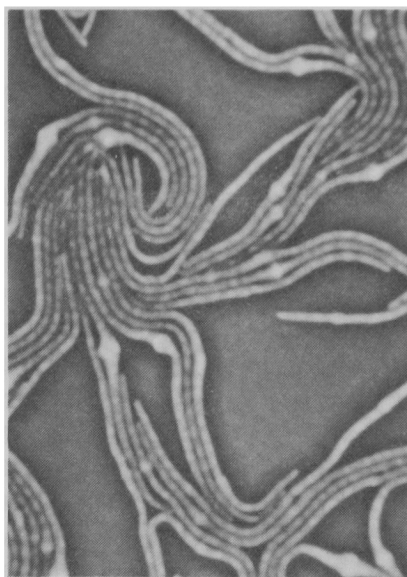
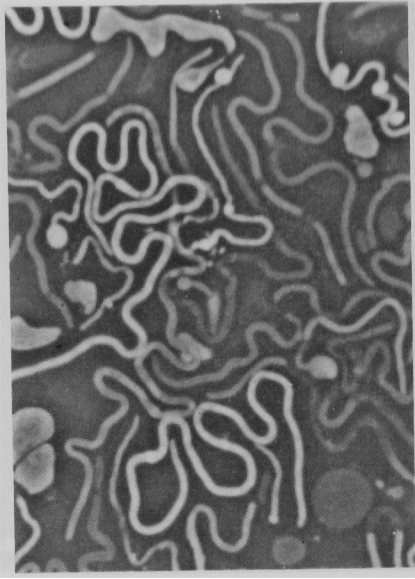


Fig.45 Phase contrast micrographs of *K. pneumoniae* SRL-1 at 3 hours after treatment with 6315-S (Ager MIC = 0.1) concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

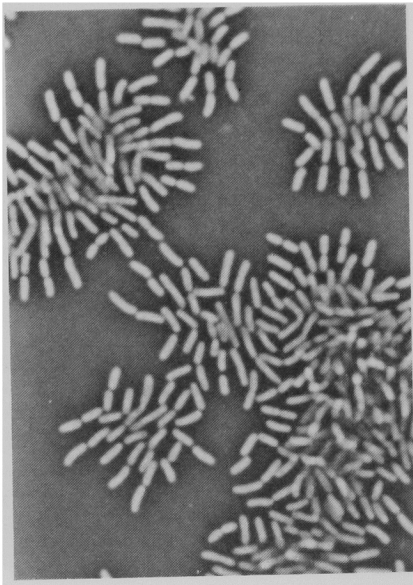
0.39



3.13



0



0.1

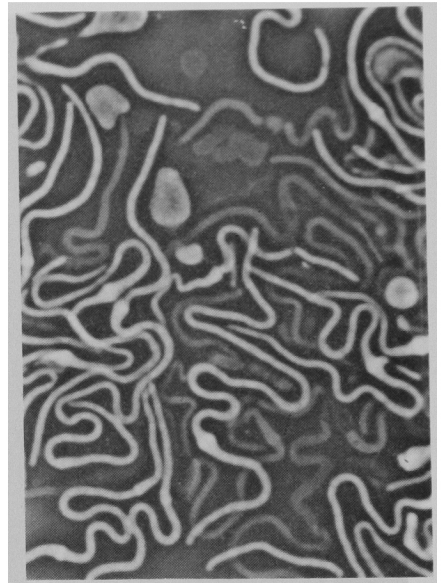


Fig.46 Morphological changes of *E. coli* (A) and *K. pneumoniae* (B) Inoculum size : one loopful of  $10^7$  cells/ml  
Medium : Sensitivity Disc agar (Nissui)

