

CS-807に関する細菌学的評価

宇津井幸男・井上松久*・三橋 進

エビゾーム研究所, 群馬大学・医学部・薬剤耐性菌実験施設*

新規経口用セファロスポリン系抗生剤 CS-807の細菌学的評価を実施した。本剤は prodrug であるため *in vitro* 抗菌力は活性代謝物 R-3763であらわした。

1) R-3763はグラム陽性菌群, グラム陰性菌群に幅広い抗菌スペクトルと強力な抗菌活性とを有し, 特に cephalexin, cefadroxil, cefaclor, amoxicillin に耐性の *C. freundii*, インドール陽性 *Proteus* 属, *M. morgani*, *E. cloacae*, *S. marcescens* などにも抗菌活性を発現した。また *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* には非常に強い抗菌力を示した。

2) R-3763の抗菌力は培地 pH, ウマ血清添加の著明な影響をうけなかったが, 接種菌量の増大に伴い若干の影響をうけた。

3) R-3763は β -lactamase 産生株を含む多くの菌種に強力な殺菌効果 (MBC/MIC) を示した。また *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* の増殖曲線に対し 1 MIC 以上の濃度で強い殺菌作用を示した。

4) R-3763は各種 β -lactamase に既存の経口 β -lactam 剤よりはるかに高い安定性を示した。

5) R-3763は *S. aureus* のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) 1, 3, 4 に, また *E. coli* の PBPs1A, 1B, 3 に高い親和性を示した。

6) CS-807は *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* などのグラム陽性菌や, 各種グラム陰性菌によるマウス実験的腹腔内感染症に cephalexin, cefadroxil, cefaclor, amoxicillin よりも優れた治療効果を示した。特に既存の経口剤の治療効果が及ばなかった β -lactamase 産生 *S. marcescens* の惹起する感染症にも非常に優れた治療効果が認められた。

近年, 幅広い抗菌スペクトルと強力な抗菌活性を示す多くの注射用セフェム系抗生剤が開発され, すでに臨床使用されている。他方, 既存の経口用セフェム剤の抗菌力は必ずしも十分ではなく, その抗菌スペクトルも比較的狭い^{1,2)}。また, 新規経口 β -lactam 剤 cefixime³⁾や T-2588⁴⁾はグラム陰性菌群には強い抗菌活性を示すが, グラム陽性の staphylococci には抗菌力が不十分である。

CS-807はセフェム環の7位側鎖に α -methoxyimino aminothiazole 基を導入したセファロスポリン誘導体 R-3763の4位カルボン酸に isopropoxycarbonyloxyethyl 基をエステル結合させることにより高い吸収性をめざした経口用セフェム剤であり, 主に腸管壁の esterase により加水分解され, 活性体として循環血中に存在すると考えられている⁵⁾。

CS-807の活性型 Na 塩 R-3746はグラム陽性菌群ならびにグラム陰性菌群に広範囲な抗菌スペクトルを示し,

特に既存の経口用 β -lactam 剤に感受性の低い *Citrobacter*, インドール陽性 *Proteus* 属, *Enterobacter*, *Serratia* にも良好な抗菌力を発現することが知られている⁶⁾。

今回, CS-807 (R-3763) の抗菌活性を評価するため cephalexin, cefadroxil, cefaclor, amoxicillin, cefixime, T-2588 (T-2525) などを対照薬として各種細菌学的試験を実施したので報告する。

I. 実験材料ならびに実験方法

1. 使用薬剤

CS-807, R-3746 (R-3763の Na 塩, 三共), cephalexin (CEX, 富山化学工業), cefadroxil (CDX, 万有製薬), cefaclor (CCL, 塩野義製薬), amoxicillin (AMPC, 万有製薬), cefixime (CFIX, 藤沢薬品工業), T-2588, T-2525 (富山化学工業), penicillin G (PCG, 万有製薬), cephaloridine (CER, 日本グラ

クソ)などを用いた。使用薬剤はいずれも力価に応じた重量補正を行ない実験に供した。

2. 使用菌株

MIC測定用標準菌株, 各種臨床分離菌株はエビゾーム研究所の保存株を用いた。

3. 使用培地と最小発育阻止濃度(MIC)の測定

使用培地は被験菌種により異なるため Table 1 にまとめて記した。なお *P. aeruginosa* の前培養には0.3%

Table 1 Media used for preculture and MIC determination

Media*	Organisms
For preculture	
BHIB	<i>S. pyogenes</i>
BHIB+5% Horse serum	<i>S. pneumoniae</i>
BHIB+1% Hemin+0.2% β -NAD	<i>H. influenzae</i>
GAMB	<i>B. fragilis</i>
STB	The other organisms
For MIC determination	
BHIA	<i>S. pyogenes</i>
BHIA+5% Horse blood	<i>S. pneumoniae</i>
BHIA+1% Hemin+0.2% β -NAD	<i>H. influenzae</i>
GAMA	<i>B. fragilis</i>
STA	The other organisms

* BHIB: Brain heart infusion broth (Difco), β -NAD: β -Nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma chemical Co.), GAMB: GAM broth (Nissui), STB: Sensitivity test broth (Nissui), BHIA: Brain heart infusion agar (Difco), GAMA: GAM agar (Nissui), STA: Sensitivity test agar (Nissui).

KNO₃添加 STBを用いた。

MIC測定は日本化学療法学会感受性測定法⁷⁾および日本化学療法学会嫌気性菌感受性測定法⁸⁾に従って実施した。被験菌株に対する MIC 累積百分率から MIC₉₀ を求めた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus FDA 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* GN6445, *P. mirabilis* GN4754, *S. marcescens* IAM 1184を被験菌として培地 pH(5.5, 7.0, 8.5), ウマ血清添加(10%, 25%)および接種菌量(10⁴~10⁸CFU/ml)の抗菌力に及ぼす影響を, STAを基礎培地とした寒天平板希釈法により上記感受性測定法⁷⁾に従って実施した。

5. 殺菌効果

(1) 最小殺菌濃度(MBC)の測定

Heart infusion broth(HIB, Nissui)で37°C 18時間前培養した各種被験菌液を薬剤含有の HIB に10⁸

CFU/mlとなるように接種し, 37°Cにて18時間培養後, 濁度変化の認められなかった最小薬剤濃度(MIC)を測定した。MIC以上の薬剤含有培地からマイクロプランター(MIT-P, 佐久間製作所)を用いて薬剤非含有 STA 上へ1 spot(5 μ l)接種し, 37°C 18時間培養後コロニー形成の認められない最小薬剤濃度を最小殺菌濃度(MBC)とした。

(2) 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus FDA 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* GN6445の HIB 前培養菌液を適宜希釈し, 試験管に移植後37°Cにて振盪培養した。約5 \times 10⁸CFU/mlに達した時点で薬剤を1/16~16MIC(HIBでのMIC)となるように添加した。さらに振盪培養を継続し, 経時的に菌液の一部を分取して生菌数を測定した。

6. β -Lactamase 安定性

すべての β -lactamase は当研究所に保存中の精製標品を適宜希釈し実験に供した。各基質はリン酸緩衝液(50mM, pH7.0)にて100 μ Mに調製し, β -lactamase 活性は spectrophotometric assay^{9,10)}により37°Cで測定した。各基質の加水分解速度は penicillinase(PCase)では PCG を, cephalosporinase(CSase)および cefuroximase(CXase)では CER を100としたときの相対加水分解速度であらわした。

7. ペニシリン結合蛋白質(PBPs)に対する親和性

S. aureus FDA 209P JC-1および *E. coli* NIHJ JC-2の対数増殖期の菌から超音波処理により膜画分を採取し, 蛋白量をそれぞれ8 mg/mlと20mg/mlに調製した。

SPRATT¹¹⁾らの方法に準じ, 無標識の R-3763, CCLと¹⁴C-PCG(54mCi/mmol, Amersham International Plc.)との競合による PBP 画分への結合親和性を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法およびフルオログラフィーによって検出した。さらに X線フィルム上の¹⁴C-PCGの感光度をデンストメーター(CS-910, 島津製作所)を用いて測定し, 50%阻害濃度(I₅₀)を算出した。

