

## 新セフェム系抗生物質 cefozopran のマウス実験感染モデルにおける治療効果

飯沢 祐史・土 森 登・小此木研二・山崎 俊幸・今 田 哲

武田薬品工業株式会社創薬第三研究所\*

新セフェム系抗生物質 cefozopran の実験的マウス感染モデルにおける治療効果を調べた。*Klebsiella pneumoniae* DT-S による急性呼吸器感染症に対して cefozopran は ceftazidime (CAZ), ceftazidime および cefpirome (CPR) と同等で cefpiramide より優れた治療効果を示した。*K. pneumoniae* 27 による慢性呼吸器感染症に対しても cefozopran は CAZ と同等の効果を示した。また *Pseudomonas aeruginosa* P9 による尿路感染症に対して cefozopran は CAZ および cefclididn と同等で CPR より優れた効果を示した。さらに *P. aeruginosa* P9 と *Enterococcus faecalis* TN2005 の尿路混合感染症に対して CAZ および ampicillin はいずれか一方の菌にのみ活性を示したが<sup>3</sup>, cefozopran は両菌を排除した。またメチシリン感受性 *Staphylococcus aureus* 308A-1 およびメチシリン耐性 *S. aureus* N133 による筋肉感染症に対して cefozopran は flomoxef と同等で CAZ より優れた治療効果を示した。さらに好中球減少マウスでの *P. aeruginosa* P9 筋肉感染症に対して cefozopran は CAZ および CPR より有意に優れた効果を示した。以上の結果から, cefozopran が様々なマウス実験感染モデルで優れた治療効果を有することが示された。このことから, cefozopran が臨床における様々な菌による呼吸器, 尿路および軟部組織感染症に対して有効であることが示唆された。

**Key words:** cefozopran, 実験感染モデル, 治療効果, マウス

新規セフェム系抗生物質 cefozopran, (–)-1-[[[6 R, 7 R)-7-(Z)-2-(5- amino -1,2,4- thiazol-3- yl)-2-methoxyiminoacetamido]-2- carboxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3- yl]methyl]imidazo[1,2-b]pyridazinium hydroxide, inner salt hydrochloride は *in vitro* において優れた抗菌活性を示すこと<sup>1,2)</sup>, またマウスでの実験的敗血症に対しても cefozopran は優れた感染防御活性を有することが明らかとなっている<sup>3)</sup>。この cefozopran の *in vivo* での薬効をより詳細に検討することを目的として, マウスを用いた実験感染モデルにおける治療効果を調べた。

実験感染モデルとしては, 当研究室で確立された *Klebsiella pneumoniae* による急性<sup>3)</sup>および慢性<sup>4)</sup>呼吸器感染症, *Pseudomonas aeruginosa* による尿路感染症<sup>5)</sup>, *P. aeruginosa* と *Enterococcus faecalis* による尿路混合感染症, *Staphylococcus aureus* および *P. aeruginosa* による筋肉感染症を用い, これらの実験感染症に対する cefozopran の治療効果を既知  $\beta$ -lactam 薬のそれと比較した。

### I. 材料と方法

#### 1. 薬剤

Cefozopran, ceftazidime (CZON), cefpirome (CPR) および cefclididn (CFCL) は武田薬品工業株式会社で合

成した標品を, ampicillin (ABPC, 936  $\mu$ g/mg, 明治製薬), ceftazidime (CAZ, 839  $\mu$ g/mg, 日本グラクソ), cefpiramide (CPM, 930  $\mu$ g/mg, 住友製薬), flomoxef (FMOX, 938  $\mu$ g/mg, 塩野義製薬) は市販品を用いた。

#### 2. 菌株

実験室で継代保存している *S. aureus* 308A-1, *S. aureus* N133, *E. faecalis* TN2005, *K. pneumoniae* DT-S, *K. pneumoniae* 27 および *P. aeruginosa* P9 を用いた。日本化学療法学会標準法に準じて測定したこれらの菌株に対する使用薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) についてはそれぞれの結果の項で記載した。

#### 3. 動物

Slc : ICR マウス, 雄, 4 週齢 (日本エスエルシー株式会社), および CBA/J マウス, 雌, 5 週齢 (日本チャールズリバー株式会社) を用いた。マウスを鈍屑を床敷とした金属性ケージに収容し, 24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 湿度 50 $\pm$ 5%, 人工照明 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) の環境下で固形飼料 (繁殖用 CA-1, 日本クレア株式会社) および水道水を自由に摂取させて飼育した。

