経口セファロスポリン cefetamet pivoxil の細菌学的検討

井上邦雄・三橋　進
エピゾーム研究所*

井上松久
群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

経口セフェム剤 cefetamet pivoxil (CEMT-PI) の抗菌力試験を cefetamet (CEMT) を用い，対照薬 cefaclor, cephalexin, ampicillin と比較検討を行った。その結果 CEMT は一部の菌種を除くグラム陽性菌，グラム陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトラムを有した。さらに CEMT は *Streptococcus* 属，*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus* (インドール+，−)，*Haemophilus influenzae* などに強い抗菌活性を示した。また，既存の経口剤では抗菌活性の弱かった *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas cepacia* に対してもより優れた抗菌力を示した。殺菌力について β-lactamase 産生菌を含む各菌種に対して CEMT の MIC と MBC の差が少ないことと，増殖曲線におよぼす影響などから，本剤は殺菌的作用を示した。CEMT はプラスミド支配のペニシリナーゼ，各菌種特有の染色体性セファロスポリナーゼおよび *P. cepacia*, *Flavobacterium odoratum* を除く各種オキシイミノセファロスポリナーゼに対し，安定であった。特に，*E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* 由来のセファロスポリナーゼに対し，本剤は低い濃度で強く阻害した。マウス感染治療効果は *E. coli* ML 4707, *S. marcescens* GN 7577, *Klebsiella pneumoniae* GN 6445 に対し，CEMT-PI がいずれの対照薬よりも優れた結果であった。

Key words: Cefetamet pivoxil, 経口セファロスポリン，細菌学的検討，β-lactamase

Cefetamet pivoxil (CEMT-PI) は，日本ロシュ社で開発された新しいエステル型経口セファロスポリン剤で，cefetamet (CEMT) の2位カルボキシル基にピバロイルオキシメチルをエステル結合することにより経口吸収を可能にしたプロドラッグである (Fig. 1)。CEMT-PI は腸管から吸収され，腸管壁のエステラーゼにより加水分解され抗菌活性体である CEMT に代謝されることが報告されている。

CEMT はグラム陽性菌，陰性菌に広い範囲に抗菌スペクトラムを有し，特にグラム陰性菌の中で既存の経口セファロスポリン剤に感受性の低い菌種にも良好な抗菌力を示している[1~3]。また，CEMT は，β-lactamase に対する安定を反映し，β-lactamase 産生菌に対しても抗菌力を示すとされている[4]。

今回，抗菌力試験に CEMT，動物感染治療実験は CEMT-PI を用い本薬剤の細菌学的検討を行ったので報告する。なお，比較薬剤として cefaclor (CCL), cephalexin (CEX), ampicillin (ABPC) を用いた。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

CEMT-PI および CEMT は日本ロシュ株式会社から，CCL, CEX は塩野義製薬株式会社，ABPC は富山化学工業株式会社からそれぞれ分与されたものを使用した。その他の薬品は市販品を用いた。

2. 使用菌株

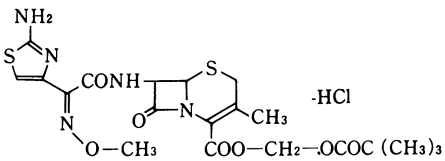
化学療法学会設定の標準菌株[5]，β-lactamase 産生菌株，動物感染菌および各種臨床分離菌株は当研究所保存株を用いた。臨床分離株は主として 1985～1987 年に，日本各地の診療機関において分離されたものを用いた。

3. 薬剤感受性測定法

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は日本化学療法学会[6]および，同学会の嫌気性菌感受性測定[7]に準じて行った。Table 1 にその使用培地および培養方法を示した。一夜，37℃静置培養菌液を 2×10^6 cells/ml になるように Buffered Saline Gelatin (BSG) で希釈し，

* 〒371-01 群馬県勢多郡富士見村小暮 2220

cefetamet pivoxil



cefetamet

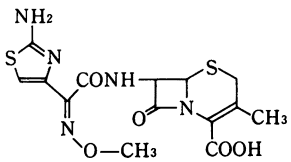


Fig. 1. Chemical structure

その約5 μl (10^4 cells/plate) をミクロプランター（佐久間製作所）を用いて薬剤含有寒天平板上に接種した。37℃，18～24時間培養後，MICを判定した。*Haemophilus influenzae* の培養はロウソク培養とし，偏性嫌気性菌の培養は嫌気条件下で行った。

4. 殺菌効果の測定

1) 最小殺菌濃度（MBC）

被験菌をSensitivity Test（ST）ブロス培地にて一夜培養し，その菌液を希釈して薬剤添加の同培地に最終濃度が，約10^4 cells/mlになるように接種した。37℃，18時間培養後，肉眼で濁度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，ミクロプランターを用いて薬剤無添加ST寒天培地へ5 μlを接種し，37℃，18時間培養後，菌の生育の認められない最小薬剤濃度をMBCとした。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

STブロス培地を用い，試験菌（*Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Proteus vulgaris* HX-19, *Klebsiella pneumoniae* GN 6445）の一夜培養液を新しい培地に接種し，振盪培養した。菌数が，10^6 cells/ml前後に達した時にMIC前後の薬剤を加え振盪培養し，経時的に菌数を測定した。

5. β-lactamaseに対する安定性測定

β-lactamaseは−70℃に保存されている精製標品を用いた[8]。β-lactamase活性はSpectrophotometric assay[9]によって測定した。なおV_{max}，Ki値はそれぞれLineweaver-Burk[10]またはDixonの式[11]から求めた。

