

新規注射用セフェム剤 Cefepime の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用

益吉 眞次・平野 実・藤村 裕子

篠田美恵子・太田 暁美・沖 俊一

ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社東京研究所*

出口 浩一

東京総合臨床検査センター研究部

Cefepime (CFPM) はグラム陽性菌、グラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、特に *Staphylococcus aureus* に対して cefmenoxime (CMX), cefoperazone (CPZ) と同等の抗菌力を示し、ceftazidime (CAZ) より優れた抗菌力を示した。一方グラム陰性菌に対する CFPM の抗菌力は、これら対照薬剤とほぼ同等であったが、特に *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* に対してより優れていた。*Pseudomonas aeruginosa* に対する MIC₅₀ 値は、3.13 μg/ml で CAZ と同等であり、CMX, CPZ のそれらより 4~8 倍優れていた。CFPM は、penicillinase, cephalosporinase 産生株に対して強い抗菌力を示し、*M. morganii*, *C. freundii*, *E. cloacae* のような大量の cephalosporinase を産生する菌株に対しても強い抗菌力を示した。一方、CAZ, CMX, CPZ の抗菌力は、これらの cephalosporinase 高度産生株の β-lactamase に強く影響を受けた。CFPM の抗菌力に対する血清の添加、培地 pH, 各種の培地による影響は、小さかった。マウスを用いた CFPM の感染防御能 (PD₅₀) は、*in vitro* の抗菌力を反映し、CAZ に比較して *S. aureus*, penicillinase 産生 *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* 感染に対して 3~12 倍、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. morganii*, *E. cloacae* および cephalosporinase 産生株の感染に対して 2~167 倍以上優れていた。また、MIC 値が同等な *P. aeruginosa* に対しても若干優れた感染防御効果を示した。

Key words : BMY-28142, Cefepime

Cefepime (BMY-28142, CFPM) は、ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社東京研究所で合成された新規注射用セファロsporin 剤であり、セフェム母核の 3 位側鎖に N-methylpyrrolidinium 基、7 位側鎖に α-methoxyimino-aminothiazole 基を有する¹⁾。CFPM の *in vitro*, *in vivo* における抗菌力は強く、*Staphylococcus aureus* を含むグラム陽性菌と *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対してバランスのよい広域スペクトラムを有していることが既に報告されている^{2~4)}。

本報では、1987 年に東京総合臨床検査センターで臨床材料から分離された菌株に対する *in vitro* 抗菌力と *in vivo* における感染防御効果を既存の β-lactam 抗生物質と比較検討した成績を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 薬剤

Cefepime (BMY-28142, CFPM) は、米国ブリストル・マイヤーズ株式会社 (Pharmaceutical Research and Development Division, Syracuse) で合成された CFPM 2HCl · H₂O salt, 力価 843 μg/ml を用いた。Ceftazidime (CAZ), cefmenoxime (CMX), cefoperazone (CPZ), cephaloridine (CER) はそれぞれ、田辺製薬、武田薬品、富山化学工業製および塩野義製薬の市販製剤を用いた。なお各薬剤は、使用直前に 1/15M phosphate buffer (pH 7.0) に溶解し使用した。

2. 試験菌株

抗菌力の測定に用いた MIC 測定用標準菌株および β-lactamase 産生株は、群馬大学薬剤耐性菌実験施設、β-lactamase 産生菌株セット (Table 2) は、千葉大学薬学部微生物薬品化学教室より分与された⁵⁾。臨床分離菌株 (Table 1-1, 1-2) は、1987 年 6 月から 11 月までに日本各地の医療機関より東京総合臨床検査セ

*〒153 東京都目黒区下目黒 2-9-3

ンター研究部に送付された各種臨床材料より分離同定されたものである。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会により定められた、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration ; MIC) 測定法に準じて測定した⁶⁾。

前培養培地には、heart infusion broth (HIB, Difco) を用いたが、fastidious bacteria である streptococci には、10%ウマ脱繊維素血液(日本生物材料センター) 添加 HIB, *Haemophilus influenzae* には、5% Bact Fildes Enrichment 添加 HIB を用いた。

抗菌力測定用培地には、Mueller Hinton agar (MHA, Difco) を用いたが、streptococci には、10%ウマ脱繊維素血液添加 MHA, *H. influenzae* には、10 µg/ml の hemin (Sigma) と 2 µg/ml の nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma) 添加 MHA を用いた。一夜培養菌液の $>2 \times 10^6$ cells/ml 菌浮遊液を調整し、multi-inoculator を用いて、2 倍希釈系列の薬剤を含んだ 10 ml の寒天培地に約 0.005 ml を接種した。

4. β -lactamase 産生菌に対する抗菌力

東京総合臨床検査センター研究部において分離された *Citrobacter freundii* 15 株より粗酵素液を調整し、CER を基質に用い分光光度法により⁷⁾ β -lactamase 活性を測定した。タンパク量当たりの β -lactamase の産生する量によって、非あるいは低度 (5 株)、中等度 (4 株)、高度 (6 株) の 3 群に分類し Table 3 に示した。なお、タンパク量は Lowry 法によって測定した⁸⁾。