8. マウス感染治療実験

HIBまたはBHIB(streptococci)にて37°C, 18時間前培養した *S. aureus* Smith, *S. pneumoniae* 2132, *S. pyogenes* 1412, *E. coli* ML4707, *K. pneumoniae* GN6445, *P. mirabilis* GN4754, *S. marcescens* L-65(β -lactamase産生株)の菌液を適宜希釈し, *E. coli* ML4707を除き4% mucin液に懸濁して ICR 系雄マウス(1群10匹)の腹腔内に接種した。菌液接種直後

に0.5%carboxymethylcelluloseに懸濁した各薬剤を1回経口投与した。CS-807とT-2588はそれぞれR-3763, T-2525に換算して用いた。感染7日後の生存率から probit 法に基づいてED₅₀値と95%信頼限界を算出した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトル

R-3763の抗菌スペクトルをTable 2に示した。R-3763はグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群(*P. aeruginosa*を除く)に幅広い抗菌スペクトルを有していた。その抗菌力は*S. aureus*にCEX, CDX, CCL, T-2525とほぼ同等、また*S. pyogenes*にはAMPCに相当する優れたものであった。さらに各種グラム陰性菌にもCFIXやT-2525と同等の非常に小さいMIC値を示し、特に既存のCEX, CDX, CCL, AMPCなどに耐性の*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*にも良好な抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

各種臨床分離株に対するR-3763および対照薬の抗菌力(MIC)を累積百分率としてあらわしFig. 1~Fig. 18に示した。

(1) *S. aureus*

メチシリン感性の*S. aureus* 100株に対しR-3763は0.78~12.5 μ g/mlのMIC値を示した。そのMIC₉₀はCCLと同等の1.56 μ g/mlでありCEX, CDX, CFIX, T-2525を上廻る良好な抗菌力を有していた(Fig. 1)。また図には示していないがメチシリン耐性の*S. aureus* 45株には各薬剤ともほとんど抗菌力を有していなかった。

Fig. 1 Antibacterial activity against *S. aureus* (100 strains)

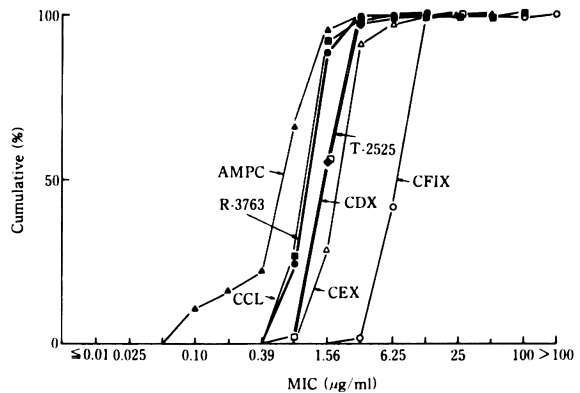
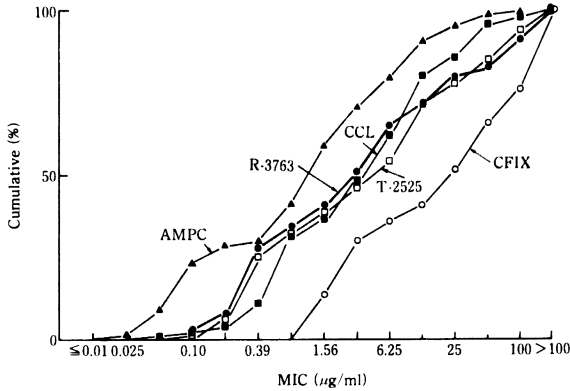


Table 2 Antibacterial spectra

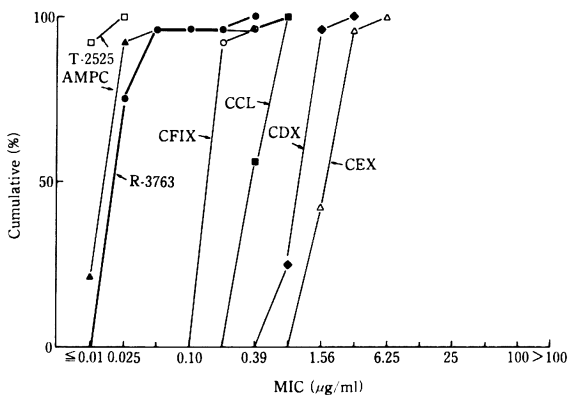
Organism	MIC (μ g/ml)						
	R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525
<i>S. aureus</i> FDA 209PJC-1	1.56	3.13	1.56	0.78	0.10	25	1.56
<i>S. aureus</i> Terajima	0.78	0.78	0.78	0.39	0.05	6.25	0.78
<i>S. aureus</i> MS 353	0.78	0.78	0.78	0.39	0.05	6.25	0.78
<i>S. pyogenes</i> Cook	≤ 0.01	0.39	0.10	0.05	≤ 0.01	0.05	0.025
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.05	0.05	0.025	≤ 0.01	≤ 0.01	0.78	≤ 0.01
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.10	0.39	0.39	0.05	≤ 0.01	1.56	0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	6.25	6.25	0.78	3.13	0.10	0.20
<i>E. coli</i> K-12 C600	0.39	6.25	6.25	1.56	3.13	0.20	0.20
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	≤ 0.01	1.56	3.13	0.20	25	≤ 0.01	≤ 0.10
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.10	3.13	3.13	0.39	0.78	≤ 0.01	0.10
<i>S. typhi</i> 901	0.10	3.13	6.25	0.39	0.39	≤ 0.01	0.10
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.025	6.25	12.5	0.78	0.39	≤ 0.01	0.025
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.10	1.56	3.13	0.20	0.20	≤ 0.01	0.05
<i>S. enteritidis</i> G14	≤ 0.01	3.13	6.25	0.39	0.39	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.20	>100	>100	>100	25	0.05	0.20
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	100	>100	>100	>100	>100	6.25	25
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10940	50	>100	>100	>100	>100	3.13	12.5
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	100	>100	>100	>100	>100	50	100
<i>M. morgani</i> IFO 3848	≤ 0.01	12.5	50	12.5	1.56	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.05	12.5	25	1.56	0.78	≤ 0.01	0.10
<i>P. vulgaris</i> OX-19	≤ 0.01	6.25	12.5	1.56	3.13	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>P. vulgaris</i> HX-19	≤ 0.01	12.5	12.5	1.56	3.13	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	≤ 0.01	6.25	3.13	0.78	0.39	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.78	>100	>100	100	>100	0.78	0.78
<i>E. cloacae</i> 963	0.78	>100	>100	100	>100	0.39	0.20

(2) *S. epidermidis*

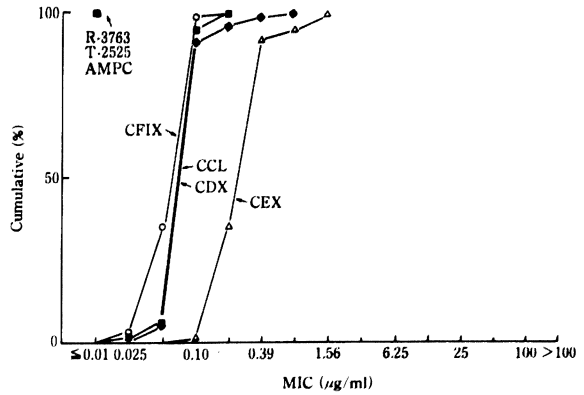
S. epidermidis 79株の R-3763に対する感受性は0.10~>100 $\mu\text{g/ml}$ と広範囲に分布した。R-3763は CCL, T-2525と同程度の抗菌力を示した (Fig. 2)。

Fig. 2 Antibacterial activity against *S. epidermidis* (79 strains)(3) *S. pneumoniae*