6. 臨床分離株からのβ-lactamaseの調整と測定

試験菌をBrain Heart Infusion Broth（BHIB, Difco）で一夜培養し，その培養液を新たなBHIBで20倍に希釈し，37℃振盪培養を行った。培養液の対数増殖期後期の細胞を遠心・集菌し，その菌体を0.05 Mリン酸緩衝液（pH 7.0）で洗浄し，同緩衝液に懸濁した。この菌液を超音波破砕し，18,000×gで50分間遠心し，その上清を粗酵素とした。

β-lactamase活性の測定はSpectrophotometric assay[9]によって測定し，ペニシリナーゼ（PCase）の活性はABPC 100 μM，セファロスポリナーゼ（CSase）はCER 100 μMそれぞれを基質として用い

Table 1. Media used

Medium	Organism
For preculture	
BHIB	*Streptococcus pyogenes*
BHIB+5% horse blood	*Streptococcus pneumoniae*
BHIB+5% Fildes, Enrichment (Difco)	*Haemophilus influenzae*
GAMB	Anaerobes
STB+0.4% KNO_3	*Pseudomonas aeruginosa*
STB	The other organisms
For MIC determination	
BHIA	*Streptococcus pyogenes*
SDA-N+5% horse blood	*Streptococcus pneumoniae*
SDA-N+5% Fildes, Enrichment (Difco)	*Haemophilus influenzae*
GAMA	Anaerobes
SDA-N	Other organisms

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (Difco). GAMB : GAM Broth (Nissui).
STB : Sensitivity Test Broth (Nissui). BHIA : Brain Heart Infusion Agar (Difco).
GAMA : GAM Agar (Nissui). STA : Sensitivity Test Agar (Nissui)
SDA-N : Sensitivity Disk Agar (Nissui)

Table 2. Antibacterial activity of cefetamet against standard strains of bacteria

Organism	MIC (μg/ml)*			
	cefetamet	cefaclor	cephalexin	ampicillin
Staphylococcus aureus FDA 209PJC-1	100	1.56	12.5	0.1
Staphylococcus aureus Terajima	25	0.1	0.2	0.013
Staphylococcus aureus MS353	25	0.78	3.13	0.1
Streptococcus pyogenes Cook	0.1	0.2	0.78	0.025
Bacillus subtilis ATCC 6633	100	0.1	0.78	0.013
Micrococcus luteus ATCC 9341	1.56	0.025	0.05	≦0.006
Escherichia coli NIHJ JC-2	0.39	1.56	6.25	6.25
Escherichia coli K-12 C600	0.39	1.56	6.25	3.13
Enterobacter cloacae 963	0.78	>100	>100	>100
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	0.78	100	>100	>100
Klebsiella pneumoniae PCI-602	0.025	0.39	3.13	12.5
Salmonella typhimurium IID 971	0.2	0.78	6.25	1.56
Salmonella typhi 901	0.39	0.2	3.13	0.39
Salmonella paratyphi 1015	0.1	1.56	12.5	0.2
Salmonella schottmuelleri 8006	0.39	0.39	3.13	0.78
Salmonella enteritidis G14	0.05	0.39	6.25	0.1
Serratia marcescens IAM 1184	0.78	>100	>100	12.5
Morganella morganii IFO 3848	0.1	25	50	0.78
Proteus mirabilis IFO3849	0.2	3.13	25	1.56
Proteus vulgaris OX-19	0.1	6.25	12.5	6.25
Proteus vulgaris HX-19	0.1	6.25	12.5	1.56
Providencia rettgeri IFO 3850	0.39	12.5	50	0.78
Pseudomonas aeruginosa IFO 3445	>100	>100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa NCTC 10490	>100	>100	>100	50
Pseudomonas aeruginosa PAO 1	>100	>100	>100	>100

* By the agar dilution method (Inoculum size : 10^6 cells/ml)

た。ただし，CSase 活性の測定にはあらかじめ酵素に clavulanic acid を 2 μg/ml の割合で添加し，30℃，30 分間 preincubation し，PCase を完全に阻害したところで CSase の活性を求めた。蛋白量は Bradford 法で，酵素活性の単位は 30℃で 1 μM の基質を 1 分間に分解する酵素量を 1 単位とした。

7. 酵素 (β-lactamase) 誘導能の検討

試験菌 BHIB で，一夜培養し，その培養液を新しい BHIB で 20 倍に希釈し，90 分間振盪培養し，その後，最終濃度 10 μg/ml の CEMT を添加し，さらに 90 分間振盪培養した。以後の操作は，前項 6 で示した方法で行った。

8. マウス実験感染における治療効果

STD：ddy (clean) 雄マウス (20 g±1g) を 1 群 10 匹使用した。被験菌には *E. coli* ML 4707, *Serratia marcescens* GN 7577 および *K. pneumoniae* GN 6445 を用いた。各菌は BHIB にて 37℃，18 時間培養した後，BSG で目的の菌量に調整した。ただし *E. coli* ML 4707 の場合は 5% Mucin (半井化学) で調整した。被験菌はマウス腹腔内に感染させ，1 時間後に薬剤を 0.3% carboxymethyl cellulose に懸濁し，経口投与した。感染 5 日後の生存率から Litchfield-Wilcoxon 法[12] に基づき，ED_{50} および 95%信頼限界を求めた。

