

合成ペニシリン Sulfobenzylpenicillin に関する細菌学的評価

中澤昭三・和島 剛・井沢武年・津田三和

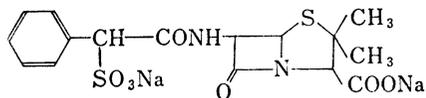
原 良子

京都薬科大学微生物学教室

はじめに

Sulfobenzylpenicillin (SB-PC) は1968年武田薬品研究所において開発された新しい広域合成ペニシリンである。

化学名として 3,3-dimethyl-7-oxo-6-(2-phenyl-2-sulfoacetamido)-4-thia-1-azabicyclo [3. 2. 0] heptane-2-carboxylic acid disodium salt といわれ、carbenicillin (CB-PC) の carboxyl 基が sulfo 基に置換されている。

分子式 $C_{17}H_{18}N_2Na_2O_7S$

分子量 458.42

本物質は白色、やや吸湿性の粉末で、水、メタノールにはきわめて溶けやすいが有機溶媒には難溶である。

毒性は他の合成ペニシリンと同様きわめて低く、急性毒性はマウスにおいて約8,000 mg/kg(i. v.), 約11,500 mg/kg(s. c.), >15,000 mg/kg(p. o.) である。

今回私どもは SB-PC に関する細菌学的評価を既知広域合成ペニシリンである CB-PC を比較薬剤として同一条件にて検討を行なったので報告する。

I. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌、陰性菌に対する試験管内抗菌力を、日本化学療法学会感受性測定法により 37°C 20 時間培養後の最小発育阻止濃度 MIC (mcg/ml) で求めた。なおレンサ球菌群、肺炎球菌、ジフテリア菌は10%馬血液を加えた。また、嫌気性菌群の破傷風菌、ウェルシー菌にはチオグリコール酸塩培地を用い、リン菌、ズイ膜炎菌には G・C 培地を用いて、37°C 48 時間培養後の MIC を求めた。その成績は Table 1, 2 に示されるとおりである。すなわち SB-PC は CB-PC 同様にグラム陽性菌群、陰性菌群にわたり広い抗菌スペクトラムを有しているが、その抗菌力を CB-PC と比較するとグラ

ム陽性菌であるブドウ球菌群では標準株は SB-PC 3.12~6.25 mcg/ml, CB-PC 0.78~3.12 mcg/ml に感受性を示した。しかしながら PC 耐性菌である No.80 に対しては CB-PC より逆に SB-PC のほうが MIC は優れていた。その理由は後述する菌産生の β -lactamase に対する安定性の差異によるものと思われる。その他、溶血レンサ球菌、肺炎球菌、枯草菌などのグラム陽性菌群については SB-PC に比較して CB-PC の抗菌力が2倍程度すぐれていた。グラム陰性球菌であるリン菌、ズイ膜炎菌に対しては SB-PC, CB-PC 共に 0.19 mcg/ml の MIC を示した。グラム陰性桿菌に対しては例えば大腸菌群 SB-PC 6.25~12.5 mcg/ml, CB-PC 3.12~6.25 mcg/ml, サルモネラ菌群 SB-PC 3.12~50 mcg/ml, CB-PC 1.56~25 mcg/ml とグラム陽性菌群とはほぼ同様に SB-PC にくらべ CB-PC の抗菌力が2倍程度すぐれていた。

以上の SB-PC と CB-PC 間の2倍程度の差異の原因

Table 1 Antibacterial spectrum
(MIC : mcg/ml)

a) Gram-positive bacteria

Test strain	SB-PC	CB-PC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P・JC	6.25	3.12
" Smith	3.12	0.78
" Terajima	6.25	3.12
" Neumann	3.12	1.56
" E-46	3.12	1.56
" No. 80	12.5	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.25	3.12
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.39	0.19
" Cook	0.78	0.19
<i>Streptococcus faecalis</i>	100	50
<i>Streptococcus viridans</i>	100	50
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type III	0.78	0.39
<i>Sarcina lutea</i> PCI-1001	0.39	0.09
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	3.12	1.56
<i>Bacillus anthracis</i>	0.78	0.39
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	12.5	6.25
<i>Clostridium tetani</i>	0.19	0.19
<i>Clostridium perfringens</i>	0.19	0.78