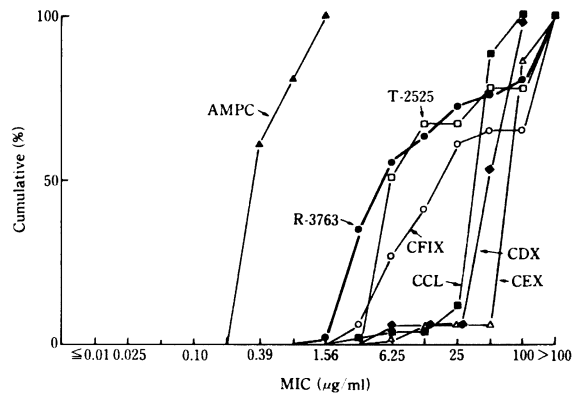
R-3763は *S. pneumoniae* 24株を0.025~0.39 $\mu\text{g/ml}$ で発育阻止し、その MIC_{80} は0.025 $\mu\text{g/ml}$ と AMPC にほぼ類似の強い抗菌力を示した (Fig. 3)。

Fig. 3 Antibacterial activity against *S. pneumoniae* (24 strains)(4) *S. pyogenes*

R-3763は *S. pyogenes* 79株すべてを0.01 $\mu\text{g/ml}$ 以下で発育阻止し CEX, CDX, CCL, AMPC, CFIX などよりも優れた抗菌力を有していた (Fig. 4)。

Fig. 4 Antibacterial activity against *S. pyogenes* (79 strains)(5) *E. faecalis*

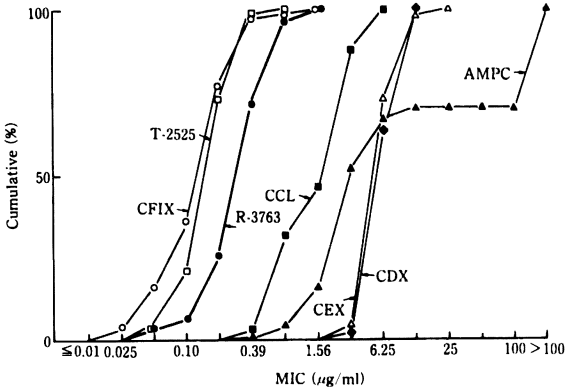
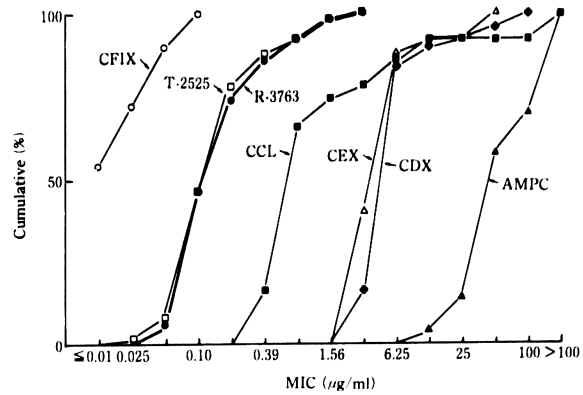
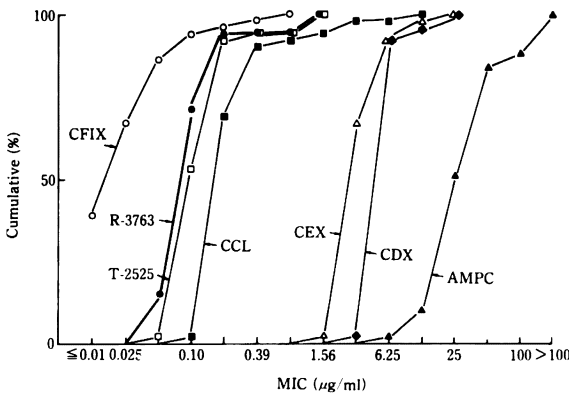
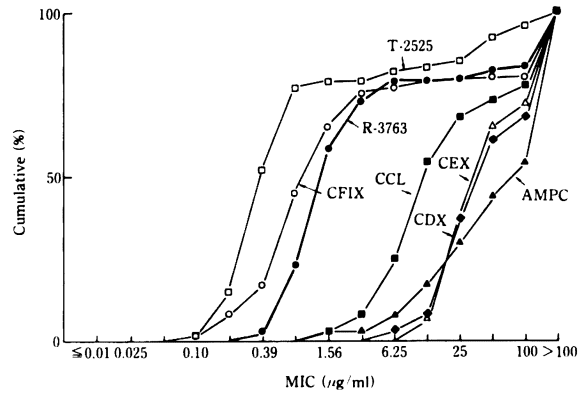
E. faecalis 49株は AMPC に良好な感受性を示したが、R-3763およびその他の対照薬には感受性の低下した株の存在が認められた (Fig. 5)。

Fig. 5 Antibacterial activity against *E. faecalis* (49 strains)(6) *E. coli*

R-3763は *E. coli* 91株を0.05~1.56 $\mu\text{g/ml}$ で発育阻止し、その MIC_{80} は0.39 $\mu\text{g/ml}$ と CEX, CDX, CCL, AMPC などよりも良好な抗菌力が認められた (Fig. 6)。

(7) *K. pneumoniae*

R-3763は *K. pneumoniae* 49株を0.05~1.56 $\mu\text{g/ml}$ で発育阻止し、 MIC_{80} は0.10 $\mu\text{g/ml}$ と優れた抗菌力を示した。その抗菌活性は T-2525 とほぼ同等で、CCL を1管程度、さらに CEX, CDX, AMPC よりも優れた成績であった (Fig. 7)。

Fig. 6 Antibacterial activity against *E. coli* (91 strains)Fig. 8 Antibacterial activity against *K. oxytoca* (50 strains)Fig. 7 Antibacterial activity against *K. pneumoniae* (49 strains)Fig. 9 Antibacterial activity against *C. freundii* (79 strains)(8) *K. oxytoca*

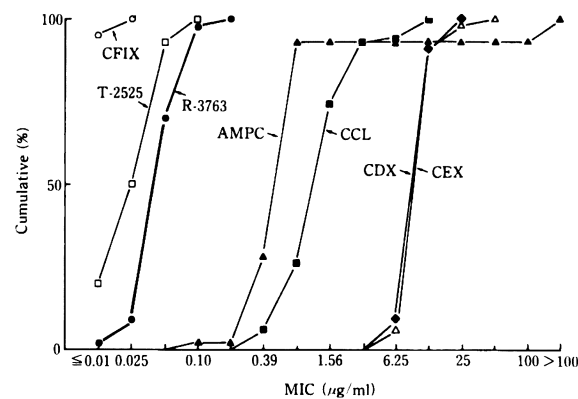
R-3763の *K. oxytoca* 50株に対する MIC値は0.05~3.13 $\mu\text{g/ml}$, MIC₅₀は0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は T-2525と同等で既存の経口用 β -lactam 剤よりもはるかに優れたものであった (Fig. 8)。

(9) *C. freundii*

C. freundii 79株に対する R-3763の MIC₅₀は12.5 $\mu\text{g/ml}$ で CFIX とほぼ同程度であり既存の経口用 β -lactam 剤よりも良好であった (Fig. 9)。

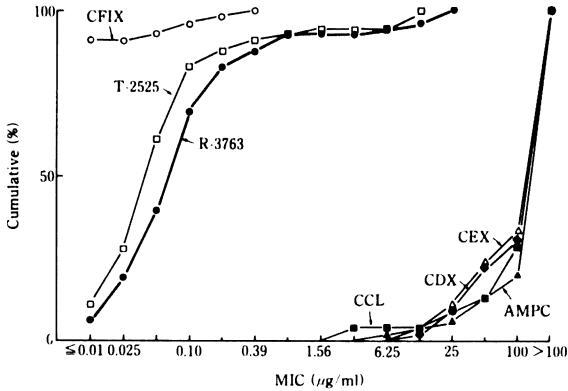
(10) *P. mirabilis*

R-3763は *P. mirabilis* 54株を0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全株発育阻止し、MIC₅₀は0.05 $\mu\text{g/ml}$ であった。AMPC, CCLも比較的小さい MIC値を示したが、R-3763は両剤および CEX, CDX よりも優れた抗菌活性を有していた (Fig. 10)。