5. 殺菌作用

倍数希釈濃度の被検薬剤を含む MHB に試験菌を 10^5 cells/ml 接種し、37°C, 18 時間培養後、培養液を 10 µl のルーブ (Nunc) を用いて薬物無添加培地に接種し colony の認められなかった最小薬物濃度を minimum bactericidal concentration (MBC) とした。

6. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設より分与された標準株、 β -lactamase 産生株を用いて、寒天平板希釈法により検討した。試験培地には、sensitivity disk agar-N[®] (SDA, Nissui), Mueller Hinton agar (MHA), heart infusion agar (HIA, Difco), Tryptic

Table 1-1. Comparative activity of cefepime and other β -lactam antibiotics against clinical isolates

Test organism (no. of strains)	MIC range (μ g/ml)			
	Cefepime	Ceftazidime	Cefmenoxime	Cefoperazone
MSSA (35) ^a	0.78~50	3.13~>100	0.78~50	0.78~50
MRSA (15) ^b	50~>100	100~>100	25~>100	50~>100
MSSE (18) ^c	0.2~12.5	3.13~50	0.2~12.5	0.39~6.25
MRSE (7) ^d	1.56~>100	12.5~100	3.13~>100	3.13~>100
<i>S. pyogenes</i> (24)	0.013~0.1	0.1~0.78	0.013~0.05	0.1~0.2
<i>S. pneumoniae</i> (24)	≤ 0.0063 ~0.1	0.1~0.78	≤ 0.0063 ~0.05	0.025~0.78
<i>H. influenzae</i> (43)	0.025~0.2	0.025~0.78	≤ 0.0063 ~0.025	≤ 0.0063 ~0.1
<i>B. catarrhalis</i> (23)	0.1~1.56	0.025~0.2	0.013~0.39	0.05~1.56
<i>E. coli</i> (50)	0.013~0.1	0.05~6.25	0.025~0.39	0.05~50
<i>K. pneumoniae</i> (35)	≤ 0.0063 ~0.1	0.025~0.39	0.025~0.1	0.05~3.13
<i>K. oxytoca</i> (15)	0.013~0.05	0.05~0.39	0.05~0.1	0.1~1.56
<i>P. mirabilis</i> (25)	0.05~0.1	0.05~0.1	0.05~0.2	0.39~12.5
<i>P. vulgaris</i> (25)	0.05~25	0.05~>100	0.05~>100	0.78~>100
<i>M. morgani</i> (25)	0.025~6.25	0.1~6.25	0.025~6.25	0.78~50
<i>P. rettgeri</i> (25)	0.013~1.56	0.1~1.56	0.013~0.78	0.39~50
<i>P. stuartii</i> (25)	0.025~0.2	0.1~50	0.05~6.25	0.78~100
<i>E. cloacae</i> (35)	0.025~6.25	0.1~>100	0.05~100	0.05~>100
<i>E. aerogenes</i> (15)	0.025~0.39	0.2~25	0.1~3.13	0.1~25
<i>C. freundii</i> (35)	0.025~1.56	0.2~>100	0.05~25	0.1~>100
<i>C. diversus</i> (15)	0.013~0.2	0.2~0.78	0.025~0.78	0.025~1.56
<i>S. marcescens</i> (50)	0.05~>100	0.2~>100	0.1~>100	0.78~>100
<i>P. aeruginosa</i> (50)	1.56~100	1.56~100	3.13~>100	3.13~>100
<i>P. cepacia</i> (10)	6.25~100	1.56~>100	6.25~>100	6.25~100
<i>X. maltophilia</i> (10)	25~100	12.5~>100	50~>100	3.13~>100
<i>A. calcoaceticus</i> (25)	0.39~>100	0.78~25	3.13~50	3.13~>100

^a Methicillin-sensitive *S. aureus*

^b Methicillin-resistant *S. aureus*

^c Methicillin-sensitive *S. epidermidis*

^d Methicillin-resistant *S. epidermidis*

ase[®] soy agar (TSA, BBL) を使用した。

培地 pH は、滅菌後 pH を 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 に修正した。馬血清は、56°C 30 分間加熱非働化して用いた。

7. マウス感染防御実験

感染菌は、0.1 % glucose 添加 HIB にて 37°C, 18 時間培養後、10 % hog mucin (American Laboratory, Omaha, Neb. USA) と同量混合し、所定の感染菌懸濁液を作成した。1 薬剤濃度当たり 1 群 10 匹の ddY 雄マウス (体重 19~24 g) の腹腔内へ接種した。調整した感染菌液を LD₅₀ (lethal dose 50 %) の約 100 倍量マウスの腹腔内に感染させた。感染直後、薬剤を 1 回筋肉内投与し、7 日後のマウスの生存数より PD₅₀ 値 (protective dose 50 %) を Litchfield & Wilcoxon 法⁹⁾ で算出した。

