

Cefodizime の細菌学的評価

兵頭昭夫・東谷房広・三橋 進

エビゾーム研究所

井上松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

新しい注射用セフェム系抗生物質 Cefodizime(THR-221)の抗菌力を Cefotaxime(CTX), Cefotiam(CTM), Cefotetan(CTT)及びCefbuperazone(CBPZ)を対照薬として比較検討した。グラム陽性菌に対しては THR-221はCTX とほぼ同等の抗菌力を示した。グラム陰性菌の *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* に対しては, THR-221はCTX よりやや劣る抗菌力を示したが, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *M. organii*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* に対しては, CTX とほぼ同等かこれより勝る抗菌力を示し, CTM, CTT, CBPZ に比べて勝っていた。

β -lactamase については, THR-221はペニシリンナーゼ(PCase), セファロスポリナーゼ(CSase)に対して極めて安定であった。*P. vulgaris*, *K. oxytoca* 由来のオキシイミノセファロスポリン分解酵素(CXase)に対してはわずかに分解されたが, THR-221はこれらの酵素に対する Km 値が大きく, 親和性が低いことがわかった。 β -lactamase 誘導能はCBPZ, CTT, CTX に比べて低かった。

PBPs に対する親和性は *E. coli* の場合 $3 > 1A/Bs > 2 > 4 > 6 > 5$ の順であり, *S. aureus* の場合 $1 > 2 > 3$ の順であった。

マウス全身感染症に対する THR-221の治療効果は MIC 値から期待される以上の強い治療効果があり, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, 及び β -lactamase 産生の *E. coli*(CSase), *P. mirabilis*(PCase), *P. vulgaris*(CXase)に対していずれの対照薬よりも優れていた。

Cefodizime(THR-221)はヘキスト社とルセル社で開発され、大鵬薬品工業とヘキストジャパン社で基礎、臨床研究が行われた新しい注射用セフェム系抗生物質である。7位側鎖に *syn*-methoxyimino-aminothiazolyl 基を3位側鎖には mercaptothiazolyl 基を有している (Fig. 1)。今回、THR-221の標準菌株及び臨床分離株に対する抗菌力、殺菌作用、 β -lactamase に対する安定性、親和性、誘導能、penicillin binding proteins(PBPs)に対する親和性及び感染治療実験などについて検討を行ったので報告する。なお比較薬剤として Cefotaxime(CTX), Cefotiam(CTM), Cefotetan(CTT), Cefbuperazone(CBPZ)を用いた。

I. 実験材料及び方法

1. 使用薬剤

THR-221(大鵬薬品), Cefotaxime(CTX:ヘキストジャパン), Cefotiam(CTM:武田薬品), Cefotetan(CTT:山之内製薬), Cefbuperazone(CBPZ:富山化学), Penicillin G(PCG:明治製薬), Cephaloridine(CER:鳥居薬品), Cefoxitin(CFX:萬有製薬)及び Cephalothin(CET:塩野義製薬)の力価の明らかな標品を用いた。

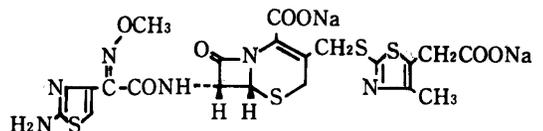
2. 使用菌株

標準菌株¹⁾及び各種臨床分離株は群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設で昭和56~59年に集めた保存株を用いた。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法²⁾に準じた寒天平板希釈法に従った。すなわち、被験菌を37℃一夜培養した後約 10^6 cells/mlになる様に Buffered Saline Gelatin(BSG)溶液³⁾で希釈し、薬剤含有の感受性測定用寒天培地(STA:日本)に約5 μ l接種し、37℃, 18時間培養後、被験菌の発育が認められない最小濃度をもって最小発育阻止濃度(MIC)とした。なお *Streptococcus* 属の前培養には BHI 液体培地を用い、薬剤含有寒天培地として10%ウマ脱繊維血液添加の STA を使用した。*H. influenzae* は Hemin 10 μ g/ml, Nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)2 μ g/

Fig. 1 Chemical structure of THR-221



ml 添加 BHI 液体培地で前培養し、Hemin, NAD 添加 STA にて感受性測定を行った。*N. gonorrhoeae* は 1% hemoglobin (Difco), 1% defined supplement 添加 Proteose No. 3 寒天培地で培養後、薬剤含有同寒天培地で MIC を求めた。また *P. aeruginosa* の前培養には 0.3% KNO_3 添加感受性測定用ブイヨン培地 (STB: 日水) を使用した。

4. 殺菌効果測定

1) 最小殺菌濃度

最小殺菌濃度 (MBC) の測定は被験菌を STB で 37°C, 18 時間培養しその菌液を希釈後、薬剤添加の同培地に最終濃度が 10^6 , 10^5 , 10^4 cells/ml になる様に接種した。37°C, 18 時間培養後、肉眼で濁りの認められない最小濃度を MIC とした。MIC 以上の薬剤を含有する培地から 100 μl を薬剤無添加 STA に接種し 37°C, 18 時間培養後、菌の生育をみない最小濃度を MBC とした。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli NIHJ JC-2, *P. vulgaris* OX-19, *P. mirabilis* IFO 3549 の 3 株を被験菌とした。STB 培地にて 37°C, 18 時間培養し、これを同培地にて約 10^4 cells/ml に希釈し、37°C で 1 時間半振盪培養後、約 10^5 cells/ml に達した時に最終濃度が $1/4$, $1/2$, 1, 2, 4 MIC になる様に各薬剤を加えた。更に振盪培養を続け、薬剤添加後 2, 4, 6, 8, 24 各時間後の生菌数を測定した。

5. β -lactamase に対する安定性

1) β -lactamase 活性の測定

すべての β -lactamase は当研究所保存の精製標品を使用した⁴⁾。 β -lactamase 活性は Spectrophotometric assay^{5,6)} により 30°C にて測定した。THR-221 の加水分解速度は 274 nm での吸光度の減少により求めた。基質特異性は PCase では PCG の V_{max} 値を、CSase 及び CXase では CET の V_{max} 値を 100 とした時の相対加水分解速度で表わした。基質溶液はリン酸緩衝液 (50 mM pH 7.0) にて 100 μM に調整した。酵素液の蛋白量は Lowry 法⁷⁾ により求めた。

2) β -lactamase 誘導能

使用菌株は誘導型酵素を産生する *E. cloacae* GN 5797 及び *P. rettgeri* GN 4430 を用いた。方法は MINAMI らの方法⁸⁾ に従った。すなわち、BHI broth にて一夜培養した菌液を新鮮な 10 倍量の同液体培地 (20 ml) に接種し、37°C にて 3 時間振盪培養した。その後、誘導剤として各薬剤を 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に加え、更に 2 時間培養を続けた。その後集菌し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 1 回洗浄後、同一緩衝液に懸濁し、超音波破碎機 (トミー精工 モデル UR-200 P) を用い、氷冷下 75 W で 2 分間超音波破碎を行った。その後 13,000 $\times\text{g}$, 10 分間遠心し、その上清を酵素画分として用いた。 β -lactamase

の活性は CET を基質として用い、1 分間に 1 μmole の基質を分解する酵素活性を 1 unit と定義し、誘導された β -lactamase の活性を unit/mg protein で表わした。

3) β -lactamase に対する親和性

各種 β -lactamase に対する親和性は各薬剤のこれらの酵素に対する K_m 値または K_i 値を求め、この値により親和性を比較検討した。 K_m 値は各基質濃度を種々に変化させ、この時得られた加水分解量を LINEWEAVER-BURK の式⁹⁾ に入れ求めた。 K_i 値は種々の濃度の CET または CER に対して薬剤を入れ、これに本研究所保存の精製 β -lactamase を加え、その時の加水分解量を LINEWEAVER-BURK または DIXON の式¹⁰⁾ に入れ求めた。なお基質は CSase に対しては CET を、PCase に対しては CER を用いた。

6. PBPs に対する親和性

E. coli NIHJ JC-2 及び *S. aureus* 209 P の PBPs に対する THR-221 の結合親和性は、SPRATT の方法¹¹⁾ に準じた競合結合実験から行った。すなわち、遠心分画した膜分画に 0.2~125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の非放射性 THR-221 を加え、30°C, 10 分間反応させた後、0.1 mM の ¹⁴C-PCG (AMERSHAM: 373 $\mu\text{g}/50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) を加え、更に 30°C, 10 分間反応させて 7.5% または 8% polyacrylamide スラブルゲル電気泳動を行った。ゲルに 2,5-Diphenyloxazole (DPO) をしみこませた後乾燥し、KODAK X-Omat レントゲンフィルムに密着し、-80°C, 2 週間以上感光させて蛍光オートラジオグラフィーを行った。オートラジオグラフィーで得られた PBPs の各バンドの濃さをデンスitomーター (LKB 2202 Ultrosan laser densitometer) で定量化した。PBPs のバンドの濃さを 50% にまで減少させるために要する薬剤の濃度を ID_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) とした。

7. マウス感染治療実験

Std-ddY 系雄マウス $20 \pm 1 \text{g}$ を 1 薬剤 1 濃度当り 1 群 10 匹を使用した。感染菌は *S. pneumoniae* 2132, *S. pyogenes* 1412, *E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445, *S. marcescens* GN 7577, *P. mirabilis* GN 4754, 更に β -lactamase 産生株の *E. coli* ML 5005 (PCase), *E. coli* GN 14930 (CSase), *K. pneumoniae* ML 5006 (PCase), *P. mirabilis* ML 5007 (PCase) 及び *P. vulgaris* ML 5008 (CXase) を用いた。菌を 4% mucin 添加または無添加でマウス腹腔内に接種した後、1 時間及び 4 時間後に薬剤を皮下投与し、感染 5 日後の生存率から Probit 法に基づき ED_{50} 値を求めた。 ED_{50} 値は 2 回薬剤投与した時の総量で示した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

化療標準菌株25株に対する THR-221の抗菌力を CTX, CTM, CTT, CBPZ と比較検討し, その結果を Table 1 に示した。THR-221はグラム陽性菌, 陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを示し, その抗菌力はグラム陽性菌に対しては CTM よりやや弱い, グラム陰性菌に対しては CTX とほぼ同程度の優れた抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性

臨床分離の24菌種, 1844株に対する THR-221の抗菌力を 10^6 cells/ml の接種条件で測定し, 累積百分率として Fig. 2~25 に示した。各菌種ごとの MIC₅₀ 及び MIC₉₀ を Table 2 に示した。また, 対照薬剤として CTX, CTM, CTT 及び CBPZ を用いた。

S. aureus では THR-221は CTM, CTX に次ぐ抗菌力を示し, MIC₉₀ は $3.13 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 2)。

S. epidermidis では THR-221は CTM, CTX に次ぐ抗菌

力を示したが, MIC₉₀ は $25 \mu\text{g/ml}$ とやや高い値であった (Fig. 3)。

S. pyogenes に対しては THR-221は強い抗菌力を示し, MIC₉₀ は $0.025 \mu\text{g/ml}$ であり対照の CTM, CTT, CBPZ に比べて優れていた (Fig. 4)。

S. pneumoniae に対しても THR-221は強い抗菌力を示し, MIC₉₀ は $0.78 \mu\text{g/ml}$ と低い値であった。CTM とほぼ同程度の抗菌力を示し, CTT, CBPZ に比べて優れていた (Fig. 5)。

