

新しい合成ペニシリン Aminocyclohexyl-Penicillin

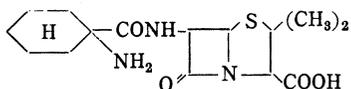
に関する細菌学的研究

中沢昭三・小野尚子・西野武志・川辺晴英
大矢依子・高田昭子・端野順子・右田洋子
京都薬科大学微生物学教室

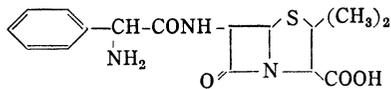
(昭和 44 年 6 月 2 日受付)

はじめに

Aminocyclohexyl-Penicillin は 1967 年米国 Wyeth 社の ALBURN らにより合成された。本物質の試験管内抗菌力に関しては ROSENMAN らの研究が報告され、またマウス実験的感染症の治療実験に関しては HOPPER, YURCHENCO らによつて報告されている。化学名は 6-(1-Aminocyclohexane carboxamido) penicillanic acid であり、次のような化学構造を示す。



Aminocyclohexyl penicillin



Aminobenzyl penicillin

第 1 表 AC-PC, AB-PC のグラム陽性菌群に対する抗菌スペクトラム

菌種		薬剤名	AC-PC	AB-PC
球 菌	<i>Staph. aureus</i> 209-P		0.78	0.19
	<i>Staph. aureus</i> E-46		0.78	0.19
	<i>Staph. aureus</i> Neuman		1.56	0.19
	<i>Staph. aureus</i> Smith		0.39	0.09
	<i>Staph. albus</i>		0.78	0.19
	<i>Staph. citreus</i>		0.39	0.19
	<i>Strept. hemolyticus</i> S23		0.045	0.01
	<i>Strept. viridans</i>		6.25	1.56
	<i>Strept. faecalis</i>		6.25	1.56
	<i>Sarcina lutea</i>		0.012	<0.006
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III		0.19	0.045	
桿 菌	<i>Cory. diphtheriae</i>		0.39	<0.19
	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219		1.56	0.39
	<i>Bacillus anthracis</i>		0.19	0.045
真 菌	<i>Clostridium tetani</i>		12.5	1.56
	<i>Clostridium welchii</i>		3.12	1.56

MIC(mcg/ml)

今回、私共も細菌学的面から本物質の評価を行なつた結果、次のような成績が得られたので報告する。

試験管内抗菌力

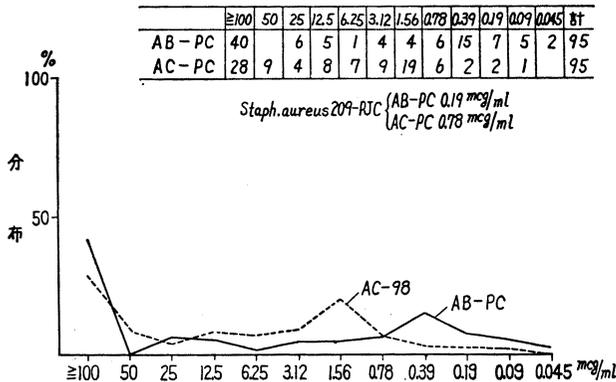
教室保存の標準菌種に対する Aminocyclohexyl Penicillin (AC-PC) の抗菌力を Aminobenzyl Penicillin (AB-PC) を比較薬剤として、日本化学療法学会感受性測定法に準じて実施した。なおレンサ球菌、肺炎球菌、ジフテリア菌については 10% 血液加寒天平板を、リン菌、ズイ膜炎菌については G・C 培地を、嫌気性菌群の破傷風菌、ウェルシー菌についてはチオグリコール酸塩