II. 実験成績

1. 臨床分離株の感受性分布

臨床材料から分離した methicillin 感受性 *S. aureus* (MSSA) 35 株, methicillin 耐性 *S. aureus* (MRSA) 15 株, methicillin 感受性 *Staphylococcus epidermidis* (MSSE) 18 株, methicillin 耐性 *S. epidermidis* (MRSE) 7 株, *Streptococcus pyogenes* 24 株, *Streptococcus pneumoniae* 24 株, *H. influenzae* 43 株, *Branhamella catarrhalis* 23 株, *Escherichia coli* 50 株, *Klebsiella pneumoniae* 35 株, *Klebsiella oxytoca* 15 株, *Proteus*

mirabilis 25 株, *Proteus vulgaris* 25 株, *Morganella morganii* 25 株, *Providencia rettgeri* 25 株, *Providencia stuartii* 25 株, *Enterobacter cloacae* 35 株, *Enterobacter aerogenes* 15 株, *C. freundii* 35 株, *Citrobacter diversus* 15 株, *Serratia marcescens* 50 株, *P. aeruginosa* 50 株, *Pseudomonas cepacia* 10 株, *Xanthomonas maltophilia* 10 株, *Acinetobacter calcoaceticus* 25 株の合計 659 株に対する CFPM, CAZ, CMX および CPZ の抗菌力の MIC 値の範囲, MIC₅₀, MIC₉₀ 値を Table 1-1, 1-2 に示した。

MSSA に対する CFPM の MIC₉₀ 値は、3.13 μg/ml であり、CAZ より 4 倍優れており CPZ と同等であったが、CMX の 1.56 μg/ml より若干劣っていた。MSSE に対する CFPM の MIC₉₀ 値は、3.13 μg/ml であり、CAZ, CMX, CPZ よりそれぞれ 8, 4, 2 倍優れていた。CPZ の MRSE に対する MIC₅₀ 値を除いて、試験に用いたすべてのセファロsporin 剤の MRSA および MRSE に対する MIC₅₀, MIC₉₀ 値は、50 μg/ml かそれ以上であった。*S. pyogenes*, *S. pneumoniae* に対する CFPM の抗菌力は強く 0.1 μg/ml の濃度で試験に用いた全ての菌の生育を阻止し、CAZ, CMX, CPZ はそれぞれ 0.78, 0.05, 0.78 μg/ml の濃度で 100 % 生育を阻止した。

H. influenzae に対する CFPM, CPZ の MIC₉₀ 値は、

Table 1-2. Comparative activity of cefepime and other β-lactam antibiotics against clinical isolates

Test organism (no. of strains)	MIC ₅₀ (μg/ml)				MIC ₉₀ (μg/ml)			
	Cefepime	Ceftazidime	Cefmenoxime	Cefoperazone	Cefepime	Ceftazidime	Cefmenoxime	Cefoperazone
MSSA (35)	1.56	12.5	1.56	3.13	3.13	12.5	1.56	3.13
MRSA (15)	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
MSSE (18)	0.39	3.13	0.78	1.56	3.13	25	12.5	6.25
MRSE (7)	50	100	100	6.25	>100	>100	>100	>100
<i>S. pyogenes</i> (24)	0.025	0.2	0.013	0.1	0.025	0.39	0.025	0.2
<i>S. pneumoniae</i> (24)	0.025	0.2	0.013	0.05	0.05	0.39	0.025	0.2
<i>H. influenzae</i> (43)	0.05	0.1	0.013	0.013	0.1	0.39	0.025	0.1
<i>B. catarrhalis</i> (23)	0.39	0.1	0.2	0.2	1.56	0.2	0.39	0.78
<i>E. coli</i> (50)	0.025	0.2	0.1	0.39	0.05	0.2	0.2	1.56
<i>K. pneumoniae</i> (35)	0.025	0.2	0.1	0.2	0.05	0.2	0.1	1.56
<i>K. oxytoca</i> (15)	0.025	0.1	0.1	0.2	0.025	0.2	0.1	0.78
<i>P. mirabilis</i> (25)	0.05	0.1	0.05	3.13	0.1	0.1	0.1	12.5
<i>P. vulgaris</i> (25)	0.1	0.1	0.2	3.13	12.5	1.56	>100	>100
<i>M. morganii</i> (25)	0.1	0.39	0.2	3.13	0.39	3.13	0.78	12.5
<i>P. rettgeri</i> (25)	0.05	0.1	0.1	1.56	0.2	1.56	0.2	6.25
<i>P. stuartii</i> (25)	0.05	0.78	0.1	1.56	0.2	50	3.13	50
<i>E. cloacae</i> (35)	0.1	6.25	3.13	6.25	3.13	100	50	>100
<i>E. aerogenes</i> (15)	0.05	0.2	0.1	0.39	0.1	12.5	3.13	6.25
<i>C. freundii</i> (35)	0.1	0.78	0.39	1.56	1.56	>100	25	100
<i>C. diversus</i> (15)	0.05	0.2	0.1	0.1	0.05	0.2	0.2	1.56
<i>S. marcescens</i> (50)	0.39	1.56	1.56	6.25	12.5	50	50	>100
<i>P. aeruginosa</i> (50)	3.13	3.13	25	12.5	12.5	12.5	100	25
<i>P. cepacia</i> (10)	6.25	1.56	6.25	12.5	100	100	>100	50
<i>X. maltophilia</i> (10)	100	50	100	100	100	>100	>100	>100
<i>A. calcoaceticus</i> (25)	3.13	6.25	25	50	25	12.5	50	100