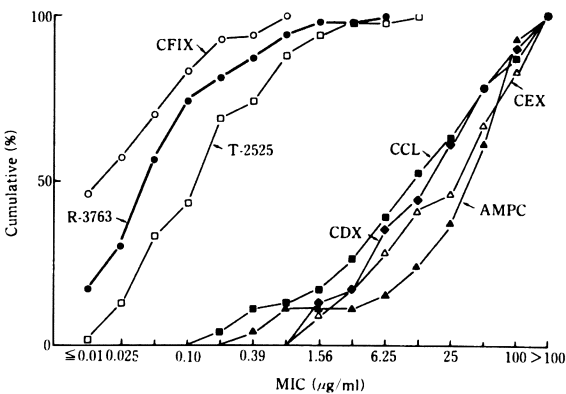
Fig. 10 Antibacterial activity against *P. mirabilis* (54 strains)

(11) *P. vulgaris*

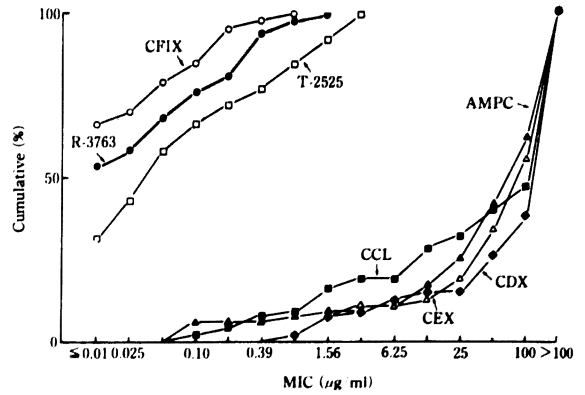
P. vulgaris 54株は既存の経口用 β -lactam 剤にそのほとんどが耐性であった。R-3763の MIC_{80} は $0.20\mu\text{g/ml}$ であり T-2525に1管程度及ばないものの、良好な抗菌力を有していた (Fig. 11)。

Fig. 11 Antibacterial activity against *P. vulgaris* (54 strains)(12) *P. inconstans*

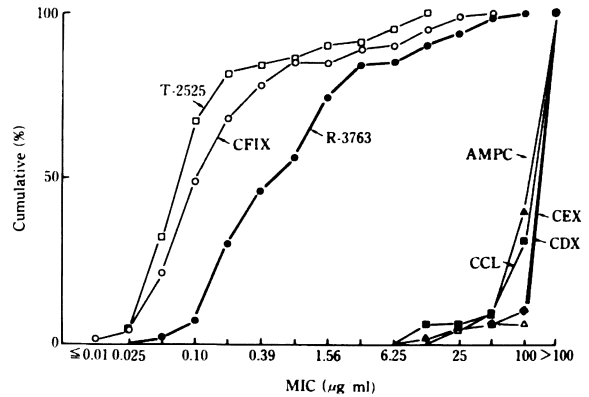
P. inconstans 54株は既存の経口剤に多数の耐性株が存在したが、R-3763の MIC_{80} は $0.20\mu\text{g/ml}$ と良好な抗菌力を示し、T-2525を1管程度上廻る成績であった (Fig. 12)。

Fig. 12 Antibacterial activity against *P. inconstans* (54 strains)(13) *P. rettgeri*

P. rettgeri 53株に対し R-3763は $\leq 0.01\sim 1.56\mu\text{g/ml}$ の非常に小さい MIC 値を持ち、 MIC_{80} は $0.20\mu\text{g/ml}$ と強い抗菌力を示した。R-3763の抗菌活性は T-2525を概ね1管上廻り、また既存の薬剤には多数耐性株の存在が認められた (Fig. 13)。

Fig. 13 Antibacterial activity against *P. rettgeri* (53 strains)(14) *M. morgani*

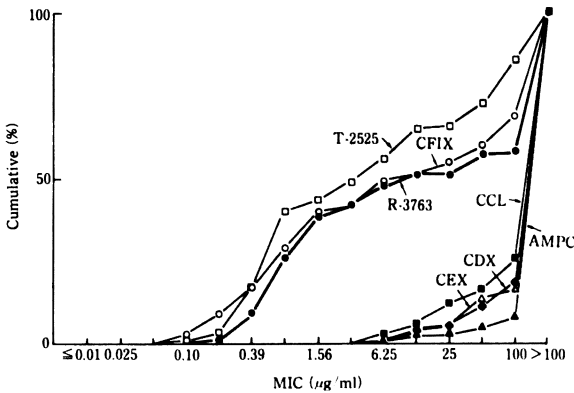
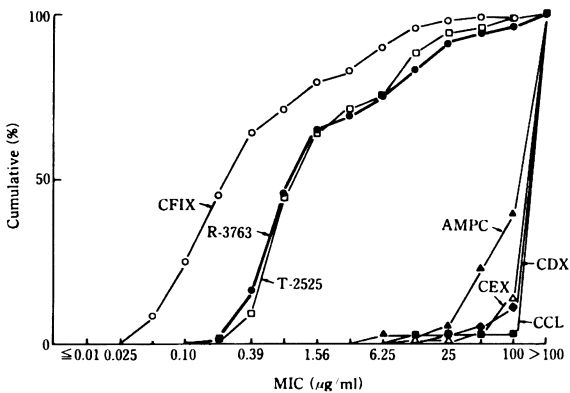
M. morgani 81株は既存の薬剤に耐性であったが、R-3763の MIC_{80} は $3.13\mu\text{g/ml}$ であり、比較的良好的な抗菌力を示した (Fig. 14)。

Fig. 14 Antibacterial activity against *M. morgani* (81 strains)(15) *E. cloacae*

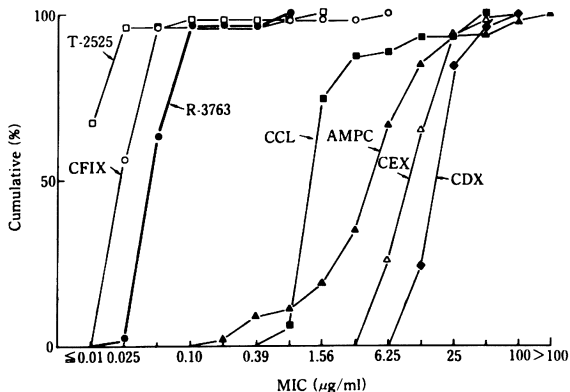
E. cloacae 77株も既存の薬剤に耐性であったが、R-3763には $0.20\sim >100\mu\text{g/ml}$ の幅広い感受性分布を示した。R-3763は CFIXと類似した中等度の抗菌力を有していた (Fig. 15)。

(16) *S. marcescens*

既存の経口用 β -lactam 剤は *S. marcescens* 80株にほとんど抗菌力を示さなかったが、R-3763は T-2525と同等の比較的良好的な抗菌活性を有していた (Fig. 16)。

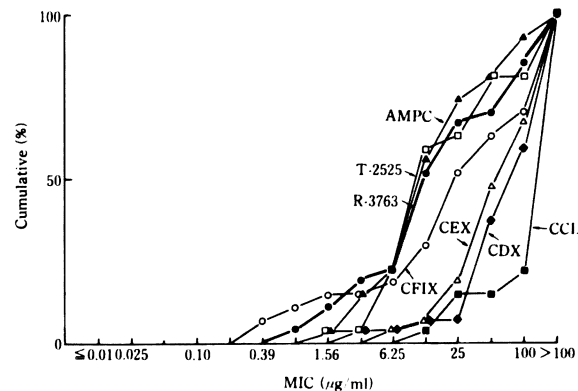
Fig. 15 Antibacterial activity against *E. cloacae* (77 strains)Fig. 16 Antibacterial activity against *S. marcescens* (80 strains)(17) *H. influenzae*

R-3763は *H. influenzae* 54株を0.05~0.78 µg/mlで発育阻止し、その MIC₅₀は0.10 µg/mlと既存の経口β-lactam剤よりも優れた強い抗菌力を有していた (Fig.17)。

Fig. 17 Antibacterial activity against *H. influenzae* (54 strains)(18) *B. fragilis*

