

経口カルバセフェム剤loracarbefのin vitro 抗菌作用

佐藤 清・吉竹裕子・山下錦也

協和醸酵工業株式会社医薬研究所*

Loracarbef(LCBF)は既存のセフェム骨格の1位の硫黄が炭素に置き換わったカルバセフェム骨格を有する新しいタイプの経口 β -ラクタム系抗生物質である。LCBFのin vitro 抗菌力をceftiofur(CCL), cephalexinおよびamoxicillinと比較検討した。

各種臨床分離株に対する感受性分布試験では、LCBFは*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*属, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*および*Neisseria gonorrhoeae*に対して0.2~1.56 μ g/mlのMIC₅₀を示した。中でも*E. coli*および*K. pneumoniae*に対しては比較薬剤中最も優れた抗菌力を示した。嫌気性菌に対してはグラム陽性菌にのみ中等度の抗菌力を示した。LCBFは殺菌的に作用しMICとMBCはほぼ同値を示した。LCBFの抗菌力は培地, 培地pHおよび馬血清の添加によって影響されにくい, 接種菌量については高菌量でMIC値が上昇した。これらの成績は比較薬剤でも同様に認められる現象であった。pHに対する安定性試験では、CCLはpH2.0~4.0でのみ安定であるのに対し、LCBFはpH2.0~10.0の広い範囲で極めて良好なpH安定性を示した。 β -lactamaseに対しては、cephalosporinaseにはCCLと同様に分解されるが、penicillinaseの一部にはLCBFがCCLより若干安定であった。 β -ラクタム系抗生物質の作用点であるペニシリン結合蛋白質に対する親和性を*E. coli* NIHJ JC-2を用いて検討したが、CCLとほぼ同様な結合親和性を示した。

以上の結果、LCBFはCCLによく類似した抗菌プロフィールを示し、優れたpH安定性はカルバセフェム骨格に起因する特徴と考えられる。

Key words : loracarbef, カルバセフェム, 殺菌作用, 作用機作

Loracarbef(LCBF)は協和醸酵工業(株)で創製されたカルバセフェム系経口抗生物質であり、化学名を(+)-(6R, 7S)-7-[(R)-2-amino-2-phenylacetamido]-3-chloro-8-oxo-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid monohydrateと称する。従来のセフェム系抗生物質と比較してその化学構造の特異性が大きな特徴である。すなわち、LCBFは既存のセフェム骨格の1位の硫黄が炭素に置き換わったカルバセフェム骨格の β -ラクタム系抗生物質である。LCBFは3位と7位にceftiofur(CCL)¹⁾と同一の側鎖を有し、CCLに近似した化学構造を有している。グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対してCCLと同様の広域抗菌スペクトルを示し、特に臨床分離株の*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*に対してはCCLに優る抗菌力を示す^{2,3)}。また、化学的安定性および動物やヒトにおけるbioavailabilityはCCLに比べて極めて良好な成績を示す^{2,4,5)}。

本稿ではLCBFのin vitro 抗菌力についてCCL, cephalexin(CEX)およびamoxicillin(AMPC)を対照剤と

して比較検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

LCBFは協和醸酵工業(株)で合成した標準品を用いた。CCL(塩野義製薬), CEX(塩野義製薬)は市販製剤より抽出, 精製して使用した。AMPC(協和醸酵工業), cephaloridine(CER, 塩野義製薬), benzylpenicillin(PCG, 明治製薬), latamoxef(LMOX, 塩野義製薬)およびcefotaxime(CTM, ヘキストジャパン)は市販品を使用した。 [¹⁴C]PCG(Specific activity 54mCi/mmol)はAmersham社のものを使用した。

2. 供試菌株

抗菌力の測定に用いた標準株ならびに臨床分離株は協和醸酵工業(株)医薬研究所に保存してあるものを使用した。臨床株は主として1983年から1986年の間に臨床材料から分離されたものを用いた。嫌気性菌は岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設, β -lactamase産生菌は群馬大学医学部微生物学教室より分与された。

*〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188

3. 感受性測定法

好気性菌は以下に示す菌種以外は前培養培地に Mueller-Hinton Broth (MHB, Difco) を感受性測定用培地に Mueller-Hinton Agar (MHA, Difco) を用いて日本化学療法学会測定法に準じて測定した⁶⁾。なお前培養培地として *Streptococcus* 属, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* には 5% 脱繊維馬血液加 MHB を, *Neisseria* 属には 1% ヘモグロビン加 Thayer-Martin Agar を用いた。また, 感受性測定用培地として, *H. influenzae* には MHA に 5% 脱繊維馬血液を加えたチョコレート寒天培地を, *Streptococcus* 属には 5% 脱繊維馬血液を加えた MHA を, *Neisseria* 属には 1% ヘモグロビン加 Thayer-Martin Agar を用いた。嫌気性菌は前培養培地に GAM Broth (ニッスイ), 感受性測定用培地に GAM Agar (ニッスイ) を用いた。各薬剤の倍数希釈液を含む感受性測定用培地に一夜前培養した試験菌 (10^6 CFU/ml) を接種し, 37℃ で 18 時間培養後 MIC (μ g/ml) を測定した。*Neisseria* 属は 5% CO₂ 下, 嫌気性菌はガスパック法 (BBL) で行なった。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

数種類の試験菌を用い抗菌力に及ぼす諸因子の影響を日本化学療法学会測定法に準じて検討した。培地として Heart Infusion Agar (HIA, 栄研), Trypto-soy Agar (TSA, ニッスイ), Mueller-Hinton Agar (MHA, Difco), Nutrient Agar (NA, ニッスイ) および Antibiotic Medium 2 (ABM, Difco) を用いた。培地 pH, 接種菌量, 馬血清添加の影響は MHA を用いて検討した。培地 pH は 6.0, 7.0, 8.0 で, 接種菌量は 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml で, 馬血清添加は 10, 20, 40% について調べた。