^a Methicillin-sensitive *S. aureus*

^b Methicillin-resistant *S. aureus*

^c Methicillin-sensitive *S. epidermidis*

^d Methicillin-resistant *S. epidermidis*

0.1 $\mu\text{g/ml}$ であり CAZ のそれより 4 倍優っているが CMX のそれより若干劣っていた。

B. catarrhalis に対する MIC₉₀ 値は, CAZ (0.2 $\mu\text{g/ml}$) が最も強く, 次いで CMX (0.39 $\mu\text{g/ml}$), CPZ (0.78 $\mu\text{g/ml}$) であり, CFPM が 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で若干劣っていた。

CFPM の腸内細菌群に対する抗菌力は非常に強く, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* に対して 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で試験したすべての株の生育を阻止した。同様な成績を得るためには, CAZ では 6.25 $\mu\text{g/ml}$, CMX では 0.39 $\mu\text{g/ml}$, CPZ では 50 $\mu\text{g/ml}$ を要した。*P. vulgaris* に対する CFPM, CAZ の MIC₅₀, MIC₉₀ 値は, それぞれ 0.1, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ と 0.1, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり, MIC₅₀ 値は同等であったが, MIC₉₀ 値で比較すると CFPM のそれが CAZ より 8 倍劣っていた。一方, CMX, CPZ の MIC₉₀ 値は >100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。*M. morgani* に対する CFPM の MIC₉₀ 値は, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり CMX より 2 倍, CAZ より 8 倍, CPZ より 32 倍優れていた。*P. rettgeri* に対する CFPM の MIC₉₀ 値は, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であり CMX と

同等, CAZ, CPZ よりそれぞれ 8, 32 倍優れていた。*P. stuartii* に対する CFPM の MIC₉₀ 値は, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であり CMX より 16 倍, CAZ, CPZ より 250 倍優れていた。

また, CFPM の *E. cloacae* に対する抗菌力は強く, MIC₅₀, MIC₉₀ 値は, それぞれ 0.1, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であったが CAZ, CMX, CPZ のそれらは, それぞれ 6.25, 100, 3.13, 50 と 6.25, >100 $\mu\text{g/ml}$ であった。さらに, *E. aerogenes* に対する抗菌力も強く, MIC₉₀ 値は, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であり CAZ, CMX, CPZ よりそれぞれ 128, 32, 64 倍優れていた。*C. freundii* に対して CFPM は強い抗菌力を示し, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で試験に用いた全ての株の生育を阻止した。CMX では, 25 $\mu\text{g/ml}$ であったが CAZ, CPZ では 100 $\mu\text{g/ml}$ でもすべての株の生育を阻止できなかった。*C. diversus* に対する CFPM の MIC₉₀ 値は, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ であり CAZ, CMX のそれらより 4 倍, CPZ より 32 倍優れていた。*S. marcescens* に対する CFPM の MIC₉₀ 値は, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり CAZ, CMX のそれらより 4 倍, CPZ のそれより 8 倍以上優れていた。*P. aeruginosa* に対する CFPM の

Table 2. *In vitro* antibacterial activity of cefepime against β -lactamase producing Gram-negative bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Cefepime	Ceftazidime	Cefmenoxime	Cefoperazone
PCase producer				
<i>E. coli</i> ML1410 ^a	0.025	0.39	0.1	0.1
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	0.05	0.39	0.05	25
<i>E. coli</i> ML1410 RGN14	0.025	0.2	0.1	0.78
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	0.2	0.1	0.39	0.1
<i>K. pneumoniae</i> GN69	0.05	0.39	0.1	3.13
<i>K. pneumoniae</i> GN118	0.05	0.05	0.05	0.2
<i>K. pneumoniae</i> GN69/2-1 ^b	0.05	0.2	0.1	0.2
<i>P. mirabilis</i> N-29	0.025	0.1	0.1	25
<i>P. mirabilis</i> N-29/2	0.05	0.1	0.1	0.78
<i>P. mirabilis</i> N-29/5	0.05	0.1	0.1	1.56
CSase producer				
<i>E. coli</i> 255	0.1	25	1.56	3.13
<i>E. coli</i> GN206	0.025	1.56	0.2	0.39
<i>E. coli</i> 255/L-7 ^c	0.025	0.2	0.1	0.2
<i>C. freundii</i> GN346	0.39	50	12.5	25
<i>C. freundii</i> GN346/16-10	0.39	25	3.13	25
<i>C. freundii</i> GN346/16	0.025	0.2	0.1	0.2
<i>E. cloacae</i> 363	0.1	50	6.25	12.5
<i>E. cloacae</i> 363/1-3	0.1	25	3.13	6.25
<i>E. cloacae</i> 363/1	0.025	0.1	0.05	0.2
<i>M. morgani</i> 1510	0.025	12.5	0.78	12.5
<i>M. morgani</i> 1510/3	0.025	1.56	0.2	1.56
<i>M. morgani</i> 1510/9 ^d	0.025	0.1	0.013	0.78
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1	0.78	0.39	6.25	25
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/1	0.78	0.2	1.56	25
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/2	0.1	0.1	0.1	0.78

