

Aminobenzyl-penicillin と Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の 協力作用に関する研究. II

病原細菌による Aminobenzyl-penicillin の分解に対する Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の阻止作用について

峯 靖 弘・西 田 実

藤沢薬品・中央研究所

五 島 嵯 智 子

東邦大学医学部・微生物学教室

(昭和 43 年 7 月 15 日受付)

Penicillinase(PC-ase) に安定な Cloxacillin, Oxacillin, Methicillin および Benzylcephalosporin C が *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus licheniformis*, *E. coli*, *Proteus morgani* および *Staph. aureus* などの産生する PC-ase に inhibitor として作用することについてはすでに報告されている^{2,5,7,9,10,11,12,13,22,23,24,28}。

著者らは前報で、広い抗菌スペクトラムをもつ AB-PC と、耐性 *Staph. aureus* に抗菌作用を示す MCI-PC との併用で試験管内抗菌作用が相乗的に増強されることを認めた³⁰。引き続き各種の病原細菌ならびに市販 PC-ase による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻害効果、および AB-PC を基質とした場合の PC-ase の inhibitor としての性状を検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1) 使用薬剤

Aminobenzyl-penicillin (Penbritin-Beecham, AB-PC), Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin (Orbenin-Beecham, MCI-PC), Benzyl-penicillin(PC-G) を用いた。

2) 使用菌株および市販 PC-ase

患者分離 *E. coli* K-11, *Klebsiella pneumoniae* K-5 は東邦大学医学部微生物学教室、患者分離 *Staph. aureus* No. 39 は医学研究所より分与されたもの、ならびに当研究所保存の *Proteus vulgaris* OX-19 株を使用した。

市販 PC-ase は東京顕微鏡院製(40 万 u/vial) を用いた。

3) AB-PC および MCI-PC の共存時における両者の分離定量法

検体を 100°C, 5 分間煮沸して PC-ase を不活性化し、適度に希釈した後、AB-PC は *E. coli* NIHJ, MCI-PC は AB-PC 耐性 *Staph. aureus* No. 20(MIC; AB-PC, >400 mcg/ml) を検定菌とするディスク法により分離定量した。

4) AB-PC および PC-G の β -lactam の分解率の測定

予め一定濃度の MIC-PC と incubate した PC-ase または無処理の PC-ase と基質(AB-PC または PC-G) 2 mg/ml とを、37°C で M/15 phosphate buffer (pH 7.0) 中で 1 時間 incubate し、その 1 ml を N/100 I₂ 溶液 10 ml に加え、15 分間密栓して放置後、N/100 Na₂S₂O₃ 溶液で逆滴定することにより β -lactam 環の開裂率を求めた。

5) AB-PC の PC 耐性大腸菌にたいする殺菌作用の測定

試験培地としてペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%, 食塩 0.25% のブイヨン(pH 7.0)を用い、これに BHI 培地中で 37°C, 20 時間培養した *E. coli* K-11 の培養液を 0.5% 接種した。この液を 200 ml の坂口コルペン中に 40 ml ずつ分注し、これに最終濃度として AB-PC 単独 40 mcg/ml, MCI-PC 単独 40 mcg/ml, AB-PC 20 mcg/ml+MCI-PC 20 mcg/ml となるよう PC 類を加え、37°C で振盪培養した(しかし 7~24 時間までは静置培養)。一定時間後に培養液の一定量を採取し、10 倍希釈法により生菌数を測定した。

なお生菌数の測定と併行して、培養液中の AB-PC の残存活性を *E. coli* NIHJ を検定菌とするディスク法により測定した。

6) 患者分離菌の Extracellular enzyme および Cell-bound enzyme による AB-PC の分解率の測定

Staph. aureus No. 39 よりつぎの方法で Extracellular enzyme および Cell-bound enzyme を調製した。すなわち *Staph. aureus* No. 39 を BHI broth 中で 37°C, 4 時間振盪しながら培養した。培養液を遠心分離し(10,000 rpm, 20 分), 上清を Extracellular PC-ase として用いた。沈澱した菌体を M/15 phosphate buffer (pH 7.0) で洗浄し、再び遠沈する。菌体を buffer に

再び浮遊せしめ、90分 sonic 処理 (20 KC) した。菌体の破壊液を 3,000 rpm で 15分遠心分離して得た上清液を Cell-bound PC-ase として用いた。

