

新規経口ペネム薬 SY5555 の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用

那須 孝昭・岡本 清美・本郷亜佐子・岩尾 佳世・中西 俊博
サントリー株式会社生物医学研究所*

新規経口ペネム系抗生物質 SY5555 の *in vitro* および *in vivo* における抗菌作用を、主に既存のセフェム系抗生物質と比較検討した。

SY5555 は *Pseudomonas aeruginosa* を除く好気性菌および嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。特に、*Enterococcus faecalis* を含む好気性グラム陽性菌および嫌気性菌に対する本薬の抗菌力は cefpodoxime, cefotiam (CTM) および cefaclor (CCL) よりも優れていた。

最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) との比較より、SY5555 は MIC もしくは 2MIC の濃度ですべての被験菌株に対し殺菌的に作用することが明らかになった。

SY5555 は *Streptococcus pneumoniae* Type III, *E. faecalis* 6 のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対して cefuroxime (CXM) より高い親和性を示した。また、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 の PBPs のうち、SY5555 は PBP 2 に、CXM は PBP 3 にそれぞれ最も高い親和性を示した。

ペニシリナーゼに対する SY5555 の安定性は ceftoram, cefixime (CFIX) および CTM と同様非常に高く、また、セファロスポリナーゼに対する本薬の安定性は試験途中で最も優れていた。

試験管内耐性獲得試験において、*Staphylococcus aureus* 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2 に対する SY5555 の MIC は imipenem と同様 4 ~ 8 倍上昇した。

マウス実験の腹腔内感染症に対する SY5555 の治療効果は *in vitro* の良好な抗菌力を反映しなかった。マウスにおける SY5555 の血清中濃度推移を検討したところ、本薬の Cmax, AUC はともに CFIX, cefuroxime axetil および CCL より小さく、このことが本薬が良好な治療効果を示さない原因の一つであると考えられた。

Key words : SY5555, *in vitro* 抗菌力, PBPs, β -ラクタマーゼ, *in vivo* 抗菌力

これまでに開発された経口 β -ラクタム薬はペニシリン系またはセフェム系のいずれかに属し、強力な抗菌活性と高い安全性を有することから臨床で広く使用されている。このような優れた特徴に加えて、既存のペニシリン薬およびセフェム薬と異なる特徴を示す β -ラクタム薬を得るために、サントリー株式会社生物医学研究所はペネム系化合物の探索に着手し、新規経口薬 SY5555 を創製した。SY5555 は *Pseudomonas aeruginosa* を除く好気性菌および嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、また、各種 β -ラクタマーゼに対して安定であることが既に報告されている。

本報では SY5555 の *in vitro* 抗菌力、ペニシリン結合蛋白質に対する結合親和性、 β -ラクタマーゼに対する安定性、マウス実験の腹腔内感染症に対する治療効果およびマウスにおける体内動態を主に既存のセフェム薬と比較検討した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

サントリー株式会社生物医学研究所で保存されている菌株を用いた。

2. 使用薬剤

SY5555 はサントリー株式会社で合成された標品を用いた。

比較薬としては imipenem (IPM, 萬有製薬), ceftriaxone (CTR, 日本ロシュ), cefpodoxime proxetil (CPDX-PR, 三共), cefpodoxime (CPDX, 三共), ceftoram (CFTM, 富山化学工業), cefixime (CFIX, 藤沢薬品工業), cefotiam hexetil (CTM-HE, 武田薬品工業), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefuroxime axetil (CXM-AX, 日本グラクソ), cefuroxime (CXM, 日本グラクソ), cefaclor (CCL, 塩野義製薬), ceftazolidim (CEZ, 藤沢薬品工業), methicillin (DMPPC, 萬有製薬) および amoxicillin (AMPC, 武田薬品工業) を使用し

た。なお、薬剤はすべて力価に応じた重量補正を行った。

3. 感受性測定

好気性菌の感受性測定は日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法²⁾に準じて実施し、前培養に Sensitivity Test Broth (STB, ニッスイ) を、MIC 測定に Sensitivity Disk Agar (SDA, ニッスイ) をそれぞれ使用した。なお、*Streptococcus* 属では前培養に 5%ウマ脱繊維血液 (DHB, 日本バイオテスト研究所) 加 Heart Infusion Agar (ニッスイ) を、MIC 測定に 5% DHB 加 SDA をそれぞれ用いた。また、*Haemophilus influenzae* では前培養および MIC 測定に、それぞれ 7.5% および 5% の Fildes enrichment (Difco) 加 SDA を使用した。

嫌気性菌の感受性測定は日本化学療法学会嫌気性菌最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法³⁾に準じて行った。前培養に GAM Broth (ニッスイ) を、MIC 測定に GAM Agar (ニッスイ) をそれぞれ用い、嫌気チャンパー (Forma scientific) 内で培養を行った。

4. 最小殺菌濃度 (MBC)