Medium: Mueller Hinton agar

Inoculum size: approximately 10⁶ cells/ml

These test strains were donated from Prof. Sawai of Chiba University.⁶⁹

^a A substrain of K12,58-161F⁻ *mel*, resistant to nalidixic acid

^b Penicillinase less mutant of GN69

^c Cephalosporinase less mutant of 255

^d Cephalosporinase less mutant of 1510

MIC₅₀, MIC₉₀値は、それぞれ 3.13, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CAZ と同等であった。CPZ のそれと比較すると、MIC₅₀値で 4 倍、MIC₉₀値で 2 倍優れていた。*P. cepacia* に対する CFPM の MIC₅₀値は、6.25 $\mu\text{g/ml}$ を示し、CMX のそれと同等で CPZ のそれより 2 倍優れていた。しかしながら、CAZ の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ より若干劣っていた。試験したセファロスポリン剤は、*X. maltophilia* に対してほとんど感受性を示さなかった。*A. calcoaceticus* に対する CFPM の MIC₅₀値は、3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、CAZ, CMX, CPZ のそれらよりそれぞれ 2, 8, 16 倍優れていた。

2. β -lactamase 産生株に対する抗菌力

β -lactamase 非あるいは低度、中等度、高度産生株に対する CFPM の抗菌活性を対照薬剤と比較検討した成績を Table 2 に示した。Penicillinase 産生株に対する CFPM の抗菌力は、*E. coli* ML1410 RGN238 株で *E. coli* ML1410 より MIC 値で 8 倍高くなった以外ほとんど変動しなかった。Cephalosporinase 産生株に対しても CFPM の抗菌力は強く、非あるいは低産生株との MIC 値の差は、*C. freundii* GN346 を除けば小さく CFPM の β -lactamase に対する安定性を示している。他剤においては、すべての菌株で MIC 値に大きな差が認められた。

C. freundii の β -lactamase 非あるいは低度 (A ; β -lactamase 活性 < 0.003~0.058 units/mg protein), 中等度 (B ; 0.28~0.59), 高度 (C ; 6.98~16.8) 産生株に対する MIC 値と試験した菌株の β -lactamase 活性と

の関連を検討し Table 3 に示した。 β -lactamase 産生が低い A 群株に対して CFPM を含むすべての薬剤は、強い抗菌力を示した。 β -lactamase を 0.28 units/mg protein 以上を産生した B 群株に対する CFPM の抗菌力は A 群株と比較し小さい変動であったが、Cu-60, 64, 71 の 3 株における CAZ, CMX, CPZ では MIC 値が大きく変動した。 β -lactamase 高度産生の 6 株に対する CFPM の MIC 値は、0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$ であったが CAZ, CPZ では無効であった。CMX では、12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ を示した。

3. 殺菌作用

Table 4 に示すように *S. aureus* とグラム陰性菌に対する CFPM の MIC, MBC 値にはほとんど差がなく、MIC 値で殺菌的に作用した。同様な結果が CAZ においても観察された。また両薬剤共に β -lactamase 産生株においても MIC, MBC 値の差が認められなかった。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

培地の種類、培地 pH および血清添加による抗菌力の変動を検討し、成績を Tables 5~7 に示した。

Table 5 に示したように *S. aureus* に対する MIC 値は、MHA で高くなり、*E. coli*, *K. pneumoniae* において低くなる傾向であったが、その他の菌株、培地では大きな変動は認められなかった。

Table 6 には培地 pH による MIC 値の変動を示した。pH 5.0 と pH 6.0 の間で *S. aureus*, *E. coli*, *P. rettgeri*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *E. cloacae* に

Table 3. Antibacterial activity of cefepime against β -lactamase producing *Citrobacter freundii*

