

Ampicillin と Dicloxacillin の協力作用に関する研究 I

試験管内抗菌作用

三宅 章・嵯峨井 均・斉藤 哲・安藤拓司

東洋醸造株式会社研究部

五 島 瑳 智 子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 48 年 2 月 27 日受付)

緒 言

Ampicillin は広域スペクトルをもつペニシリンであるが、ペニシリナーゼ感性のため黄色ブドウ球菌では耐性菌の分離頻度が高く、また近年大腸菌および赤痢菌にも、R因子による耐性菌が増加している¹⁾。なお、Ampicillin は *Klebsiella*, *Enterobacter* および indole positive *Proteus* 等には元来無効である。これら耐性菌はペニシリンを加水分解する β -ラクタマーゼを産生してペニシリンを不活性化し、とくに、後者の無効菌群においては種特異的 β -ラクタマーゼ²⁻⁴⁾を有することが知られている。

そこで、isoxazolyl 系の半合成ペニシリンが β -ラクタマーゼの阻害剤となること^{5,6)}を利用して Ampicillin と Dicloxacillin との抗菌力の面での相乗作用について、各種の菌株を用いて検討し、同時に、各種菌株の培養から β -ラクタマーゼ酵素液を調製し、Ampicillin の酵素的分解の Dicloxacillin による阻害について検討を加えた。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

Ampicillin (AB-PC Na salt, 920 mcg/mg, 東洋醸造)

Dicloxacillin (MDI-PC Na salt, 880 mcg/mg 東洋醸造)

Cloxacillin (MCI-PC Na salt, 890 mcg/mg 東洋醸造)

Benzylpenicillin (PC-G K salt, 1,590 mcg/mg 東洋醸造)

Methicillin (DMP-PC Na salt, 870 mcg/mg 万有製薬)

Cephaloridine (CER 645 mcg/mg 鳥居薬品)

2. 使用菌株

臨床分離 *Escherichia coli* 60 株, *Staphylococcus aureus* 66 株, *Salmonella* sp. 17 株, *Shigella* sp. 35 株, *Klebsiella pneumoniae* 12 株, *Enterobacter aerogenes* 8 株, *Proteus* 群 19 株, *Pseudomonas aeruginosa* 22 株。

3. 使用培地

Heart infusion agar Difco (HIA)

Brain heart infusion broth Difco (BHI)

Medium B: (1L 中に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 8.0 g, KH_2PO_4 : 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1.0 g, クエン酸ナトリウム: 0.5 g, ペプトン(極東): 10 g, 酵母エキス(Difco): 2.0 g, グルコース: 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1 g を含む, pH 7.0)

4. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法に従がつて最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

5. 濾紙による寒天平板拡散法による相乗作用の検討

両薬剤をそれぞれ浸みこませた幅 0.8 cm, 長さ 4 cm の帯状の濾紙を各剤 2 枚ずつ用意し、菌の混積平板上に正方形となるように置く。その際、AB-PC の濾紙 2 枚, MDI-PC の濾紙 2 枚を隣接する辺上において、AB-PC, MDI-PC の接する角は 2 箇所にてできるようにする。37°C 1 夜培養後、濾紙周辺の阻止帯により相乗作用の検討を行なった。

6. AB-PC, MDI-PC 合剤中の AB-PC の分離定量法

試料を HCl で pH 2.0 としてエチルエーテルで MDI-PC を抽出除去(試料の 2 倍量で 3 回反復抽出)したのち、 NaHCO_3 で pH を中性として残存する AB-PC を *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を試験菌とするディスク法により測定した。

7. 増殖曲線測定法

BHI 培地で 37°C 1 夜培養した菌液を Medium B に 5×10^5 cells/ml になるように接種し、薬剤添加後 37°C で振盪培養した。

一定時間後に培養液を採取し生菌数を測定した。なお、比濁法(Bausch-Lomb Spectronic 20)により O.D. (530 m μ) 値を測定した。