これらの酵素液に AB-PC 500 mcg/ml (単独), MCI-PC 250 mcg/ml (単独), AB-PC 500 mcg/ml + MCI-PC 250 mcg/ml をそれぞれ加え、37°C で振盪した。30分、1時間および2時間目に反応液の一定量を 100°C、5分間煮沸し、これを適当に稀釈して上記のディスク法により残存する AB-PC を定量した。

7) 市販 PC-ase による AB-PC の分解率の測定

最終濃度として 5,000 u/ml の市販 PC-ase を含む M/15 phosphate buffer (pH 7.0) に、表 2 に示すような濃度に AB-PC または MCI-PC および両者の混合液をそれぞれ添加し、37°C で振盪、1時間および3時間目に一定量を採り、等容量の 99% エタノールを添加して 30分間静置し、AB-PC および MCI-PC の残存量をディスク法により分離測定した。

8) 各種の患者分離菌の産生する粗 Cell-bound PC-ase による AB-PC の β -lactam 分解率の測定

患者分離 *Staph. aureus* No. 39, *E. coli* T-20, *Klebsiella pneumoniae* K-5, *Proteus vulgaris* OX-19 より前記の方法で得られた粗 Cell-bound PC-ase 液に最終濃度として、AB-PC 2 mg/ml, MCI-PC 2 mg/ml および AB-PC 2 mg/ml + MCI-PC 2 mg/ml を加え、37°C で 30分、1時間、1.5時間、2時間 incubate し上記の iodometric assay により β -lactam の分解率を測定した。また AB-PC の量を変えた他の目的の実験も、この方法に準じて行なった。

9) MCI-PC による Cell-bound PC-ase の不活性化実験

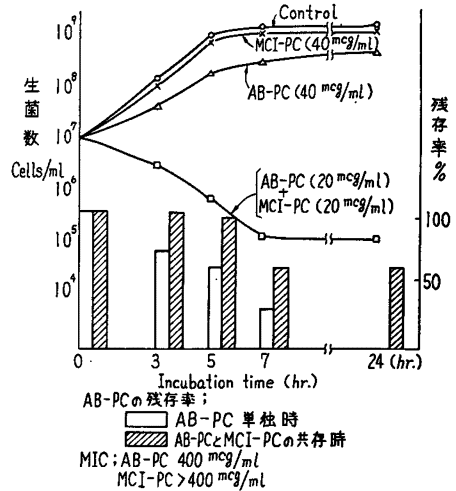
Staph. aureus No. 39, *E. coli* T-20 より調製した粗 Cell-bound PC-ase 液に MCI-PC 4 mg/ml (最終濃度) を添加し、あらかじめ 37°C で 5, 10, 20, 40 および 60分間 incubate した。ついで基質 AB-PC 1 mg/ml あるいは PC-G 1 mg/ml を添加後 37°C で 1時間 incubate し、iodometric assay により AB-PC あるいは PC-G の残存量を測定した。この実験で MCI-PC を添加しない場合の基質の分解量を 100 とし、MCI-PC 添加時の基質の分解量より残存率を求めた。

実験結果

(1) AB-PC 耐性大腸菌にたいする AB-PC の殺菌作用と MCI-PC の添加効果

図 1 に示すとおり、AB-PC および MCI-PC に高度耐性の *E. coli* K-11 (MIC: AB-PC 400 mcg/ml, MCI-PC >400 mcg/ml) の増殖培地に、AB-PC および MCI-PC をそれぞれ 40 mcg/ml (MIC の 1/10 濃度またはそ

図 1 AB-PC と MCI-PC の共存時の患者分離大腸菌 K-11 にたいする殺菌作用と AB-PC の不活性化との関連性



れ以下) を添加しても、菌の増殖阻害はおこらず、対照の無添加時に近い増殖傾向を示した。これにたいし AB-PC 20 mcg/ml + MCI-PC 20 mcg/ml (両 PC の合計濃度で 40 mcg/ml) の共存によつて殺菌効果の著明な増強が認められた。

つぎにこの条件下における AB-PC の残存量を AB-PC 単独と MCI-PC 共存時について比較した。すなわち 7時間目において AB-PC 単独時では、添加量の 25%, 共存時で 60%, 24時間目では、全く活性が認められなかつたが、共存時では 60% の AB-PC の残存活性が認められた。この結果から上記の AB-PC と MCI-PC