## 4. 治療実験

## I. 呼吸器感染モデル

(i) *K. pneumoniae* DT-S による急性呼吸器感染症

*K. pneumoniae* DT-S の $-80^{\circ}\text{C}$ 凍結保存菌液を室温で融解し、Trypticase soy agar (TSA; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) に接種して $37^{\circ}\text{C}$ で1夜培養した。その1白金耳をBrain heart infusion (BHI; Difco Labs., Detroit, Mich.) broth に接種して $37^{\circ}\text{C}$ で1夜培養した菌液を $12,000\times\text{g}$ , 20分間遠心分離し、菌をリン酸塩緩衝食塩水[PBS: Dulbecco's formula (modified) without magnesium and calcium; Flow Labs., U.K.] で1回洗浄後、元の培養菌液の1/2量のPBSに浮遊させたものを感染菌液とした。感染はNishiとTsuchiya<sup>3)</sup>の報告に従い、菌液を入れたネプライザーを約100匹のICRマウスを収容したchamberに装着し、 $1.2\text{ kg}/\text{cm}^2$ の圧力で40分間噴霧した。薬剤はいずれも滅菌蒸留水で所要濃度に溶解した。薬剤投与は噴霧感染20時間後から開始し、朝、夕(9:00, 17:00)の1日2回の皮下投与(0.2 ml)を5日間継続した。薬剤投与終了翌日までのマウス死亡経過を観察すると共に、生残マウスから無菌的に摘出した肺を4 mlの滅菌蒸留水と共にTeflon tissue homogenizerを用いてホモゲナイズし、Trypticase soy broth (TSB; BBL)で適宜希釈した後、その0.1 mlをTSA約10 mlと混合して $37^{\circ}\text{C}$ で1夜培養した。生菌数は培養後の集落数をコロニーカウンター(Biotran II, Automated Colony Counter, New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, N. J.)で数えて算出した。薬剤効果は生残マウス数および肺から感染菌が排除された(10 CFU/肺以下)マウス数をもとに判定し、50%のマウスを生残させるのに必要な投与1回当たりの量( $\text{SD}_{50}$ ; 50% survival dose)および50%のマウスの肺から感染菌を排除するのに必要な投与1回当たりの量( $\text{CD}_{50}$ ; 50% clearance dose)をそれぞれprobit法<sup>6)</sup>で算出した。

(ii) *K. pneumoniae* 27 による慢性呼吸器感染症

*K. pneumoniae* DT-Sと同様にして*K. pneumoniae* 27の感染菌液を作製した。ただしBHI broth 1夜培養菌液の1/8量のPBSに菌体を浮遊させた。感染は先の報告<sup>4)</sup>に従い、ネプライザーに入れた菌液を $1.2\text{ kg}/\text{cm}^2$ の圧力で60分間、CBA/Jマウスに噴霧した。この感染により、感染1週から4週にかけて肺内菌数が $10^6$  CFU前後で推移する慢性感染が成立することが明らかとなっている<sup>4)</sup>。薬剤投与は噴霧感染2週後

から開始し、朝、夕(8:30, 16:30)の1日2回の皮下投与(0.2 ml)を7日間継続した。薬剤投与終了翌日におけるマウス肺内生菌数を*K. pneumoniae* DT-S急性呼吸器感染症の項で記載したと同様にして測定した。薬剤効果は、肺から感染菌が排除された(10 CFU/肺以下)マウス数をもとに判定し、 $\text{CD}_{50}$ をprobit法で算出した。

## II. 尿路感染モデル

(i) *P. aeruginosa* P9 による尿路感染症

*P. aeruginosa* P9の $-80^{\circ}\text{C}$ 凍結保存菌液を室温で融解し、King A broth[2% (w/v) Bacto peptone (Difco), 0.14% (w/v)  $\text{MgCl}_2$ , 1% (w/v)  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1% (w/v) glycerin]に接種して $37^{\circ}\text{C}$ で1夜培養した。培養菌液を $1,600\times\text{g}$ , 10分間遠心分離して得た菌をTSBで2回洗浄後、元の培養菌液の2/5量のTSBに浮遊させた。この浮遊液を600 nmの吸光度が0.06となるようにTSBで希釈したものを感染菌液とした。感染はNishiとTsuchiya<sup>5)</sup>の方法の変法で行った。即ち、CBA/Jマウスをペントバルビタール麻酔(50 mg/kg, 腹腔内投与)下で膀胱部圧迫により強制排尿させた後、先端を切断して丸めた23ゲージの注射針を装着した注射筒を用いて、マウス当たり50  $\mu\text{l}$ の感染菌液を経尿道的に膀胱内へ接種した。直ちにヘアピンを用いて外尿道口を閉塞し、ビニールパイプを加工した保定台上で6時間固定した後、外尿道口の閉塞およびマウスの保定を解除した。薬剤投与は感染3日後から開始し、朝、夕(8:30, 16:30)の1日2回の皮下投与(0.2 ml)を5日間継続した。薬剤投与終了翌日にマウスを頸椎脱臼により致死させ、無菌的に両側の腎臓を摘出し、4 mlのTSBと共にホモゲナイズした。このホモジネート中の生菌数を*K. pneumoniae* DT-Sの項で記載したと同様にして測定した。薬剤効果は腎臓から感染菌が排除された(40 CFU/腎以下)マウス数をもとに判定し、 $\text{CD}_{50}$ をprobit法で算出した。

(ii) *P. aeruginosa* P9と*E. faecalis* TN2005による尿路混合感染症

*P. aeruginosa* P9および*E. faecalis* TN2005の $-80^{\circ}\text{C}$ 凍結保存菌液を室温で融解し、TSBで適宜希釈したものを混合して感染菌液とした。感染方法は前記の*P. aeruginosa* P9単独尿路感染法と同様にマウス当たり50  $\mu\text{l}$ の感染菌液を膀胱内に接種した。感染菌量は両菌共に $1\times 10^4$  CFU/マウスとした。薬剤投与は、感染翌日から8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00および18:00の1日6回の皮下投与(0.2 ml)を3日間継続した。薬剤投与終了翌日に前項と同様に腎臓を摘出し、4 mlのTSBと共にホモゲナイズした。このホ