B. fragilis 27株はその多くが R-3763と対照薬とに感受性を示さなかった (Fig.18)。

さらに図には示していないが R-3763とすべての対照薬剤は *P. aeruginosa* (27株)と *X. maltophilia* (26株)のほとんど全てを100 µg/mlでも発育阻止できなかった。

Fig. 18 Antibacterial activity against *B. fragilis* (27 strains)

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

R-3763および対照薬剤の抗菌力に及ぼす培地 pH, ウマ血清添加, 接種菌量の影響を Table 3~5 に示した。

(1) 培地 pH

S. aureus FDA 209P JC-1に対しては各薬剤とも酸性側で抗菌力の上昇がみられた。他方, グラム陰性菌4株に対しては一部例外はあるものの, 各薬剤とも中性もしくはアルカリ側で若干抗菌力が良好となる傾向が認められた (Table 3)。

(2) ウマ血清添加

R-3763はウマ血清の共存下でもほとんど抗菌力の低下がみられなかった。CCLは血清添加量の増大によって若干抗菌力が低下したが, 他の対照薬剤は大きな変動が認められなかった (Table 4)。

(3) 接種菌量

S. aureus FDA 209P JC-1に対しては菌量の増大に伴い CEX, AMPCの抗菌力が顕著に低下したが, R-3763, CDX, T-2525などは比較的影響を受け難かった。またグラム陰性菌に対しては各薬剤とも $10^5 \sim 10^7$ CFU/mlの範囲ではほとんど抗菌力は変動しなかったが, 10^8 CFU/mlの場合にやや抗菌力の低下する薬剤が認められた (Table 5)。

4. 殺菌効果

(1) MBC/MIC

β -Lactamase 産生株を含む16株に対する MBC/MIC の成績を Table 6 に示す。R-3763 はすべての被験菌株に対し MBC は MIC と同一か、1 管程度の差であり強い殺菌力を有していた。対照薬もほぼ R-3763 と

類似の傾向を示したが、CCL は一部の菌株に殺菌力が弱かった。

(2) 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus FDA 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* GN6445 の増殖に及ぼす R-3763 の影響を CCL, T-2525 と比較した。

Table 3 Influence of medium pH on antibacterial activity

Organism	Medium pH	MIC (μ g/ml)						
		R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525
<i>S. aureus</i> FDA 209PJC-1	5.5	0.05	1.56	1.56	0.39	0.10	0.39	0.10
	7.0	1.56	3.13	1.56	0.78	0.10	25	1.56
	8.5	3.13	6.25	3.13	6.25	0.10	50	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	5.5	0.78	50	100	3.13	1.56	0.39	0.78
	7.0	0.39	6.25	6.25	1.56	6.25	0.10	0.20
	8.5	0.39	12.5	12.5	12.5	6.25	0.20	0.20
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	5.5	0.20	100	100	6.25	100	0.20	0.20
	7.0	0.10	6.25	6.25	0.78	25	0.025	0.10
	8.5	0.10	6.25	3.13	1.56	50	0.05	0.10
<i>P. mirabilis</i> GN4754	5.5	0.20	>100	100	12.5	1.56	≤ 0.01	3.13
	7.0	0.025	6.25	6.25	0.78	0.39	≤ 0.01	0.025
	8.5	0.05	12.5	6.25	3.13	0.39	≤ 0.01	≤ 0.01
<i>S. marcescens</i> IAM1184	5.5	6.25	>100	>100	100	12.5	3.13	12.5
	7.0	0.39	>100	>100	>100	25	0.05	0.20
	8.5	0.39	>100	>100	>100	50	0.05	0.20

Table 4 Influence of horse serum on antibacterial activity

Organism	Horse serum (%)	MIC (μ g/ml)						
		R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525
<i>S. aureus</i> FDA 209PJC-1	0	1.56	3.13	1.56	0.78	0.10	25	1.56
	10	3.13	3.13	1.56	1.56	0.10	25	1.56
	25	3.13	6.25	1.56	3.13	0.05	25	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0	0.39	6.25	6.25	1.56	6.25	0.10	0.20
	10	0.39	6.25	6.25	6.25	6.25	0.05	0.20
	25	0.39	12.5	6.25	12.5	3.13	0.05	0.10
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	0	0.10	3.13	6.25	0.39	25	0.025	0.10
	10	0.10	3.13	3.13	1.56	25	0.025	0.10
	25	0.20	6.25	3.13	3.13	50	0.05	0.10
<i>P. mirabilis</i> GN4754	0	0.025	6.25	6.25	0.78	0.39	≤ 0.01	0.025
	10	0.025	6.25	6.25	3.13	0.39	≤ 0.01	0.025
	25	0.05	12.5	12.5	3.13	0.78	≤ 0.01	0.05
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0	0.39	>100	>100	>100	25	0.05	0.20
	10	0.39	>100	>100	>100	50	≤ 0.01	0.20
	25	0.39	>100	>100	>100	50	≤ 0.01	0.20

Table 5 Influence of inoculum size on antibacterial activity

Organism	Inoculum size (CFU/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525
<i>S. aureus</i> FDA 209PJC-1	9.2×10^7	6.25	6.25	3.13	1.56	6.25	50	3.13
	9.2×10^6	3.13	6.25	3.13	1.56	0.78	50	3.13
	9.2×10^5	1.56	3.13	1.56	0.78	0.10	25	1.56
	9.2×10^4	0.78	0.10	0.39	0.10	0.05	3.13	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.3×10^8	3.13	25	25	12.5	6.25	0.78	0.78
	1.3×10^7	0.78	25	12.5	3.13	6.25	0.39	0.39
	1.3×10^6	0.39	6.25	6.25	1.56	6.25	0.10	0.20
	1.3×10^5	0.39	6.25	6.25	1.56	6.25	0.10	0.20
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	1.2×10^8	0.78	25	6.25	1.56	100	0.05	0.39
	1.2×10^7	0.20	3.13	6.25	0.78	50	0.025	0.10
	1.2×10^6	0.10	3.13	6.25	0.39	25	0.025	0.10
	1.2×10^5	0.10	3.13	3.13	0.39	25	≤ 0.01	0.10
<i>P. mirabilis</i> GN4754	3.1×10^8	1.56	25	12.5	1.56	6.25	0.05	0.39
	3.1×10^7	0.05	6.25	6.25	0.78	1.56	≤ 0.01	0.025
	3.1×10^6	0.025	6.25	6.25	0.39	0.39	≤ 0.01	0.025
	3.1×10^5	0.025	6.25	6.25	0.39	0.39	≤ 0.01	0.025
<i>S. marcescens</i> IAM1184	1.4×10^8	6.25	>100	>100	>100	>100	0.10	6.25
	1.4×10^7	0.78	>100	>100	>100	50	0.10	0.78
	1.4×10^6	0.39	>100	>100	>100	25	0.05	0.20
	1.4×10^5	0.39	>100	>100	>100	25	≤ 0.01	0.20

Table 6 Bactericidal effect

Organism	MBC/MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525
<i>S. aureus</i> FDA 209PJC-1	6.25/6.25	6.25/6.25	3.13/3.13	1.56/1.56	0.10/0.10	100/100	6.25/6.25
<i>S. aureus</i> Smith	3.13/3.13	3.13/1.56	1.56/1.56	0.78/0.78	0.20/0.20	12.5/12.5	3.13/3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2*	1.56/0.78	12.5/12.5	25/25	6.25/6.25	6.25/6.25	0.78/0.78	0.39/0.39
<i>E. coli</i> ML4707	0.39/0.39	12.5/12.5	12.5/12.5	1.56/1.56	6.25/6.25	0.78/0.78	0.20/0.20
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.05/0.025	12.5/6.25	12.5/12.5	0.78/0.78	>100/>100	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.05/0.025
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	0.10/0.10	6.25/6.25	6.25/6.25	0.39/0.39	100/100	0.05/0.05	0.20/0.20
<i>P. mirabilis</i> IFO3849	0.10/0.05	100/25	50/50	12.5/3.13	1.56/1.56	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.20/0.10
<i>P. mirabilis</i> GN4754	0.025/0.025	12.5/12.5	6.25/6.25	0.78/0.39	0.39/0.39	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.05/0.05
<i>P. vulgaris</i> OX-19*	0.05/0.025	50/50	50/25	100/12.5	100/50	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.025/ ≤ 0.01
<i>P. vulgaris</i> GN76*	0.39/0.20	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.39/0.39
<i>P. rettgeri</i> IFO3850*	1.56/0.78	50/12.5	50/12.5	100/12.5	12.5/3.13	3.13/0.78	6.25/1.56
<i>P. rettgeri</i> GN4430*	0.78/0.78	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/100	0.05/0.05	0.78/0.78
<i>M. morgani</i> IFO3848*	0.05/0.05	100/100	>100/>100	50/50	25/12.5	$\leq 0.01/\leq 0.01$	0.025/0.025
<i>E. cloacae</i> 963*	6.25/6.25	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	6.25/3.13	0.78/0.78
<i>S. marcescens</i> IAM1184*	1.56/1.56	>100/>100	>100/>100	>100/>100	50/25	0.78/0.39	1.56/1.56
<i>S. marcescens</i> L-65*	6.25/3.13	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	3.13/3.13	6.25/6.25

* : β -lactamase-producing strains.