Table 2 Antibacterial spectrum
(MIC : mcg/ml)

b) Gram-negative bacteria

Test strain	SB-PC	CB-PC
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.19	0.19
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.19	0.19
<i>Escherichia coli</i> NIH-JC	12.5	6.25
" NIH	6.25	3.12
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3.12	1.56
<i>Salmonella typhi</i> T-287	6.25	3.12
" O-901	3.12	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> A	6.25	3.12
" B	6.25	6.25
<i>Salmonella enteritidis</i>	50	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.12	3.12
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	6.25	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	6.25	3.12
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	3.12
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	25	25
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	3.12	1.56
<i>Proteus morganii</i> Kono	25	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	50	100

としてはCB-PCの製造過程で脱炭酸が起こつてPC-Gが数% (規格では5%以下に押えられている) 含有されているためでこれによる影響を考慮するならば両剤間のMICはほとんど同一と考えられる。

II. 臨床分離株に対する感受性

臨床分離ブドウ球菌70株, 大腸菌26株, 緑膿菌27株に対する感受性分布を heart infusion 寒天培地を用いた寒天平板希釈法により37°C20時間培養後のMICで求めた。その成績は Fig. 1~3に示されるとおりである。

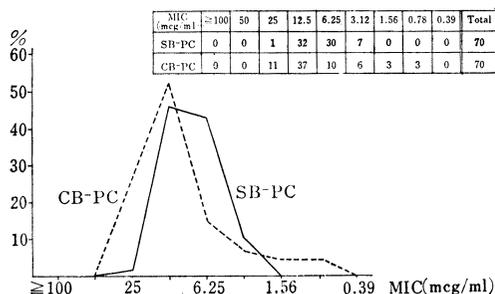


Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Staph. aureus*

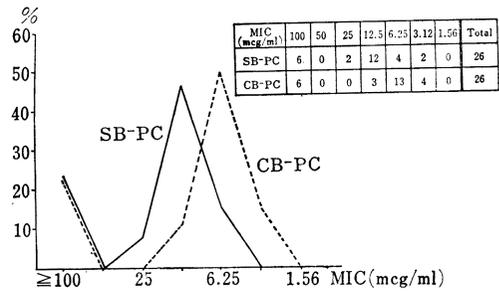


Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates : *E. coli*

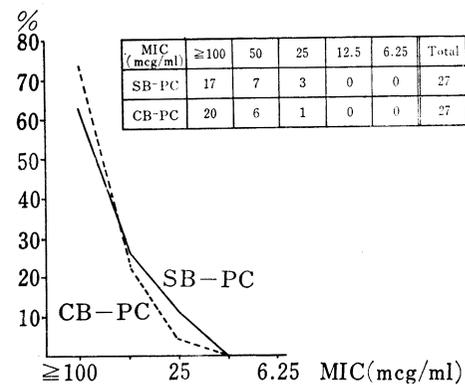


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Pseudomonas*

ブドウ球菌についてはSB-PCは6.25~12.5 mcg/mlに88.6%の株が分布し全株3.12~25 mcg/mlの間に存在した。一方CB-PCにおいては12.5 mcg/mlに1峰性のピークを持つてはいるが, 0.78~25 mcg/mlとSB-PCに比較して幅広い分布を示した。その理由としては後述するPC耐性ブドウ球菌の産生するβ-lactamaseに対する安定性がSB-PCよりもCB-PCのほうが弱い事実と関係があると思われる。

大腸菌ではSB-PCは12.5 mcg/mlにCB-PCでは6.25 mcg/mlに1峰性の山を持つきれいな分布を示したが, ≥100 mcg/mlの株が両薬剤共に存在し, 完全な交叉耐性がみられた。