8. 酵素液 (β -ラクタマーゼ) の調製

S. aureus は BHI broth で培養し、DMP-PC (1.0 mcg/ml) を添加して、酵素を誘導し、その遠沈上清 (7,000 rpm 20 分) を菌体外酵素とし、沈渣の菌体の超

音波破壊液 (10 KH₂, 1.8 A, 40 分) を菌体内酵素とした。*Proteus* および *Enterobacter* は PC-G (100 mcg/ml) 誘導菌体, *E. coli* は BHI broth 培養菌体を超音波破壊 (10 KH₂, 1.8 A, 10 分) し酵素液とした。

9. 酵素活性測定法

PARRET のヨードメトリー法⁷⁾により行なつた。なお, 0.1 M リン酸緩衝液は, 黄色ブドウ球菌の酵素の場合は pH 5.8, グラム陰性桿菌酵素の場合は pH 7.5 を使用し, 酵素活性は 1 unit = 加水分解されたペニシリンまたはセファロスポリン 1 μmole/hr. で表わした。

実験結果

1. 臨床分離株に対する抗菌作用

臨床分離株 239 株に対する, AB-PC, MDI-PC 各単剤および AB-PC, MDI-PC 合剤 (2:1) の最小発育阻止濃度を測定し, その成績の一部を Table 1 に示し, 全株の MIC はその累積を Fig. 1 に表わした。

両ペニシリンによる相乗作用は AB-PC 耐性 *E. coli*,

Enterobacter および *Proteus morganii* に著明に認められた。*Shigella* には 2:1 の場合にわずかながら相乗作用がみとめられた (Fig. 1, Table 1)。AB-PC 感受性 *E. coli* には相加的効果が認められた。

2. 寒天拡散法による相乗作用の確認

MIC 測定により相乗作用が認められた菌株, *E. coli* 0205, *E. aerogenes* 0655, *P. morganii* 0237 を用い, 薬剤濃度は, *E. coli* および *Proteus* では AB-PC 4,000, 2,000 mcg/ml, MDI-PC 4,000, 2,000 mcg/ml, *Enterobacter* では AB-BC 8,000 mcg/ml, MDI-PC 8,000 mcg/ml で行なつた。

Fig. 2 に示すとおり, AB-PC と MDI-PC の接触部分に相乗作用を示す阻止帯の増大が認められた。

3. 増殖曲線におよぼす影響

AB-PC 耐性株で AB-PC, MDI-PC 合剤 (1:1, 2:1, 1:2) でいずれも 25 mcg/ml の MIC を示す *E. coli* 0205 を用いて増殖曲線への影響をしらべた。AB-PC 50 mcg/ml 存在下では対数期の増殖がある程度抑制されるだけであるが, AB-PC, MDI-PC 合剤 (1:1, 2:1) では MIC より低い 12.5 mcg/ml 存在下で生菌数の減少がみられた (Fig. 3)。

P. morganii 0239 は AB-PC 50 mcg/ml 存在下で対照の薬剤無添加例とほぼ同一の増殖曲線を示したが, 合剤 (1:1, 2:1) 25 mcg/ml 存在下で *E. coli* におけると同様に生菌数は著明に減少した (Fig. 4)。