5. pH 安定性

各薬剤の 100 μ g/ml 液を 37℃ で振盪し経時的にサンプリング後 bioassay にて各溶液中の残存薬剤量を測定した。0 時間の薬剤量を 100 とした相対残存量 (%) により各種 pH における安定性を検討した。使用した緩衝液は次の通りである。pH 2.0 ~ 5.0: 1N HCl-1M CH₃COONa, pH 6.0 ~ 8.0: M/5 Na₂HPO₄-M/10 citric acid, pH 9.0 ~ 11.0: M/5 Na₂CO₃-M/5 boric acid + M/5 KCl を用いた。

6. 最小殺菌濃度 (MBC) の測定法

試験菌を MHB で一夜前培養し, 同培地で 10^5 CFU/ml となるように希釈し, その希釈菌液と 2 倍希釈系列の薬剤液を混和し (最終菌数 10^4 CFU/ml) 37℃, 18 時間培養する。肉眼的に菌の発育を阻止した最小濃度を MIC とし, さらに MIC 濃度付近の数段階の培養液を薬剤フリーの寒天平板上に約 5 μ l 点滴塗抹した。これを

37℃, 18 時間培養後, 平板上のコロニー数が 10 個以下の最小濃度を MBC として判定した。

7. β -lactamase に対する安定性

1) 粗 β -lactamase の調製法

試験菌を Brain Heart Infusion (BHI, Difco) 培地にて一夜培養し, その培養液を新たな BHI で 20 倍に希釈し 4 時間振盪培養する。培養後の菌体を遠心分離 (2℃, 4,000 $\times$ g, 30 分) により集め, 0.1M 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碎し, 遠心分離 (2℃, 8,000 $\times$ g, 30 分) して得た上清を粗酵素液とした。

2) β -lactamase に対する安定性の測定

β -lactamase に対する安定性の測定は既報⁷⁾に従って行なった。すなわち, 基質 (薬剤) 100 μ mol を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5ml に溶解し, 30℃ で 10 分加温する。前述の粗酵素液を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で適宜希釈し, 基質液に加えて 30℃ で 15 ~ 30 分反応する。0.016N ヨウ素液を 10ml 加え酵素反応を止め, 10 分間放置する。0.016N チオ硫酸ナトリウム溶液 10ml を加え, 直ちに 1/100 希釈する。粗酵素液を加えず同様に処理した基質液を対照とし, bioassay により基質の分解量を求め, CER の分解率を 100 とし各薬剤の相対分解率を求めた。

8. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性実験

1) PBPs の調製法

E. coli NIHJ JC-2 の PBPs は, Spratt⁸⁾らの方法に準じて調製した。Antibiotic Medium 3 (Difco) で培養した菌体を超音波処理し, 8,000 $\times$ g, 20 分の遠心で未破壊細胞を除き, その上清を 100,000 $\times$ g, 30 分の超遠心で膜画分を得た。蛋白濃度は 20mg/ml (Folin 法) に調製した。

2) PBPs に対する親和性の解析

薬剤を最終濃度 0.005 ~ 50 μ g/ml になるように膜画分に加え, 30℃ 10 分間保温後, [¹⁴C] PCG (0.5 μ Ci/Reaction mixture) を添加, さらに 30℃ 10 分間保温した。20% Sarkosyl で内膜をとかし, 外膜を遠心で除いた反応液を SDS 存在下で 100℃ 2 分間加熱後, 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル平板電気泳動にかけ, ゲル乾燥後 X-ray film (Ultrofilm ³H, LKB) に密着し, -80℃ で約 3 ケ月間感光させて Fluorography を作成した。各 PBPs に対する [¹⁴C] PCG の結合を 50% 阻害する LCBF の量 (ID₅₀) は, X-ray film 上の黒化度を TLC scanner CG-900 (島津製作所) を用いて測定した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

各種グラム陽性菌，グラム陰性菌および嫌気性菌に対するLCBFの抗菌力をCCL，CEXおよびAMPCと比較検討し，その結果をTable 1～2に示した。

LCBFはグラム陽性菌やグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し，*Staphylococcus*属，*Streptococcus*属，*Micrococcus luteus*，*Bacillus subtilis*，*E. coli*，

K. pneumoniae，*Proteus mirabilis*および*H. influenzae*に対して0.2～1.56μg/mlのMICを示した。前述した菌種に対するLCBFの抗菌力はCCLとほぼ同程度であったが，CEXより2～8倍優れていた。AMPCと比較するとLCBFはグラム陽性菌では劣るものの*E. coli*や*K. pneumoniae*には優る抗菌力を示した。LCBFは

Table 1. Antibacterial spectrum of loracarbef and reference antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria

Organism	MIC (μg/ml)			
	Loracarbef	Cefaclor	Cephalexin	Amoxicillin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	0.2	0.2	0.78	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.78	0.78	1.56	0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> J555*	>100	>100	>100	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.56	1.56	3.13	0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> S23	0.2	0.1	0.39	0.01
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.2	0.1	0.39	0.01
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I	0.39	0.39	1.56	0.01
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II	0.78	0.39	3.13	0.01
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III	1.56	0.78	6.25	0.01
<i>Enterococcus faecalis</i> 10541	25	25	>100	0.2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.39	0.2	1.56	0.2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.2	0.1	0.78	0.02
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.78	0.78	3.13	3.13
<i>Escherichia coli</i> GN2411-5	0.39	0.78	3.13	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> F3800	0.39	0.78	3.13	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	1.56	1.56	12.5	0.78
<i>Proteus vulgaris</i> 6897	>100	25	25	50
<i>Proteus inconstans</i> F3301	6.25	50	25	>100
<i>Providencia rettgeri</i> 4289	50	>100	>100	25
<i>Morganella morganii</i> KY4298	100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> F1870	>100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> F1949	>100	>100	>100	>100
<i>Citrobacter freundii</i> F1905	12.5	25	50	>100
<i>Serratia marcescens</i> T-26	100	>100	>100	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> #1	>100	>100	>100	>100
<i>Haemophilus influenzae</i> F4270	1.56	1.56	6.25	0.2

