

## Carbenicillin に関する基礎的研究

西田 実・松原忠雄・峯 靖弘

奥井正雄・横田好子

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

(所長：中野浩博士)

五島差智子・桑原章吾

東邦大学医学部微生物学教室

Beecham 研究所において新しく開発された Carbenicillin ( $\alpha$ -Carboxybenzyl-penicillin, CB-PC) は図 1 に示すように、PC-G の benzyl 基の  $\alpha$  位に carboxyl 基を導入した新合成 PC である。

われわれは CB-PC の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用、吸収、排泄その他の生物学的性格を検討したのでその結果を報告する。

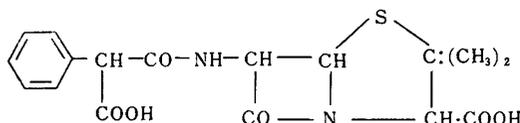


図 1 Carbenicillin の化学構造式

#### 実験材料および実験方法

##### (1) 供試菌株

*Staph. aureus*, *E. coli*, *Pseud. aeruginosa*, *Proteus* その他の患者分離菌のほとんどは東邦大学病院中検で分離されたものを使用した。

またグラム陰性桿菌研究会に所属する機関において分離された171株の新鮮分離 *Pseudomonas* が試験菌株として用いられた。

##### (2) 使用薬剤

CB-PC としては Beecham 研究所より分与された Na 塩の原末を使用した。

また対照薬剤として、Gentamicin (GM), Kasugamycin (KSM), Colistin methansulfonate (CL-M), Polymyxin B (PL-B) および Ampicillin (AB-PC) を用いた。

##### (3) 試験管内抗菌作用

一般に試験管内抗菌作用はつぎのような方法によつて測定した。試験培地としてペプトン 1g, 肉エキス 1g, 食塩 0.25g, カンテン末 1.5g を精製水 100ml に溶解し、pH を 7.0 としたものを使用した。種々の濃度に CE-PC を含む上記のカンテン平板上に、肉汁ブイヨン

中で 37°C, 20 時間前培養した菌液を 1 白金耳、画線接種した。MIC は 37°C, 20 時間培養後に菌の発育を観察し、完全に菌の発育を阻止した最小濃度をもつてあらわした。なお *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* については試験培地にウサギ脱センイ血液を、前培養培地にはウサギ血清をいずれも 10% の割合に添加した。

#### (4) 抗菌作用に対する各種の因子の影響

##### a) 培地の種類と MIC

各種の培地における CB-PC の抗菌作用は *Staphylococcus aureus* 1 株, *Escherichia coli* 2 株および *Pseudomonas aeruginosa* 2 株を試験菌とし、普通カンテン培地、ハート・インヒュジョン、トリプトソイ、ミューラー・ヒントソイ、ブレイン・ハート・インヒュジョンなどの各カンテン培地に前培養菌液 ( $10^8$ /ml) を 1 白金耳接種した。37°C, 20 時間培養後、常法どおり MIC を判定した。

##### b) 培地 pH と MIC の関係

pH 6.0~8.0 の間の異なる pH に調整した 5 種類のカンテン培地に種々の試験菌株の前培養液 ( $10^8$ /ml) を 1 白金耳接種した。37°C, 20 時間培養後、常法どおり MIC を判定した。

##### c) 接種菌量と MIC の関係

*Staph. aureus* をはじめとして、8 種の菌株を用いて接種菌量の影響を検討した。これらの試験菌の前培養液 ( $10^8$ /ml) を希釈し、各希釈液の 1 白金耳をカンテン平板に接種した。MIC の判定は常法にしたがっておこなつた。

##### d) 血清添加の影響

CB-PC の抗菌作用にたいする血清の影響は *Staph. aureus* 209-P, *E. coli* NIHJ, *Proteus mirabilis* および *Pseudomonas aeruginosa* NCTC-10490 を試験菌として実験した。CB-PC を所定濃度に含む肉エキスブイヨンに、ウサギ血清を 10% および 50% の割合に加えたも

のを試験培地とした。この培地 100 ml あたり、試験菌の前培養液 0.5 ml を加え、37°C、20 時間培養後、MIC を判定した。

#### (5) 殺菌作用

CB-PC の MIC が 50 mcg/ml の *Proteus vulgaris* を試験菌とし、0.5% 肉エキスブイオンに試験菌が  $10^6$ /ml となるように接種した。この培地に CB-PC を最終濃度として 1/2 MIC, MIC, 2 MIC と添加し、37° で 7 時間振とう、その後 24 時間、37°C で放置した。この間一定間隔で培養液中の生菌数を算定した。

#### (6) 試験管内耐性獲得実験

試験菌として *Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ を用いた。ブイオン中で 37°C、20 時間を 1 世代とする増量継代法にしたがつて耐性獲得傾向を観察した。

#### (7) マウスの実験的感染症にたいする効果

実験マウスとして dd 系♂、17~21g、1 群 7~10 匹を使用した。*Staph. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* の菌液をマウスあたり  $1 \times 10^7$  ~  $1.2 \times 10^8$  静脈内 (*Staph. aureus*) または腹腔内に接種した。薬剤は皮下投与し、感染菌種により 1 回 (感染 1 時間後)、2 回 (1 時間後と 4 時間後) および 3 回 (30 分、1 時間、3 時間後) の 3 方法に分けた。薬剤の効果は感染後 8 日観察し、生存マウス数から ED<sub>50</sub> を求めた。

#### (8) 微生物学的定量法

本報に記載した CB-PC の定量は、つぎの方法にしたがつておこなった。

ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%, カンテン末 1%, pH 6.8~7.0 よりなるカンテン培地に、*B. subtilis* ATCC-6633 の孢子浮遊液を最終濃度で  $2 \sim 8 \times 10^8$ /ml となるよう接種した。この菌接種培地の 10 ml をシャーレに分注した。この培地上に CB-PC 標準液または検液を含んだ抗生物質検定用ディスク (東洋濾紙製、直径 8 mm) をのせ、37°, 20 時間培養後、阻止帯を測定した。