モジネート中の生菌数を *P. aeruginosa* P9 については NAC (栄研化学) を、また *E. faecalis* TN2005 については SF (栄研化学) 寒天培地を用いて測定した。

### III. 筋肉感染モデル

#### (i) *S. aureus* 308A-1 による筋肉感染症

メチシリン感受性 *S. aureus* 308A-1 の卵培地 (日水製薬株式会社) 保存菌を TSA にて 37°C で 1 夜培養し、その 1 白金耳を BHI broth に接種して 37°C で 1 夜培養したものを感染菌液とした。感染は Selbie と Simon<sup>7)</sup> の方法に準じ、ペントバルビタール麻酔 (62.5 mg/kg, 腹腔内投与) 下で ICR マウスの左大腿四頭筋肉内に感染菌液の 0.1 ml を接種して行った。薬剤は菌接種 2, 18 および 26 時間後の 3 回、0.2 ml を皮下投与した。菌接種 5 日後にマウスを頸椎脱臼により致死させ、無菌的に大腿四頭筋を摘出した。筋肉を 3 ml の TSB と共にホモゲナイズし、ホモジネート中の生菌数を前記と同様にして測定した。薬剤効果は薬剤投与マウスの筋肉内生菌数の対数値が薬剤非投与マウスの筋肉内生菌数の対数値の平均値より 1 以上低下したものを有効と判定し、その有効マウス数をもとに 50% のマウスに有効な治療効果を示す投与 1 回当たりの量 (ED<sub>50</sub>; 50% effective dose) を probit 法で算出した。

#### (ii) *S. aureus* N133 による筋肉感染症

メチシリン耐性 *S. aureus* N133 を *S. aureus* 308A-1 の方法と同様にして ICR マウスの筋肉内に接種し、その 2, 18 および 26 時間後に薬剤を皮下投与した。Cefozopran 投与後の経日的筋肉内生菌数推移を調べると共に、cefazopran と対照薬剤との薬効比較においては菌接種 7 日後に筋肉内生菌数を測定した。薬剤投与マウスの筋肉内生菌数の対数値が薬剤非投与マウスの筋肉内生菌数の対数値の平均値より 2 以上低下した場合を有効と判定し、この有効マウス数をもとに先と同様にして ED<sub>50</sub> を probit 法で算出した。

#### (iii) *P. aeruginosa* P9 による筋肉感染症

*P. aeruginosa* P9 を BHI broth に接種し、37°C で 1 夜培養した菌液を TSB で 50,000 倍に希釈したものを感染菌液とした。4 日前に cyclophosphamide (CY, 塩野義製薬) を 200 mg/kg 腹腔内投与して得た白血球減少 CBA/J マウスに *S. aureus* 308A-1 の時と同様にペントバルビタール麻酔下で感染菌液の 0.1 ml をマウス大腿四頭筋肉内に接種した。薬剤投与は菌接種 2 および 4 時間後、および翌日と翌々日に朝、夕 (8:30, 16:30) の 1 日 2 回の計 6 回行った。菌接種 7 日後までのマウス死亡経過を観察すると共に、7 日後生残マウスから無菌的に筋肉を摘出し、前記と同様にして筋肉内生菌数を測定した。薬剤効果は生残マ

ウス数および筋肉から感染菌が排除された (10<sup>3</sup> CFU/筋肉以下) マウス数をもとに判定し、SD<sub>50</sub> および CD<sub>50</sub> を probit 法で算出した。

### 5. 統計的解析

各感染症に対する cefozopran の SD<sub>50</sub>, CD<sub>50</sub> および ED<sub>50</sub> について、対照薬剤との間で probit 解析を用いた平行線検定法による有意差検定を行った。有意水準は 5% とした。また *P. aeruginosa* と *E. faecalis* の尿路混合感染症では薬剤投与マウスと薬剤非投与マウスの腎臓内生菌数間で Mann-Whitney test による有意差検定を行った。

## II. 結 果

### 1. 呼吸器感染症に対する治療効果

#### (i) *K. pneumoniae* DT-S 急性呼吸器感染症

*K. pneumoniae* DT-S を ICR マウスに 3.4 × 10<sup>8</sup> CFU/肺となるように噴霧すると薬剤非投与マウスは感染 3 日前後で全例死亡した。Cefozopran, CAZ, CZON および CPR ではいずれも 20 mg/kg 投与で大部分のマウスが生残したが、CPM は 80 mg/kg 投与で半数以上のマウスが死亡した (Table 1)。一方、肺から感染菌が完全に排除されたマウス数に関しても、cefazopran, CAZ, CZON および CPR はほぼ同様の傾向を示し、80 mg/kg の投与で大部分のマウスから菌が排除された (Table 1)。CPM では用いた最高投与量の 320 mg/kg においても感染菌を肺から排除することはできなかった。Cefozopran の SD<sub>50</sub> は 13.8 mg/kg であり、CAZ の 9.02 mg/kg, CZON の 10.0 mg/kg および CPR の 7.25 mg/kg とほぼ同等であり、CPM の 116 mg/kg より有意に優れていた。CD<sub>50</sub> も SD<sub>50</sub> と同様の傾向であった。各薬剤の治療効果はそれぞれの MIC 値とほぼ相関した。