表 1 患者分離黄色ブドウ球菌 (No. 39) による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻止効果

Enzyme & Penicillins	(AB-PC の分解率 %*)		
	Incubation times (hr).		
	0.5	1	2
Extracellular enzyme			
AB-PC 500 mcg/ml	68	93	99
MCI-PC 250 mcg/ml	0	0	0
AB-PC 500 mcg/ml + MCI-PC 250 mcg/ml	0	0	52
Cell-bound enzyme			
AB-PC 500 mcg/ml	30	96	99
MCI-PC 250 mcg/ml	0	0	8
AB-PC 500 mcg/ml + MCI-PC 250 mcg/ml	22	32	46

* ディスク法 試験菌; AB-PC, *E. coli* NIHJ
MCI-PC *Staph. aureus* No. 20

の相乗効果は、MCI-PC による AB-PC の分解阻止が一因をなしていると思われる。

(2) 患者分離ブドウ球菌の Extracellular および Cell-bound enzyme による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻止効果

表1に示すごとく、AB-PC(500 mcg/ml) は、患者分離 *Staph. aureus* No.39 より得た Extracellular enzyme により 68%(30分), 93%(1時間), 99%(2時間) とひじょうに分解をうけ易い。いつぼう MCI-PC は同一条件で2時間まで全く分解をうけなかつた。つぎに AB-PC 500 mcg/ml に MCI-PC 250 mcg/ml が共存した場合、AB-PC はこの PC-ase の分解活性に抵抗し、1時間の incubation では分解をうけず、2時間ではじめて 52% の分解がおこつた。

いつぼう Cell-bound enzyme による AB-PC 500 mcg/ml の分解は 30%(30分), 96%(1時間), 99%(2時間) と分解をうけ易いが、MCI-PC 250 mcg/ml の共存によつて AB-PC の分解は 22%(30分), 50%(2時間) と著明な分解阻止が認められた。

(3) 市販 PC-ase による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻止効果

表2に示すように、反応液中 500 mcg/ml の濃度に存在する AB-PC は市販 PC-ase により、1時間で 58%、3時間で 83% と強く分解されたが、MCI-PC は反応液中に 500 mcg/ml または 250 mcg/ml のいずれの濃度においてもほとんど分解をうけなかつた。いつぼう AB-PC (500 mcg/ml) に MCI-PC が 250 mcg/ml, 500 mcg/ml または 1,000 mcg/ml の濃度に共存した場合、AB-PC の分解は1時間後でそれぞれ 45%、25%、

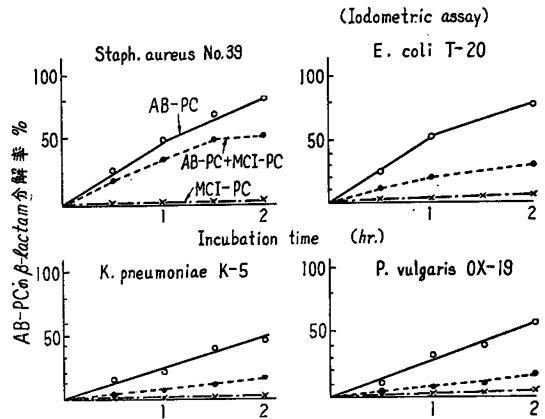
表2 市販 PC-ase による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻止作用

Penicillins & PC-ase		抗菌活性分解率 %*		
		Substrates	Incubation time (hr.)	
			1	3
PC-ase 5,000 u/ml	AB-PC 500 mcg/ml	AB-PC	58	83
	MCI-PC 500 mcg/ml	MCI-PC	0	0
	MCI-PC 250 mcg/ml	MCI-PC	0	9
	AB-PC 500 mcg/ml	AB-PC	45	54
	MCI-PC 250 mcg/ml	MCI-PC	0	8
	AB-PC 500 mcg/ml	AB-PC	25	55
	MCI-PC 500 mcg/ml	MCI-PC	0	7
	AB-PC 500 mcg/ml	AB-PC	39	48
	MCI-PC 1,000 mcg/ml	MCI-PC	0	0

