

経口カルバセフェム剤loracarbefのin vivo 抗菌作用

山下錦也・清水牧子・望月治美・佐藤 清

協和醸酵工業株式会社医薬研究所*

新しい経口カルバセフェム剤loracarbef(LCBF)のin vivo 抗菌作用について、マウスおよびラットを用いて各種感染症モデルを作製し、対照薬としてceftiofur(CCL), cephalixin, cefixime, ceftiofur pivoxilを用い感染治療効果を比較検討した。

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*および*Klebsiella pneumoniae*のマウス腹腔内感染症に対して、LCBFは良好な治療効果を示しCCLとほぼ同程度であった。特筆すべきこととしてLCBFは*S. aureus*および*K. pneumoniae*に対して第3世代セフェムの経口剤よりも優れた治療効果を示す場合がみられた。

Cyclophosphamide投与による白血球減少マウスを用いた腹腔内感染症においても、LCBFはCCLと同等の良好な治療効果を示した。

S. aureus, *E. coli*および*K. pneumoniae*を用いたラット腹腔内感染症において、LCBFは5株中3株で同等、2株ではCCLより著明に優れた治療効果を示した。

*K. pneumoniae*によるマウス呼吸器感染症、ならびに*E. coli*による尿路感染症に対してもLCBFはCCLに匹敵する治療効果を示した。

Key words : loracarbef, カルバセフェム, 感染治療試験

Loracarbef(LCBF)は協和醸酵工業(株)で創製された新経口カルバセフェム剤で、化学名を(+)-(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と称する。LCBFはセファロsporin母核の1位の硫黄が炭素に置き換わったカルバセフェム核を有する新規骨格のβ-lactam抗生物質である。LCBFは3位と7位にceftiofur(CCL)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¹⁾。

今回、我々はマウスおよびラットを用いて種々の実験感染症モデルにおける治療効果を検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

LCBFはlot DPD11927(944 μg/ml力価)を用いた。CCL(塩野義製薬), cephalixin (CEX, 塩野義製薬), cefixime (CFIX, 藤沢薬品), ceftiofur pivoxil (CFTM-PI, 富山化学)は市販製剤を使用した。

2. 使用菌株

当研究所保存の標準株および臨床分離株を使用し

た。

3. 実験動物

マウスはddY系雄マウス(4週齢, 19~21g, 日本エスエルシー)を1群10匹で用いた。また、呼吸器感染症モデルについてはICR系雄マウス(4週齢, 18~20g, 日本エスエルシー)を、尿路感染症モデルについてはICR系雌マウス(4週齢, 18~20g, 日本エスエルシー)を各々1群5匹で用いた。ラットはWistar系雄ラット(5週齢, 110~130g, 日本エスエルシー)を1群10匹で用いた。

4. 白血球減少症マウスの作製

Cyclophosphamide (CPA, 塩野義製薬)の200mg/kgを感染実験を実施する4日前に腹腔内に投与した。この前処置マウスは感染に対する生体防御能が低下することが報告されている²⁾。

5. 実験感染動物の作製および治療方法

1) マウス全身感染症

試験菌株をBrain Heart Infusion broth (BHI, Difco Labs.)培地にて37℃, 17時間振盪培養し、その培養液5mlを新しいBHI培地50mlに加えてさらに37℃, 4時間振盪培養した。ただし、*Streptococcus pyogenes* S23の培養にはTrypto-Soya broth(TSB, ニッスイ)を用いた。

*〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188

この培養液を滅菌生理食塩水で所定の菌濃度に希釈し、等量の10% mucin (Bacto Mucin Bacteriological, Difco Labs.)と混合したものを感染菌液とし、マウス腹腔内に0.5ml接種した。薬剤は0.3% sodium carboxymethyl celluloseに溶解または懸濁し、菌接種1, 3, 5時間後の3回経口投与針を用いて経口投与した。

2) マウス呼吸器感染症

臨床分離の*K. pneumoniae* F3740を試験菌としてBHI培地を用いて培養した後、遠心分離により集菌し、滅菌生理食塩水に再浮遊する。この菌液を超音波噴霧器を用いて30分間マウスに噴霧し呼吸器感染を惹起する³⁾。薬剤は感染後18, 21, 24時間の3回に分けて経口投与した。