#### (9) 血清中濃度

正常ウサギ (2.0~2.6 kg, ♂) に精製水に溶解した CB-PC を 20 mg/kg 1 回筋注し、投与後 15 分~5 時間までの各時間で採血し血清を分離した。血清中の抗菌活性物質を CB-PC を標準としてディスク法 (*B. subtilis* ATCC-6633) で測定した。

またイヌ (7.2~10 kg ♂) 6 匹にウサギの場合と同様、CB-PC を 20 mg/kg 筋注し、投与後 30 分~7 時間における血清中の抗菌活性を上記の方法で測定した。なお、イヌ 6 匹のうち 3 匹は CB-PC を 0.5% キンロカインに溶解して筋注した。

#### (10) 尿中排泄

ウサギの血清中濃度の測定時に、同一のウサギで採尿をおこない、尿中の活性物質濃度を血清中濃度の測定と同様におこなった。なお採尿は投与後 3 時間まで、3~5 時間、5~7 時間および 7~24 時間の間隔でおこなった。

#### (11) 胆汁中排泄

3 匹のウィスター系ラット (240~270 g) をエーテル麻酔し、胆管にビニールチューブを導入した。CB-PC の 20 mg/kg をこのラットに筋注し、投与 4 時間までの胆汁中の抗菌活性物質濃度を上記のごとく測定した。

#### (12) 組織内濃度

1 群 3 匹のウィスター系ラット (140~170 g) を実験前 1 日絶食し、CB-PC を 20 mg/kg 筋注した。投与後 30 分および 1 時間でラットを出血致死せしめ、各組織の一定量を採取し、ブレンダー中で 5 倍量のアセトンで抽出した。抽出液に等容量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加えた。つぎにこれを 3,000 r. p. m., 10 分間遠心分離し、得られた上清液を適当に稀釈して、これを試料としてディスク法 (*B. subtilis* ATCC-6633) で測定した。

#### (13) CB-PC 投与ヒト尿中の抗菌活性物質の検索

CB-PC を健康成人 3 名に 1 g, 1 回筋注し、5 時間まで得られた尿を集め、これを試料として検討した。

シリカゲル薄層クロマトグラフィーの展開溶媒として、n-ブタノール:酢酸:水=4:1:2 を使用した。検出試薬として BCG および KMnO<sub>4</sub> 試薬を用いた。またカンテン・ゲル電気泳動は東洋科学 AE-2 型の泳動装置を用い、450 V (約 90 mA)/14 cm の条件で 80 分間泳動処理をおこなった。この場合、抗菌活性物質の検出のため、カンテン層に肉エキス (0.3%), ペプトン (0.5%) を加え、*B. subtilis* ATCC-6633 をこの培地中  $10^8$ /ml 接種した。泳動終了後、37°C、20 時間放置し、カンテン上の活性物質の阻止円から同定をおこなった。

## 実験結果

### (1) 抗菌スペクトラム

CB-PC の抗菌スペクトラムを AB-PC, GM および KSM と比較した。表 1 に示すとおり、CB-PC は *Proteus vulgaris* および *Pseud. aeruginosa* にたいして AB-PC より強い抗菌活性をもつが、その他のほとんどの細菌には AB-PC より作用はやや弱い。またこの測定条件で KSM は認むべき活性を示さなかつたが、GM は *Streptococcus pyogenes* S-23 および *Diplococcus pneumoniae* III を除いて CB-PC よりも全般に抗菌活性が強かつた。以上の結果から、CB-PC は AB-PC と同様、広い抗菌スペクトラムをもち、*Pseud. aeruginosa* および

表1 Carbenicillin の抗菌スペクトル

試験菌種, 菌株	MIC: mcg/ml			
	CB-PC	AB-PC	GM	KSM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	1.25	0.125	0.25	>500
" " Newman	2.5	0.25	1.25	>500
" " Smith	1.25	0.125	0.25	500
" " Terashima	5.0	0.25	0.125	500
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	1.25	0.05	25	500
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	1.25	0.125	12.5	250
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8	12.5	1.25	1.25	>500
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	0.25	0.25	0.125	>500
" " PCI-219	1.25	0.125	0.125	>500
<i>Sarcina lutea</i> PCI-1001	0.25	0.012	1.25	500
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	1.25	0.5	2.5	125
<i>Shigella flexneri</i> 2a	12.5	5.0	2.5	125
" <i>sonnei</i> I	1.25	2.5	2.5	500
<i>Salmonella typhi</i> T-287	1.25	0.25	1.25	125
" " O-901	2.5	0.25	0.5	125
<i>Salmonella enteritidis</i>	50	5.0	5.0	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST-101	2.5	2.5	2.5	125
<i>Proteus vulgaris</i> IAM-1025	1.25	25	2.5	>500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM-1095	125	>250	25	250

試験培地: 普通カンテン  
 被検菌増菌培地: 普通ブイヨン  
 接種菌液と接種量:  $10^8$ /ml 菌液を1白金耳量

*Proteus* 属に AB-PC より高い抗菌活性をもつことがわかった。

(2) 新鮮患者分離株の CB-PC 感受性

最近, 患者より分離された *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* の CB-PC 感受性をカンテン平板希釈法で測定し, 感受性分布をしらべてみた。

a) *Staphylococcus aureus*

感受性を測定した 100 株のうち, 12.5 mcg/ml の MIC を示すものが 43 株と最も多く, 6.25 mcg/ml 以下が 19 株, 25 mcg/ml 以上が 38 株であった。100 株の試験株のうち PC-G に 100 mcg/ml またはそれ以上の高度耐性株は 58 株と過半数を示したが, CB-PC では 13 株で, PC-G との完全な交差性は認めなかった。また TC 高度耐性株との交差性も認められなかった (表 2)。

b) *Proteus* group

*Proteus* group の CB-PC 感受性は植菌量の影響が強い。 $10^7$ /ml の

表2 新鮮分離株の Carbenicillin 感受性分布 *Staphylococcus aureus* 100 株

薬剤	MIC : mcg/ml	MIC (mcg/ml)										
		$\leq 0.19$	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100 < mcg/ml
PC-G		5	8	4	6	3	3	1	3	9	9	49
CB-PC				1	9	4	5	43	18	7	10	3
TC		4	32	10	1	2	2	2	5	6		36