E. faecalis における THR-221の感受性ピークは $3.13 \mu\text{g/ml}$ にみられ, 本剤の抗菌力は CTX に比べてやや劣るが, その他の対照薬剤に比べ勝っていた (Fig. 6)。

E. coli に対しては THR-221の抗菌力は CTX に比べやや劣るが, その感受性ピークは $0.1 \mu\text{g/ml}$ にあり, 対照の CTM, CTT, CBPZ と同じ値であった (Fig. 7)。

Table 1 Antibacterial activity of THR-221 against standard strains

Organism	Inoculum size : 10^6 cells/ml				
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	6.25	1.56	0.2	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> TERAJIMA	0.78	0.39	0.05	1.56	3.13
<i>S. aureus</i> MS 353	3.13	0.39	0.2	3.13	6.25
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.05	≤ 0.013	0.1	3.13	1.56
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.56	0.39	0.2	1.56	3.13
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.1	≤ 0.013	0.2	1.56	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.025	0.1	0.05	0.1
<i>E. coli</i> K12 C600	0.2	0.025	0.1	0.1	0.1
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.025	≤ 0.013	0.05	0.025	≤ 0.013
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.1	0.1	0.2	0.05	0.1
<i>S. typhi</i> 901	0.2	0.05	0.05	≤ 0.013	0.025
<i>S. paratyphi</i> 1015	1.56	0.2	0.2	12.5	12.5
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.2	0.025	0.2	0.05	0.2
<i>S. enteritidis</i> G-14	0.05	≤ 0.013	0.025	0.025	≤ 0.013
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.1	0.025	1.56	0.1	0.05
<i>M. morgani</i> IFO 3848	≤ 0.013	≤ 0.013	0.1	0.1	0.05
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.025	0.025	0.78	0.2	0.78
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.025	0.05	0.39	0.2	0.78
<i>P. vulgaris</i> HX-19	≤ 0.013	≤ 0.013	0.39	0.2	0.025
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	6.25	0.78	6.25	50	3.13
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.78	0.1	1.56	50	0.78
<i>E. cloacae</i> 963	0.39	0.1	0.78	6.25	0.2
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	12.5	50	>100	100	100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	3.13	3.13	>100	12.5	12.5
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	25	12.5	>100	>100	100

K. pneumoniae に対する THR-221 の MIC₉₀ は 0.2 μg/ml で CTM より優れ, CTX, CTT, CBPZ に比べて劣っていた (Fig. 8)。

K. oxytoca に対し THR-221 は *K. pneumoniae* とほぼ同様の傾向が認められ, MIC₉₀ は 0.78 μg/ml であった (Fig. 9)。

C. freundii に対する THR-221 の MIC₉₀ は 0.78 μg/ml で, CTX を除く対照薬とほぼ同程度であった。いずれの薬剤に対してもなだらかなカーブを示した (Fig. 10)。

E. cloacae に対する THR-221 の MIC₉₀ は 3.13 μg/ml であり, CTX に次ぐ値であり, これは対照の CTM, CTT, CBPZ に比べて優れていた。累積カーブは *C. freundii* と同様のなだらかなカーブを示した (Fig. 11)。

P. mirabilis に対して THR-221 は鋭い立ち上がりの分布を示し, MIC₉₀ は 0.025 μg/ml であり, CTX と同様, 他の対照薬より優れていた (Fig. 12)。

P. vulgaris に対しても THR-221 は強い抗菌力を示し, MIC₉₀ は 0.78 μg/ml と低い値であった。CTX とほぼ同程度の抗菌力を示し, 対照の CTM, CTT, CBPZ に比べて勝っていた (Fig. 13)。

P. rettgeri に対する THR-221 の MIC₉₀ は 0.39 μg/ml であり, CTX に次ぐ強い抗菌力を示した (Fig. 14)。

M. morgani に対しては THR-221, CTX 共に MIC₉₀ が 3.13 μg/ml であり, 対照の CTM, CTT, CBPZ に比べて優れた抗菌力を示した (Fig. 15)。

P. inconspans に対しても強い抗菌力があり, THR-221 の MIC₉₀ は 0.78 μg/ml であった (Fig. 16)。

Salmonella spp., *Shigella* spp. に対する THR-221 の抗菌力は対照薬剤に比べやや劣るが, MIC₉₀ はそれぞれ 0.39, 0.2 μg/ml と低い値であった (Fig. 17, 18)。

S. marcescens に対する THR-221 の抗菌力は CTT, CBPZ と同程度であり, CTX よりやや劣るが, CTM より優れていた (Fig. 19)。

P. aeruginosa に対しては CTT, CTM, CBPZ は抗菌力を示さなかったが, THR-221 は CTX と同様の抗菌力を示した (Fig. 20)。

P. cepacia に対する THR-221 の抗菌力は弱く, MIC₉₀ は 50 μg/ml であり, CTX の 12.5 μg/ml に比べやや劣っていた (Fig. 21)。

X. maltophilia に対してはいずれの薬剤も弱い抗菌活性を示し, MIC₉₀ は 100 μg/ml 以上であった (Fig. 22)。

A. calcoaceticus に対しても同様に, いずれの薬剤も抗菌力は弱く, MIC₉₀ は 100 μg/ml であった (Fig. 23)。

H. influenzae に対しては THR-221, CTX 共に強い抗菌力を示し, 全株 0.05 μg/ml 以下で抑制され, MIC₉₀ は 0.025 μg/ml の値であった。これは対照の CTM, CTT,

CBPZ に比べて著しく優れていた (Fig. 24)。

N. gonorrhoeae に対する THR-221 の抗菌力は強く, いずれの対照薬よりも優れ, MIC₉₀ は 0.05 μg/ml であった (Fig. 25)。

3. 殺菌効果

1) MBC

標準菌株のうち 5 株を用いて THR-221 の MIC と MBC を比較した。CTX, CTM, CTT, CBPZ を対照薬として用いた。*S. marcescens* の 10⁶ 接種を除き THR-221 の MBC は MIC と同じか 1 管程度の差であり, 本剤の強い殺菌力が示された。*P. vulgaris* に対する MIC と MBC の差は対照薬剤において 4~16 倍上昇したが, THR-221 ではほとんど差がみられなかった (Table 3)。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli NIHJ JC-2, *P. vulgaris* OX-19, *P. mirabilis* IFO 3849 の増殖曲線に及ぼす THR-221 の影響を CTX, CTM と比較した。

E. coli NIHJ JC-2 に対する殺菌効果を Fig. 26 に示した。THR-221 は 1 MIC において 4 時間目まで強い殺菌力を示したが, それ以後再増殖した。2, 4 MIC では 8 時間目まで強い殺菌力を示した。この THR-221 の殺菌効果は MIC 値の比較より, CTX に比べてやや劣るが, CTM より優れていた。

P. vulgaris OX-19 については Fig. 27 に示した様に, THR-221 の場合 1 MIC 以上において 8 時間目まで強い殺菌力を示した。1/4, 1/2 MIC でもそれぞれ 4, 6 時間目まで殺菌効果があった。この THR-221 の殺菌効果は CTX, CTM に比べ優れていた。

P. mirabilis IFO 3849 については Fig. 28 に示した様に, THR-221 の場合 1 MIC において 4 時間目まで強い殺菌力を示したが, それ以後再増殖した。2, 4 MIC では 8 時間目まで強い殺菌力を示した。この THR-221 の殺菌効果は CTX とほぼ同等であったが, CTM に比べて優れていた。

4. β-lactamase に対する安定性

1) β-lactamase 産生菌株に対する THR-221 の抗菌力

PCase 及び CSase 産生株に対する THR-221 の抗菌力は CTT, CBPZ より優れていた。また, CXase 産生株に対しては THR-221 は CTX と同様の抗菌力は弱かった (Table 4)。

2) 各種の β-lactamase に対する安定性

THR-221 の各種の β-lactamase に対する安定性を Vmax 値から求め, その結果を Table 5 に示した。THR-221 は PCase, CSase に対し CTX, CTT, CBPZ と同様に安定であったが, CTM は不安定であった。*P. vulgaris*,

Fig. 2 Antibacterial activity of THR-221 against *S. aureus* (94 strains)

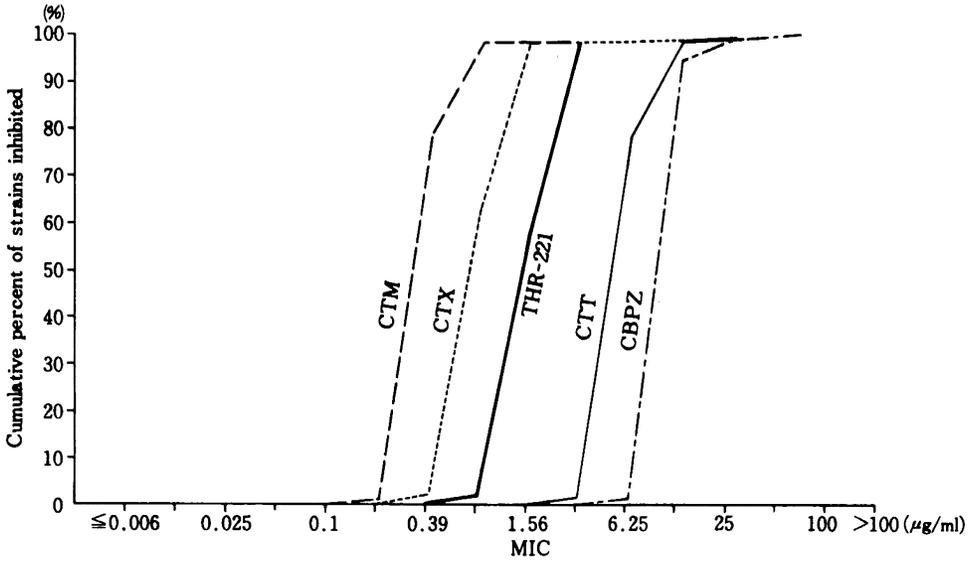


Fig. 3 Antibacterial activity of THR-221 against *S. epidermidis* (107 strains)

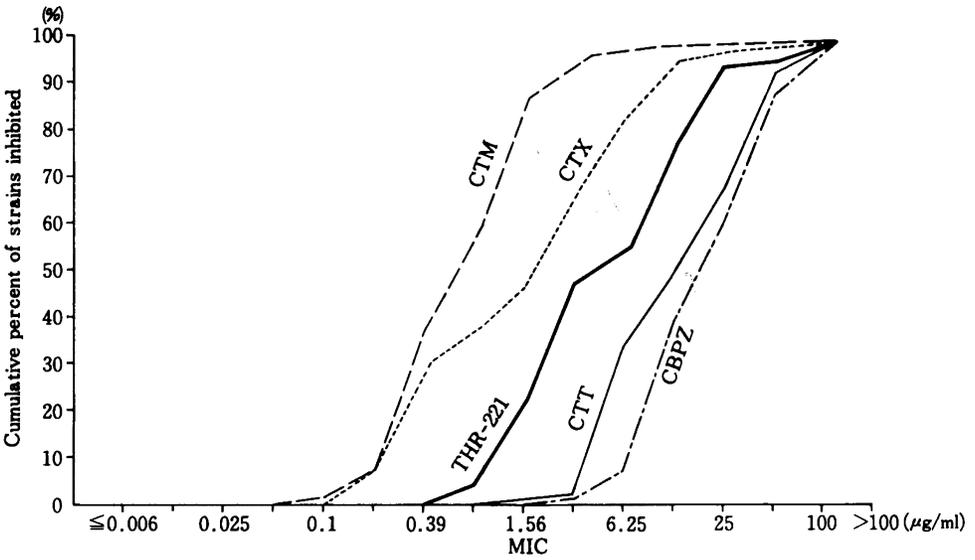


Fig. 4 Antibacterial activity of THR-221 against *S. pyogenes* (97 strains)

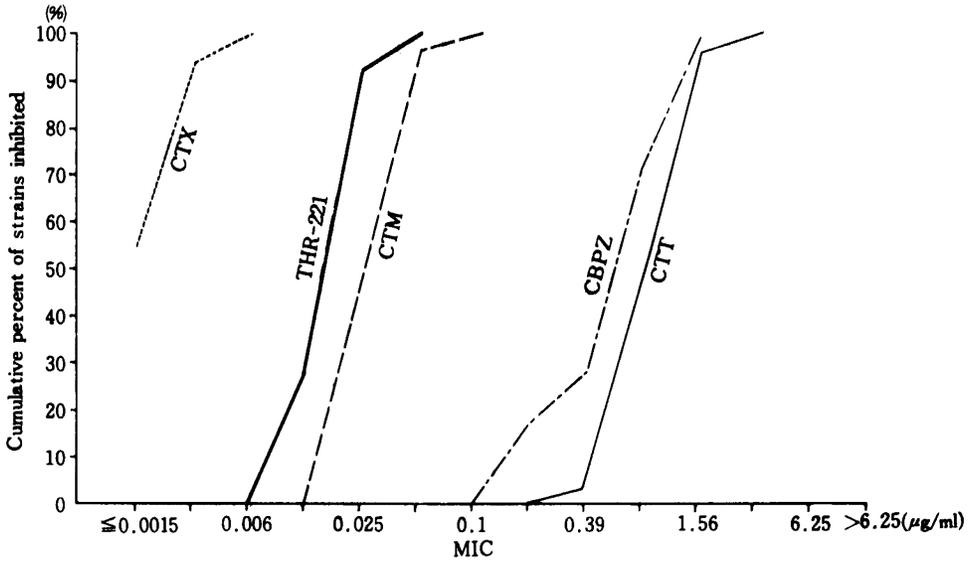


Fig. 5 Antibacterial activity of THR-221 against *S. pneumoniae* (20 strains)