Agar dilution method, inoculum size 10⁶ CFU/ml

* Methicillin resistant

Table 2. Antibacterial spectrum of loracarbef and reference antibiotics against anaerobic bacteria

Organism	MIC (μg/ml)			
	Loracarbef	Cefaclor	Cephalexin	Amoxicillin
<i>Peptococcus prevotii</i> 1911	0.2	0.39	0.39	0.02
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 0665	0.78	0.78	3.13	0.2
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 1684	0.1	0.2	0.2	0.02
<i>Peptococcus magnus</i> 1694	0.78	1.56	3.13	0.2
<i>Peptococcus magnus</i> 1908	1.56	1.56	6.25	0.2
<i>Peptococcus variabilis</i> 0670	1.56	1.56	6.25	0.2
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1705	0.78	1.56	3.13	0.1
<i>Propionibacterium acnes</i> 1827	1.56	1.56	6.25	0.2
<i>Eubacterium lentum</i> 0309	6.25	12.5	6.25	0.78
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 0364	100	>100	50	25
<i>Clostridium difficile</i> 0745	100	>100	50	25
<i>Veillonella parvula</i> 2646	>100	>100	50	25
<i>Bacteroides fragilis</i> 0004	100	>100	50	25
<i>Bacteroides fragilis</i> 7000	100	>100	50	25
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 0659	100	>100	50	25
<i>Fusobacterium mortiferum</i> 0304	100	50	25	1.56

Agar dilution method, inoculum size 10⁶ CFU/ml

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Enterobacter* 属, *Serratia marcescens* および *Pseudomonas aeruginosa* に対しては CCL や CEX および AMPC と同様ほとんど抗菌力を示さなかった。一方、嫌気性菌については *Peptostreptococcus* 属, *Propionibacterium* 属 および *Eubacterium* 属のグラム陽性菌に対して LCBF は CCL とほぼ同程度、CEX よりは約4倍強い抗菌力を示した。*Bacteroides fragilis* 等のグラム陰性菌に対しては LCBF は CCL,

CEX と同様に抗菌力を示さなかった。LCBF は嫌気性菌に対しては AMPC と比べ全般的に約4倍弱い抗菌力であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

各種臨床分離株の LCBF に対する感受性分布を Table 3 に示した。LCBF は *S. aureus*, *Streptococcus* 属, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* および *Neisseria gonorrhoeae* に対して 0.2~1.56 µg/ml の MIC₅₀ を示した。特に *E. coli* および *K. pneumoniae* に対しては

Table 3. Antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics against various clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC (µg/ml) *		
		Range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (51)	Loracarbef	0.39 ~ >100	1.56	100
	Cefaclor	0.39 ~ >100	1.56	100
	Cephalexin	0.78 ~ >100	3.13	100
	Amoxicillin	0.1 ~ 100	1.56	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (15)	Loracarbef	0.78 ~ 50	6.25	12.5
	Cefaclor	0.78 ~ 25	6.25	12.5
	Cephalexin	1.56 ~ 50	12.5	25
	Amoxicillin	0.39 ~ 50	1.56	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> (27)	Loracarbef	0.1 ~ 0.39	0.2	0.20
	Cefaclor	0.1 ~ 0.2	0.2	0.2
	Cephalexin	0.2 ~ 0.78	0.78	0.78
	Amoxicillin	0.01 ~ 0.01	0.01	0.02
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (11)	Loracarbef	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
	Cefaclor	0.39 ~ 0.78	0.39	0.39
	Cephalexin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	Amoxicillin	0.01 ~ 0.01	0.01	0.01
<i>Escherichia coli</i> (54)	Loracarbef	0.2 ~ >100	0.78	25
	Cefaclor	0.39 ~ >100	1.56	50
	Cephalexin	1.56 ~ >100	6.25	>100
	Amoxicillin	1.56 ~ >100	50	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (54)	Loracarbef	0.2 ~ >100	0.39	1.56
	Cefaclor	0.2 ~ >100	0.78	3.13
	Cephalexin	1.56 ~ >100	3.13	12.5
	Amoxicillin	12.5 ~ >100	100	>100
<i>Proteus mirabilis</i> (50)	Loracarbef	0.39 ~ 12.5	0.78	1.56
	Cefaclor	0.39 ~ 12.5	1.56	1.56
	Cephalexin	6.25 ~ 50	12.5	25
	Amoxicillin	0.39 ~ >100	0.78	1.56
<i>Enterobacter cloacae</i> (27)	Loracarbef	0.78 ~ >100	50	>100
	Cefaclor	0.39 ~ >100	100	>100
	Cephalexin	3.13 ~ >100	>100	>100
	Amoxicillin	6.25 ~ >100	>100	>100
<i>Haemophilus influenzae</i> (11)	Loracarbef	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56
	Cefaclor	0.78 ~ 3.13	1.56	1.56
	Cephalexin	6.25 ~ 25	6.25	12.5
	Amoxicillin	0.2 ~ 0.39	0.2	0.39
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (22)	Loracarbef	0.78 ~ 3.13	1.56	1.56
	Cefaclor	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	Cephalexin	12.5 ~ 50	12.5	25
	Amoxicillin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56

*Agar dilution method; inoculum size 10⁶ CFU/ml; 50 and 90%, MIC of the antibiotic that inhibited 50 and 90%, respectively, of the isolates.

