

## CS-807の嫌気性菌に対する抗菌作用

渡辺邦友・加藤直樹・沢 赫代・青木 誠・上野一恵

岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設

新しい経口セファロsporin CS-807とその活性体 (R-3763) の Na 塩である R-3746の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用を GAM 寒天培地を用いる寒天平板希釈法で参考菌株38株および最近の臨床分離株152株を対象として検討した。また *B. fragilis* GAI-5562株を用い、ラットパウチ内感染モデルにより CS-807の *in vivo* 抗菌作用をも検討した。

R-3746は、対照とした T-2525と同等の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムおよび抗菌力を示した。R-3746は *B. fragilis* の産生する  $\beta$ -lactamase に対し、不安定であるものの、Cefaclor よりはるかに安定で、*B. fragilis* に対する抗菌力も Cefaclor より強力であることが認められた。R-3746の *in vitro* 抗菌力は接種菌量により影響を受けたが、試験にもちいる基礎培地の種類によっては影響を受けなかった。

ラットパウチ内に $10^6$ CFU/ml接種されたあと、CS-807の20mg/kg 1日2回2日間の経口投与は、24時間経過した対数増殖期にある *B. fragilis* のその後の増殖に対し、殆ど影響をあたえなかった。接種菌株に対する R-3746の MIC は $10^6$  CFU/ml接種で $3.13\mu\text{g/ml}$ 、 $10^8$  CFU/ml接種で $100\mu\text{g/ml}$ であった。なお、この条件下で、パウチ内の R-3746濃度は最高値で $2.0\mu\text{g/ml}$  (初回投与後6時間) であった。

CS-807を2mg/mouse ICR系マウスに5日間経口投与し、盲腸内の *C. difficile* の異常増殖の有無を中止後1日目と5日目の2点で検討した。CS-807投与によっては中止後1日目に *C. difficile* の増殖が見られたが、5日目には見られなかった。

CS-807は臨床材料からしばしば分離される嫌気性菌の大多数の菌種に良好な抗菌作用を示し、好気性菌と嫌気性菌の混合感染症にその有用性が期待される。また CS-807の使用に際しては他のほとんどの化学療法剤と同様に *C. difficile* の出現にすべきであろう。

CS-807は、三共株式会社で開発された経口用セファロsporin 薬剤である。著者らは本薬剤の活性体である R-3763の Na 塩である R-3746の嫌気性菌に対する抗菌作用を検討した。さらに CS-807の経口投与ラットパウチ内での *Bacteroides fragilis* の増殖阻止能ならびに CS-807経口投与マウスの盲腸内での *Clostridium difficile* の異常増殖の有無についても検討した。

## I. 材料および方法

## 1. 供試菌株

研究室保存の代表参考菌株および ATCC 由来株と当研究室で臨床材料から分離した嫌気性菌を用いた。臨床分離株は、原則として PRAS II media (Scott Labo. アメリカ) をもちいる生化学的性状とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析から VPI manual 第4版に基づき同定された。一部 Rap ID

ANA system (Vitek, アメリカ) を用いた数値同定とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析結果から同定された。これらの菌株は、10%スキムミルクを保護剤として $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。

## 2. 供試験薬剤

R-3746および CS-807 (いずれも三共株式会社) を主に用いた。対照薬剤として T-2525 (富山化学), Cefaclor (CCL, 塩野義製薬), Cephaloridine (CER), Cephalexin (CEX), Cefoxitin (CFX), Cefixime (CFIX, 藤沢薬品), Cefotaxime (CTX, ヘキスト), Cefotetan (CTT, 山之内製薬) および Amoxicillin (AMPC, ビーチャム薬品) を用いた。

いずれもその力価の明らかなものを用いた。

### 3. 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

寒天平板希釈法および液体希釈法によって測定した。寒天平板希釈法は、日本化学療法学会の推奨する方法に準じて行った<sup>1)</sup>。すなわち、感受性測定用培地には GAM 寒天 (日水) を用い、37°C で 24 時間または、48 時間 anaerobic glove box (Forma 社) (N<sub>2</sub> 80%, CO<sub>2</sub> 10%, H<sub>2</sub> 10%) で嫌気性培養後の MIC を求めた。

### 4. 臨床分離株に対する抗菌作用

最近数年間に、当研究室で扱った次の菌株を実験に供した。

*Bacteroides fragilis* 30 株, Indole positive *B. fragilis* group 29 株 (*Bacteroides thetaiotaomicron* 11 株, *Bacteroides uniformis* 13 株, *Bacteroides ovatus* 5 株), pigmented *Bacteroides* (*Bacteroides intermedius* 9 株, *Bacteroides asaccharolyticus* 2 株, *Bacteroides corporis* 5 株), *Bacteroides bivius* 22 株, *Peptostreptococcus magnus* 29 株 および *Peptostreptococcus anaerobius* 27 株である。