緑膿菌ではSB-PC, CB-PC共に25~≥100 mcg/mlの分布を示し両薬剤間に顕著な差は認められなかつた。

III. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす培地 pH, 人血清添加の影響をブドウ球菌 209-P-JC 株を試験菌として heart infusion プ

イオンを用いた液体希釈法により、また、接種菌量の影響は同じく、ブドウ球菌 209-P・JC 株を試験菌として heart infusion 寒天培地を用いた寒天平板希釈法により 37 °C 20 時間培養後の MIC で求めた。

その成績は Fig. 4 に示されるとおり、培地 pH の影響では両薬剤とも酸性側において抗菌力の増強が認められたが SB-PC のほうが CB-PC にくらべやや影響を受けやすいようであった。

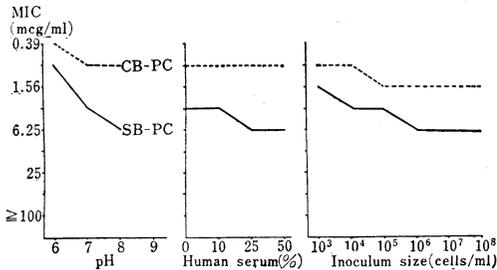


Fig. 4 Influence of various factors on activity
Test medium : heart infusion
Test strain : *Staph. aureus* 209-P・JC

人血清による影響では SB-PC は人血清添加により抗菌力の減弱が認められたが CB-PC は全く影響を受けなかった。

接種菌量による影響は両薬剤共にわずかではあるが接種菌量による影響がみられた。

IV. 作用型式

ブドウ球菌 No.50774 株を brain heart infusion ブイオン培地に約 5×10^6 コ/ml 接種し、37 °C において約 3 時間培養を行ない、対数期の途上で SB-PC、CB-PC を MIC を中心として、その 2 倍、4 倍、1/2、1/4 の濃度を添加し、以後 2、4、6、8 および 24 時間後の生菌数を測定した。その成績は Fig. 5、6 に示されるとおりである。両薬剤共に 2 MIC、4 MIC では時間の経過とともに生菌数の減少がみられ、24 時間まで完全な殺菌作用が認められた。

V. β -lactamase に対する安定性

1) 生物学的定量法による

臨床分離ペニシリン耐性ブドウ球菌、および大腸菌を用いて Table 3 に示す方法によりその菌体から β -lactamase を抽出し、これに対する SB-PC、CB-PC および ampicillin (AB-PC) の安定性を検討した。 β -lactamase の抽出方法はそれぞれの菌を 37 °C 20 時間寒天培地で培養後集菌し、生理食塩水にて菌体を洗浄する。