第 2 表 AC-PC, AB-PC のグラム陰性菌群に対する抗菌スペクトラム

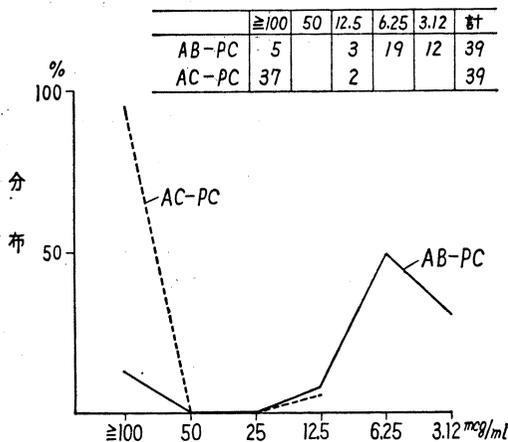
菌種		薬剤名	AC-PC	AB-PC
球 菌	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		0.39	0.09
	<i>Neisseria meningitidis</i>		0.39	0.19
桿 菌	<i>Escherichia coli</i> NIH JC-1		100	6.25
	<i>E. coli</i> NIH		12.5	6.25
	<i>Escherichia coli</i> Ikaken		6.25	0.39
	<i>Aerobacter aerogenes</i>		>100	50
	<i>Salmonella typhosa</i> T-287		6.25	0.19
	<i>Salmonella typhosa</i> O-901		6.25	0.19
	<i>Salmonella typhosa</i> H-901			
	<i>Salmonella enteritidis</i>		>100	6.25
	<i>Shigella dysenteriae</i>		12.5	1.56
	<i>Shigella flexneri</i> 2a		50	3.12
	<i>Shigella flexneri</i> コマゴメ		50	3.12
	<i>Shigella sonnei</i> EW-33		25	3.12
	<i>Shigella sonnei</i>		25	3.12
	<i>Shigella boydii</i>		25	3.12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No-12		>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i>		100	3.12	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602		0.19	0.04	
真 菌	<i>Candida albicans</i>		>100	>100
	<i>Trichophyton rubrum</i>		>100	>100

MIC(mcg/ml)

第1図 臨床分離ブドウ球菌に対する感受性分布



第2図 臨床分離大腸菌に対する感受性分布



培地を用いた液体希釈法により測定し、また、真菌についてはサブロー寒天培地を用いた。その成績は第1, 2表に示されるとおりである。グラム陽性菌群についてはブドウ球菌にいずれも 0.39~1.56 mcg/ml の感受性を示している。

AB-PC とくらべるとグラム陽性球菌、桿菌では 4~8 倍 AB-PC のほうの抗菌力がすぐれていた。グラム陰性菌群については、さらにこの差が開き、大腸菌群で 2~8 倍、サルモネラ菌群、赤痢菌群では 8~16 倍 AB-PC の抗菌力がすぐれていた。緑膿菌、真菌であるカンジダ、白癬菌には AC-PC, AB-PC 共に >100 mcg/ml であった。

臨床分離株に対する感受性

臨床的に分離されたブドウ球菌 95 株、大腸菌 39 株に対する AB-PC, AC-PC の感受性を普通寒天培地を用い 37°C 24 時間判定にて求めた。その成績は第1, 2図に示されるとおりである。すなわち、ブドウ球菌に対して AC-PC は 1.56 mcg/ml にピークをもつならかな山がみられ、さらに >100 mcg/ml の耐性菌がみられた。

また AB-PC では 0.39 mcg/ml に感受性の山が認められ、また AC-PC と同様 >100 mcg/ml の耐性菌が認められた。いつぼう、大腸菌については AC-PC はほとんどの株が ≥100 mcg/ml で、わずかに 2 株のみが 12.5 mcg/ml であった。AB-PC は 6.25 mcg/ml に 1 峰性の山が認められ、臨床分離のブドウ球菌、大腸菌ともに AC-PC にくらべ AB-PC の感受性がすぐれていた。

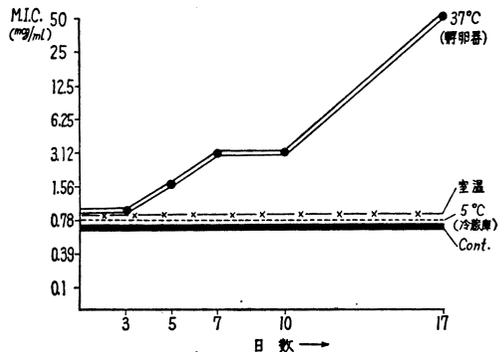
水溶液の安定性

1 mg/ml の AC-PC, AB-PC の水溶液を 5°C, 室温および 37°C ふらん器内に 17 日間放置し、その間の力価の減少をブドウ球菌 209-P 株を試験菌としブイオンを用いた感受性の変動をもって検討した。その成績は第3, 4図に示されるとおりである。AC-PC, AB-PC とともに 5°C および室温では安定であった。しかし 37°C においては AC-PC のほうが不安定であり 10 日目より著明な力価の減少がみられた。