市販 PC-ase: 東京顕微鏡院製 400,000 u/vial

* ディスク法

図2 患者分離菌の Cell-bound PC-ase による AB-PC の β -lactam の分解にたいする MCI-PC の阻止効果



39% および 3 時間後で 54%、55%、48% となつた。すなわち AB-PC と MCI-PC の濃度と分解阻止効果との間に一定の関係は認められなかつたが、いずれの場合も MCI-PC の共存により市販 PC-ase による AB-PC の分解は阻止された。

(4) 各種の患者分離菌の Cell-bound PC-ase による AB-PC の β -lactam の分解にたいする MCI-PC の阻止効果

図2に示すごとく、MCI-PC(2 mg/ml) を患者分離の *Staph. aureus* No. 39, *E. coli* T-20, *Kleb. pneumoniae* K-5 または *Proteus vulgaris* OX-19 より調製した粗 Cell-bound PC-ase とそれぞれ 2 時間 incubate しても、MCI-PC の β -lactam 環の開裂はほとんどおこらない。これにたいし AB-PC では同一条件における 2 時間の incubate で、添加量にたいし 70%(*Staph. aureus* No. 39), 83% (*E. coli* T-20), 37% (*Kleb. pneumoniae* K-5) および 60% (*Proteus vulgaris* OX-19) の β -lactam 環の開裂がおこる。しかし AB-PC(2 mg/ml) と MCI-PC(2 mg/ml) の共存により、AB-PC の分解率はそれぞれ 47% (*Staph. aureus* No. 39), 30% (*E. coli* T-20), 12% (*Kleb. pneumoniae* K-5) および 25% (*Proteus vulgaris* OX-19) と AB-PC の単独の場合に比較して著るしくその分解は阻止された。

(5) MCI-PC による β -lactamase の不活性化と Preincubation 時間との関係

表3および表4に示すごとく、*Staph. aureus* No. 39 の Cell-bound PC-ase と MCI-PC との反応で、60 分の Preincubation では基質として加えた AB-PC の分解は僅かに添加量にたいして 92% で分解をうけずに残存する。

また Preincubation せずに基質を MCI-PC と同時に PC-ase に加えた際でも約 47% の AB-PC が分解され

たにすぎなかつた。しかし基質を PC-G とした場合では、MCI-PC と PC-G の同時添加では PC-ase による PC-G の分解はほとんど阻止することはできない。ただ PC-G を基質とした場合でも MCI-PC と酵素の Preincubation を 5 分以上おこなうと、PC-G の分解は AB-PC を基質とした時と大差なかつた。いつぼう患者分離 *E. coli* T-20 では Preincubation の効果が非常に異なる。すなわち *E. coli* T-20 より得られた Cell-bound PC-ase の場合、*Staph. aureus* でみられたような両基質の分解性の極端な差は認められなかつた。すなわち AB-PC を MCI-PC と同時に *E. coli* T-20 Cell bound PC-ase に加えた場合の残存率は 64%、60 分の Preincubation では 79% であつた。PC-G を基質とした時では、同時添加で 55%、Preincubation 60 分で 57% の残存率を示した。

表 3 MCI-PC による患者分離黄色ブドウ球菌 (No. 39) の β -lactamase 活性の不活化と Preincubation 時間との関係

Preincubation times (min.)	Substrates	
	AB-PC	PC-G
60	92	92
40	82	84
20	75	63
10	75	61
5	65	58
0	53	3

* Iodometry

反応条件

- 1) Preincubation (37°C)
Cell-bound PC-ase 0.02 mg/ml
MCI-PC 4 mg/ml
- 2) AB-PC または PC-G 2 mg/ml 添加
37°C, 1 時間反応

表 4 MCI-PC による患者分離大腸菌 (T-20) の β -lactamase 活性の不活化と Preincubation 時間との関係

Preincubation times (min.)	Substrates	
	AB-PC	PC-G
60	79	57
40	76	57
20	74	55
10	69	55
5	66	55
0	64	55