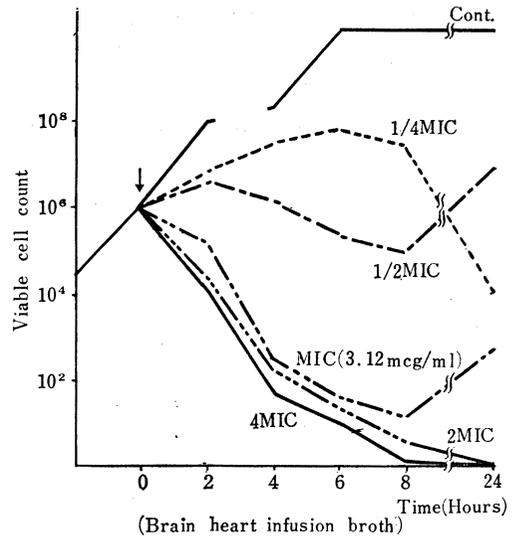


Fig. 5 Bactericidal effect of SB-PC
Staph. aureus No. 50774

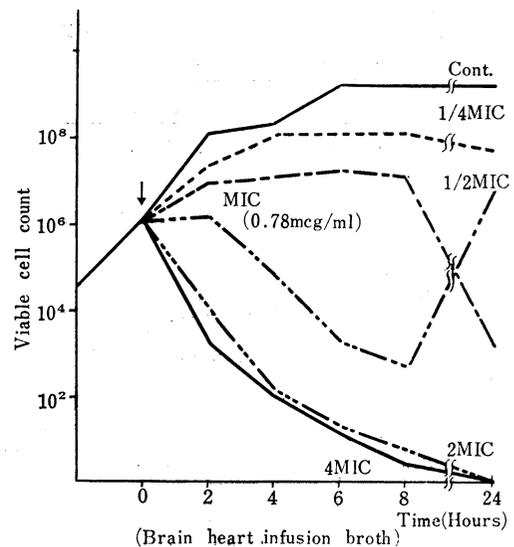


Fig. 6 Bactericidal effect of CB-PC
Staph. aureus No. 50774

菌体を凍結融解後 pH 7.2 のリン酸緩衝液に懸濁させ、超音波を用いて菌体を破壊し遠心分離を行なった。上澄液を冷却下に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 30%、60%、全飽和と添加した。得られた沈澱を同一緩衝液を用いて透析後使用した。

安定性の測定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 10 mcg/ml になる

ように加え37°C 4時間接触後83°C, 80秒間でβ-lactamaseを不活化し *Bacillus subtilis* PCI-219株を検定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 Fig. 7, 8 に示されるとおりである。すなわちブドウ

Table 3 Extraction and purification procedures of β-lactamase

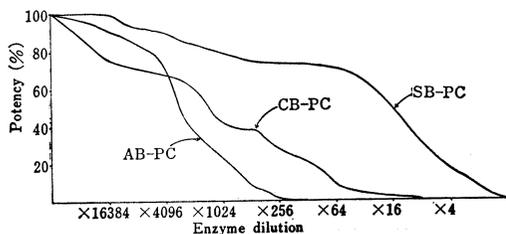
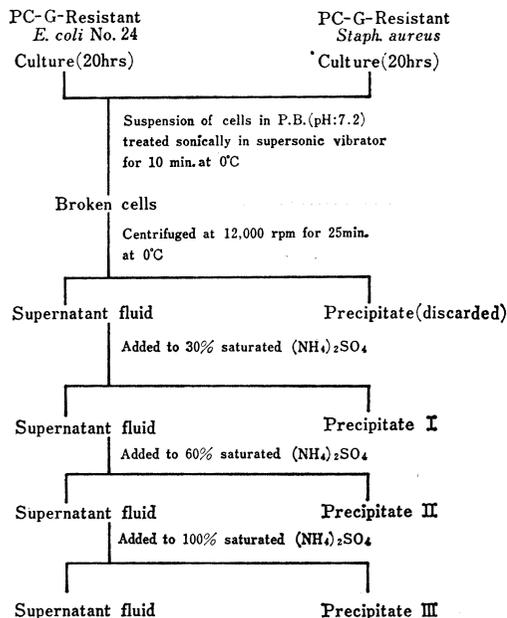


Fig. 7 Stability of SB-PC to β-lactamase *Staph. aureus* No. 87

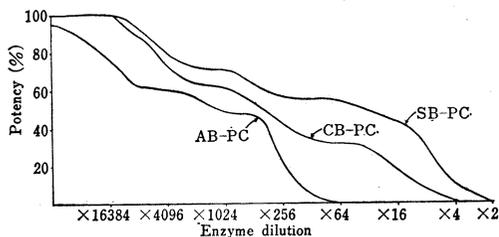


Fig. 8 Stability of SB-PC to β-lactamase *E. coli* No. 24

球菌から抽出したβ-lactamaseに対する3薬剤の態度はSB-PCはAB-PCにくらべるとかなり安定である。しかしながら私共が以前行なつたセファロスポリン系抗生物質で見られたほど安定な成績はみられなかつた。大腸菌から抽出したβ-lactamaseに対する態度はブドウ球菌と同じような傾向がみられたがブドウ球菌におけるほど明らかな差はみられなかつた。

2) 化学的定量法による

患者分離ブドウ球菌1840株から得られたβ-lactamaseを武田薬品研究所より分与していただきこの酵素に対するSB-PC, CB-PC, AB-PCの安定性をhydroxylamine法により測定した。その結果は Fig. 9 に示されるようにSB-PCは3薬剤の中で最も安定な薬剤でありAB-PC, CB-PCはほぼ同程度であつた。

