

Cefclidlinの *in vitro* および *in vivo* 抗菌力

西野武志, 大槻雅子, 尾花芳樹, 比留間良一, 田嶋雅徳  
京都薬科大学 微生物学教室\*

新しく合成された注射用セフェム抗生物質cefclidlin(CFCL)の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について, cefoperazone(CPZ), cefmenoxime(CMX), ceftazidime(CAZ)およびcefuzonam(CZON)を比較薬として検討し, 以下の成績を得た。

CFCLはグラム陽性菌から緑膿菌を含むグラム陰性菌にまで幅広い抗菌スペクトルを有していた。グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* に対してはCAZと, *Staphylococcus epidermidis* に対してはCPZとほぼ同等の, また *Streptococcus* spp. に対してはCAZとほぼ同様な抗菌力を示した。腸内細菌群に対するCFCLの抗菌力は対照薬とほぼ同様の優れた抗菌力を示し, 特に第三世代セフェム耐性菌の多い *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* には対照薬より優れた抗菌力を示した。*Pseudomonas aeruginosa* に対してはCAZよりも4~16倍強い非常に優れた抗菌力を示した。臨床分離株の *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *M. morganii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *P. aeruginosa* に対するCFCLのMIC<sub>50</sub>はそれぞれ6.25, 3.13, 0.10, 0.10, 0.10, 0.20, 0.20, 0.20, 0.10, 0.20, 0.78, 0.10, 1.56, 0.78, 0.78 μg/mlであった。

*E. coli*, *A. calcoaceticus*, *P. aeruginosa* に対してCFCLは薬剤濃度に応じた殺菌作用を示した。*P. aeruginosa* にCFCLを作用させた時の形態変化を位相差顕微鏡, 走査電子顕微鏡により観察したところ, 低濃度で filament 像, spheroplast そして溶菌像を認めた。マウス実験的腹腔内感染症に対するCFCLの治療効果は, *S. aureus* ではCAZと同様の効果を示し, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* に対しては他剤より若干劣ったが, *E. coli*, *S. marcescens* に対しては他剤と同様の優れた効果を示した。*A. calcoaceticus* と β-lactamase 過剰産生株あるいは gentamicin (GM) 耐性の *P. aeruginosa* に対しては使用薬剤中最も優れた効果を示した。

**Key words** : Cefclidlin, 形態変化, 実験感染治療効果, 抗緑膿菌活性

Cefclidlin (CFCL) はエーザイ株式会社で合成された新しい注射用セフェム抗生物質である。化学名は{(6R, 7R)-3-[4-carbamoyl-1-quinuclidinio)methyl]-7-[2-(5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-1-(Z)-2-methoxyiminoacetoamido]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo(4,2,0)oct-2-ene-2-carboxylate}で, いわゆるベタイン構造を有するoxime型セフェム抗生物質であり, 分子式(分子量)がC<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (550.62) の白色ないし淡黄色の結晶性の粉末である。

本剤はグラム陽性菌, 陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し, 特に第三世代セフェム剤耐性の多い *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* や *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対し

て優れた抗菌力を示し, β-lactamase に対しても極めて安定であり, 親和性も低いことが報告されている<sup>1,2)</sup>。

今回, 我々はCFCLの *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について既知抗生物質cefoperazone, cefmenoxime, ceftazidimeおよびcefuzonamを比較薬として検討したので報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 使用薬剤

Cefclidlin (CFCL; エーザイ株式会社), cefoperazone (CPZ; 富山化学工業), cefmenoxime (CMX; 武田薬品工業株式会社), ceftazidime (CAZ; 日本グラクソ株式会社), cefuzonam (CZON; 日本レダリー

\*〒607 京都市山科区御陵中内5

株式会社), cefsulodin (CFS; 武田薬品工業株式会社), piperacillin (PIPC; 富山化学工業株式会社), cefpiramide (CPM; 住友製薬株式会社), および gentamicin (GM; 塩野義製薬株式会社) のいずれも力価の明かなものを用いた。

## 2. 使用菌株

教室保存のグラム陽性菌19株, グラム陰性菌27株および臨床材料から分離された *Staphylococcus aureus* 62株, *Staphylococcus epidermidis* 26株, *Streptococcus pneumoniae* 16株, *Streptococcus pyogenes* 35株, *Escherichia coli* 96株, *Klebsiella pneumoniae* 62株, *E. cloacae* 29株, *Enterobacter aerogenes* 34株, *Serratia marcescens* 91株, *Proteus mirabilis* 30株, *Proteus vulgaris* 36株, *Providencia rettgeri* 17株, *Morganella morganii* 25株, *Haemophilus influenzae* 24株, *Branhamella catarrhalis* 19株, *Acinetobacter calcoaceticus* 64株および *P. aeruginosa* 40株を用いた。

## 3. 感受性測定法

前培養に Tryptosoya broth (TSB, ニッスイ), 感受性測定培地に Heart infusion agar (HIA, ニッスイ) を用い, 日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC 測定法<sup>3)</sup> に従って行った。なお, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium diphtheriae* には10%馬脱繊維血液を添加したHIAを, *H. influenzae* には5%の割合にFilde's enrichment (Difco) を添加したHIAを, *B. catarrhalis* には5%馬脱繊維血液を添加したチョコレート寒天培地を測定培地として用いて37°C, 20時間培養後のMIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) を求めた。

## 4. 増殖曲線に及ぼす影響

前培養した *E. coli* KC-14, *A. calcoaceticus* Ac-54, *P. aeruginosa* E-2 の各菌液を Heart infusion broth (HIB, ニッスイ) で希釈し, 振とう培養を行った。約2~3時間後の対数増殖途上に種々の濃度の薬剤を作用させ, 薬剤作用1, 2, 4時間後に生菌数の測定を行った。

## 5. 位相差顕微鏡による形態観察

スライドガラス上で薬剤を含有させた薄層の寒天を作成し, これに対数増殖途上の *E. coli* KC-14, *P. aeruginosa* E-2, *A. calcoaceticus* Ac-54 各菌液を塗抹後, カバーガラスを載せ, パラフィンで封じ, これをニコン倒立位相差顕微鏡で観察した。

