

新経口用セファロスポリン CS-807の細菌学的評価 第4報 黄色ブドウ球菌のメチシリン感受性と CS-807の抗菌活性

宇津井幸男・安食洋子・勝田光大・土門春樹

梅澤純子・曲淵輝夫・安田 紘・田島政三

岩田正之

三共株式会社 生物研究所

1) 新鮮臨床分離 *S. aureus* 1,000 菌株を日本化学療法学会規定の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法によるメチシリン (DMPPC) 感受性にに基づき 3 群に分類した。

① DMPPC に $1.56\mu\text{g/ml}$ の菌株は接種菌量, 培養温度の相違による感受性変化をほとんど示さなかった。

② DMPPC に $3.13\mu\text{g/ml}$ の菌株のうち, 約 30% は 10^8 CFU/ml \cdot 1 spot 接種あるいは 30°C 培養で 2 管以上感受性が低下した。

③ DMPPC に $6.25\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株は前記条件下で感受性低下が顕著に認められた。

2) DMPPC に $6.25\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株には耐性要因である PBP2' が検出されたが, $1.56\mu\text{g/ml}$ の菌株には検出されなかった。また DMPPC に $3.13\mu\text{g/ml}$ の菌株には PBP2' が検出される株と検出されない株とが存在した。

3) メチシリン感受性成績ならびに PBP2' の存在から, DMPPC に $6.25\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株をメチシリン耐性株 (MRSA, 270 株) と定義した。また DMPPC に $3.13\mu\text{g/ml}$ 以下の菌株はメチシリン感性株 (MSSA, 730 株) に区分した。

4) CS-807 の生体内活性代謝物 R-3763 は MSSA に対し, cephalexin と同等の抗菌力 (MIC_{50} : $3.13\mu\text{g/ml}$) を保有していた。

5) CS-807 は MSSA によるマウス腹腔内感染に対し, 供試菌株の penicillinase (PCase) 産生に関係なく一定した治療効果 (ED_{50} : $6.8\sim 29.4$ mg/kg) を発現した。Cefaclor (CCL) と amoxicillin (AMPC) は PCase 非産生菌株による感染には CS-807 を上回る治療効果を示したが, PCase 産生菌株に対する ED_{50} 値は両剤とも大きな幅があった。

6) MSSA に対する液体培地中での抗菌作用 ($2.5\mu\text{g/ml}$ 添加) を調べると, R-3763 は PCase 産生株, 非産生株とも約 90% を増殖抑制した。他方, CCL, AMPC は前者の約 90% に増殖抑制効果を発現したが, 後者に対しては各々 25%, 4% を増殖抑制したにとどまった。

以上の結果から, CS-807 は MRSA を除く *S. aureus* に対し, PCase 産生の有無にかかわらず, 優れた抗菌活性を保有することが明らかとなった。

CS-807 はグラム陽性菌, グラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を保有するエステル型の経口用セファロスポリン剤である¹⁾。その活性体 R-3763 は 7 α 位に aminothiazole 基と methoxyimino 基を持ち, いわゆる第三世代セフェム系抗生剤と呼ばれる cefotaxime, ceftizoxime, cefmenoxime などと構造類似のセファロスポリン誘導体である。一般に第三世代セ

フェム系抗生剤は強い抗グラム陰性菌活性を発現するが, グラム陽性菌, ことに *S. aureus* に対する抗菌力は第一, 第二世代セフェム系抗生剤よりもむしろ劣っている²⁻⁴⁾。しかし R-3763 は上記第三世代セフェム系抗生剤と類似構造を持ちながら, グラム陰性菌のみならず *S. aureus* にも優れた抗菌活性を保有すると報告されている⁵⁾。

近年, *S. aureus* は薬剤感受性変化が顕著に認めら

れ⁹⁻¹¹⁾, 特に1980年以降, 抗黄色ブドウ球菌作用の弱い第三世代セフェム系抗生剤の汎用により, methicillin (DMPPC) および各種セフェム系抗生剤に耐性を示す株 (MRSA) の分離頻度も増加している⁹⁻¹²⁾。今回, 私共は CS-807 の *S. aureus* に対する抗菌活性を評価するにあたり, 今日のように *S. aureus* の薬剤感受性が変化しつつある状況下では新鮮分離株を用いて精査することが重要と考えた。そこで昭和57~61年に国内39病院で各種臨床材料から分離された *S. aureus* 1,000 菌株の DMPPC 感受性に及ぼす接種菌量, 培養温度の影響を詳細に検討し, それらの成績と MRSA の耐性機構である PBP2¹³⁻¹⁶⁾ の存在様式とから MRSA と MSSA との区分を試みた。さらに, R-3763 の MSSA に対する試験管内抗菌力を既存の経口用 β -lactam 剤と比較した。また, MSSA によるマウス腹腔内感染に対する CS-807 の治療効果を調べ, *in vivo* 効果の解析も行なったので報告する。

I. 実験材料ならびに実験方法

1. 使用菌株

全国39病院から分与を受けた *S. aureus* 1,000 菌株を実験に用いた。年度別の分離株数は昭和57年39株, 58年54株, 60年225株, 61年682株であった。供試菌株の分離地域と株数は, 北海道87株(3病院), 東北61株(4), 関東184株(8), 中部165株(5), 近畿169株(6), 中国95株(5), 四国173株(4), 九州66株(4)などであり, 菌株数, 施設数とも地域的に大きな偏りは見られなかった。また, 菌株の由来は, 膿(281株), 喀痰(149株), 咽頭(122株), 耳漏(121株)などが優位を占めたが, 分離材料にも特定の偏りは見られなかった。

2. 使用抗生剤

CS-807 (lot S-11) と R-3746 (R-3763 の Na 塩, lot 9) は三共研究所合成品を, cephalixin (CEX, 塩野義製薬), cefaclor (CCL, 塩野義製薬), methicillin (DMPPC, 万有製薬), ampicillin (ABPC, 明治製薬), amoxicillin (AMPC, 協和醸酵)などは市販製剤を用いた。なお各薬剤は力価に応じた重量補正を行なって実験に供した。