MIC および MBC は液体培地希釈法により測定した。2 倍希釈系列の各薬剤を含む STB に被験菌を約 1×10^6 CFU/ml となるよう接種し、37°C、18 時間培養した。MIC は肉眼的に菌の増殖が認められない最小薬剤濃度とした。MIC 判定後、各培養液の一定量を薬剤無添加の SDA 上で 37°C、一夜平板培養し、生菌数を測定した。MBC は接種した被験菌が 99.9% 以上殺菌された最小薬剤濃度とした。

5. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性

Streptococcus pneumoniae Type III, *Enterococcus faecalis* 6 および *Escherichia coli* NIHJ JC-2 から調製した膜画分を用いて、Spratt らの方法⁴⁾を一部改変した競合結合実験により測定した。すなわち、蛋白濃度 $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の膜画分 $20 \mu\text{l}$ を所定濃度の各薬剤 $2.0 \mu\text{l}$ と 30°C、10 分間反応させた後、 ^{35}S -benzylpenicillin ($0.2 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, NEN Research Products) を $2.0 \mu\text{l}$ 加え、さらに 10 分間反応させた。45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ penicillin G を含む 15% sarkosyl NL-97 水溶液 $1.3 \mu\text{l}$ を添加することにより反応を停止させた後、各反応液から遠心分離により不溶画分を除去した。得られた上清を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動に供し、PBPs の検出を fluorography により行った。

6. β -ラクタマーゼに対する安定性

ペニシリン産生菌では ampicillin (ABPC, 明治製薬) を、セファロスポリナーゼ産生菌では cephalor-

idine (CER, 塩野義製薬) をそれぞれ $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した Brain Heart Infusion Broth (ニッスイ) 400 ml で被験菌を 37°C、一夜振盪培養した。各菌体を $1/15\text{M}$ phosphate buffer (pH 7.0) で 2 回洗浄し、約 20 ml の同緩衝液に懸濁した後、超音波処理により破砕した。破砕液の遠心分離上清を同緩衝液で適宜希釈し、粗酵素液とした。これら粗酵素液による各薬剤の加水分解速度を UV 吸収法^{5,6)}にて測定し、 β -ラクタマーゼに対する安定性の指標とした。なお、各薬剤の分解速度はペニシリン産生菌の場合には ABPC の分解速度を、セファロスポリナーゼの場合には CER の分解速度をそれぞれ 100 とした相対値で表した。

7. 試験管内耐性獲得

Staphylococcus aureus 209P JC-1 および *E. coli* NIHJ JC-2 を被験菌として、4. 項と同様に液体培地希釈法により MIC を測定した。MIC 判定後、薬剤無添加の対照とほぼ同程度の濁度を示す最高薬剤濃度の培養液を接種菌液として、次の MIC 測定を行った。以上の操作を繰り返し、各薬剤の示す 1 回目と 10 回目の MIC を比較した。

8. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

寒天培地上で 37°C、一夜培養した被験菌を液体培地または生理食塩水にて所定の菌量に懸濁した後、等容量の 10% ムチンと混合し、接種菌液とした。ただし、*Streptococcus pyogenes* C-203 および *S. pneumoniae* Type III の接種菌液は ムチン無添加で調製した。ICR 系、雄、5 週齢 (日本エスエルシー) のマウスを 1 群 10 匹で用い、0.5 ml の菌液を腹腔内に接種することにより感染を惹起した。菌接種 2 時間後に所定濃度の各薬剤をマウス 1 匹あたり 0.2 ml 経口投与し、数日後のマウスの生存率より Probit 法にて算出した 50% effective dose (ED_{50}) を治療効果とした。

9. マウスにおける血清中濃度

8. 項と同条件のマウス (ただし、1 群 5 匹) に各薬剤を 20 mg/kg 経口投与 (0.2 ml) した後、経時的に採血を行った。血清中の薬剤濃度は bioassay により測定した。なお、SY5555 および CCL の場合は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を、CFIX および CXM-AX の場合は *E. coli* K-12 変異株をそれぞれ検定菌とした。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

好気性菌および嫌気性菌に対する SY5555 の抗菌スペクトルを CPDX, CTM および CCL と比較検討した。

1) 好気性菌

10^6 CFU/ml 接種時の抗菌スペクトルを Table 1 に

Table 1. Antibacterial spectrum of SY5555 against aerobic bacteria

Inoculum size : 10⁶CFU/ml

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	SY5555	cefepodoxime	cefotiam	cefaclor
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	0.1	3.13	0.39	3.13
<i>S. aureus</i> Terajima	0.05	1.56	0.39	0.1
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.05	0.39	0.39	0.39
<i>S. pyogenes</i> C-203	≤ 0.025	≤ 0.025	0.05	0.1
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.05	≤ 0.025	0.1	0.39
<i>S. pneumoniae</i> Type I	≤ 0.025	≤ 0.025	0.2	0.78
<i>S. pneumoniae</i> Type II	≤ 0.025	0.05	0.2	0.39
<i>S. pneumoniae</i> Type III	≤ 0.025	0.05	0.2	0.78
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.78	>100	50	100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	≤ 0.025	0.39	0.2	0.1
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.05	0.2	0.39	0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.78	0.78	0.2	6.25
<i>E. coli</i> K-12	0.2	0.1	0.05	0.78
<i>C. freundii</i> GN 7391	25	>100	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i> PCI 602	0.2	≤ 0.025	0.1	0.78
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 15380	0.2	0.05	0.2	0.78
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	1.56	0.78	0.78	100
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	3.13	0.78	0.78	100
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	6.25	0.78	6.25	>100
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	1.56	≤ 0.025	0.39	6.25
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	1.56	0.2	0.78	3.13
<i>M. organii</i> IFO 3848	0.78	≤ 0.025	0.2	50
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.78	≤ 0.025	0.2	50
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	>100	>100	>100	>100
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	0.2	≤ 0.025	0.39	0.78