3) マウス尿路感染症

マウス全身感染症の場合と同様の方法で前培養を行い、滅菌生理食塩水で希釈して感染菌液を調製した。マウスは菌接種1日前から絶水し、菌接種直前に排尿させ、感染菌液50 μ lを外尿道から接種し直ちに小型クリップで外尿道を閉塞し1時間後に解除した。薬剤はマウス全身感染症と同様に菌接種1, 3, 5時間後の3回経口投与した。

4) ラット全身感染症

前述のマウス全身感染症と同一の方法により、調製

した菌液1.0mlをラット腹腔内に接種し、1時間後に1回、各薬剤を経口投与した。

いずれの感染症モデルにおいても接種菌液を適宜希釈し、寒天培地との混釈平板を作製し、37 $^{\circ}$ C、18時間培養後のコロニー数から接種菌量を求めCFU/animalで示した。

6. 感染治療効果の判定

マウスおよびラットの全身感染症では菌接種後7日間生死を観察し、7日後の生存率からLitchfield-Wilcoxon法によりED₅₀(mg/kg)値を求めた。呼吸器感染症モデルでは3回目の投薬21時間後にマウスを放血死させ胸部切開により肺を摘出し重量を測定後、滅菌生理食塩水2mlを加えてホモゲナイズしたのち、滅菌ガーゼで濾過してスパイラルシステム⁴⁾により肺内の生菌数を測定した。尿路感染症モデルでは感染24時間後にマウスの両腎を摘出し呼吸器感染モデルと同様に腎内生菌数を測定した。

II. 実験結果

1. マウス全身感染症に対する治療効果

1) 正常マウスを用いた感染治療効果

Staphylococcus aureus Smith, *E. coli* GN2411-5, *K. pneumoniae* #8045に対するLCBFの治療効果を対照薬剤と比較した(Table 1)。

Table 1. Therapeutic effect of loracarbef and other antibiotics against experimental systemic infection in normal mice

Organism challenge dose	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith 1.26 $\times 10^5$ CFU/mouse	loracarbef	0.78	0.012 (0.008~0.017)
	cefaclor	0.78	0.013 (0.009~0.018)
	cephalexin	1.56	0.017 (0.008~0.038)
	cefixime	25	>120
	cefteram pivoxil	3.13	60.0 (37.5~96.1)
<i>Escherichia coli</i> GN2411-5 2.18 $\times 10^4$ CFU/mouse	loracarbef	0.39	19.34 (9.30~40.19)
	cefaclor	0.78	7.08 (3.72~13.47)
	cephalexin	3.13	60.0 (30.86~116.64)
	cefixime	0.1	3.60 (2.41~5.37)
	cefteram pivoxil	0.01	2.39 (1.35~4.25)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> #8045 7.50 $\times 10^3$ CFU/mouse	loracarbef	0.39	2.56 (1.73~3.77)
	cefaclor	0.39	2.40 (1.38~4.16)
	cephalexin	3.13	22.79 (17.15~30.29)
	cefixime	0.05	1.57 (0.98~2.52)
	cefteram pivoxil	0.1	8.41 (5.67~12.46)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> F3640 1.75 $\times 10^6$ CFU/mouse	loracarbef	0.78	4.22 (2.54~7.01)
	cefixime	0.39	5.74 (2.96~11.12)
	cefteram pivoxil	3.13	>48

Mouse: ddY, \uparrow , 20 \pm 1 g, n=10 Therapy: 0.2 ml/mouse p.o., 1, 3, 5 h after infection
Drug: 0.3% CMC-Na suspension Infection: 0.5 ml/mouse i.p. with 5% mucin

S. aureus Smithに対してLCBFは優れた治療効果を示しCCL, CEXとほぼ同程度であった。これに対してCFIXおよびCFTM-PIの効果は弱いあるいは無効であった。

E. coli GN2411-5に対するLCBFの効果はCEXより優れていたが, CCL, CFIX, CFTM-PIと比較すると弱かった。

K. pneumoniae #8045に対するLCBFの効果はCFIXには若干劣るもののCCLと同等でCEX, CFTM-PIより優れていた。さらに, 臨床分離株の*K. pneumoniae* F3640に対するLCBFの効果はCFIX, CFTM-PIと比較すると, LCBFはCFIXと同等の治療効果を示し, CFTM-PIの治療効果より10倍以上優っていた。