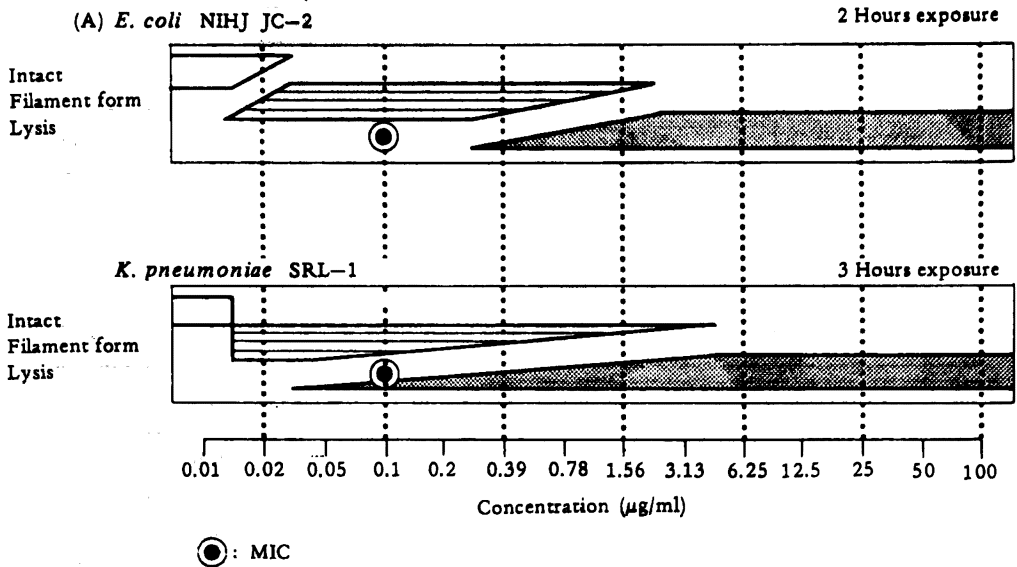
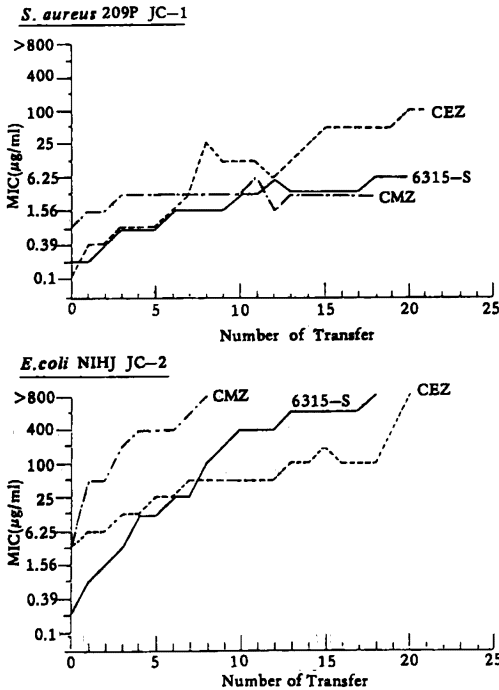


Fig.47 *In vitro* development of resistance of *S. aureus* 209P JC-1 and *E. coli* NIHJ JC-2 to 6315-S, CMZ, and CEZ passaged on broth medium



$\mu\text{g/ml}$ )を選び出し、6315-Sおよび13種の市販 $\beta$ -lactam 抗生剤のMIC測定を行なった。6315-SのMICは、1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、MIC<sub>90</sub>は6.25 $\mu\text{g/ml}$ で幾何平均MICは2.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。この成績はMCIPC(平均MIC:0.97 $\mu\text{g/ml}$ )に次ぐ強い抗菌力であり、6315-Sはcephem系で抗菌力を示したCER, CMD, CMZ(平均MIC:3.6, 6.6, 8.7 $\mu\text{g/ml}$ )のどれよりも優れていた。

2) 培地 pH と食塩添加の影響 (Fig.49)

pHを5.6, 6.2, 7.0に修正したSTAおよびpH7.0で食塩を5%に添加したSTAを用いて、agar dilution法でCEZ耐性*S. aureus*(36株)に対する6315-Sの抗菌力をCEZとで比較した。6315-Sの抗菌力はpHの低下と共に上昇し、pH5.6で4倍の活性増強を示した。pH5.6にするとCEZに対しても感受性化し、CEZ耐性因子が酸性で働かなくなることを示した。5%食塩添加では6315-Sの抗菌力は僅かに弱まったが、CEZの抗菌力は著しく影響を受け、耐性度は8倍に上昇した。

3) MBC値による殺菌作用 (Table 8)

臨床分離*S. aureus*のCEZ感性菌23株(MIC:<6.25 $\mu\text{g/ml}$ )と耐性菌17株(MIC: $\geq$ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ )に対する6315-SのMICおよび6, 24時間作用のMBCを測定し、CMD, CFX, CEZ, DMPPC, ABPCと比較した。成績は感性、耐性に分類して幾何平均値を



Fig.48 Comparative *in vitro* activity of 6315-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics against 38 isolates of cefazolin-resistant *Staphylococcus aureus*

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				Range	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		Mean MIC
	0.1	1	10	100		70%	90%	
6315-S					1.56 - 12.5	3.1	6.3	2.7
CER					0.78 - 12.5	6.3	12.5	3.6
CMD					1.56 - 12.5	6.3	12.5	6.6
CMZ					3.13 - 25	12.5	25	8.7
CET					1.56 - 50	25	50	12.7
CFX					12.5 - 100	25	50	24.5
CEZ					12.5 - 100	50	100	45.4
LMOX					12.5 - >100	50	>100	52.0
CPZ					50 - >100	>100	>100	>100
MCIPC					0.39 - 50	1.6	3.1	0.97
DMPPC					12.5 - >100	50	>100	34.0
PCG					12.5 - 100	50	50	51.0
ABPC					6.25 - 100	50	100	54.0
PIPC					50 - >100	>100	>100	>100