Agar dilution method

示す。

SY5555は *P. aeruginosa* を除く好気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。

Staphylococcus 属および *Streptococcus* 属等のグラム陽性菌に対する SY5555 の抗菌力は試験薬中で最も優れており、特にセフェム薬に耐性を示す *E. faecalis* に対しても SY5555 の MIC は $0.78\mu\text{g/ml}$ であり、本薬の抗菌力は良好であった。腸内細菌科に属する菌種および *H. influenzae* に対する SY5555 の抗菌力は概して CPDX より劣るものの、CTM とほぼ同等であり、CCL より優れていた。

10⁶CFU/ml 接種時の MIC (Table 2) と 10⁸CFU/ml 接種時の MIC を比較すると、*Proteus vulgaris* および *H. influenzae* に対する SY5555 の MIC は対照薬と同様、接種菌量の増加にともない顕著に上昇した。しかし、その他の菌株に対する本薬の MIC の変動はほとんど認められなかった。

2) 嫌気性菌

10⁶CFU/ml 接種時の抗菌スペクトルを Table 3 に示す。

SY5555 は嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。

Peptostreptococcus 属、*Propionibacterium acnes*、*Eubacterium* 属および *Clostridium* 属のグラム陽性菌に対する SY5555 の MIC は $\leq 0.025\sim 1.56\mu\text{g/ml}$ であり、本薬の抗菌力は試験薬中で最も優れていた。

また、*Bacteroides* 属等のグラム陰性菌に対して、セフェム薬の抗菌力は非常に弱かったが、SY5555 の MIC は $1.56\mu\text{g/ml}$ 以下であり、本薬は良好な抗菌力を示した。

10⁸CFU/ml 接種時の MIC (Table 4) を検討したところ、グラム陰性菌に対する SY5555 の MIC は 10⁶CFU/ml 接種時に比べ顕著に上昇した。しかし、本薬の MIC は *Fusobacterium varium* を除き、 $3.13\mu\text{g/ml}$

Table 2. Antibacterial spectrum of SY5555 against aerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	SY5555	cefepodoxime	cefotiam	cefaclor
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	0.2	3.13	0.78	6.25
<i>S. aureus</i> Terajima	0.1	1.56	0.78	3.13
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.05	0.78	0.78	0.78
<i>S. pyogenes</i> C-203	≤ 0.025	≤ 0.025	0.05	0.2
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.05	≤ 0.025	0.1	0.39
<i>S. pneumoniae</i> Type I	≤ 0.025	≤ 0.025	0.2	0.78
<i>S. pneumoniae</i> Type II	≤ 0.025	0.05	0.2	0.78
<i>S. pneumoniae</i> Type III	≤ 0.025	0.05	0.2	1.56
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.78	>100	100	100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	≤ 0.025	1.56	0.39	0.39
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.1	0.39	0.78	0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	1.56	0.39	12.5
<i>E. coli</i> K-12	0.78	0.2	0.1	1.56
<i>C. freundii</i> GN 7391	25	>100	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i> PCI 602	0.39	0.05	0.2	3.13
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 15380	0.39	0.1	0.39	3.13
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	6.25	3.13	>100	>100
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	3.13	3.13	>100	>100
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	12.5	1.56	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	>100	>100	>100	>100
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	6.25	0.2	1.56	3.13
<i>M. morgani</i> IFO 3848	6.25	6.25	50	>100
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	1.56	1.56	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	>100	>100	>100	>100
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	>100	>100	>100	>100

Agar dilution method

以下であり、その抗菌力はセフェム薬より優れていた。

2. 最小殺菌濃度 (MBC)

各種好気性菌に対するSY5555のMIC・MBCをCFIX, CXMおよびCCLと比較検討し、Table 5に示す。

SY5555のMBC ($\leq 0.025 \sim 25 \mu\text{g/ml}$)は被験菌19株のうち15株でMICと一致し、また、残る4株でもMICの2倍であった。すなわち、本薬はMICもしくは2MICの濃度ですべての被験菌に対して殺菌的に作用した。

一方、セフェム薬では、MBCがMICの2倍以上となる被験菌が多数認められ、また、*Citrobacter freundii* GN 7391, *Enterobacter cloacae* 91等の被験菌に対するMICおよびMBCはともに $>100 \mu\text{g/ml}$ であった。

3. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性

S. pneumoniae Type III, *E. faecalis* 6 および *E. coli*

NIHJ JC-2のPBPsに対するSY5555の結合親和性をCXMと比較検討し、Fig. 1に示す。

S. pneumoniae Type IIIのPBPsに対して、SY5555はPBP 1>3>2の順に強い結合親和性を示し、また、その親和性はいずれのPBPsに対してもCXMより強かった。

E. faecalis 6のPBPsに対して、SY5555はPBP 5>3>2>1>4の順に強い結合親和性を示した。また、本薬は $6.25 \mu\text{g/ml}$ ですべてのPBPsの結合部位をほとんど飽和した。一方、CXMは $400 \mu\text{g/ml}$ 添加時でもPBPsの結合部位を飽和できず、その結合親和性は特にPBP 1, 3, 4および5に対して弱かった。

E. coli NIHJ JC-2の場合、SY5555の結合親和性はPBP 2>4>1>3>5, 6の順に強かった。一方、CXMはPBP 3>1>2>4>5, 6の順に強い結合親和性を示し、特にPBP 2および3に対する両薬剤の結合親和性に大きな差が認められた。

Table 3. Antibacterial spectrum of SY5555 against anaerobic bacteria

Inoculum size : 10⁶CFU/ml

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	SY5555	cefepodoxime	cefotiam	cefaclor
<i>P. anaerobius</i> GAI 1161	0.1	0.2	0.2	0.39
<i>P. asaccharolyticus</i> 4280-2	≤ 0.025	0.2	0.39	0.2
<i>P. acnes</i> T-16	≤ 0.025	≤ 0.025	0.1	0.39
<i>P. acnes</i> T-34	≤ 0.025	≤ 0.025	0.1	0.39
<i>E. lentum</i> GAI 1515	1.56	50	25	12.5
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	0.05	0.78	12.5	3.13
<i>C. tetani</i>	0.05	0.2	0.1	0.78
<i>C. perfringens</i>	0.05	≤ 0.025	≤ 0.025	0.05
<i>C. sporogenes</i>	0.2	3.13	0.78	0.78
<i>C. sporogenes</i> GAI 0005	0.2	>100	>100	>100
<i>C. ramosum</i> GAI 2560	0.1	25	0.39	25
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	≤ 0.025	12.5	100	>100
<i>B. fragilis</i> GM 7000	≤ 0.025	12.5	12.5	>100
<i>B. fragilis</i> R-2-8	0.05	25	100	>100
<i>B. fragilis</i> V-283	0.1	100	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 2926	0.2	100	100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 3304	0.2	100	100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> 5600	0.2	>100	>100	>100
<i>B. distasonis</i> Ju-11-1	0.1	12.5	100	>100
<i>B. distasonis</i> clin-99-3	0.78	25	>100	>100
<i>B. vulgatus</i> ES 14	0.1	6.25	12.5	50
<i>B. vulgatus</i> ES 21	0.2	6.25	25	50
<i>B. ovatus</i> Ju-6-1	1.56	50	100	>100
<i>F. varium</i> ATCC 8501	0.2	25	3.13	50
<i>F. mortiferum</i> F-1-9	0.1	0.78	3.13	6.25

Agar dilution method

4. β -ラクタマーゼに対する安定性

SY5555の β -ラクタマーゼに対する安定性をCFTM, CFIX, CTM, CCLおよびAMPCと比較し、Table 6に示す。

S. aureus β -1, *E. coli* ML1410 RGN14および*Klebsiella pneumoniae* 134由来のペニシリナーゼによるSY5555の相対加水分解率はすべて検出限界以下であり、本薬はセフェム薬と同様の優れた安定性を示した。一方、*E. coli* 106, *P. vulgaris* GN 76, *P. vulgaris* No. 9, *Providencia rettgeri* GN 624および*P. rettgeri* 105由来のセファロスポリナーゼに対するSY5555の安定性は試験薬中で最も優れていた。また、*E. cloacae* 91由来のセファロスポリナーゼに対しては、SY5555はCFTMおよびCFIXとほぼ同等の安定性を示した。

5. 試験管内耐性獲得

SY5555に対する試験管内耐性獲得をIPM, CTRX, CFTM, CFIX, CCL, CEZおよびDMPPCと比較し、Table 7に示す。

S. aureus 209P JC-1を被験菌とした場合、SY5555のMICは0.05 $\mu\text{g/ml}$ から0.39 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。SY5555に対する本菌の耐性獲得の程度はIPM, CFTM, CFIXおよびDMPPCとほぼ同等であった。一方、CTRXおよびCCLでは、それぞれ64~512倍のMICの上昇が認められた。

E. coli NIHJ JC-2の場合、SY5555のMICは1.56 $\mu\text{g/ml}$ から6.25 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。本薬に対する耐性獲得の程度はIPM, CTRXおよびCFIXとほぼ同等であった。