3. 薬剤感受性測定法

S. aureus の各種薬剤に対する感受性測定は最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法¹⁶⁾に従って実施した。被験菌株は Mueller-Hinton broth (MHB, BBL) にて 37°C 20 時間培養し, 各々の菌液を 10⁸ CFU/ml, 10⁶ CFU/ml レベルとなるよう新鮮 MHB で適宜希釈した。それぞれの希釈菌液をマイクロプランター (MIT-P 型, 佐久間製作所) を用い, 100 μ g/ml から 2 倍希釈系列の薬剤を

含有する Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA, BBL) 平板上に 1 spot 接種した。各平板は 37°C または 30°C で 20 時間培養し, 最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

4. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) の検出

a) Penicillinase-plasmid の除去

供試 13 菌株のうち penicillinase (PCase) 産生性の 8 菌株は耐性に及ぼす PCase の関与を排除し, さらに PBPs 検出過程で ¹⁴C-penicillin G (¹⁴C-PCG) が水解されるのを避けるため plasmid の除去を行なった。

上記 8 菌株を L-broth 中で 44°C 18 時間振盪培養し, 10⁻⁶ 希釈した菌液 0.1 ml を薬剤非含有 heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板上に一様に塗抹後, 37°C 18 時間培養した。各平板を ABPC 10 μ g/ml 含有 HIA 平板と薬剤非含有 HIA 平板とにレプリカし, それらを 37°C 18 時間培養した。ABPC 10 μ g/ml 含有平板上には生育せず, 薬剤非含有平板上に生育したコロニー (PCase 非産生菌株) を MHB にて 37°C 20 時間培養した。各菌液 0.3 ml とニトロセフィン (200 μ g/ml, 三共研究所合成) 0.1 ml とを反応させて PCase 陰性を確認後, DMPPC 感受性を各々の親株とともに調べた。

b) 膜画分の調製

DMPPC 感受性に親株との差が認められなかった PCase 非産生菌株 8 株および PCase 非産生性の供試菌株 5 株から, 前報¹⁷⁾の方法に従って膜画分を分離した。蛋白量は 8 mg/ml となるよう調製した。

c) PBPs の検出

PBPs の検出は SPRATT¹⁸⁾らの方法に準じて実施した。すなわち 30 μ l の膜画分浮游液に 3 μ l の ¹⁴C-PCG (0.15 μ Ci, Amersham International Plc.) を添加し, 30°C 10 分間反応させた。各サンプルを sarkosyl (東京化成) で処理し, さらに 100°C にて 2 分間加熱後, ポリアクリルアミド (10% acrylamide-0.06% bisacrylamide, 生化学工業) ゲル電気泳動によって蛋白質を分離した。フルオログラフィーは前報¹⁷⁾の方法に従って実施した。

5. マウス腹腔内感染に対する治療試験

供試菌株は trypticase soy broth (TSB, BBL) にて 37°C 20 時間培養し, 各菌株の毒力に応じて適宜希釈した。それぞれの希釈菌液を 5% gastric mucin (東京化成工業) 液に懸濁し, その 0.2 ml を 1 群 10 匹のマウスに腹腔内接種した。CS-807 と AMPC は 0.5% トラガント液に懸濁し, また CCL は重曹水にて溶解後それぞれの希釈液を調製した。治療は菌接種直後と 4 時間後の 2 回, 各薬剤液 0.2 ml を経口投与することにより行なった。感染治療 5 日後の生存率から Probit 法により

50%有効量(ED₅₀)を算出し、1回当たりの薬剤量(mg/kg)で表示した。

6. 液体培地における抗菌作用の検討

TSBを用いて37°C 18時間培養した各供試菌液を新鮮TSBで10⁻³希釈し、それらを37°Cで3時間振盪培養後、10⁶~10⁷ CFU/mlの菌量に達したものを被験菌液とした。最終濃度が2.5 μg/mlとなるよう調製した薬剤溶液0.1 mlを自動細菌検査装置MS-2(Abott)のresearch用wellに分注後、それらに上記被験菌液0.9 mlを移植した。同装置を用いて37°Cで培養し、670 nmでの濁度変化を経時的に観察した。薬剤添加後15時間の培養中にO.D. 670nmが0.1以上に上昇した場合、菌は有意に増殖したものと判定した。供試菌株の増殖所要時間を指標として、各薬剤の増殖抑制効果を比較検討した。

II. 実験成績

1. DMPPCおよび経口用β-lactam剤感受性と接種菌量による変動

昭和57~61年に分離された*S. aureus* 1,000菌株の寒天平板希釈法によるDMPPC, CEX, CCL, AMPCおよびR-3763への感受性を各薬剤のMIC累積分布でFig. 1に示した。それら1,000菌株の10⁸ CFU/mlの菌液1 spot(以下[L]と略)接種, 37°C培養におけるDMPPCのMIC₅₀は1.56 μg/mlであったがMIC₈₀, MIC₉₀はそれぞれ6.25 μg/ml, 12.5 μg/mlとなり、一部感受性の低下した株の存在が認められた。

次に、経口用β-lactam剤への感受性を比較すると、R-3763のMIC₅₀, MIC₈₀は3.13 μg/ml, 100 μg/mlであったが、CCLはそれぞれ1.56 μg/ml, 50 μg/mlと1管良好であった。またCEXのMIC₅₀はR-3763と同等の3.13 μg/mlであったが、MIC₈₀は50 μg/mlであった。

さらに10⁸ CFU/mlの菌液1 spot(以下[H]と略)接種, 37°C培養での感受性を、DMPPCのMICを指標

として調べた。そのMIC₈₀は3.13 μg/mlであったものの、MIC₉₀は50 μg/ml, MIC₉₅は>100 μg/mlと著明に大きい値を示し、[H]接種においてDMPPC感受性の低下する株が多数存在した。