表 3 と同じ条件

考 察

AB-PC が有用な抗生物質として広く臨床的に利用されていることは周知のとおりである^{6,8)}。しかし最近、AB-PC 耐性菌の増加の傾向から、この種の菌を起因菌とする感染症の治療にたいし新しい方法が要求されつつある。一般的にはこれを解決する方向として、AB-PC 耐性菌に有効な、より広い抗菌性をもつ抗生物質の開発、または AB-PC の耐性菌にたいする弱められた抗菌活性を、なんらかの手段で回復するという方向が考えられる。われわれは本報では後者の立場での検討を試みた。一般に PC 耐性黄色ブドウ球菌または PC 耐性グラム陰性菌にたいする AB-PC の感受性の低下は、これらの菌の PC-ase (β -lactamase) による AB-PC の分解によると考えられる^{1,4,5,14,15,17,18,26)}。

いつぼう Oxacillin ならびに Methicillin などの β -lactamase に安定な PC 類が β -lactamase の Competitive inhibitor として作用することが報告されている^{19,22,23)}。われわれは Oxacillin, Methicillin などと同様に PC-ase に安定な MCI-PC が AB-PC にたいする β -lactamase の inhibitor として、どのような活性をもっているかについて検討した。

われわれは AB-PC および MCI-PC に高度耐性の患者分離 *D. coli* K-11 を用いた実験で、両 PC の低濃度 (1/20 MIC) における共存で、著明な殺菌効果の増加と AB-PC の分解の抑制効果が認められた。すなわち MCI-PC が抗菌作用を殆んど示さない上記の試験菌株 (MCI: >400 mcg/ml) でも PC-ase inhibitor としての活性があり、また AB-PC の殺菌作用の増強が認められたことは興味深い。ただ MCI-PC による PC-ase の不活性化と両者の相乗効果との相関性についてはなお充分明らかではない。SMITH および HAMILTON らは PC-ase はその bacterial source によつて基質特異性が異なることを報告している^{16,20,21,26,27,29)}。われわれは患者より分離した数種の病原細菌の AB-PC- β -lactamase 活性にたいする MCI-PC の阻害効果を比較したところ、それらの細菌の AB-PC を基質とした際の MCI-PC の不活性化効果は必ずしも一定でなかつた。

また GOUREVITCH らは *Staph. aureus* の PC-ase による PC-G の分解は Methicillin と酵素を予め反応せしめた場合にのみ阻止されると報告している¹²⁾。われわれは患者分離の *Staph. aureus* No. 39 および *E. coli* T-20 より得た粗 Cell-bound PC-ase にたいする MCI-PC の不活化実験で、*Staph. aureus* No. 39 由来の PC-ase と MCI-PC (阻害剤) および PC-G (基質) の同時添加では PC-G の分解阻止は認められなかつた。すなわちここに用いた PC-ase と PC-G との反応速度は、MCI-PC

による PC-ase の不活性化の速度よりも大きいと考えられる。しかし同一条件で AB-PC を基質とした場合には、酵素および MCI-PC の同時添加でも AB-PC の分解阻害が認められた。この結果はここで用いた *Staph. aureus* の β -lactamase が PC-G と強い親和性をもつためと考えられる。

しかし *E. coli* T-20 由来の Cell-bound PC-ase の場合、基質および阻害剤の同時添加では AB-PC と PC-G の分解率の間には大差がなかった。われわれの上記の実験結果にたいし、MCI-PC は AB-PC または PC-G よりも β -lactamase にたいしより親和性が大きいであるという報告があるが、これは β -lactamase の source および精製度などが異なるので必ずしも同一に論じられない。

以上、われわれは病原細菌にたいする AB-PC と MCI-PC の共存下で試験管内抗菌作用の相乗的増強を認めたが、このような事実は単に AB-PC の細菌による分解が MCI-PC の存在下では抑制されるという、いわば消極的な事実では充分説明できないと思われるので今後さらに検討を加えたいと考えている。

要 約

各種の病原細菌の産生する PC-ase による AB-PC の分解にたいする MCI-PC の阻止作用を検討した。また AB-PC と MCI-PC の共存時の殺菌作用についても検討を加えた。

1) AB-PC および MCI-PC に高度耐性の患者分離 *E. coli* K-11 にたいし、両者の共存下では極めて低濃度 (MIC の 1/10 またはそれ以下) において著明な殺菌効果が認められた。またこの条件下において、MCI-PC の共存によつて病原細菌による AB-PC の分解が著明に阻止された。