## 6. 走査型電子顕微鏡による形態変化

TSBを用いて前培養を行い, これを1%の割合でHIBに接種し, 37°Cで振とう培養を行った。培養約3時間後の対数途上に薬剤を作用させ, 2時間後に菌体を集菌し, 電子顕微鏡の試料とした。1%glutaraldehyde溶液にて前固定を行い, Kellenbergerらの方法<sup>4)</sup>に従

って, 1% OsO<sub>4</sub>で本固定後, アルコール系列で脱水を行った。これを酢酸イソアミールに置換し, 臨界点乾燥法により乾燥を行った。その後, カーボン, 金にて蒸着し走査電子顕微鏡JSM-35 (日本電子) で菌体の表面構造を観察した。

## 7. マウス実験的感染症に対する治療効果

ddy系雄性マウス (4週令, 体重20±1g) 1群10匹を用いた。*S. pneumoniae* III型の菌液あるいは6% gastric mucin (半井化学) と等量混合した各種菌液をマウス腹腔内に接種し, 接種2時間後に1回皮下治療を行った。7日目の生存率からLitchfield-Wilcoxon法<sup>5)</sup>によりED<sub>50</sub> (mg/mouse) およびその95%信頼限界値を算出し, 治療効果として示した。

## 8. $\beta$ -ラクタマーゼ活性

被験菌株の一夜培養液をHIBに5%接種し, 37°Cで4~5時間培養後集菌した。誘導を行う場合には2~3時間後に0.1 $\mu\text{g/ml}$ のIPMを添加した。破碎菌体を遠心分離により除き遠心上清を細胞粗抽出液とし, 100 $\mu\text{M}$ のCETを基質としてUV法<sup>6)</sup>により測定し, 単位蛋白あたりの活性で表した。

## II. 実験結果

### 1. 抗菌スペクトル

教室保存のグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対する感受性について検討した結果をTable 1, 2に示した。CFCLはグラム陽性菌からグラム陰性菌に幅広い抗菌力を示した。その抗菌力を比較すると, グラム陽性菌ではCAZとはほぼ同等か若干強い抗菌力を示したが, CPZ, CMX, CZONよりも劣っていた。一方, グラム陰性菌に対しては, CFCLは優れた抗菌力を示した。特に, *P. aeruginosa* に対してはCAZより8倍強い最も優れた抗菌力を示した。

### 2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床由来の17菌種に対する累積分布および感受性分布をTable 3に示した。

#### 1) *S. aureus* の場合

CFCLのMIC<sub>50</sub>は6.25 $\mu\text{g/ml}$ でCPZ, CMX, CZONよりも劣っていたが, CAZと同等か若干優れていた。

#### 2) *S. epidermidis* の場合

CFCLのMIC<sub>50</sub>は3.13 $\mu\text{g/ml}$ でCAZより2倍優れていたが, 他比較薬より劣っていた。しかし, CFCLのMIC<sub>90</sub>は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり, 対照薬に対する耐性菌ではCAZよりはるかに優れ, 他の比較薬と同等の抗菌力を示した。

#### 3) *S. pneumoniae* の場合

CFCLのMIC<sub>50</sub>は0.39 $\mu\text{g/ml}$ でCAZと同等の抗菌力であったが, 他の比較薬より劣っていた。

Table 1. Antibacterial spectrum of cefclidin against gram-positive bacteria (10<sup>6</sup> cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)				
	Cefclidin	Ceftazidime	Cefoperazone	Cefmenoxime	Cefzonam
<i>S. aureus</i> 209-PJC	1.56	12.5	1.56	1.56	0.39
<i>S. aureus</i> Smith	6.25	12.5	1.56	1.56	0.39
<i>S. aureus</i> Terajima	6.25	12.5	1.56	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> Neumann	3.13	6.25	1.56	1.56	0.39
<i>S. aureus</i> E-46	6.25	6.25	1.56	0.78	0.39
<i>S. aureus</i> No.80	6.25	6.25	1.56	0.78	0.39
<i>S. epidermidis</i>	3.13	12.5	3.13	6.25	1.56
<i>S. pyogenes</i> S-23	0.05	0.10	0.05	0.012	0.012
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.05	0.20	0.10	0.025	≦0.006
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.025	0.10	0.05	0.012	≦0.006
Viridans group <i>Streptococcus</i>	100	>100	12.5	50	100
<i>S. pneumoniae</i> I	0.20	0.20	0.05	0.012	≦0.006
<i>S. pneumoniae</i> II	0.20	0.20	0.05	0.012	≦0.006
<i>S. pneumoniae</i> III	0.20	0.20	0.025	0.012	0.012
<i>E. faecalis</i>	100	>100	3.13	25	12.5
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.39	0.05	0.012	0.012
<i>C. diphtheriae</i>	0.78	25	3.13	0.78	0.78
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3.13	1.56	0.39	0.20	0.20
<i>B. anthracis</i>	100	50	1.56	6.25	6.25