Strains no.	Group	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a				β -lactamase activity ^b (units/mg protein ^c)
		Cefepime	Ceftazidime	Cefmenoxime	Cefoperazone	
Cu-59	A	0.025	0.39	0.1	0.2	0.034
Cu-65		0.05	0.78	0.2	0.78	0.024
Cu-67		0.1	0.78	0.1	0.39	0.058
Cu-81		0.05	0.39	0.1	0.39	0.009
Cu-87		0.025	0.39	0.1	0.1	< 0.003
Cu-60	B	0.2	50	3.13	25	0.37
Cu-64		0.1	6.25	0.78	6.25	0.30
Cu-69		0.2	0.78	0.39	3.13	0.28
Cu-71		0.2	100	6.25	25	0.59
Cu-61	C	0.78	100	12.5	100	14.6
Cu-72		1.56	>100	25	100	16.8
Cu-77		1.56	>100	25	>100	8.41
Cu-78		1.56	>100	25	100	6.98
Cu-91		1.56	>100	25	>100	8.04
Cu-92		0.78	>100	12.5	50	7.74

^a Inoculum size : approximately 10⁶ cells/ml

^b β -lactamase activity was determined by the spectrophotometric method using cephaloridine as a substrate.

^c The concentration of protein was estimated by method of Lowry et al.

Table 4. Correlation of bacteriostatic and bactericidal activity of cefepime and ceftazidime

Organism	Cefepime		Ceftazidime	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
Standard strains				
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	3.13	6.25	12.5	12.5
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.78	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.025	0.025	0.025	0.05
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	0.1	0.39	0.39
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	3.13	3.13	3.13
β -lactamase producers				
<i>E. coli</i> GN5482	0.05	0.05	3.13	3.13
<i>E. cloacae</i> GN7471	0.2	0.39	50	50
<i>C. freundii</i> GN7391	12.5	12.5	200	400
<i>S. marcescens</i> GN10857	1.56	1.56	3.13	3.13
<i>P. vulgaris</i> GN7919	50	50	3.13	3.13
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	1.56	1.56	3.13	3.13

MIC and MBC were determined in Mueller Hinton broth using broth dilution method with microplate.

Inoculum size : 10^5 cells/ml

Table 5. Effect of media on antibacterial activity of cefepime by agar dilution method

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	MHA	SDA	HIA	TSA
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	1.56	0.2	0.39	0.78
<i>S. aureus</i> Terajima	0.78	<0.05	0.1	<0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	1.56	3.13	3.13
<i>E. coli</i> K12 C600	0.05	1.56	3.13	3.13
<i>K. pneumoniae</i> PCI 602	0.013	0.78	0.78	0.78
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>M. morgani</i> IFO 3848	<0.0063	<0.0063	<0.0063	<0.0063
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.025	0.025	0.025	0.025
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.013	0.013	0.013	0.013
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13043	0.05	0.025	0.05	0.05
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.39	0.78	0.39	0.78

Media : MHA, Mueller Hinton agar (Difco)

SDA, sensitivity disk agar-N (Nissui)

HIA, heart infusion agar (Difco)

TSA, Trypticase[®] soy agar (BBL)

Inoculum size : 10^6 cells/ml

変動が認められたが、pH 5.0における *S. aureus*, *P. vulgaris* GN7919 株は生育が阻害された。しかし、*E. cloacae*, *S. marcescens* では、pH 5.0 において高い MIC 値を示した。

Table 7 に示すように血清を添加しても MIC 値の変動は 4 倍以内と小さかった。

5. マウス感染防御作用

グラム陽性菌 3 株とグラム陰性菌 8 株によるマウス全身感染に対する CFPM の筋肉内投与による感染防御作用を CAZ のそれらと比較した成績を Table 8 に示した。

正常マウスにおける CFPM の *S. aureus*, β -lacta-

mase 産生の *S. aureus*, *S. pyogenes* に対する PD₅₀ 値は、それぞれ 0.38, 2.8, 1.0 mg/kg であり CAZ のそれより約 12, 8, 3 倍以上優れていた。

CFPM の腸内細菌のグラム陰性桿菌に対する感染防御作用は非常に強く、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *E. cloacae*, β -lactamase 産生の *E. cloacae* に対する CFPM の PD₅₀ 値は、それぞれ 0.023, 0.77, 0.03, 1.1, 0.77 mg/kg であり、CAZ よりそれぞれ 8, 2, 167, 10, 42 倍以上優れていた。CFPM の *P. aeruginosa* に対する PD₅₀ 値は、6.5~15 mg/kg を示し、CAZ のそれら 4.2~14 mg/kg とほぼ同等であり、*P. aeruginosa* に対しても強い感染防御作用を示した。

Table 6. Effect of medium pH on antibacterial activity of cefepime by agar dilution method

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
Standard strains				
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	<0.05	3.1	3.1	1.6
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.16	<0.05	<0.05	<0.05
<i>K. pneumoniae</i> PCI 602	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.2	<0.05	<0.05	0.1
<i>P. vulgaris</i> HX-19	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.2	<0.05	<0.05	<0.05
<i>E. cloacae</i> 963	0.78	0.39	0.2	0.1
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.78	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	6.25	3.13	6.25
β -lactamase producer				
<i>E. coli</i> GN 5482	0.1	0.1	<0.05	<0.05
<i>E. cloacae</i> GN7471	0.2	0.1	0.1	0.1
<i>C. freundii</i> GN7391	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>S. marcescens</i> GN10857	12.5	3.1	1.56	1.56
<i>P. vulgaris</i> GN7919	0.1	6.25	1.56	3.13