2) 患者分離 AB-PC 耐性 *Staph. aureus* No. 39 より得た Extracellular PC-ase および Cell-bound PC-ase による AB-PC の分解にたいして MCI-PC は同程度の阻止作用を示した。

3) 患者分離 *Staph. aureus* No. 39 をはじめとする種々の病原細菌より得た粗 PC-ase による AB-PC の β -lactam 環の開裂は、いずれも MCI-PC の存在下に阻止されたが、その阻止効果は一定ではない。

4) *Staph. aureus* No. 39 より分離した Cell-bound PC-ase による AB-PC の分解は、反応開始時に MCI-PC を同時添加することによつて、そうとう阻止されるが、PC-G を基質とした場合には、MCI-PC と Preincubation しなければ阻止効果は認められない。

稿を終るにあたり、藤沢薬品・中央研究所 小原前所長、中野現所長および熊田部長の御援助を感謝します。

また実験に協力された深田志計実君に感謝します。

文 献

- 1) ABRAHAM, E. P. & CHAIN, E. B.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837~840, 1940
- 2) HENRY, R. J. & HOUSEWRIGHT, R. P.: Studies on penicillinase. 11. Manometric method of assaying penicillinase and penicillin, kinetics of the penicillin-penicillinase reaction and the effects of inhibitors on penicillinase. *J. Biol. Chem.* 167, 559~571, 1947
- 3) ABRAHAM, E. P. & NEWTON, G. G. F.: A comparison of the action of penicillinase on benzylpenicillin and cephalosporin N and the competitive inhibition of penicillinase by cephalosporin C. *Biochem. J.* 63, 628~634, 1956
- 4) ROLINSON, C. N., BATCHELER, F. R., BUTTERWORTH, D., *et. al.*: Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. *Nature* 187, 236~237, 1960
- 5) KNOX, G. N. & SMITH, J. T.: The nature of penicillin resistance in *Staphylococci*. *Lancet* Sept. 2. 520~522, 1961
- 6) ROLINSON, G. N. & STEVENS, S.: Microbiological studies on a new broad spectrum penicillin, Penbritin. *Brit. Med. J.* ii, 191~196, 1961
- 7) SAZ, A. K., LOWERY, D. L. & JACKSON, L. J.: *Staphylococcal penicillinase*. 1. Inhibition and stimulation of activity. *J. Bact.* 82, 298~304, 1961
- 8) KNOX, R. & SMITH, J. T.: Antibacterial activity, penicillinase stability and inducing ability of different penicillins. *J. Gen. Microbiol.* 29, 471~479, 1962
- 9) NOVICK, R. P.: *Staphylococcal penicillinase and the new penicillin*. *Biochem. J.* 83, 229~235, 1962
- 10) CROMPTON, B., JAGO, M., CRAWFORD, K., NEWTON, G. G. F. & ABRAHAM, E. P.: Behaviour of some derivatives of 7-aminocephalosporanic acid and 6-aminopenicillanic acid as substrate, inhibitor and inducers of penicillinase. *Biochem. J.* 83, 52~63, 1962
- 11) SMITH, J. T., HAMILTON-MILLER, J. M. T. & KNOX, R.: Isoxazolyl penicillin and penicillinase. *Nature* 195, 1300~1301, 1962
- 12) GOUREVITCH, A., PURSIANO, T. A. & LEIN, J.: Inactivation of *staphylococcal penicillinase* by reaction with resistant penicillins. *Nature* 195, 496~497, 1962
- 13) GARBER, N. & CITRI, N.: The interaction of penicillinase with penicillins. 1. Effect of substrates and of a competitive inhibitor on native and urea-treated enzyme. *Biochem. Biophys. Acta* 62, 385~396, 1962