Table 2. Antibacterial spectrum of cefclidin against gram-negative bacteria (10<sup>6</sup> cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)				
	Cefclidin	Ceftazidime	Cefoperazone	Cefmenoxime	Cefzonam
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0.05	0.39	0.20	0.10	0.10
<i>E. coli</i> K-12	0.10	0.10	0.025	0.025	0.025
<i>C. freundii</i> NIH 10018-68	0.10	0.39	0.78	0.05	0.10
<i>S. typhi</i> T-287	0.05	0.10	0.10	0.012	0.012
<i>S. typhi</i> 0-901	0.10	0.05	0.10	0.012	0.012
<i>S. paratyphi</i> A	0.05	0.025	0.20	0.012	0.012
<i>S. paratyphi</i> B	0.10	0.10	0.20	0.012	0.025
<i>S. enteritidis</i>	0.05	0.05	0.10	0.012	0.025
<i>S. dysenteriae</i> EW-7	0.10	0.20	0.20	0.10	0.10
<i>S. flexneri</i> 2a EW-10	0.10	0.20	0.10	0.025	0.05
<i>S. boydii</i> EW-28	0.012	0.05	0.012	0.012	0.012
<i>S. sonnei</i> EW-33	0.05	0.025	0.05	0.012	0.025
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0.05	0.10	0.10	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	0.10	0.05	0.10	0.025	0.025
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	0.05	0.78	0.39	0.20	0.39
<i>E. aerogenes</i> NCTC 10006	0.10	0.78	0.39	0.20	0.78
<i>H. alvei</i> NCTC 9540	0.025	0.39	0.78	0.20	0.20
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	0.10	0.10	0.78	0.05	0.10
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.10	0.025	0.012	0.012	≦0.006
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.10	0.025	0.10	≦0.006	≦0.006
<i>M. morganii</i> Kono	0.10	0.78	1.56	0.05	0.10
<i>P. rettgeri</i> NIH 96	0.012	≦0.006	≦0.006	≦0.006	≦0.006
<i>P. inconstans</i> NIH 118	0.05	0.10	0.39	≦0.006	0.025
<i>P. aeruginosa</i> No.12	0.20	1.56	6.25	12.5	25
<i>P. aeruginosa</i> Nc-5	0.05	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>P. aeruginosa</i> E-2	0.39	3.13	12.5	12.5	50
<i>A. calcoaceticus</i> Ac-54	0.20	3.13	25	25	25

4) *S. pyogenes*の場合  
CFCLのMIC<sub>90</sub>は0.10μg/mlで、CAZ, CPZと同等であったが、CMX, CZONより劣っていた。

5) *E. coli*の場合  
CFCLのMIC<sub>90</sub>は0.20μg/mlであり、CMXと同様最も優れた抗菌力を示した。

6) *K. pneumoniae*の場合  
CFCLのMIC<sub>90</sub>は0.78μg/mlであり、CMXより劣るが、CAZの2倍、CPZの16倍強い抗菌力を示した。

7) *E. cloacae*の場合

CFCLは0.10~0.20μg/mlと幅の狭い感受性分布を示し、MIC<sub>90</sub>は0.20μg/mlで他剤よりも8倍強い抗菌力を示した。

8) *E. aerogenes*の場合  
CFCLの感受性分布は、0.10~1.56μg/mlと他剤に比べて幅が狭かった。MIC<sub>90</sub>は0.20μg/mlで、CAZより128倍優れ、他剤に対しても32~128倍優れていた。

9) *S. marcescens*の場合  
CFCLは比較薬とほぼ同等に優れた抗菌力を示した。

10) *P. mirabilis*の場合

Table 3. Comparative *in vitro* activities of cefclidin and other cephalosporins against clinical isolates

Organisms (No. of strains)	Antibiotics	MIC (μg/ml)		
		Range	50%	90%
<i>S. aureus</i> (62)	Cefclidin	≤0.006~12.5	6.25	6.25
	Ceftazidime	1.56~12.5	6.25	12.5
	Cefoperazone	0.20~3.13	1.56	1.56
	Cefmenoxime	0.10~3.13	1.56	1.56
	Cefuzonam	0.025~0.78	0.39	0.78
<i>S. epidermidis</i> (26)	Cefclidin	0.39~50	3.13	6.25
	Ceftazidime	3.13~50	6.25	50
	Cefoperazone	0.39~12.5	1.56	6.25
	Cefmenoxime	0.20~6.25	0.78	6.25
	Cefuzonam	0.20~6.25	0.39	3.13
<i>S. pneumoniae</i> (16)	Cefclidin	0.05~0.39	0.10	0.39
	Ceftazidime	0.05~0.78	0.10	0.39
	Cefoperazone	0.013~0.20	0.025	0.20
	Cefmenoxime	≤0.006~0.05	≤0.006	0.025
	Cefuzonam	≤0.006~0.05	≤0.006	0.013
<i>S. pyogenes</i> (35)	Cefclidin	0.05~0.10	0.10	0.10
	Ceftazidime	0.10~0.39	0.10	0.10
	Cefoperazone	0.05~0.20	0.10	0.10
	Cefmenoxime	≤0.006~0.025	≤0.006	0.025
	Cefuzonam	≤0.006	≤0.006	≤0.006
<i>E. coli</i> (96)	Cefclidin	0.025~0.78	0.10	0.20
	Ceftazidime	0.025~25	0.20	0.39
	Cefoperazone	0.025~100	0.20	6.25
	Cefmenoxime	0.012~1.56	0.10	0.20
	Cefuzonam	0.012~3.13	0.20	0.39
<i>K. pneumoniae</i> (62)	Cefclidin	0.05~100	0.20	0.78
	Ceftazidime	0.05~>100	0.20	1.56
	Cefoperazone	0.012~>100	0.78	12.5
	Cefmenoxime	0.025~25	0.10	3.13
	Cefuzonam	0.025~12.5	0.10	0.20
<i>E. cloacae</i> (29)	Cefclidin	0.10~0.20	0.10	0.20
	Ceftazidime	0.20~1.56	0.39	0.78
	Cefoperazone	0.10~1.56	0.39	0.78
	Cefmenoxime	0.10~0.78	0.20	0.78
	Cefuzonam	0.10~1.56	0.39	0.78
<i>E. aerogenes</i> (34)	Cefclidin	0.10~1.56	0.20	0.20
	Ceftazidime	0.10~100	0.39	25
	Cefoperazone	0.10~100	0.39	25
	Cefmenoxime	0.05~25	0.10	6.25
	Cefuzonam	0.20~100	0.39	25