4. 菌の増殖と AB-PC 不活性化

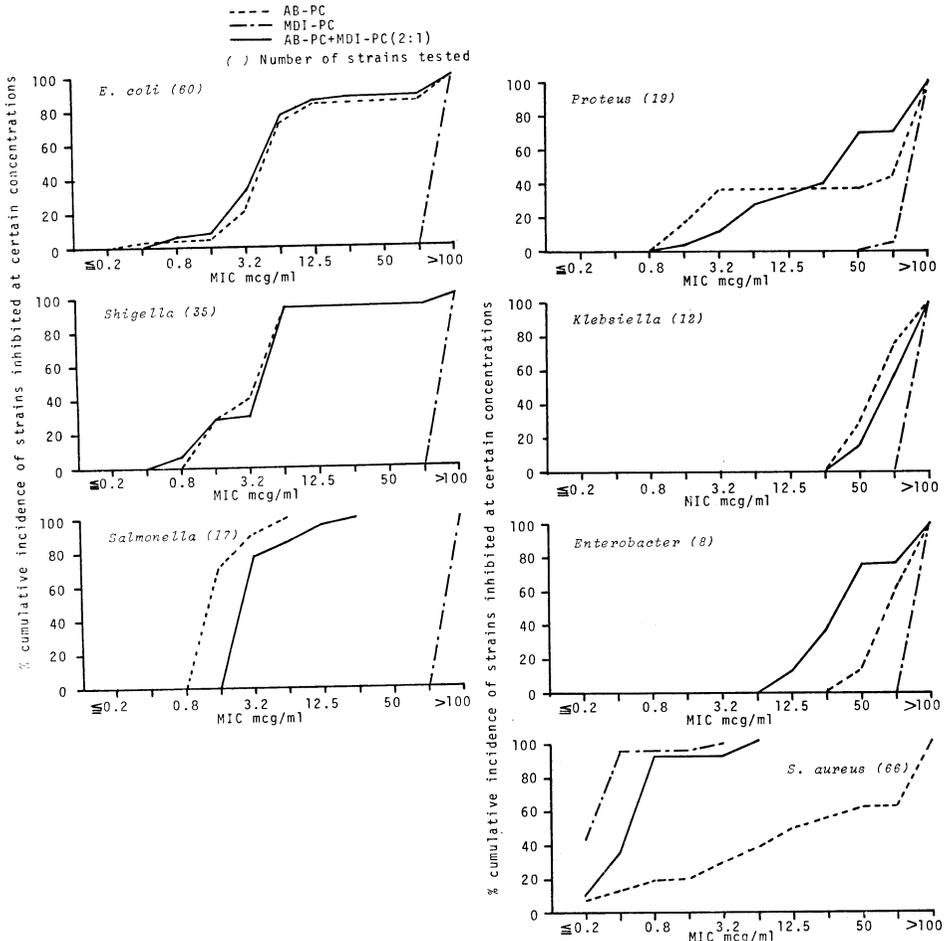
AB-PC 単剤の場合と, 合剤とした場合とで菌の AB-PC 不活性化の程度に差があるかどうかをしらべるため, *E. coli* 0205 を用い増殖を比濁法により測定すると同時に, 培養液中の残存 AB-PC 活性を測定した。Fig. 5 に示すように, AB-PC だけでは 50 mcg/ml でもすみやかな AB-PC 活性の減少がみられ, 増殖曲線は対数期の菌の増殖遅延が認められただけで増殖は阻害されない。合剤 6.3 mcg/ml (1:1) では培養 10 時間後においても 66% の AB-PC の残存活性を示し, 増殖は誘導期の延長および阻害がみとめられた。

Table 1. Comparison of MIC of ampicillin, dicloxacillin and their combination against several clinical isolates

Strain	AB-PC	MDI-PC	AB-PC : MDI-PC		
			1 : 1	2 : 1	1 : 2
<i>S. aureus</i>					
0047	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
0027	>100	0.4	0.4	0.4	0.4
<i>E. coli</i>					
0205	>100	>100	25	25	25
0236	6.3	>100	6.3	3.2	6.3
<i>Salmonella</i>					
0410	3.2	>100	3.2	6.3	6.3
0413	1.6	>100	3.2	3.2	6.3
<i>S. sonnei</i>					
0503	6.3	>100	6.3	3.2	6.3
0505	6.3	>100	6.3	3.2	6.3
<i>K. pneumoniae</i>					
0601	100	>100	100	100	>100
0607	100	>100	100	100	>100
<i>E. aerogenes</i>					
0651	100	>100	12.5	12.5	12.5
0655	>100	>100	50	50	50
<i>P. morganii</i>					
0237	100	>100	12.5	12.5	12.5
0239	>100	>100	50	50	50
<i>P. mirabilis</i>					
0700	1.6	>100	3.2	1.6	3.2
<i>P. vulgaris</i>					
0707	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i>					
0800	>100	>100	>100	>100	>100
0801	>100	>100	>100	>100	>100