#### (ii) *K. pneumoniae* 27 慢性呼吸器感染症

*K. pneumoniae* 27 を CBA/J マウスに 6.0 × 10<sup>5</sup> CFU/肺となるように噴霧したところ、投薬終了翌日、即ち感染 3 週後の薬剤非投与コントロールマウスの肺内生菌数は約 10<sup>6</sup> CFU であった。Cefozopran の 80 mg/kg 投与では全例のマウスから菌が排除されたのに対し、CAZ 投与群は 12 例中 3 例から 10<sup>3</sup> CFU 強の感染菌が回収された。160 mg/kg 投与では両薬剤共全例のマウスで除菌が認められた。両剤について CD<sub>50</sub> を算出すると、cefazopran が 55.2 mg/kg, CAZ が 62.8 mg/kg となりほぼ同等の効果であった (Table 2)。

### 2. 尿路感染症に対する治療効果

#### (i) *P. aeruginosa* P9 尿路感染症

*P. aeruginosa* P9 を CBA/J マウスに 2.5 × 10<sup>6</sup> CFU 膀胱内接種したところ、投薬終了翌日における薬剤非

Table 1. Therapeutic effect of cefozopran and reference compounds against acute respiratory tract infection caused by *K. pneumoniae* DT-S in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Survival <sup>c</sup> rate	SD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	Clearance <sup>e</sup> rate	CD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC ( $\mu$ g/ml)	
Drug	Dose (mg/kg)						
Control		0/10		0/10			
cefazopran	5	0/10		0/10			
	20	8/10	13.8	2/10	29.0	0.05	
	80	10/10	(7.80-23.8)	10/10	(16.8-51.0)		
ceftazidime	5	1/10		0/10			
	20	10/10	9.02	1/10	36.0	0.025	
	80	10/10	(6.69-12.5)	10/10	(26.7-49.9)		
cefuzonam	5	2/10		0/10			
	20	8/10	10.0	0/10	40.0	0.013	
	80	10/10	(5.40-18.6)	10/10	(32.1-49.8)		
cepiramide	20	0/10		0/10			
	80	2/10	116 * <sup>f</sup>	0/10	>320 *	0.2	
	320	10/10	(67-204)	1/10			
	cepirome	5	2/10		1/10		
20		10/10	7.25	5/10	23.6		0.025
80		10/10	(4.21-12.8)	8/10	(10.4-47.9)		
320		10/10		10/10			

<sup>a</sup> Infection was induced as described in the text, and bacterial recovery immediately after infection was  $(3.4 \pm 1.2) \times 10^3$  CFU/lung (mean  $\pm$  SD).

<sup>b</sup> Antibiotics were administered s.c. twice a day for 5 days. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup> Survival rate on day 6 after infection.

<sup>d</sup> SD<sub>50</sub> and CD<sub>50</sub> were calculated from the survival rate and the clearance rate, respectively. Figures in parentheses indicate 95% confidence limits.

<sup>e</sup> Bacterial counts in the lungs were determined on day 6 after infection. Clearance rate is expressed as the number of mice sterilized per total number treated.

<sup>f</sup> Significantly different from the value for cefozopran ( $P < 0.05$ ).

投与コントロールマウスの腎内生菌数は約  $10^5$  CFU であった。各薬剤投与群において、腎臓から感染菌が回収されたマウスの生菌数はいずれもコントロールマウスの生菌数と大きく違わなかったが、腎臓から感染菌が排除されたマウス数については投与量に依存した効果が認められた。このマウス数をもとに算出した各薬剤の CD<sub>50</sub> は、cefazopran が 8.78 mg/kg, CAZ が 14.6 mg/kg, CPR が 40.8 mg/kg, CFCL が 18.4 mg/kg であり、cefazopran の効果は CPR より有意に優れ、CAZ および CFCL と同等であった (Table 3)。

(ii) *P. aeruginosa* P9 と *E. faecalis* TN2005 尿路混合感染症

*P. aeruginosa* P9 と *E. faecalis* TN2005 を共に CBA/J マウスに  $1.0 \times 10^4$  CFU 膀胱内接種したところ、投薬終了翌日における薬剤非投与コントロールマウスの腎内生菌数は *E. faecalis* TN2005, *P. aeruginosa* P9 共に約  $10^6$  CFU であった (Table 4)。Cefazopran の 10 mg/kg の投与によって腎内生菌数は両菌共にコントロールマウスの生菌数より有意に低下した。CAZ は

*P. aeruginosa* P9 の菌数を有意に低下させたが、*E. faecalis* TN2005 に関しては 100 mg/kg の投与によっても有意な菌数低下がみられなかった。一方、ABPC は *E. faecalis* TN2005 の菌数を有意に低下させたが、*P. aeruginosa* P9 の菌数には全く影響を及ぼさなかった。これら 3 剤の *E. faecalis* TN2005 および *P. aeruginosa* P9 に対する MIC は、それぞれ cefazopran が 3.13 および 0.78  $\mu$ g/ml, CAZ が 6.25 および 1.56  $\mu$ g/ml, ABPC が 0.78 および >800  $\mu$ g/ml であった。