2) 白血球減少症マウスを用いた感染治療効果

免疫機能低下マウスを用いることにより, 正常マウスの場合よりも少ない接種菌量で感染が成立した。この系を用いて4種類の試験菌に対するLCBFの感染治療効果を検討した(Table 2)。

S. aureus Smith, *S. pyogenes* S23に対するLCBFの効果はCCLと同等で, CEX, CFIXおよびCFTM-PIよりも優れていた。

E. coli GN2411-5に対するLCBFの効果はCEXより優れており, CCL, CFTM-PIと同等で, CFIXよりは弱かった。

K. pneumoniae #8045に対するLCBFの効果はCFIXよりも劣っているが, CCLとほぼ同等でCEX, CFTM-PIより優れていた。

2. マウス呼吸器感染症に対する治療効果

K. pneumoniae F3740を用いた呼吸器感染症モデルに対するLCBFの治療効果をCCL, CEXと比較検討した(Fig. 1)。LCBF, CCLはともに薬剤投与量に応じた肺内生菌数の減少が認められ治療効果を示したが, 両薬剤間に差は認められなかった。また, CEXは薬剤投与量に応じた肺内生菌数の減少が認められず, 他の2剤に比べ効果は弱いものであった。

3. マウス尿路感染症に対する治療効果

E. coli GN2411-5を用いた上行性尿路感染症モデルに対するLCBFの治療効果をCCLと比較した(Fig. 2)。菌感染後の腎内生菌数は, 薬剤無処置群では 1.38×10^6 CFU/kidneyであるが, これに対してLCBFの投与群では, 5mg/kgでも腎内生菌数は無処置群の1/100以下に減少した。また, LCBFとCCLの治療効果に大

Table 2. Therapeutic effect of loracarbef and other antibiotics against experimental infection in cyclophosphamide-treated mice

Organism challenge dose	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith 4.88×10^3 CFU/mouse	loracarbef	0.78	3.68 (2.18~6.10)
	cefaclor	0.78	3.41 (1.96~5.72)
	cephalexin	1.56	9.39 (5.71~17.13)
	cefixime	25	>120
	cefteram pivoxil	3.13	>120
<i>Streptococcus pyogenes</i> S23 1.91×10^5 CFU/mouse	loracarbef	0.2	6.14 (3.89~9.70)
	cefaclor	0.1	5.79 (3.03~11.07)
	cephalexin	0.39	18.23 (13.72~24.23)
	cefixime	0.2	16.97 (11.30~25.50)
	cefteram pivoxil	0.01	18.23 (13.72~24.23)
<i>Escherichia coli</i> GN2411-5 2.53×10^2 CFU/mouse	loracarbef	0.39	6.04 (4.41~8.35)
	cefaclor	0.78	7.54 (5.15~11.14)
	cephalexin	3.13	58.63 (39.82~98.46)
	cefixime	0.1	2.69 (1.88~3.90)
	cefteram pivoxil	0.01	5.69 (4.36~7.40)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> #8045 9.03×10^2 CFU/mouse	loracarbef	0.39	3.73 (2.65~5.09)
	cefaclor	0.39	2.29 (1.52~3.05)
	cephalexin	3.13	22.76 (17.43~29.62)
	cefixime	0.05	1.62 (1.21~2.14)
	cefteram pivoxil	0.1	7.84 (5.90~10.46)

Mouse: ddY, ♂, 20 ± 1 g, n=10, 200 mg/kg i.p. of cyclophosphamide before 4 days of infection