(mcg/ml)

Fig. 1 Resistance pattern of clinical isolates to ampicillin, dicloxacillin and their combination



5. MDI-PC の β -ラクタマーゼ活性阻害

AB-PC, MDI-PC 併用による相乗作用は MDI-PC の β -ラクタマーゼ活性の阻害作用に起因すると考えられるので, *E. coli* 0205, 0220, *P. morgani*i 0239, *E. aerogenes* 0655 から前述の方法で酵素液を調製し, AB-PC 分解活性阻害への影響を検討した。

Table 2 に示すとおり, 基質として AB-PC(*E. aerogenes* 0655 では AB-PC を不活化する酵素活性が低いため PC-G を基質とした) を用い, その 1/2 量および 1/4 量の MDI-PC 添加で, いずれも菌の AB-PC または PC-G を不活化する酵素活性の阻害が認められ, とくに, *E. coli* 0205, *P. morgani*i 0239, *E. aerogenes* 0655 の場合に顕著であった。

6. MDI-PC 前処理による β -ラクタマーゼ阻害

S. aureus 0003 の菌体内酵素および菌体外酵素 *E. coli* 0220 の酵素を使用し, MDI-PC および MCI-PC による前処理の酵素活性におよぼす影響を調べた。

約 25 units の酵素 4 ml に MDI-PC または MCI-PC 4 mg/ml を加え, 種々の時間 30°C に保つたのち, 基質となる AB-PC を加えさらに 30 分間反応させた。反応後, ヨード法により酵素活性を測定し, MDI-PC および MCI-PC の酵素阻害率を Table 3 に示した。

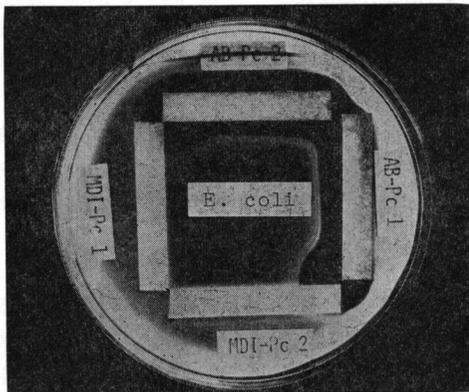
Table 3 に示すとおり, *E. coli* 0220 の酵素ではいずれの処理時間においても活性阻害が MDI-PC で約 80%, MCI-PC では約 70% で, 前処理の影響は認められなかった。

S. aureus 0003 の菌体外酵素では, MDI-PC を同時添加した時 75.7% の活性阻害であったが 15~60 分の前処理によりさらに 20% の阻害の増強が認められ, MCI-PC の場合には 37.8% から 63.1% と増強した。菌体内酵素では菌体外酵素よりさらに顕著な前処理の影響がみとめられた。

7. 各種細菌の β -ラクタマーゼ活性

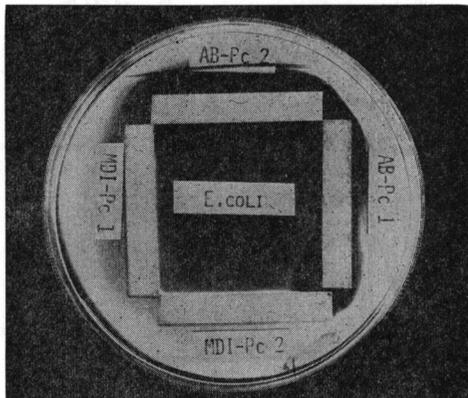
E. coli 0205 の β -ラクタマーゼは *E. coli* 0220 のそれ

Fig. 2 Agar diffusion test for synergism between ampicillin and dicloxacillin against *E. coli* strain 0205, *P.morganii* strain 0237 and *E. aerogenes* strain 0655