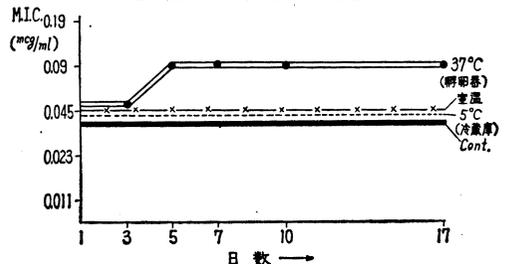
抗菌力に及ぼす諸因子の影響

ブドウ球菌 209-P 株を試験菌としブイオンを用いた液体希釈法により培地 pH, 血清添加, 接種菌量の影響を検討した。その成績は第3表に示されるとおりである。すなわち、pH の影響は pH 6 の酸性側で AC-PC は著明に増強されるが AB-PC はわずかに感受性の変動をみた。人血清により AC-PC, AB-PC とともに影響がなく、また、接種菌量の影響では AB-PC は全く影響をうけず、

第3図 AC-PC 水溶液の安定性



第4図 AB-PC 水溶液の安定性

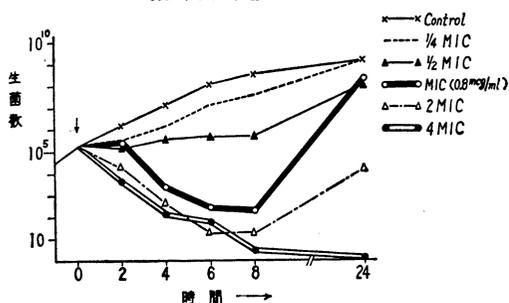


第3表 抗菌作用に及ぼす諸因子の影響

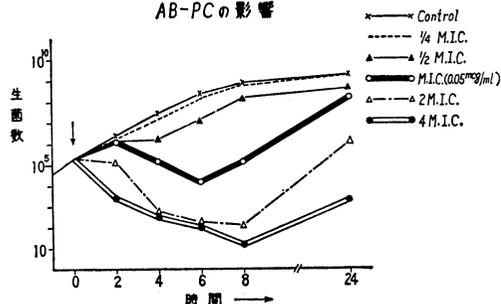
		MIC(mcg/ml)	
諸因子		AC-PC	AB-PC
pH	6	0.09	0.045
	7	0.78	0.09
	8	0.78	0.09
	9	1.56	0.19
人血清 (%)	50	0.78	0.09
	25	0.78	0.09
	10	0.78	0.09
	5	0.78	0.09
	0	0.78	0.09
接種菌量	1.6×10^8	0.78	0.19
	1.6×10^7	0.78	0.09
	1.6×10^6	0.78	0.09
	1.6×10^5	0.78	0.09
	1.6×10^4	0.78	0.045

試験菌 *Staph. aureus* 209-P JC

第5図 ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼす AC-PCの影響



第6図 ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼす AB-PCの影響

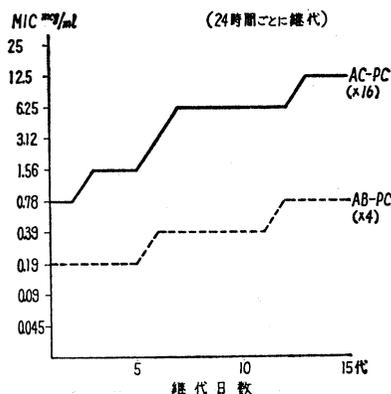


AB-PC においてわずかに感受性の変動がみられた。

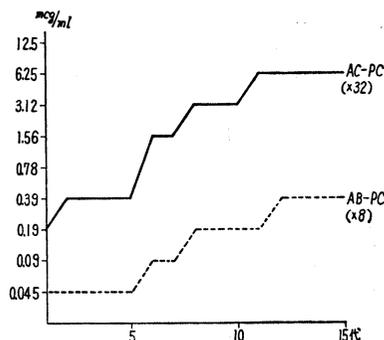
静菌作用 Bacteriostatic action と殺菌作用 Bactericidal action