*Proteus* group

菌種	菌量/ml	MIC (mcg/ml)										
		$\leq 0.19$	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100 < mcg/ml
<i>P. vulgaris</i>	$10^8$										1	1
	$10^7$									2		
<i>P. mirabilis</i>	$10^8$			1	3		1	4	4	9	5	2
	$10^7$		8	15	4							2
<i>Retzgerella</i>	$10^8$			1					4	1	1	1
	$10^7$	1	2	3			2					
<i>Morganella</i>	$10^8$					1	5			2	1	
	$10^7$		2	3	2				2			
<i>Providencia</i>	$10^8$						2	1	2			
	$10^7$		1	2	2							

表3 *Pseudomonas* の Carbenicillin 感受性分布

(1) 東邦大中検分離株 (40株)

薬剤	菌量/ml	MIC										
		≦0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<mcg/ml
CB-PC	10 <sup>8</sup>								2	1	3	34
	10 <sup>6</sup>			1			3	4	26	2	1	3
GM	10 <sup>8</sup>						10	15	15			
	10 <sup>6</sup>				3	13	20	1	3			
		≦0.19	3.9	7.8	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	1000<u/ml
PL-B	10 <sup>8</sup>				5	24	11					
	10 <sup>6</sup>		3	10	27							
CL-M	10 <sup>8</sup>							4	20	14	2	
	10 <sup>6</sup>					4	5	30	1			

(2) Gram 陰性桿菌研究会蒐集株 (171株)

CB-PC	10 <sup>8</sup>						3	1	6	10	97	54
GM	10 <sup>8</sup>	1		2	2	38	97	24	5			2
PL-B	10 <sup>8</sup>					17	137	14				
CL-M	10 <sup>8</sup>								123	37	4	7

菌液を用いた場合, *Proteus vulgaris* の2株を除き, それらの大部分は 6.25 mcg/ml 以下の感受性を示した (表2)。

c) *Pseudomonas*

*Pseudomonas* の CB-PC 感受性は東邦大中検で分離された40株, およびグラム陰性桿菌研究会が蒐集した171株を試験菌として調査した。表3にこれらの菌の CB-PC 感受性を GM, PL-B および CL-M と比較した結果を示した。

東邦大学中検分離株およびグラム陰性桿菌研究会株とも 10<sup>8</sup>/ml の菌液を植菌した場合には CB-PC にたいする感受性は低い。しかし 10<sup>6</sup>/ml の場合 (東邦大株) では感受性は強くなる。すなわち 10<sup>8</sup>/ml で40株中37株が ≧100 mcg/ml の感受性であったが, 10<sup>6</sup>/ml では 25 mcg/ml 以下のものが34株となつた。GM, PL-B および CL-M は何れも CB-PC より全般に強い抗 *Pseudomonas* 作用を示した。

(3) 抗菌作用にたいする各種の因子の影響

a) 試験培地の種類

培地 pH を 7.4 に定め, 10<sup>6</sup>/ml 生菌量の菌液を用いて CB-PC の抗菌作用におよぼす培地の影響を検討した。試験菌として *Staph. aureus* 2株, *E. coli* 2株および *Pseud. aeruginosa* 1株の MIC を図のとおり6種のカンテン培地で常法によつて測定した。6種の培地のう

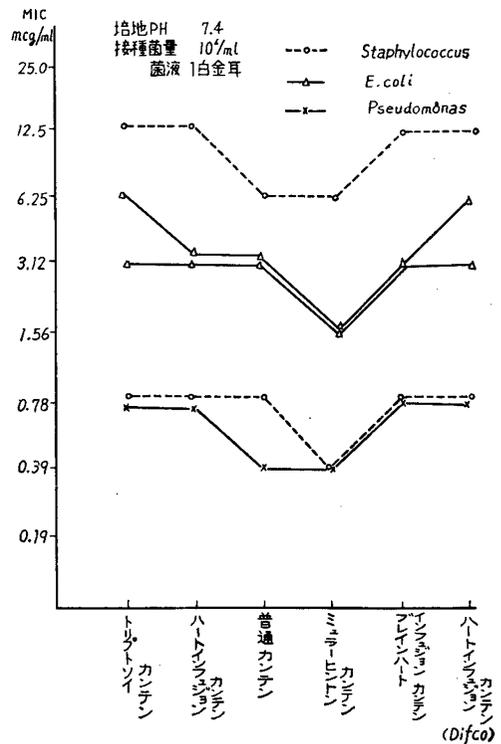


図2 試験培地の種類と Carbenicillin 感受性

表4 培地 pH と Carbenicillin の感受性値

MIC : mcg/ml

菌種	pH				
	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
<i>Staph. aureus</i> Terashima	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
" " 209-P	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
" " B-5	50	100	50	50	25
<i>B. subtilis</i> PCI	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>E. coli</i> T-1	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12
" " T-2	6.25	12.5	3.12	3.12	25
<i>Sh. flexneri</i>	1.56	1.56	0.78	1.56	12.5
<i>Sal. typhi</i>	6.25	3.12	3.12	12.5	6.25
<i>Klebsiella</i> T-1	100<	100<	100<	100<	100<
" T-2	100<	100<	100<	100<	100<
<i>Pseudomonas</i> S-1	100<	100<	100<	100<	100
" S-2	100<	100<	50	100<	100<
" S-3	25	100	50	100<	25
" TD-1	100<	100<	100<	100<	100<
" TD-2	100<	100<	100<	100<	25
" TD-3	100<	100<	100<	100<	100<
" TD-4	100<	100<	100<	100<	100<
" TD-5	100<	100<	100<	100<	100<
<i>Prot. mirabilis</i> T-2	100<	50	25	12.5	6.25
" <i>vulgaris</i> T-2	100<	100<	50	25	50

試験培地：普通カンテン培地

接種菌量：10<sup>8</sup>/ml 菌液を1白金耳量

ち、ミューラー・ヒントン培地で CB-PC の抗菌作用が最も強く表現され、普通カンテン培地がこれに次ぎ、逆にハート・インフュージョン、トリプトソイ培地では抗菌作用はやや弱くなる傾向がある。しかし、全般的にみて培地の影響はあまり強くない。