### 3. 筋肉感染症に対する治療効果

#### (i) *S. aureus* 308A-1 筋肉感染症

メチシリン感受性 *S. aureus* 308A-1 を ICR マウス筋肉内に  $5.0 \times 10^7$  CFU 接種すると、筋肉内生菌数は少なくとも 5 日間は  $10^6$  CFU で推移した。本感染症の薬剤投与による完治は困難であり、用いた薬剤の最高投与量によっても感染菌は完全には排除されなかった。しかしながら、筋肉内生菌数は薬剤の投与量に依存して減少したため、薬剤非投与マウスの筋肉内生菌数の 90% 以上の菌が排除された場合を有効と判定して各

Table 2. Therapeutic effect of ceftazidime and ceftazidime against chronic respiratory tract infection caused by *K. pneumoniae* 27 in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Clearance <sup>c</sup> rate	CD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC (μg/ml)
Drug	Dose (mg/kg)			
Control		0/10		
	ceftazidime	20		
		40	0/11	55.2
ceftazidime	80	12/12	(48.8-62.9)	
	20	0/12		
	40	1/11	62.8	0.1
	80	9/12	(47.7-82.6)	
	160	11/11		

<sup>a</sup>Infection was induced as described in the text, and bacterial recovery immediately after infection was  $(6.0 \pm 4.4) \times 10^5$  CFU/lung (mean  $\pm$  SD).

<sup>b</sup>Antibiotics were administered s.c. twice a day for 7 days. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup>Bacterial counts in the lungs were determined the day after the final antibiotic treatment. Clearance rate is expressed as the number of mice sterilized per total number treated.

<sup>d</sup>CD<sub>50</sub> was calculated from the clearance rate. Figures in parentheses indicate 95 % confidence limits.

薬剤の治療効果を比較した (Table 5)。Cefozopran の ED<sub>50</sub> は 2.87 mg/kg であり, FMOX の 1.73 mg/kg と同等で CAZ の 56.1 mg/kg より有意に優れた値であった。

#### (ii) *S. aureus* N133 筋肉感染症

メチシリン耐性 *S. aureus* N133 についてもマウス筋肉内に  $1.2 \times 10^8$  CFU を接種して同様の筋肉感染症を作製し, ceftazidime の治療効果を調べた。まず ceftazidime の 200 mg/kg 投与後の筋肉内生菌数推移を調べた (Fig. 1)。Ceftazidime 投与により筋肉内生菌数は感染 5 日後に感染直後の 1/100, 7 日後に 1/10,000 に低下した。10 日後には生菌数はさらに減少したが, この時には薬剤非投与マウスの筋肉内生菌数も若干減少した。このように本感染症では前項の *S. aureus* 308A-1 による筋肉感染症に比べて薬剤投与による菌数減少が顕著であったため, 薬剤非投与マウスの筋肉内生菌数の 99 % 以上の菌が排除された場合を有効と判定した。Ceftazidime の ED<sub>50</sub> は 79.8 mg/kg であり, FMOX の 116 mg/kg と同等で CAZ の 200 mg/kg 以上より有意に優れた値となった (Table 6)。特に, 用いた最高投与量の 200 mg/kg では ceftazidime は最も強い菌数減少活性を示した。

#### (iii) *P. aeruginosa* P9 筋肉感染症

好中球減少マウスの筋肉内に  $8.0 \times 10^2$  CFU (約 20

Table 3. Therapeutic effect of ceftazidime and reference compounds against urinary tract infection caused by *P. aeruginosa* P9 in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Clearance <sup>c</sup> rate	CD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC (μg/ml)
Drug	Dose (mg/kg)			
Control		0/15		
	ceftazidime	1.56		
		6.25	7/15	8.78
ceftazidime	25	11/15	(2.86-21.4)	
	100	12/15		
	1.56	0/10		
	6.25	6/10	14.6	1.56
	25	5/10	(4.85-49.9)	
ceftazidime	1.56	0/10		
	6.25	2/10	40.8 * <sup>e</sup>	6.25
	25	5/10	(16.1-330)	
ceftazidime	1.56	6/10		
	6.25	4/10	18.4	0.78
	25	6/10	(5.48-106)	
ceftazidime	1.56	7/10		
	6.25	7/10		
	100	7/10		

<sup>a</sup>Infection was induced as described in the text.

<sup>b</sup>Antibiotics were administered s.c. twice a day for 5 days. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup>Bacterial counts in the kidneys were determined the day after the final antibiotic treatment. Clearance rate is expressed as the number of mice sterilized per total number treated.

<sup>d</sup>CD<sub>50</sub> was calculated from the clearance rate. Figures in parentheses indicate 95 % confidence limits.

<sup>e</sup>Significantly different from the value for ceftazidime ( $P < 0.05$ ).

LD<sub>50</sub>) の *P. aeruginosa* P9 を接種すると, マウスは感染 3 日後までに全例が死亡した。Ceftazidime の 2 mg/kg 投与では大部分のマウスが生残したが, CAZ および CPR の 2 mg/kg 投与ではほとんどのマウスが死亡した (Table 7)。Ceftazidime の SD<sub>50</sub> は 0.81 mg/kg であり, CAZ の 7.58 mg/kg, CPR の 15.7 mg/kg より有意に優れた値であった。また CAZ および CPR の CD<sub>50</sub> は 200 mg/kg 以上であり, 両剤共に用いた投与量では筋肉内から感染菌を充分に排除できなかったが, ceftazidime は 200 mg/kg の投与で半数のマウスから感染菌を排除した (Table 7)。