LCBFのMIC₅₀値およびMIC₉₀値はCCLの1/2, CEXの1/8, AMPCの1/64以下であり; LCBFは比較薬剤中最も優れた抗菌力を示した。S. aureus, Streptococcus属, P. mirabilis, H. influenzaeおよびN. gonorrhoeaeに対してLCBFはCCLと同等の抗菌力を示した。CEXは試験した全菌種においてLCBFより約2~16倍抗菌力

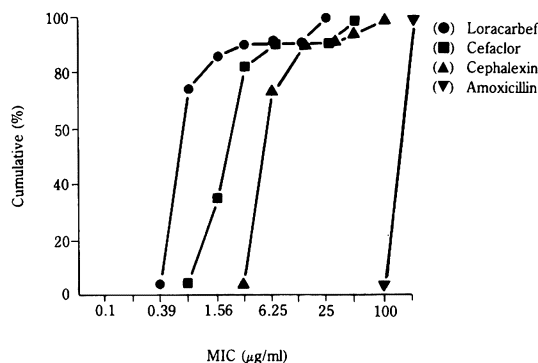


Fig. 1. Antibacterial activity of loracarbef, cefaclor, cephalixin and amoxicillin against 23 clinical isolates of ampicillin-resistant *Escherichia coli*.

が弱かった。Fig. 1にはABPC耐性*E. coli*の感受性分布を示した。LCBF, CCL, CEX, AMPCのMIC₅₀値はそれぞれ0.78, 3.13, 6.25, >100 μg/mlであり, LCBFは対照薬に比べ最も強い抗菌力を示した。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

5種類の異なる培地を使用して6菌株に対するLCBFのMICを測定した結果をFig. 2に示した。各試験菌ともいずれの培地においてもLCBFのMICの変動は4倍以内に収まり, 培地の影響はほとんどみられなかった。培地pHを6.0, 7.0, 8.0に修正したMHA培地を用いてLCBFのMICを測定しFig. 3に示した。培地pH6.0~8.0の間では各試験菌に対するLCBFのMICの変動は4倍以内に収まったが, pH5.0ではグラム陰性菌のMICは増大する傾向がみられた。接種菌量を $10^1 \sim 10^8$ CFU/mlに変化させると*Staphylococcus epidermidis*を除き他5菌株では $10^1 \sim 10^6$ CFU/mlの間ではMIC値の変動は2倍以内であったが 10^7 CFU/ml以上になるとMIC値の著しい増大がみられた(Fig. 4)。MHA培地に馬血清を最終濃度10, 20, 40%加えてMIC値の変動をみたが, 2倍以内に収まり諸因子の中で最もMICの変動が小さかった(Fig. 5)。以上の成績よりLCBFの抗菌力は培地, 培

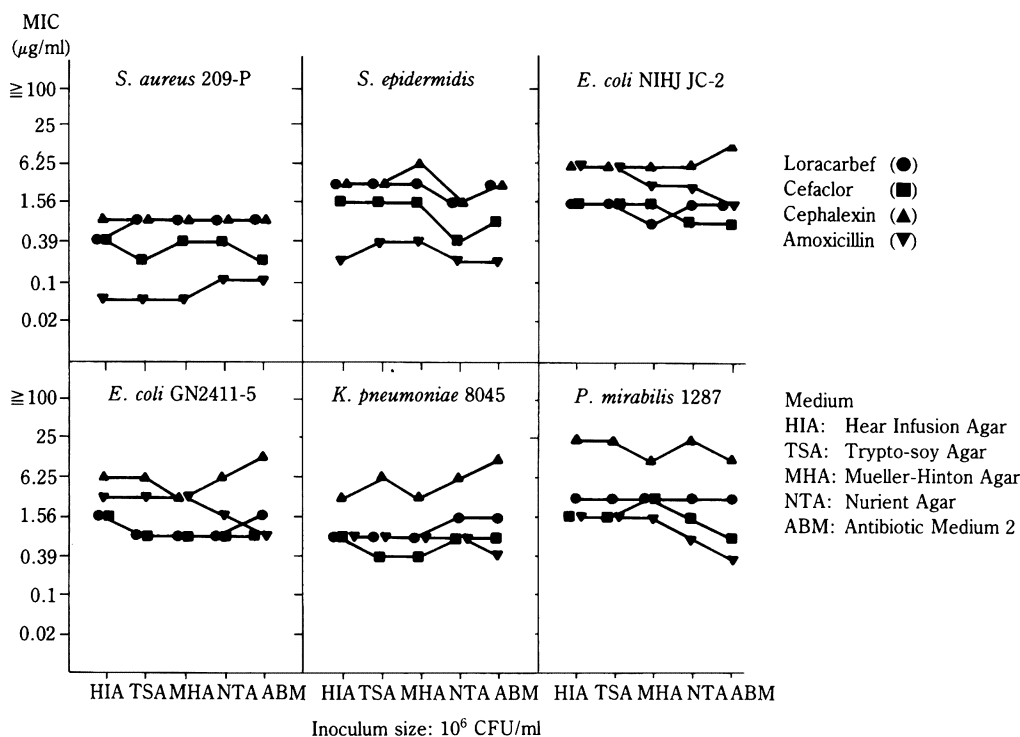


Fig. 2. Effect of agar medium on antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics.