## b) 培地 pH の影響

8菌種、20株の CB-PC 感受性を pH 6.0 ~ 8.0 における5条件で比較した(表4)。試験培地の pH の変動によつて、試験菌の CB-PC 感受性はある程度の動揺を示したが、著明な特定の傾向はなかつた。

## c) 接種菌量の影響

表5のとおり、カンテン平板上に接種する菌液濃度を 10<sup>4</sup>/ml ~ 10<sup>8</sup>/ml とした場合の、CB-PC の MIC の変化を *Staph. aureus* 209-P 以下8菌株を用いて検討した。

接種菌量の影響は菌株によつて一様ではない。ただ CB-PC は AB-PC より接種菌量に鋭敏で、*Staph. aureus* B-5, *Sal.*

表5 接種菌量による Carbenicillin 感受性値の変動

MIC : mcg/ml

菌種	菌量/ml	薬 剤		菌種	菌量/ml	薬 剤	
		CB-PC	AB-PC			CB-PC	AB-PC
<i>Staph. aureus</i> 209-P	10 <sup>8</sup>	0.78	3.12	<i>Pseudomonas</i> TD-1	10 <sup>8</sup>	100	100<
	10 <sup>7</sup>	0.78	1.56		10 <sup>7</sup>	100	100<
	10 <sup>6</sup>	0.39	1.56		10 <sup>6</sup>	100	100<
	10 <sup>5</sup>	0.39	1.56		10 <sup>5</sup>	50	100<
	10 <sup>4</sup>	0.39	1.56		10 <sup>4</sup>	50	100<
<i>Staph. aureus</i> B-5	10 <sup>8</sup>	50	100<	<i>Pseudomonas</i> TD-2	10 <sup>8</sup>	100	100<
	10 <sup>7</sup>	6.25	100<		10 <sup>7</sup>	1.56	100<
	10 <sup>6</sup>	6.25	50		10 <sup>6</sup>	0.78	100<
	10 <sup>5</sup>	<0.19	<0.19		10 <sup>5</sup>	0.39	100<
	10 <sup>4</sup>	<0.19	<0.19		10 <sup>4</sup>	0.39	100<
<i>Sal. typhi</i> S-60	10 <sup>8</sup>	25	12.5	<i>Prot. mirabilis</i> T-2	10 <sup>8</sup>	100<	100<
	10 <sup>7</sup>	12.5	6.25		10 <sup>7</sup>	6.25	100<
	10 <sup>6</sup>	0.78	6.25		10 <sup>6</sup>	1.56	100<
	10 <sup>5</sup>	0.39	3.12		10 <sup>5</sup>	1.56	100<
	10 <sup>4</sup>	0.39	3.12		10 <sup>4</sup>	0.78	100<
<i>Sh. flexneri</i> 3a MZ	10 <sup>8</sup>	1.56	25	<i>Prot. vulgaris</i> T-2	10 <sup>8</sup>	100<	100<
	10 <sup>7</sup>	1.56	25		10 <sup>7</sup>	25	100<
	10 <sup>6</sup>	0.78	25		10 <sup>6</sup>	0.78	100<
	10 <sup>5</sup>	0.78	25		10 <sup>5</sup>	0.39	100<
	10 <sup>4</sup>	0.78	25		10 <sup>4</sup>	0.39	100<

試験培地：普通カンテン培地

*typhi* S-60, *Pseudomonas* TD<sub>2</sub>, *Prot. mirabilis* T-2, *Prot. vulgaris* T-2 などでは植菌量の 10<sup>8</sup>/ml から 10<sup>7</sup>/ml への比較的少ない変化で、抗菌価は著明に増強された。

d) 血清添加の影響

CB-PC の抗菌作用におよぼす血清の影響は、試験培地として用いたブイオンにウサギ血清を10%および50%の割合に添加し、MIC を測定することによって決定した。

*Staph. aureus* 209-P, *E. coli* NIHJ, *Proteus mirabilis*, *Pseud. aeruginosa* NCTC-10490 にたいする CB-PC の MIC は表 6 のとおりで、血清を試験培地に 10% または 50% の割合に添加しても著明に変動しなかつた。すなわち、各種の細菌にたいする CB-PC の抗菌作用は、血清の存在によつて阻害されないと考えられる。

表 6 血清濃度と Carbenicillin 感受性  
MIC : mcg/ml

試 験 菌 株	血 清 濃 度 %		
	0	10	50
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	2.5	5.0	5.0
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	2.5	2.5	5.0
<i>Proteus mirabilis</i>	10	10	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC-10490	5.0	2.5	2.5

試験培地：肉エキス・ブイオン pH 7.0      培養：37°C, 20時間  
接種菌量：10<sup>8</sup>/ml 菌液, 0.5%植菌      血清：ウサギ新鮮血清

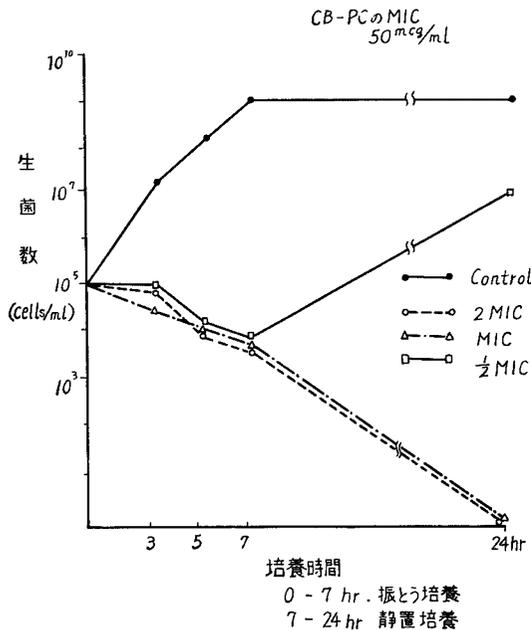


図3 *Proteus vulgaris* に対する Carbenicillin の殺菌作用

(4) 殺菌作用

CB-PC の感受性が 50 mcg/ml の *Proteus vulgaris* を試験菌として CB-PC の殺菌効果を検討した。結果は図 3 のとおりである。CB-PC を含まないブイオンに 10<sup>8</sup>/ml の濃度に試験菌を植菌すると、前述の培養条件で 7 時間まで著明な増菌傾向を示した。これにたいし培地に MIC またはそれ以上の濃度に CB-PC が存在すると、生菌数は減少し 24 時間後ではほとんど生菌は消失した。この結果から、CB-PC は他の PC 類と同様、MIC 付近の低濃度で強い殺菌性をもつことがわかつた。