Table 3. continued

Organisms (No. of strain)	Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Range	50%	90%
<i>S. marcescens</i> (91)	Cefclidin	0.10~50	0.78	6.25
	Ceftazidime	0.025~6.25	0.39	3.13
	Cefoperazone	0.78~>100	3.13	100
	Cefmenoxime	0.10~25	0.39	6.25
	Cefuzonam	0.10~50	0.78	6.25
<i>P. mirabilis</i> (30)	Cefclidin	0.20~0.78	0.39	0.39
	Ceftazidime	0.025~0.20	0.10	0.10
	Cefoperazone	0.05~3.13	1.56	3.13
	Cefmenoxime	$\leq 0.006\sim 0.39$	0.10	0.10
	Cefuzonam	$\leq 0.006\sim 0.39$	0.20	0.20
<i>P. vulgaris</i> (36)	Cefclidin	0.10~0.39	0.20	0.39
	Ceftazidime	0.025~0.20	0.05	0.20
	Cefoperazone	0.025~6.25	0.78	3.13
	Cefmenoxime	0.012~6.25	0.05	0.39
	Cefuzonam	0.025~0.78	0.10	0.39
<i>P. rettgeri</i> (17)	Cefclidin	0.025~0.39	0.10	0.39
	Ceftazidime	0.025~6.25	0.78	3.13
	Cefoperazone	0.39~50	6.25	25
	Cefmenoxime	$\leq 0.006\sim 1.56$	0.10	0.78
	Cefuzonam	0.025~6.25	0.39	6.25
<i>M. morgani</i> (25)	Cefclidin	0.05~0.78	0.20	0.20
	Ceftazidime	0.05~12.5	0.20	6.25
	Cefoperazone	0.39~25	1.56	12.5
	Cefmenoxime	0.012~3.13	0.05	1.56
	Cefuzonam	0.025~6.25	0.10	1.56
<i>P. aeruginosa</i> (40)	Cefclidin	0.20~0.78	0.39	0.39
	Ceftazidime	0.39~6.25	1.56	6.25
	Cefoperazone	3.13~25	6.25	12.5
	Cefmenoxime	3.13~25	12.5	25
	Cefuzonam	12.5~100	25	100
<i>A. calcoaceticus</i> (64)	Cefclidin	$\leq 0.006\sim 25$	0.78	3.13
	Ceftazidime	0.39~50	6.25	12.5
	Cefoperazone	1.56~>100	50	>100
	Cefmenoxime	$\leq 0.006\sim 100$	25	50
	Cefuzonam	0.20~100	25	50
<i>H. influenzae</i> (24)	Cefclidin	$\leq 0.006\sim 0.78$	0.10	0.39
	Ceftazidime	0.013~1.56	0.10	0.39
	Cefoperazone	$\leq 0.006\sim 0.78$	0.013	0.20
	Cefmenoxime	$\leq 0.006\sim 1.56$	$\leq 0.006$	0.025
	Cefuzonam	$\leq 0.006\sim 0.05$	$\leq 0.006$	0.05
<i>B. catarrhalis</i> (19)	Cefclidin	0.39~3.13	1.56	3.13
	Ceftazidime	0.025~0.39	0.05	0.20
	Cefoperazone	0.20~6.25	1.56	3.13
	Cefmenoxime	0.025~0.78	0.20	0.78
	Cefuzonam	0.10~3.13	0.78	1.56

CFCLの抗菌力はCAZより若干劣ったが、MIC<sub>90</sub>は0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり、優れた抗菌力を示した。

11) *P. vulgaris*の場合

CFCLのMIC<sub>50</sub>はCAZやCMXより劣ったが、MIC<sub>90</sub>ではほぼ同等の優れた抗菌力を示した。

12) *P. rettgeri*の場合

CFCLのMIC<sub>90</sub>は0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり、CAZより8倍

優れ、最も優れた抗菌力を示した。

13) *M. morgani*の場合

CFCLのMIC<sub>50</sub>とMIC<sub>90</sub>はともに0.20 $\mu\text{g/ml}$ で、耐性菌に対しても優れた抗菌力を示した。CAZの32倍優れた抗菌力を示し、他の比較薬よりも優れていた。

14) *P. aeruginosa*の場合

CFCLは0.78 $\mu\text{g/ml}$ ですべての株の発育を阻止し、

Table 4. Protective effects of cefclidin on experimental infections in mice

Organism	Challenge* (cells/mouse) (LD <sub>50</sub> )	Drug	MIC (μg/ml)		ED <sub>50</sub> (mg/kg) (95% confidence limits)
			10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	
<i>S. aureus</i> Smith	2.5 × 10 <sup>6</sup> (80 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	12.5	6.25	3.31 ( 2.51~4.36 )
		Ceftazidime	6.25	6.25	4.74 ( 3.45~6.53 )
		Cefoperazone	6.25	1.56	1.27 ( 1.04~1.56 )
		Cefmenoxime	1.56	1.56	3.06 ( 1.96~4.78 )
		Cefuzonam	0.78	0.39	1.59 ( 0.98~2.58 )
<i>S. pneumoniae</i> Type III	2.6 × 10 <sup>6</sup> ** (13 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	0.20	0.20	18.51 ( 12.1~28.2 )
		Ceftazidime	0.20	0.20	7.12 ( 4.55~11.1 )
		Cefoperazone	0.05	0.025	0.996(0.687~1.45)
		Cefmenoxime	0.012	0.012	6.70 ( 4.11~10.9 )
		Cefuzonam	0.012	0.012	6.61 ( 4.44~9.83 )
<i>E. coli</i> 444	3.0 × 10 <sup>6</sup> (25 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	0.025	0.025	0.475(0.310~0.729)
		Ceftazidime	0.10	0.10	0.529(0.343~0.811)
		Cefoperazone	0.025	0.025	0.118(0.071~0.197)
		Cefmenoxime	0.012	≤0.006	0.073(0.050~0.109)
		Cefuzonam	0.10	0.025	0.173(0.109~0.275)
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	1.0 × 10 <sup>4</sup> (600 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	0.10	0.05	12.7 ( 9.32~17.2 )
		Ceftazidime	0.10	0.05	9.89 ( 5.34~18.3 )
		Cefoperazone	0.05	0.025	8.94 ( 5.69~14.0 )
		Cefmenoxime	0.05	0.012	1.76 ( 1.15~2.68 )
		Cefuzonam	0.05	0.025	1.57 ( 0.875~2.82 )
<i>S. marcescens</i> T-55	6.2 × 10 <sup>6</sup> (30 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	0.39	0.20	0.490(0.219~1.09)
		Ceftazidime	0.20	0.20	0.106(0.054~0.206)
		Cefoperazone	1.56	0.78	0.906(0.663~1.24)
		Cefmenoxime	0.39	0.20	0.377(0.207~0.686)
		Cefuzonam	0.39	0.20	0.593(0.327~1.08)
<i>A. calcoaceticus</i> Ac-54	2.5 × 10 <sup>6</sup> (30 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	3.13	0.78	0.839(0.618~1.14)
		Ceftazidime	6.25	3.13	1.45 ( 0.973~2.17 )
		Cefoperazone	100	25	67.3 ( 48.2~93.9 )
		Cefmenoxime	25	25	55.7 ( 33.5~92.9 )
		Cefuzonam	50	25	66.1 ( 44.3~98.7 )