ブドウ球菌を Brain Heart Infusion に移植し、その約3時間後の対数期の途中において AC-PC, AB-PC の各濃度を添加し、以後 2, 4, 6, 8 及び 24 時間後の

第7図 *Staphylococcus aureus* 209-P の耐性獲得状態



第8図 *Staphylococcus aureus* E-46 の耐性獲得状態

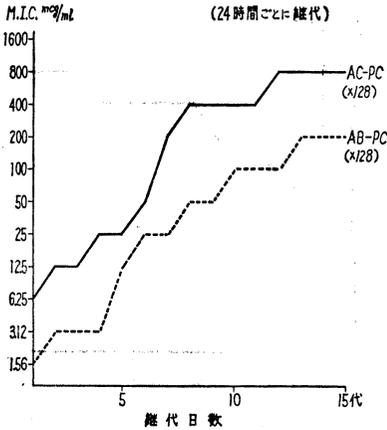


生菌数を寒天平板培養により求めた。その成績は第5, 6 図に示されるとおりである。AC-PC においては最小発育阻止濃度 (MIC) 以上の濃度添加の場合に 8 時間まで著明な殺菌作用がみられ 8 時間以後 MIC, MIC の 2 倍量においては生存菌の増殖がみられる。MIC の 4 倍量では 24 時間までその殺菌作用は持続している。また MIC の 1/2 量, 1/4 量添加ではそれぞれの濃度に応じた静菌的な作用がみられた。いつぼう, AB-PC においては MIC, MIC の 2 倍量, 4 倍量による殺菌作用は AC-PC ほど強くなく、いずれも濃度に応じた生菌数の抑制がみられた。

試験管内耐性獲得と交叉耐性

ブドウ球菌 209-P 株, ブドウ球菌 E-46 株および大腸菌 NIH 株を試験菌としてブイオン培地を用い、37°C 24 時間を 1 世代とする増量の継代法により耐性獲得状態を検討した。その成績は第7, 8, 9 図に示されるとおりである。ブドウ球菌 209-P 株, 同じく E-46 株については AC-PC は AB-PC にくらべ耐性獲得状態はやや早かった。いつぼう, 大腸菌 NIH 株では AC-PC, AB-PC とともに同じような耐性獲得状態を示した。このよう

第9図 *Escherichia coli* NIHの耐性獲得状態



第4表 *Staph. aureus* 209-P 耐性菌間の交叉耐性

菌株	薬剤	AB-PC	AC-PC
原株		0.19	0.78
AB-PC-R		0.78 (×4)	6.25 (×8)
AC-PC-R		1.56 (×8)	12.5 (×16)

MIC mcg/ml

第5表 *Staph. aureus* E-46 耐性菌間の交叉耐性

菌株	薬剤	AB-PC	AC-PC
原株		0.045	0.19
AB-PC-R		0.39 (×8)	1.56 (×8)
AC-PC-R		1.56 (×32)	6.25 (×32)

MIC mcg/ml

第6表 *E. coli* NIH 耐性菌間の交叉耐性

菌株	薬剤	AB-PC	AC-PC
原株		1.56	6.25
AB-PC-R		200 (×128)	1600 (×256)
AC-PC-R		800 (×512)	800 (×128)

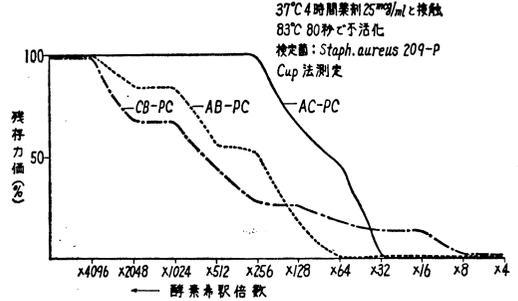
MIC mcg/ml

にして得られたブドウ球菌2株、大腸菌1株のそれぞれの薬剤に対する耐性菌を用いて交互の薬剤間の交叉耐性を検討した。その成績は第4, 5, 6表に示されるようにAC-PC, AB-PCの耐性菌間にはブドウ球菌、大腸菌ともに完全な交叉耐性が認められた。