Table 8 に示した。6315-S の平均 MIC は感性菌で  $0.53 \mu\text{g/ml}$ 、耐性菌で  $1.0 \mu\text{g/ml}$  を示しその差は狭く 2 倍程度であった。CMD や DMPPC は感性菌と耐性菌でそれぞれ 7.2 倍、6 倍程度、CEZ では 25 倍の開きを示した。平均殺菌率 99.9% を示す 6315-S の平均 MBC は、作用 6 時間で感性菌が  $0.84 \mu\text{g/ml}$ 、耐性菌が  $2.9 \mu\text{g/ml}$  となり、ともに MIC に近似しており短時間で強い殺菌効果を示した。対照薬を作用した時の平均 MBC は 6315-S の 10 倍以上で、いずれの菌にも高い値を示し、作用 6 時間で  $10 \mu\text{g/ml}$  以上を必要とした。

4) Biophotometer による増殖阻止曲線 (Fig.50, 51)  
CEZ 耐性 *S. aureus* 1621 に対する溶菌作用を bio-

photometer で調べた。6315-S を作用させると  $1/8$  MIC の  $0.39 \mu\text{g/ml}$  で濁度の低下が観察され、 $0.39$ 、 $0.78 \mu\text{g/ml}$  では 8 時間以降で再増殖を始めるが、 $1/2$  MIC の  $1.56 \mu\text{g/ml}$  では作用 18 時間まで再増殖を認めなかった。薬剤添加後、濁度が添加時よりも低下させる最小濃度で、対照薬と溶菌作用の強さを比較すると、CER、CMZ の  $12.5 \mu\text{g/ml}$  や CEZ、CTM の  $50 \mu\text{g/ml}$  より 6315-S の  $0.39 \mu\text{g/ml}$  は明らかに低く、優れた効果が認められた。CEZ と 6315-S の差をさらに明らかにする目的で、同一の菌に作用させたときの生菌数推移と作用薬の濃度変化を測定した (Fig. 51)。

Fig.49 Effects of medium pH and supplement of sodium chloride on susceptibility of cefazolin-resistant *S. aureus* to 6315-S and cefazolin

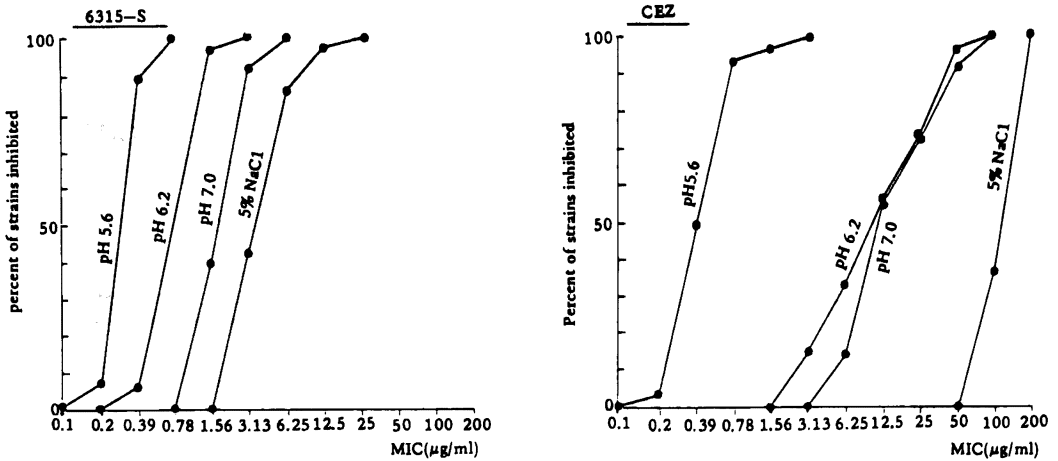


Table 8 Comparative bactericidal activity of 6315-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics against cefazolin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* determined by micro dilution method

	Geometrical mean value ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	MBC (6hr)		MBC (24hr)		MIC (24hr)	
	[ S ]*	[ R ]	[ S ]	[ R ]	[ S ]	[ R ]
6315-S	0.84	2.9	0.80	5.1	0.53	1.0
CMD	13.4	27.2	1.6	13.0	1.3	9.4
CFX	16.4	33.2	9.3	84.7	7.5	29.5
DMPPC	53.2	144	7.5	81.8	4.5	27.2
CEZ	11.7	78.5	2.1	66.4	1.1	27.2
ABPC	67.4	>800	74.2	>800	41.8	>800

\* S : Cefazolin-sensitive *S. aureus* (23 strains)  
 R : Cefazolin-resistant *S. aureus* (17 strains)

Inoculum size = more than  $2 \times 10^6$  cells/ml  
 Killing rate = 99.9%,  
 MBC determination = after incubation with antibiotics for 6 and 24 hours