II. 結　　果

1. 抗菌スペクトラム

CEMT-PI の抗菌力を CEMT を用い，各標準菌株に対する抗菌スペクトラムを CCL, CEX, ABPC を対照薬剤として比較検討した (Table 2)。CEMT は *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* および *Pseudomonas aeruginosa* を除く各菌種に対し広い抗菌スペクトラムを有していた。この時の MIC 値はグラム陽性菌で 0.1～1.56 μg/ml，グラム陰性菌で 0.025～0.78 μg/ml を示した。この傾向は一部の菌種を除き対照薬剤の CCL, CEX, ABPC より強い抗菌活性を示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離株の 24 菌種に対する CEMT の抗菌力を各菌種ごとに MIC_{50} および MIC_{90} として Table 3 に示した。

S. aureus 107 株，*Staphylococcus epidermidis* 72 株に対する 4 剤には，明確な感受性ピークが認められなかった。しかし MIC_{50}, MIC_{90} で比較するとその抗菌力の強さは ABPC>CEX≒CCL>CEMT の順であった。

Table 3. Comparative MICs of cefetamet and other antibiotics tested against clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC range (μg/ml)	MIC_{50}* (μg/ml)	MIC_{90}* (μg/ml)
Staphylococcus aureus	cefetamet	25 −>100	>100	>100
(107)	cefaclor	1.56 −>100	11.1	>100
	cephalexin	1.56 −>100	8.84	>100
	ampicillin	0.2 − 50	1.70	23.5
Staphylococcus epidermidis	cefetamet	3.13 −>100	56.9	>100
(72)	cefaclor	0.1 −>100	2.69	24.2
	cephalexin	0.2 −>100	6.66	24.6
	ampicillin	0.05 − 25	0.39	5.56
Streptococcus pyogenes	cefetamet	0.013 − 0.05	0.017	0.037
(92)	cefaclor	0.1 − 0.39	0.134	0.275
	cephalexin	0.39 − 1.56	0.481	0.721
	ampicillin	≦0.006 − 0.025	0.008	0.016
Streptococcus pneumoniae	cefetamet	0.39 − 1.56	0.305	0.865
(17)	cefaclor	0.39 − 0.78	0.327	0.616
	cephalexin	0.2 − 0.78	0.321	0.616
	ampicillin	0.025 − 0.1	0.019	0.039
Enterococcus faecalis	cefetamet	1.56 −>100	3.05	>100
(97)	cefaclor	6.25 −>100	38.4	79.3
	cephalexin	25 −>100	45.0	94.5
	ampicillin	0.2 − 100	0.315	0.625
Escherichia coli	cefetamet	0.1 − 12.5	0.433	1.02
(99)	cefaclor	0.39 − 100	1.35	4.46
	cephalexin	3.13 −>100	5.25	11.6
	ampicillin	0.78 −>100	2.99	>100
Enterobacter cloacae	cefetamet	0.39 −>100	4.43	>100
(94)	cefaclor	6.25 −>100	>100	>100
	cephalexin	25 −>100	>100	>100
	ampicillin	6.25 −>100	>100	>100
Serratia marcescens	cefetamet	0.78 −>100	4.97	>100
(100)	cefaclor	6.25 −>100	>100	>100
	cephalexin	25 −>100	>100	>100
	ampicillin	1.56 −>100	>100	>100
Enterobacter aerogenes	cefetamet	0.2 − 0.39	0.271	0.37
(9)	cefaclor	12.5 −>100	35.4	>100
	cephalexin	50 −>100	84.1	>100
	ampicillin	50 −>100	74.9	>100
Citrobacter freundii	cefetamet	0.39 −>100	1.97	>100
(96)	cefaclor	1.56 −>100	25	>100
	cephalexin	6.25 −>100	100	>100
	ampicillin	3.13 −>100	75.8	>100
Klebsiella pneumoniae	cefetamet	0.025 − 1.56	0.123	0.196
(99)	cefaclor	0.39 − 12.5	0.577	1.576
	cephalexin	3.13 − 25	4.31	6.06
	ampicillin	1.56 −>100	13.5	>100
Klebsiella oxytoca	cefetamet	0.05 − 0.78	0.07	0.15
(74)	cefaclor	0.2 − 100	0.428	1.29
	cephalexin	1.56 −>100	2.28	3.91
	ampicillin	1.56 −>100	10.2	75.8
Proteus mirabilis	cefetamet	0.05 − 0.78	0.059	0.095
(52)	cefaclor	0.78 − 25	1.14	2.26
	cephalexin	6.25 −>100	9.43	18.0
	ampicillin	0.39 −>100	0.748	>100
Proteus vulgaris	cefetamet	0.05 − 3.13	0.121	0.293
(56)	cefaclor	50 −>100	>100	>100
	cephalexin	100 −>100	>100	>100
	ampicillin	50 −>100	>100	>100