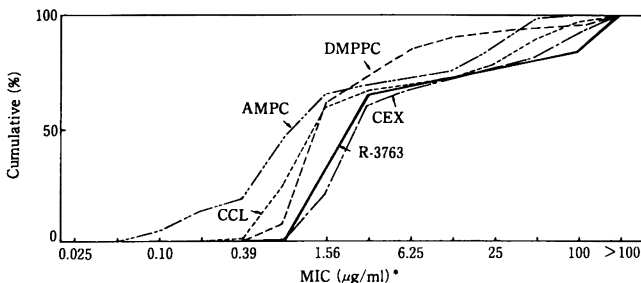
接種菌量による被験菌株のDMPPC感受性の変動を、[L]接種時の感受性別にFig. 2に図示した。[L]接種時DMPPCに1.56 μg/mlの感受性を示した菌株は[H]接種においてもその大部分が1.56~3.13 μg/mlの感受性を保持していた。次に[L]接種で3.13 μg/mlの菌株は、その約1/3が[H]接種において2管以上感受性が低下した。さらに[L]接種で6.25 μg/mlおよび12.5 μg/mlの菌株は、そのほとんどが[H]接種において2管~5管以上の顕著な感受性低下を示した。なお、図には示していないが、[L]接種時≤0.78 μg/mlの菌株(82株)はその大部分が[H]接種においても感受性の変動は認められなかった。他方、[L]接種時≥25 μg/mlの菌株(98株)は[H]接種においてその大部分が顕著な感受性低下を示した。

2. 薬剤感受性に対する培養温度の影響

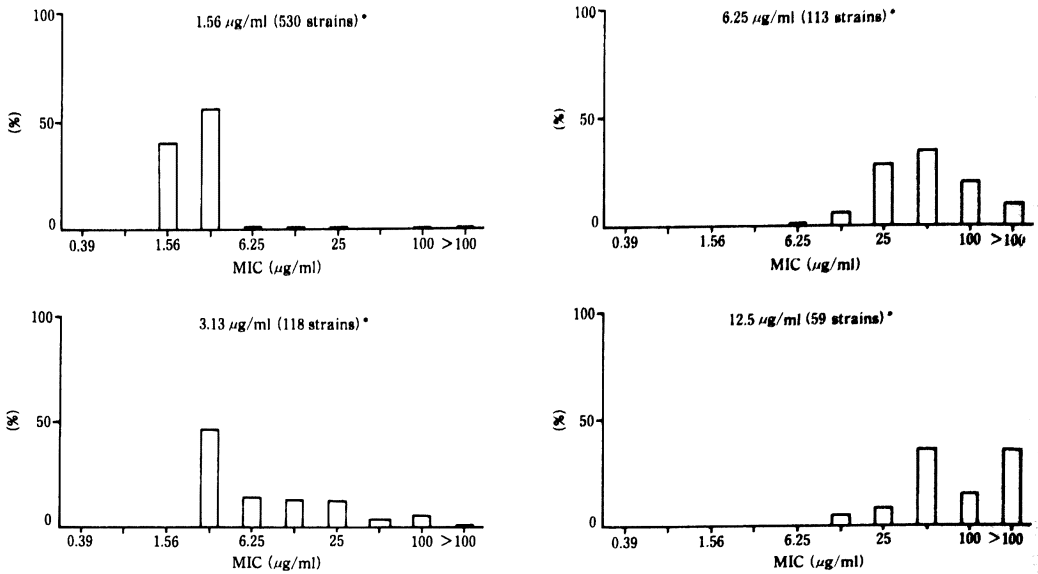
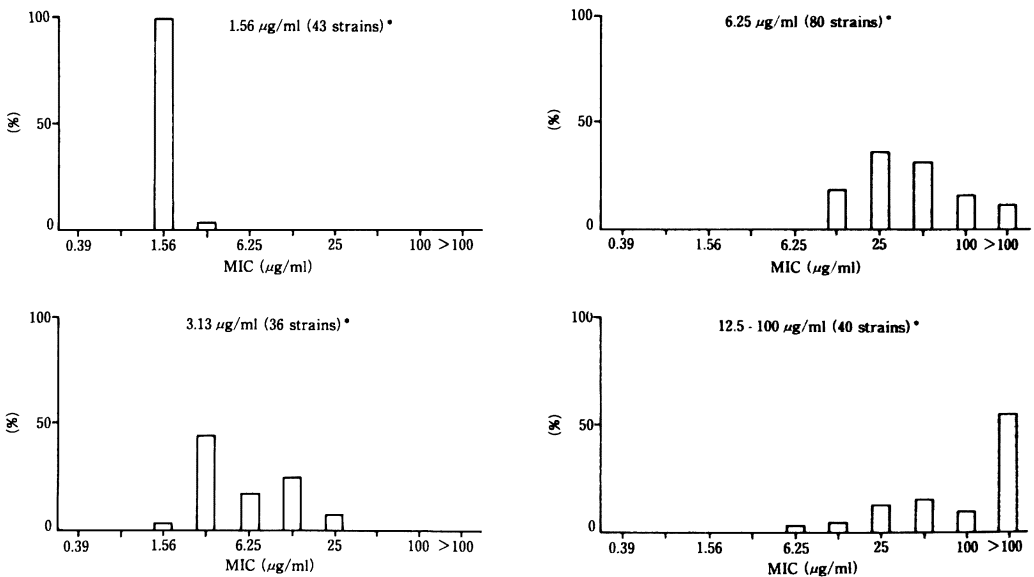
MRSAは接種菌量^{19,20)}だけでなく培養温度^{21~23)}によっても薬剤感受性の変化することが知られているので、供試菌株のDMPPC感受性に及ぼす培養温度の影響を検討した。

[L]接種・37°C培養時のDMPPC感受性別に供試菌株を無作為に選択し、それぞれの30°C培養における感受性の変動をFig. 3に図示した。37°C培養時DMPPCに1.56 μg/mlの菌株は30°C培養でもほぼ全株が同等の感受性を保持していた。一方、37°C培養で3.13 μg/mlの菌株は、その約30%が30°C培養で12.5~25 μg/mlとなり、2管~3管感受性が低下した。さらに37°C培養で6.25 μg/mlの菌株と12.5~100 μg/mlの菌株は、そのほとんどが30°C培養によって2管以上の顕著な感受性低下を示した。

Fig. 1 Susceptibility of 1,000 strains of *S. aureus*



*Determined at 37°C after 1 spot-inoculation of 10⁸ CFU/ml.