6. マウス実験的腹腔内感染症モデルに対する治療効果

SY5555の治療効果をCPDX-PR, CFIX, CTM-HE, CXM-AXおよびCCLと比較し、Table 8に示す。

S. aureus Smith感染症に対して、SY5555の治療効果はCFIXより優れていたが、その他の4セフェム薬より劣っていた。

S. pyogenes C-203感染症に対するSY5555の治療

Table 4. Antibacterial spectrum of SY5555 against anaerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	SY5555	cefepodoxime	cefotiam	ceftazidime
<i>P. anaerobius</i> GAI 1161	0.39	0.2	0.39	0.78
<i>P. asaccharolyticus</i> 4280-2	≤ 0.025	0.39	0.78	0.39
<i>P. acnes</i> T-16	≤ 0.025	1.56	0.2	6.25
<i>P. acnes</i> T-34	≤ 0.025	0.39	0.2	1.56
<i>E. lentum</i> GAI 1515	3.13	>100	50	100
<i>E. limosum</i> ATCC 8486	0.1	3.13	25	6.25
<i>C. tetani</i>	0.1	1.56	0.39	3.13
<i>C. perfringens</i>	3.13	100	25	6.25
<i>C. sporogenes</i>	0.39	6.25	1.56	3.13
<i>C. sporogenes</i> GAI 0005	3.13	>100	>100	>100
<i>C. ramosum</i> GAI 2560	0.2	50	0.39	50
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	1.56	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> GM 7000	3.13	100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> R-2-8	1.56	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> V-283	1.56	>100	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 2926	3.13	100	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL 3304	3.13	>100	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> 5600	3.13	>100	>100	>100
<i>B. distasonis</i> Ju-11-1	0.78	25	>100	>100
<i>B. distasonis</i> clin-99-3	1.56	50	>100	>100
<i>B. vulgatus</i> ES 14	1.56	25	>100	>100
<i>B. vulgatus</i> ES 21	3.13	25	>100	>100
<i>B. ovatus</i> Ju-6-1	3.13	100	>100	>100
<i>F. varium</i> ATCC 8501	>100	>100	>100	>100
<i>F. mortiferum</i> F-1-9	0.78	>100	>100	>100

Agar dilution method

Table 5. Minimum bactericidal concentrations of SY5555

Organism	SY5555		cefixime		cefuroxime		ceftazidime	
	MIC ¹⁾	MBC	MIC ¹⁾	MBC	MIC ¹⁾	MBC	MIC ¹⁾	MBC
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	0.1	0.1	12.5	25	0.78	0.78	1.56	3.13
<i>S. aureus</i> Smith	0.05	0.1	12.5	12.5	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.1	0.1	12.5	25	1.56	6.25	0.78	1.56
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	≤ 0.025	≤ 0.025	6.25	25	0.78	6.25	0.1	0.1
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	0.39	1.56	1.56	6.25	6.25	50	100
<i>E. coli</i> KC-14	0.39	0.39	0.1	0.2	3.13	3.13	12.5	25
<i>E. coli</i> KC-14/RGN823	1.56	1.56	0.78	1.56	25	50	>100	>100
<i>E. coli</i> KC-14/RGN238	3.13	3.13	3.13	3.13	50	50	50	100
<i>E. coli</i> 33	0.39	0.39	0.78	0.78	0.39	0.39	>100	>100
<i>E. coli</i> 106	1.56	1.56	100	>100	50	50	>100	>100
<i>C. freundii</i> GN 7391	25	25	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhi</i> O-901	0.2	0.39	0.2	0.2	6.25	>100	0.78	25
<i>K. pneumoniae</i> PCI 602	0.2	0.2	0.05	0.05	1.56	1.56	0.78	1.56
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0.39	0.78	≤ 0.025	≤ 0.025	0.1	0.1	0.78	1.56
<i>E. cloacae</i> 91	3.13	3.13	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> GN 7919	3.13	6.25	25	25	>100	>100	>100	>100
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	12.5	12.5	0.2	0.39	3.13	3.13	3.13	50
<i>M. morgani</i> IFO 3848	6.25	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	>100	>100
<i>P. rettgeri</i> GN 624	3.13	3.13	50	100	100	>100	>100	>100

¹⁾ Broth dilution method (Inoculum size : 10⁶CFU/ml)($\mu\text{g/ml}$)