Table 3. Continued

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC range (μg/ml)	MIC_{50}* (μg/ml)	MIC_{90}* (μg/ml)
Providencia rettgeri (50)	cefetamet	≦0.006— 0.78	0.01	0.1
	cefaclor	0.39 —>100	59.5	>100
	cephalexin	0.78 —>100	100	>100
	ampicillin	0.1 —>100	29.7	>100
Providencia stuartii (75)	cefetamet	0.013— 0.78	0.033	0.214
	cefaclor	0.2 —>100	13.0	>100
	cephalexin	1.56 —>100	23.3	>100
	ampicillin	0.78 — 100	15.1	48.9
Morganella morganii (35)	cefetamet	0.78 —>100	1.72	84.1
	cefaclor	100 —>100	>100	>100
	cephalexin	>100	>100	>100
	ampicillin	50 —>100	74.5	>100
Pseudomonas cepacia (33)	cefetamet	0.2 — 1.56	0.969	1.42
	cefaclor	25 —>100	>100	>100
	cephalexin	100 —>100	>100	>100
	ampicillin	100 —>100	>100	>100
Haemophilus influenzae (53)	cefetamet	0.013— 3.13	0.13	0.195
	cefaclor	0.39 — 25	3.03	6.20
	cephalexin	3.13 —>100	16.4	55.1
	ampicillin	0.2 — 50	0.286	20.3
Acinetobacter calcoaceticus (46)	cefetamet	3.13 —>100	16.8	45.6
	cefaclor	12.5 —>100	61.9	>100
	cephalexin	100 —>100	>100	>100
	ampicillin	6.25 —>100	15.9	75.8
Bacteroides fragilis (27)	cefetamet	0.78 —>100	70.7	>100
	cefaclor	6.25 —>100	>100	>100
	cephalexin	12.5 —>100	38.6	>100
	ampicillin	1.56 —>100	13.1	88.6
Legionella spp. (15)	cefetamet	0.05 — 25	4.06	11.5
	cefaclor	0.1 — 50	1.86	11.5
	cephalexin	0.39 — 12.5	2.21	5.74
	ampicillin	0.05 — 12.5	0.336	2.21

* MIC_{50} and MIC_{90} values were represented as the concentration at which more than 50% and 90% of the isolates were inhibited, respectively.
Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (1×10^6 cells/ml).

Streptococcus pyogenes 92株に対する抗菌力は4剤共優れた抗菌活性を示した。その中でもCEMTとABPCの抗菌活性が最も強く，0.05 μg/mlの濃度ですべての菌株の発育を抑えた。

Streptococcus pneumoniae 17株に対するCEMTの感受性ピークはCCL，CEXと同様0.39 μg/mlを示し，1.56 μg/mlですべての菌の発育を阻止した。この時，ABPCのMICは0.025～0.1 μg/mlであった。

Enterococcus faecalis 97株に対し，CEMTのMIC_{50}は3.1 μg/mlでABPCの0.32 μg/mlに比べ約10倍程度劣っていた。一方，CCL，CEXのMIC値は，用いた試験菌の約90%が≧50 μg/mlであった。

E. coli 99株に対するCEMTの感受性ピークは0.39～0.78 μg/mlに存在し，この値はCCL，ABPC，CEXに比べ，1～3管（2～8倍）強い抗菌力を示した。ABPC耐性菌（6.25 μg/ml以上）の菌全株に対してもCEMTは12.5 μg/mlでその発育を抑えた。

Enterobacter cloacae 94株，*S. marcescens* 100株に対してCEMTは比較的幅広いMIC分布を示している。CEMTは6.25 μg/mlで約50%の菌株の発育を抑えたが，しかし中には100 μg/ml以上の耐性菌も約40%存在した。一方，ABPC，CCL，CEXは，全体の80%前後の菌株が≧100 μg/mlの値を示した。*Enterobacter aerogenes* 9株に対してもCEMTは0.39 μg/mlの濃度でその菌株の発育を阻止した。一方，対照薬は無効であった。

Citrobacter freundii 96株に対し，CEMTは60%が3.13 μg/mlでその発育を抑え残りの約40%は25 μg/ml以上の値を示した。これに対し，対照薬は3.13 μg/mlでは全体の約5%の菌株の発育を抑えるにすぎなかった。

Klebsiella oxytoca 74株，*K. pneumoniae* 99株に対

するCEMTの感受性ピークはそれぞれ0.1 μg/ml, 0.2 μg/mlに存在し，この値はCCL (0.39～0.78 μg/ml, 0.78 μg/ml)，CEX (3.13 μg/ml, 6.25 μg/ml)，ABPC (12.5 μg/ml, 12.5～25 μg/ml) に比べ優れた値を示した。

Proteus mirabilis 52株に対して，CEMTは強い抗菌活性を示し0.05～0.1 μg/mlにその感受性ピークが認められた。用いた52株中51株が0.2 μg/ml濃度でその発育が抑えられた。この時，対照薬の感受性ピークはABPC, CCL, 0.78～1.56 μg/ml, CEXは12.5 μg/mlであった。

P. vulgaris 56株に対してもCEMTは強い抗菌活性を示し，0.39 μg/mlの濃度で100%近い菌株の発育を抑えた。対照薬は，そのほとんどが≧100 μg/mlのMICであった。

Providencia rettgeri 50株，*Providencia stuartii* 75株の両菌種は明確な感受性ピークが認められなかった。しかしMIC_{90}値で比較すると，CEMTはそれぞれ0.1, 0.2 μg/mlで，CCL, CEX, ABPCは共に＞100 μg/mlを示し，4剤の中ではCEMTの抗菌力が最も

Table 4. Antibacterial activity of cefetamet against β-lactamase producing organisms