Fig. 2 Change of DMPPC-susceptibility by inoculation of 10^8 CFU/ml*Susceptibility to DMPPC determined with MHA by 1 spot-inoculation of 10^8 CFU/ml.Fig. 3 Change of DMPPC-susceptibility by determination at 30°C *Susceptibility to DMPPC determined with MHA at 37°C

以上の接種菌量ならびに培養温度の相違による薬剤感受性変動の結果から、DMPPCに $6.25\mu\text{g/ml}$ （〔L〕接種・ 37°C 培養）以上の株がMRSAと推定されたが、さらにこの点をMRSAの生化学的特性から確認するためPBP2'の存在様式を検討した。

3. PBP2'の存在様式

各供試菌株のフルオログラフィーの成績ならびにDMPPC感受性をFig. 4とFig. 5に示した。

Fig. 4に示した如く、〔L〕接種・ 37°C 培養時DMPPCのMIC値が $6.25\mu\text{g/ml}$ および $12.5\mu\text{g/ml}$ の各3菌

Fig. 4 PBP profiles and DMPPC-susceptibility

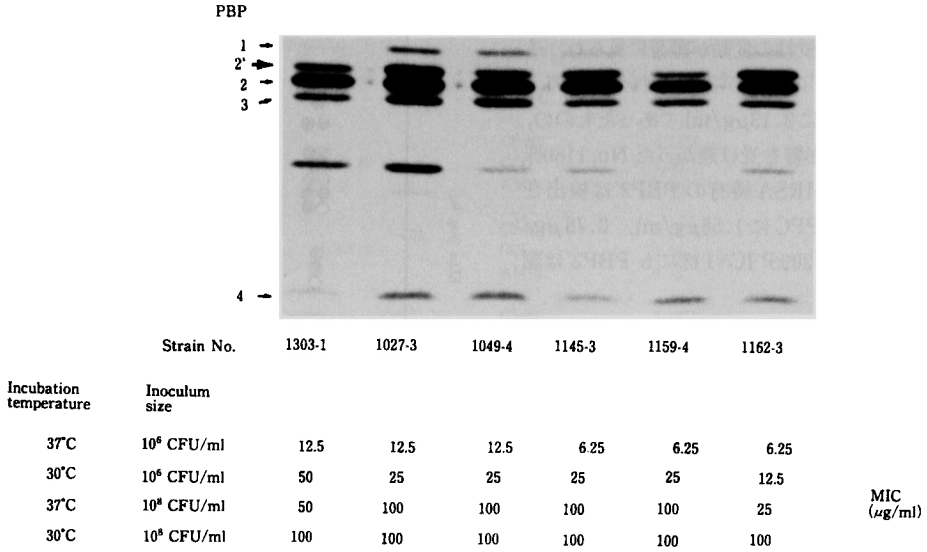
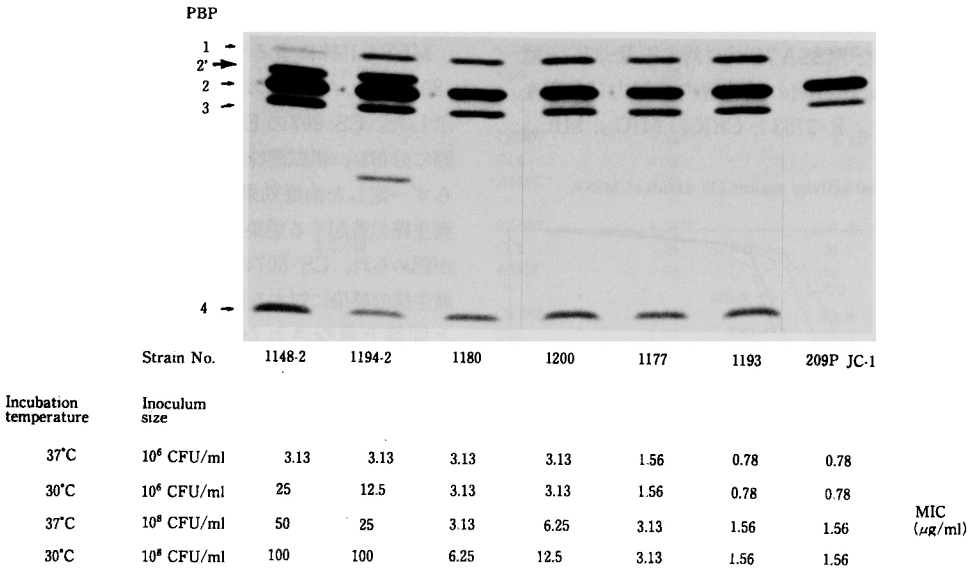


Fig. 5 PBP profiles and DMPPC-susceptibility



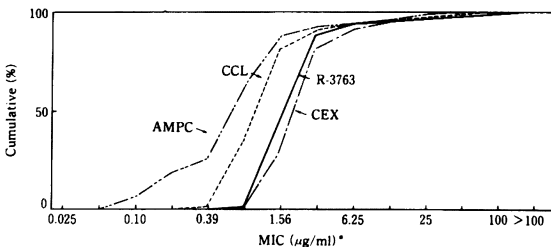
株は、培養条件によって DMPPC 感受性が顕著に低下したが、これら 6 菌株には *S. aureus* に通常検出される²⁴⁻²⁷ PBP_s 1, 2, 3, 4 以外に、PBP_{2'} が全株に共通して検出された。

次に Fig. 5 に示した各菌株のうち、DMPPC に 3.13 μg/ml の No. 1148-2 株と No. 1194-2 株とは培養条件による DMPPC 感受性の変動が顕著に見られ、これら 2 菌株には PBP_{2'} の存在が確認された。他方、DMPPC 感受性が同様に 3.13 μg/ml であったものの、接種菌量や培養温度の影響を受け難かった No. 1180 株と No. 1200 株には MRSA 特有の PBP_{2'} は検出されなかった。また DMPPC に 1.56 μg/ml, 0.78 μg/ml の各菌株と標準株の 209 P JC-1 株にも PBP_{2'} は認められなかった。

DMPPC に 6.25 μg/ml ((L)接種・37°C培養)以上の菌株には MRSA に特徴的な培養条件の相違による薬剤感受性の変動が顕著に認められたこと、さらにこれらの菌株には MRSA の耐性機構である PBP_{2'} が検出されたことなどから、DMPPC に 6.25 μg/ml 以上の菌株を MRSA と見なすのが妥当と結論された。また DMPPC に 3.13 μg/ml ((L)接種・37°C培養)の菌株の中には MRSA と見なすべき株も存在したが、今回はそれらも含め DMPPC に 3.13 μg/ml 以下の菌株は MSSA に区分した。