Inoculum size : 10^6 cells/ml

Medium : Mueller Hinton agar

Table 7. Effect of horse serum on antibacterial activity of cefepime by agar dilution method

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	0 %	30 %	50 %
Standard strains			
<i>S. aureus</i> Smith	3.13	3.13	3.13
<i>E. coli</i> Juhl	0.05	0.013	<0.0063
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.025	0.025	0.013
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	0.05	0.025
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	0.78	0.78
β -lactamase producer			
<i>C. freundii</i> GN7391	0.39	0.1	0.1
<i>E. cloacae</i> GN7471	6.25	1.56	1.56
<i>P. vulgaris</i> GN7919	6.25	12.5	25

Medium : Mueller Hinton medium

Inoculum size : 10^6 cells/ml

III. 考 察

CFPM は、3 位側鎖の N-methylpyrrolidinium と 2 位の carboxyl 基とのペタイン構造と 7 位側鎖に α -methoxyimino-aminothiazole 基を持っているために CAZ¹⁰⁾, CTX¹¹⁾の両者の利点を持っており、*S. aureus* を含むグラム陽性菌と *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対して非常に強い抗菌力を示した¹¹⁾。

今回、CFPM の *in vitro* における抗菌力を CAZ, CMX, CPZ を比較対照薬とし、また、マウスを用いた実験感染に対する防御効果について CAZ を対照薬に選り検討した。これらの試験成績は、他施設で報告されている結果とよく一致したが²⁻⁴⁾、一部の菌種において既発売の薬剤に感受性の低下が認められた。

新しく臨床材料より分離された *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* には CAZ, CPZ

Table 8. Protective effect of cefepime and ceftazidime against experimental infections in mice

Organism	Challenge ^a (cells/mouse)	Drug	MIC ^c ($\mu\text{g/ml}$)	PD ₅₀ (mg/kg)
<i>S. aureus</i> Smith	3.2×10^7	CFPM	1.56	0.38
		CAZ	6.25	4.50
<i>S. aureus</i> BX1633 ^b	2.5×10^7	CFPM	3.13	2.8
		CAZ	12.5	21.0
<i>S. pyogenes</i> A20201	1.1×10^4	CFPM	0.013	1.0
		CAZ	0.1	3.2
<i>E. coli</i> Juhl	1.4×10^6	CFPM	0.025	0.023
		CAZ	0.1	0.19
<i>K. pneumoniae</i> D11	1.4×10^4	CFPM	0.025	0.77
		CAZ	0.1	1.2
<i>M. morgani</i> A9553	9.7×10^7	CFPM	0.1	0.03
		CAZ	3.13	5.0
<i>E. cloacae</i> A9659	3.0×10^7	CFPM	0.05	1.1
		CAZ	0.2	11.0
<i>E. cloacae</i> GN7471 ^b	5.4×10^7	CFPM	0.1	0.77
		CAZ	6.25	32.0
<i>P. aeruginosa</i> A9843A	4.8×10^5	CFPM	1.56	6.5
		CAZ	1.56	6.8
<i>P. aeruginosa</i> A21509	2.0×10^4	CFPM	12.5	8.5
		CAZ	6.25	4.2
<i>P. aeruginosa</i> A20599	2.0×10^6	CFPM	6.25	15.0
		CAZ	6.25	14.0

^a i.p. injection about 100 LD₅₀ of cell suspensions containing 5% mucin^b β -lactamase producer^c Inoculum size : 10^6 cells/ml

CFPM : cefepime CAZ : ceftazidime

に対する MIC 値の高い菌株が少なからずあった。これら新しく分離された菌株は、 β -lactamase を大量に産生することによって、CAZ, CPZ 等に耐性化傾向を示しているものと思われる。CFPM は大量の β -lactamase の産生により CAZ, CMX, CPZ に耐性獲

得した菌株に対しても強い抗菌力を示し、抗菌力の減弱がほとんど認められなかった。このことは、CFPM が種々の β -lactamase に安定であり、また β -lactamase との affinity が低く β -lactamase に安定である事とよく一致した¹²⁾。

CFPM のマウス感染モデル実験に対する成績は、*in vitro* の抗菌力 (MIC) を反映してグラム陽性菌、陰性菌ともに良好であった。これは、CFPM が *in vitro* において強い抗菌力を有していることに加えて β -lactamase に affinity が低いこと、別報でのラットにおける高い血中濃度、速やかな組織への分布、生体中で安定で代謝されないことなどが考えられる。さらに CFPM の動物血清タンパクとの結合比率はヒト、イヌ、ラット、マウスでそれぞれ 16, 18, 22, 29% であり、これらの値が小さいことも一因となるであろう¹³⁾。