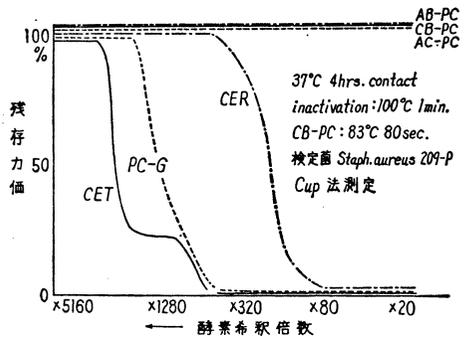
細菌の産生する β -lactamase に対する安定性

臨床分離 Penicillin 耐性ブドウ球菌および試験管内 Cephalothin 耐性大腸菌を用いて、その菌体から β -lactamase を抽出し、これに対する合成 Cephalosporin C 系抗生物質及び合成 Penicillin の安定性を検討した。

第10図 PC-G 耐性 *Staph. aureus* No.87の産生ペニシラーゼに対するAB-PC, AC-PCの分解能



第11図 CET 耐性 *E. coli* NIHの産生する Cephalosporinase の AB-PC, AC-PC等の分解能



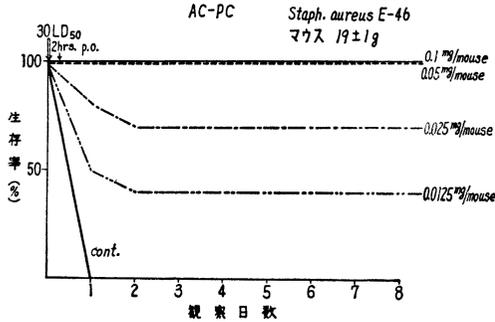
β -lactamase の抽出方法はまず各々の菌を 37°C 20 時間固形培地で培養後集菌し、生理食塩水にて菌体を洗浄する。この洗浄菌体を凍結融解後リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、超音波を用いて菌体を破壊し遠心分離する。得られた上澄液を冷却下 $(NH_4)_2SO_4$ を 30% 飽和, 60% 飽和, 全飽和となるように添加する。得られた沈澱は同一緩衝液を用いて透析後使用した。安定性の測定法としてはブドウ球菌、大腸菌の β -lactamase の各希釈液にそれぞれ薬剤を 25 mcg/ml となるように加え 37°C 4 時間接触後 100°C 1 分間 (但し Carbenicillin は 83°C 80 秒) で β -lactamase を不活化し、ブドウ球菌を 209-P 試験菌としたカップ法により残存力価を測定した。その成績は第 10, 11 図に示されるとおりである。すなわち Penicillin 耐性ブドウ球菌の産生する β -lactamase に対しては AB-PC, Carbenicillin (CB-PC) は同じ程度に不活化されたが AC-PC はこれらにくらべると安定であった。CET 耐性大腸菌の β -lactamase に対して AC-PC, AB-PC, CB-PC はいずれも全く安定であった。

マウス実験的感染症に対する治療効果

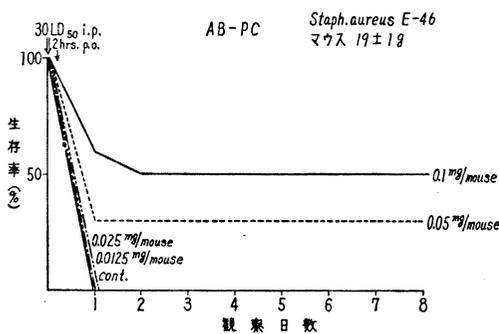
1) ブドウ球菌 E-46 株に対する治療効果

ブドウ球菌 E-46 株を 6% ムチンと等量懸濁し、30 LD₅₀ 腹腔内に感染させ 2 時間後に AC-PC, AB-PC をマウスあたり 0.1 mg, 0.05 mg, 0.025 mg, 0.0125 mg