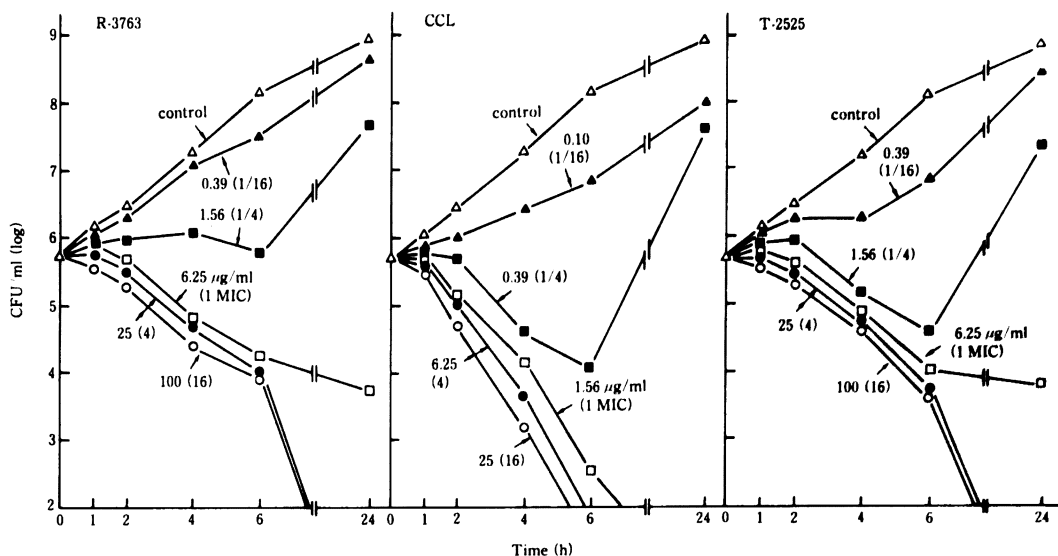
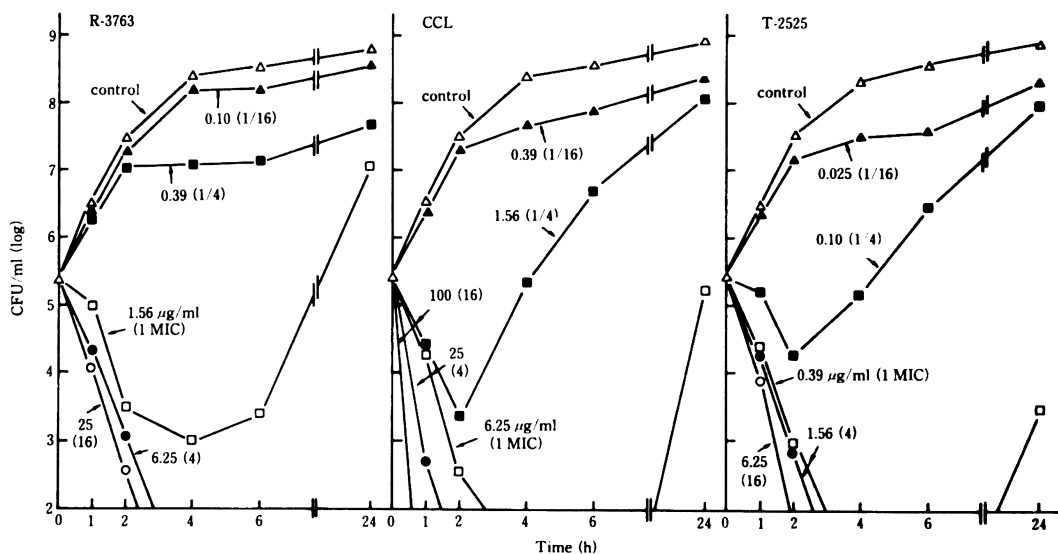
S. aureus に対し R-3763, CCL, T-2525 とも 1/4 MIC 添加では静菌作用を示したが, 1 MIC 以上では殺菌作用を発現し, 24時間後まで継続した (Fig.19)。

E. coli に対し各薬剤とも 1/4 MIC 添加で静菌作用を, また 1 MIC 以上の添加で短時間内に強力な殺菌作用を発現した。24時間後の完全殺菌はそれぞれの 4 MIC, 16 MIC で達成された (Fig.20)。

K. pneumoniae に対してはどの薬剤も dose response のある生菌数の増減を示し, 1 MIC 以上で殺菌的に作用した。24時間後には R-3763 と T-2525 は 4 MIC 以上で完全殺菌を達成したが, CCL は 4 MIC 添加でも再増殖を許した (Fig.21)。

5. β -lactamase 安定性

各種 β -lactamase に対する安定性を Table 7 に示

Fig. 19 Time-kill curves against *S. aureus* FDA 209PJC-1Fig. 20 Time-kill curves against *E. coli* NIHJ JC-2

した。

R-3763は *P. vulgaris* GN7919や *P. cepacia* GN11164の産生するCXaseを除く他のPCase, CSase, CXaseによってほとんど分解を受けず, CFX とほぼ同等の高い β -lactamase 安定性を有していた。CEX, CDX, CCLなどはCSaseやCXaseに, またAMPCはPCaseやCXaseに加水分解され易く, さらにT-2525は一部の酵素にやや不安定であった。

6. PBP_sに対する結合親和性

S. aureus FDA 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2から調製したPBP_sに対するR-3763と¹⁴C-PCGとの競合結合阻害実験の成績をFig. 22に, さらに50%阻害濃度(I₅₀)をTable 8に示した。

R-3763は *S. aureus* のPBP_s 1, 3, 4に高い親和性を示し, PBP 2に対する親和性も良好であった。CCLはPBP 3への親和性がR-3763よりも高かったが,