\*containing 3% hog gastric mucin

\*\*not containing gastric mutin

その抗菌力はCAZより16倍優れ、他の比較薬よりもはるかに優れていた。

15) *A. calcoaceticus*の場合

CFCLのMIC<sub>90</sub>は3.13μg/mlであり、最も優れた抗菌力を示した。

16) *H. influenzae*の場合

CFCLのMIC<sub>90</sub>は0.39μg/mlで、その抗菌力はCPZ, CMX, CZONよりも劣ったが、CAZとほぼ同等であった。

17) *B. catarrhalis*の場合

CFCLのMIC<sub>90</sub>は3.13μg/mlでCPZと同等で、CAZ, CMXより劣っていた。

## 3. 増殖曲線に及ぼす影響

CFCLの*E. coli* KC-14, *A. calcoaceticus* Ac-54, *P. aeruginosa* E-2に対する殺菌作用について検討した結果を Fig. 1に示した。各々の菌種において、CFCLおよびCAZのいずれの薬剤もMIC濃度付近から作用濃

度に応じた殺菌作用を示した。

## 4. 形態変化

*P. aeruginosa* E-2にCFCLを作用させた時の位相差顕微鏡像および走査電子顕微鏡像をそれぞれ Fig. 2, Fig. 3に示した。低濃度から(0.08μg/ml作用時)菌の伸長化が観察され、2μg/ml以上ではスフェロプラストやバルジ、溶菌像が認められた。

## 5. マウス実験の感染症に対する治療効果

グラム陽性菌2菌種とグラム陰性菌4菌種を用いたマウス実験の全身感染症に対するCFCLおよび比較薬の治療効果をTable 4に示した。*S. aureus* Smith感染時のCFCLの治療効果はED<sub>50</sub>で3.3mg/kgであり、CPZやCZONよりも劣ったが、CAZやCMXとほぼ同等であった。*S. pneumoniae* TypeIII, *E. coli* 444, *K. pneumoniae* KC-1に対する治療効果はCPZ, CMX, CZONよりも劣っていた。*S. marcescens* T-55に対してはCAZに次いで優れた抗菌力を示した。一方、*A. cal-*

Table 5. Protective effects of cefclidin on *P. aeruginosa* experimental infections in mice

Organism	Challenge* (cells/mouse) (LD <sub>50</sub> )	Drug	MIC (μg/ml)		ED <sub>50</sub> (mg/kg) (95% confidence limits)
			10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	
<i>P. aeruginosa</i> E-2	5.0 × 10 <sup>5</sup> (30 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	3.13	0.39	5.96 (3.27~10.9)
		Ceftazidime	25	1.56	22.6 (14.7~34.8)
		Cefpiramide	>100	6.25	36.7 (23.2~58.1)
		Cefoperazone	>100	6.25	>200
		Piperacillin	>100	6.25	>200
<i>P. aeruginosa</i> K-31	3.0 × 10 <sup>5</sup> (54 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	0.78	0.78	3.89 (2.40~6.33)
		Ceftazidime	3.13	1.56	9.73 (5.60~16.9)
		Cefpiramide	50	6.25	7.98 (5.35~11.9)
		Cefoperazone	12.5	6.25	>200
		Piperacillin	100	12.5	>200
		Gentamicin	>100	100	>200
<i>P. aeruginosa</i> EN0011	3 × 10 <sup>4</sup> (40 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	3.13	1.56	11.9 (7.81~18.2)
		Ceftazidime	25	25	60.7 (38.3~96.0)
		Cefpiramide	>100	100	194 (104~373)
		Cefoperazone	>100	100	>400
		Piperacillin	>100	100	>400
<i>P. aeruginosa</i> KA-5	6 × 10 <sup>5</sup> (40 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	3.13	0.78	25.0 (13.0~48.3)
		Ceftazidime	50	6.25	98.0 (61.2~157)
		Cefpiramide	>100	50	>400
		Cefoperazone	>100	100	>400
		Cefsulodin	25	25	>400
		Piperacillin	>100	>100	>400
<i>P. aeruginosa</i> TP-5	5 × 10 <sup>5</sup> (10 LD <sub>50</sub> )	Cefclidin	3.13	1.56	19.7 (11.5~33.7)
		Ceftazidime	3.13	1.56	20.9 (11.1~39.1)
		Cefpiramide	>100	25	>400
		Cefoperazone	>100	25	>400
		Cefsulodin	100	50	>400
		Piperacillin	>100	>100	>400