### 5. 抗菌作用に及ぼす諸因子の影響

#### A) 接種菌量

*P. magnus* 1 株, *B. fragilis* 2 株, *B. thetaiotaomicron* 1 株, *Fusobacterium nucleatum* 1 株, *Clostridium perfringens* 1 株の合計 6 株を用いて、接種菌量を 10<sup>6</sup>/ml から 10<sup>8</sup>/ml と 4 段階に変化させ、接種菌量が MIC に及ぼす効果を検討した。これらの 6 株については、β-lactamase 産生性をニトロセフィンディスク (BBL, アメリカ), アシドメトリー紙 (Oxoid, イギリス) を用いて測定した。

#### B) 基礎培地

GAM 寒天培地 (日水), 5% ヒツジ脱繊維血液液添加 *Brucella* 寒天培地 (BBL) および Wilkins-Chalgren 寒天培地 (Difco) を用いた。*Brucella* 寒天培地には Hemin と Vitamin K をそれぞれ 5 μg/ml, 0.1 μg/ml 添加した。*Streptococcus intermedius* 1 株, *P. magnus* 1 株, *Bacteroides vulgatus* 1 株, *B. fragilis* 2 株, *B. thetaiotaomicron* 1 株, *Bacteroides melanogenicus* 1 株, *Bacteroides ureolyticus* 1 株, *B. intermedius* 1 株, *B. bivius* 1 株, *Fusobacterium mortiferum* 1 株, *Clostridium septicum* 1 株, *Clostridium sordellii* 1 株, *Clostridium innocuum* 1 株 および *C. perfringens* 1 株の合計 15 株を用いた。接種菌量は、10<sup>6</sup>/ml 程度とした。

6. *B. fragilis* 産生の β-lactamase に対する安定性, *B. fragilis* GAI-0558 株 と GAI-7955 株 を用い、本薬剤の安定剤を CER, CCL, CEX, T-2525 および

CFX を比較薬剤として検討した。被験菌株を GAM ブイヨンにて 37°C, 4 時間嫌気性培養した後、4°C にて遠心分離 (5,000rpm, 20分) して集菌後、超音波処理にて菌体を破壊し、再び 4°C にて遠心 (12,000rpm, 60分) した。この上清を粗酵素液として用いた。β-lactamase 活性は photometric assay にて測定した<sup>2)</sup>。

### 7. ラットパウチ内で増殖する *B. fragilis* GAI-5562 に及ぼす影響

ラットパウチの作製は加藤らの方法に準じた<sup>3)</sup>。すなわち、Wistar 系, 雄, 5 週齢ラットの背部皮下に 20 ml の空気を注入後、1% のクロトン油を添加したオリーブ油を 1 ml 注入し、1 週間放置した。

*B. fragilis* GAI-5562 をパウチ当たり 10<sup>8</sup> 個を接種し、24 時間後に薬剤の投与を開始した。投与量は 20 mg/kg 2 回/日, および 2 mg/kg 2 回/日とした。経時的にパウチ内容物を吸引採取し菌数を測定し、パウチ内で増殖する *B. fragilis* に対する影響を観察した。対照薬剤として、Cefminox を用いた。なお、同時にパウチ内の薬剤濃度を *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌としたペーパーディスク法で測定した。なお、*B. fragilis* GAI-5562 株に対する R-3746 の MIC は 10<sup>8</sup> CFU/ml 接種で 100 μg/ml, 10<sup>6</sup> CFU/ml 接種で 3.13 μg/ml であり、CFIX の MIC は 10<sup>8</sup> CFU/ml 接種で 12.5 μg/ml, 10<sup>6</sup> CFU/ml 接種で 3.13 μg/ml であった。

### 8. 薬剤投与マウス盲腸内容物における *Clostridium difficile* の出現

ICR マウス, 雄, 20 ± 1 g, 1 群 5 匹を用い、1 日 1 回 CS-807 を 2 mg/マウス 5 日間経口投与した。

なお、この間、敷きわらとケージは毎日交換した。投与中止 1 日, および 5 日後にマウスを屠殺し、盲腸内容物中の総菌数と *C. difficile* の菌数を定量培養した。なお対照薬剤として中止 1 日後の陽性コントロールとして必ず *C. difficile* の異常増殖が起こる注射薬剤の Cefotaxime (CTX), さらに中止 5 日目の陽性コントロールとして注射薬剤の Cefotetan (CTT) を用いた。総菌数測定用には変法 GAM 寒天培地 (ニッスイ) を, *C. difficile* の選択培地には, CCMA 培地 (ニッスイ) を用いた。マウスの屠殺後、盲腸を切り出し、anaerobic glove box 内に搬入した。chamber 内で内容物を押し出し、試験管に収め重量を測定した後、10 倍量の PRAS リンゲル希釈液 (クリニカルサプライ) を加え十分混合したものを原液とした。