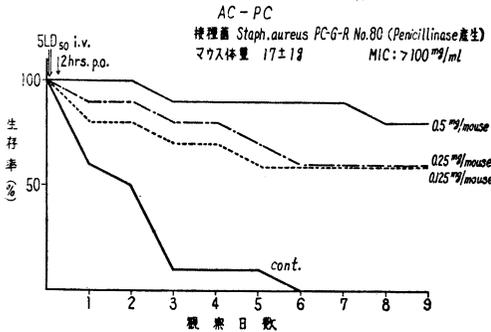
第12図 マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する治療効果



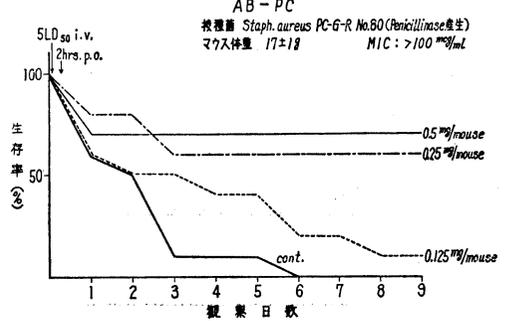
第13図 マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する治療効果



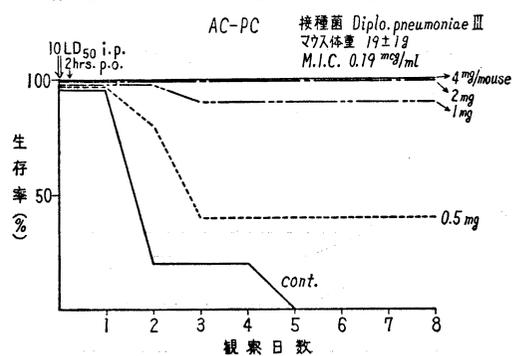
第14図 マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する治療効果



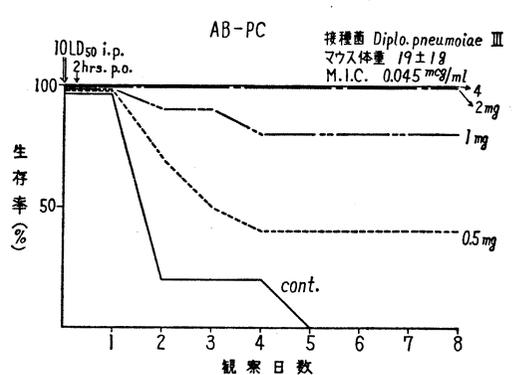
第15図 マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する治療効果



第16図 マウス実験的肺炎球菌感染症に対する治療効果



第17図 マウス実験的肺炎球菌感染症に対する治療効果



経口投与した。その成績は第 12, 13 図に示されるとおりである。AC-PC 投与群では 0.1 mg, 0.05 mg で 100%, 0.025 mg で 70%, 0.0125 mg で 40% の治療効果が得られ、AB-PC 投与群では 0.1 mg で 50%, 0.05 mg で 30% の治療効果が得られたが、0.025 mg, 0.0125 mg 投与群では無処置群と同じように全群 1 日で死亡した。なおこの場合ブドウ球菌 E-46 株に対する *in vitro* の抗菌力は AC-PC の 0.78 mcg/ml, AB-PC 0.19 mcg/ml と AC-PC のほうが劣っているにもかかわらず *in vivo* 治療効果がすぐれていたことは興味深いことだと思ふ。