\*containing 3% hog gastric mucin

Table 6. β-lactamase activity of bacteria used in experimental infections

Organism <sup>a)</sup>	β-lactamase activity (unit/mg protein) <sup>b)</sup>					
	Cephalosporinase activity			Penicillinase activity		
	uninduced (A)	induced (B)	ratio (B/A)	uninduced (A)	induced (B)	ratio (B/A)
<i>P. aeruginosa</i> E-2	<0.006	1.28	213	<0.1	<0.1	—
<i>P. aeruginosa</i> K-31	0.009	2.52	280	<0.04	<0.05	—
<i>P. aeruginosa</i> EN0011	2.17	6.66	3.1	<0.08	<0.08	—
<i>P. aeruginosa</i> TP-5	0.052	4.74	91	1.78	1.74	1.0
<i>P. aeruginosa</i> KA-5	0.034	6.70	197	2.62	2.80	1.1

a) E2, laboratory stock strain producing inducible cephalosporinase ; K-31, gentamicin resistant clinical isolate producing inducible cephalosporinase ; EN0011, ceftazidime resistant clinical isolate producing high level cephalosporinase ; KA-5 and TP-5 are clinical isolates and produce inducible high level cephalosporinase and penicillinase.

b) The enzyme activity was determined by spectrophotometric assay using 100 μM cephalothin (cephalosporinase) or 200 μM ampicillin (penicillinase) as the substrate. Imipenem (0.1 μg/ml) was added to mid-exponential phase culture broth. Incubation was continued for 2.5h at 37°C.

*coaceticus* に対する  $ED_{50}$  は  $0.8\text{mg/kg}$  で CAZ の 2 倍、他の比較薬の 7 倍以上の優れた治療効果を示した。

緑膿菌 5 株を用いたマウス実験の全身感染症に対する CFCL および比較薬の治療効果を Table 5 に示した。またこれら菌株の  $\beta$ -lactamase 産生プロファイルは Table 6 に示した。CFCL は  $\beta$ -lactamase 産生脱抑制株 (EN0011)、penicillinase 産生株 (KA-5, TP-5) や GM 耐性株 (K-31) に対しても最も優れた治療効果を示し、TP-5 株を除く全ての株に CAZ より 2 ~ 5 倍優れていた。TP-5 株では、CAZ とほぼ同等の治療効果であったが、他の抗緑膿菌性  $\beta$ -ラクタム剤である CPM, CPZ, CFS, PIPC に比べるとはるかに優れていた。

### III. 考 察

CFCL は 7 位側鎖に新規なアミノチアザゾール基を有する oxime 型の注射用セフェム系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルを有し、特に *P. aeruginosa* に対して優れた抗菌力を持つことが認められた。

CFCL は、*S. marcescens* を除くグラム陰性菌の 90% を  $6.25\mu\text{g/ml}$  以下で阻止した。また、一般にセフェム剤が効きにくい *A. calcoaceticus* に対しても優れた抗菌力を示した。一方、*S. aureus* に対しては、いわゆる第 3 世代セフェム剤に比べて若干抗菌力が劣ったが、CAZ とほぼ同等であった。一般的に  $\beta$ -ラクタム抗生物質のグラム陰性菌に対する抗菌力は 1)  $\beta$ -lactamase に対する安定性 2) 外膜の透過性 3) PBPs に対する親和性により影響を受けることが知られている。CFCL は 7 位にメトキシイミノ基を持ち  $\beta$ -lactamase に安定であること、3 位に carbamoyl-quinuclidinio methyl 基を導入したことによる  $\beta$ -lactamase に対する低親和性<sup>7)</sup>が、これらグラム陰性菌に対する優れた抗菌力に反映されたと考えている。また、3 位の carbamoylquinuclidinio methyl と 4 位のカルボン酸との間で分子内塩をつくるベタイン構造により、CFCL のグラム陰性菌外膜透過性は優れているものと考えられる。

CFCL の最も大きな特徴は、難治感染症の代表的菌種である *P. aeruginosa* に対する優れた抗菌力である。*P. aeruginosa* は各種薬剤に自然耐性を示し、臨床治療上大きな問題となっている。その原因として低い外膜透過性が考えられている<sup>6)</sup>。カルバペネム系薬剤では、その透過経路が明かにされている<sup>7)</sup>が、セフェム剤の場合、透過経路ははっきりしていない。二階堂らは CFCL の *P. aeruginosa* 外膜透過速度は比較薬と比べてそれほど速くないと報告している<sup>8)</sup>。一方、*P. aeruginosa* の産生する  $\beta$ -lactamase に対しては極めて安定であり、親和性も極めて低い。このことが CFCL の *P.*

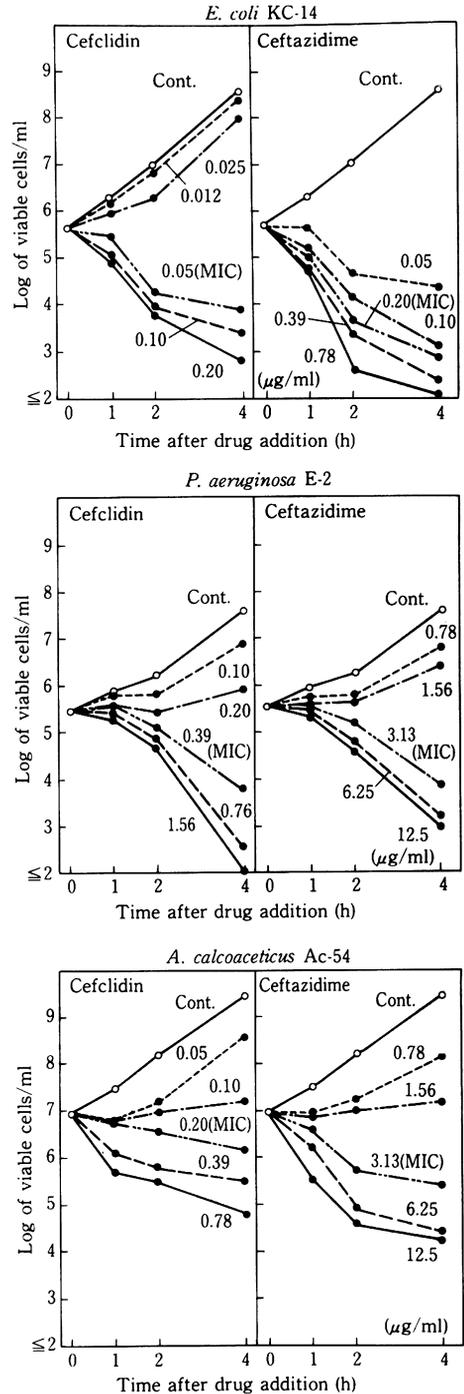


Fig. 1. Effect of cefclidlin and ceftazidime on the viability of gram-negative bacteria