(5) 試験管内耐性獲得

試験培地としてブイオンを用い、試験管内増量継代法で *Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ の耐性化を検討した。*Staph. aureus* 209-P では 20 代の継代で、CB-PC の MIC が 1.25 mcg/ml から 50 mcg/ml と 40 倍、AB-PC では同一条件で 0.1 mcg/ml から 10 mcg/ml と 100 培の耐性化がみられた。すなわち、このような条件では CB-PC と AB-PC の *Staph. aureus* 209-P にたいする試験管内耐性化の速さには大差はなかつた (図 4)。

*E. coli* NIHJ では同じ条件で、CB-PC の場合、8 代の継代で MIC が初代 2.5 mcg/ml から 5,000 mcg/ml と 2,000 倍に上昇

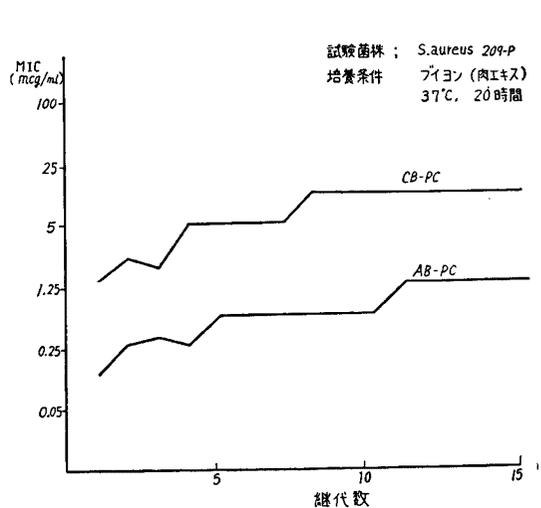


図4 *Staph. aureus* の Carbenicillin に対する試験管内耐性獲得

した。これにたいして、AB-PC は初代で 1 mcg/ml から 1,000 mcg/ml と 1,000 倍の耐性の上昇が認められた。

以上、CB-PC と AB-PC の試験管内耐性化を比較したが、両者の耐性化の傾向には大差がなかつた (図 5)。

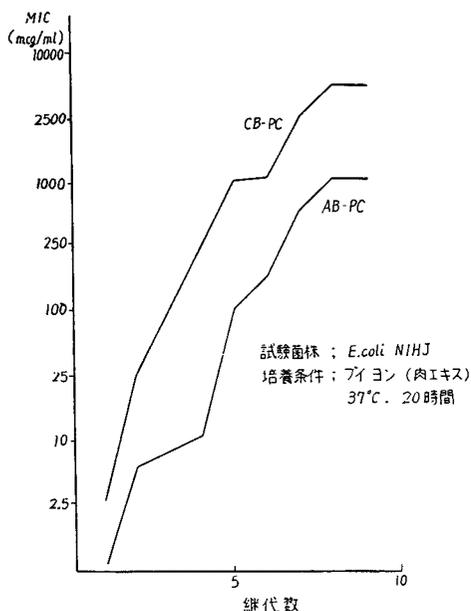


図5 E. coliのCarbenicillinに対する試験管内耐性獲得

(6) マウス実験的感染症にたいする治療効果

CB-PCに感受性の異なる患者分離 *Staph. aureus* 以下5種類の菌によるマウスの実験的感染症にたいし、表7に示したような条件でCB-PCを皮下注射し、感染8日目における生存率からED<sub>50</sub>を求めた。

この種のマウスの感染にたいして、CB-PCの効果は、対照としたAB-PCおよびPL-Bと比較して強くなかったが、*in vitro*の抗菌活性と比較的平行している点が注目される。また感染実験に使用した *E. coli* K-10およびK-11はAB-PCにたいする感受性が50mcg/mlで、CP、TCその他の抗生物質にも耐性を示す患者分離菌である。この種の菌株にCB-PCが比較的良好な効果を示したのは興味のある事実である。

7) 吸収と排泄

a) 血清中濃度

CB-PCをウサギに20mg/kg筋注(1回)し、投与後15分~5時間における血清中の抗菌活性物質を測定した(表8)。5例の結果では筋注後30分で最高血清中濃度に達し、その値は12.5~32.0mcg/mlであった。またウサギの場合、この投与量では2時間目には全例とも血清中に抗菌活性が認められたが、5時間では全例とも抗菌活

表7 Carbenicillinのマウス実験的感染症に対する治効

菌種	菌株	in vitro 感受性 (mcg/ml)			接種種	接種菌量 /mouse	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)		
		CB-PC	AB-PC	PL-B			CB-PC	AB-PC	PL-B
<i>Staph. aureus</i> **	STP	3.13	—	—	iv	1.9×10 <sup>8</sup>	1.73	<0.86	—
	T-1	12.5	—	—	"	1.2×10 <sup>8</sup>	>6.7	0.57	—
<i>E. coli</i> *	K-3	12.5	2.5	—	ip	5×10 <sup>8</sup>	8.9	1.6	—
	K-10	1.25	50.0	—	"	1.2×10 <sup>9</sup>	5.3	>18.5	—
	K-11	1.0	50.0	—	"	1.7×10 <sup>8</sup>	<1.6	16.3	—
<i>Prot. vulgaris</i> **	T-2	5.0	5.0	—	"	9×10 <sup>8</sup>	>9.1	5.7	—
<i>Prot. mirabilis</i> **	T-1	1.25	2.5	—	"	1×10 <sup>8</sup>	5.0	<1.5	—
	5551	1.25	2.5	—	"	2.5×10 <sup>8</sup>	2.58	0.55	—
<i>Pseud. aeruginosa</i> ***	PY-28	50.0	—	5.0	"	1×10 <sup>7</sup>	30.0	—	0.20
	T-2	5.0	—	5.0	"	1.5×10 <sup>8</sup>	>3.9	—	0.22