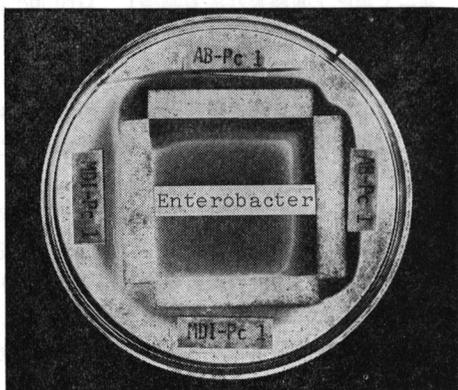
E. coli strain 0205

AB-PC 1(2,000 mcg/ml) MDI-PC 1(2,000 mcg/ml)
 AB-PC 2(4,000 mcg/ml) MDI-PC 2(4,000 mcg/ml)



P. morganii strain 0237

AB-PC 1(2,000 mcg/ml) MDI-PC 1(2,000 mcg/ml)
 AB-PC 2(4,000 mcg/ml) MDI-PC 2(4,000 mcg/ml)



E. aerogenes strain 0655

AB-PC 1(8,000 mcg/ml) MDI-PC 1(8,000 mcg/ml)

Fig. 3 Changes in the growth curve of *E. coli* strain 0205 in the presence of ampicillin and combinations of ampicillin and dicloxacillin.

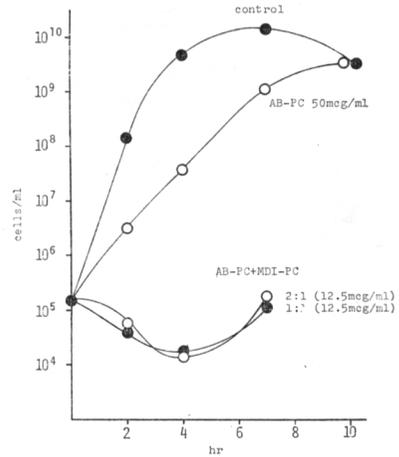


Fig. 4 Changes in the growth curve of *Proteus morganii* strain 0239 in the presence of ampicillin and combinations of ampicillin and dicloxacillin.

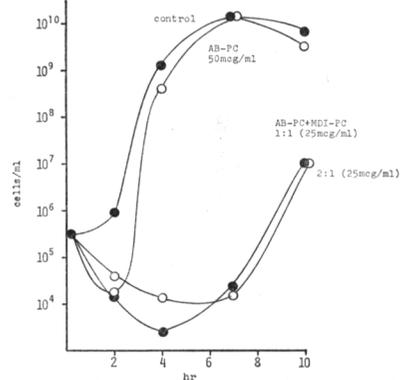


Fig. 5 Delay of the degradation of ampicillin by growing cells of *E. coli* strain 0205 in the presence of dicloxacillin.

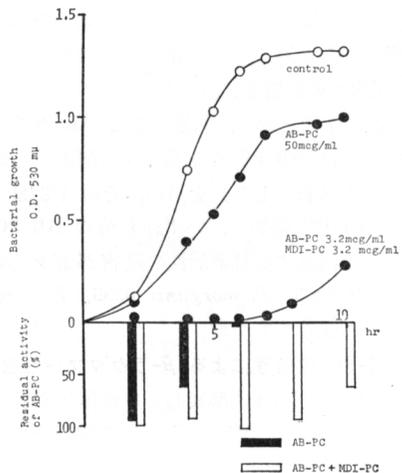


Table 2. Residual activity of β -lactamases in the presence of dicloxacillin

Source of enzyme	AB-PC alone	AB-PC + $\frac{1}{2}$ MDI-PC	AB-PC + $\frac{1}{4}$ MDI-PC	MDI-PC alone
<i>E. coli</i> 0205	(100)	7.0	6.0	0.8
<i>E. coli</i> 0220	(100)	38.1	60.9	1.8
<i>P. morganii</i> 0239	(100)	8.0	7.0	3.0
<i>E. aerogenes</i> 0655	(100)*	6.0*	5.0*	1.0

Numbers indicate relative activity(%).