Therapy: 0.2 ml/mouse p.o., 1, 3, 5 h after infection

Drug: 0.3% CMC-Na suspension Infection: 0.5 ml/mouse i.p. with 5% mucin

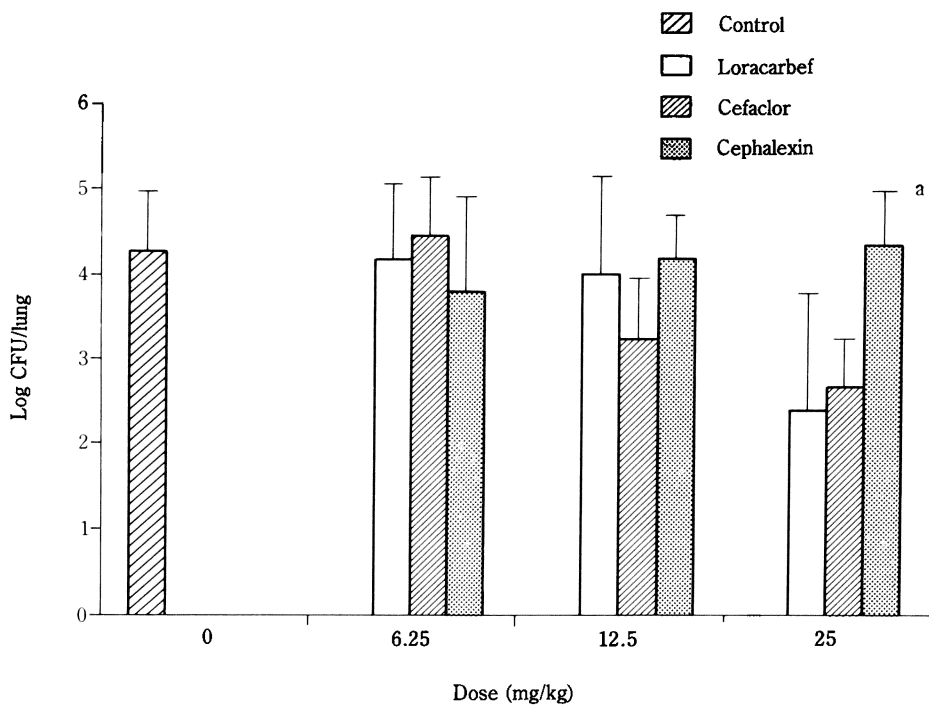


Fig. 1. Protective effect of loracarbef, cefaclor and cephalixin against respiratory tract infection caused by *Klebsiella pneumoniae* F3740 in mice (N=10, a = Mean ± SD).

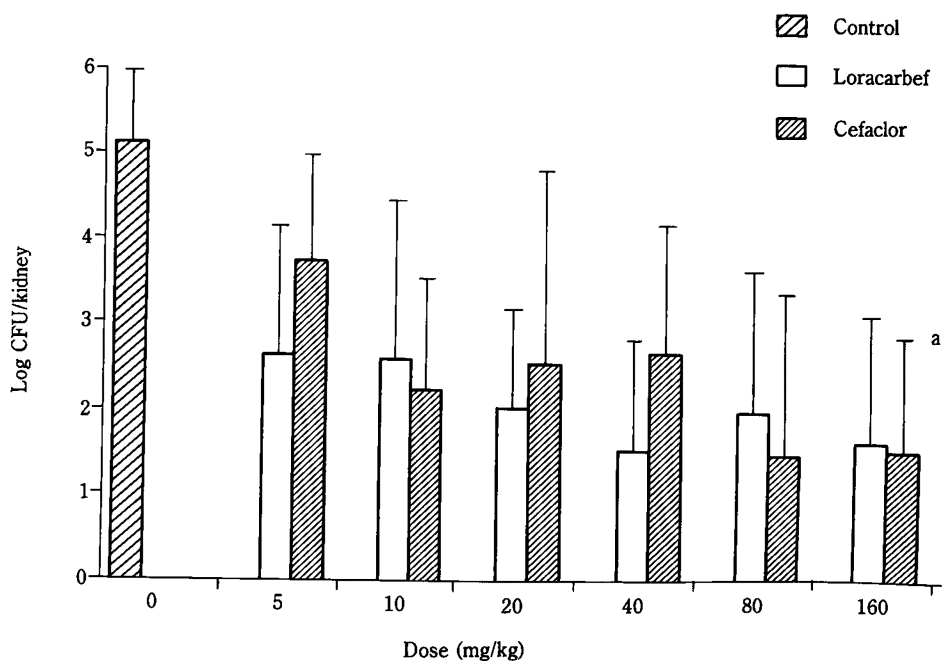


Fig. 2. Protective effect of loracarbef, cefaclor and cephalixin against urinary tract infection caused by *Escherichia coli* GN2411-5 in mice (N=10, a = Mean ± SD).