\*薬剤1回治療

\*\*薬剤2回治療

\*\*\*薬剤3回治療

表8 Carbenicillin筋注後の血清中濃度(ウサギ)

筋注: 20mg/kg

ウサギ: ♂ 2.0~2.6kg

mcg ml\*\*

ウサギ	時間	15 min.	30 min.	1 hr.	2 hr.	3 hr.	5 hr.
A ♂ 2.6kg		12.0	12.5	7.0	2.3	1.2	ND*
B ♂ 2.0		29.0	32.0	19.0	2.6	ND	ND
C ♂ 2.3		21.0	32.0	29.0	13.8	8.0	ND
D ♂ 2.3		16.2	16.2	8.2	1.6	ND	ND
E ♂ 2.1		19.0	24.7	15.3	4.3	0.3	ND
濃度範囲		12.0-29.0	12.5-32.0	7.0-29.0	1.6-13.8	<0.3-8.8	—

\*ND: <0.3mcg/ml

\*\*ディスク法: *B. subtilis* ATCC-6633

性は検出されなかつた (表8)。

イヌにウサギと同様 20 mg/kg の CB-PC を筋注した実験では、CB-PC を精製水で溶解した場合、および 0.5% キシロカインで溶解した場合 (各3例) とともに血清中濃度には有意差はない。またこの際の最高値は 11.5~16.5 mcg/ml (30分) で、抗菌活性物質は投与後5時間の血清にも認められた (表9)。

#### b) 尿中排泄

ウサギの血清中濃度の測定と併行して、尿中への活性物質の排泄量を測定した。20 mg/kg の1回の筋注後、活性物質の大部分は5時間までの尿中に排泄され、わずかに投与量の1%以下のものが5~7時間尿に排泄された。とくに3時間までに得られた尿には活性物質が高濃度に排泄された。CB-PC の尿中濃度の推移は、CB-PC

感受性菌による尿路系の感染にたいし、本物質が有効であることを示唆する (表10)。

#### c) 胆汁中排泄

ラットに 20 mg/kg 1回、CB-PC を筋注し、胆汁中への活性物質の排泄性を検討した。3例の結果では、24時間までの胆汁への排泄率は約15%で、その大部分は投与後2時間までに排泄された。投与後2時間までの胆汁中濃度は 266~451 mcg/ml となり、ウサギおよびイヌで得られた血清中濃度より高い値が得られた。したがって、CB-PC は AB-PC と同様に胆汁への移行性の高い抗生物質であるといえる (表11)。

#### d) 組織内濃度

ラットに CB-PC を 20 mg/kg 筋注した後、30分および1時間における各組織の抗菌活性を比較した。心、

表9 Carbenicillin 筋注後の血清中濃度 (イヌ)

		mcg/ml					
イヌ	時間	30 min.	1 hr.	2 hr.	3 hr.	5 hr.	7 hr.
A*	♂ 7.2 kg	13.3	8.6	5.5	2.3	0.3	<0.2
B*	♂ 9.2	11.5	10.5	6.3	3.5	0.4	<0.2
C*	♂ 10.0	15.0	10.5	4.4	2.0	0.2	<0.2
D**	♂ 9.3	16.5	9.7	4.8	2.4	0.2	<0.2
E**	♂ 7.8	13.6	8.6	5.5	2.8	0.7	<0.2
F**	♂ 9.9	12.5	8.4	5.0	2.7	0.4	<0.2
平均		13.7	9.4	5.3	2.6	0.4	<0.2

投与方法：イヌ (7.2~10 kg) 20 mg/kg 筋注

\*CB-PC を精製水に溶解

\*\*CB-PC を 0.5% キシロカイン液に溶解

表10 Carbenicillin 筋注後の尿中排泄 (ウサギ)

		20 mg/kg				
ウサギ	時間	0-3 hr.	3-5 hr.	5-7 hr.	7-24 hr.	総排泄
A	♂ 2.6 kg	5533 mcg/ml (55.4%)	225 mcg/ml (8.4%)	6.4 mcg/ml (0.2%)	—	32.6 mg (63.9%)
B	♂ 2.0	1560 " (50.8%)	312 " (32.0%)	5.7 " (0.2%)	—	33.2 (82.9%)
C	♂ 2.3	5525 " (72.0%)	825 " (16.4%)	60 " (1.0%)	0.24 mcg/ml (0.02%)	39.9 (89.3%)
D	♂ 2.3	963 " (78.5%)	63.8 " (5.4%)	13.5 " (0.2%)	—	38.7 (84.1%)
E	♂ 2.1	375 " (55.2%)	191.7 " (15.4%)	42.4 " (0.7%)	0.24 mcg/ml (0.06%)	30.3 (72.0%)
範囲		375-5533 mcg/ml (50.8-78.5%)	63.8-825 mcg/ml (5.4-32.0%)	5.7-60 mcg/ml (0.2-0.7%)	0-0.3 mcg/ml (0-0.06%)	30.3-39.9 mg (63.9-89.3%)

デイク法：B. subtilis ATCC-6633

表11 Carbenicillin 筋注後の胆汁排泄 (ラット)  
20 mg/kg

ラット	濃度 (mcg/ml)		排泄率 (%)		
	0-2 hr.	2-4 hr.	0-2 hr.	2-4 hr.	総排泄
No. 1	451	15.4	18.2	0.5	18.7
" 2	266	9.5	12.3	0.3	12.6
" 3	385	14.5	15.2	0.4	15.6

ラット: ウィスター系, 240~270 g  
測定法: *B. subtilis* ATCC-6633

肺, 肝, 脾, 腎の各組織のうち, 肝, 腎は30分および1時間  
で血清中濃度よりも高い活性物質濃度を示した。とくに血清中濃度が30分値, 19 mcg/ml から1時間値, 5.7  
mcg/ml とかなりの低下を示しているが, 腎内濃度は  
77 mcg/g (30分) から63 mcg/g (1時間) とその濃度の  
低下は少なく, 腎に集まった活性物質は高濃度で, かつ  
持続性があることがわかった (表12)。

表12 Carbenicillin 筋注後の組織内分布 (ラット)

