

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

マウス感染治療実験

横井山繁行・鳥屋 実・星野保夫・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)

## はじめに

前報で<sup>1,2)</sup> Ampicillin (AB-PC) と Dicloxacillin (MDI-PC) が試験管内で相乗的な抗菌作用を示し、 $\beta$ -lactamase を産生する病原菌による AB-PC の分解が MDI-PC の共存によつて明瞭に阻止されること、および実験動物、ヒトでの吸収排泄実験で、各種病原菌に対する試験管内抗菌力と対照して、生体内で十分な効果が期待されるだけの薬剤の体内分布が得られること、を報告した。

本報では、既報の試験管内における効果と、吸収排泄の成績とがマウス感染実験でどのように反映されるかを検討した成績を報告する。

## 実験材料と方法

## 1) 使用薬剤

AB-PC および MDI-PC は共に東洋醸造製のものを、単独または両剤を重量比 (AB-PC : MDI-PC) で 2 : 1 および 1 : 1 になるよう混合して使用した。

## 2) 使用菌株

新鮮患者分離株の *E. coli* 0205 株および *P.morganii* 0237 株(いずれも日本大学医学部石山外科から分与されたもの)、*S. aureus* 226, *S. aureus* Smith, *D. pneumoniae* III および *S. hemolyticus* S 23(いずれも東京大学医科学研究所から分与されたもの)、*S. typhimurium* H (群馬大学細菌学教室から分与されたもの)、の計 7 株を用いた。

## 3) 薬剤感受性試験

マイクロタイター法<sup>3)</sup>により使用菌株に対する使用薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

## 4) 使用薬剤のマウス血中濃度測定

ddY 系マウス (♂, 体重 20 g 前後) 1 群 10 匹に AB-PC または MDI-PC を 1 回経口投与後、経時的に眼せん刺法により採血、血清分離し、常法のペーパーディスク法により測定した。試験菌は *S. lutea* ATCC 9341, 培地はハートインフュージョン寒天 (Difco) を用いた。

## 5) マウス感染治療実験

ddY 系マウス (♂, 体重 20 g 前後) を、1 群 5 または 10 匹使用し、菌接種無投与対照群は 1 群 10 または 20 匹とし、投与群の 2 倍のマウスを使用した。

攻撃菌量およびルート

*E. coli* 0205 株,  $10^8$ /mouse, 静脈内接種。*P.morganii* 0237 株,  $2 \times 10^8$ /mouse, 腹腔内接種。*D. pneumoniae* III,  $2 \times 10^7$ /mouse, 腹腔内接種。*S. aureus* Smith,  $2 \times 10^7$ /mouse, 腹腔内接種。*S. hemolyticus* S 23,  $10^6$ /mouse, 腹腔内接種。*S. typhimurium* H,  $10^7$ /mouse, 腹腔内接種。

治療は菌接種後 1 時間と 4 時間の 2 回に薬剤総投与量の 1/2 量ずつ経口投与した。薬剤効果の判定は菌接種後 7 日目までの延命状況、生残マウスの剖検所見および簡易プロビット法により算出した。

*S. aureus* 226 の感染実験は、マウス背部皮下膿瘍形成抑制実験は田所法<sup>4-6)</sup>を改良した著者等の方法によつて行なつた。すなわち、 $10^7$  の菌を含む 0.1 ml の菌液をマウス背部皮下に接種し、治療は接種直後と 4 時間後の 2 回に総投与量の 1/2 量ずつを経口投与した。接種 72 時間後に背部皮膚を背中線に沿つて切開、皮膚を静かにはがし、膿瘍の長径と短径を測定しその和の 1/2 を膿瘍径とし、同時に接種部位と対側の同部位の皮膚を比較観察し、膿瘍および周囲組織の病変の程度から下記のような評点基準を定め薬剤の効果を判定した。