4. 経口用 β-lactam 剤の MSSA に対する抗菌力
供試 *S. aureus* 1,000 菌株のうち、前述の基準による MRSA を除外した MSSA 730 株に対する R-3763 と既存の経口用 β-lactam 剤の試験管内抗菌力 (MIC) を Fig. 6 に示した。R-3763 と CEX の MIC₅₀, MIC₈₀,

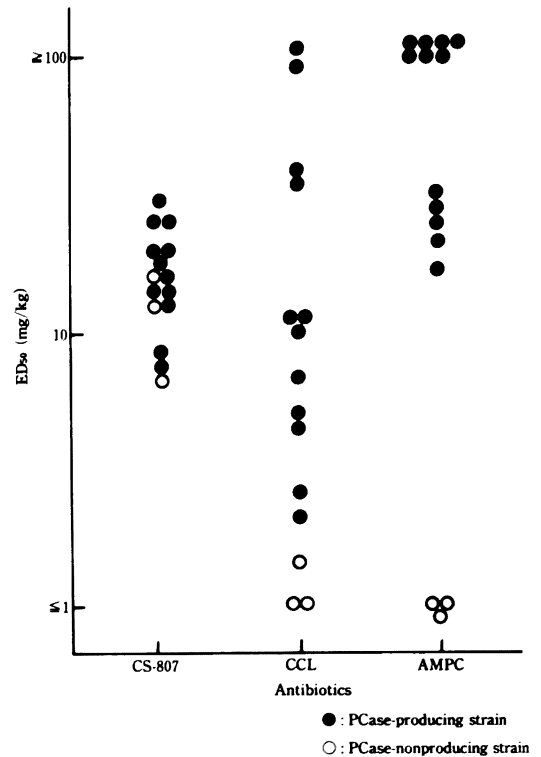
Fig. 6 Antibacterial activity against 730 strains of MSSA



*Determined at 37°C after 1 spot-inoculation of 10⁸ CFU/ml

MIC₈₀はともにそれぞれ 3.13 μg/ml, 3.13 μg/ml, 6.25 μg/ml であり、両剤とも同等の抗菌力を保有していた。CCL の抗菌力は R-3763, CEX より 1 管程度良好であり、また AMPC は MIC₅₀ において CCL をさらに上回る抗菌力を示した。

Fig. 7 Therapeutic effect on intraperitoneal infections in mice caused by MSSA



5. マウス腹腔内感染に対する治療効果

MSSA 15 株によるマウス腹腔内感染に対する CS-807, CCL, AMPC の治療成績を Table 1 と Fig. 7 に示した。CS-807 の ED₅₀ 値は 6.8~29.4 mg/kg の範囲に分布し、供試菌株の PCase 産生、非産生にかかわらず一定した治療効果を発現した。CCL は PCase 非産生株の惹起する感染には 1 mg/kg 以下でも治療効果が認められ、CS-807 のそれを上回った。一方、PCase 産生株の感染に対する治療効果は、全般的には CS-807 と同等と見なされたが、その ED₅₀ 値は 2.1~>100 mg/kg と大きな幅があり、治療効果は一定していなかった。また AMPC も PCase 非産生株の感染には優れた治療効果を示したが、PCase 産生株の半数以上による感染に対しその ED₅₀ 値は >100 mg/kg となり、それらには治療効果が認められなかった。

6. MSSA に対する液体培地中での抗菌作用

マウス感染治療実験に供試した MSSA 15 株に対し、TSB 中での R-3763, CCL, AMPC の増殖抑制効果を調べた。なお被験薬剤濃度は前記 730 菌株に対する MIC₈₀ 値に鑑み、R-3763 の 3.13 μg/ml を超えず

Table 1 Therapeutic effect on intraperitoneal infections in mice caused by MSSA

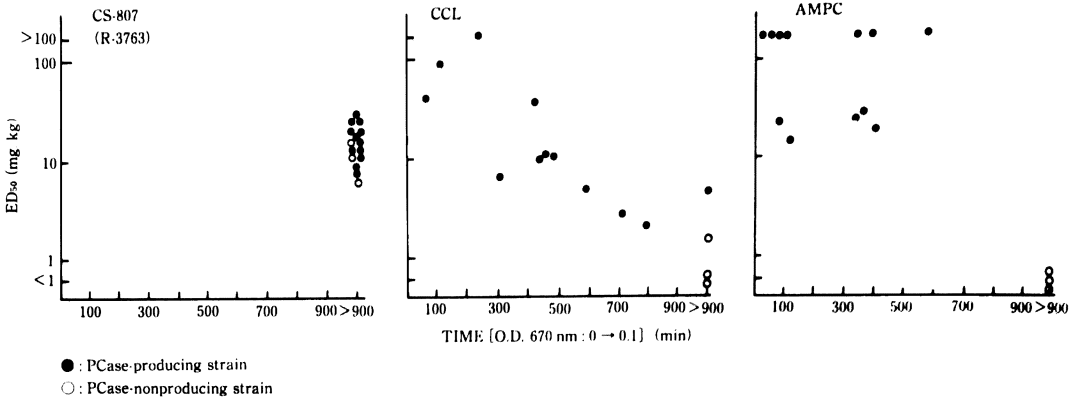
Strain	PCase	Challenge dose (CFU/body)	Drug	MIC* (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
Smith	(-)	3.0×10^6	CS-807	3.13**	6.83 [5.27-8.86]
			CCL	0.78	0.03 [0.02-0.04]
			AMPC	0.10	0.08 [0.05-0.12]
177	(-)	4.0×10^7	CS-807	1.56**	12.5 [8.94-17.5]
			CCL	1.56	1.43 [1.10-1.85]
			AMPC	0.20	0.54 [0.44-0.67]
458	(-)	5.9×10^7	CS-807	3.13**	15.7 [12.6-19.6]
			CCL	1.56	0.78 [0.64-0.95]
			AMPC	0.10	0.30 [0.24-0.36]
31	(+))	1.8×10^7	CS-807	3.13**	12.5 [10.2-15.3]
			CCL	1.56	2.58 [1.54-4.31]
			AMPC	0.78	20.1 [9.03-44.8]
244	(+))	3.1×10^7	CS-807	3.13**	19.5 [14.5-26.2]
			CCL	1.56	2.07 [1.67-2.57]
			AMPC	0.78	26.4 [13.8-50.4]
560	(+))	1.6×10^7	CS-807	1.56**	16.1 [11.9-21.6]
			CCL	3.13	89.6 [60.1-134]
			AMPC	1.56	>100
3858	(+))	1.0×10^7	CS-807	6.25**	24.4 [16.5-36.2]
			CCL	3.13	6.65 [4.37-10.1]
			AMPC	3.13	>100
3862	(+))	1.0×10^7	CS-807	3.13**	19.5 [14.5-26.2]
			CCL	1.56	4.57 [3.36-6.21]
			AMPC	0.78	30.3 [20.9-44.0]
4018	(+))	7.9×10^6	CS-807	1.56**	12.6 [9.30-17.0]
			CCL	0.78	10.6 [6.22-17.9]
			AMPC	0.78	>100
4019	(+))	2.1×10^7	CS-807	3.13**	29.4 [22.9-37.8]
			CCL	1.56	11.2 [7.80-16.2]
			AMPC	1.56	>100
3-1248	(+))	2.2×10^7	CS-807	1.56**	8.12 [6.51-10.1]
			CCL	0.78	4.73 [3.88-5.75]
			AMPC	0.78	23.6 [14.9-37.4]
4-1011	(+))	3.0×10^7	CS-807	1.56**	17.3 [14.0-21.5]
			CCL	1.56	33.7 [27.1-42.0]
			AMPC	0.78	>100
4-1043	(+))	4.0×10^7	CS-807	1.56**	23.9 [18.2-31.3]
			CCL	1.56	35.9 [25.6-50.4]
			AMPC	1.56	>100
4-1207	(+))	2.8×10^7	CS-807	1.56**	7.45 [4.75-11.7]
			CCL	3.13	10.0 [6.14-16.3]
			AMPC	3.13	16.0 [15.4-16.7]
5-1035	(+))	2.5×10^7	CS-807	3.13**	13.0 [8.65-19.5]
			CCL	1.56	>100
			AMPC	1.56	>100