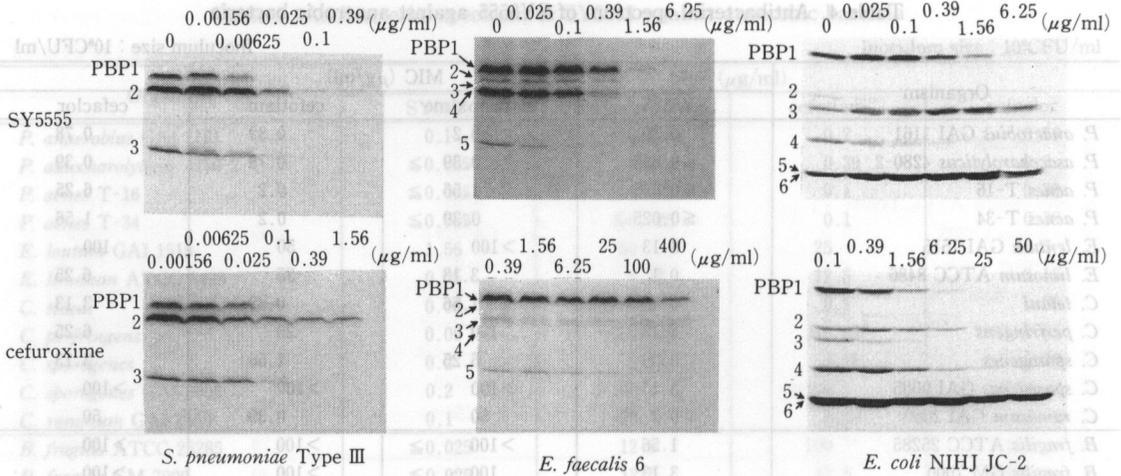


Fig. 1. Binding affinity of SY5555 to penicillin binding proteins

Table 6. Stability of SY5555 to β-lactamases

Source of β-lactamase	Relative rate of hydrolysis							
	SY5555	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor	amoxicillin	cephaloridine	ampicillin
Penicillinase								
<i>S. aureus</i> β-1	ND	ND	ND	ND	3.07	86.00	ND	100.00
<i>E. coli</i> ML1410 RGN14	ND	1.99	ND	3.02	4.99	92.66	19.30	100.00
<i>K. pneumoniae</i> 134	ND	ND	ND	ND	6.97	117.44	18.11	100.00
Cephalosporinase								
<i>E. coli</i> 106	ND	1.99	0.62	133.35	295.73	20.28	100.00	18.81
<i>E. cloacae</i> 91	0.27	0.46	0.16	26.70	71.79	0.73	100.00	0.58
<i>P. vulgaris</i> GN 76	ND	31.25	13.02	345.08	324.99	ND	100.00	ND
<i>P. vulgaris</i> No.9	ND	9.74	3.39	324.77	394.48	147.84	100.00	101.75
<i>P. rettgeri</i> GN 624	ND	3.49	2.09	16.93	76.25	ND	100.00	1.71
<i>P. rettgeri</i> 105	ND	3.08	0.99	15.52	59.72	1.21	100.00	ND

ND: not detected

Table 7. Acquisition of resistance to SY5555 in the serial susceptibility testings

Organism	Antibiotic	MIC (μg/ml)	
		1st testing	10th testing
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	SY5555	0.05	0.39
	imipenem	0.0125	0.1
	ceftriaxone	1.56	100
	cefteram	3.13	12.5
	cefixime	25	400
	cefaclor	0.39	200
	cefazolin	0.2	6.25
	methicillin	0.78	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	SY5555	1.56	6.25
	imipenem	0.78	3.13
	ceftriaxone	0.1	0.78
	cefteram	12.5	12.5
	cefixime	1.56	12.5
	cefaclor	50	25
	cefazolin	6.25	100
	methicillin	>400	>400

Broth dilution method (Inoculum size: 10⁶CFU/ml)

効果はCTM-HEより優れ、CCLとはほぼ同等であり、CPDX-PR、CFIXおよびCXM-AXより劣っていた。

S. pneumoniae Type III感染症に対して、SY5555の治療効果はCXM-AXより劣るが、CPDX-PRとはほぼ同等であり、CFIX、CTM-HEおよびCCLより優れていた。

E. coli KC-14および*K. pneumoniae* KC-1感染症では、SY5555のED₅₀は試験薬中で最も大きかった。

7. マウス血清中濃度推移

SY5555のマウス血清中濃度推移をCFIX、CXM-AXおよびCCLと比較し、Fig. 2に示す。

SY5555のC_{max}は5.40μg/mlであり、その値は試験薬中で最も小さかった。また、本薬のAUCは625.6 μg·min/mlであり、セフェム薬の約1/2であった。