培養中の 6315-S は安定で、濃度は初濃度の高低にかかわらず少なくとも 6 時間まで変化しなかった。生菌数は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  以上で低下し 6 時間まで再増殖はなかった。一方、CEZ 濃度は添加直後からすみやかに低下し始めるが、その速度は初濃度が低いほど速く、 $100 \mu\text{g/ml}$  を作用したときには 4 時間で半減したが、 $12.5$

$\mu\text{g/ml}$  では 1 時間であった。生菌数は CEZ 初濃度  $50 \mu\text{g/ml}$  のときで低下したが、この濃度では 4 時間以降で再び増殖を始めた。このとき CEZ 濃度は  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以下に低下していた。この菌株においては、CEZ が  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上に保たれている間は殺菌的に作用するが、それ以下に分解されると再増殖してくる。したがっ

Fig.50 Bacteriolytic effect of 6315-S against *S. aureus* 1821 compared with other cephalosporins and vancomycin  
*S. aureus* was grown in biophotometer with antibiotics of the concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) indicated

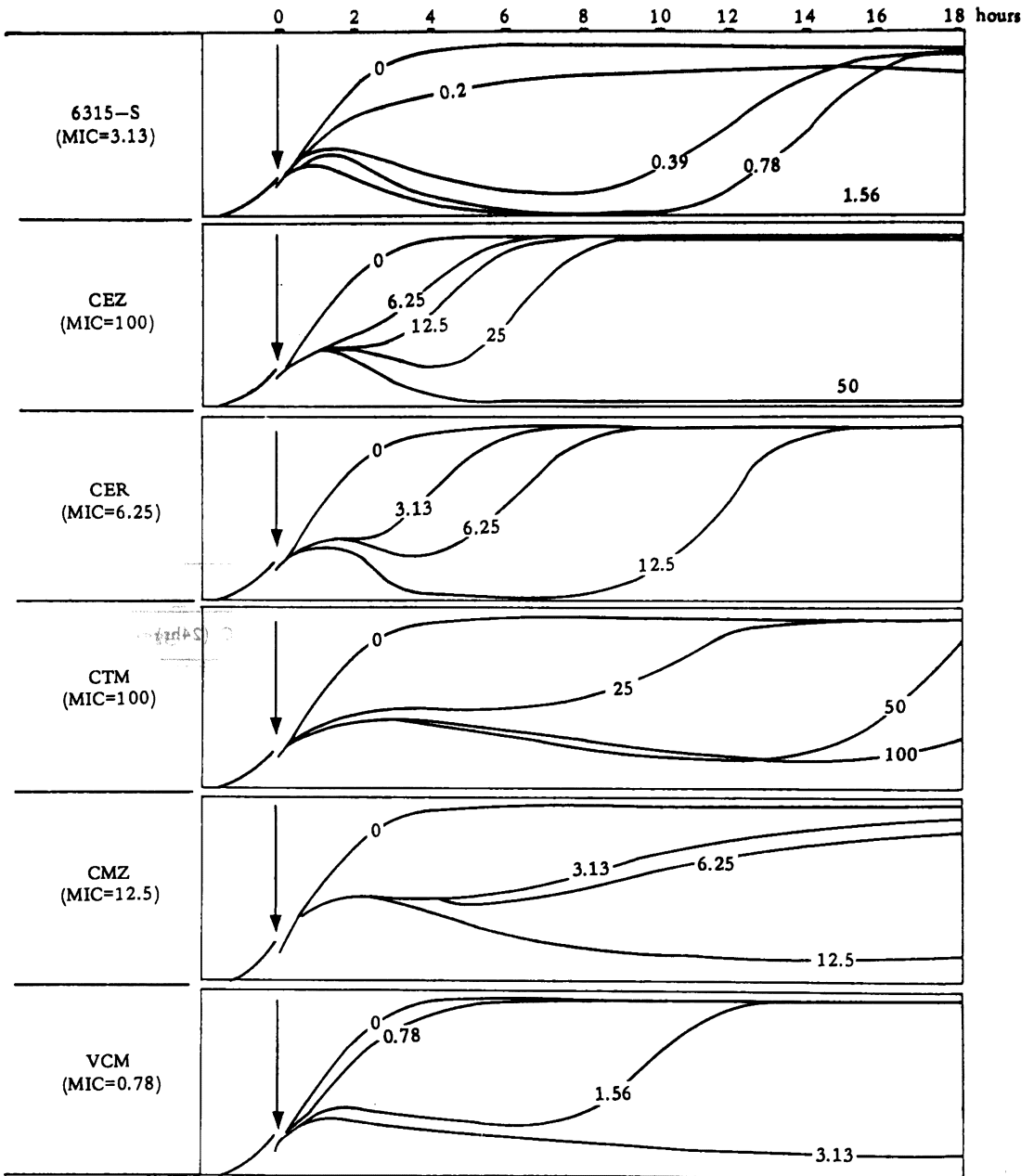
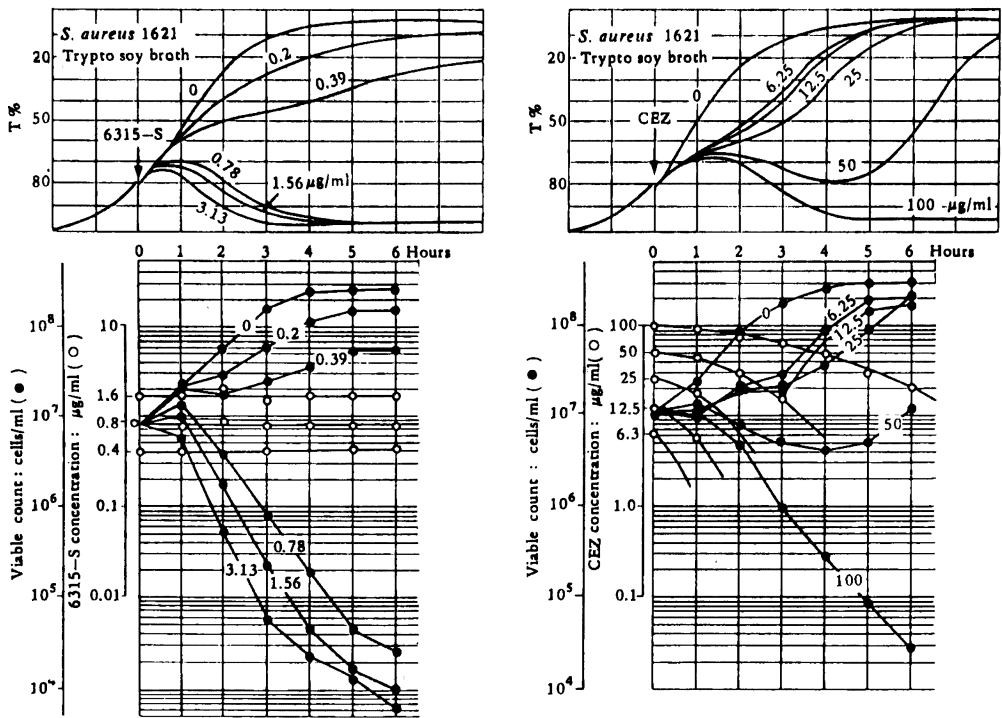