* Determined with MHA (10^6 CFU/ml-37°C).

** MIC of R-3763.

[] 95% confidence limit.

Fig. 8 Relation of *in vitro* and *in vivo* anti-MSSA activities



CCL, AMPCの1.56 μ g/mlを上回る濃度として2.5 μ g/mlを設定した。

Fig. 8には各薬剤存在下での供試菌株の増殖所要時間とED₅₀値との関係を図示した。R-3763は供試15菌株すべての増殖を抑制したため相関関係は認められなかった。CCLではED₅₀値が>100 mg/kgの1菌株と増殖所要時間900分以上の4菌株を除く10菌株において良好

な相関性(r=0.87)が認められた。AMPCの場合、PCase産生株には大きいED₅₀値と短時間の増殖抑制しか示さない傾向が強く、またPCase非産生株に対しては、薬剤添加後増殖を抑制したため相関関係は得られなかった。

次にMSSAに対する液体培地中での抗菌作用の一般性を検討するため、R-3763, CCLには207株, AMPC

Table 2 Anti-MSSA activities of R-3763, CCL and AMPC in TSB

PCase	Drug (Strain No.)	MIC* (μ g/ml)	No. of strain (Growth #/Total)	Growth inhibition (%)	
				total	
+	R-3763 (165)	6.25	11/18	39	87
		3.13	9/118	92	
		1.56	1/29	97	
+	CCL (165)	6.25	6/8	25	25
		3.13	22/22	0	
		1.56	89/113	21	
		≤ 0.78	7/22	68	
+	AMPC (52)	3.13	4/4	0	4
		1.56	20/20	0	
		≤ 0.78	26/28	7	
-	R-3763 (42)	6.25	3/5	40	90
		3.13	1/21	95	
		1.56	0/16	100	
-	CCL (42)	6.25	0/1	100	93
		3.13	0/3	100	
		1.56	2/24	92	
		≤ 0.78	1/14	93	
-	AMPC (11)	1.56	0/2	100	91
		≤ 0.78	1/9	89	

* : Determined with Mueller Hinton agar by 1 spot of 10⁶ CFU/ml inoculation.

: O.D._{670nm}; 0.0→ ≥ 0.1 within 900 min.

には63株と被験株数を増やして、TSB中で薬剤2.5 $\mu\text{g/ml}$ 作用後の増殖抑制効果を調べた。なお、ニトロセフィン法²⁰⁾で調べたPCase産生株は前者の場合が165株(80%)、後者が52株(83%)であった。Table 2に示した如くPCase非産生株に対しては、3薬剤とも約90%の菌株を増殖抑制した。他方、PCase産生株に対してCCL, AMPCは各々25%, 4%の菌株を増殖抑制したにすぎなかったが、R-3763は87%の株の増殖を抑制し、PCase産生株に対してもPCase非産生株と差のない優れた増殖抑制効果が認められた。

III. 考 察

*S. aureus*は鼻腔、皮膚、腸管などの常在菌でありながら強毒菌のため、その耐性株の出現は難治感染や院内感染の発症を来し臨床で多くの問題を生じてきた²⁹⁻³²⁾。

しかも最近では抗黄色ブドウ球菌作用の弱い第三世代セフェム系抗生剤の汎用によりMRSAの分離頻度も漸増の傾向にあるといわれている⁹⁻¹²⁾。

ところで耐性*S. aureus*, いわゆるMRSAを正確に区別することは臨床検査および治療の面から非常に重要と考えられるが、その検索は必ずしも容易ではない。そこで今回、多数の新鮮臨床分離株を用い、それらをMRSAとMSSAとに区分することを試みた。第一にMRSAの薬剤感受性は接種菌量の影響を受けること^{19,20)}、第二にMRSAの耐性発現は温度依存性で30°Cでの耐性度が高いこと²¹⁻²³⁾、第三にMRSAの耐性機構であるPBP2'は30°Cで熱に安定であり¹⁴⁾、さらにその最適産生温度も30°Cであること¹⁵⁾などに着目し、培養条件の相違による薬剤感受性の変動とPBP2'の存在様式とを検討した。その結果、現行の最小発育阻止濃度測定法¹⁶⁾による(L)接種、37°C培養でDMPPCに6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株の大部分と3.13 $\mu\text{g/ml}$ の株の約30%は、(H)接種もしくは30°C培養で著明に感受性低下が認められ、さらにMRSAの耐性の本質であるPBP2'は上記の接種菌量、培養温度の影響を受ける株に共通して検出された。従って、現行法に準拠する限りDMPPCに6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株をMRSAと定義することに矛盾はないものと考えられた。また、DMPPCに3.13 $\mu\text{g/ml}$ の菌株の中にはMRSAと見なすべき菌株も存在したが、MRSAのPBP2'は β -lactam剤の存在下で誘導的に産生される^{15,33)}と報告されており、前述の如きDMPPCに3.13 $\mu\text{g/ml}$ の株は30°C培養あるいは(H)接種の条件下でDMPPCによってPBP2'が誘導産生され易い株と考えられた。従って、現行の最小発育阻止濃度測定法¹⁶⁾では