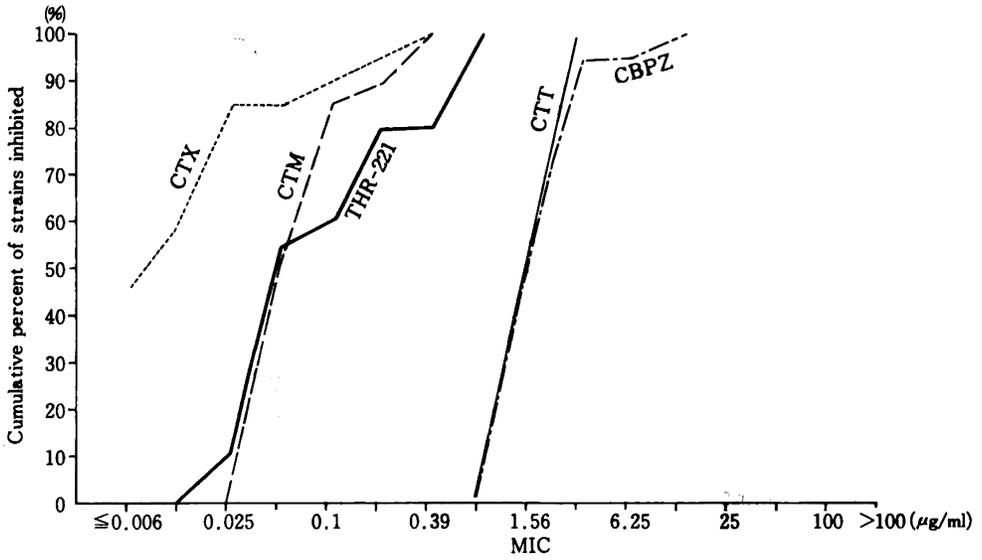


Fig. 6 Antibacterial activity of THR-221 against *E. faecalis* (80 strains)

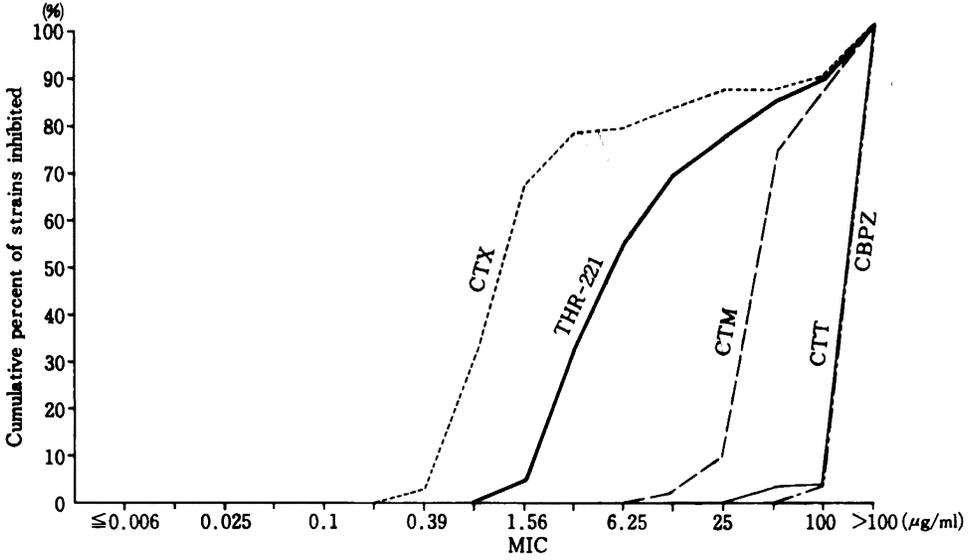


Fig. 7 Antibacterial activity of THR-221 against *E. coli* (95 strains)

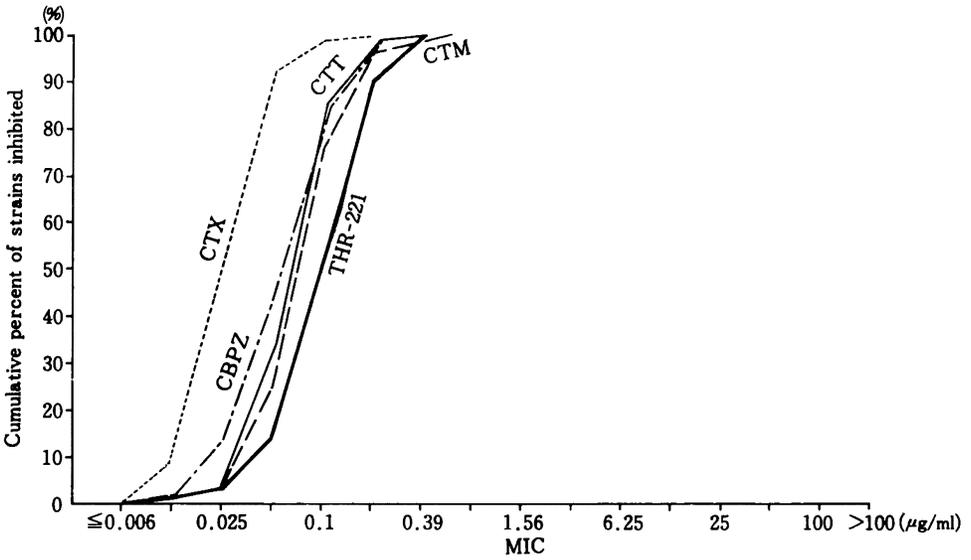


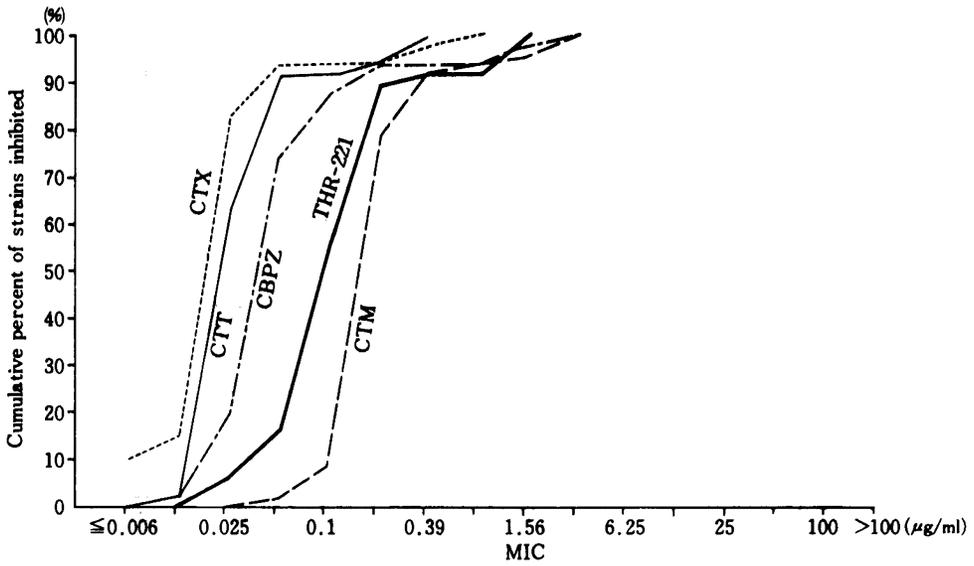
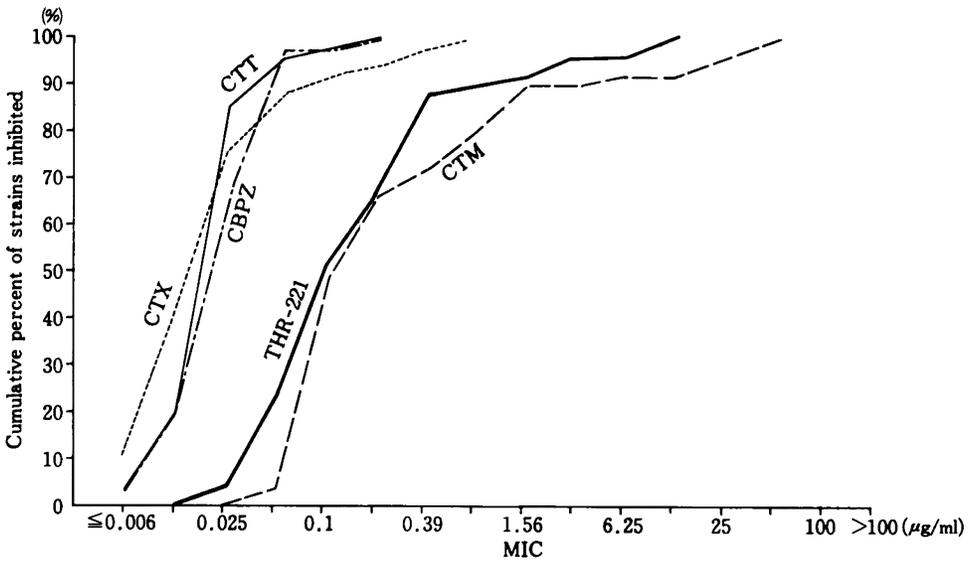
Fig. 8 Antibacterial activity of THR-221 against *K. pneumoniae* (50 strains)Fig. 9 Antibacterial activity of THR-221 against *K. oxytoca* (50 strains)

Fig. 10 Antibacterial activity of THR-221 against *C. freundii* (75 strains)

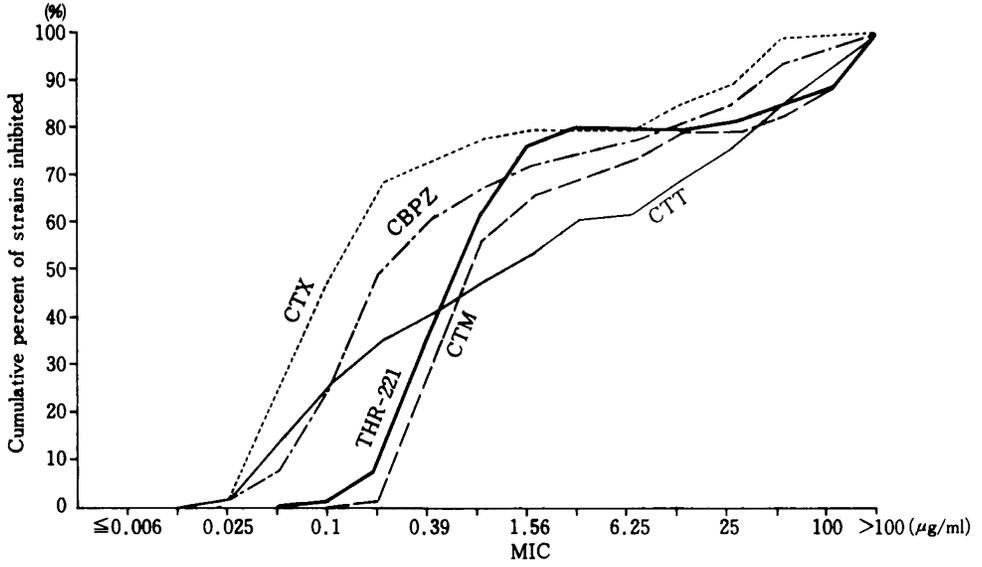


Fig. 11 Antibacterial activity of THR-221 against *E. cloacae* (100 strains)

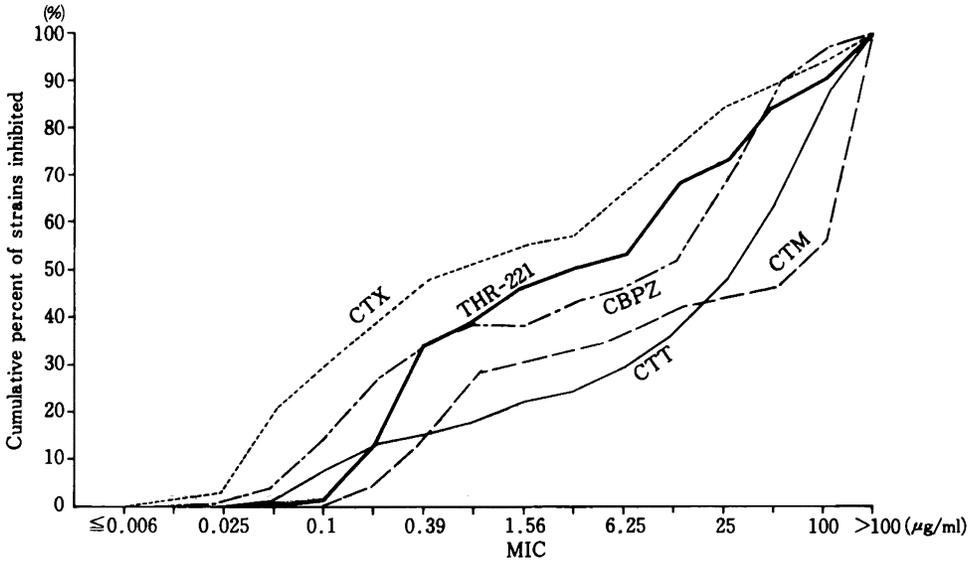


Fig. 12 Antibacterial activity of THR-221 against *P. mirabilis* (98 strains)