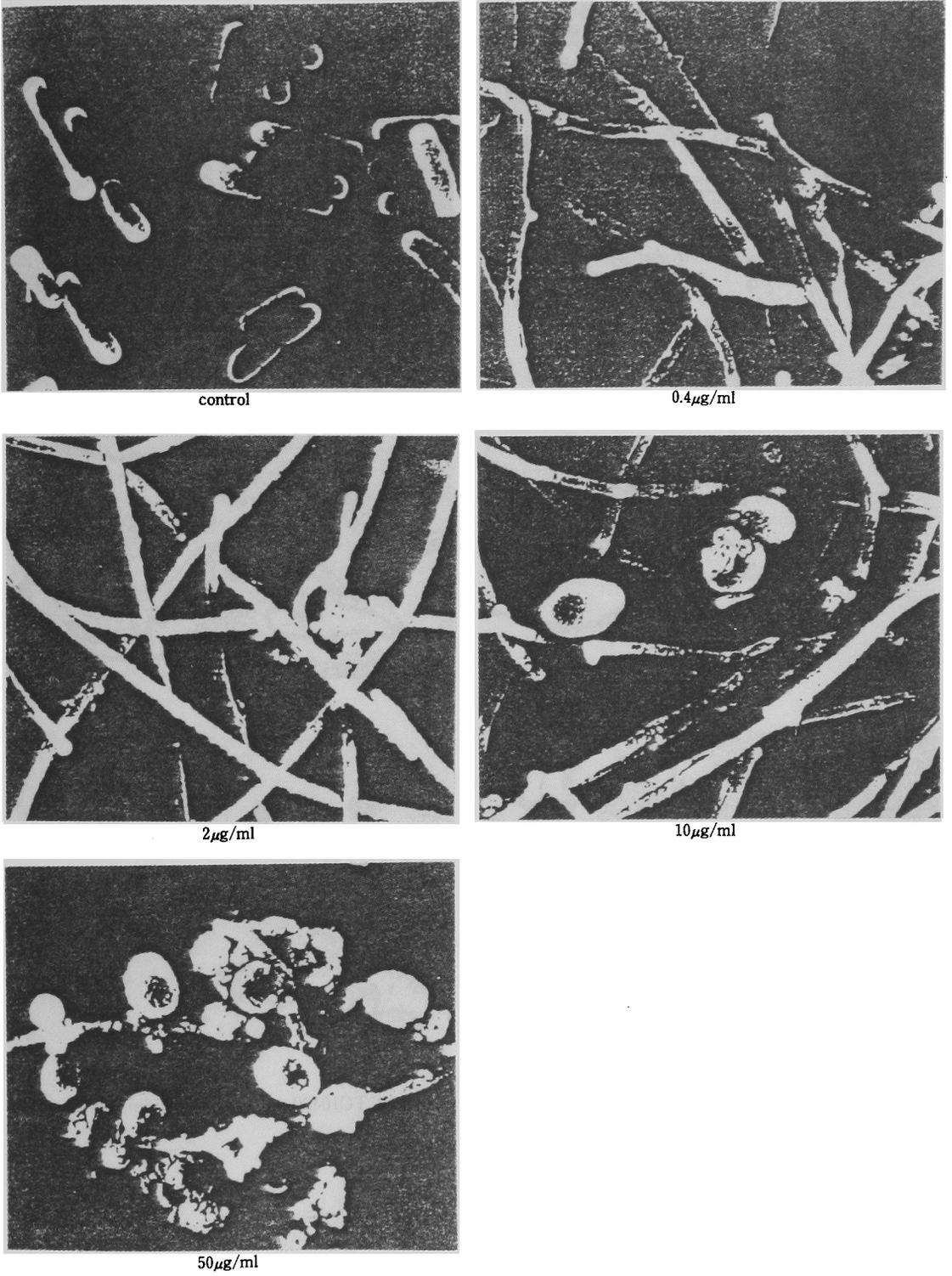


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *P. aeruginosa* NCTC10490 exposed cefclidin for 2h.