ブチルゴム栓し chamber 外に搬出した後、PRAS リンゲル希釈液 (クリニカルサプライ) にて、10 倍希釈系列を作製した。

## II. 成 績

### 1. R-3746の抗菌スペクトラム

R-3746の ATCC 由来の標準菌株を含む主要な嫌気性菌に対する MIC 値を Table 1 と Table 2 に示した。

R-3746は $10^8$  CFU/ml接種において *Eubacterium lentum* (25 $\mu$ g/ml), *C. septicum* (25 $\mu$ g/ml), *Clostridium tertium* (12.5 $\mu$ g/ml), *Clostridium sporogenes* (6.25 $\mu$ g/ml), *B. fragilis* の3株 (200 $\mu$ g/ml), *B. thetaiotaomicron* の2株 (25 $\mu$ g/ml) に対し12.5 $\mu$ g/mlあるいはそれ以上の MIC をしめしたが<sup>3</sup>, その他の28株に対しては, すべて6.25 $\mu$ g/mlあるいはそれ以下の MIC を示した。

この結果は, R-3746の抗菌力はグラム陽性菌に対しては AMPC より劣るものの T-2525, CCL とほぼ同

等であり, グラム陰性菌では *B. fragilis* group に対し CCL よりはるかに優れ, T-2525, AMPC よりもやや優れる成績であった。*B. fragilis* 以外のグラム陰性菌に対しては, AMPC よりやや劣るものの T-2525, CCL よりも優れる成績であった。

なお接種菌量として $10^8$  CFU/mlと $10^6$  CFU/mlを用いた時の MIC の変動は *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. bivius*, *F. mortiferum*, *Propionibacterium acnes*, *C. tertium*, *C. perfringens* でかなり顕著であった。

### 2. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

#### 1) 接種菌量

接種菌量の影響を Table 3 に示した。

*P. magnus* ATCC 39328 の MIC は接種菌量が $10^6$

Table 1 Antibacterial spectra of R-3746 against anaerobic Gram negative bacteria

Organism	R-3746		T-2525		CCL		AMPC		
	$10^8$ *	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	
<i>B. fragilis</i> GAI-0558	200<	200	200<	100	200<	200<	200<	100	
	ATCC25285	200	6.25	25	6.25	200	200	12.5	12.5
	GM-7000	100	3.13	12.5	6.25	200	200	12.5	12.5
	TM2300	100	3.13	50	6.25	200	200	25	6.25
	JC101	50	3.13	6.25	1.56	100	100	6.25	3.13
	GAI-7343	200<	200	200<	200<	200<	200	200<	200
	GAI-7955	200<	200	200<	200<	200<	200	200<	200<
<i>B. vulgatus</i> ATCC29327	0.39	0.20	0.78	0.39	1.56	1.56	0.78	0.39	
<i>B. distasonis</i> ATCC8503	1.56	0.10	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	3.13	3.13	1.56	0.78	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	WAL3304	50	25	25	25	200	200	25	12.5
	WAL2926	50	3.13	25	12.5	200	200	25	6.25
	ATCC29741	50	25	25	25	200	200	25	12.5
<i>B. ovatus</i> ATCC8483	100	3.13	25	12.5	200	200	25	3.13	
<i>B. eggerthii</i> ATCC27754	0.78	0.05	1.56	0.78	0.78	0.78	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	
<i>B. ureolyticus</i> NCTC10941	0.20	0.10	0.10	0.05	0.78	0.78	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	
<i>B. disiens</i> ATCC29426	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	0.39	0.39	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	
<i>B. bivius</i> ATCC29303	50	3.13	100	25	200	50	200	25	
<i>B. melaninogenicus</i>	GAI-0413	0.20	0.10	0.20	0.10	0.39	0.39	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$
	<i>B. intermedius</i> GAI-5594	0.39	0.10	0.78	0.20	0.39	0.20	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$
<i>B. loescheii</i> GAI-8157	0.79	0.20	1.56	1.56	0.78	0.05 $\geq$	0.10	0.05 $\geq$	
<i>F. mortiferum</i> 9817	200	1.56	25	12.5	100	50	1.56	0.78	
<i>F. necrophorum</i> SPH-1	0.39	0.20	0.78	0.20	3.13	3.13	0.39	0.20	
<i>F. nucleatum</i> F-1	0.39	0.20	0.78	0.10	1.56	1.56	0.05 $\geq$	0.05 $\geq$	

\*: Inoculum size, CFU/ml

CFUから $10^8$  CFU/mlの間では変動がみられないが、 $10^9$ /mlでは $10^8$  CFU/mlの場合の8倍のMICを示した。*B. fragilis* ATCC 25285では $10^6$ と $10^7$  CFU/mlでのMICに16倍の差が認められた。*C. perfringens* ATCC 13124のMICも接種菌量により大きな影響をうけ、 $10^8$  CFU/mlでは $12.5\mu\text{g/ml}$ 、 $10^6$  CFU/mlでは $0.025\mu\text{g/ml}$ 以下であった。*B. thetaiotaomicron*、*F. nucleatum*では接種菌量による影響はみられなかった。