Fig. 21 Time-kill curves against *K. pneumoniae* GN6445

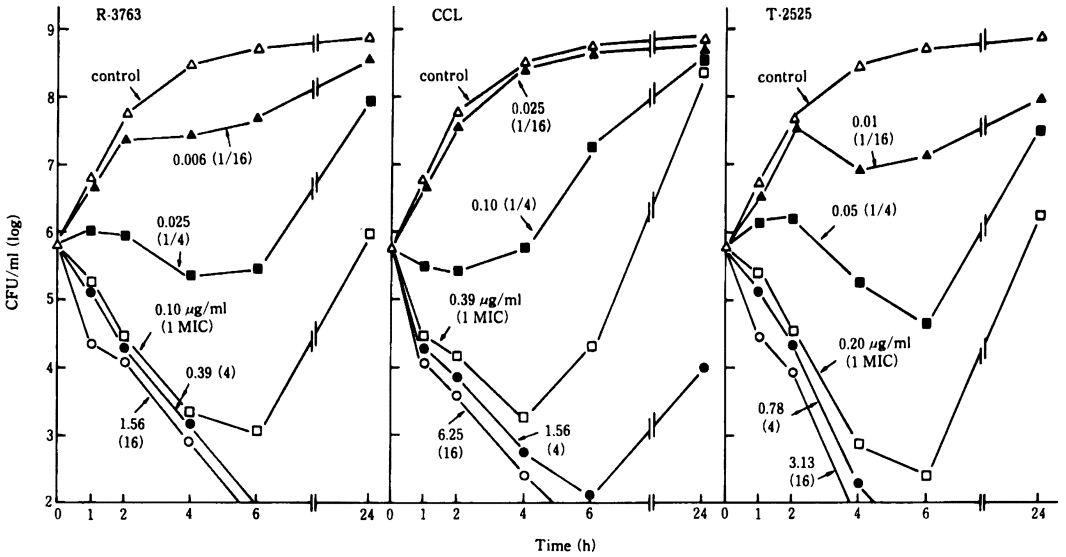


Table 7 β -lactamase stability

Enzyme source	Relative hydrolysis rate (%)								
	R-3763	CEX	CDX	CCL	AMPC	CFIX	T-2525	PCG	CER
PCase									
Rms212/ <i>E. coli</i> W3630 (type I)	<0.1	0.1	0.2	1.6	110	<0.1	<0.1	100	-
Rms213/ <i>E. coli</i> W3636 (type II)	2.3	0.3	0.7	10	730	0.4	22	100	-
Rte16/ <i>E. coli</i> ML1410 (type III)	0.2	0.2	0.1	24	97	<0.1	0.1	100	-
pCR1::Tn2101/ <i>E. coli</i> ML4905 (type IV)	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	130	0.1	0.1	100	-
CSase									
<i>E. coli</i> GN5482	1.2	35	46	180	7.1	0.4	0.7	-	100
<i>C. freundii</i> GN7391	0.4	29	48	78	3.4	0.1	0.4	-	100
<i>P. rettgeri</i> GN4430	6.0	24	28	150	3.9	3.3	18	-	100
<i>M. morgani</i> GN5407	0.8	22	29	130	6.9	0.9	2.3	-	100
<i>E. cloacae</i> GN7471	0.6	29	30	80	1.5	0.2	0.4	-	100
<i>S. marcescens</i> GN10857	5.2	36	45	210	1.9	4.4	6.2	-	100
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	2.2	30	30	110	6.2	0.8	1.4	-	100
CXase									
<i>K. oxytoca</i> GN10650	4.2	4.6	6.5	84	290	0.8	7.3	-	100
<i>P. vulgaris</i> GN7919	11	26	46	140	27	1.4	28	-	100
<i>P. cepacia</i> GN11164	54	46	64	97	180	1.3	65	-	100

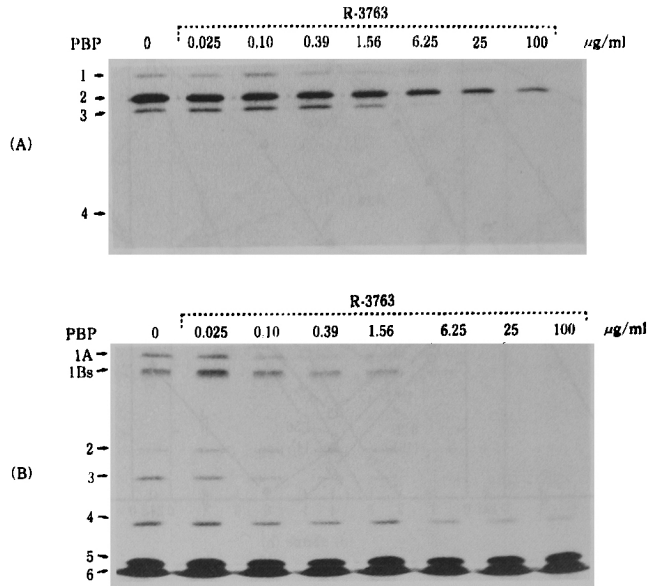
- : Not tested.

PBP 2には低かった。また *E. coli* に対して R-3763 は PBP 3に最も高い親和性を示し、次いで1A, 1Bs, 2の順に良好であった。CCLの結合親和性はどの PBP画分に対しても R-3763を下廻る成績であった。

7. マウス感染治療実験

各種菌株を用いたマウス実験的腹腔内感染症に対する

治療効果を Table 9に示した。*S. aureus* Smith株の感染症に対する CS-807の治療効果は現存経口用 β -lactam 剤に及ばなかったものの、CFIXや T-2588を上廻る成績であった。しかし、*S. pneumoniae* 2132株や *S. pyogenes* 1412株の感染症に対しては、CS-807は非常に優れた治療効果を示し、CCLや T-2588と同

Fig. 22 Competition of R-3763 with ¹⁴C-PCG for binding to PBPs(A) : *S. aureus* FDA 209PJC-1, (B) : *E. coli* NIHJ JC-2Table 8 Competition of R-3763 and CCL with ¹⁴C-PCG for binding to PBPs

PBPs	Iso ($\mu\text{g/ml}$)			
	1	2	3	4
R-3763	0.3	2.4	0.9	0.1
CCL	0.6	8.4	0.2	0.1

S. aureus FDA 209PJC-1

PBPs	Iso ($\mu\text{g/ml}$)						
	1A	1Bs	2	3	4	5	6
R-3763	0.6	0.8	2.2	0.4	13.0	>100	>100
CCL	2.3	14.2	29.7	5.2	18.0	>100	>100

E. coli NIHJ JC-2

等で CEX, CDX, CFIX を上廻る成績であった。 *E. coli* ML4707, *K. pneumoniae* GN6445, *P. mirabilis* GN4754, *S. marcescens* L-65 などグラム陰性菌の惹起する感染に対して CS-807 は小さい ED₅₀ 値を示した。その治療効果は既存の薬剤よりも優れており、さ

らにわずかながらも T-2588 を上廻り CFIX とほぼ同等の成績であった。特に既存の CEX, CDX, CCL, AMPC などの ED₅₀ 値が >100mg/kg と治療効果を示さない β -lactamase 産生性の *S. marcescens* L-65 株による感染症に対しても、CS-807 は優れた治療効果を示したのが特長であった。

III. 考 察

CS-807 の生体内活性代謝物 R-3763 はセフェム環の 7 位に α -methoxyimino aminothiazole 基を持ち、いわゆる第三世代セフェム系抗生剤とよばれる cefotaxime, ceftizoxime, cefmenoxime などと共通の構造を有している。今回の実験成績から R-3763 はこれら第三世代セフェム剤と同様グラム陽性菌、グラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトルを有し、かつ強力な抗菌活性を示した。とくに現在臨床使用されている経口用 β -lactam 抗生剤 CEX, CDX, CCL, AMPC などの抗菌力が及ばなかった β -lactamase 産生性の *C. freundii*, インドール陽性の *Proteus* 属, *M. morgani*, *E. cloacae*, *S. marcescens* にも比較的良好な抗菌力を発現した。また R-3763 は各菌種由来の PCase, CSase に高い安定性を有しており、このことが上記菌種に R-3763 が良好な抗菌活性を示す一因であろう。さらに R-3763 は *S. aureus* の PBPs 1, 3, 4 ならば