Organism	MIC (μg/ml)*			
	cefetamet	cefaclor	cephalexin	ampicillin
Escherichia coli GN5482	12.5	100	>100	50
Escherichia coli GN14929	0.78	3.13	12.5	>100
Escherichia coli GN14930	12.5	100	>100	100
Citrobacter freundii GN346	25	>100	>100	>100
Citrobacter freundii GN7391	>100	>100	>100	>100
Enterobacter cloacae GN5797	25	>100	>100	>100
Enterobacter cloacae GN7467	100	>100	>100	>100
Enterobacter cloacae GN7471	100	>100	>100	100
Serratia marcescens GN10857	50	>100	>100	>100
Serratia marcescens GN14931	0.39	>100	>100	>100
Serratia marcescens GN14932	12.5	>100	>100	>100
Morganella morganii GN5307	0.78	100	>100	50
Morganella morganii GN5375	0.78	100	>100	50
Morganella morganii GN5407	3.13	>100	>100	>100
Providencia rettgeri GN4430	0.013	25	50	3.13
Providencia rettgeri GN4762	0.2	100	100	6.25
Providencia rettgeri GN5284	0.013	25	100	6.25
Pseudomonas aeruginosa GN918	>100	>100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa GN10362	>100	>100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa GN10367	>100	>100	>100	>100
Klebsiella oxytoca GN10650	0.2	100	50	>100
Proteus vulgaris GN76	0.2	>100	>100	50
Proteus vulgaris GN4413	6.25	>100	>100	>100
Proteus vulgaris GN7919	0.78	>100	>100	>100
Pseudomonas cepacia GN11164	0.78	>100	>100	>100
Xanthomonas maltophilia GN12873	>100	>100	>100	>100
Escherichia coli ML4901	0.78	6.25	12.5	6.25
Escherichia coli ML4901/Rms212 type I	0.78	6.25	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/Rms213 typeII	0.78	3.13	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/Rte16 typeIII	1.56	6.25	12.5	25
Escherichia coli ML4901/Rms149 typeIV	0.78	3.13	6.25	>100
Escherichia coli ML4901/TEM-1	1.56	3.13	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/TEM-2	1.56	25	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/OXA-1	0.78	1.56	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/OXA-2	1.56	6.25	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/PSE-1	0.78	3.13	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/PSE-3	0.78	3.13	12.5	>100
Escherichia coli ML4901/SHV-1	0.78	6.25	12.5	>100
Klebsiella pneumoniae GN69	0.1	0.39	3.13	100
Staphylococcus aureus ML15009	6.25	≦0.39	≦1.56	≦1.56
Staphylococcus aureus ML15009/pI258	25	0.78	≦1.56	≦1.56

*Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

優れていた。この傾向は MIC_{50} でも同様であった。

Morganella morganii 35株に対するCEMTの感受性ピークは，1.56～3.13 μg/mlでこの抗菌力の強さはCEMT＞ABPC＞CCL≒CEXの順であった。

P. aeruginosa 50株，*Xanthomonas maltophilia* 47株に対する4剤の抗菌活性は低くほとんどの株が≧100 μg/mlの耐性菌であった。

Pseudomonas cepacia 33株に対してCEMTのMICピークは1.56 μg/mlを示し，用いた試験菌のすべてが1.56 μg/mlの濃度でその発育が抑えられた。これに対し，対照薬剤CCL，CEX，ABPCは80～90%の株が≧100 μg/mlであった。

H. influenzae 53株に対するCEMTのMICは0.013～3.13 μg/ml，MIC_{50} は0.13 μg/mlであり，その抗菌力はABPCより2倍程度上回り，また，既存の経口剤CCL，CEXよりも遥かに優れたものであった。

Acinetobacter calcoaceticus 46株，*Bacteroides fragilis* 27株に対してはいずれの薬剤も弱い抗菌活性を示し，CEMTの MIC_{90} はそれぞれ45.6，＞100 μg/mlであった。

Legionella spp. 15株に対する4剤のMIC領域の差が広く明確な感受性ピークが認められなかった。しかし MIC_{50} で比較するとCEMTの MIC_{50} は4.06 μg/mlに存在し，この結果は他の薬剤より下回る抗菌力であった。

3．殺菌効果

殺菌力を細菌の増殖曲線におよぼす影響から *E. coli* NIHJ JC-2，*K. pneumoniae* GN 6445，*P. vulgaris* HX-19に対するCEMTの影響をCCLと比較した(Fig. 2)。*E. coli* NIHJ JC-2に対し，CEMTはMIC以上の濃度で4時間後まで殺菌作用が認められたが，24時間後には4 MIC (1.56 μg/ml) 以外の濃度では菌の再増殖が見られた。一方，CCLは0.78 μg/ml以外の濃度では殺菌的であったが，24時間後はすべての薬剤濃度で菌の再増殖が見られた。

K. pneumoniae GN 6445に対するCEMTの殺菌効果は0.2 μg/ml以上の濃度で4時間目まで強い殺菌作用を示したが，それ以後再増殖した。このCEMTの殺菌力はMICを反映しておりCCLの約1/8の濃度でCEMTはCCLと同程度の殺菌作用を示した。

P. vulgaris HX-19に対し，CEMTは0.05 μg/mlの濃度で6時間後まで強い殺菌作用を示したが，24時間後には0.39 μg/mlでもわずかながら再増殖が見られた。CCLの殺菌力は0.78 μg/ml以上の濃度で約2～4時間位まで殺菌性を示し，24時間後にはどの濃度でも再増殖が認められた。