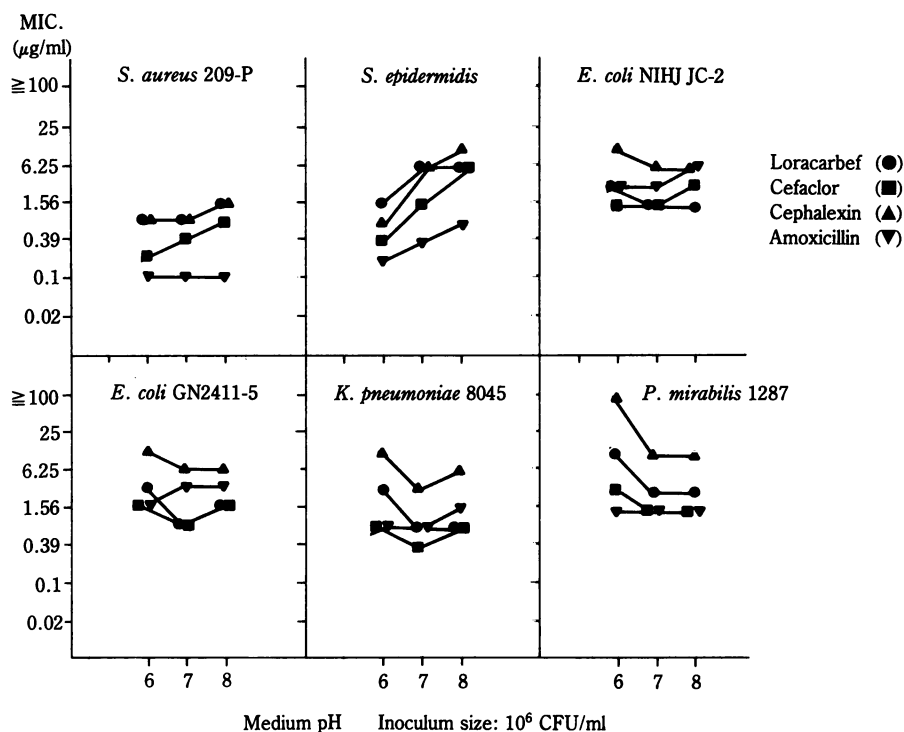


Fig. 3. Effect of medium pH on antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics.

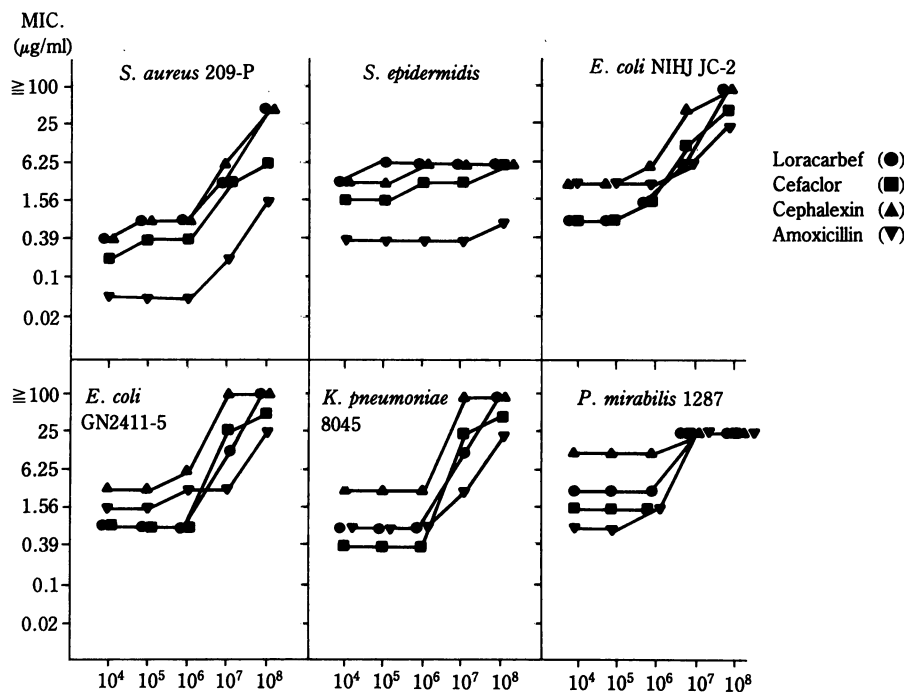


Fig. 4. Effect of inoculum size on antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics.

地pH, 馬血清添加などの測定条件によって影響されにくい, 接種菌量についてはCCL, CEXと同じく高菌量の場合MIC値が増加した。

4. pH安定性

LCBFのpHに対する安定性をCCLと比較しその結果をFig. 6に示した。37℃で6時間振盪後の残存薬量は, LCBFではpH2.0からpH9.0まではほぼ100%, pH10.0で86.5%, pH11.0で13.0%であった。一方, CCLはpH2.0~3.0ではほぼ100%, pH4.0~5.0で70.0~90.0%, pH6.0~8.0で20.0%以下, pH9.0~11.0では検出限界以下であった。CCLは酸性側では安定であるが, 中性あるいは塩基性では不安定であった。ところが, LCBFは酸性, 中性および弱塩基性条件下まで極めて広い安定性を示した。

5. 最小殺菌濃度(MBC)

Broth法によりLCBFのMICおよびMBCを対照薬剤と比較した(Table 4)。LCBFは*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*に対してCCL, CEX, AMPCと同様殺菌的に作用しLCBFのMICとMBCはほぼ同等であった。

6. β -lactamaseに対する安定性

被験菌株に対する各種薬剤のMICをTable 5に示した。PCGはpenicillinase(PCase)産生菌の*E. coli* S1112にMIC > 100 μ g/ml, セフェム剤はcephalosporinase(CEPase)産生菌の*E. coli* S1119, *Citrobacter freundii* S1256に50~100 μ g/mlの値を示した。LMOXはいずれの菌株にも優れた抗菌力を示した。LCBFの β -lactamaseに対する安定性をCCLおよび他のセフェム剤と比較した(Table 6)。PCase(*E. coli* S1112由来)に対してはCERの分解を100%とした時の相対比較でCCLは約30%弱分解されるのにLCBFはほとんど分解がみられずに安定であった。*E. coli* および *C. freundii* 由来のCEPaseに対してはLCBFはCCLより分解率が高かった。一方, 臨床分離株より得た新鮮臨床分離株由来の β -lactamaseに対しては4株中3株LCBFの方が安定性を示した。

7. Penicillin結合蛋白質(PBPs)に対する親和性

β -ラクタム剤の作用点であるPBPsに対する親和性を*E. coli* NIHJ JC-2を用いてCCLと比較した。Fig. 7には薬物の各濃度作用したFluorography, Table 7には