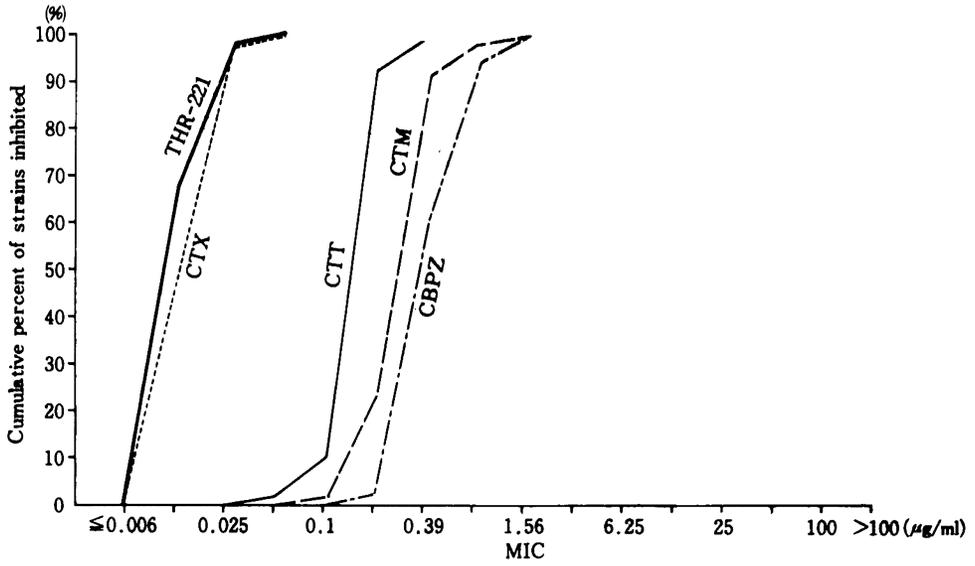


Fig. 13 Antibacterial activity of THR-221 against *P. vulgaris* (84 strains)

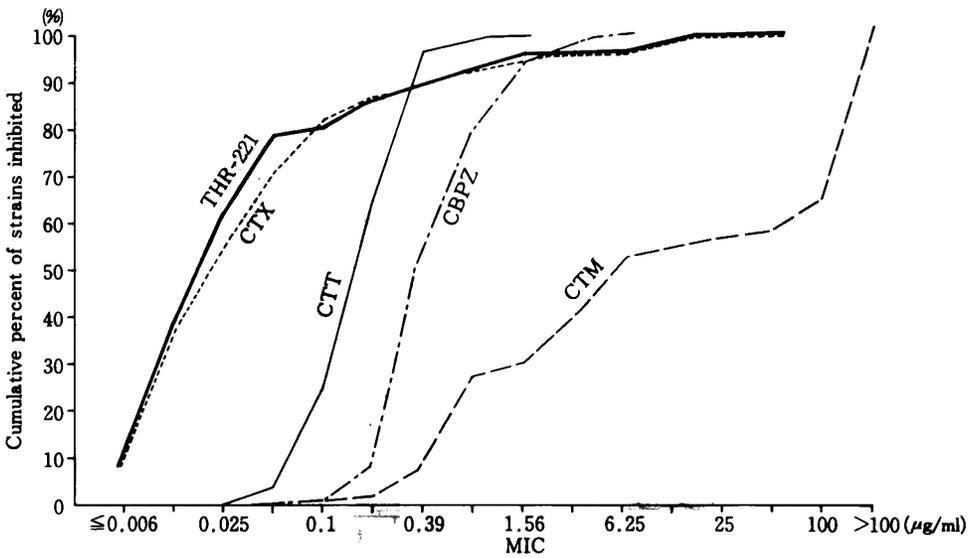


Fig. 14 Antibacterial activity of THR-221 against *P. rettgeri* (58 strains)

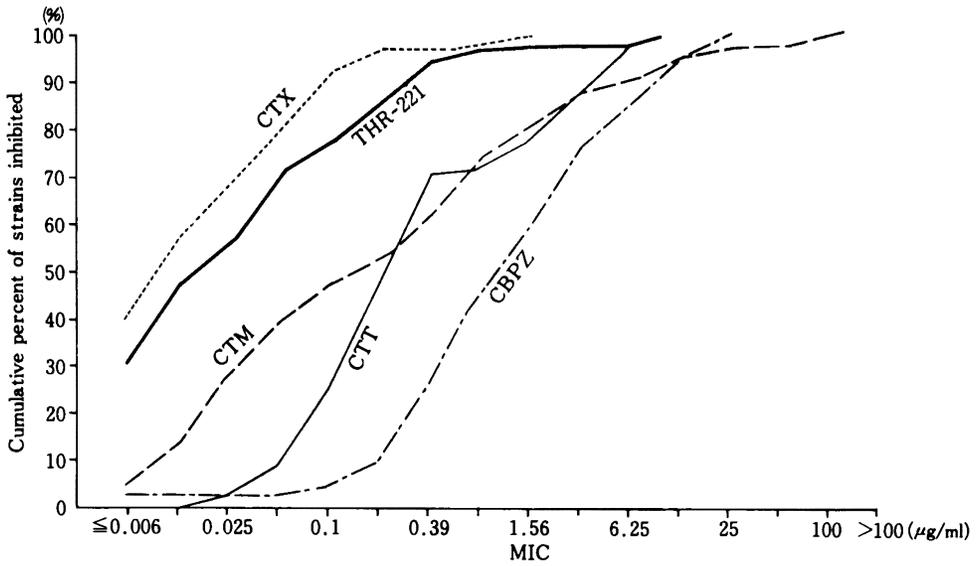


Fig. 15 Antibacterial activity of THR-221 against *M. morgani* (93 strains)

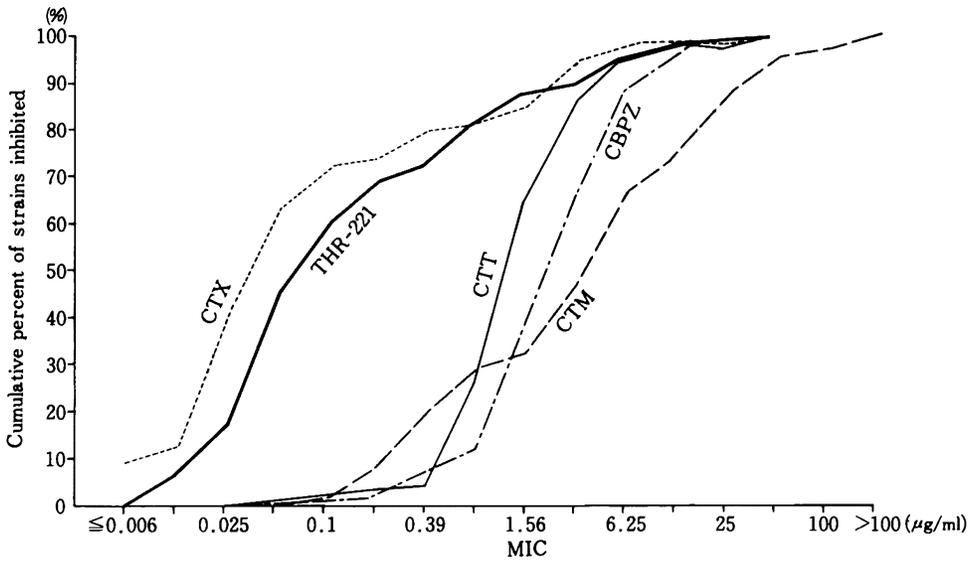


Fig. 16 Antibacterial activity of THR-221 against *P. inconstans* (93 strains)

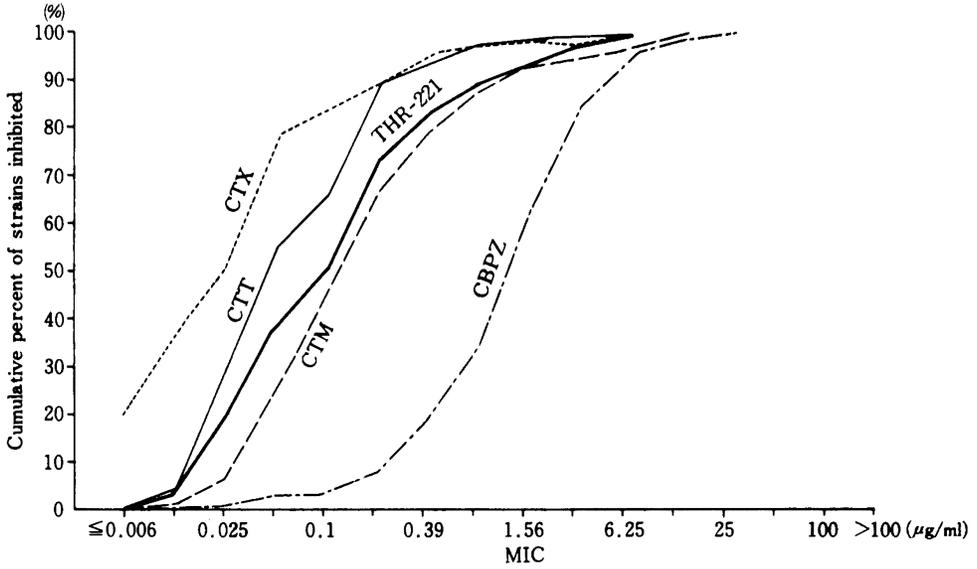


Fig. 17 Antibacterial activity of THR-221 against *Salmonella* spp. (108 strains)

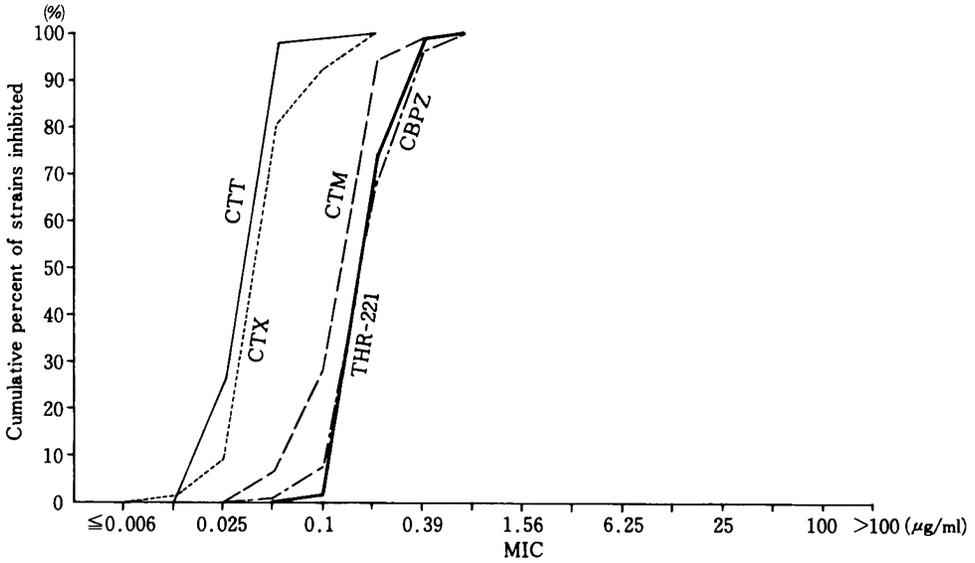


Fig. 18 Antibacterial activity of THR-221 against *Shigella* spp. (108 strains)