- 14) SMITH, J. T.: Penicillinase and ampicillin resistance in a strain of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 30, 299~306, 1963
- 15) AYLIFFE, G. A. J.: Ampicillin inactivation and sensitivity of coliform bacilli. J. Gen. Microbiol. 30, 339~348, 1963
- 16) SMITH, J. T. N & HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Difference between penicillinase from gram-positive and gram-negative bacteria. Nature 197, 976~978, 1963
- 17) PERCIVAL, A., BRUMFITT, W. & LOUVAIS, J. DE: The role of penicillinase in determining natural and acquired resistance of gram-negative bacteria to penicillins. J. Gen. Microbiol. 32, 77~89, 1963
- 18) BATHELOP, F. R., CAMERON-WOOD, J., CHAIN, E. B. & ROLINSON, G. N.: Studies on penicillinase produced by a strain of *Staphylococcus aureus*. Proc. Roy. Soc. 158, 311~328, 1963
- 19) KNOX, R. & SMITH, J. T.: Stability of methicillin and cloxacillin to staphylococcal penicillinase. Brit. Med. J. ii, 205~207, 1963
- 20) HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Penicillinase from *Klebsiella aerogenes*. A comparison with penicillinase from gram-positive species. Biochem. J. 87, 209~214, 1963
- 21) HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Inhibition of penicillinase from gram-positive and gram-negative bacteria by substrate analogues. Nature 201, 999~1001, 1964
- 22) SUTHERLAND, R. & BATCHELOR, F. R.: Synergistic activity of penicillins against penicillinase-producing gram-negative bacilli. Nature 201, 868~869, 1964
- 23) CITRI, N., GARBER, N. & KALKSTEIN, A.: The interaction of penicillinase with penicillins. III. Comparison of exopenicillinase preparations of various origins. Bioch. Biophys. Acta 92, 572~581, 1964
- 24) HAMILTON-MILLER, J. M. T., SMITH, J. T. & KNOX, R.: Potentiation of penicillin action by inhibition of penicillinase. Nature 201, 867~868, 1964
- 25) POLLOCK, M. R.: Enzymes destroying penicillin and cephalosporin. Antimicrob. Agents & Chemoth. 292~301, 1964
- 26) SABATH, L. D., JAGO, M. & ABRAHAM, E. P.: Cephalosporinase and penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. Biochem. J. 96, 739~752, 1965
- 27) HAMILTON-MILLER, J. M. T., SMITH, J. T. & KNOX, R.: Interaction of cephaloridine with penicillinase-producing gram-negative bacteria. Nature 208, 235~237, 1965
- 28) CYNTHIA H. O'CALLAGHAN & MUGGLETON, P. W.: The action of cephaloridine with cloxacillin or methicillin against β -lactamase-producing gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 48, 449~460, 1967
- 29) DYKE, K. G. H.: Substrate-specific inactivation of staphylococcal penicillinase. Biochem. J. 103, 641~646, 1967
- 30) 峯 靖弘, 西田 実, 五島 瑛智子: Aminobenzylpenicillin と Methylchlorophenylisoxazolylpenicillin の協力作用に関する研究. I. 試験管内抗菌作用. Chemotherapy 17, 974~978, 1969

STUDIES ON THE SYNERGISTIC ACTION OF AMINO BENZYL-PENICILLIN AND METHYLCHLOROPHENYLISOXAZOLYL-PENICILLIN

(2) Preventive Activity of MCI-PC for Microbial Degradation of AB-PC
by Some Pathogenic Bacteria

YASUHIRO MINE & MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka

SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo

1) The combination of AB-PC with MCI-PC showed excellent bactericidal activity, even at the low concentration (1/20 MIC) which was inactive in both antibiotics alone, against a AB-PC and MCI-PC resistant strain of *E. coli* isolated from a patient. Then in this case, the microbial degradation of AB-PC by this strain was highly prevented in presence of MCI-PC.

2) The enzymatic degradation of AB-PC by extracellular and cell-bound PC-ase, obtained from a AB-PC resistant strain (No. 39) of *Staph. aureus*, were at same degree prevented in presence of MCI-PC.

3) The β -lactam hydrolysis of AB-PC by the crude PC-ase from several pathogenic bacteria were

prevented in presence of MCI-PC, but the rates of hydrolysis were not constant among these bacteria used.

4) In the experiment in which the β -lactam hydrolysis of AB-PC and PC-G by the PC-ase was determined, when inhibitor (MCI-PC) added to the incubation mixture of substrate (AB-PC or PC-G) with the PC-ase at start, a marked difference was found between the rates of β -lactam hydrolysis of AB-PC and PC-G by the cell-bound PC-ase from *Staph. aureus* No. 39. Namely, the β -lactam of PC-G was almost hydrolysed with this enzyme (the residual activity; 3%) during incubation, while the β -lactam hydrolysis of AB-PC was remarkably prevented under same condition (the residual activity; 53%).