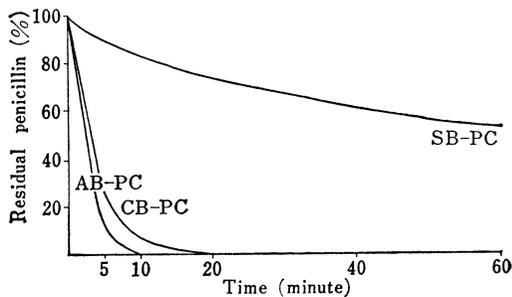


Fig. 9 Stability of SB-PC to β-lactamase Hydroxylamine method *Staph. aureus* No. 1840

VI. マウス実験的感染症に対する治療効果

1) ブドウ球菌感染症に対する効果

ブドウ球菌No.50774株(MICはSB-PC 3.12mcg/ml, CB-PC 1.56mcg/ml)をマウス尾静脈に3LD₅₀感染させ、攻撃2時間後に1回SB-PC, CB-PCの2mg/mouse, 1mg/mouse, 0.5mg/mouse, 0.25mg/mouseをマウス皮下に注射した。その成績は Fig. 10, 11 に示

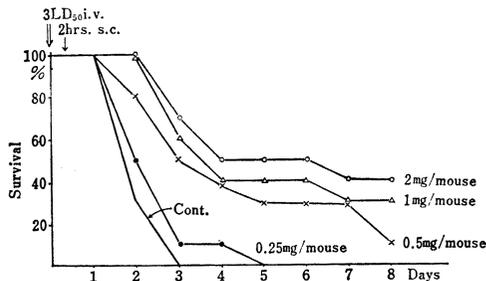


Fig. 10 Protecting effect of SB-PC against experimental mice infections with *Staph. aureus* No. 50774

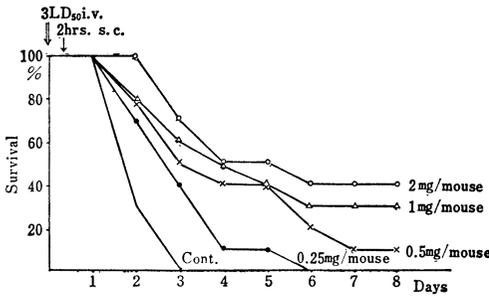


Fig. 11 Protecting effect CB-PC against experimental mice infections with *Staph. aureus* No. 50774

されるとおり感染 8 日後における両薬剤の治療成績はほとんど同等で 2 mg 投与群で 40%, 1 mg 投与群で 30%, 0.5 mg 投与群で 10% の生存率を示した。なお無処置群は 3 日以内に全マウス感染死亡した。

2) 大腸菌感染症に対する効果

大腸菌 NIH 株 (MIC は SB-PC 6.25 mcg/ml, CB-PC 3.12 mcg/ml) を 2 LD₅₀ ムチンを使用してマウス腹腔内攻撃を行ない、攻撃 2 時間後に 1 回 SB-PC, CB-PC を 4 mg/mouse, 2 mg/mouse, 1 mg/mouse 腹腔皮下に投与を行なった。その成績は Fig. 12, 13 に示されるとおり、SB-PC 4 mg 投与群で 90%, 2 mg 投与群 60%, 1 mg 投与群 10%, CB-PC 4 mg 投与群で 100%, 2 mg 投与群 80%, 1 mg 投与群 30% の生存率を示し各投与量群共に CB-PC 治療群のほうが SB-PC 治療群に比較してややすぐれた効果を示した。なお無処置群は 3 日以内に全マウス感染死した。

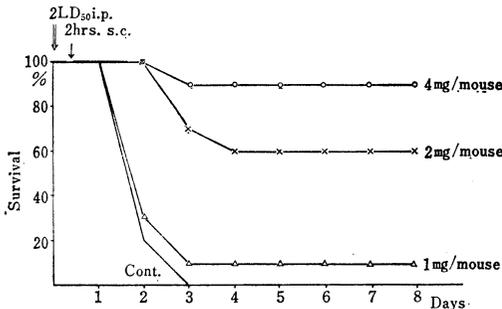


Fig. 12 Protecting effect of SB-PC against experimental mice infections with *E. coli* NIH