III. 考察

新規経口ペネム薬SY5555の*in vitro*および*in vivo*における抗菌作用を検討したところ、本薬はβ-

Table 8. Protective effects of SY5555 on experimental infection in mice

Organism	Challenge dose (CFU/mouse)	Mucin	Antibiotic	MIC ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (95% confidence limits) (mg/kg)
<i>S. aureus</i> Smith	7.80×10^5	+	SY5555	0.2	2.55 (1.89-3.20)
			cefpodoxime proxetil	3.13 ²⁾	1.52 (0.84-3.72)
			cefixime	12.5	47.91 (33.61-68.17)
			cefotiam hexetil	0.78 ³⁾	0.56 (0.37-0.87)
			cefaclor	0.78	0.04 (0.03-0.05)
	2.79×10^5	+	SY5555	0.1	2.65 (2.15-3.26)
			cefixime	12.5	82.47 (64.73-109.09)
			cefuroxime axetil	1.56 ⁴⁾	1.34 (0.98-1.78)
			cefaclor	0.39	0.03 (0.02-0.03)
			<i>S. pyogenes</i> C-203	1.04×10^3	-
cefpodoxime proxetil	$\leq 0.025^{2)}$	0.24 (0.11-0.47)			
cefixime	0.1	1.95 (1.52-2.46)			
cefotiam hexetil	$\leq 0.025^{3)}$	31.31 (16.97-115.51)			
cefaclor	0.1	8.71 (5.55-16.49)			
1.08×10^6	-	SY5555		≤ 0.025	11.42 (3.99-19.61)
		cefixime		0.05	3.04 (2.21-4.26)
		cefuroxime axetil		$\leq 0.025^{4)}$	0.28 (0.09-4.73)
		cefaclor		0.1	8.82 (4.49-15.02)
		<i>S. pneumoniae</i> Type III		9.2×10^1	-
cefpodoxime proxetil	0.05 ²⁾		20.48 (10.51-43.08)		
cefixime	0.39		28.27 (19.11-43.47)		
cefotiam hexetil	0.39 ³⁾		63.74 (35.91-143.02)		
cefaclor	3.13		72.38 (48.04-178.89)		
1.67×10^2	-		SY5555	≤ 0.025	4.21 (3.01-5.58)
			cefixime	0.2	22.03 (17.79-27.49)
			cefuroxime axetil	$\leq 0.025^{4)}$	2.50 (1.34-4.74)
			cefaclor	0.78	26.34 (17.85-55.64)
			<i>E. coli</i> KC-14	1.25×10^6	+
cefpodoxime proxetil	0.1 ²⁾	0.58 (0.49-0.67)			
cefixime	≤ 0.025	0.52 (0.36-0.72)			
cefotiam hexetil	0.05 ³⁾	1.71 (1.40-2.07)			
cefaclor	0.78	0.74 (0.57-0.93)			
1.15×10^6	+	SY5555		0.2	11.58 (9.97-13.37)
		cefixime		≤ 0.025	0.41 (0.31-0.52)
		cefuroxime axetil		0.78 ⁴⁾	2.96 (2.39-3.66)
		cefaclor		0.39	0.72 (0.54-0.90)
		<i>K. pneumoniae</i> KC-1		1.42×10^3	+
cefpodoxime proxetil	0.1 ²⁾		14.24 (10.50-19.35)		
cefixime	≤ 0.025		0.55 (0.48-0.64)		
cefotiam hexetil	0.2 ³⁾		28.00 (19.89-40.43)		
cefaclor	0.78		13.12 (10.06-20.22)		
3.25×10^3	+		SY5555	0.39	254.47 (220.88-300.63)
			cefixime	≤ 0.025	0.56 (0.47-0.67)
			cefuroxime axetil	3.13 ⁴⁾	39.84 (32.51-57.33)
			cefaclor	0.39	8.93 (7.03-11.42)

¹⁾ Agar dilution method (Inoculum size : 10^6 CFU/ml)²⁾ MIC of cefpodoxime ³⁾ MIC of cefotiam ⁴⁾ MIC of cefuroxime

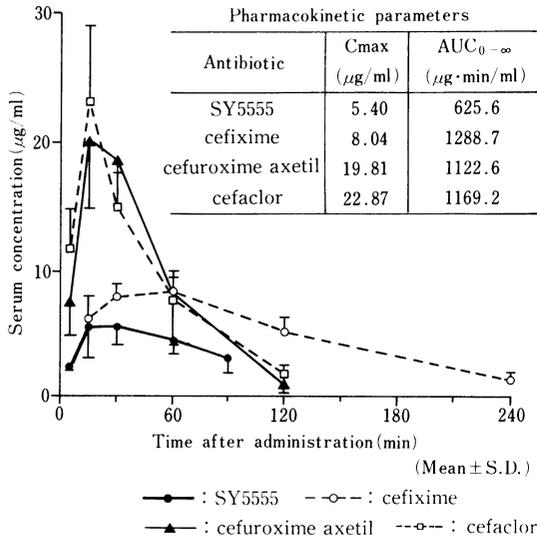


Fig. 2. Serum concentrations of SY5555 after oral administration (20mg/kg) to mice

ラクタム薬の有する基本的特徴の他に、既存の経口セフェム薬と異なる性質を有することが明らかとなった。

In vitro 抗菌作用に関しては、SY5555は *P. aeruginosa* を除く好気性菌および嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。SY5555の抗菌活性をセフェム薬 CPDX, CTM および CCL と比較した場合、次の4点が本薬の特徴と考えられる。第一に好気性グラム陽性菌に対する SY5555 の抗菌活性は最も優れており、セフェム薬に自然耐性を示す *E. faecalis* に対しても本薬は良好な抗菌力を示した。第二に *P. aeruginosa* を除く好気性グラム陰性菌に対する SY5555 の抗菌活性は CCL より優れており、CTM とほぼ同等であった。第三にセフェム薬に耐性の *Bacteroides* 属を含む嫌気性菌に対して、SY5555 は良好な抗菌活性を示した。第四に接種菌量を増加した場合の抗菌活性の変動は SY5555 ではセフェム薬より小さかった。

MIC と MBC の比較により、各種好気性菌に対して SY5555 は MIC ないし 2MIC 濃度で殺菌的に作用することが明らかとなった。なお、この殺菌作用は CFIX, CXM および CCL が無効の *C. freundii*, *E. cloacae* 等の被験菌においても認められた。

ペニシリンナーゼおよびセファロスポリナーゼに対して、SY5555 は第三世代経口セフェム薬 (CFTM および CFIX) を含む対照薬より高い安定性を示した。β-ラクタム薬の作用標的である PBP との結合親和性の検討では、*S. pneumoniae* および *E. faecalis* の