## 2) 基礎培地の影響

基礎培地の R-3746のMIC値に及ぼす影響を検討し、その結果をTable 4に示した。

使用した15菌株のうち *P. magnus* と *C. perfringens* の2株を除き、使用した3種類の培地で求めたMIC値に大きな差異は認められなかった。*P. magnus* ATCC 29328では5%ヒツジ脱繊維血液添加 *Brucella* 寒天培地でのMICが他の2者でのMICよりやや大きい値をとった。また、*C. perfringens* ATCC 13124ではGAM寒天培地でのMICが一番小さい値をとった。

## 3. 臨床分離株に対する抗菌作用

*B. fragilis*, Indole陽性 *B. fragilis* group, pigmenting *Bacteroides*, *B. bivius*, *P. magnus*, *P. anaerobius*

Table 2 Antibacterial spectra of R-3746 against anaerobic Gram positive bacteria

Organism	R-3746		T-2525		CCL		AMPC	
	$10^8$ *	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$
<i>S. constellatus</i> ATCC27823	0.78	0.78	0.39	0.20	12.5	12.5	0.39	0.20
<i>S. intermedius</i> ATCC27335	0.39	0.39	0.39	0.20	12.5	12.5	0.39	0.39
<i>S. morbillorum</i> ATCC27824	$0.05\geq$	$0.05\geq$	$0.05\geq$	$0.05\geq$	0.39	0.39	$0.05\geq$	$0.05\geq$
<i>P. prevotii</i> ATCC9321	0.78	0.39	0.39	0.20	0.78	0.78	0.10	$0.05\geq$
<i>P. anaerobius</i> ATCC27337	0.78	0.20	0.20	0.10	0.78	0.78	0.20	$0.05\geq$
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL3218	0.39	0.20	0.78	0.39	0.78	0.78	0.20	$0.05\geq$
<i>P. magnus</i> ATCC39328	0.78	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78	0.20	$0.05\geq$
<i>P. acnes</i> ATCC6919	0.39	$0.05\geq$	0.10	$0.05\geq$	0.39	0.20	$0.05\geq$	$0.05\geq$
<i>E. lentum</i> ATCC25559	200	25	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3.13	0.10
<i>C. septicum</i> ATCC12464	25	25	12.5	6.25	0.20	0.20	$0.05\geq$	$0.05\geq$
<i>C. sordellii</i> ATCC9714	0.20	0.20	0.39	0.20	6.25	3.13	$0.05\geq$	$0.05\geq$
<i>C. tertium</i> ATCC19405	50	12.5	50	50	100	100	0.39	0.20
<i>C. sporogenes</i> ATCC3584	12.5	6.25	25	3.13	50	3.13	0.78	0.20
<i>C. perfringens</i> ATCC3624	12.5	$0.05\geq$	6.25	$0.05\geq$	25	0.20	0.39	$0.05\geq$

\*: Inoculum size, CFU/ml

Table 3 Effect of inoculum size on MIC values

Organism	Inoculum size			
	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
<i>P. magnus</i> ATCC39328	3.13	0.39	0.20	0.20
<i>B. fragilis</i> ATCC25285	200	200	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> GAI-0558	$200<$	$200<$	$200<$	200
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC29741	50	50	50	50
<i>F. nucleatum</i> ATCC10953	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>C. perfringens</i> ATCC13124	12.5	12.5	0.39	$0.025\geq$

Inoculum: 48 hour culture in GAM broth was diluted 1:2 with GAM broth ( $10^9$  CFU/ml) and then diluted 1:10 successively

Table 4 Effect of basal media on MIC values

Organism	Basal media <sup>1</sup>		
	GAM	Bru	W-C
<i>S. intermedius</i> ATCC273345	0.39 <sup>2</sup>	0.39	0.39
<i>P. magnus</i> ATCC29328	0.39	1.56	0.39
<i>B. vulgatus</i> ATCC29327	0.20	0.20	0.39
<i>B. fragilis</i> GM-7000	3.13	6.25	3.13
<i>B. fragilis</i> ATCC25285	6.25	12.5	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC29741	25	50	12.5
<i>B. melaninogenicus</i> GAI-0413	0.10	0.20	0.10
<i>B. intermedius</i> GAI-5594	0.10	0.20	0.05
<i>B. bivius</i> ATCC29303	3.13	6.25	3.13
<i>B. ureolyticus</i> NCTC10941	0.10	0.10	0.10
<i>F. mortiferum</i> 9817	0.78	0.78	0.39
<i>C. septicum</i> ATCC12464	25	12.5	12.5
<i>C. sordellii</i> ATCC9714	0.20	0.20	0.20
<i>C. innocuum</i> ATCC14501	12.5	12.5	12.5
<i>C. perfringens</i> ATCC13124	<0.05	0.05	0.10

<sup>1</sup>Basal media: GAM, GAM agar (Nissui) supplemented with 0.1 µg/ml vitamin K; Bru, *Brucella* agar base (BBL) supplemented with 5% sheep blood, 5 µg/ml hemin and 0.1 µg/ml vitamin K; WC, Wilkins Chalgren agar (Difco)

<sup>2</sup>MIC (µg/ml): Inoculum size 10<sup>6</sup> CFU/ml; Incubation time, 48 hours.