3) 緑膿菌感染症に対する効果

緑膿菌 NC-5 株 (興和東京研究所小林氏から分与されたものでその MIC は SB-PC, CB-PC 共に 200 mcg/ml である) を ムチンを用いて 100 LD₅₀ (3.2 × 10⁶ コ)

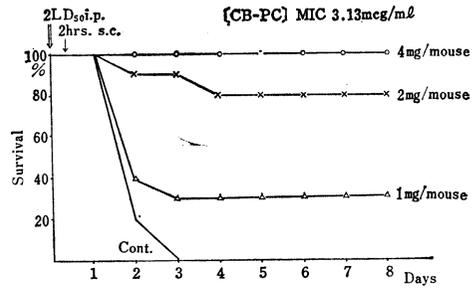


Fig. 13 Protecting effect of CB-PC against experimental mice infections with *E. coli* NIH

をマウス (体重 18.5 ± 2g) 腹腔内に攻撃し、攻撃 2 時間後に SB-PC, CB-PC を 200 mg/mouse, 100 mg/mouse, 50 mg/mouse 治療する群、および攻撃 2 時間後、4 時間後に 100 mg を 2 回投与する群について実験を行なった。その成績は Fig. 14, 15 に示されるとおりである。SB-PC では 100 mg/mouse 2 回投与で 80%, 200 mg, 100 mg/mouse 投与で 60%, 50 mg/mouse 投与で 40% の治療成績が得られたのにもかかわらず CB-PC においては 100 mg/mouse で 50%, 100 mg/mouse

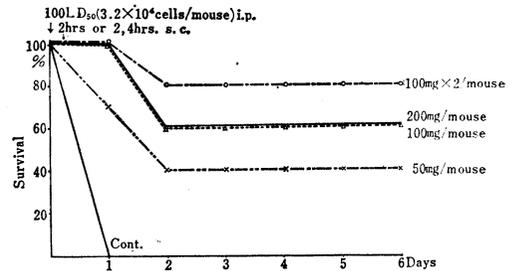


Fig. 14 Protecting effect of SB-PC against experimental mice infections with *Pseud. aeruginosa* NC-5

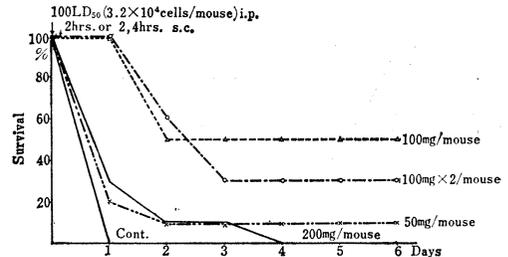


Fig. 15 Protecting effect of CB-PC against experimental mice infections with *Pseud. aeruginosa* NC-5

2回投与で30%, 50 mg/mouse で10%の効果, 200 mg/mouse では4日以内に全マウス死亡した。

このことは CB-PC のマウスにおける急性毒性 LD₅₀ は 9,150 mg/kg, 約 183 mg/20 g といわれており, SB-PC では 11,500 mg/kg, 約 230 mg/20 g と報告されているのでその毒性の差が治療効果に大きく影響しているためと考える。今かりに CB-PC と SB-PC のマウス実験的緑膿菌感染症に対する ED₅₀ とマウス急性毒性 LD₅₀ (文献値) の比を化学療法係数 *chemotherapeutic index* とすると

$$\text{CB-PC では } \frac{5,000 \text{ mg/kg}}{9,150 \text{ mg/kg}} = 0.5464$$

$$\text{SB-PC では } \frac{3,750 \text{ mg/kg}}{11,500 \text{ mg/kg}} = 0.3261$$

となり SB-PC のほうが CB-PC より優れているが, 今後更に同一条件での ED₅₀ と LD₅₀ を求め正確な化学療法係数を求めなくてはならない。

4) マウス実験的変形菌感染症に対する治療

Proteus mirabilis 1287 株を 2LD₅₀ (3×10⁸コ)