Fig.51 Correlation of time-kill curves with bacteriolytic effect and the remained activity of 6315-S and cefazolin in the culture of *S. aureus* 1821 (CEZ-resistant strain)



て、初濃度が高いと再増殖の時期がおくられて始まる。濁度による溶菌と生菌数による殺菌とは良く平行していた。

#### 5) MS-2 による増殖阻止曲線 (Fig.52, 53)

CEZ 耐性 *S. aureus* 2742 に対して 6315-S を作用させると、5 時間までに 0.78  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で菌の増殖が認められるが、1.56  $\mu\text{g/ml}$  以上で抑制された。5 時間後の判定で MIC は 1.56  $\mu\text{g/ml}$  であった (Fig.52)。

一方、CEZ を作用させたときは、12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上に濃度が高くなると増殖阻害がみられたが、50  $\mu\text{g/ml}$  までは再増殖し MIC は 100  $\mu\text{g/ml}$  であった。同様に 19 株の CEZ 耐性 *S. aureus* について、MS-2 による作用 5 時間の MIC を測定した。この値を agar dilution 法による MIC とで比較して Fig.53 に相関図を示した。

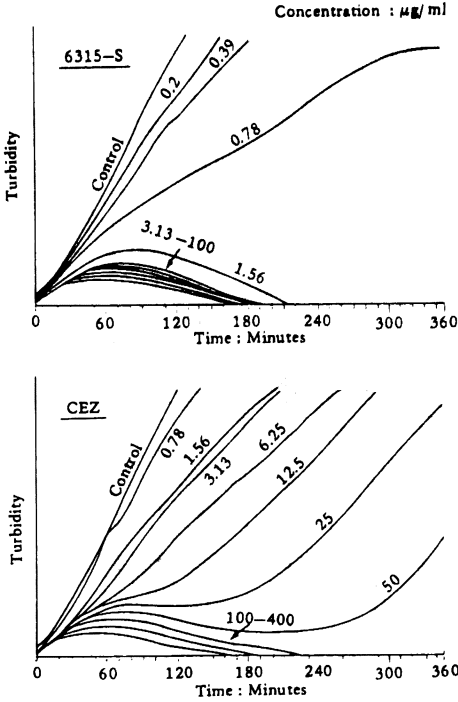
6315-S の MS-2 で測定した増殖阻害は、agar MIC よりやや低い濃度で認められ強い殺菌作用を示した。しかし、CEZ では agar MIC に比べて 4~16 倍高い濃度を必要とした。