### III. 考 察

Ceftazidime は 3 位および 7 位側鎖にそれぞれ imidazo[1,2-*b*]pyridazine 基と 5-amino-1,2,4-thiadiazolyl methoxyimino 基を有する注用セファロスポリンであり, *S. aureus* を含むグラム陽性菌から

Table 4. Therapeutic effect of cefozopran and reference compounds against mixed urinary tract infection caused by *E. faecalis* TN2005 and *P. aeruginosa* P9 in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		No. of bacteria <sup>c</sup>	
Drug	Dose (mg/kg)	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Control		5.94±0.48	6.18±0.50
cefazopran	10	3.90±1.74 * <sup>d</sup>	3.45±2.32 *
	100	3.16±1.57 **	<1.60 ***
ceftazidime	10	4.85±1.30	2.77±2.33 *
	100	4.65±1.99	1.90±2.02 **
ampicillin	10	4.03±1.32 *	6.19±0.55
	100	3.77±0.96 **	5.71±1.19

<sup>a</sup>Infection was induced as described in the text.

<sup>b</sup>Antibiotics were administered s.c. six times a day for 3 days. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup>Bacterial counts in the kidneys were determined the day after the final antibiotic treatment.

<sup>d</sup>Significantly different from the value for control: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

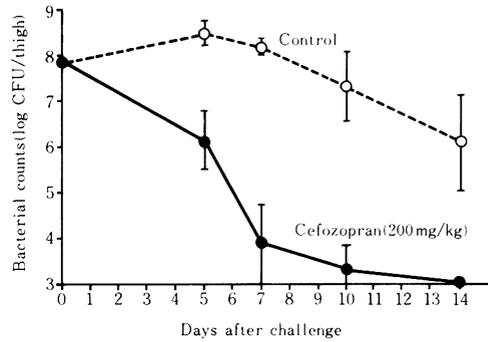


Fig. 1. Kinetics of bacterial count in the thigh muscle of mice challenged intramuscularly with *S. aureus* N133 followed by treatment with antibiotic. Cefozopran (200 mg/kg) was administered s.c. 2, 18 and 26 hours after bacterial inoculation. Data are expressed as means ( $\pm$ SD) of nine to ten mice.

Table 5. Therapeutic effect of cefozopran and reference compounds against thigh muscle infection caused by methicillin-sensitive *S. aureus* 308A-1 in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Bacterial recovery <sup>c</sup>		ED <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC ( $\mu$ g/ml)
Drug	Dose (mg/kg)	No. of bacteria	Effective rate		
Control		6.59±0.48	0/10		
cefazopran	0.625	6.14±1.42	2/8	2.87 (0.75-7.56)	0.39
	2.5	5.38±1.12	3/8		
	10	4.77±1.19	6/8		
	40	4.59±0.96	8/8		
ceftazidime	10	6.45±0.26	0/8	56.1 * <sup>e</sup> (20.7-135)	6.25
	40	5.29±1.09	4/8		
	160	4.35±0.95	7/8		
flomoxef	0.625	4.06±1.14	7/8	1.73 (0.12-5.08)	0.39
	2.5	5.83±0.64	2/8		
	10	5.54±0.70	5/8		
	40	4.34±1.20	7/8		
	40	3.37±1.08	7/8		

<sup>a</sup>Infection was induced as described in the text.

<sup>b</sup>Antibiotics were administered s.c. 2, 18 and 26 hours after infection. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup>Bacterial counts in the thigh muscle were determined on day 5 after infection (log CFU; mean $\pm$ SD). Bacterial counts less than 10<sup>3</sup> CFU were regarded as 10<sup>3</sup> CFU to calculate the mean. Effective rate is expressed as the number of mice in which treatment was judged effective per total number treated.

<sup>d</sup>ED<sub>50</sub> was calculated from the effective rate. Figures in parentheses indicate 95% confidence limits.

<sup>e</sup>Significantly different from the value for cefazopran (P<0.05).

Table 6. Therapeutic effect of ceftazopran and reference compounds against thigh muscle infection caused by methicillin-resistant *S. aureus* N133 in mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Bacterial recovery <sup>c</sup>		ED <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC (μg/ml)
Drug	Dose (mg/kg)	No. of bacteria	Effective rate		
Control		8.18±0.23	0/10		
ceftazopran	3.125	7.63±0.41	0/8		
	12.5	7.55±0.43	0/8	79.8 (39.4-181.7)	50
	50	6.54±0.95	2/8		
	200	4.82±1.29	7/8		
3.125	7.93±0.57	0/8			
ceftazidime	12.5	7.88±0.40	0/8	>200 * <sup>e</sup>	>100
	50	7.61±0.65	0/8		
	200	6.99±0.64	1/8		
	3.125	7.86±0.39	0/8		
flomoxef	12.5	7.16±0.47	0/8	116 (56-417)	100
	50	7.18±0.67	1/8		
	200	5.86±0.95	6/8		

<sup>a</sup>Infection was induced as described in the text.

<sup>b</sup>Antibiotics were administered s.c. 2, 18 and 26 hours after infection. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup>Bacterial counts in the thigh muscle were determined on day 7 after infection (log CFU; mean±SD). Bacterial counts less than 10<sup>3</sup> CFU were regarded as 10<sup>3</sup> CFU to calculate the mean. Effective rate is expressed as the number of mice in which treatment was judged effective per total number treated.