組織	時間	0.5 hr.	1 hr.
	心		4.2 mcg/g
肺		6.2 "	" "
肝		50.5 "	22.0 "
脾		<2.7 "	<2.7 "
腎		77.0 "	63.3 "
血 清		19.0 mcg/ml	5.7 mcg/ml

投与方法: ウィスター系ラット (140~170 g) 1群3匹  
20 mg/kg, 皮下注

測定法: ディスク法, *B. subtilis* ATCC-6633

(8) ヒト尿中の抗菌活性物質の検索

健康成人に CB-PC を 1g, 1回筋注し, 5時間まで  
に排泄された尿を捕集し, これを試料として尿中活性物質  
の検索をおこなった。

a) 尿中活性物質の抗菌スペクトラム

*B. subtilis* ATCC-6633 を検定菌とし, ディスク法で  
まず尿中の抗菌活性物質の濃度を測定した。この値を基  
準として, 尿中の活性物質の抗菌スペクトラムを CB-PC  
のそれと比較した。結果は表13のとおりである。CB-PC  
が生体内で CB-PC とは抗菌スペクトラムの異なる物質  
、たとえば PC-G に変化すれば, グラム陰性菌にたい  
する抗菌作用が低下するはずである。表示のとおり, 尿  
中の活性物質の抗菌スペクトラムは CB-PC のそれと全  
体として変らなかつた。

b) 薄層クロマトグラフィー

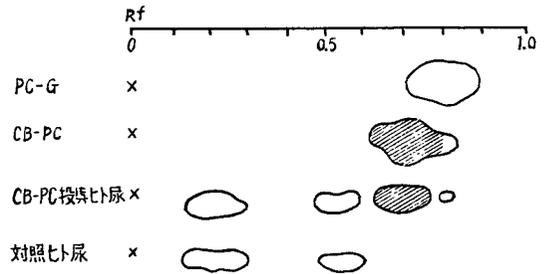
CB-PC 投与後に集めた尿試料のシリカゲル薄層クロ  
マトの結果は図6のとおりである。n-ブタノール: 酢

表13 Carbenicillin 投与ヒト尿中の活性物質の抗菌  
スペクトラム MIC: mcg/ml\*\*

試験菌株	CB-PC	5時間尿*
<i>Staph. aureus</i> 209-P	1.25	1.25
" " Newman	2.5	2.5
" " Terashima	5.0	5.0
" " Smith	0.5	1.25
<i>Strept. pyogenes</i> S-23	0.25	0.25
<i>Dipl. pneumoniae</i> III	1.25	1.25
<i>Coryn. diphtheriae</i> PW-8	12.5	12.5
<i>S. lutea</i> PCI-1001	0.25	0.125
<i>B. subtilis</i> PCI-219	1.25	2.5
" " ATCC-6633	0.5	1.25
<i>Sal. typhi</i> T-287	1.25	1.25
" " O-901	2.5	1.25
" <i>enteritidis</i>	25.0	25.0
<i>Kleb. pneumoniae</i> ST-101	5.0	12.5
<i>E. coli</i> NIHJ	2.5	2.5
<i>Sh. flexneri</i> 2a	12.5	12.5
" <i>sonnei</i> I	2.5	2.5
<i>Prot. vulgaris</i> IAM-1025	2.5	2.5
" " X-K	0.5	1.25
<i>Pseud. aeruginosa</i> IAM-1095	125.0	125.0

\*CB-PC 投与後, 5時間までに排泄された尿

\*\*ディスク法, *B. subtilis* ATCC-6633



展開溶媒: n-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:2)

検出: KMnO<sub>4</sub>, BCG

1%ヒト 1回筋注後5時間尿

図6 薄層 Chromatography

酸: 水 (4:1:2) で展開後, 検出試薬として BCG 指  
示薬および KMnO<sub>4</sub> 試薬を用いた。試料と同時に PC-G  
および CB-PC (投与したのと同じ Lot No. のもの) を  
展開した。クロマトグラムから明らかとなっており, 尿試料  
中の主要な呈色物質は, その Rf から CB-PC そのもの  
であると推定される。ただ CB-PC には少量の PC-G が  
混在していることが認められた。

## c) カンテン・ゲル電気泳動

実験の項に記載した条件で、尿試料のカンテン・ゲル電気泳動を行なった。Bioautography で *B. subtilis* の増殖阻止円の位置を PC-G および CB-PC と比較した。図7のとおり、尿試料中の抗菌活性物質は2コに分離し、それらは CB-PC および PC-G に対応した。ただ Bioautogram 上、CB-PC 標品に PC-G の混在が認められ、この標品中の両者の混合比は尿試料中のそれと大差がない (*B. subtilis* の CB-PC および PC-G 感受性は大きく異なるので、両者の阻止円の大きさは直接比較できない)。

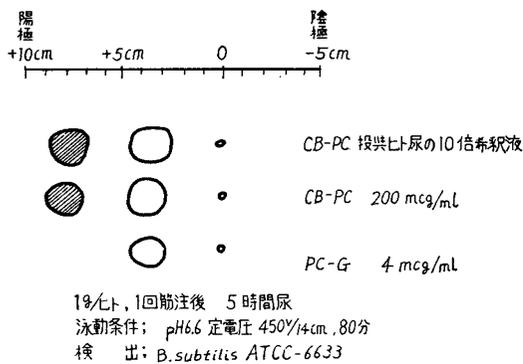


図7 カンテン・ゲル 電気泳動 Bioautography

以上の検討成績から、ヒトに投与された CB-PC は比較的安定で、PC-G に変化することなく CB-PC として尿中に排泄されるものと思われる。

## 考 察

CB-PC が PC-G および AB-PC と極めて類似した化学構造をもつた PC 誘導體であるにもかかわらず、抗菌作用の面で両者とはある程度異なつた性状をもっていることは興味のある事実である。周知のとおり、PC-G はグラム陰性菌群には抗菌活性が非常に弱い、CB-PC は AB-PC と同様にグラム陽性、陰性の両群に広い抗菌作用をもっている。また CB-PC は AB-PC と比較して、一部の菌を除いて全般に活性が低いが、ブ菌の感受性分布の観察からも明らかなように AB-PC よりも Penicillinase に対する抵抗が強く、また *Pseudomonas* や *Proteus* 群に対して少なくとも AB-PC より高い抗菌活性を示す点が注目された。CB-PC の *Pseudomonas* にたいする抗菌作用は GM などと比較するとかなり弱い<sup>1),2),3)</sup>。この点に関し KNUDSEN らは CB-PC の *Pseudomonas pyocyanea* にたいする完全発育阻止濃度は比較的大きい、植菌量を  $10^7$ /ml から  $10^6$ /ml に減