* PC-G was used as substrate instead of AB-PC.

Table 3 Effect of preincubation of β -lactamases with dicloxacillin or cloxacillin on the inhibition of inactivating rates of ampicillin

Preincubation (min.)	Inhibition percent	
	MDI-PC	MCI-PC
Enzyme : <i>E. coli</i> 0220		
0	82.3	73.6
15	84.9	72.7
30	84.0	70.2
45	79.0	67.2
60	80.7	66.6
Enzyme : <i>S. aureus</i> 0003 exo		
0	75.7	37.8
15	94.6	55.8
30	93.7	56.8
45	94.6	63.1
60	95.5	63.1
Enzyme : <i>S. aureus</i> 0003 endo		
0	24.8	0
15	72.8	8.2
30	76.8	14.8
45	80.0	20.5
60	77.6	23.0

Substrate AB-PC 1.0 mg/ml
MDI-PC or MCI-PC 4.0 mg/ml (preincubation)

Table 4 Substrate specificity of β -lactamases from clinical isolates

Strain	AB-PC	MDI-PC	PC-G	CER
<i>E. coli</i> 0205	2.2 (>100)	* (>100)	43.7 (>100)	153.6 (12.5)
<i>E. coli</i> 0220	212 (>100)	1.0 (>100)	108 (>100)	284.4 (25.0)
<i>P. morganii</i> 0239	2.3 (>100)	* (>100)	96.4 (>100)	525.8 (>100)
<i>E. aerogenes</i> 0655	0.7 (>100)	* (>100)	24.0 (>100)	62.4 (>100)

Numbers indicate β -lactamase activity (units/ml).
Numbers in parentheses indicate MIC (mcg/ml). * not detectable

よりも強く MDI-PC により阻害されることから (Table 2), 両株の β -ラクタマーゼの性質に差があることが考えられる。そこで各種菌株の β -ラクタマーゼの基質特異性を調べた結果 (Table 4), *E. coli* 0205 の酵素は, AB-PC に対する相対的な活性が *E. coli* 0220 の酵素より低いことがわかった。

また, *P. morganii* および *E. aerogenes* の酵素は PC-G で誘導可能で, その基質特異性よりセファロスポリナーゼと推定される。

考察と結論

AB-PC と MCI-PC の *in vitro* の併用効果についてはすでに報告されており, 第 16 回日本化学療法学会でも合剤のシンポジウムとしてとりあげられている。本実験では AB-PC と MDI-PC の併用につき *in vitro* における基礎的実験によつてその効果の検討を行なつた。

臨床分離株 239 株を用いた協力作用についての試験成績は, AB-PC と MCI-PC の併用とほぼ同様であり, 相乗作用が *E. coli* 0205 株および *E. aerogenes*, *P. morganii* の菌群において顕著に認められ, 抗菌スペクトラムの拡大と AB-PC 耐性株への有効性が確認された。これらの菌群に対しては寒天拡散法においても, 増殖曲線への影響を調べた実験においても, 両薬剤の協力作用が認められた。

また, AB-PC および MDI-PC に高度耐性の臨床分離株 *E. coli* 0205 を用いた実験で両ペニシリンの低濃度共存下で, 著明な誘導期の延長が認められ, その培養液中の AB-PC の分解抑制効果も確認され, MDI-PC が上記の菌株の β -ラクタマーゼの阻害剤として作用していることは MCI-PC の時と同様明らかである。

E. coli, *P. morganii*, *E. aerogenes* の β -ラクタマーゼを用い酵素学的検討を行なつた結果, AB-PC に少量の MDI-PC を添加することにより β -ラクタマーゼ活性の阻害が著明に観察され, *S. aureus* の酵素を使用した MDI-PC 前処理実験においても β -ラクタマーゼに対する阻害が確認されている。この結果は MCI-PC で報告されている⁸⁾のと同様であるが, Table 3 に示したように使用した 3 菌株については, その阻害の程度は MCI-PC より MDI-PC のほうが大きかつた。