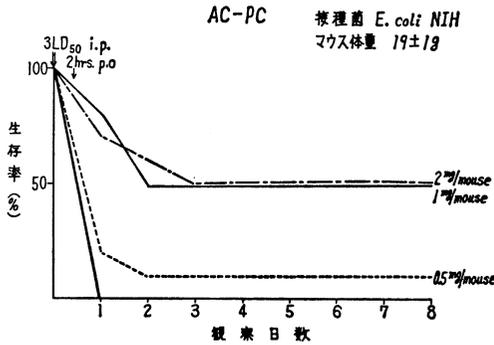
2) Penicillin G 耐性ブドウ球菌 No. 80 に対する治療効果

臨床分離ブドウ球菌 (PC-G 耐性株) を 5LD₅₀ マウス静脈内に感染させ、2 時間後に AC-PC, AB-PC を 0.5 mg, 0.25 mg, 0.125 mg 経口投与した。その成績は第 14, 15 図に示されるとおりである。この場合も AC-PC の治療効果が AB-PC にくらべすぐれていた。これは前記 PC-G 耐性ブドウ球菌の産生する β -lactamase に対し AB-PC のほうが AB-PC より安定であるためと思われる。

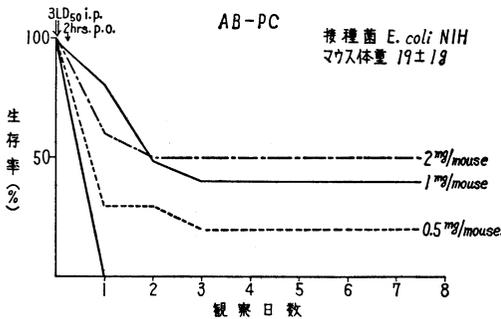
3) 肺炎球菌感染症に対する治療効果

肺炎球菌 III 型を 10LD₅₀ マウス腹腔内に感染させ、2 時間後に AC-PC, AB-PC を 4 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg 経口投与した。その成績は第 16, 17 図に示される

第18図 マウス実験的大腸菌感染症に対する治療効果



第19図 マウス実験的大腸菌感染症に対する治療効果



とおりである。AC-PC, AB-PC とも各濃度同じ程度の治療効果がみられた。なお肺炎球菌Ⅲ型に対する AC-PC, AB-PC の試験管内抗菌力は AC-PC は 0.19 mcg/ml, AB-PC は 0.045 mcg/ml であった。

4) 大腸菌感染症に対する治療効果

大腸菌 NIH 株の 3LD₅₀ を 6% ムチンと等量懸濁させマウス腹腔内に感染し、2時間後に AC-PC, AB-PC を 2 mg, 1 mg, 0.5 mg 経口投与した。その成績は第 18, 19 図に示されるとおりである。この場合も前記同様大腸菌 NIH 株に対する試験管内感受性は AC-PC のほうが劣っているにもかかわらず AB-PC とほぼ同程度の治療効果が得られた。

考 察

グラム陽性菌、陰性菌に有効な広い抗菌スペクトラムをもつ合成ペニシリン Aminobenzyl Penicillin に類似した構造をもつ Aminocyclohexyl Penicillin について細菌学的研究を行なった結果、本物質は *in vitro* における抗菌作用は Aminobenzyl Penicillin と比較し、かなり劣っている。しかしながらブドウ球菌、肺炎球菌のマウス実験的感染症の経口投与による治療実験においては Aminobenzyl Penicillin と同程度もしくはそれよりややすぐれた治療効果が得られたことは本物質の大きな特性と考えられる。これはおそらく本物質の吸収が AB-

PC に比べ、ひじようによく、体内分布もすぐれているためか、あるいは、また血清蛋白との結合が Aminobenzyl Penicillin 以上に少ないこと、また、殺菌作用が Aminobenzyl Penicillin よりもややすぐれていることなどが主因と考えられる。また Aminocyclohexyl Penicillin のもう 1 つの特性としては Penicillin 耐性ブドウ球菌に対する安定性が Aminobenzyl Penicillin と比較するとかなり安定であつた事実である。しかしながら大腸菌に対する *in vitro* 感受性は Aminobenzyl Penicillin にくらべかなり悪く、そのため動物実験における治療成績はグラム陽性菌ほどよい成績を得ることは困難であつた。今後さらに肺炎桿菌、サルモネラ菌についても検討することが必要である。