少すると、抗菌作用が著明に増強されると報告している<sup>4)</sup>。このように比較的少ない植菌量における CB-PC の抗菌活性の増強は、われわれの実験においても数種の菌で認められた。この場合、CB-PC の臨床的な抗菌効果が、どのような植菌条件において得られた成績と最も相関性が高いかという点は今後に残された問題であると思われる。

つぎに、われわれの実験では、*Pseudomonas* によるマウスの実験的感染症にたいし、CB-PC の治療効果は必ずしも強くはなかつた。しかし JONES<sup>5)</sup> らは、火傷マウスの実験的 *Pseudomonas* 感染にたいし、CB-PC の非経口投与で CL よりも有効で、GM と同程度の治療効果があつたと報告している。この原因として、CB-PC が非経口投与で生体内に高濃度に分布するためであると述べている。われわれも筋注した CB-PC が高濃度に血中に移行し、高い尿中排泄性を示すことを認めた。またラットを用いた実験で、少数例であるが胆汁中に相当量の活性物質が排泄されることがわかつた。このような CB-PC の実験動物における効率的な吸収性は、*Pseudomonas*, *Proteus* を含む各種の細菌による感染症にたいし、CB-PC が広範囲抗生物質として、臨床的に利用し得るということを示唆するものと考えている。とくに尿路感染症、胆道感染症については、この薬剤の高濃度の排泄が認められる事実から、もつとも効果が期待される。

## 要 約

(1) CB-PC は AB-PC とよく似た広域の抗菌スペクトルを示し、一般細菌に対する抗菌力は AB-PC よりややよわいが、Penicillinase に対する抵抗性が強く、また *Proteus* 群、*Pseudomonas* に対しては AB-PC より強い抗菌活性を示した。

(2) CB-PC の試験管内抗菌作用は培地の種類、培地の pH、血清の存在によつて強い影響をうけないが、植菌量の影響をうけやすい。

(3) CB-PC の抗菌作用は殺菌的である。

(4) ブイヨン中で、増量継代法で *Staph. aureus* 209-P および *E. coli* NIHJ の試験管内耐性の獲得を検討すると、AB-PC と同様の傾向を示した。すなわち、*Staph. aureus* では耐性化がおそく、*E. coli* では高度な、そして迅速な耐性化が認められた。

(5) 各種の患者分離菌 (*Staph. aureus*, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*) によるマウスの実験的感染症に、皮下投与で有効であつた。

(6) ウサギおよびイヌに 20 mg/kg, 1回、筋注したとき、一定時間まで有効濃度の活性物質が血清中に認めら

れた。また尿および胆汁中に高濃度の活性物質が検出された。CB-PC を筋注したラットの各組織から活性物質を確認した。

(7) 筋注した CB-PC は生体内で比較的安定で、PC-G へ変化せずにそのまま尿中に排泄された。

#### 文 献

- 1) JONES R. J. & E. J. L. LOWBURY : Prophylaxis and therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infection with carbenicillin and with genta-

micin. Brit. Med. J. 3 : 79~82, 1967.

- 2) 五島 瑛智子・桑原章吾 : Gentamicin の抗菌作用. Chemotherapy. 15 : 462~466, 1967.
- 3) BRUMFITT W., A. PERCIVAL & D. A. LEIGH : Clinical and laboratory studies with carbenicillin. Lancet i : 289~1293, 1967.
- 4) KNUDSEN E. T., G. N. ROBINSON & R. SUTHERLAND : Carbenicillin, a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Brit. Med. J. 3 : 75~78, 1967.

## FUNDAMENTAL STUDIES ON CARBENICILLIN

MINORU NISHIDA, TADAO MATUBARA, YASUHIRO MINE, MASAO OKUI  
& YOSHIKO YOKOTA

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

(Director : Dr. HIROSHI NAKANO)

SACHIKO GOTO & SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University  
School of Medicine, Tokyo

*In vitro* and *in vivo* evaluations as well as absorption excretion, and distribution in the body were investigated with carbenicillin, a new semi-synthetic penicillin.

This antibiotic has a wide spectrum against Gram-positive and Gram-negative species of bacteria, especially active at a certain level against strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus* group, which are highly resistant to ampicillin. It seemed likely that this drug possessed a certain stability against penicillinase because of the fact that some of the ampicillin-resistant strains showed to be considerably sensitive to carbenicillin.

*In vitro* activities of carbenicillin were not so markedly influenced by the kinds and pH of test medium, and the addition of serum to the medium, but changes of the inocula sizes caused considerable changes in MIC values. The MIC level of carbenicillin acted bactericidally. Repeated subculture of *staphylococci* and *E. coli* in nutrient broth containing increasing levels of carbenicillin resulted a step wise development of resistance, the rate of which was more rapid in *E. coli* than in *staphylococci*.

Subcutaneous treatments of experimental mice infections by various bacteria with carbenicillin were proved to be effective, if the causative organisms were sensitive *in vitro* against this drug.

Carbenicillin was administered by intramuscular injection to rabbit, rat and dog as a single dose of 20 mg/kg, and the levels of the drug in serum, urine, bile and tissues were investigated. Both in dog and rabbit peak serum levels were obtained 30 minutes after administration about 12.5~30 mcg/ml in rabbit and 15 mcg/ml in dog. The amounts of carbenicillin excreted in the urine during the first 7 hours in rabbit fluctuated between 65% and 80% of the given dose, and those excreted in the bile during the first 4 hours in rat fluctuated from 12 to 18% of the given dose. Tissue concentrations were relatively high in liver and kidney.

In human volunteers, thin layer chromatography and agar-gel electrophoresis of the urine sample showed that the antibiotic was excreted into the urine without conversion to penicillin G after intramuscular administration.