DMPPCに3.13 $\mu\text{g/ml}$ の株は明確にはMRSAかMSSAかを定義できなかったが、今回は一応それらの株も含めDMPPCに3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下の株をMSSAと区分した。

以上の結果に基づくと、今回の供試*S. aureus* 1,000菌株中にMRSAは270株(27%)存在したが、この成績は諸家の報告^{6,7,24,25)}と概ね一致するものであった。

MRSAを除く730株のMSSAに対するR-3763のMIC₅₀は3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、この抗菌力は既存のCEXと同等のものであった。さらにMSSA 15菌株によるマウス腹腔内感染に対し、CS-807は供試菌株のPCase産生の有無にかかわらず、一定した治療効果を発現した。他方、CCLは供試15菌株中、半数以上の株の感染に対しCS-807よりも良好な治療効果が得られたものの、PCase産生株に対する*in vivo*効果が一定せず、少数ではあったが全く無効の菌株も認められた。また、AMPCではCCLで見られた傾向がより顕著に認められ、PCase産生株の約半数による感染に全く無効であった。

このように*in vivo*効果の良否が薬剤間に現われたのは、PCase産生株に対する*in vitro*抗菌作用の相違にその一因があるものと考えた。そこで β -lactamaseの影響が出易いと考えられている液体培地³⁶⁾を用い、さらに薬剤添加時の菌量を感染実験時の攻撃菌量(Table 2)と同レベルの10⁶~10⁷ CFU/mlに設定して、各薬剤の増殖抑制効果を検討した。その結果、R-3763はPCase産生株に対しても、非産生株の場合と差のない抗菌作用を発現することが判明し、前者に対してはCCLとAMPCを上回る成績であった。それゆえ、CS-807がPCase産生株、非産生株を問わずMSSAのマウス腹腔内感染に一定した治療効果を発現し得た理由の一つは、上記のごとくR-3763がPCase産生株にも優れた*in vitro*抗菌作用を保有するためと考えられた。また、今回調べたPCase産生性のMSSAは約80%にも達していたが、R-3763のPCase産生株への優れた*in vitro*抗菌作用は、それら多数のMSSAに対して共通に認められる現象であった。

以上、CS-807の活性代謝物R-3763はMSSA 730株に対してCEXと同等の抗菌力(MIC₅₀: 3.13 $\mu\text{g/ml}$)を保有していたこと、さらにR-3763はMSSAの大半を占めるPCase産生株にも優れた抗菌活性を保有していたことから、CS-807はMSSAによる感染症に適用し得る経口用抗生剤と考えられた。

本論文の一部は順天堂大学・医学部・細菌学教室 横田健教授との共同研究であり、第35回日本化学療法学

会(盛岡)にて発表した。

文 献

- 1) 第35回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウムII CS-807抄録集, 1987
- 2) 西野武志, 大槻雅子, 宮川行正, 谷野輝雄: 新しいセファロスポリン系抗生物質 Cefotaxime に関する細菌学的評価。Chemotherapy 28(S-1): 42-64, 1980
- 3) 西田実, 上村利明, 岡田直彦, 松本佳巳, 峯 靖弘, 村川武雄: 新しいcephalosporin, Ceftizoxime (CZX)の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 28(S-5): 83-97, 1980
- 4) 五島達智子, 辻 明良, 小川正俊, 宮崎修一, 金子康子, 桑原章吾: 7位に methoxyimino 基, 3位に methyl-tetrazol-thiomethyl 基を有する Cephalosporin 系新誘導体 Cefmenoxime (SCE-1365) の細菌学的評価。Chemotherapy 29(S-1): 8-31, 1981
- 5) 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. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 26th abstr. no. 592, 1986
- 6) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 上条仁子, 佐々木宗男, 島山 勤, 稻松孝思, 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抗菌剤に対する感受性。Chemotherapy 31: 835-841, 1983
- 7) 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 第一報— β -lactam 剤感受性について—。Chemotherapy 32: 344-358, 1984
- 8) 紺野昌俊, 野々口律子, 後藤 朗, 生方公子, 川上小夜子: 血液培養から検出される細菌の動向について。感染症学雑誌 58: 99-112, 1984
- 9) MAYERS, J. P. & C. C. LINNEMANN: Bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 145: 532-536, 1982
- 10) 松本慶蔵, 工藤和治, 隆杉正和: 呼吸器感染症の起炎菌の流れとその意義。臨床成人病 13: 959-964, 1983
- 11) JARIS, W.; C. THORNBERRY, J. HUGHES, J. BOYCE & R. HALEY: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at children's hospital in the United States. Program Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 23rd abstr. no. 533, 1983
- 12) 島田 馨: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌—臨床編一。感染・炎症・免疫 14: 98-101, 1984
- 13) YOKOTA, T. & R. SEKIGUCHI: Change of penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Program Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 22nd abstr. no. 342, 1982
- 14) UTSUI, Y. & T. YOKOTA: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 397-403, 1985
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 宇津井幸男, 大屋 哲, 土門春樹, 矢島 努, 坂尾規代美, 塚田由実子, 関根奈穂子, 安田 敏, 田島政三, 岩田正之: 新経口用セファロスポリンCS-807の細菌学的評価 第2報 CS-807の作用機作に関する研究。Chemotherapy: in press
- 18) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 2999-3003, 1975
- 19) SUTHERLAND, R. & G. N. ROLINSON: Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. J. Bacteriol. 87: 887-899, 1964
- 20) SELIGMAN, S. J. & W. L. HEWITT: Resistance to penicillins and cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 1965: 387-391, 1966
- 21) ANNEAR, D. I.: The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some antibiotics. Med. J. Aust. 1: 444-446, 1968
- 22) PARKER, M. T. & J. H. HEWITT: Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet i: 800-804, 1970