ま と め

新しい合成ペニシリン Aminocyclohexyl Penicillin に関し細菌学的研究を行なつているが現在まで次のような成績を得た。

1) 試験管内抗菌力は Aminobenzyl Penicillin とくらべグラム陽性菌群で 4~8 倍、グラム陰性菌群で 8~16 倍おとつていた。

2) 臨床分離ブドウ球菌 95 株、大腸菌 39 株に対する感受性ではブドウ球菌については Aminocyclohexyl Penicillin の感受性は Aminobenzyl Penicillin よりも低く Aminobenzyl Penicillin と同様 50~2,100 mcg/ml の耐性菌が認められた。大腸菌については、Aminobenzyl Penicillin は 6.25 mcg/ml に 1 峰性の山をつくるが Aminocyclohexyl Penicillin はほとんどの株が ≥ 100 mcg/ml の感受性であつた。

3) 水溶液の安定性は Aminocyclohexyl Penicillin, Aminobenzyl Penicillin とともに 5°C、室温では安定であるが 37°C ふらん器においては力価の減少がみられ、特に Aminocyclohexyl Penicillin では著明な力価の減少がみられた。

4) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響では pH の影響は pH 6 の酸性側で Aminocyclohexyl Penicillin は著しく抗菌力が增強され、Aminobenzyl Penicillin でもわずかに增強された。人血清による影響は Aminocyclohexyl Penicillin とともになく、接種菌量では Aminocyclohexyl Penicillin は影響されず、Aminobenzyl Penicillin ではわずかに影響をうけた。

5) 抗菌作用の型式は Aminobenzyl Penicillin 同様殺菌的作用と静菌的作用が認められ、その殺菌作用は Aminobenzyl Penicillin よりやや優れているようである。

6) 試験管内耐性獲得状態についてはブドウ球菌では Aminobenzyl Penicillin の耐性獲得がやや早かつた。

大腸菌では Aminocyclohexyl Penicillin は同じような段階的上昇を示した。また、このようにして得られたブドウ球菌、大腸菌の各々の薬剤に対する耐性菌の交互の薬剤間には完全な交叉耐性がみられた。

7) 臨床分離 Penicillin 耐性ブドウ球菌及び試験管内 Cephalothin 耐性大腸菌の産生する β -lactamase に対する態度を検討したが、ブドウ球菌の産生する β -lactamase には Aminobenzyl Penicillin に比較し Aminocyclohexyl Penicillin は安定であつた。いつぼろ、大腸菌の産生する β -lactamase には Aminocyclohexyl Penicillin, Aminobenzyl Penicillin とともに安定であつた。

8) マウス実験的感染症に対する治療効果については Aminocyclohexyl Penicillin は試験管内抗菌力が Aminobenzyl Penicillin にくらべ劣つているにもかかわらず、ブドウ球菌感染症、肺炎球菌感染症、大腸菌感

染症において Aminobenzyl Penicillin と同程度、あるいはそれ以上の治療効果が得られた。

参考文献

- 1) ROSENMAN, S. B., L. S. WEBER, G. OWEN & G. H. WARREN: Antimicrobial activity and pharmacological distribution of Wy-4508, an aminoalicyclic penicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1967*, p. 590~596
- 2) HOPPER, M. W., J. A. YURCHENCO & G. W. WARREN: Duration of therapeutic activity of aminoalicyclic penicillins against bacterial infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1967*, p. 597~601
- 3) YURCHENCO, J. A., M. W. HOPPER & G. H. WARREN: Therapeutic activity of aminoalicyclic penicillins in bacterial infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1967*, p. 602~608

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON AMINOCYCLOHEXYL PENICILLIN, A NEW SEMISYNTHETIC PENICILLIN

SHOZO NAKAZAWA, HISAKO ONO, TAKESHI NISHINO,
HARUHIDE KAWABE, YORIKO OYA, AKIKO TAKADA,
JUNKO HASHINO and YOKO MIGITA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Aminocyclohexyl penicillin, a new semisynthetic penicillin published by the study group of Wyeth Institute, U. S. A., is a broad spectrum antibiotic same as well-known aminobenzyl penicillin. But it has less 4~8 times antibacterial activity against gram-positive cocci and less 8~16 times antibacterial activity against gram-negative ones than that of aminobenzyl penicillin. Moreover it has showed cross resistance to aminobenzyl penicillin. On the contrary prominent effect has also been observed in therapeutic experiment of mouse infectious disease.