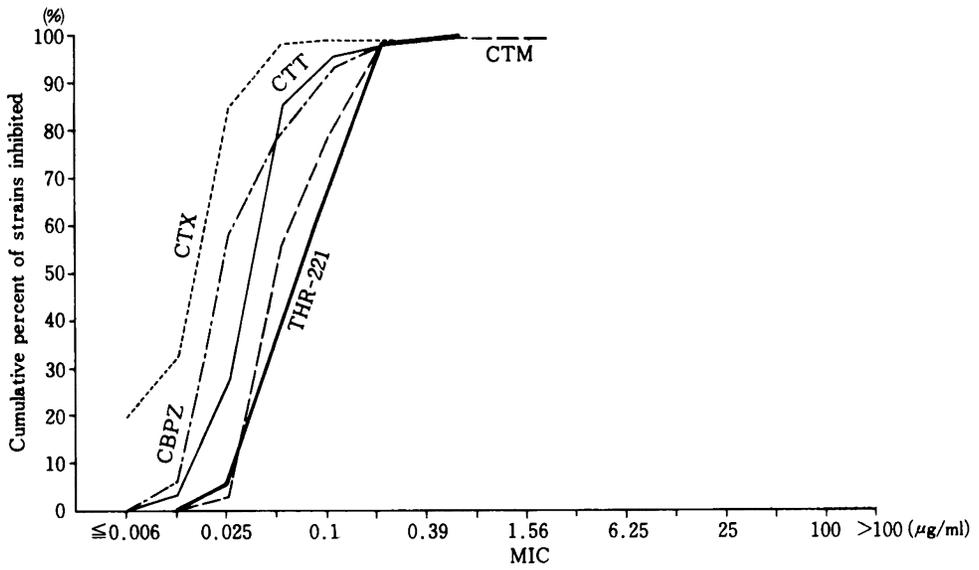


Fig. 19 Antibacterial activity of THR-221 against *S. marcescens* (108 strains)

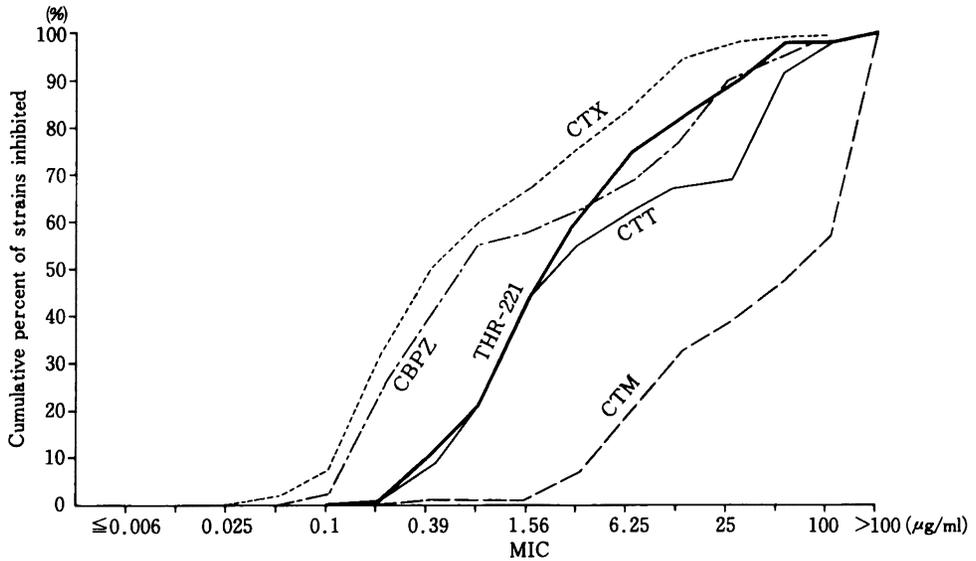


Fig. 20 Antibacterial activity of THR-221 against *P. aeruginosa* (100 strains)

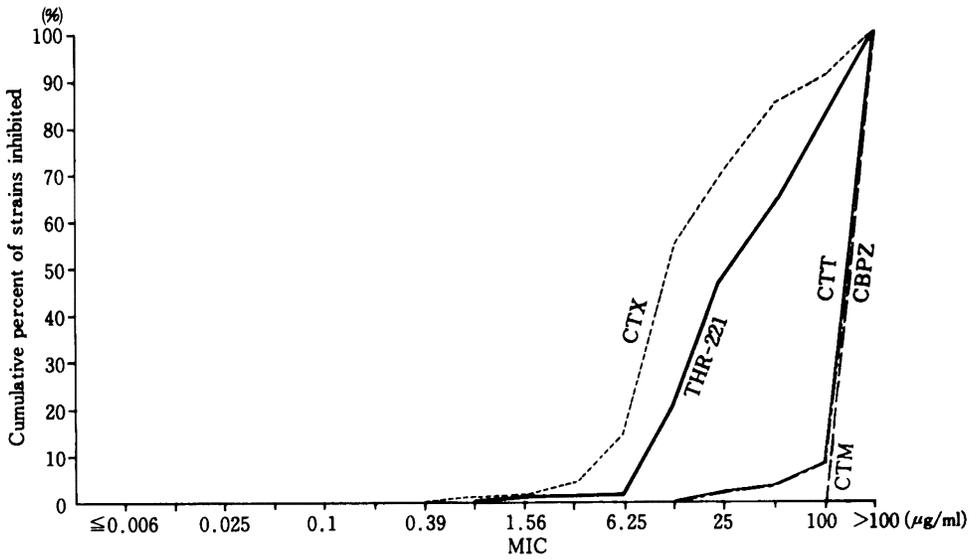


Fig. 21 Antibacterial activity of THR-221 against *P. cepacia* (50 strains)

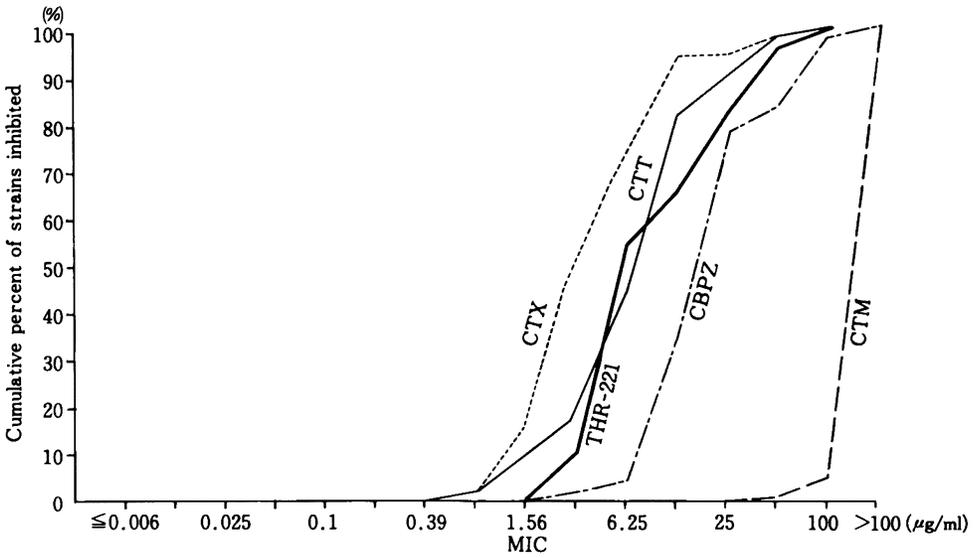


Fig. 22 Antibacterial activity of THR-221 against *X. maltophilia* (49 strains)

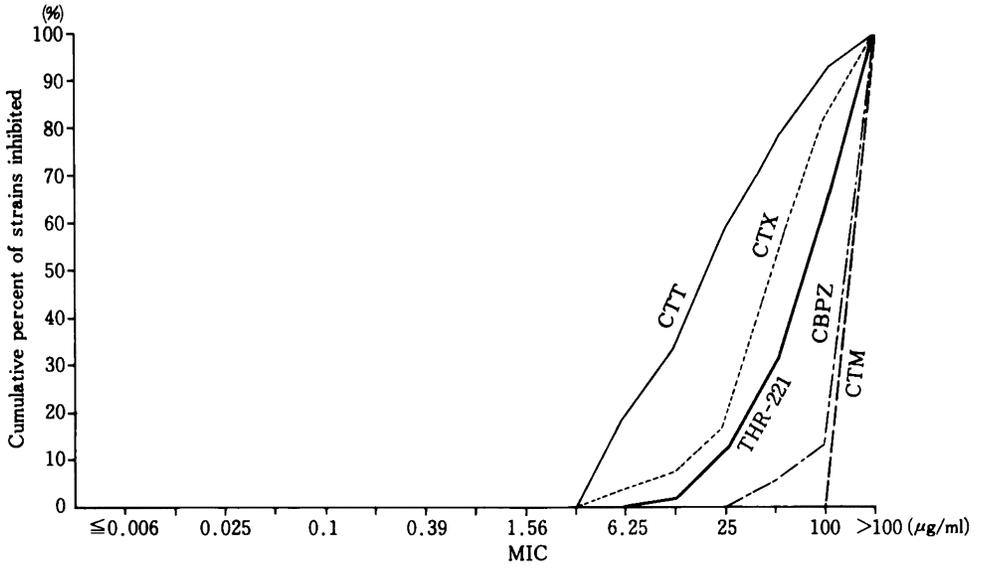


Fig. 23 Antibacterial activity of THR-221 against *A. calcoaceticus* (54 strains)

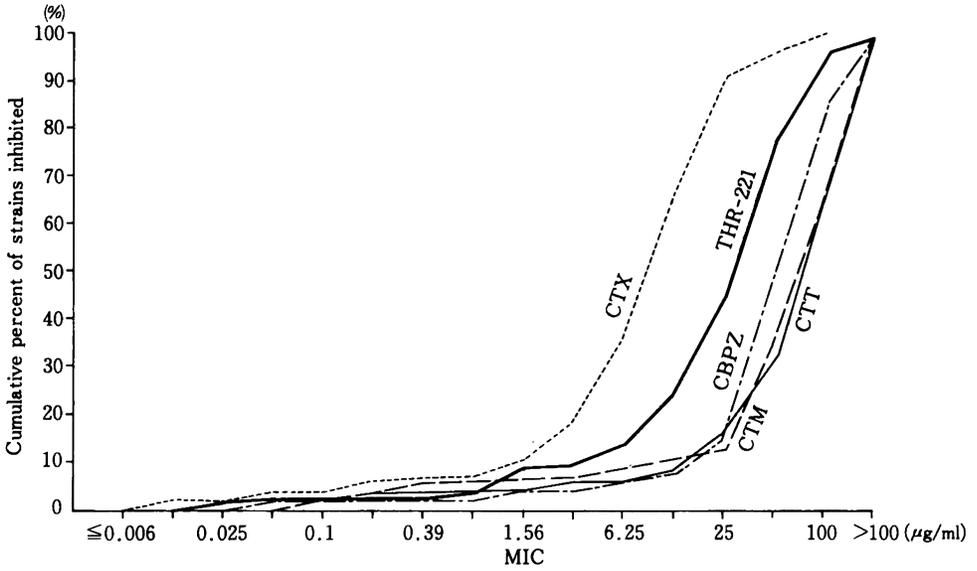


Fig. 24 Antibacterial activity of THR-221 against *H. influenzae* (63 strains)

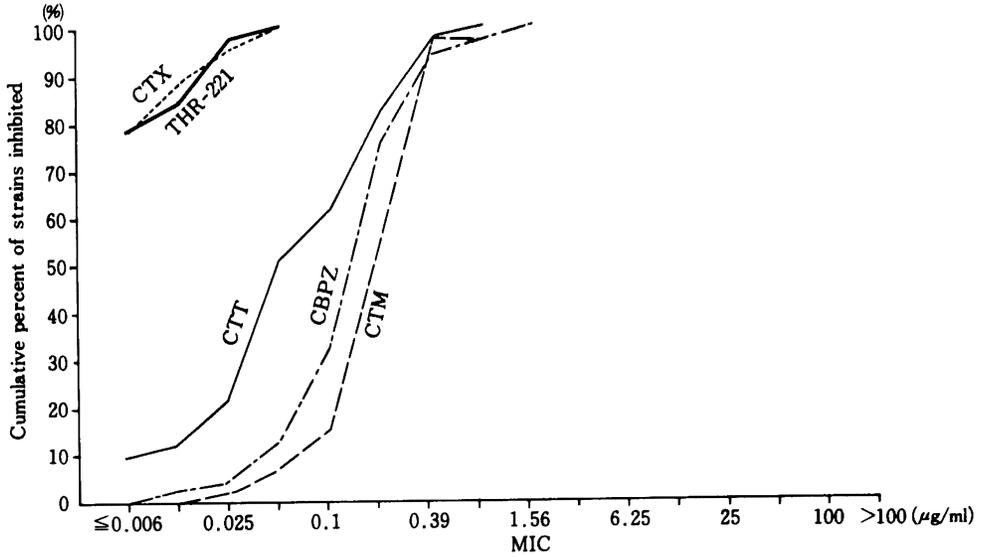


Fig. 25 Antibacterial activity of THR-221 against *N. gonorrhoeae* (10 strains)