- 23) 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
- 24) 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
- 25) GEORGOPAPADAKOU, N. H. & F. Y. LIU: Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 834-836, 1980
- 26) 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
- 27) WYKE, A. W.; J. B. WARD, M. V. HAYES & N. A. C. CURTIS: A role *in vivo* for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 119: 389-393, 1981
- 28) O'CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY & A. H. SHINGLER: Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents Chemother. 1: 283-288, 1972
- 29) BENNER, E. J. & F. H. KAYSER: Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2: 741-744, 1968
- 30) KAYSER, F. H. & T. M. MAK: Methicillin-resistant staphylococci. Am. J. Med. Sci. 264: 197-205, 1972
- 31) LINNEMANN, C. C.; M. MASON, P. MOORE, T. R. KORFHAGEN & J. L. STANECK: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: experience in a general hospital over four years. Am. J. Epidemiol. 115: 941-950, 1980
- 32) GRIEBLE, H. G.; S. L. KRAUSE, S. A. PAPPAS & M. B. DICOSTANZO: The prevalence of high-level methicillin-resistance in multiply resistant hospital staphylococci. Medicine 60: 62-69, 1981
- 33) 小此木研二, 野路弓子, 近藤正照, 今田 哲, 横田健: セファマイシン耐性 *S. aureus* の耐性機構。第35回日本化学療法学会総会プログラム・講演抄録, p. 104, 1987
- 34) 紺野昌俊, 生方公子, 山下直子, 松下真理, 川上小夜子, 増田真理子, 野々口律子: 薬剤耐性型とファージ型から見たメチシリン耐性黄色ブドウ球菌について。感染症学雑誌 59: 1029-1040, 1985
- 35) 渡辺正治, 久保勢津子, 石山尚子, 畠山靖子, 斎藤知子, 高橋公毅, 菅野治重, 陳 瑞明: 千葉大学付属病院における Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離状況—最近5年間の観察—。Chemotherapy 35: 467-475, 1987
- 36) 山根誠久, 斎藤芳彦, 加藤仁美: ブドウ球菌および緑膿菌を対象とした自動細菌検査装置 MS-2 薬剤感受性試験の精度評価: 最小発育阻止濃度(MIC)との比較評価。臨床と細菌 11: 107-114, 1984

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CS-807, A NEW ORALLY ACTIVE CEPHALOSPORIN

IV. METHICILLIN-SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND ANTI-*S. AUREUS* ACTIVITY OF CS-807

YUKIO UTSUI, YOHKO AJIKI, MITSUO KATSUTA,
HARUKI DOMON, JUNKO UMEZAWA, TERUO MAGARIBUCHI,
HIROSHI YASUDA, MASAZO TAJIMA, MASAYUKI IWATA
Biological Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo

Based on the susceptibility to methicillin and the profile of penicillin-binding proteins (PBPs), we have classified 1,000 fresh clinical isolates of *S. aureus* into methicillin-resistant (MRSA) strains and methicillin

-susceptible (MSSA) strains. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of CS-807 against MSSA were investigated as compared to those of cephalexin (CEX), cefaclor (CCL), and amoxicillin (AMPC).

1) One thousand strains of *S. aureus* isolated clinically in recent years were divided into 3 classes on the basis of their susceptibility to methicillin (DMPPC) examined by using two-fold plate dilution method with Mueller-Hinton agar on which a 10^8 CFU/ml suspension was spotted, followed by incubation at 37°C for 20 h. ① Strains with DMPPC-susceptibility of $1.56\mu\text{g/ml}$ retained almost the same susceptibility even by inoculation of 10^8 CFU/ml or incubation at 30°C. ② Approximately 30% of strains with DMPPC-susceptibility of $3.13\mu\text{g/ml}$ showed a greater than four-fold reduction in their susceptibility by change of inoculum size or incubation temperature. ③ Susceptibility of strains to which MIC of DMPPC was more than $6.25\mu\text{g/ml}$ was decreased markedly by change of inoculum size or incubation temperature.

2) PBP2' fraction specific for MRSA was detected in the strains with DMPPC-susceptibility of more than $6.25\mu\text{g/ml}$, while no PBP2' was detectable in the strains with DMPPC-susceptibility of $1.56\mu\text{g/ml}$. The strains with DMPPC-susceptibility of $3.13\mu\text{g/ml}$, whose susceptibility was influenced by inoculation of 10^8 CFU/ml or incubation at 30°C, were confirmed to possess PBP2'.

3) From the shift of DMPPC-susceptibility with change in inoculum size or incubation temperature, and from the presence of PBP2' in the resistance mechanism, 270 strains (27%) with DMPPC-susceptibility of more than $6.25\mu\text{g/ml}$ were demonstrated to be MRSA. The remaining 730 strains (73%) with DMPPC-susceptibility of less than $3.13\mu\text{g/ml}$, in which MRSA strains were a little included, were regarded as being MSSA.

4) R-3763, an active metabolite of CS-807, exerted the same *in vitro* activity as CEX against 730 MSSA strains, and its MIC_{80} to those was $3.13\mu\text{g/ml}$.

5) CS-807 was found to have a constant therapeutic effect (ED_{50} : $6.8\sim 29.4\text{ mg/kg}$) on intraperitoneal infections in mice caused by 15 MSSA strains without any relation to their penicillinase (PCase)-production and nonproduction.

The therapeutic effect of CCL and AMPC on infections by 3 PCase-nonproducing MSSA strains was superior to that of CS-807. Whereas, against the infections by 12 PCase-producing MSSA strains, both CCL and AMPC only displayed an instable therapeutic efficacy.

6) R-3763, CCL, and AMPC exhibited a growth inhibitory effect on about 90% of the PCase-nonproducing MSSA strains after exposure to $2.5\mu\text{g/ml}$ in a liquid medium. On the other hand, as much as 87% of the PCase-producing MSSA strains had their growth inhibited by treatment with R-3763 at a concentration of $2.5\mu\text{g/ml}$, but 25% and only 4% of the MSSA strains treated with the same concentration of CCL and AMPC, respectively, had their growth inhibited.

From the results described above, we have concluded that CS-807 possesses potent *in vitro* and *in vivo* activities against *S. aureus*, except for the DMPPC-resistant strains, without any bearing on PCase-production or nonproduction.