Table 5 Sensitivity distribution of 30 isolates of *B. fragilis* to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC (µg/ml)														
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	200<
R-3746	10 <sup>6</sup>								2	18	1	1	2	3	1	2
T-2525	10 <sup>6</sup>								3	18		3	1	2	2	1
CCL	10 <sup>6</sup>													5	16	9
AMPC	10 <sup>6</sup>									2	20	2	3	1	1	1

Table 6 Sensitivity distribution of 29 isolates<sup>1</sup> of indole positive *Bacteroides* group to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC (µg/ml)													
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
R-3746	10 <sup>6</sup>						1	4	2		1	3	6	5	7
	10 <sup>8</sup>									1	1	1	8	2	16
T-2525	10 <sup>6</sup>								4	3	1	4	4	5	8
	10 <sup>8</sup>										2	3	6	4	14
CCL	10 <sup>6</sup>												2	5	22
	10 <sup>8</sup>														29
AMPC	10 <sup>6</sup>								1	1	5	10	4	1	7
	10 <sup>8</sup>									1	1	7	9	2	9

<sup>1</sup> *B. uniformis* 13 strains, *B. thetaiotaomicron* 11 strains, *B. ovatus* 5 strains

Table 7 Sensitivity distribution of 16 isolates<sup>1</sup> of pigmented *Bacteroides* to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )													
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
R-3746	10 <sup>6</sup>	2		3	5	1	1	1			2	1			
	10 <sup>8</sup>	2		1	6	1	2		1			1	2		
T-2525	10 <sup>6</sup>	2		1	5	2	2			2	2				
	10 <sup>8</sup>	1	1		4	4		1	1			1	1	2	
CCL	10 <sup>6</sup>	2		1	8	1			1				2	1	
	10 <sup>8</sup>	1	1		1	6	1	2				1			3
AMPC	10 <sup>6</sup>	2	8				1	1		1		1	1	1	
	10 <sup>8</sup>	2	7	1					2				3		1

<sup>1</sup> *B. intermedius* 9 strains, *B. corporis* 5 strains, *B. asaccharolyticus* 2 strains

Table 8 Sensitivity distribution of 22 isolates of *Bacteroides bivius* to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )													
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
R-3746	10 <sup>6</sup>	1		2	2	3	3	4	3	2	1	1			
	10 <sup>8</sup>		1	1	1	1	3		1	2	6	2	2	1	1
T-2525	10 <sup>6</sup>	2			1	1	3		5	4	5	1			
	10 <sup>8</sup>			1		1		3	2		1	2	6	3	3
CCL	10 <sup>6</sup>	1				1	2	2	2	1	6	3		1	3
	10 <sup>8</sup>							2	1	1	2	2	1	4	9
AMPC	10 <sup>6</sup>	1	2				3	2	1	4	4	1	3	1	
	10 <sup>8</sup>			2				1	3	2	1	1	5	4	3

Table 9 Sensitivity distribution of 29 isolates of *P. magnus* to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )													
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	
R-3746	10 <sup>6</sup>		2	6	6	5	5	3	1	1					
	10 <sup>8</sup>							2	11	4	6		4	2	
T-2525	10 <sup>6</sup>			2	4	11	6	5			1				
	10 <sup>8</sup>						2	12	6		2	4	2	1	
CCL	10 <sup>6</sup>	3	3	4	9	2	1	7							
	10 <sup>8</sup>							1		4	9	12	2	1	
AMPC	10 <sup>6</sup>	1	3	16	9										
	10 <sup>8</sup>			13	11	4	1								

Table 10 Sensitivity distribution of 26 isolates of *P. anaerobius* to R-3746, T-2525, CCL and AMPC

Drug	Inoculum	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												
		0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
R-3746	10 <sup>6</sup>				5	16	1			1	2	1		
	10 <sup>8</sup>					5	15	1	1	1	1	2		
T-2525	10 <sup>6</sup>			5	16	1	1	1		2				
	10 <sup>8</sup>			1	18	2		2	1	2				
CCL	10 <sup>6</sup>				1	8	6	7				1	2	
	10 <sup>8</sup>								2	5	13	3		3
AMPC	10 <sup>6</sup>			5	18			1	1	1				
	10 <sup>8</sup>			1	18	4			1			2		

の菌株分離株に対する抗菌作用を T-2525, CCL, および AMPC と比較検討した成績を Table 5, 6, 7, 8, 9 および 10 に示した。 *B. fragilis*, Indole 陽性 *B. fragilis* group, pigmented *Bacteroides*, *B. bivius* などに対しては R-3746 は CCL より優れ, T-2525 とほぼ同等あるいはやや優れる成績であった。 *P. magnus*, *P. anaerobius* に対しては, R-3746 は AMPC, CCL より劣り, T-2525 とほぼ同等あるいはやや劣る成績であった。