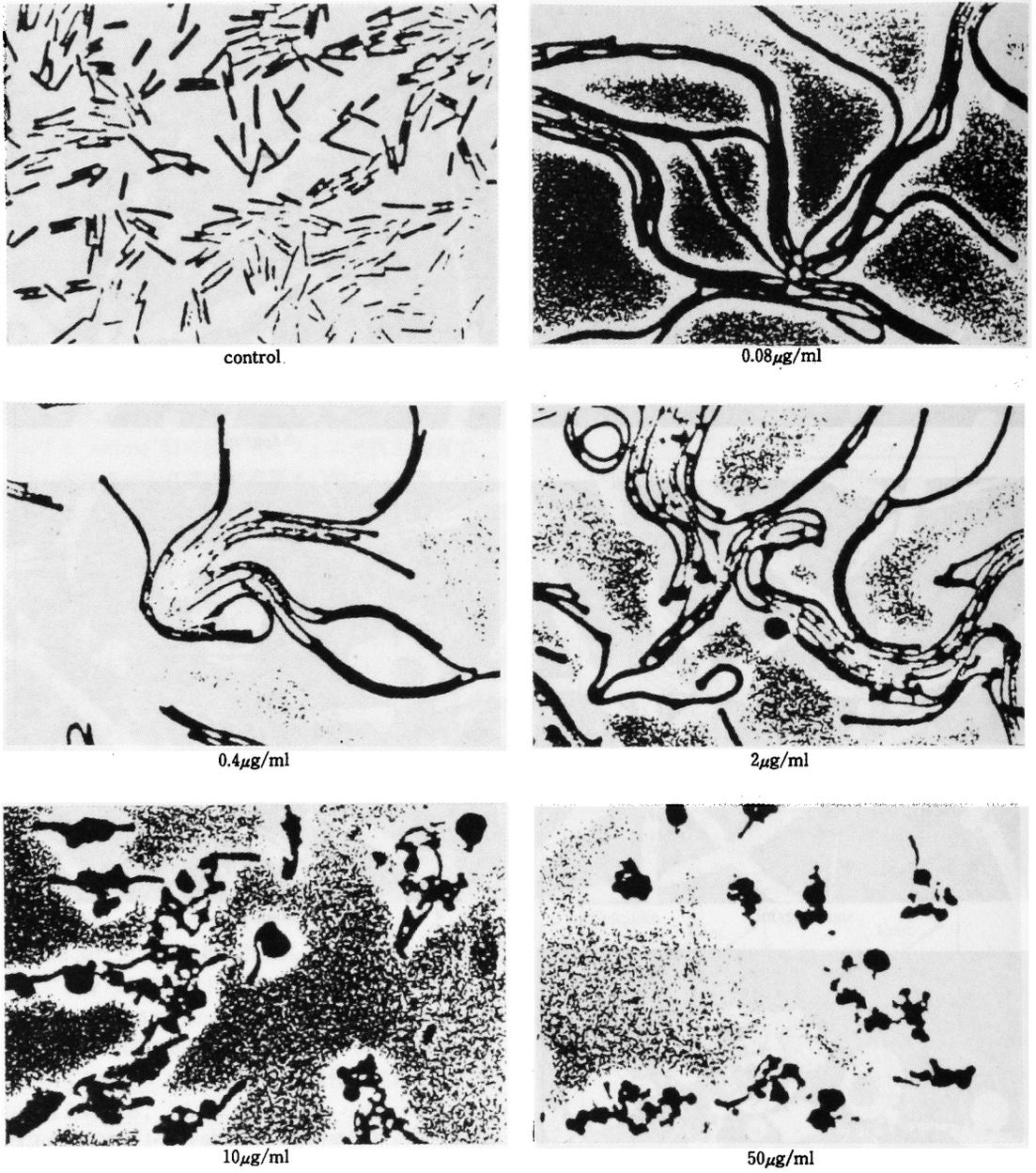


Fig. 2. Phase-contrast micrographs of *P. aeruginosa* NCTC10490 exposed cefclidin for 2h.

*aeruginosa*に対する優れた抗菌力に反映されていると考えられる<sup>9)</sup>。本論文で示された優れた殺菌性、低濃度から観察される菌の伸長化やスフェロプラスト形成は、PBP 3とPBP 1aに対する優れた親和性によると考えられる<sup>1)</sup>。また、マウス実験的腹腔感染症で得られた *in vitro* 抗菌力を反映した優れた治療効果には、低い血清蛋白結合も関与していると考えられる。

以上の特徴より、CFCLはグラム陽性菌からグラム陰性菌、特に *P. aeruginosa*による各種感染症に有用性が期待される。

#### 文 献

- 1) Watanabe N, Katsu K, Moriyama M, and Kitoh K : *In vitro* evaluation of E1040, a new cephalosporin with potent anti-pseudomonal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 : 693~701, 1988
- 2) Neu H C, Chin N, and Novelli A : *In vitro* activity of E1040, a novel cephalosporin with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agent Chemother* 32 : 1666~1675, 1988
- 3) 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
- 4) Kellenberger E, Ryter A, and Sechwald J.: Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 671~678, 1958
- 5) Litchfield J T, and Wilcoxon F : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 99~113, 1949
- 6) Yosimura E N, Nikaido H : Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* 152 : 636~642, 1982
- 7) Gotoh N, and Nishino T : Decreases of the susceptibility to low molecular weight  $\beta$ -lactam antibiotics in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants role of outer membrane protein D2 in their diffusion. *J. Antimicrob. Chemother.* 25 : 191~198, 1990
- 8) Nikaido H, Liu W, and Rosenberg E Y : Outer membrane permeability and  $\beta$ -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 : 337~342, 1990

*IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CEFCLIDIN

Takeshi Nishino, Masako Otsuki, Yoshiki Obana, Ryoichi Hiruma and Masanori Tashima  
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University,  
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cefclidin (CFCL), a new parenteral cephem antibiotic, were compared with those of cefoperazone (CPZ), cefmenoxime (CMX), ceftazidime (CAZ) and cefzonam (CZON). The following results were obtained.

CFCL had a broad antimicrobial spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*, and its antibacterial activity against clinical isolates of *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Providencia rettgeri*, and *Morganella morganii* were superior to those of CPZ, CMX, CAZ, CZON. The activities of CFCL against Gram-positive cocci were comparable to those of CAZ, but it was less active than CPZ, CMX, and CZON. Against *P. aeruginosa*, CFCL was the most potent compound of all the cephem antibiotics tested. In the sensitivity distribution of clinically isolated strains, the MIC<sub>50</sub> values ( $\mu\text{g/ml}$ ) of CFCL were 6.25 for *Staphylococcus aureus*, 3.13 for *Staphylococcus epidermidis*, 0.10 for *Streptococcus pyogenes*, 0.10 for *Streptococcus pneumoniae*, 0.10 for *Escherichia coli*, 0.20 for *Klebsiella pneumoniae*, 0.20 for *Proteus vulgaris*, 0.20 for *M. morganii*, 0.10 for *E. cloacae*, 0.20 for *E. aerogenes*, 0.78 for *Serratia marcescens*, 0.10 for *Haemophilus influenzae*, 1.56 for *Branhamella catarrhalis*, 0.78 for *Acinetobacter calcoaceticus*, and 0.78 for *P. aeruginosa*. The *in vitro* activity of CFCL was well sustained *in vivo* as shown by results obtained in experimental infections in mice. In particular, CFCL was the most active drug against *P. aeruginosa* including gentamicin-resistant and  $\beta$ -lactamase-overproducing strains. Morphological studies using a scanning electron microscope and a phase-contrast microscope showed that CFCL caused spheroplast and bulge formation in *P. aeruginosa* at low concentration.