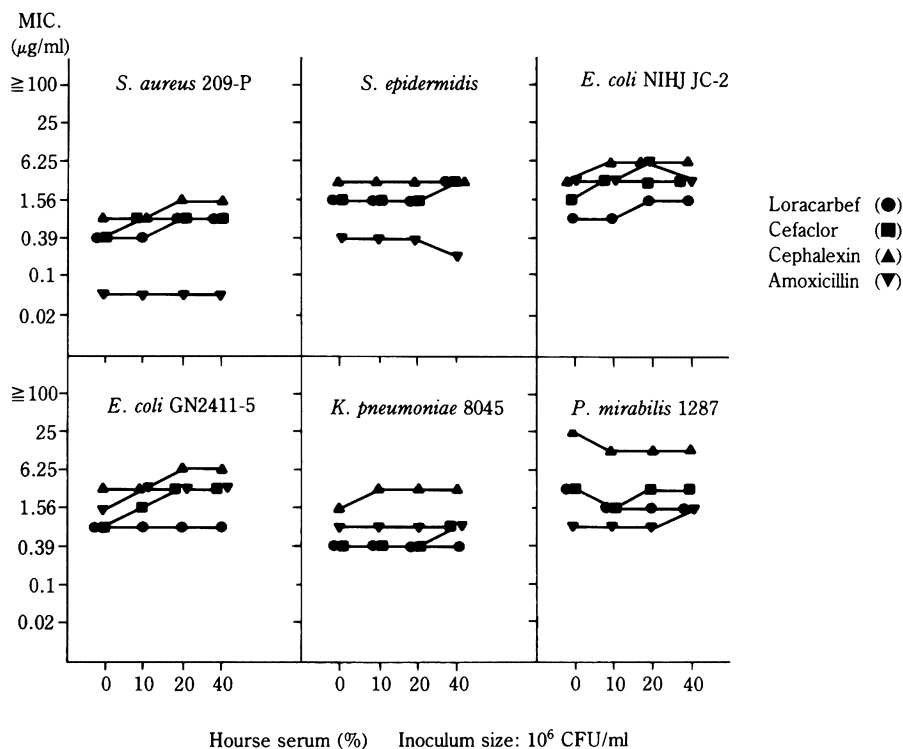
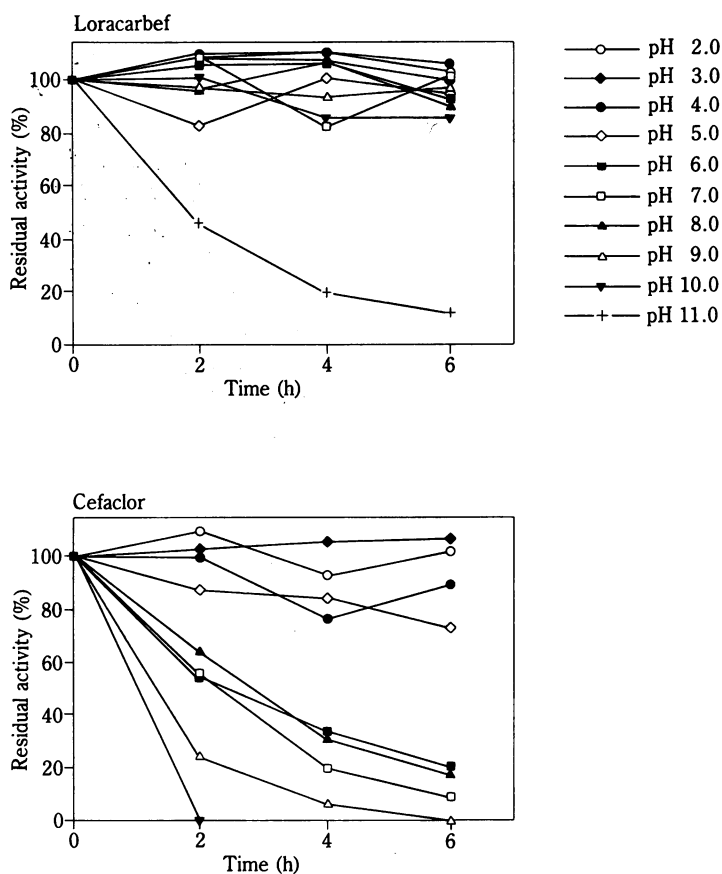


Fig. 5. Effect of horse serum on antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics.



Buffer: pH 2.0 ~ 5.0 1N HCl-1M CH₃COONa
 pH 6.0 ~ 8.0 M/5 Na₂HPO₄-M/10 citric acid
 pH 9.0 ~ 11.0 M/5 Na₂CO₃-M/5 boric acid + M/5 KCl

Fig. 6. Chemical stability of loracarbef and cefaclor in buffer solution at various pH values.

Table 4. Correlation of MICs and MBCs of loracarbef and reference antibiotics against various organisms

Organism	Loracarbef		Cefaclor		Cephalexin		Amoxicillin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> 209-P	0.2	0.39	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39	0.39
<i>S. aureus</i> Smith	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	3.13	0.1	0.2
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>E. coli</i> GN2411-5	0.39	0.78	0.78	1.56	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>K. pneumoniae</i> 8045	0.39	0.39	0.39	0.39	3.13	6.25	0.39	0.78
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.78	1.56	0.78	1.56	12.5	25	0.78	0.78

MIC (μg/ml)

Inoculum size; 10⁴ CFU/ml

Mueller-Hinton broth

ID₅₀値を示した。LCBFのID₅₀($\mu\text{g/ml}$)は、PBP 1A (2.7), PBP 1B(18.6), PBP 2(>50), PBP 3(3.6), PBP 4(2.6), PBP 5/6(>50)となり、PBP 1A, PBP 3, PBP 4には良好な親和性を示しPBP 2, PBP 5/6とは結合しなかった。CCLのPBP_sに対する親和性もPBP 1Bに対する結合がやや強いことを除けばLCBFと同一親和性パターンを示した。