Table 9 Protective effect on intraperitoneal infections in mice

Organism	Challenge dose (CFU/mouse)	Antibiotics	ED ₅₀ (mg/kg)	MIC (μ g/ml)
<i>S. aureus</i> Smith	1.1 \times 10 ⁷ * (16 LD ₅₀)	CS-807	3.56 (2.26-5.33)	1.56**
		CEX	0.44 (0.30-0.77)	1.56
		CDX	0.48 (0.34-0.74)	1.56
		CCL	0.14 (0.09-0.23)	0.78
		AMPC	0.06 (0.04-0.09)	0.10
		CFIX	55.4 (38.3-80.9)	12.5
		T-2588	41.7 (29.8-58.9)	1.56***
<i>S. pneumoniae</i> 2132	3.6 \times 10 ⁸ * (14 LD ₅₀)	CS-807	0.57 (0.38-0.76)	0.025**
		CEX	23.8 (16.3-34.9)	3.13
		CDX	16.2 (11.6-22.4)	3.13
		CCL	1.31 (0.78-2.15)	0.10
		AMPC	0.09 (0.06-0.13)	\leq 0.01
		CFIX	13.7 (9.69-19.4)	0.20
		T-2588	0.65 (0.44-1.04)	\leq 0.01***
<i>S. pyogenes</i> 1412	4.1 \times 10 ⁶ ** (24 LD ₅₀)	CS-807	0.16 (0.09-0.28)	\leq 0.01**
		CEX	0.61 (0.38-0.95)	0.39
		CDX	0.59 (0.37-0.93)	0.39
		CCL	0.13 (0.08-0.20)	0.05
		AMPC	0.08 (0.05-0.13)	\leq 0.01
		CFIX	1.15 (0.74-1.83)	0.10
		T-2588	0.15 (0.10-0.23)	0.025***
<i>E. coli</i> ML4707	1.1 \times 10 ⁷ * (15 LD ₅₀)	CS-807	1.38 (0.85-2.23)	0.20**
		CEX	25.9 (14.4-49.0)	6.25
		CDX	23.5 (13.9-53.1)	6.25
		CCL	3.68 (2.08-7.25)	0.78
		AMPC	8.65 (5.52-13.0)	6.25
		CFIX	1.71 (1.09-2.66)	0.20
		T-2588	2.29 (1.30-5.02)	0.10***
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	2.0 \times 10 ⁷ * (21 LD ₅₀)	CS-807	1.12 (0.71-1.83)	0.05**
		CEX	20.0 (11.9-32.7)	3.13
		CDX	27.5 (18.7-40.8)	6.25
		CCL	11.9 (7.69-18.2)	0.39
		AMPC	>100	25
		CFIX	0.75 (0.48-1.20)	0.025
		T-2588	3.61 (2.24-5.74)	0.10***
<i>P. mirabilis</i> GN4754	1.9 \times 10 ⁷ * (40 LD ₅₀)	CS-807	0.67 (0.42-1.09)	0.025**
		CEX	35.0 (23.0-56.5)	6.25
		CDX	32.0 (22.7-45.5)	6.25
		CCL	4.68 (2.95-8.22)	0.39
		AMPC	1.98 (1.29-3.18)	0.39
		CFIX	0.54 (0.35-0.84)	\leq 0.01
		T-2588	1.90 (0.44-4.27)	0.025***
<i>S. marcescens</i> L-65****	1.1 \times 10 ⁷ * (100 LD ₅₀)	CS-807	1.31 (0.29-2.60)	1.56**
		CEX	>100	>100
		CDX	>100	>100
		CCL	>100	>100
		AMPC	>100	>100
		CFIX	0.63 (0.35-1.05)	0.78
		T-2588	4.04 (1.89-7.01)	0.78***

* : With 4% mucin.

** : MIC of R-3763.

*** : MIC of T-2525.

**** : β -lactamase-producing strain.

() : 95% confidence limit.

に *E. coli* では PBP_s 1A, 1B_s, 3 などに高い親和性を示した。R-3763の優れた抗菌力は β -lactamase に対する高い安定性と、作用標的である PBP_s への高い親和性に基づくものと考えられる。

マウス腹腔内感染症に対する治療成績は、*S. aureus*

の場合 CS-807は CEX, CDX, CCL, AMPC に及ばなかったが、*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* さらには各種グラム陰性菌による感染に非常に優れた治療効果を発現した。ことに上記4薬剤の *in vivo* 効果が全く及ばない β -lactamase 産生菌による感染症にも優れた治

療成績を示し、*in vitro* の抗菌力が治療効果にも反映されているものと思われる。さらに CS-807 の優れたマウス治療実験成績は R-3763 の強い抗菌力のみならず、CS-807 経口投与後における活性体の高い血中濃度の持続⁹⁾によるものと考えられる。また R-3763 が血清蛋白との結合率の低い (47%)⁹⁾ ことも CS-807 の良好な治療効果をもたらす一因と考えられる。

近年、現有経口用 β -lactam 剤に感性的な各種病原菌による感染症が多くなってきているが、一方で呼吸器感染症における *S. pneumoniae*, *H. influenzae* あるいは尿路感染症における *E. coli*, *K. pneumoniae* などは依然として重要な起炎菌の位置を占めている。R-3763 はこれらの菌種にも非常に強力な抗菌活性を示しているため、CS-807 は臨床治療においてもその抗菌活性の特長を十分に発揮し得るものと期待される。

文 献

- 1) BILL, N. J. & J. A. WASHINGTON: Comparison of *in vitro* activity of cephalexin, cephradine, and cefaclor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 470-471, 1977.
- 2) NEU, H. C. & K. P. FU: Cefatrizine activity compared with that of other cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 209-212, 1979
- 3) 井上松久, 井上邦雄, 三橋 進: 新しい経口セファロsporin系薬剤 Cefixime (CFIX) に対する細菌学的検討。 *Chemotherapy* 33(S-6): 1-12, 1985
- 4) 岡本世紀, 浜名洋子, 三橋 進, 井上松久: T-2588 に関する細菌学的評価。 *Chemotherapy* 34(S-2): 1-12, 1986
- 5) KOMAI, T. ; K. FUJIMOTO, M. IWATA, M. SEKINE & H. MASUDA: CS-807, a new orally active cephalosporin. II. Absorption-excretion studies in experimental animals. *Program Abstr. Inter-ci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* 26, abstr. no. 593, 1986
- 6) SUGAWARA, S. ; M. IWATA, M. TAJIMA, T. MAGARIBUCHI, H. YANAGISAWA, H. NAKAO, J. KUMAZAWA & S. KUWAHARA: CS-807, a new orally active cephalosporin. I. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Program Abstr. Inter-ci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* 26, abstr. no. 592, 1986
- 7) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76-79, 1981
- 8) 嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 27: 559-560, 1979
- 9) ROSS, G. W. ; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O'CHALLAGHAN: Comparison of assay technique for beta-lactamase activity. *Anal. Biochem.* 54: 9-16, 1973
- 10) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780-789, 1974
- 11) SPRATT, B. G. & A. B. PARDEE: Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254: 516-517, 1975

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CS-807, A NEW ORAL CEPHALOSPORIN

YUKIO UTSUI, MATSUHISA INOUE* and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute, Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University*, Maebashi

The antibacterial activities of CS-807, a new orally absorbable cephalosporin, were compared with those of cephalexin (CEX), cefadroxil (CDX), cefaclor (CCL), amoxicillin (AMPC), cefixime (CFIX), and T-2588. The results are as follows.

- 1) R-3763, active compound of CS-807, possessed broad antibacterial spectra together with potent activities against both Gram-positive and Gram-negative pathogens, namely, *C. freundii*, indole-positive *Proteus* sp., *M. morgani*, *E. cloacae*, and *S. marcescens* insusceptible to CEX, CDX, CCL, and AMPC. Moreover, R-3763 was very active against *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *H. influenzae*.
- 2) The activity of R-3763 was scarcely influenced by changes in pH of medium or co-existence of horse serum in medium, but was slightly affected by an increase in inoculum size.
- 3) R-3763 showed the potent bactericidal activity (MBC/MIC) against various species of bacteria including β -lactamase-producing strains. Time-kill studies against *S. aureus*, *E. coli*, and *K. pneumoniae* showed potent bactericidal activity of R-3763 at concentrations above the MIC level.
- 4) R-3763 was highly resistant to hydrolysis by β -lactamases from various organisms, and its β -lactamase stability was much higher than that of CEX, CDX, CCL, and AMPC.
- 5) R-3763 showed high affinity for penicillin-binding proteins (PBPs) 1, 3, 4 of *S. aureus*, and PBPs 1A, 1Bs, 3 of *E. coli*.
- 6) The therapeutic efficacy of CS-807 against experimental intraperitoneal infections caused by Gram-positive cocci such as *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, and Gram-negative bacilli was superior to that of CEX, CDX, CCL, and AMPC. In addition, CS-807 was very active against systemic infection caused by *S. marcescens*, a β -lactamase-producing strain, on which orally available β -lactam antibiotics were not effective.