<sup>d</sup>ED<sub>50</sub> was calculated from the effective rate. Figures in parentheses indicate 95 % confidence limits.

<sup>e</sup>Significantly different from the value for ceftazopran (P<0.05).

Table 7. Therapeutic effect of ceftazopran and reference compounds against thigh muscle infection caused by *P. aeruginosa* P9 in neutropenic mice<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>		Survival <sup>c</sup> rate	SD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	Clearance <sup>e</sup> rate	CD <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mg/kg)	MIC (μg/ml)
Drug	Dose (mg/kg)					
Control		0/9		0/9		
ceftazopran	0.2	0/10		0/10		
	2	9/10	0.81 (0.45-1.30)	0/10	151 (52.9-453)	0.78
	20	9/10		1/10		
	200	10/10		5/10		
0.2	0/10	0/10				
ceftazidime	2	1/9	7.58 * <sup>f</sup> (2.64-20.9)	0/9	>200	1.56
	20	8/10		1/10		
	200	10/10		2/10		
cefpirome	2	0/9	15.7 * (4.98-44.9)	0/9	>200	6.25
	20	7/10		0/10		
	200	9/10		1/10		

<sup>a</sup> Infection was induced as described in the text.

<sup>b</sup> Antibiotics were administered s.c. twice a day for 3 days. Dose is expressed as amount of antibiotic per injection.

<sup>c</sup> Survival rate on day 7 after infection.

<sup>d</sup> SD<sub>50</sub> and CD<sub>50</sub> were calculated from the survival rate and the clearance rate, respectively. Figures in parentheses indicate 95 % confidence limits.

<sup>e</sup> Bacterial counts in the kidneys were determined on day 7 after infection. Clearance rate is expressed as the number of mice sterilized per total number treated.

<sup>f</sup> Significantly different from the value for ceftazopran (P<0.05).

*P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルを有することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。Cefozopran はまた各種細菌によるマウスでの実験的敗血症においても優れた感染防御活性を有することが示されている<sup>2)</sup>。しかしながら、マウスでの実験的敗血症は臨床病態に即したものとは言えず、本剤の臨床における効果を予測するためには臨床病態に近い局所感染モデルを用いた薬効評価が必要である。

そこで cefozopran の実験感染モデルにおける治療効果を、*K. pneumoniae* による呼吸器感染症、*P. aeruginosa* および *E. faecalis* による尿路感染症、*S. aureus* および *P. aeruginosa* による筋肉感染症を用いて検討した。この中で *S. aureus* による筋肉感染症は臨床病態を十分に反映したものとは言えないが、筋肉内に明瞭な膿瘍が形成されることから、皮下膿瘍を形成する感染症との類似性は高いと考えられる。*S. aureus* は呼吸器感染症および皮膚軟部組織感染症において主要な起因菌となっているが<sup>3)</sup>、筋肉感染症モデルは後者における薬剤効果を類推するのに適していると思われる。今回、メチシリン感受性および耐性の *S. aureus* による筋肉感染症を用いて cefozopran の治療効果を調べたところ、両感染症に対して cefozopran は FMOX と同等で CAZ より有意に優れた効果を示した。この結果は、*S. aureus* 感染症治療剤として cefozopran が有効であることを示唆している。

*K. pneumoniae* DT-S による急性呼吸器感染症は、臨床における急性肺炎のモデルである。本感染症に対して cefozopran は、CAZ、CZON および CPR と同等で CPM より優れた効果を示した。一方、*K. pneumoniae* 27 による慢性呼吸器感染症は、噴霧感染後 1 週から 4 週にかけて肺内生菌数が  $10^6$  CFU 前後で推移する持続感染症であり、この期間においてマウスの肺には大葉性の肝変化病変が形成される<sup>4)</sup>。本感染モデルは臨床でみられる日和見感染菌による慢性感染症を想定して作製されたものであり、臨床上意義深いモデルと思われる。この慢性感染症に対しても cefozopran は CAZ と同等の効果を示した。即ち、*K. pneumoniae* による急性および慢性のいずれの感染症に対しても cefozopran は優れた治療効果を有することが明らかとなった。

*P. aeruginosa* は呼吸器あるいは泌尿器科において最もよく検出される菌の一つである。従って *P. aeruginosa* による局所感染モデルでの薬効評価は薬剤の臨床における意義を考える上で重要である。そこで *P. aeruginosa* P9 による尿路感染症に対する cefozopran の治療効果を調べたところ、cefazolin は CAZ およ

び CFCL と同等で CPR より優れた効果を示した。一方、*E. faecalis* は正常な腸内フローラを構成する菌であり、その病原性はあまり高くないが、近年 *P. aeruginosa* と共に複雑性尿路感染症から高頻度に分離されており、その感染症における役割が注目されている<sup>5)</sup>。*E. faecalis* は多くのセフェム剤に自然耐性を示し、現在のところ本菌と *P. aeruginosa* の両方に活性を示す抗菌剤は少ない。Cefozopran はこれら両菌に対して高い抗菌活性を有することが明らかとなっていることから<sup>2)</sup>、*E. faecalis* と *P. aeruginosa* の尿路混合感染モデルでの治療効果を調べたところ、10 mg/kg の cefozopran が両菌の腎臓内生菌数を有意に減少させた。一方、CAZ および ABPC はそれぞれ *P. aeruginosa* および *E. faecalis* の菌数を有意に減少させた。他方の菌数には有意な影響を及ぼすことができなかった。従って本感染症はいずれか一方の菌が排除されても完治には至らず、十分に治療するには cefozopran のような両菌に活性を有する薬剤が必要であることが示された。