Ⅲ. 考 察

LCBFは新規骨格をもつ新しいタイプの β -ラクタム系抗生物質の開発を目標とした探索研究から誕生した経口抗生物質である。LCBFは従来のセファロスポリン母核のS原子がC原子に置換された構造を有し、世界初のカルバセフェム系 β -ラクタム抗生物質である。LCBFとCCLは7位、3位に同一側鎖をもち相互に対応するカルバセフェムとセフェムの関係にある。セフェム剤の開発の歴史を概観すると、注射用セフェム剤は第1世代から第3世代セフェム剤へと順調に開発が進められ、臨床に広く使用されてきた。一方、経口セフェム剤は注射剤に比べて開発が大幅に遅れ長い間第1世代でとどまっていた。その最大の理由は注射剤は抗

菌力の強化拡大だけが目標であるのに対し経口剤では抗菌力増強以外に経口吸収性を併せ保持しなければならなかったからである。ようやく最近になって第2, 3世代注射用セフェム剤の特性を有するプロドラッグ型、非プロドラッグ型経口剤が登場するようになってきた。しかしこれらはいずれもグラム陽性菌に対する抗菌力が十分とはいえなかったり経口吸収性もよいとはいえない。LCBFはCCLとほぼ類似の抗菌活性をもつが、経口吸収性の面では優れたbioavailabilityを示すものである。

本稿においては代表的な経口 β -ラクタム系抗生物質であるCCL, CEXおよびAMPCと細菌学的評価および若干の物性について比較検討した。LCBFはCCLとほぼ同じ抗菌スペクトルを有するものと考えられる。菌種別にみるとグラム陽性菌では*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, グラム陰性菌では*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* および*N. gonorrhoeae*に有効であった。インドール陽性*Proteus*属, *C. freundii*, *Enterobacter*属, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*等は無効であった。活性の強

Table 5. Antibacterial activity of loracarbef and reference antibiotics against β -lactamase-producing strains

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	Loracarbef	Cefaclor	Cephalexin	Cephaloridine	Latamoxef	Penicillin G
<i>E. coli</i> S1112 ^a	0.78	3.13	6.25	6.25	0.1	>100
<i>E. coli</i> S1119 ^b	50	100	>100	50	0.39	>100
<i>C. freundii</i> S1256 ^b	100	>100	>100	50	0.1	50
<i>E. coli</i> F4532 ^c	1.56	3.13	12.5	25	0.2	>100
<i>E. coli</i> F4533 ^c	1.56	6.25	6.25	50	0.2	>100
<i>E. coli</i> F4537 ^c	1.56	6.25	12.5	12.5	0.1	>100
<i>K. pneumoniae</i> F3182 ^c	6.25	50	12.5	>100	0.1	>100

a: penicillinase-producing strain (PCase type I)

b: cephalosporinase-producing strain (Case)

c: clinical isolate

Table 6. Stability of loracarbef and reference antibiotics to β -lactamase

Source of enzyme	Relative hydrolysis ^d (%)					
	Loracarbef	Cefaclor	Cephalexin	Cephaloridine	Latamoxef	Penicillin G
<i>E. coli</i> S1112 ^a	<0.1	28.6	<0.1	100	7.8	120.4
<i>E. coli</i> S1119 ^b	30.7	8.9	14.0	100	<0.1	57.6
<i>C. freundii</i> S1256 ^b	68.8	50.5	35.7	100	5.2	36.9
<i>E. coli</i> F4532 ^c	8.8	22.8	<0.1	100	<0.1	145.0
<i>E. coli</i> F4533 ^c	13.8	23.5	1.2	100	<0.1	99.4
<i>E. coli</i> F4537 ^c	8.9	3.6	<0.1	100	<0.1	106.9
<i>K. pneumoniae</i> F3128 ^c	32.0	73.7	<0.1	100	<0.1	99.9

a: penicillinase producing strain

b: cephalosporinase producing strain

c: clinical isolate

d: Hydrolysis of each substrate is expressed as relative rate of hydrolysis taking the absolute rate of cephaloridine hydrolysis as 100.

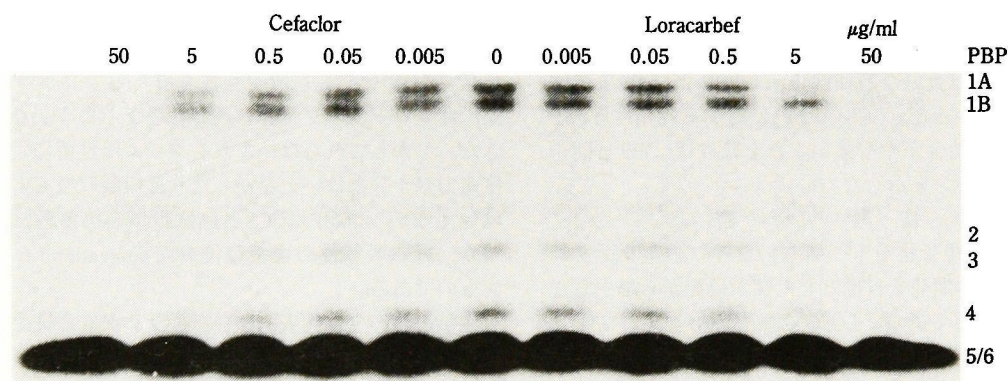


Fig. 7. Fluorography showing competition of loracarbef and cefaclor for [^{14}C] benzylpenicillin-binding to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2.