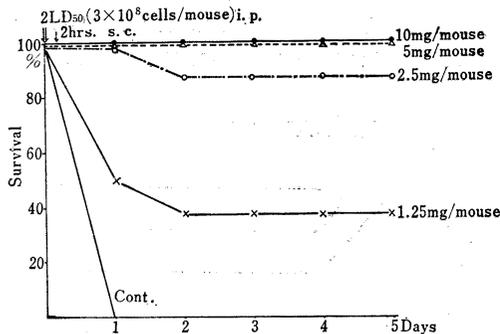


Fig. 16 Protecting effect of SB-PC against experimental mice infections with *Proteus mirabilis*

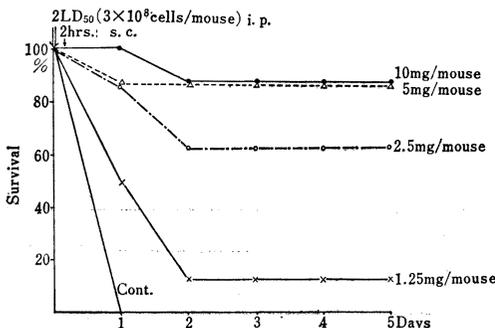


Fig. 17 Protecting effect of CB-PC against experimental mice infections with *Proteus mirabilis*

1群8匹のマウス腹腔内に感染させ, 2時間後に1回 SB-PC, CB-PC を 10 mg/mouse, 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse, 1.25 mg/mouse 皮下投与行なつた。その成績は Fig. 16, 17 に示されるようである。SB-PC 10 mg/mouse, 5 mg/mouse 投与では生存マウス数は 8/8, 同じ投与量において CB-PC は 7/8, 2.5 mg/mouse 投与では SB-PC 7/8, CB-PC 5/8, 1.25 mg/mouse 投与では SB-PC 3/8, CB-PC 1/8 の生存匹数を示し, 各投与量において CB-PC に比べ SB-PC の治療効果が優れていた。

ま と め

今回私どもは武田薬品研究所において開発された新しい広域合成ペニシリン sulfobenzylpenicillin(SB-PC) の細菌学的評価について化学構造ならびに活性類似の既知広域ペニシリン carbenicillin (CB-PC) を比較薬剤として検討した結果 SB-PC の抗菌スペクトラムは CB-PC と同一でグラム陽性, 陰性菌群に有効で, またその抗菌力についても CB-PC に混在している PC-G を考慮に入れるならばほとんど同等であり, そのことは臨床分離のブドウ球菌, 大腸菌, 緑膿菌の感受性分布の成績からもうかがえ得る。

試験管内抗菌力に及ぼす pH, 人血清, 接種菌量の影響では CB-PC より SB-PC のほうが受け易かつた。

また, SB-PC の抗菌作用型式は CB-PC と同様 MIC 以上の濃度でいずれも bactericidal であつた。

次に患者より分離した PC 耐性ブドウ球菌 2 株より分離した β -lactamase に対する安定性は生物学的定量, 化学的定量により SB-PC が CB-PC あるいは AB-PC と比較するとやや安定であることが認められた。しかしながらこの成績は本酵素に対する合成セファロsporin C系抗生物質や耐性ブドウ球菌用合成ペニシリンで認められるほど強力なものではなく PC 耐性ブドウ球菌感染マウスを治療するには至っていない。またグラム陰性の大腸菌より分離した β -lactamase に対する安定性についてはブドウ球菌の場合ほど大差は認められないが SB-PC > CB-PC > AB-PC の順に安定であつた。