CFPM は、*in vitro*、*in vivo* において、グラム陽性菌、*P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌にバランスよい広域スペクトルを有し、腸内細菌に対し CAZ のそれらよりも強い抗菌活性を示した。また、*in vitro* の抗菌作用がマウスを用いた感染モデル実験でも *in vitro* を反映し、CAZ と同等かより良好な成績が認められた。これらの成績から臨床における感染症の治療に対して CAZ 以上の効果が期待される。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、本研究に用いました貴重な β -lactamase 産生菌株セットを分与していただきました千葉大学薬学部微生物薬品化学教室 澤井哲夫教授、MIC 測定用標準菌株と β -lactamase 産生菌株を分与していただきました群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設 井上松久助教授に心より深謝いたします。

文 献

- 1) Naito T, Aburaki S, Kamachi H, Narita Y, Okumura J, Kawaguchi H: Synthesis and structure-activity relationships of a new series of cephalosporins, BMY-28142 and related compounds. *J Antibiot* 39: 1092~1107, 1986
- 2) Kessler R E, Bies M, Buck R E, Chisholm D R, Pursiano T A, Tsai Y H, Misiek M, Price K E, Leitner F: Comparison of a new cephalosporin, BMY 28142, with other broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 207~216, 1985
- 3) Tsuji A, Maniatis A, Bertram M A, Young L S:

In vitro activity of BMY-28142 in comparison with those of other β -lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 515~519, 1985

- 4) Masuyoshi S, Hiraoka M, Inoue M, Tomatsu K, Hirano M, Mitsuhashi S: Comparison of the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cefepime (BMY-28142) with ceftazidime, cefuzonam, cefotaxime and cefmenoxime. *Drugs Exptl Clin Res* 15: 1~10, 1989
- 5) Sawai T, Yoshida T, Tsukamoto K, Yamagishi S: A set of bacterial strains for evaluation of β -lactamase stability of β -lactam antibiotics. *J Antibiot* 34: 1318~1326, 1981
- 6) 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
- 7) Ross G W, Chanter K V, Harris A M, Kirby S M, Marchall M J, O'Callaghan C H: Comparison of assay technique for β -lactamase activity. *Anal Biochem* 54: 9~16, 1973
- 8) Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 9) Litchfield J T, Wilcoxon F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99~113, 1949
- 10) 小柏美恵子, 井上松久, 三橋 進: Ceftazidime (SN 401) に関する細菌学的検討。 *Chemotherapy* 31 (S-3): 1~16, 1983
- 11) Hamilton-Miller J M T, Brumfitt W, Reynolds A V: Cefotaxime (HR 756), a new cephalosporin with exceptional broad-spectrum activity *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 4: 437~444, 1978
- 12) Hiraoka M, Masuyoshi S, Mitsuhashi S, Tomatsu K, Inoue M: Cephalosporinase interactions and antimicrobial activity of BMY-28142, ceftazidime and cefotaxime. *J Antibiot* 41: 86~93, 1988
- 13) 平野 実, 益吉真次, 近藤昇一郎, 朝井保美, 沖 俊一: ラットにおける Cefepime の体内動態—血中濃度, 臓器内分布, 尿中・胆汁排泄— *Chemotherapy* 39 (S-2): 97~103, 1991

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFEPIME

Shinji Masuyoshi¹⁾, Minoru Hirano¹⁾, Hiroko Fujimura¹⁾,
Mieko Shinoda¹⁾, Akemi Ohta¹⁾, Toshikazu Oki¹⁾,
Koichi Deguchi²⁾

¹⁾Tokyo Research Center, Bristol-Myers Research Institute, Ltd.,
2-9-3 Shimo-meguro, Meguro-ku, Tokyo 153, Japan

²⁾Research Department, Tokyo Clinical Research Center

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of cefepime (BMY-28142, CFPM), a new parenteral cephalosporin, was evaluated in comparison with ceftazidime (CAZ), cefmenoxime (CMX) and cefoperazone (CPZ). CFPM showed a well-balanced broad spectrum of activity against Gram-positive and -negative bacteria isolated clinical specimens. Its activity against Enterobacteriaceae, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter diversus* was almost equal to that of CAZ, CMX and CPZ. CFPM demonstrated superior activity to CAZ, CMX and CPZ against *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*. The activity of CFPM against *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* and *Acinetobacter calcoaceticus* was very comparable to that of CAZ. CFPM showed potent activity against various types of β -lactamase-producing organisms. The MIC values ranging from 0.025 to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ for CFPM indicate good stability against β -lactamases. The antibacterial activity of CFPM was slightly affected by the addition of serum or culture media or by the pH of the medium. The minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of CFPM were similar to a variety of bacteria. The remarkable *in vitro* antibacterial activity of CFPM was reflected in its *in vivo* efficacy against various type of experimental infections in mice. CFPM was eight times more effective than CAZ against *S.aureus*, *E.coli*, *M. morganii* and *E.cloacae* infections, and as effective as CAZ against *S.pyogenes*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* infections.