### III. 考 察

6315-S はグラム陽性菌、陰性菌に平均して強い抗菌力を示し、なかでもグラム陽性球菌とくに耐性菌を含む *S. aureus* に強く、抗菌スペクトルを嫌気性菌の *C. difficile* に拡大した抗生物質として特徴づけられる。6315-S のグラム陽性菌に対する抗菌力は CEZ と同程度に強いが、メチシリン・セフェム耐性 *S. aureus* に対しては他剤よりも著しく強い抗菌力を示した。グラム陰性菌の *E. coli*, *Klebsiella* 属, *Proteus* に LMOX や CTX と同程度であった。その他の *Enterobacteriaceae* に対しては LMOX, CTX より劣ったが、CMZ, CTM などより強い。しかし、*E. faecalis* や *Pseudomonas* 属にはほとんど無効であった。嫌気性菌については、*B. fragilis* をはじめとしてグラム陽性菌および陰性菌に幅広いスペクトルを示し、特に *C. difficile* に有効な点は他剤にない特徴で、臨床分離株も 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以下の強い抗菌力を認め、腸内細菌叢における *C. difficile* 発生を抑えることが期待される。

各種の臨床分離株 (1012 株) に対する 6315-S の感受性分布の成績は、抗菌スペクトルを裏づけるもので

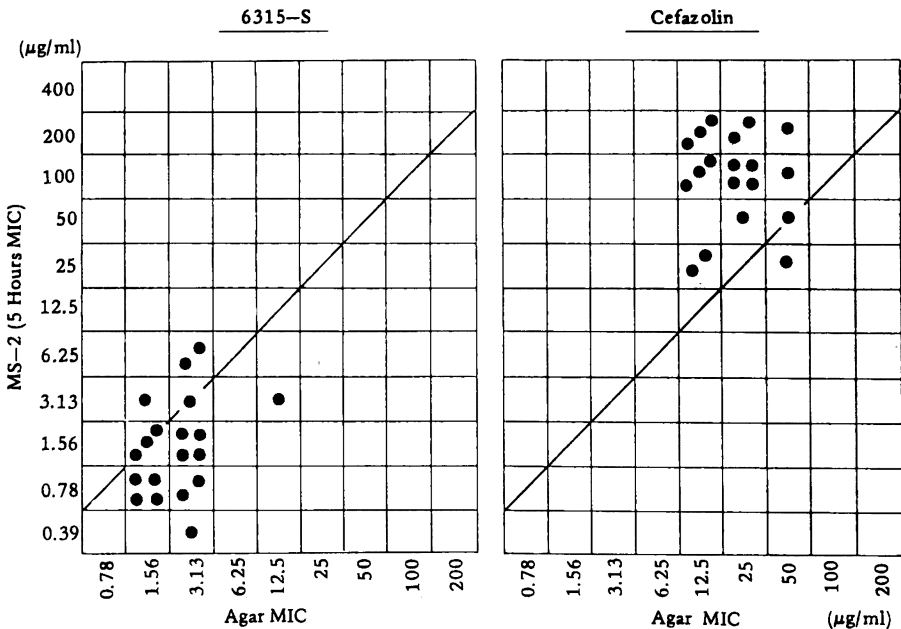
Fig.52 Comparison of bactericidal activity of 6315-S and cefazolin against *S. aureus* 2742 (CEZ-resistant strain) determined by MS-2



あった。グラム陽性球菌に対して抗菌力が強く、被検菌の90%以上を阻害する $\text{MIC}_{90}$ は、*S. aureus*, *S. epidermidis*で $3.13 \mu\text{g/ml}$ , *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*ではそれぞれ $0.2 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.39 \mu\text{g/ml}$ , グラム陰性球菌の*B. catarrhalis*に対しても $0.39 \mu\text{g/ml}$ で認められた。また、グラム陰性菌の $\text{MIC}_{90}$ は*E. coli*, *Klebsiella*属, *P. mirabilis*では $0.39 \mu\text{g/ml}$ 以下の低濃度であり、penicillinase型に安定な性質<sup>9)</sup>を反映して耐性菌は認められなかった。*P. vulgaris*, *Providencia*属, *M. morganii*, *H. influenzae*, *Alcaligenes*属に対しては、MICは $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下で認められた。本薬はCephalosporinaseに対する低抗性がLMOXより劣るので<sup>9)</sup>, *Enterobacter*属, *S. marcescens*, *C. freundii*に対してはLMOX, CTXなどより抗菌力が弱くなり、70%以上を阻害するのにそれぞれ $12.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ を必要とした。しかし、*Enterobacter*にはCTMと同等、CMZより優れ、*Serratia*にはCTM, CMZのいずれよりも優れていた。以上の成績からみて、6315-Sはグラム陽性菌に対する抗菌力が、グラム陰性菌に対すると同じ位まで強化された広域スペクトルをもち、とくに*S. aureus*に対する強い抗菌力が特徴にあげられる。

今回試験した臨床分離*S. aureus* 264株中、CEZに $25 \mu\text{g/ml}$ 以上のMICを示した耐性菌は65株(24.6

Fig.53 Correlations between agar dilution MICs and minimum bacteriolytic concentrations of 6315-S and cefazolin against CEZ-resistant *S. aureus*