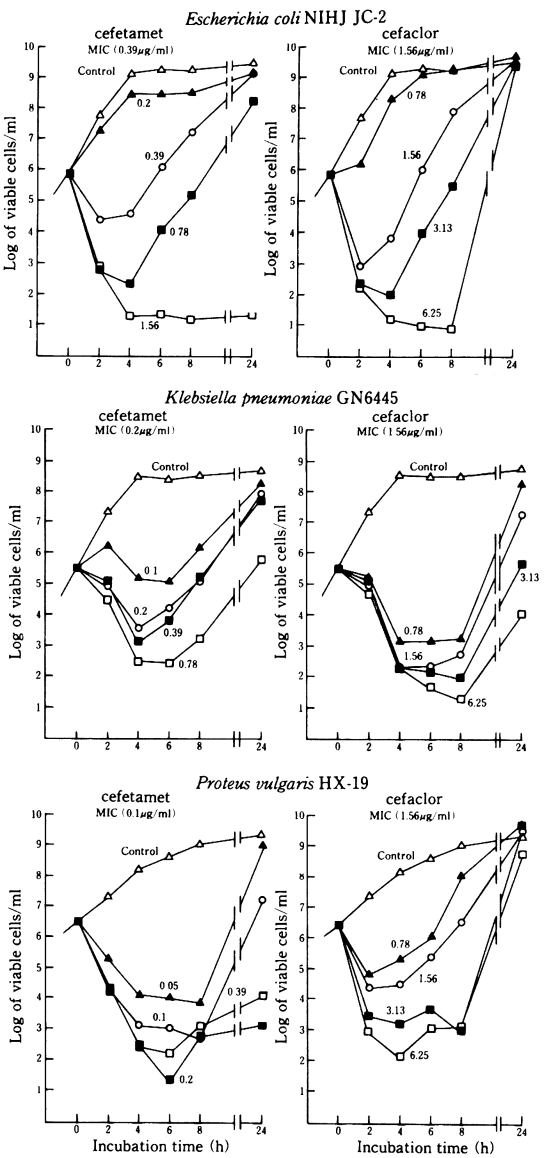


Fig. 2. Bactericidal activity of cefetamet against *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* GN6445 and *Proteus vulgaris* HX-19.

4．β-lactamaseに対する安定性

1)　β-lactamase産生菌株に対する抗菌力

Table 4は各種のβ-lactamase産生菌株に対するCEMTの抗菌力を示している。*S. aureus* のPCaseを除くPCase産生菌に対し，0.1～1.56 μg/mlであり，この値は対照薬CCL，CEX，ABPCに比べ強い抗菌力を示した。CSase，オキシイミノセファロスポリナーゼ(CXase)産生菌に対し，CEMTは対照薬剤よりも強い抗菌力を示した。しかし，*C. freundii*，*E. cloacae*，*P.*

aeruginosa, *X. maltophilia* に対して本剤は対照薬と同様にその活性は弱かった。

2) 各種の β-lactamase に対する安定性

CEMT の PCase, CSase, CXase に対する安定性を CCL を対照薬剤として比較検討し，Table 5 に示した。CEMT は I 型 PCase を除く各 PCase によりわずかながら分解された。さらに CSase の内 *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* の酵素に対し，安定で，かつ，*E. coli* GN 5482, *C. freundii* GN 7391, *E. cloacae* GN 7471 の産生する CSase 活性を阻害した。しかし *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *P. rettgeri* の CSase に対し，わずかながら加水分解を受けた。一方 CEMT は，*X. maltophilia* GN 12873, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* GN 14062 の CXase により微弱，*Flavobacterium odoratum* の CXase に対して加水分解された。

5. CEMT 高度耐性菌の耐性機構

各菌種に対する CEMT の抗菌力試験の結果，本剤の MIC 値が耐性側に偏った菌株について β-lactamase 産生量を検討した。その結果を Table 6 に示した。その結果，CSase 活性が 0.025～0.041 units/mg of protein の場合，CEMT の MIC は 12.5 μg/ml 前後，0.4 units/mg of protein 以上の場合 MIC は＞100 μg/ml の値を示した。

一方，PCase 活性と CEMT との関係では＜0.01 でも 2～15 units/mg of protein でも CEMT の MIC 値は感性から耐性に分布していた。このことは Table 5 に示した結果，すなわち CEMT は PCase に対し，安定であるという結果から考え，妥当と思われた。

6. マウス感染治療実験

E. coli ML 4707, *S. marcescens* GN 7577, *K. pneumoniae* GN 6445 を用い，CEMT-PI の *in vivo* 抗菌活性をマウス感染症に対する感染防御効果で比較検討した(Table 7)。*E. coli* ML 4707 に対する CEMT-PI の ED_{50} は 2.95 mg/kg を示し，この値は対照薬剤の CCL (＞10 mg/kg)，CEX (＞50 mg/kg)，ABPC (＞25 mg/kg) に比べ強い活性を示した。*S. marcescens* GN 7577 に対し，CEMT-PI の ED_{50} は 2.25 mg/kg であり，CCL (61.5 mg/kg)，CEX (＞100 mg/kg)，ABPC (27.4 mg/kg) に対し，CEMT-PI の方が *E. coli* ML 4707 と同様に強い活性を示した。*K. pneumoniae* GN 6445 に対し，CEMT-PI の ED_{50} は 1.82 mg/kg であり，CCL の 1.53 mg/kg とほぼ同程度の活性であった。しかし，CEX，ABPC の ED_{50} 値に比べその活性は約 14～＞55 倍優れた結果であった。

Table 5. β-Lactamase stability of cefetamet against penicillinase, cephalosporinase and cefuroximase