マウス実験的感染症に対する治療実験ではブドウ球菌において, *in vitro* の MIC が CB-PC より 1/2 程度弱い SB-PC が CB-PC と同程度の効果を示した。しかし大腸菌においては MIC と平行し CB-PC のほうがやや優れていた。緑膿菌感染マウスの治療実験においては SB-PC, CB-PC 共に大量投与が必要であり私どもの得た ED₅₀ と文献値での LD₅₀ により化学療法係数を求め見たところ SB-PC が 0.326, CB-PC は 0.546 となり, やや SB-PC のほうが優れていることとなる。

また変形菌感染マウスの治療実験においても SB-PC は CB-PC よりもややすぐれた成績が得られた。

以上私どもの細菌学的評価を端的にまとめるならば外国で開発された CB-PC と同等の効果を持つた新しい広域合成ペニシリン SB-PC が国産化されたということが出来、CB-PC に比しその純度、安定性などの長所を含めその意義は大きいと思われる。

参 考 文 献

- 1) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND : Carbenicillin, a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicro. Agents & Chemoth.* 1967 : p. 609~613
- 2) ENGLISH, A. R. : Laboratory studies with carbenicillin. *Antimicro. Agents & Chemoth.* 1968 : p. 482~488
- 3) 西田実, 五島瑛智子, 桑原章吾 他 : Carbenicillin に関する基礎的研究。 *Chemotherapy* 17 : 1095~1105, 1969
- 4) 本間遜, 熊沢洋子, 横手規子 : Carbenicillin の緑膿菌に対する作用。 *Chemotherapy* 17 : 1106~1110, 1969
- 5) 北本治, 深谷一太, 友利玄一 : 抗微生物剤の生体内動態にかんする研究—carbenicillin について。 *Chemotherapy* 17 : 1134~1139, 1969

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF A NEWLY SEMI-SYNTHESIZED PENICILLIN, SULFOBENZYL PENICILLIN

SYOZO NAKAZAWA, GO WAJIMA, TAKETOSHI IZAWA,
MIWA TSUDA and RYOKO HARA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Biological evaluation was made on sulfobenzylpenicillin (SB-PC), a broad-spectral penicillin newly synthesized by Research Laboratories of Takeda Pharmaceutical Company, in comparison with a known broad-spectral penicillin, carbenicillin (CB-PC), having similar chemical structure and activities. The results indicate that SB-PC is equal to CB-PC in its antibacterial spectrum, showing effects against gram-positive and gram-negative organisms as well. Further, it has been presumed from the results of the susceptibility tests on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* that SB-PC may be equal to CB-PC in its bactericidal effect too, provided that PC-G involved in CB-PC is taken into account.

The *in vitro* anti-bacterial effect of SB-PC was more vulnerable to the influences of the pH value, human serum and inoculum size than that of CB-PC.

SB-PC, like CB-PC, showed its bactericidal effect at the level higher than the MIC.

Stability to β -lactamase extracted from 2 clinical isolates of PC-G resistant *Staphylococcus aureus* was evaluated by the biological and chemical methods. It was found that SB-PC was a little more stable to β -lactamase than CB-PC and AB-PC, but less stable than the cephalosporin derivatives or semi-synthetic penicillins used against PC-G resistant *Staphylococcus aureus*, thus failing to heal mice infected with PC-G resistant *Staphylococcus aureus*. Their stability, on the other hand, to the β -lactamase extracted from *Escherichia coli* did not so widely differ as in the case of *Staphylococcus aureus*. It was in the decreasing order of SB-PC, CB-PC and AB-PC.

SB-PC was as effective as CB-PC against infections experimentally induced with *Staphylococcus aureus* in mice, even though its MIC proved almost double that of CB-PC in the *in vitro* tests. As to the activity against *Escherichia coli*, however, CB-PC was somewhat superior to SB-PC in pro-

portion to the MIC. Large doses of SB-PC and CB-PC were required for treatment of *Pseudomonas* infections in mice. The chemotherapeutic index in *Pseudomonas* infections on the basis of the ED₅₀ obtained by us and the LD₅₀ values reported in literature was 0.326 for SB-PC and 0.546 for CB-PC. From this, it may be presumed that SB-PC is a little superior to CB-PC. Further, mice experimentally infected with *Proteus* showed a little better response to SB-PC than to CB-PC.