評点基準

3 : 膿瘍形成著しく、著明な充血と周囲組織の融解を伴うもの

2 : 膿瘍形成と充血が認められるもの

1 : 小膿瘍の形成と軽微な充血が認められるもの

0 : 膿瘍形成も対側部位との著変も認められないもの

## 実験結果

## 1) 使用菌株の薬剤感受性試験

試験管内抗菌力で、合剤による相乗効果の認められたのは、Table 1 に示すように、AB-PC 耐性菌の 2 株だけで、*E. coli* 0205 株に対する各薬剤の MIC は AB-PC

Table 1. Therapeutic effects of AB-PC, MDI-PC and combinations of both against the experimental infections in mice

Administration route ; P. O									
Test organisms	MIC (mcg/ml) 2				Chall- enge	CD 50 (mg/kg)			
	2 AB-PC		1 AB-PC			2 AB-PC		1 AB-PC	
	AB-PC	MDI-PC	1 MDI-PC	1 MDI-PC		AB-PC	MDI-PC	1 MDI-PC	1 MDI-PC
<i>Esch. coli</i> 0205	125	1000	16	16	IV	—	—	680	560-580
<i>Prot. morganii</i> 0237	500	1000	62.5	62.5	IP	—	—	1440-1550	880-1080
<i>Sal. typhimurium</i> H	1	250	1	1	IP	—	—	—	—
<i>Dipl. pneumoniae</i> III	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	IP	7.5	95	7.6-8.5	7.0
<i>Staph. aureus</i> Smith	0.125	0.125	0.125	0.125	IP	0.18	13.5	0.12-0.13	≤0.0625
<i>Staph. aureus</i> 226	100	0.2	0.8	0.8	IP				
<i>Strep. hemolyticus</i> S23	≤0.03	≤0.03	0.03	≤0.03		0.4	38	1.25	1.25

で 125 mcg/ml, MDI-PC 1,000 mcg/ml, 2:1 および 1:1 合剤では 16 mcg/ml であった。また *P. morganii* 0237 株に対する MIC は AB-PC で 500 mcg/ml, MDI-PC で 1,000 mcg/ml, 2:1 および 1:1 合剤では 62.5 mcg/ml であった。他の菌株では合剤による相乗的效果は認められなかった。

## 2) マウス血中濃度

AB-PC 200, 100 mg/kg および MDI-PC 100 mg/kg の各経口投与群とも, Fig. 1 に示すように, 15 分から 30 分値に血中濃度曲線のピークを示した。AB-PC 100 mg/kg 投与群の 5 時間値は *S. aureus* Smith 株に対する MIC の約 33 倍, 7 時間値では約 11 倍の血中濃度が認められた。MDI-PC 100 mg/kg 投与群では, 5 時間値は Smith 株に対する MDI-PC の MIC 値の約 25 倍であったが, 7 時間では検出されなかった。

## 3) マウス感染治療実験

*E. coli* 0205 株の感染実験では, Table 1 および Fig. 2 に示すように, AB-PC は最高投与量 4,000 mg/kg において使用マウス 1 群 10 匹中 1 匹だけ生存し, それ以下の投与群では全例死亡した。MDI-PC では投与群のす

べてにおいて生残例は認められなかった。

これに対し, 2:1 合剤では 2,000 mg/kg 投与群では全例生残し, 1,000 mg/kg では 6 例, 500 mg/kg では 2 例の延命が認められ, CD<sub>50</sub> は 680~860 mg/kg, 1:

Fig. 1 Serum levels of AB-PC and MDI-PC in mice after oral administration

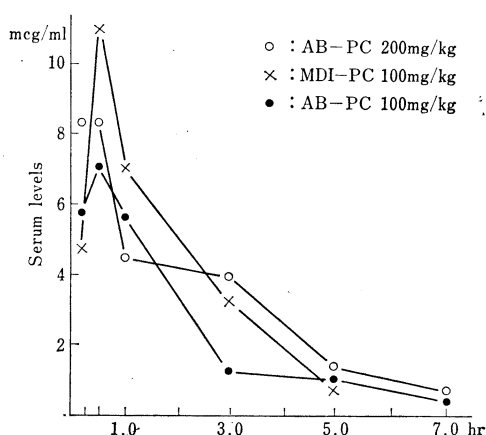
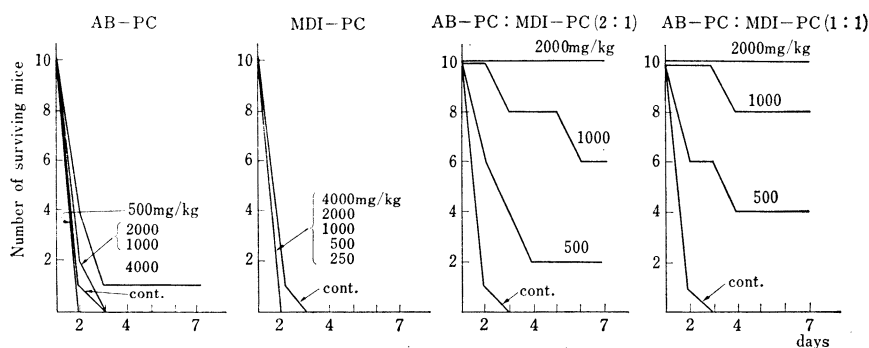
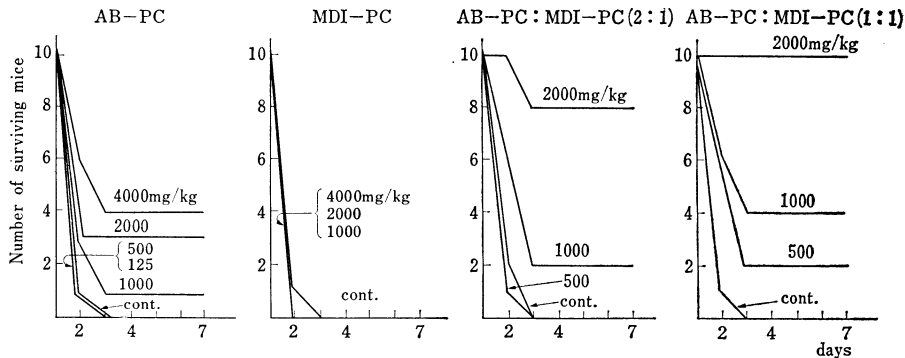
Fig. 2 Survival time of mice infected with *E. coli* strain 0205 and treated with different doses of antibiotics

Fig. 3 Survival time of mice infected with *Proteus morganii* strain 0237 and treated with different doses of antibiotics



1 合剤投与群では 2,000 mg/kg で全例生残し, 1,000 mg/kg では 8 例, 500 mg/kg では 4 例の生残が認められ,  $CD_{50}$  は 560~580 mg/kg であった。以上のように, *E. coli* 0205 株では両配合比ともに合剤による相乗的效果が認められた。

*P. morganii* 0237 株の感染実験では, Table 1 および Fig. 3 に示すように, AB-PC は 2,000 mg/kg で使用マウス 1 群 10 匹中 4 匹が, 1,000 mg/kg では 3 匹の生残が見られた。MDI-PC 投与群は投与群のすべてが全例死亡した。

しかし, 2:1 合剤では 2,000 mg/kg で 8 匹, 1,000 mg/kg では 2 匹の生残を認め,  $CD_{50}$  は 1,400~1,550 mg/kg, 1:1 合剤では 2,000 mg/kg で 10 匹全例が, 1,000 mg/kg では 4 匹, そして 500 mg/kg では 2 匹の生残が認められ,  $CD_{50}$  は 880~1,080 mg/kg で両配合比とも併用による相乗的效果がみとめられた。