Enzyme source	Relative hydrolysis (V*max*)[a] and inhibition constant (K*i*)[b]					cefetamet MIC (μg/ml)
	cefetamet		cefaclor	penicillin G	cephaloridin	
	V*max*	K*i* (μM)	V*max*	V*max*	V*max*	
Penicillinase						
Type I *Escherichia coli* ML4901/Rms212	＜0.1	＞100	20	100		0.78
TypeII *Escherichia coli* ML4901/Rms213	1.14		NT	100		0.78
TypeIII *Escherichia coli* ML4901/Rte16	0.62		212	100		1.56
TypeIV *Escherichia coli* ML4901/Rms149	0.27		12	100		0.78
TypeV *Staphylococcus aureus* ML15009/pI258	0.95		25	100		25
Cephalosporinase						
Escherichia coli GN5482	＜0.1	0.889	111		100	12.5
Citrobacter freundii GN7391	＜0.1	0.389	63		100	＞100
Enterobacter cloacae GN7471	＜0.1	1.062	37		100	100
Pseudomonas aeruginosa GN10362	1.09		204		100	＞100
Serratia marcescens GN10857	1.33		53		100	50
Providencia rettgeri GN4430	0.43		77		100	0.013
Cefuroximase						
Pseudomonas cepacia GN11164	3.59		132		100	0.78
Xanthomonas maltophilia GN12873	0.44		8.41		100	＞100
Flavobacterium odoratum GN14053	17.4		600		100	N.T.
Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxydans GN14062	0.52		3.3		100	N.T.

[a] The rate of hydrolysis is expressed in percentage of the hydrolysis of penicillin (PCase) or cephaloridine (CSase, CXase)
[b] K*i* values were determined using penicillin G and cephaloridine as a substrate
[c] Inoculum size : 10^6 cells/ml
NT : not tested

Table 6. Relative rates of hydrolysis of cephalosporin and penicillin against β-lactamase producing strains.

Organism	MIC** (μg/ml)		β-Lactamase activity (units*/mg of protein)	
	cefetamet	ampicillin	Cephalosporinase(1)	Penicillinase(2)
Escherichia coli				
GN16277	12.5	100	0.025	0.99
GN16322	12.5	100	0.041	0.73
GN16323	6.25	50	0.037	< 0.01
GN16328	12.5	100	0.033	< 0.01
Enterobacter cloacae				
GN16029	>100	>100	4.059	2.22
GN16048	>100	>100	12.100	1.16
GN16057	>100	>100	3.410	< 0.01
GN16093	>100	>100	2.982	1.49
Citrobacter freundii				
GN16903	>100	>100	4.736	< 0.01
GN16915	>100	>100	0.457	7.61
GN16918	>100	>100	3.205	< 0.01
GN16984	>100	>100	1.089	15.04
GN16986	>100	>100	1.211	12.74
Serratia marcescens				
GN16661	>100	>100	0.026	9.41
GN16663	>100	>100	0.220	0.93
GN16676	>100	>100	0.006	1.38
GN16691	>100	>100	0.169	10.72
Klebsiella pneumoniae				
GN16411	1.56	>100	< 0.001	1.56
Klebsiella oxytoca				
GN17067	0.2	50	< 0.001	< 0.01
GN17083	0.78	>100	< 0.001	< 0.01
Proteus mirabilis				
GN16820	0.78	>100	0.013	2.98
Proteus vulgaris				
BI-1623	3.13	>100	< 0.001	< 0.01
Morganella morganii				
GN17107	>100	>100	0.482	< 0.01
GN17113	>100	>100	1.894	< 0.01
GN17130	100	>100	0.007	< 0.01

* μ moles of cephaloridine and ampicillin hydrolysed per minute
** Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)
(1) Activity was assayed spectrophotometrically with cephaloridine (100 μM) as a substrate after preincubation with clavulanic acid
(2) Activity was assayed spectrophotometrically with ampicillin (100μM) as a substrate

III. 考　　察

In vitro におけるCEMT-PIの抗菌力をCEMTを用い，CCL, CEX, ABPCと比較検討を行った。CEMTはグラム陽性菌の *Streptococcus* 属および *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*(インドール+, −), *H. influenzae* などのグラム陰性菌に強い抗菌活性を示した。また既存の経口剤CCL, CEX, ABPCに比べ *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. cepacia* に対してCEMTは，より優れた抗菌活性を示した。

殺菌力からCEMTのMBCはMICと同じかあるいは1管程度の差を示すことと，本剤の増殖曲線におよぼす薬剤影響の結果からCEMTは，短時間内で殺菌力を示した。このことは，本剤はグラム陰性桿菌のPBP 1 a, PBP 3に強い結合親和性を示すことから[13]，説明されよう。しかし，*S. aureus* に対してCEMTの抗菌力が弱いことも本剤が *S. aureus* のPBPsに結合しにくいための[13]一つとして説明可能であろう。

異なるPCaseを産生する菌株に対し，本剤はこれらの菌に強い抗菌力を示したもののCEMTはpI 258保有の *S. aureus* ML 15009に対し，無効であった。これは，宿主が *S. aureus* であることによるものと考えられる。一部の菌株を除くグラム陰性桿菌の産生するβ-

Table 7. A comparison of the *in vivo* antibacterial activity of cefetamet, cefaclor, cephalexin and ampicillin against systemic infection

Challenge organism	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotic	MIC (μg/ml)	ED_{50}** (mg/kg)	95% confidence limit
Escherichia coli ML4707	1.8×10^{6}*** ($7.5LD_{50}$)	cefetamet	0.2*	2.95	2.09～4.60
		cefaclor	1.56	> 10	
		cephalexin	6.25	> 50	
		ampicillin	3.13	> 25	
Serratia marcescens GN7577	3.4×10^{6} ($2.7LD_{50}$)	cefetamet	0.78*	2.25	1.07～8.76
		cefaclor	>100	61.5	41.3～>100
		cephalexin	>100	>100	
		ampicillin	>100	27.4	15.3～52.0
Klebsiella pneumoniae GN6445	2.4×10^{6} ($3.4LD_{50}$)	cefetamet	0.1*	1.82	1.13～2.75
		cefaclor	0.78	1.53	1.10～2.15
		cephalexin	3.13	25.3	18.2～35.2
		ampicillin	12.5	>100	