また *P. aeruginosa* は感染防御能が低下した患者、特に好中球減少患者で感染を起こし易いことが知られている。このような患者では抗菌剤投与により感染菌の増殖を抑えても投薬を止めると感染が再発する。従って強い殺菌活性を有する抗菌剤の使用が必要である。今回 CY で処理した好中球減少マウスで *P. aeruginosa* P9 による筋肉感染症を作製し、cefazolin の治療効果を調べたところ、cefazolin は CAZ および CPR に比べて有意に高い治療効果を示した。CAZ は正常マウスにおける *P. aeruginosa* P9 尿路感染症に対しては cefazolin と同等の効果を示したが、CY 処理マウスにおける感染症に対しては cefazolin より効果が劣った。この結果は cefazolin が *P. aeruginosa* に対して CAZ より高い殺菌活性を有すること<sup>10)</sup> が反映していると考えられる。

以上、用いた 7 種のマウス実験感染モデルに対する cefazolin の効果は、*in vitro* における高い抗菌活性を強く反映したものであった。即ち、呼吸器および尿路感染症、並びに膿瘍を形成する軟部組織感染症といった現在の臨床において最も重要な問題となっている感染症に対して、cefazolin が *in vitro* の抗菌活性から期待できる治療効果を十分に発揮し得ることが明らかとなった。従って、cefazolin の感染症治療剤としての有効性は極めて高いと考えられる。

## 文 献

- 1) Miyake A, Yoshimura Y, Yamaoka M, Nishimura T, Hashimoto N, Imada A : Studies on condensed-heterocyclic azolium cephalosporins. IV. Synthesis and antibacterial activity of 7 $\beta$ -[2-(5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-2(Z)-alkoxyiminoacetamido]-3-(condensed-heterocyclic azolium) methyl cephalosporins including SCE-2787. *J Antibiotics* 45 : 709~720, 1992
- 2) 岩日朋幸, 志岐志喜子, 内藤貴子, 林 良吾, 山崎俊幸, 今田 哲 : 新セフェム系抗生物質 cefozopran の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力. *Chemotherapy* 41(S-4) : 67~80, 1993
- 3) Nishi T, Tsuchiya K : Experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice : chemotherapy with kanamycin. *Antimicrob Agent Chemother* 17 : 494~505, 1980
- 4) Iizawa Y, Nishi T, Kondo M, Imada A : Experimental chronic pulmonary infection in mice caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Immunol* 32 : 895~906, 1988
- 5) Nishi T, Tsuchiya K : Experimental urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect Immun* 22 : 508~515, 1978
- 6) Litchfield J T, Wilcoxon F : A simple method of evaluating dose effect experiments. *J Pharmacol Exp Thera* 96 : 99~113, 1949
- 7) Selbie F R, Simon R D : Virulence to mice of *Staphylococcus pyogenes* : its measurement and its relation to certain *in vitro* properties. *Br J Exp Pathol* 33 : 315~326, 1952
- 8) 松本慶蔵, 他 : ブドウ球菌感染症。ブドウ球菌, p. 197~280, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1986
- 9) 古川迪代 : 1988 年分離病原由来細菌の薬剤耐性。第 18 回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録, p. 23~26, 1989
- 10) 中尾雅文, 野路弓子, 岩日朋幸, 山崎俊幸, 今田 哲 : 新セフェム系抗生物質 cefozopran のペニシリン結合蛋白質への親和性, 殺菌・溶菌作用ならびに形態変化誘発作用について。 *Chemotherapy* 41(S-4) : 112~120, 1993

Cefozopran, a new cephem antibiotic: therapeutic effect against  
experimental infections in mice

Yuji Iizawa, Noboru Tsuchimori, Kenji Okonogi, Toshiyuki Yamazaki and Akira Imada  
Pharmaceutical Research Laboratories III, Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries Ltd.  
2-17-85 Jusohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka, Japan

The therapeutic effect of cefozopran, a new semisynthetic cephalosporin, against experimental infection in mice was examined. Cefozopran was more effective than cefpiramide and as effective as ceftazidime (CAZ), ceftazidime and cefpirome (CPR) against acute respiratory tract infection caused by *Klebsiella pneumoniae* DT-S. In the model of chronic respiratory tract infection caused by *K. pneumoniae* 27, cefozopran was shown to be as effective as CAZ. The therapeutic effect of cefozopran against urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* P9 was superior to that of CPR and equal to those of CAZ and cefclidin. In the model of mixed urinary tract infection induced with *Enterococcus faecalis* TN2005 and *P. aeruginosa* P9, cefozopran reduced viable cell counts of both organisms. Cefozopran was more effective than CAZ and as effective as flomoxef against thigh muscle infections caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* 308A-1 and methicillin-resistant *S. aureus* N133. In addition, cefozopran was more effective than CAZ and CPR against thigh muscle infection caused by *P. aeruginosa* P9 in neutropenic mice. The strong therapeutic effect of cefozopran against experimental infections in mice suggests its clinical effectiveness against human infectious diseases.