*D. pneumoniae* III の感染実験では, Table 1 に示すように, AB-PC 投与群は 50 mg/kg で使用マウス 1 群 5 匹全例が生残し, 12.5 mg/kg で 3 匹, 3.1 mg/kg で 2 匹生残, 0.8 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 7.5 mg/kg であった。MDI-PC 投与群では 200 mg/kg で 5 匹全例, 100 mg/kg で 3 匹の生残が見られ, 50 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 95 mg/kg であった。

2:1 合剤投与群では 100 mg/kg で 5 匹全例, 25 mg/kg で 4 匹, 63 mg/kg で 2 匹の生残が見られ,  $CD_{50}$  は 7.6~8.5 mg/kg であった。また 1:1 合剤投与群では 100, 50 mg/kg で 5 匹, 6.3 mg/kg では 2 匹の生残が見られ,  $CD_{50}$  は 7 mg/kg で両配合比による合剤の成績は AB-PC とほぼ同等の効果を示した。

*S. aureus* Smith の感染実験では, Table 1 に示すように, AB-PC 投与群では 0.8 mg/kg で 1 群 5 匹全例, 0.2 mg/kg で 3 匹が生残, 0.05 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 0.18 mg/kg であった。MDI-PC は 50 mg/kg

で全例, 12.5, 3.1 mg/kg で 2 匹生残, 0.8 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 13.5 mg/kg であった。

2:1 合剤では 1 mg/kg で全例, 0.25 mg/kg で 4 匹, 0.06 mg/kg で 1 匹延命し  $CD_{50}$  は 0.12~0.13 mg/kg, 1:1 合剤で 1 および 0.25 mg/kg 投与で全例, 0.06 mg/kg で 4 匹の延命を認め  $CD_{50}$  は  $\leq 0.06$  mg/kg で, 2:1 合剤は AB-PC 単剤の場合とほぼ同等の效果であったが, 1:1 合剤は AB-PC に比して約 3 倍の効果を示した。

*S. hemolyticus* S<sub>23</sub> の感染実験では, Table 1 に示すように, AB-PC 投与群は 3.12 mg/kg で 1 群 5 匹全例, 0.8 mg/kg では 4 匹, 0.2 mg/kg で 2 匹生残したが, 0.05 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 0.4 mg/kg であった。MDI-PC 投与群は 100 mg/kg で 4 匹, 50 mg/kg で 3 匹, 12.5 mg/kg で 2 匹生残し, 3.1 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 38 mg/kg であった。2:1 および 1:1 合剤投与群は同一成績で, 12.5 mg/kg で 5 匹, 3.1 mg/kg で 4 匹, 0.8 mg/kg では 2 匹生残し, 0.2 mg/kg では全例死亡し  $CD_{50}$  は 1.25 mg/kg で, 両合剤の效果は AB-PC の約 1/3 程度であった。

*S. typhimurium* H の感染実験では, Table 1 および Fig. 4 に示すように, 各薬剤投与群とも 7 日以内に使用マウス 1 群 5 匹の全数が死亡したが, 無投与群にくらべて AB-PC と 2:1 および 1:1 合剤投与群はほぼ同程度の延命効果が認められた。MDI-PC 投与群の延命状況は無投与群とはほぼ同様であった。

*S. aureus* 226 の感染 (皮下膿瘍) 実験では, Table 2 および Fig. 5 に示すように, 各薬剤の 400 mg/kg 投与群での皮下膿瘍形成抑制効果を比較すると, AB-PC 投与群の膿瘍径は 4.7 mm, 評点は 2.0 で, 無投与群の膿瘍径 5.7 mm, 評点 2.0 に比較して極くわずかながら抑制効果が認められた。MDI-PC の膿瘍径は 1.6 mm, 評点は 0.6 で最も抑制効果が強かった。

Fig. 4 Survival time of mice infected with *Salmonella typhimurium* strain H and treated with different doses of antibiotics