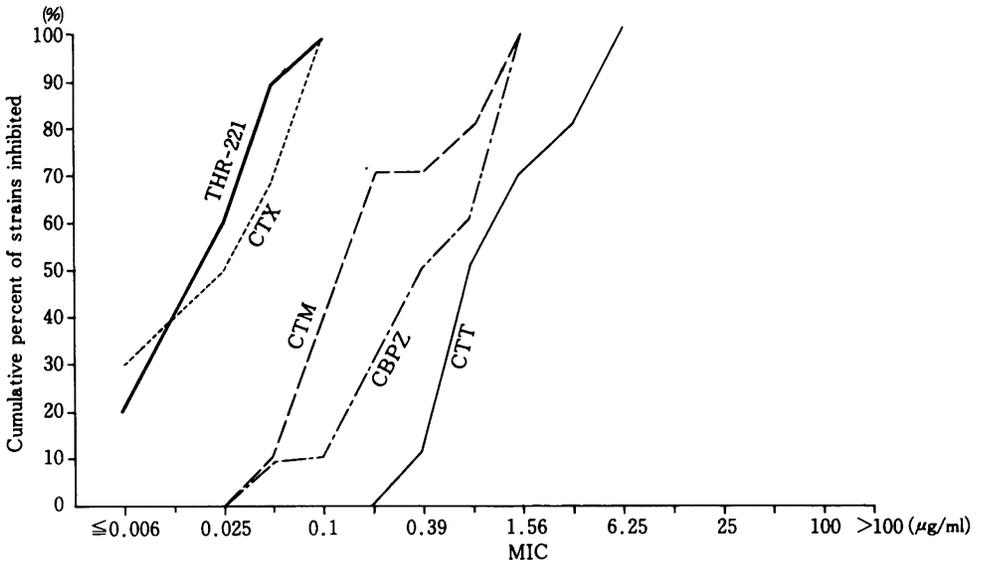


Table 2 Antibacterial activity of THR-221 against clinical isolates

Organism	No.	Inoculum size : 10 ⁶ cells/ml									
		MIC ₅₀ (μg/ml)					MIC ₉₀ (μg/ml)				
		THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ	THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ
<i>S. aureus</i>	94	1.56	0.78	0.39	6.25	12.5	3.13	1.56	0.78	12.5	12.5
<i>S. epidermidis</i>	107	6.25	3.13	0.78	25	25	25	12.5	3.13	50	100
<i>S. pyogenes</i>	97	0.025	≤0.0015	0.05	1.56	0.78	0.025	0.003	0.05	1.56	1.56
<i>S. pneumoniae</i>	20	0.05	0.013	0.05	1.56	1.56	0.78	0.1	0.2	3.13	3.13
<i>E. faecalis</i>	80	6.25	1.56	50	>100	>100	100	100	>100	>100	>100
<i>E. coli</i>	95	0.1	0.025	0.1	0.1	0.1	0.39	0.05	0.2	0.2	0.2
<i>K. pneumoniae</i>	50	0.1	0.025	0.2	0.025	0.05	0.2	0.05	0.39	0.05	0.2
<i>K. oxytoca</i>	50	0.1	0.025	0.2	0.025	0.025	0.78	0.1	1.56	0.05	0.05
<i>C. freundii</i>	75	0.78	0.2	0.78	1.56	0.39	>100	50	>100	>100	50
<i>E. cloacae</i>	100	3.13	0.78	100	50	12.5	100	100	>100	>100	100
<i>P. mirabilis</i>	98	0.013	0.013	0.39	0.2	0.39	0.025	0.025	0.39	0.2	0.78
<i>P. vulgaris</i>	84	0.025	0.025	6.25	0.2	0.39	0.78	0.78	>100	0.39	1.56
<i>P. rettgeri</i>	58	0.025	0.013	0.2	0.39	1.56	0.39	0.1	6.25	6.25	12.5
<i>M. morgani</i>	93	0.1	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	3.13	50	6.25	12.5
<i>P. inconstans</i>	93	0.1	0.025	0.2	0.05	1.56	0.78	0.2	1.56	0.2	6.25
<i>Salmonella</i> spp.	108	0.2	0.05	0.2	0.05	0.2	0.39	0.1	0.2	0.05	0.39
<i>Shigella</i> spp.	108	0.1	0.025	0.05	0.05	0.025	0.2	0.05	0.2	0.1	0.1
<i>S. marcescens</i>	108	3.13	0.78	100	3.13	0.78	50	12.5	>100	50	25
<i>P. aeruginosa</i>	100	50	12.5	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100
<i>P. cepacia</i>	50	6.25	3.13	>100	12.5	25	50	12.5	>100	50	100
<i>X. maltophilia</i>	49	100	50	>100	25	>100	>100	>100	>100	100	>100
<i>A. calcoaceticus</i>	54	50	12.5	100	100	100	100	25	>100	>100	>100
<i>H. influenzae</i>	63	≤0.006	≤0.006	0.2	0.05	0.2	0.025	0.025	0.39	0.39	0.39
<i>N. gonorrhoeae</i>	10	0.025	0.025	0.2	0.78	0.39	0.05	0.1	1.56	6.25	1.56

Table 3 Correlation between MICs and MBCs

Organism	Inoculum size (cells/ml)	Medium : Sensitivity-test broth									
		μg/ml									
		THR-221		CTX		CTM		CTT		CBPZ	
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	10 ⁶	6.25	12.5	3.13	6.25	0.39	0.78	12.5	25	12.5	50
	10 ⁵	6.25	12.5	3.13	3.13	0.2	0.39	12.5	25	25	25
	10 ⁴	6.25	12.5	1.56	3.13	0.2	0.2	12.5	12.5	25	25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	10 ⁶	0.39	0.78	0.1	0.2	0.39	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78
	10 ⁵	0.1	0.39	0.1	0.1	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78
	10 ⁴	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.78
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	10 ⁶	0.1	0.1	0.006	0.013	0.1	0.39	0.2	0.2	0.1	0.1
	10 ⁵	0.1	0.1	0.006	0.013	0.05	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05
	10 ⁴	0.05	0.1	0.006	0.006	0.05	0.05	0.1	0.1	0.05	0.1
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	10 ⁶	0.39	6.25	0.1	1.56	50	>100	0.39	3.13	0.39	3.13
	10 ⁵	0.39	0.39	0.1	0.2	0.78	6.25	0.2	0.39	0.39	0.39
	10 ⁴	0.39	0.78	0.1	0.1	0.78	12.5	0.05	0.2	0.1	0.2
<i>P. vulgaris</i> OX-19	10 ⁶	0.013	0.025	0.006	0.05	100	100	0.78	3.13	0.2	3.13
	10 ⁵	0.006	0.006	0.013	0.013	0.39	6.25	0.2	0.2	0.05	0.39
	10 ⁴	0.006	0.006	0.006	0.006	0.1	0.2	0.1	0.2	0.05	0.05

Fig. 26 Bactericidal activity of THR-221 against *E. coli* NIHJ JC-2

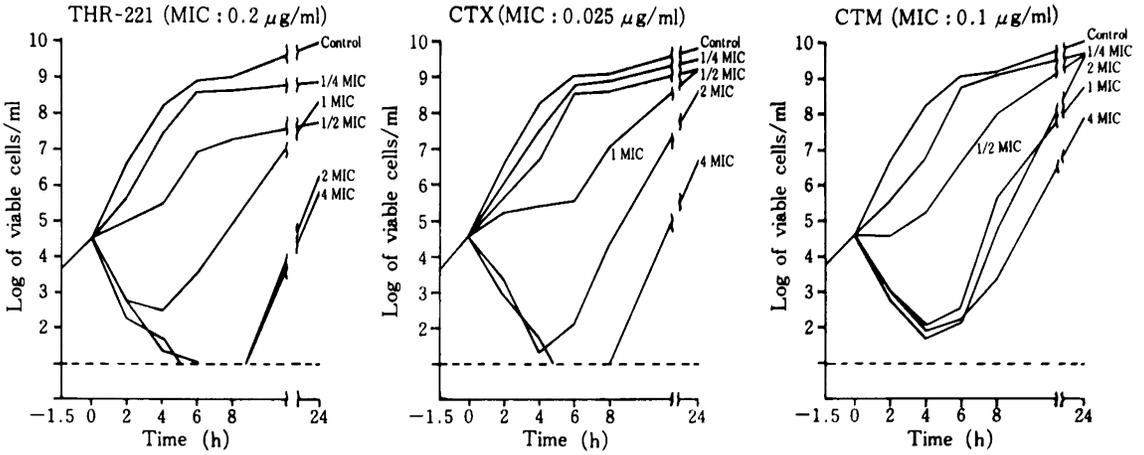


Fig. 27 Bactericidal activity of THR-221 against *P. vulgaris* OX-19

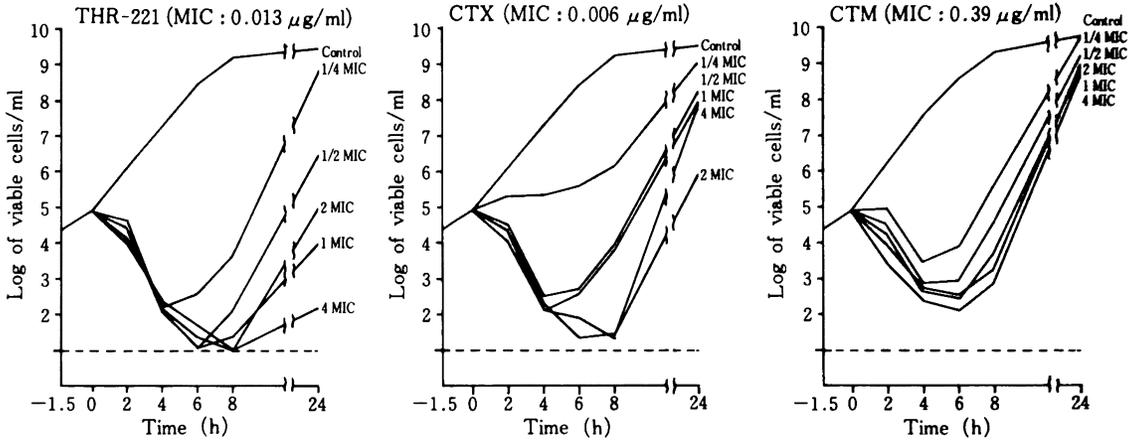
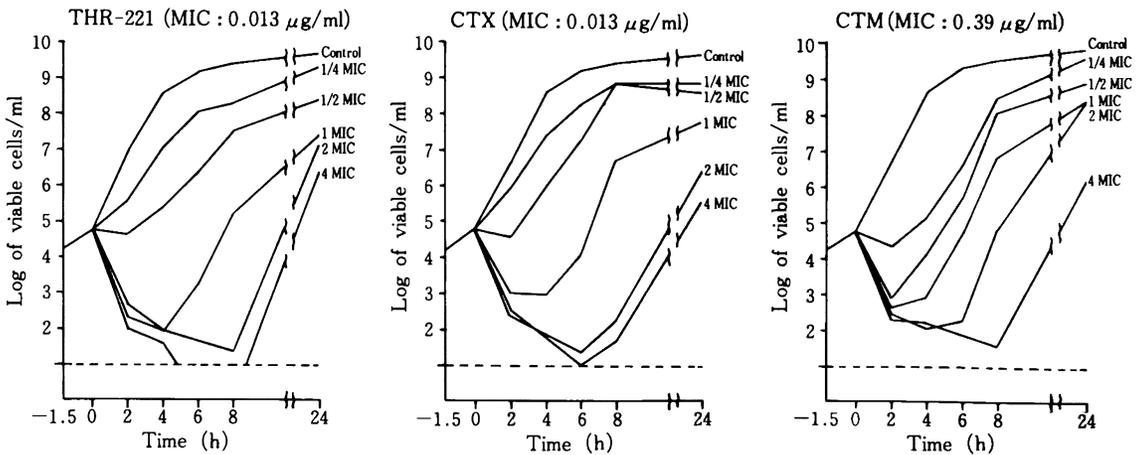