Table 7. Affinity of KT3777 and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2

Antibiotic	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)						MIC ($\mu\text{g/ml}$)
	1A	1B	2	3	4	5/6	
Loracarbef	2.7	18.6	>50	3.6	2.6	>50	0.78
Cefaclor	5.9	9.8	29.5	2.5	7.2	>50	0.78

この点では *E. coli*, *K. pneumoniae* の臨床分離株に対し、LCBFがCCLより明らかに強い抗菌力が認められ、抗菌力の面でみられたLCBFの特徴である。特にABPC耐性の *E. coli* に対してはLCBFはCEXどころかCCLよりも強活性を示す。LCBFの *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* などの菌種に対する抗菌力は、培地の種類、培地pH、ウマ血清添加、接種菌量などの影響を余り受けず、変動の程度は対照剤と同じであった。接種菌量については対照剤と同じく高菌量でMIC値の上昇がみられた。また、LCBFの殺菌作用は *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* に対してMBCとMICの乖離は2倍以内でMIC濃度付近で殺菌的に作用した。LCBFの β -lactamaseの水解酵素に対する分解率をCERを基準として検討したところ、LCBFはいずれの β -lactamase産生臨床分離株に対してCERより全株ともより安定であった。CCLと比べても分解率の小さい株があり、PCase型の β -lactamase産生菌にはCCLより安定であることが推察された。Jones RNはLY163892(KT3777)がplasmid-mediated β -lactamase(TEM-1)に対してCCLより安定であることを報告している⁹⁾。抗菌作用を発揮するためのtarget enzymeであるPBPs親和性において、LCBFは *E. coli* の主要PBP 1A, 1B, 3にCCLと同

程度の親和性を示した。種々のpHを示す緩衝液中での安定性を検討したところ、37℃、6時間反応後CCLはpH2.0~3.0ではほぼ100%の残存力価を示し、pHが上昇するに従い残存力価が低下しpH5.0では73.7%、pH7.0では20%以下、pH9.0以上では残存力価が認められなかった。CCLのpH安定性に関してはFoglesong MA等も中性、アルカリ性では不安定であることを報告している¹⁰⁾。一方、LCBFはpH2.0~9.0まで残存力価はほぼ100%を示し、pH10.0では86.5%、pH11.0では13.0%を示し、CCLと比べLCBFは極めてpH安定性に優れていた。これはカルバセフェムの大きな特徴であると考えられる。

LCBFは抗菌スペクトルこそ従来の第1世代セフェムにとどまるが、本稿で示した β -lactamase安定性、著しいpH安定性などカルバセフェムの母核に基づく独特の特徴を示し、かつ優れたbioavailabilityを有することからグラム陽性菌、陰性菌に起因する各種感染症に対して経口投与で高い有効性を発揮することが期待される。

文 献

- 1) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司, 村上和久: Cefaclorのin vitro抗菌作用. Chemotherapy 27: 71~97, 1979

- 2) Sato K, Okachi R, Mochida K and Hirata T: KT3777(LY163892), a new orally active carbacephem antibiotic: antibacterial activity and pharmacokinetics in animals. 27th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, No.1203, p.307, New York, 1987
- 3) Sato K, Okachi R, Matsukuma I, Mochida K and Hirata T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of KT3777, a new orally active carbacephem. J Antibiotics 42: 1844 ~ 1853, 1989
- 4) Hirata T, Matsukuma I, Mochida K and Sato K: KT3777 (LY163892), a new oral carbacephem antibiotic; Synthesis and chemistry. 27th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, No.1187, p.304, New York, 1987
- 5) Matsukuma I, Yoshiie S, Mochida K, Hashimoto Y, Sato K, Okachi R and Hirata T: Synthesis and biological evaluation of 3-chloro-1-carbacephem compounds. Chem Pharm Bull 37: 1239~1244, 1989
- 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) 沢井哲夫, 高橋郁子： β -ラクタマーゼ活性測定法とその応用。蛋白質・核酸・酵素 23: 391 ~400, 1978
- 8) Spratt B G: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. Eur J Biochem 72: 341~352, 1977
- 9) Jones R N and Barryand A L: Beta-lactamase hydrolysis and inhibition studies of the new 1-carbacephem LY163892. Eur J Clin Microbiol 6: 570~571, 1987
- 10) Foglesong M A, Lamb J W and Dietz J V : Stability and blood level determinations of cefaclor, a new oral cephalosporin antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 13: 49~52, 1978

In vitro antibacterial activity of loracarbef,
a new oral carbacephem antibiotic

Kiyoshi Sato, Hiroko Yoshitake and Kinya Yamashita
Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
1188 Shimotogari, Nagaizumicho, Suntogun, Shizuoka 411, Japan

Loracarbef (LCBF) is a novel carbacephem antibiotic structurally identical to cefaclor (CCL) except that the sulfur atom of position 1 of the cephem nucleus has been replaced by carbon. Its chemical name is (+)-(6*R*,7*S*)-7-[(*R*)-2-amino-2-phenylacetamido]-3-chloro-8-oxo-1-azabicyclo [4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate. LCBF was investigated for its *in vitro* antibacterial activities in comparison with CCL, cephalixin (CEX) and amoxicillin. The MIC₅₀ of LCBF ranged from 0.2 to 1.56 µg/ml for clinically isolated *Staphylococcus aureus*, streptococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoeae*. LCBF possessed an antibacterial spectrum and potency similar to that of CCL. However, against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, LCBF was about twice as active as CCL. LCBF was more active than CEX against all strains of clinical isolates tested. LCBF was not affected by several media, medium pH, addition of horse serum into medium, or inoculum size in the expression of antibacterial activity. MBC of LCBF against most of the strains tested were equal to or only twice as high as the bactericidal activity of the drug. LCBF had potent antibacterial activity comparable to or greater than CCL against β-lactamase-producing strains, especially to penicillinase. LCBF showed good affinity for penicillin-binding proteins 1A, 1Bs, 3 and 4 of *E. coli* NIHJ JC-2. Moreover, LCBF showed remarkable stability in solution compared with CCL. The results showed that LCBF is similar to CCL in chemical structure, antibacterial activity and mode of action, but is significantly more stable in solution than CCL.