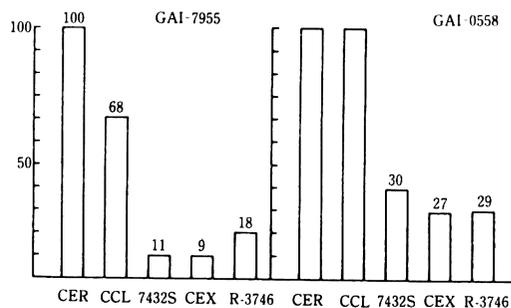
4. *B. fragilis* 産生の  $\beta$ -lactamase に対する安定性 *B. fragilis* 由来の  $\beta$ -lactamase に対する R-3746 の安定性を Fig. 1 に示した。

R-3746 は *B. fragilis* 2 株の産生する  $\beta$ -lactamase に CCL より安定で, CEX, 7432S とほぼ同程度の安定性を示した。 CER に対する分解を 100% としたとき, R-3746 は GAI-7955 株で 29%, GAI-0558 株で 18% であった。

5. ラットパウチ内で増殖する *B. fragilis* に及ぼす影響

ラウトパウチ内で増殖する *B. fragilis* GAI-5562 に

Fig. 1 Stability of R-3746 to  $\beta$ -lactamase produced by 2 strains of *B. fragilis*



対し, CS-807 の 20 mg/kg 2 回/day の経口投与は対照とした CFIX の 20 mg/kg 2 回/day の経口投与と同様にほとんど影響を与えなかった (Fig. 2)。なおこの場合でのパウチ内の薬剤濃度は 20 mg/kg 2 回/day 投与時で, 最高濃度は R-3746 で 6 時間後の 2  $\mu\text{g/ml}$ , CFIX で 6 時間後の 0.6  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 6. マウス盲腸内の *C. difficile* 異常増殖

CS-807 経口投与 1 日後の 5 匹のマウス盲腸内容物の 1 g 当たりの総菌数は  $3 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$  個/g の間に分布し, *C. difficile* 菌数はすべてで  $2 \times 10^6$  個/g に認められた (Table 11)。投与終了 5 日目の 5 匹の盲腸内容物 1 g 当たりの総菌数は  $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^9$  個の間に分布し, *C. difficile* 菌数はすべて検出限界以下 ( $10^2$  個以下) であった。なお, CTX 投与マウスでは投与中止翌日に, CTT 投与マウスでは投与中止後 5 日目にそれぞれ 100% *C. difficile* が検出された。

### III. 考 察

CS-807 は新しく開発された経口用セファロスポリン薬剤である。

著者らは, CS-807 の活性体 R-3763 の Na 塩である R-3746 の *in vitro* での抗菌力, CS-807 の *in vivo* での抗菌作用をラットパウチ内での *B. fragilis* の増殖阻止効果ならびに, マウスに連続経口投与した場合の盲腸内 *C. difficile* の異常増殖の有無について検討した。

R-3746 は *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. bivius*, *E. lentum*, および *Clostridium* 属の数菌種を除き幅広い嫌気性菌の菌種に対し強い抗菌力を示した。 *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. bivius* は  $\beta$ -lactamase を産生する菌種であることが知られている<sup>4)</sup>。今回の著者らの実験でも R-3746 が *B. fragilis* 産生の  $\beta$ -lactamase に対して CCL よりは安定であるものの

Fig. 2 *In vivo* killing curves of CS-807 and CFIX against *Bacteroides fragilis* GAI-5562 in rat pouch