Fig. 28 Bactericidal activity of THR-221 against *P. mirabilis* IFO 3849



K. oxytoca 由来の CXase に対して THR-221 は CTX 同様に分解を受けた。

3) 各種 β -lactamase に対する親和性

THR-221 の CSase に対する K_i 値は小さく、これらの酵素に対して高い親和性と強い阻害活性を示した。また THR-221 は CXase 及び PCase に対する K_i 値が大きく、これらの酵素に対して低い親和性と弱い阻害活性を示した (Table 6)。

4) β -lactamase 誘導能

THR-221 の β -lactamase 誘導能を *E. cloacae* GN 5797,

P. rettgeri GN 4430 両菌株を用い、CTX, CTM, CTT, CBPZ, CFX と比較検討した。THR-221 の濃度を 1.0, 10 $\mu\text{g/ml}$ と増加させると β -lactamase はわずかに誘導されたが、対照の CTX やセファマイシン系の CBPZ, CFX に比べ誘導能は小さかった (Fig. 29, 30)。

5. PBPs に対する親和性

E. coli NIHJ JC-2 及び *S. aureus* 209 P の PBPs に対する THR-221 の親和性を検討した。THR-221 は *E. coli*, *S. aureus* 両者の PBPs に強い親和性を認めた。*E. coli* の場合、3, 1 A/Bs, 2 に対する ID_{50} はそれぞれ < 0.2 ,

Table 4 Antibacterial activity of THR-221 against β -lactamase producing strains

Inoculum size : 10^6 cells/ml

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ
<i>P. rettgeri</i> GN 5284 (CSase)	0.025	≤ 0.013	0.1	0.2	1.56
<i>P. rettgeri</i> GN 4430 (CSase)	≤ 0.013	≤ 0.013	0.05	0.1	1.56
<i>P. rettgeri</i> GN 4424 (CSase)	0.025	≤ 0.013	0.2	0.39	6.25
<i>P. rettgeri</i> GN 4429 (CSase)	0.025	≤ 0.013	0.025	0.1	0.78
<i>P. rettgeri</i> GN 4762 (CSase)	0.2	0.2	3.13	3.13	25
<i>E. coli</i> GN 5482 (CSase)	0.78	0.39	3.13	3.13	0.78
<i>E. coli</i> No. 1058 (CSase)	0.2	0.05	0.2	0.1	0.1
<i>E. coli</i> No. 96 (CSase)	1.56	0.39	0.78	1.56	0.39
<i>E. cloacae</i> GN 7471 (CSase)	25	12.5	> 100	25	25
<i>E. cloacae</i> GN 7467 (CSase)	25	6.25	> 100	50	12.5
<i>E. cloacae</i> GN 5797 (CSase)	0.78	0.2	100	> 100	12.5
<i>M. morganii</i> GN 5407 (CSase)	0.78	0.39	12.5	3.13	3.13
<i>M. morganii</i> GN 5307 (CSase)	0.05	≤ 0.013	0.78	0.78	1.56
<i>M. morganii</i> GN 5375 (CSase)	0.05	0.025	3.13	1.56	1.56
<i>P. aeruginosa</i> GN 918 (CSase)	100	50	> 100	> 100	> 100
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362 (CSase)	25	25	> 100	> 100	> 100
<i>P. aeruginosa</i> GN 10367 (CSase)	50	25	> 100	> 100	> 100
<i>S. marcescens</i> L-48 (CSase)	25	12.5	> 100	50	12.5
<i>S. marcescens</i> L-65 (CSase)	1.56	0.2	100	6.25	0.39
<i>S. marcescens</i> L-82 (CSase)	1.56	0.39	25	> 100	25
<i>P. vulgaris</i> GN 7919 (CXase)	12.5	25	> 100	0.39	6.25
<i>P. vulgaris</i> GN 4413 (CXase)	12.5	50	> 100	1.56	12.5
<i>P. cepacia</i> GN 11164 (CXase)	1.56	0.78	0.2	0.78	1.56
<i>K. oxytoca</i> GN 10650 (CXase)	12.5	0.78	100	0.05	0.05
<i>X. maltophilia</i> GN 12873 (CXase)	100	100	> 100	25	> 100
Rms 149/ <i>E. coli</i> C (PCase IV)	0.2	0.025	0.1	0.1	0.05
Rms 212/ <i>E. coli</i> W 3630 (PCase I)	0.2	0.05	0.2	0.2	0.1
Rms 213/ <i>E. coli</i> W 3630 (PCase II)	0.2	≤ 0.013	0.1	0.1	0.05
Rte 16/ <i>E. coli</i> ML 1410 (PCase III)	0.2	≤ 0.013	0.1	0.1	0.05
Rms 139/ <i>P. aeruginosa</i> M-1 (PCase IV)	12.5	6.25	> 100	100	> 100

0.3, 1.9 $\mu\text{g/ml}$ と低く、親和性は $3 > 1 \text{ A/Bs} > 2 > 4 > 6 > 5$ の順であった (Fig. 31)。 *S. aureus* の場合 1, 2, 3 に対する ID_{50} はそれぞれ < 0.2 , 1.5, 2.1 であり、親和性の順は $1 > 2 > 3$ であった (Fig. 32)。

6. マウス感染治療実験

S. pneumoniae 2132, *S. pyogenes* 1412, *E. coli* ML 4707, *K. pneumoniae* GN 6445, *S. marcescens* GN 7577, *P. mirabilis* GN 4754, 更に β -lactamase 産生株の *E. coli*

ML 5005 (PCase), *E. coli* GN 14930 (CSase), *K. pneumoniae* ML 5006 (PCase), *P. mirabilis* ML 5007 (PCase), *P. vulgaris* ML 5008 (CXase) を用い THR-221 の *in vivo* 効果を検討し、対照薬の CTX, CTM, CTT, CBPZ と比較した (Table 7)。 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* の場合 THR-221 は強い *in vivo* 効果を示し、 ED_{50} 値はそれぞれ 1.16, 0.25 mg/kg であった。特に *S. pneumoniae* の場合、対照薬剤のいずれよりも優れた治療効果を示した。

Table 5 Stability of THR-221 against various β -lactamases

β -lactamase source	Type of β -lactamase	Relative rate of hydrolysis (Vmax)*						
		CER	PCG	THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ
<i>E. coli</i> GN 5482	CSase	100		<1	<1	22	<1	<1
<i>E. cloacae</i> GN 7471	CSase	100		<1	<1	17	<1	<1
<i>C. freundii</i> GN 7391	CSase	100		<1	<1	<1	<1	<1
<i>S. marcescens</i> GN 10857	CSase	100		3	<1	43	<1	<1
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362	CSase	100		<1	<1	19	<1	<1
<i>P. rettgeri</i> GN 4430	CSase	100		<1	<1	7	<1	<1
<i>M. morgani</i> GN 5407	CSase	100		<1	<1	19	<1	<1
<i>P. vulgaris</i> GN 7919	CXase	100		89	34	332	<1	<1
<i>K. oxytoca</i> GN 10650	CXase	100		3	4	13	<1	<1
Rms 212/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase(I)		100	<1	<1	2	<1	<1
Rms 213/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase(II)		100	<1	11	3	<1	<1
Rte 16/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase(III)		100	<1	<1	12	<1	<1
Rms 139/ <i>P. aeruginosa</i> M 1	PCase(IV)		100	<1	<1	<1	<1	<1

* : Relative Vmax, in percent of hydrolysis of CER or PCG

Table 6 Affinity of THR-221 to various β -lactamases

β -lactamase source	Type of β -lactamase	Km (μM)	Ki (μM)				
		CET	THR-221	CTX	CTM	CTT	CBPZ
<i>E. coli</i> GN 5482	CSase	29.2	0.22	0.10	265	0.18	0.67
<i>E. cloacae</i> GN 7471	CSase	72.0	0.98	0.05	286	0.21	1.55
<i>C. freundii</i> GN 7391	CSase	20.9	0.17	0.02	2.06	0.13	0.82
<i>S. marcescens</i> GN 10857	CSase	59.0	3.79	1.18	97.3	0.47	0.12
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362	CSase	122	1.51	1.53	21.7	0.27	0.06
<i>P. rettgeri</i> GN 4430	CSase	100	64.1	54.6	45.1	2.04	2.82
<i>M. morgani</i> GN 5407	CSase	30.9	0.24	0.60	155	0.39	0.14
<i>P. vulgaris</i> GN 7919	CXase	41.6	261 ^c	143 ^c	219 ^c	13.8	37.9
<i>K. oxytoca</i> GN 10650	CXase	39.9	28.1 ^c	96.9 ^c	12.1 ^c	143	25.0
<i>P. cepacia</i> GN 11164	CXase	63.0	69.6 ^c	251 ^c	52.0 ^c	116	40.7
Rms 212/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase (I)	416 ^a	— ^b	— ^b	— ^b	133	127
Rms 213/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase (II)	366 ^a	3.14	49.2	9.97	13.6	45.5
Rte 16/ <i>E. coli</i> W 3630	PCase (III)	81.1 ^a	33.7	157	22.1	1.13	27.2
Rms 149/ <i>E. coli</i> C	PCase (IV)	237 ^a	— ^b	— ^b	10.6	— ^b	— ^b

^a : CER was used as a substrate

^b : Not inhibited

^c : Km value

Fig. 29 Induction of β -lactamase production by THR-221 and other β -lactams

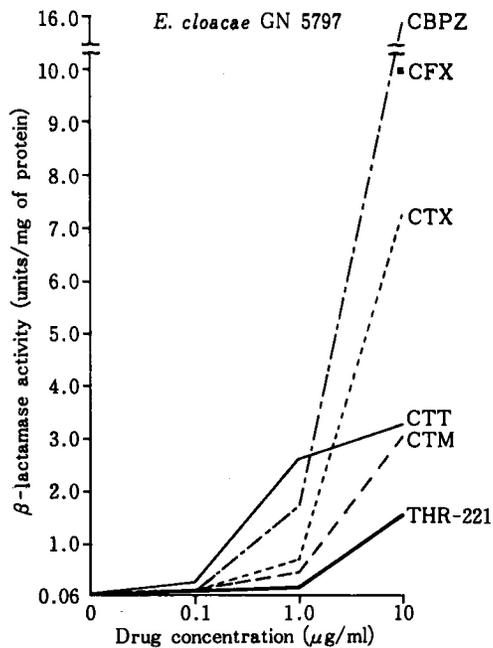


Fig. 30 Induction of β -lactamase production by THR-221 and other β -lactams

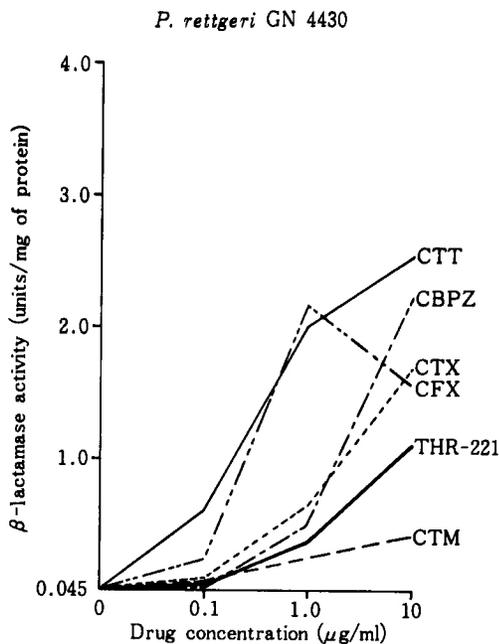
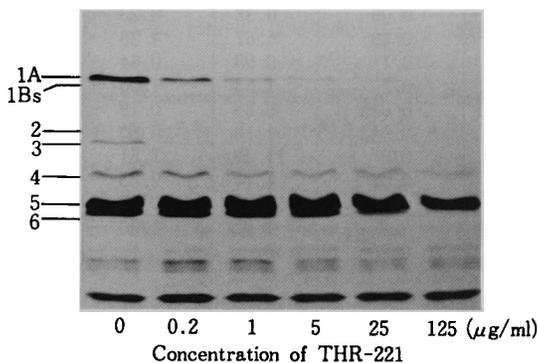