PBP に対する SY5555 の親和性は CXM より高く、また、*E. coli* の PBP のうち SY5555 は PBP 2 に、CXM は PBP 3 にそれぞれ最も高い親和性を示した。β-ラクタマーゼに対する高い安定性と PBP に対する高い親和性は SY5555 の大きな特徴であり、本薬の幅広い抗菌スペクトルおよび良好な殺菌作用はこれらの特性に基づくものと考えられる。また、CXM をはじめとするセフェム薬は一般に *E. coli* の PBP 3 に非常に高い親和性を示し、その結果 *E. coli* 細胞を伸長させた後、溶菌させることは既に報告されている⁷⁾。これに対して、SY5555 は PBP 2 に高い親和性を示すため、セフェム薬と異なる変化を *E. coli* 細胞に惹起する⁸⁾と推察される。

一方、*in vivo* 抗菌作用の成績では、マウス実験の腹腔内感染症において、CPDX-PR, CFIX, CTM-HE, CXM-AX および CCL 等のセフェム薬がそれぞれの *in vitro* 抗菌力に応じた治療効果を示したのに対して、SY5555 の治療効果は *in vitro* 抗菌力を反映しなかった。この結果は特に、*E. coli* KC-14 および *K. pneumoniae* KC-1 感染症において顕著に認められた。マウスにおける SY5555 の血中濃度推移を検討したところ、本薬の Cmax, AUC はセフェム薬に比べ極めて小さかった。マウスにおいて SY5555 が期待された治療効果を示さなかったのはこの体内動態上の特性によるものと考えられる。

以上のように、新規経口セフェム薬 SY5555 は *in vitro* 抗菌作用においては既存の経口 β-ラクタム薬と異なる数々の優れた特徴を有するものの、マウスを用いた感染実験では良好な治療効果が得られていない。しかしながら、ヒトにおける SY5555 の体内動態が比較的良好であることが明らかとなりつつあるので⁹⁾、本薬の優れた *in vitro* 抗菌作用は臨床効果に反映されるものと推察される。

文 献

- 1) Nishino T, Maeda Y, Ohtsu E, Koizuka S, Nishihara T, Adachi H, Okamoto K, Ishiguro M: Studies on penem antibiotics II. *in vitro* activity of SUN5555, a new oral penem. *J Antibiotics* 42: 977~988, 1989
- 2) 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
- 3) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27: 559~560, 1979
- 4) Spratt B G, Pardee A B: Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254: 516~517, 1975

- 5) Waley S G : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139 : 789~790, 1974
- 6) Ross G W, Chanter K V, Harris A M, Kirby S M, Marshall M J, O'Challaghan C H : Comparison of assay techniques for β -lactamase activity. *Anal Biochem* 54 : 9~16, 1973
- 7) Spratt B G : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 2999~3003, 1975
- 8) 西野武志, 岡本清美, 岩尾佳世, 大槻雅子 : SY5555 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力. *Chemotherapy* 42(S-1) : 51~71, 1994
- 9) 中島光好, 植松俊彦, 吉長孝二, 末吉俊幸, 菊地康博, 平林 隆, 和田 徹, 杉田 修 : 新規ペネム系経口抗生物質 SY5555 の第 I 相臨床試験. *Chemotherapy* 41 : 1277~1292, 1993

In vitro and *in vivo* antibacterial activities of SY5555, a novel oral penem

Takaaki Nasu, Kiyomi Okamoto, Asako Motozaki,

Kayo Iwao and Toshihiro Nakanishi

Suntory Institute for Biomedical Research

1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of SY5555, a novel oral penem antibiotic, were investigated in comparison with those of other β -lactam antibiotics.

SY5555 showed a broad antibacterial spectrum against both aerobic and anaerobic bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. In particular, against gram-positive bacteria including *Enterococcus faecalis* and against anaerobic bacteria, the activity of SY5555 was superior to that of cefpodoxime, cefotiam and cefaclor (CCL).

Comparisons of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) revealed that twofold concentrations of MICs of SY5555 were sufficient to show bactericidal activity against all the bacterial strains tested.

The affinity of SY5555 for penicillin-binding proteins (PBPs) of both *Streptococcus pneumoniae* Type III and *E. faecalis* 6 was found to be higher than that of cefuroxime (CXM). In the case of *Escherichia coli* NIHJ JC-2, SY5555 showed high affinity to PBP 2, as did CXM to PBP 3.

SY5555 was found to be more stable to β -lactamases derived from several aerobic bacterial strains than any other compound tested, including ceftoram and cefixime (CFIX).

In the serial susceptibility testings against *Staphylococcus aureus* 209P JC-1 and *E. coli* NIHJ JC-2, the acquisition of resistance to SY5555 was similar to that to imipenem.

In experimental infection in mice, the therapeutic efficacy of SY5555 did not reflect the *in vitro* antibacterial activity. The pharmacokinetic behavior of SY5555 in mice was inferior to that of CFIX, cefuroxime axetil and CCL, which might be one of the reasons why SY5555 did not show excellent therapeutic efficacy in animals.