差はなく同様な腎内生菌数の推移を示した。

4. ラット全身感染症に対する治療効果

S. aureus Smithに対してはLCBFはCCLとともに優れた治療効果を示したが両者間に差は認められなかった。また、CFIX, CFTM-PIは効果を示さなかった (Table 3)。

E. coli GN2411-5に対するLCBFの効果はCCLと同等で、CFIX, CFTM-PIよりも若干劣っていた。しかし、臨床分離のampicillin (ABPC)耐性大腸菌*E. coli* F4540, F4533を用いた場合はLCBFはCFIXには劣るもののCFTM-PIと同等で、CCLよりも著明に優れた治療効果を示した。

K. pneumoniae #8045に対するLCBFの治療効果はCFIXには劣り、CCLと同等で、CFTM-PIよりも優れていた。

Ⅲ. 考 察

LCBFは新経口カルバセフェム剤で、その構造はCCLに類似し、*in vitro*抗菌力もCCLに匹敵する活性を示す^{5,6)}。今回我々はLCBFの*in vivo*効果を評価する目

的でCCL, CFIX, CEX, CFTM-PIを対照薬としてマウス, ラットを用いて検討した。

*S. aureus*に対してLCBFはマウス, ラットのどの実験系においてもCCLと同等の優れた治療効果を示した。一方、CFIX, CFTM-PIの効果は弱いものであった。

*E. coli*に対するLCBFの治療効果はCFIX, CFTM-PIより劣り、CCLと同等か若干劣るものであった。しかし、ラットを用いて検討した臨床分離のABPC耐性*E. coli*に対する治療効果ではLCBFはCCLよりも著明に優れ、CFTM-PIに匹敵する成績であった。

*K. pneumoniae*に対するLCBFの治療効果はCCLと同等でCFIXよりも若干劣る値を示し、CFTM-PIよりは優れた成績を示した。

近年、抗生物質の基礎評価をより臨床に近づけるために局所感染症モデルによる検討が多く行われるようになった。そこで、今回の実験では尿路感染症モデルと呼吸器感染症モデルについて、それぞれ*E. coli* GN2411-5, *K. pneumoniae* F3740を用いて検討した。

Table 3. Therapeutic effect of loracarbef and other antibiotics against experimental infection in rats

Organism	Challenge cells (CFU/rat)	Drug	MIC (μg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	2.73 × 10 ⁷	loracarbef	0.78	0.094 (0.065 ~ 0.137)
		cefaclor	0.78	0.066 (0.041 ~ 0.107)
		cefixime	25	>20
		cefteram pivoxil	3.13	>20
<i>Escherichia coli</i> GN2411-5	9.05 × 10 ⁵	loracarbef	0.39	5.18 (4.31 ~ 6.23)
		cefaclor	0.78	5.68 (4.87 ~ 6.63)
	9.45 × 10 ⁵	cefixime	0.1	2.48 (1.71 ~ 3.61)
		cefteram pivoxil	0.01	2.28 (1.57 ~ 3.32)
<i>Escherichia coli</i> F4540*	2.98 × 10 ⁵	loracarbef	0.78	10.3 (7.57 ~ 14.0)
		cefaclor	3.13	20.0 (14.7 ~ 27.2)
	2.62 × 10 ⁵	cefixime	0.2	3.04 (2.29 ~ 4.04)
		cefteram pivoxil	0.2	13.0 (10.5 ~ 16.1)
<i>Escherichia coli</i> F4533*	2.90 × 10 ⁵	loracarbef	1.56	19.8 (15.5 ~ 25.3)
		cefaclor	3.13	46.5 (36.5 ~ 59.2)
	2.30 × 10 ⁵	cefixime	0.2	3.07 (1.98 ~ 4.75)
		cefteram pivoxil	0.2	15.5 (11.4 ~ 21.0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> #8045	1.35 × 10 ⁵	loracarbef	0.39	4.11 (3.03 ~ 5.60)
		cefaclor	0.39	3.01 (2.28 ~ 3.99)
	2.05 × 10 ⁵	cefixime	0.05	0.50 (0.33 ~ 0.76)
		cefteram pivoxil	0.1	8.18 (5.85 ~ 11.4)