P. morganii 0239 および *E. aerogenes* 0655 の産生する β -ラクタマーゼは Table 4 および各報告^{4,5)}からセファロスポリナーゼと考えられ, その活性は MDI-PC により強く阻害される。いつぼう, *E. coli* 0205 の β -

ラクタマーゼは CER を良く分解するが、CER に対する本菌の MIC は 12.5 mcg/ml と低く、セファロスポリナーゼとは考えられない。しかしながら本酵素も前 2 者の酵素と同様 AB-PC に対する相対活性は低い。このように β -ラクタマーゼの AB-PC に対する相対活性が低い場合に、とくに MDI-PC の効果が発揮されるものと考えられるが、さらに酵素化学的検討が必要と思われる。

以上のような結果から、AB-PC と MDI-PC の併用はほとんど AB-PC、MCI-PC の場合と同様の効果、すなわち抗菌スペクトラムの拡大と AB-PC 耐性菌に対する β -ラクタマーゼ阻害作用による AB-PC 抗菌力の相乗的復活が期待されるのである。

文 献

- 1) DATTA, N. & P. KONTOMICHALOU : Penicillinase synthesis controled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208 : 239~241, 1965
- 2) FLEMING, P. C.; H. GOLDNER & D. G. GLASS : Observations on the nature, distribution and significance of cephalosporinase. *Lancet* 1 : 1399~1401, 1963
- 3) O'CALLAGHAN, C. H; P. W. MUGGLETON, S. M. KIRBY & D. M. RYAN: Inhibition of β -lactamase decomposition of cephaloridine and cephalothin by other cephalosporins. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1966 : 337~343, 1967
- 4) MARSHALL, M. J.; G. W. ROSS, K. V. CHANTER & A. M. HARRIS : Comparison of the substrate specificities of the β -lactamases from *Klebsiella aerogenes* 1082 E and *Enterobacter cloacae* P 99. *Appl. Microbiol.* 23 : 765~769, 1972
- 5) GOUREVITCH, A.; T. A. PURSITANO & J. LEIN : Inactivation of staphylococcal penicillinase by reaction with penicillins. *Nature* 195 : 496~497, 1962
- 6) SMITH, J. T.; J. M. T. HAMILTON-MILLER & R. KNOX : Isoxazolyl penicillin and penicillinase. *Nature* 195 : 1300~1301, 1962
- 7) PERRET, C. J : Iodometric assay of penicillinase. *Nature* 174 : 1012~1013, 1954
- 8) NISHIDA, M.; Y. MINE & S. KUWAHARA : Synergistic activity of ampicillin and cloxacillin. Protective effect of cloxacillin on enzymatic degradation of ampicillin by penicillinase, and therapeutic activity of mixtures of ampicillin and cloxacillin. *J. Antibiotics* 22 : 144~150, 1969

SYNERGISTIC EFFECT OF AMPICILLIN AND DICLOXACILLIN ON PATHOGENIC BACTERIA. I

In vitro Synergism

AKIRA MIYAKE, HITOSHI SAGAI, TETSU SAITO and TAKUJI ANDO

Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd., Shizuoka-ken

SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo

A synergistic effect of ampicillin and dicloxacillin on pathogenic bacteria has been studied *in vitro*. Growth of the high penicillin resistant bacteria, namely, *E. coli* strain 0205, *Proteus morgani* and *Enterobacter aerogenes* were inhibited with the relatively low concentrations of the mixture of ampicillin and dicloxacillin.

This synergism can be explained by the fact that dicloxacillin inhibits the enzymatic hydrolysis of ampicillin by β -lactamase prepared from these bacteria, particularly, strong inhibition was observed against enzymes have a relatively slow hydrolysis rate for ampicillin.