%)の多くを認めた。我々が LMOX の評価をしたとき報告した例では、1978 年以前に分離した 96 株の *S. aureus* を用いたが、CEZ 耐性菌は僅か 1 株を認めたのみである<sup>3)</sup>。しかしながら、今回検討した 264 株中、1981 年 10 月に分離した 48 株から 5 株 (11.4%)、1982 年 10 月～1983 年 3 月までに分離した 216 株から 80 株 (27.8%) を認め、CEZ 耐性化が急速に進行している傾向が認められた。すでに本邦では *S. aureus* における cephem 剤耐性化の傾向が 1980 年以降急増しているとする島田ら<sup>10)</sup>、松本ら<sup>11)</sup>の報告があり、我々の成績もこれを裏づけている。CEZ 耐性 *S. aureus* は CER, CMD, CMZ などに比較的高い感受性を示しているが、Methicillin や多くの新しい世代を含む cephem 系に交差耐性を示した (Fig.48)。6315-S は *S. aureus* 分離株中 9 株 (3.4%) に無効であったが、残りの 56 株の CEZ 耐性菌に強い抗菌力を示した (MIC $\leq$ 6.25  $\mu$ g/ml) 点が注目された。

*S. aureus* の CEZ または Methicillin に対する耐性機構は、主として  $\beta$ -lactamase<sup>12)</sup> とペニシリン結合蛋白の異常<sup>13, 14)</sup> が複合して発現すると考えられる。6315-S は *S. aureus* 産生の  $\beta$ -lactamase に極めて安定化されている<sup>9)</sup>。6315-S は耐性菌との作用中に濃度低下がないこと (Fig.51) はこのため、殺菌作用の持続に役立っている。培地 pH を 7.0 から 5.2 に低下させると、メチシリン耐性が解除されることが知られ<sup>15)</sup>。これは耐性に関与する低親和性の PBP 2' (または 2a) が消失することに帰因している<sup>16)</sup>。培地 pH の低下によっておこる 6315-S の耐性菌に対する MIC 低下の度合は、CEZ のそれよりも小さいが、両薬ともに同等の MIC 値 (0.2~0.78  $\mu$ g/ml) を示した (Fig.49)。このことは 6315-S に対する高度耐性 9 株の存在と合せて、6315-S は PBP 2' への親和性がそれほど大きくないことを示唆している。しかし、殺菌作用の発現が他剤に比べて速いこと (Fig.50, Table 8) は、本薬が PBP 異常に対して特異な作用をもつことを考えさせる。PBP 2' は誘導的に産生されることが知られている<sup>17)</sup>。しかし、6315-S に比較的感受性を示した CEZ 耐性の *S. aureus* において、6315-S は PBP 2' を誘導しにくい特異性を有することが報告されている<sup>18)</sup>。これも抗菌力に寄与していると考えられる。6315-S の CEZ 中等度耐性菌に対する作用は殺菌的であった。6315-S は、6 時間後ですでに MIC と同じ濃度で殺菌作用を示したのに対して、CEZ は 6 時間作用後の MBC は MIC 濃度に達することはなかった (Fig.53, Table 8)。

初菌数 10<sup>8</sup> cfu/ml に作用した時の殺菌作用では、*S.*

*aureus* 209P JC-1, *S. pyogenes* C-203, *E. coli* NIHJ JC-2 に対して、6315-S は agar dilution 法の MIC 濃度で 8 時間まで生菌数を低下させた。6315-S 作用菌の形態変化を観察すると、1/4 MIC 濃度で隔壁合成阻害による異常形態がみられ、*S. pyogenes* では ovoid 状に、*E. coli* と *K. pneumoniae* は LMOX と同様に特徴的な filament を形成した。グラム陰性菌では PBP 3 の親和性が高いことと付合した<sup>9)</sup>。この作用 2 時間で溶菌像は MIC 濃度付近で観察され、24 時間まで再増殖は起さなかった。

近年、cephalosporin 系の開発がグラム陰性菌の弱毒菌に指向するあまり、*S. aureus* への抗菌力が減弱される傾向が認められる。本剤は、グラム陽性菌、陰性菌に平均した強い抗菌力をもつ点に特徴をもつが、その意義は臨床使用による治療効果で明らかにされねばならない。