Rat: Wistar, ♂, 120 ± 10 g, n=10

Therapy: 0.5 ml/rat p.o., 1 h after infection

Drug: 0.3% CMC-Na suspension Infection: 1.0 ml/rat i.p. with 5% mucin

*: Clinical isolates of ampicillin-resistant *E. coli*

この二つの感染症モデルにおいてLCBFはCCLと同程度の治療効果を示し、その有効性が認められた。

マウスでのLCBFの体内動態はCCLとほとんど同様な推移を示すことが報告⁷⁾されている。したがって、マウスでのLCBFの*in vivo*効果はCCLと同程度の治療効果を示したと考えられる。一方、ラットではLCBFの体内動態はCCLを上回る成績を示すことが報告⁷⁾されている。ラットを用いた実験の中で、臨床分離の大腸菌にLCBFがCCLよりも明らかに優れた治療効果を示したことは一つには体内動態に起因していると考えられる。

抗生物質の体内動態に関しては動物種による差があることは周知の通りであるが、LCBFにもその傾向はみられる。各種実験動物を用いて体内動態をCCLと比較すると、LCBFはマウスではCCLと差はないがラット、イヌおよびサルではCCLより優れたbioavailabilityを示す⁷⁾。ヒトにおける体内動態についてもCCLと比べ優れた成績が既に報告⁸⁾されており、LCBFの臨床での有用性が期待できると考えられる。

文 献

- 1) Hirata T, Matsukuma I, Mochida K and Sato K: KT3777 (LY163892), a new oral carbacephem antibiotic, synthesis and chemistry. Program and Abstracts of the 27th Intersci Conf on Antimicrob Agents Chemother, Abst. No1187, New York, Oct. 4~7, 1987
- 2) 横田好子：実験的免疫機能低下宿主の感染防御機構と免疫賦活剤による修復。日本細菌学雑誌39: 29~45, 1984
- 3) Nishi T and Tsuchiya K: Experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice: Chemotherapy with kanamycin. Antimicrob Agents Chemother 17: 494~505, 1980
- 4) Jarvis B, Lach V H and Wood J M: Evaluation of the spiral plate maker of the enumeration of micro-organisms in foods. J Appl Bacteriol 43: 149~157, 1977
- 5) Howard A J and Dunkin K T: Comparative *In vitro* activity of a new oral carbacephem, LY163892. J Antimicrob Chemother 22: 445~456, 1988
- 6) Cynthia C K and John A W: *In vitro* activities of LY163892, cefaclor, and cefuroxime. Antimicrob Agents Chemother 32: 131~133, 1988
- 7) 山下錦也, 上野素子, 佐藤 清：経口カルバセフェム剤loracarbefの各種動物における体内動態。Chemotherapy 41(S-3): 97~106, 1993
- 8) 柴 孝也：KT3777の臨床第I相試験。新薬シンポジウム, p.88, 第40回日本化学療法学会西日本支部総会, December, 1992, 岡山

In vivo antibacterial activity of loracarbef, a new oral carbacephem

Kinya Yamashita, Makiko Shimizu, Harumi Motizuki and Kiyoshi Sato

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,

1188 Shimotogari, Nagaizumicho, Suntogun, Shizuoka 411, Japan

The therapeutic efficacy of loracarbef (LCBF) was compared with that of cefaclor (CCL), cephalixin (CEX), cefixime (CFIX) and ceftam pivoxil (CFTM-PI) against experimental infections in mice and rats.

1) LCBF was as effective as CCL and more effective than CFIX and CFTM-PI against *Staphylococcus aureus* systemic infections in mice and rats.

2) LCBF was similar to or less effective than CCL against mouse and rat systemic infections with *Escherichia coli* GN2411-5, but LCBF was more effective than CCL against rat systemic infections with the clinical isolates of *E. coli*.

3) The therapeutic efficacy of LCBF was comparable to that of CCL and inferior to that of CFIX but superior to that of CFTM-PI against *Klebsiella pneumoniae* infection in mice.

4) The therapeutic efficacy of LCBF against experimental respiratory tract infection caused by *K. pneumoniae* and urinary tract infection caused by *E. coli* in mice was comparable to that of CCL.

5) The therapeutic efficacy of LCBF against experimental infections caused by various organisms in immunosuppressed mice was comparable to that of CCL.