* MIC of cefetamet
** Single oral administration 1 h after infection
*** With 5% mucin

lactamaseは染色体性遺伝子支配の菌種特有のCSaseやCXaseである。これらの菌種の内のβ-lactam剤高度耐性菌はプラスミド支配のPCaseを同時に産生することが多い。したがってCEMTは，各種β-lactamaseの安定性試験からPCaseに対して安定を示したことが抗菌力を示すものと考えられる。事実，Table 4に示したごとくCEMTの抗菌力でCCL，CEX，ABPCよりも強い結果であった。一方，臨床分離株 *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morganii* に対するCEMTの抗菌力を調べた結果，それぞれの菌種の中からMIC値の高い菌株が認められた。これらの菌株の耐性機構はペリプラズム内にCSaseが高密度に存在する[14]。CEMTはCSaseと結合親和性が高いためβ-lactam剤の標的であるPBPsへ到達する量が減ることにより耐性を示すものと予想される。このことから今回，我々はこの耐性機構を酵素学的立場から解析した。その結果，Table 6に示したごとく *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morganii* は構成的にCSaseを産生し，その中で *E. cloacae* は大量の酵素が認められた。しかし，*S. marcescens* GN 16661，GN 16676および *M. morganii* GN 17130の酸素産生量は非常に少なかった。この株のβ-lactamaseの産生様式は誘導型によるものと考えられる。事実，*M. morganii* GN 17130についてCEMT（10 μg/ml）でβ-lactamaseの誘導能を調べたところ薬剤無添加のそれと比較すると約40倍の酵素産生量を示した。このことにより本剤は，これらの酵素に対して安定性を示したものの大量に作られたβ-lactamaseと結合親和性が高いため一部はトラッピング（薬剤補捉）により，一部は遅速度加水分解により耐性を生じると考えられた。

マウス実験的感染症に対するCEMT-PIの治療効果は *E. coli* ML 4707，*S. marcescens* GN 7577，*K. pneumoniae* GN 6445に対して本剤が対照薬CCL，CEX，ABPCに比べ優れ，そのED_{50}は1.8～2.95 mg/kgであった。

以上細菌学的効果の結果より，本剤は臨床においてもその有用性が期待される。しかし，β-lactamase多量産生菌に対する治療は充分注意する必要があろう。

文　献

1) Fass R J, Helsel V L: *In vitro* activities of Ro 19-5247 and Ro 15-8074, new oral cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 30: 429～434, 1986
2) Jones R N, Fuchs P C, Barry A L, Ayers L W, Gerlach E H, Gavan T L: Antimicrobial activity of Ro 15-8074, active metabolite of a new oral cephalosporin (Ro 15-8075), against 7,775 recent clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 30: 961～963, 1986
3) Wise R, Andrews J M, Piddock L J V: *In vitro* activity of Ro 15-8074 and Ro 19-5247, two orally administered cephalosporin metabolites. Antimicrob Agents Chemother 29: 1067～1072, 1986
4) Peeters M, Piot P: *In vitro* activity of Ro 15-8074, a new oral cephalosporin. Antimicrob Agents Chemother 16: 469～473, 1985
5) 三橋　進，井上松久：測定用標準菌株。Chemotherapy 27: 561, 1979
6) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度（MIC）測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76～79, 1981

7) 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
8) Mitsuhashi S, Inoue M：Mechanism of resistance to β-lactam antibiotics. β-Lactam Antibiotics (Mitsuhashi, S., ed.), Japan Scientific Societies Press：41～56, 1981
9) Waley S G：A spectrophotometric assay of beta-lactamase action on penicillins. Biochem J 139：780～789, 1974
10) Lineweaver H Burk D：The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 56：658～663, 1934
11) Dixon M：The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem J 55：170～171, 1953
12) Litchfield J T, Wilcoxon F：A simplemethod of evaluating dose effect experiments. J Pharmacol 92：99～113, 1948
13) 大石正夫，小林宏行：第36回日本化学療法学会東日本支部総会，新薬シンポジウム。Ro 15-8075 (Cefetamet pivoxil)，新潟，1989
14) Sanders C C, Sanders W E Jr：Microbial resistance to newer generation β-lactam antibiotics. Clinical and laboratory implications. J Infect Dis 151：399～406, 1985

IN VITRO AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFETAMET PIVOXIL

Kunio Inoue[1], Susumu Mitsuhashi[1], Matsuhisa Inoue[2]
[1]Episome Institute, 2220 Kogure, Fujimimura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan
[2]Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University

Cefetamet pivoxil (CEMT-PI) is a new oral cephalosporin ester of cefetamet (CEMT). The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of CEMT-PI (CEMT), was investigated and compared with those of cefaclor (CCL), cephalexin (CEX) and ampicillin (ABPC). CEMT had a broad antibacterial spectrum and was more active than CCL, CEX and ABPC against *Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Serratia marcescens* and *Pseudomonas cepacia*, which are insensitive to the three reference drugs. Moreover, it was far more active than these drugs against Streptococci, *Escherichia coli, Klebsiella, Proteus* (indole +, −) and *Haemophilus influenzae*. A time-kill study showed potent bactericidal activity of CEMT against *E. coli, Klebsiella pneumoniae* and *Proteus vulgaris*. CEMT was stable to various types of β-lactamase. The *in vivo* antibacterial activity of CEMT-PI against experimental infections in mice was more active than those of CCL, CEX and ABPC.