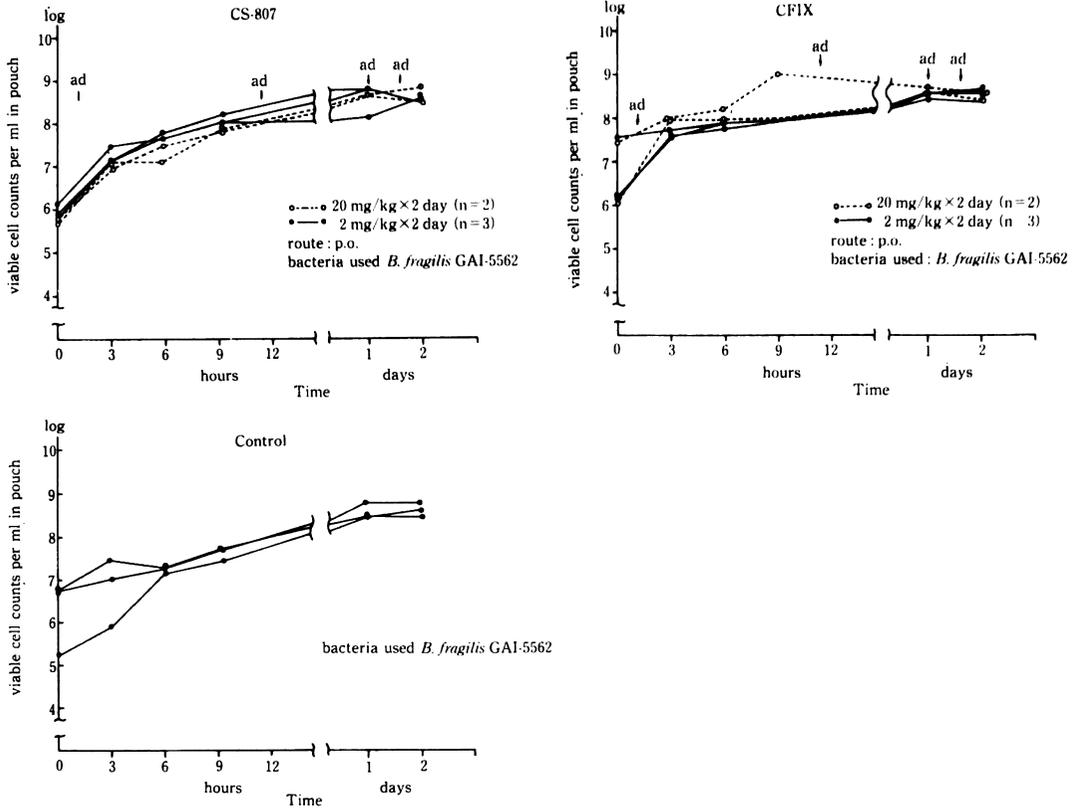


Table 11 Appearance of *C. difficile* in cecal contents of mice administered CS-807, CTX and CTT

Group	Mouse No.	1 <sup>#</sup>		5		
		No. of <i>C. difficile</i>	Total count	Mouse No.	No. of <i>C. difficile</i>	Total count
CS-807 2 mg/mouse	1	2 × 10 <sup>6</sup> §	3 × 10 <sup>10</sup>	6	N.D.	1 × 10 <sup>9</sup>
	2	2 × 10 <sup>6</sup>	2 × 10 <sup>10</sup>	7	N.D.	8 × 10 <sup>8</sup>
	3	2 × 10 <sup>6</sup>	2 × 10 <sup>10</sup>	8	N.D.	3 × 10 <sup>9</sup>
	4	2 × 10 <sup>6</sup>	3 × 10 <sup>9</sup>	9	N.D.	6 × 10 <sup>8</sup>
	5	2 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>10</sup>	10	N.D.	2 × 10 <sup>8</sup>
CTX 2 mg/mouse	1	2 × 10 <sup>6</sup>	4 × 10 <sup>10</sup>			
	2	2 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>10</sup>			
	3	2 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>9</sup>			
	4	2 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>9</sup>			
	5	4 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>9</sup>			
CTT 2 mg/mouse				1	6 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>9</sup>
				2	7 × 10 <sup>5</sup>	8 × 10 <sup>9</sup>
				3	6 × 10 <sup>5</sup>	5 × 10 <sup>9</sup>
				4	2 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>10</sup>
				5	2 × 10 <sup>5</sup>	9 × 10 <sup>9</sup>

Administration route; p.o. or s.c. No. of mice; 5-10 Administration term; 7 days

Mouse; ICR, 4W, male 20 ± 1g

# : days after final administration § : cfu/wet g of caecal contents

多少加水分解されることが明らかとなった。これらの3菌種の産生する $\beta$ -lactamaseにより弱いながら加水分解を受けることが、R-3746がこれらの菌種に対して抗菌作用がよいことの重要な因子の一つであろう。また、*E. lentum*はR-3746に対して高度耐性であるが、*E. lentum*は多くのセファロスポリンに耐性を示すことが知られている。これまで、*E. lentum*が $\beta$ -lactamaseを産生するという報告は見られないし、ここに使用された*E. lentum*の菌株も $\beta$ -lactamase非産生株であった。その抗菌力は全体として既に市販されている経口セファロスポリンであるCCLより優れ、既に開発を終了したT-2525とほぼ同等であった。

R-3746のMICに影響を与える諸因子のうち基礎培地が与える影響を検討した。今日嫌気性菌の薬剤感受性試験用培地として使用されている*Brucella*血液寒天培地、Wilkins-Chalgren寒天培地とGAM寒天培地の3種類の基礎培地で検討されたが、三者間に大きな差異は認められなかった。しかし、接種菌量の検討では*B. fragilis*と*C. perfringens*で $10^7$  CFU/mlと $10^6$  CFU/mlの間でかなり強い影響が観察された。*P. magnus*では、 $10^8$  CFU/mlと $10^9$  CFU/mlの間でその影響が観察された。*B. fragilis*においては前述したごとくこの菌種の産生する $\beta$ -lactamaseが影響していると考えられたが、*C. perfringens*についてはその原因はあきらかではない。*C. perfringens*では本薬剤に限らず接種菌量、とくに菌液の希釈がMICを大きく変動させる。