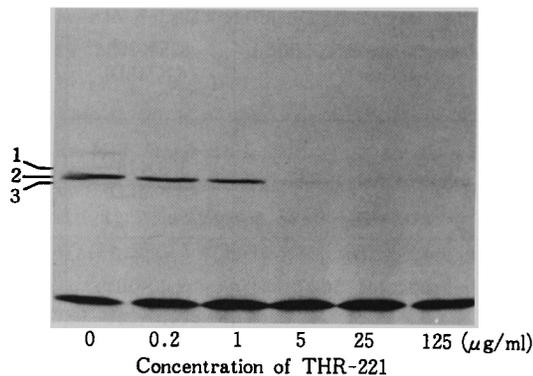
Fig. 31 Affinity of THR-221 to *E. coli* PBPs



Competition of THR-221 with ^{14}C -labelled Penicillin G for binding to PBPs in *E. coli* NIHJ JC-2

Proteins	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					
	1A/Bs	2	3	4	5	6
THR-221	0.3	1.9	<0.2	8.5	>125	19

Fig. 32 Affinity of THR-221 to *S. aureus* PBPs



Competition of THR-221 with ^{14}C -labelled Penicillin G for binding to PBPs in *S. aureus* 209P

Proteins	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		
	1	2	3
THR-221	<0.2	1.5	2.1

Table 7 *In vivo* antibacterial activity of THR-221 against systemic infection in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Drug	MIC (μ g/ml) (10^6 /ml)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit
<i>S. pyogenes</i> 1412	7.0×10^5 ($2 \times$ MLD)	+	THR-221	0.025	0.25	0.16 ~ 0.38
			CTX	0.006	0.058	0.035 ~ 0.081
			CTM	0.025	0.50	0.27 ~ 0.92
			CTT	1.56	>5	—
			CBPZ	0.78	>5	—
<i>S. pneumoniae</i> 2132	8.2×10^2 ($32 \times$ MLD)	—	THR-221	3.13	1.16	0.84 ~ 1.61
			CTX	0.39	>20	—
			CTM	0.1	>20	—
			CTT	6.25	>20	—
			CBPZ	6.25	>20	—
<i>E. coli</i> ML 4707	1.3×10^6 ($2 \times$ MLD)	—	THR-221	0.05	0.25	0.15 ~ 0.35
			CTX	0.013	0.36	0.11 ~ 0.68
			CTM	0.05	2.42	1.39 ~ 4.04
			CTT	0.025	0.37	0.23 ~ 0.57
			CBPZ	0.025	0.19	0.068 ~ 0.34
<i>E. coli</i> ML 5005 (PCase)	2.6×10^6 ($16 \times$ MLD)	+	THR-221	0.1	1.90	1.45 ~ 2.47
			CTX	0.025	0.70	0.31 ~ 1.14
			CTM	0.1	4.13	1.95 ~ 7.65
			CTT	0.1	1.22	0.73 ~ 1.90
			CBPZ	0.1	2.06	1.28 ~ 3.17
<i>E. coli</i> GN 14930 (CSase)	3.6×10^5 ($2 \times$ MLD)	+	THR-221	0.78	3.18	2.07 ~ 5.78
			CTX	0.39	6.86	4.32 ~ 11.29
			CTM	0.78	49.1	36.95 ~ 74.03
			CTT	1.56	9.19	6.80 ~ 12.30
			CBPZ	0.78	9.33	6.08 ~ 15.20
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	5.0×10^6 ($2 \times$ MLD)	—	THR-221	0.1	3.45	2.33 ~ 5.10
			CTX	0.013	5.59	3.57 ~ 9.05
			CTM	0.1	14.14	11.05 ~ 18.11
			CTT	0.05	11.09	7.96 ~ 15.59
			CBPZ	0.025	3.72	2.43 ~ 5.70
<i>K. pneumoniae</i> ML 5006 (PCase)	5.5×10^5 ($4 \times$ MLD)	+	THR-221	0.2	0.99	0.62 ~ 1.89
			CTX	0.05	0.32	0.23 ~ 0.44
			CTM	0.39	5.67	4.25 ~ 7.55
			CTT	0.1	0.93	0.64 ~ 1.35
			CBPZ	0.2	1.53	1.05 ~ 2.28
<i>P. mirabilis</i> GN 4754	3.3×10^6 ($4 \times$ MLD)	+	THR-221	0.013	0.26	0.19 ~ 0.35
			CTX	0.013	1.12	0.80 ~ 1.57
			CTM	0.2	11.48	7.51 ~ 17.6
			CTT	0.05	4.14	2.83 ~ 6.23
			CBPZ	0.39	16.75	10.02 ~ 32.92
<i>P. mirabilis</i> ML 5007 (PCase)	5.1×10^5 ($8 \times$ MLD)	+	THR-221	0.2	1.92	1.30 ~ 2.86
			CTX	0.2	>40	—
			CTM	25	>600	—
			CTT	0.1	>10	—
			CBPZ	0.78	79.5	43.21 ~ 395.7
<i>P. vulgaris</i> ML 5008 (CXase)	4.0×10^5 ($2 \times$ MLD)	+	THR-221	0.1	1.58	0.79 ~ 2.52
			CTX	0.1	50.6	29.84 ~ 141.1
			CTM	25	>500	—
			CTT	0.1	5.92	3.51 ~ 11.95
			CBPZ	0.78	>20	—
<i>S. marcescens</i> GN 7577	5.8×10^4 ($3 \times$ MLD)	+	THR-221	1.56	0.78	0.46 ~ 1.28
			CTX	0.39	0.21	0.044 ~ 0.35
			CTM	50	12.1	4.47 ~ 20.54
			CTT	1.56	0.66	0.49 ~ 0.91
			CBPZ	0.39	0.27	0.19 ~ 0.38

ED₅₀ : Probit analysisMice : Std-ddY weighing 20 ± 1 g

Infection : Intraperitoneal infection with 0.2 ml of bacterial suspension per mouse

Therapy : Two injections at 1 and 4 h after infection

また THR-221 は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* に対しても強い *in vivo* 効果を示し, ED₅₀ 値はそれぞれ 0.25, 3.45, 0.26 mg/kg であり, 対照の CTX, CTM, CTT, CBPZ に比べて勝っていた。

更に β -lactamase 産生株を用いて感染治療実験を行った結果, THR-221 は *E. coli*(CSase), *P. mirabilis*(PCase), *P. vulgaris*(CXase) に対しても強い治療効果を示し, ED₅₀ 値はそれぞれ 3.18, 1.92, 1.58 mg/kg を示し, CTX を初め他の対照薬に比べてはるかに勝っていた。

THR-221 はいずれの菌株においても, MIC 値は CTX に比べて高い値であるにもかかわらず治療効果は優れていた。

III. 考 察

THR-221 はグラム陽性, グラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有していた。グラム陽性菌の *S. aureus* に対しては THR-221 は CTM, CTX に劣ったが, CTT, CBPZ に比べて勝っていた。*S. pyogenes*, *S. pneumoniae* に対しては THR-221 は CTX に比べやや劣っていたが, CTT, CBPZ に比べはるかに勝っていた。グラム陰性菌の *E. coli*, *K. pneumoniae* に対しては CTX より少し劣るが, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *M. Morganii*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* に対しては CTX とほぼ同等か, 若干優れた抗菌力を示した。

MIC と MBC の値を比較したところ, 両者の間には大きな差が認められなかった。また, 増殖曲線に及ぼす影響を調べたところ, THR-221 は短時間内における殺菌力は強かった。

更に *E. coli*, *S. aureus* の PBP_s に対する THR-221 の親和性を検討したところ, *E. coli* の場合 3, 1 A/Bs, 2 に対して, *S. aureus* の場合 1, 2, 3 に対して親和性が強いことがわかった。これらのことから, THR-221 はこれらの菌の PBP に結合しやすく, 短時間内で殺菌的な作用を及ぼし優れた殺菌力を発揮したと考えられる。

次に種々の β -lactamase に対する安定性について V_{max} 値より求めたところ, THR-221 は PCase 及び CSase に対して極めて安定であることがわかった。CTX は PCase II 型によりわずかに分解を受けたが, THR-221 は安定であった。CXase に対しては THR-221 は CTX 同様に分解を受けた。そのため CXase 産生の *P. vulgaris*, *K. oxytoca*, *P. cepacia* から β -lactamase を調製し, THR-221 との間の親和性を Km 値から調べたところ Km 値は大きく, THR-221 はこれらの酵素に対して親和性が低いことがわかった。また CSase 産生の *P. rettgeri*, *E. cloacae* を用いて THR-221 の β -lactamase 誘導能を調べたところ, β -lactamase 誘導能はあったが, 対照薬の CTX,

CTT, CBPZ に比べてはるかに小さい値であった。

次に THR-221 の *in vivo* 効果を検討するためにマウス全身感染治療実験を行った。その結果, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, 更に β -lactamase 産生の *E. coli*(CSase), *P. mirabilis*(PCase), *P. vulgaris*(CXase) に対して MIC 値から期待される以上の強い治療効果を示し, 対照の CTX, CTM, CTT, CBPZ に比べて優れていた。

以上の結果により, THR-221 はヒト感染治療に対し優れた効果が期待できる薬剤の一つと考えられる。

なお, THR-221 が優れた *in vivo* 治療効果を示す原因として, 優れた殺菌力の他に生体内防御因子との間で協力作用が存在していることが考えられ, そのことについて我々は本特集号にて報告している¹²⁾。

文 献

- 1) 三橋 進, 井上松久: MIC 測定用標準菌株. *Chemotherapy* 27: 561, 1979
- 2) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76-79, 1981
- 3) CURTISS, R.: Chromosomal aberrations associated with mutations to bacteriophage resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 89: 28-40, 1965
- 4) MITSUHASHI, S. & M. INOUE: Mechanism of resistance to β -lactam antibiotics. β -Lactam Antibiotics (MITSUHASHI, S., ed.), Japan Scientific Societies Press: 41-56, 1981
- 5) 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
- 6) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780-789, 1974
- 7) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the forin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951
- 8) MINAMI, S., A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 382-385, 1980
- 9) LINEWEAVER, H & D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-663, 1934

- 10) DIXON, M. : The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55 : 170~171, 1953
- 11) SPRATT, R. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 : 2999~3003, 1975
- 12) 三宅美行, 朝長正志, 東岡俊之, 山田雄次, 石田直文, 兵頭昭夫, 井上松久, 三橋 進 : Cefodizime の実験的感染防御能低下マウスにおける治療効果について。Chemotherapy 投稿中

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFODIZIME

AKIO HYODO, FUSAHIRO HIGASHITANI and SUSUMU MITSUHASHI
Episome Institute, Gunma

MATSUHISA INOUE

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

Cefodizime (THR-221) is a new aminothiazolyl cephalosporin with the mercaptothiazolyl group at the 3-position of the cephalosporin nucleus. This compound had a broad spectrum of antibacterial activity against Gram-positive and -negative bacteria. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of THR-221 was compared with that of cefotaxime (CTX), cefotiam (CTM), cefotetan (CTT) and cefbuperazone (CBPZ). The results are summarized as follows:

1. THR-221 showed potent *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive and -negative bacteria. Against *S. aureus*, *S. pyogenes* and *S. pneumoniae*, the activity of THR-221 was almost comparable to that of CTX and slightly lower than that of CTM. Against *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *M. morgani*, *H. influenzae* and *N. gonorrhoeae*, the activity of THR-221 was comparable to or slightly higher than that of CTX and much higher than that of CTM, CTT and CBPZ.

2. Greater bactericidal activity of THR-221 was shown by determining minimum bactericidal concentrations (MBC).

3. THR-221 was quite stable against PCases and CSases. However, THR-221, CTX and CTM were less stable against oxyminocephalosporin hydrolyzing enzymes (CXases) from *P. vulgaris* and *K. oxytoca*. On the other hand, THR-221 had lower affinity to these CXases when the Km values of THR-221 against CXases were determined. Inducibility of β -lactamase by THR-221 in *P. rettgeri* and *E. cloacae* was lower than with CTX, CTM, CTT and CBPZ.

4. THR-221 had a high affinity to *E. coli* PBP 3, 1A/Bs and 2, and *S. aureus* PBP 1, 2 and 3.

5. THR-221 showed excellent *in vivo* activity against *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and β -lactamase producing *E. coli* (CSase), *K. pneumoniae* (PCase), *P. mirabilis* (PCase), *P. vulgaris* (CXase) compared with CTX, CTM, CTT and CBPZ. The therapeutic activity of THR-221 was much higher than the values expected from the *in vitro* MIC data.