#### 文 献

- 1) TSUJI, T. ; H. SATOH, M. NARISADA, Y. HAMASHIMA & T. YOSHIDA : Synthesis and antibacterial activity of 6315-S, a new member of the oxacephem antibiotic. *J. Antib.* 38 (4) : 466~476, 1985
- 2) MURAKAMI, K. ; M. TAKASUKA, K. MOTOKAWA & T. YOSHIDA : 1-oxacephalosporins ; Enhancement of  $\beta$ -lactam reactivity and antibacterial activity. *J. Med. Chem.* 24 : 88~93, 1980
- 3) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司 : Oxacephem 系抗生物質 6059-S の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 28 (S-7) : 86~131, 1979
- 4) YOSHIDA, T. ; T. TSUJI, S. MATSUURA, T. MATSUBARA, Y. HARADA & S. KUWAHARA : 6315-S, a novel oxacephem for parenteral use ; Antibacterial activity and pharmacology. 23rd ICAAC, Abst. 265 Oct. 24, 1983 (Las Vegas)
- 5) 松原尚志, 大坪 龍, 小川文子 : ラットのアルコール代謝系に対する Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の影響。Chemotherapy 35 (S-1) : 460~469, 1987
- 6) 日本化学療法学会嫌気性菌 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 : 559~560, 1979
- 7) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) の

- 測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 8) 木村靖雄, 中清水 弘, 中野雅夫, 大坪 龍, 松原尚志, 吉田 正 ; Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の各種動物における体内動態。Chemotherapy 35 (S-1) : 161~175, 1987
- 9) 村上和久, 土肥正善, 野村和秀, 中本省三, 吉田正 ; Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の  $\beta$ -Lactamase に対する安定性とペニシリン結合蛋白質への親和性。Chemotherapy 35 (S-1) : 115~120, 1987
- 10) 島田 肇, 安達桂子, 田中喜久子, 上条仁子, 佐々木宗男, 畠山 勳, 稲松孝思, 浦山京子 ; セフェムを含む多剤耐性黄色ブドウ球菌の分離状況と 41 剤に対する感受性。Chemotherapy 31 : 835~841, 1983
- 11) 松本慶蔵, 工藤和治, 宇塚良夫, 渡辺貴和雄, 永武 毅, 力富直人, 高橋 淳, 鈴木 寛 ; 本邦における最近の病原性の明確な黄色ブドウ球菌 第 1 報  $\beta$ -lactam 剤感受性について。Chemotherapy 32 : 344~353, 1984
- 12) MURAKAMI, K. ; M. DOI, Y. KAMEDA, T. YOSHIDA & K. SHIMADA : Contribution of  $\beta$ -lactamase stability of 6315-S to its activity against cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. 24th ICAAC, Abst. 641, Oct. 8 : 1984 (Washington, D. C.)
- 13) 吉田玲子 ; *Staphylococcus aureus* のセフェム系抗生物質に対する耐性機構。日細菌誌 39 : 873~880, 1984
- 14) HARTMAN, B. J. & A. TOMASZ : Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 19 : 726~735, 1981
- 15) SABATH, L. D. : Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 3 (Suppl. c.) : 47~51, 1977
- 16) HARTMAN, B. J. & A. TOMASZ : Low-Affinity penicillin-binding protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 158 : 513~518, 1984
- 17) UBUKATA, K. ; N. YAMASHITA & M. KONNO : Occurrence of a  $\beta$ -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 27 : 851-857, 1985.
- 18) 村上和久, 野村和秀, 土肥正善, 吉田 正 ; Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌作用。Chemotherapy 35 (S-1) : 108~114, 1987

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 6315-S (FLOMOXEF),  
A NEW OXACEPHEM ANTIBIOTIC

YASUO KAMEDA, HIROSHI NAGATA, KIYOSHI MOTOKAWA,  
TAKASHI FUKAO, SHOZO NAKAMOTO, YOSHIHIRO WATANABE  
and TADASHI YOSHIDA  
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

6315-S (flomoxef) is a new semisynthetic oxacephem antibiotic for parenteral use. It proved highly active *in vitro* against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. These include staphylococci and most *Enterobacteriaceae* which are resistant to earlier  $\beta$ -lactam antibiotics.

The susceptibility of clinical isolates of pathogens was tested by the agar dilution method and compared with those of cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX) and latamoxef (LMOX). A majority of the tested strains of Gram-positive cocci other than enterococci were inhibited at doses of 6315-S lower than 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , showing activity similar to CEZ and superior to CMZ, CTX and LMOX. Additionally, methicillin- and cefazolin-resistant *S. aureus* (MRSA) were generally susceptible to 6315-S at concentrations of 0.78 to 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , but only a small portion of MRSA were resistant. Among Gram-negative bacteria, clinical isolates of *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., the *Proteus* group, *Alcaligenes*, *Moraxella* and *Haemophilus influenzae* were susceptible to less than 0.78  $\mu\text{g/ml}$  of 6315-S. 6315-S was as effective as LMOX and more active than CMZ and CTM against many strains of Gram-negative bacilli other than glucose-nonfermentative bacteria. *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile* were susceptible to less than 6.25  $\mu\text{g/ml}$  of 6315-S. Bacteria susceptible to 6315-S were killed by those MIC's. Medium pH, medium variation, serum supplement and inoculum size of bacteria influenced the antibacterial effectiveness of 6315-S only marginally.