CS-807の臨床細菌学的に最も重要である*B. fragilis*に対する抗菌作用を*in vivo*で検討した。モデルとして著者らが検討を行っているラットパウチ内感染モデルを用いた<sup>3)</sup>。CS-807の2mg/kgの1日2回の合計4回経口投与はもとより20mg/kgの1日2回の合計4回経口投与でもラットパウチ内で増殖する*B. fragilis*に対し殆ど影響を与えなかった。この成績は対照薬のCFIXの場合と同様であった。パウチ内のR-3763の最高濃度は初回投与後6時間に2匹中1匹で2 $\mu$ g/ml、CFIXの最高濃度は、同じく6時間後に2匹中1匹で0.6 $\mu$ g/mlであり、菌数減少を来たさなかつた大きな理由はパウチ内薬剤濃度が*B. fragilis*のこれらの薬剤にたいするMICをはるかに下回っていたと考えられた。

化学療法剤と関連して起こる下痢、偽膜性腸炎の原因菌として*Clostridium difficile*が重要である<sup>5)</sup>。著者らは、化学療法剤をマウスに連続投与した際、盲腸内容物中に*C. difficile*が異常増殖することを報告してきた<sup>6)</sup>。

これらの実験では各薬剤の1~2mgを1日1回マウスに皮下または経口的に投与(5~7日)した直後に盲腸

内容物の検索を実施している。この条件下で*C. difficile*腸炎の治療薬剤として知られるVancomycinの経口投与とCTTのみで*C. difficile*の異常増殖が認められた。しかし、その後の研究において、*C. difficile*の異常増殖が認められなかったCTTにおいて、薬剤投与中止後5日目に*C. difficile*の異常増殖が起こることが知られた。すなわち殆どすべての化学療法剤が出現時期に差異はあるもののマウスの盲腸内での*C. difficile*の異常増殖を起こす能力があると考えられる。そこで、今回は、中止直後陽性コントロールとしてCTXを、中止5日目陽性コントロールとしてCTTを用いた。今回の実験においてCS-807は中止直後に*C. difficile*の異常増殖を引き起こすタイプの薬剤であることが示唆された。

以上の実験からCS-807は好気性菌のみならず*B. fragilis*と少数の菌種を除く嫌気性菌に対しても広い抗菌スペクトラムを有し、好気性菌とこれらの嫌気性菌の関与する種々の感染症、特に*B. fragilis*の関与する頻度の低い横隔膜より上部の感染症に対し有用であると考えられた。

## 文 献

- 1) 嫌気性菌MIC測定法検討委員会(小酒井望,他):嫌気性菌の最小発育阻止濃度(MIC)測定法。Chemotherapy 27:559-560, 1979
- 2) 朝日良成, 渡辺邦友, 今朝洞忠孝, 上野一恵: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791)の嫌気性菌に対する抗菌力。Chemotherapy 33(S-4):54-73, 1985
- 3) 加藤直樹, 大橋葉津樹, 渡辺邦友, 上野一恵:ラットパウチ内における嫌気性菌の増殖。日本感染症学雑誌, 投稿中
- 4) M. TAJIMA, K. SAWA, K. WATANABE and K. UENO: The  $\beta$ -lactamases of Genus *Bacteroides*, The Journal of Antibiotics 36(4):423-428, 1983
- 5) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよ子:偽膜性腸炎と*Clostridium difficile*, モダンメディア 25(12):798-810, 1983
- 6) 青木誠, 小林とよ子, 渡辺邦友, 上野一恵:化学療法剤投与によるマウス盲腸内*C. difficile*の変動について。Chemotherapy 33:617-624, 1985

## THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ACTIVITY OF CS-807 AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

KUNITOMO WATANABE, NAOKI KATO, KAKUYO SAWA, MAKOTO AOKI, and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine, Gifu

The *in vitro* activity of R-3746 a bioactive derivative of CS-807, a new oral cephalosporin, was determined against 38 strains of reference organisms and a total of 152 strains of clinical isolates of anaerobic bacteria by agar dilution technique using GAM agar as basal media. The *in vivo* activity of CS-807 was also determined against *B. fragilis* GAI-5562 using rat pouch model.

R-3746 was very active against many kinds of anaerobic bacteria tested and had a very similar spectrum to that of T-2525. R-3746 was more stable than cefaclor (CCL) against the  $\beta$ -lactamase from two strains of *B. fragilis* tested, and showed stronger activity against *B. fragilis* than CCL. MIC values were raised by increasing the inoculum size, but were not influenced by the kind of basal medium. The oral administration of CS-807 at a dose of 20mg/kg twice daily for 2 days had no effect on *B. fragilis* GAI-5562 which was growing exponentially in the rat pouch. The MIC of R-3746 to *B. fragilis* GAI-5562 was 3.13 $\mu$ g/ml at a concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. At 6 hours after the initial administration, a maximal concentration 2.0 $\mu$ g/ml of R-3746 was detected in the aspirate of rat pouch.

The influence of CS-807 on caecal flora of mice was also determined with a special attention to *Clostridium difficile*. CS-807 was given orally to mice at a dose of 2 mg/mouse for 5 days. Growth of *C. difficile* was observed on the 1st. day, but not on the 5th day after withdrawal of the compound.