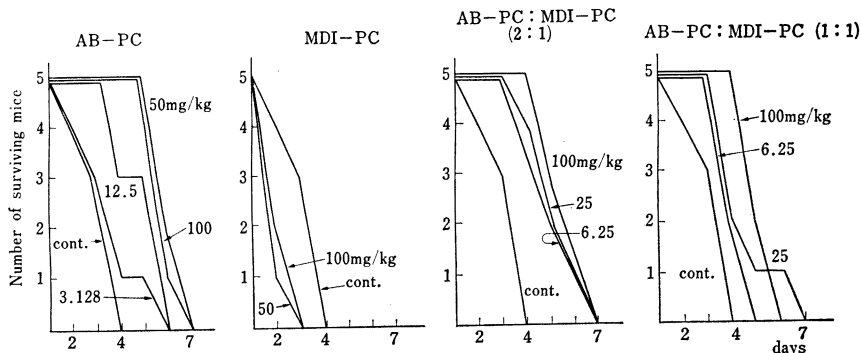
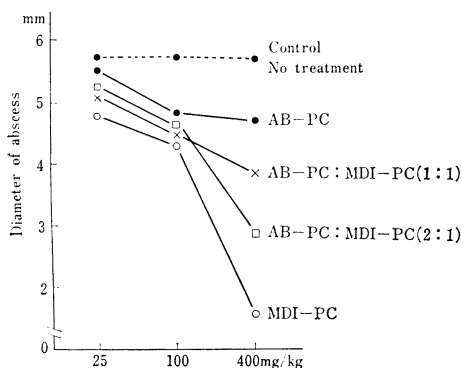


Table 2. Effect of AB-PC, MDI-PC and combinations of both on experimental subcutaneous infection with *S. aureus* 226 in mice

	Dose (mg/kg)	diameter (mm)	score
AB-PC	440	4.7	2.0
	100	4.8	2.0
	25	5.5	2.0
MDI-PC	400	1.6	0.6
	100	4.3	1.9
	25	4.8	1.9
2 AB-PC + MDI-PC	400	2.9	1.2
	100	4.6	2.0
1 MDI-PC	25	5.2	2.0
1 AB-PC + MDI-PC	400	3.9	1.7
	100	4.5	2.0
1 MDI-PC	25	5.1	2.0
Control		5.7	2.0

Fig. 5 Effect of AB-PC, MDI-PC and combinations of both on experimental subcutaneous abscess infection with *S. aureus* 226 in mice



2:1 合剤は膿瘍径 2.9 mm, 評点 1.2, 1:1 合剤は膿瘍径が 3.9 mm, 評点 1.7 で両合剤の効果は, MDI-PC に次ぐものであつたが, 2:1 合剤の効果が 1:1 合剤のそれより優れていたのは注目される成績である。

#### 考 察

今回の実験で, 相乗効果が見られた *E. coli* 0205 株と *P.morganii* 0237 株については先にこの 2 株をはじめ多くのグラム陰性菌の産生する  $\beta$ -lactamase を MDI-PC が強力に阻害し, 試験管内抗菌力においても合剤による相乗効果が認められたと報告した<sup>1)</sup>。

また, SABATH<sup>7)8)</sup> らは *P. pyocyanea* NCTC 8203 の産生する  $\beta$ -lactamase による Benzyl-penicillin の加水分解を Methicillin(DMP-PC) と Cloxacillin(MCI-PC) が競合的に阻害すると報告しており, ACRED<sup>9)</sup> らも AB-PC と MCI-PC の併用で多くのグラム陰性菌の産生する  $\beta$ -lactamase を阻害し, 阻害効果が認められたとし, 峯ら<sup>10)</sup> は AB-PC と MCI-PC の合剤による *E. coli* K-11 株を用いたマウス感染治療実験における相乗効果が, 生体内で増殖する菌の Penicillinase に MCI-PC が inhibitor として作用することに原因することを報告している。

さらに, BACH<sup>11)</sup> らは MDI-PC が試験管内で 20 mcg/ml 以下の濃度で *S. flexneri* の産生する  $\beta$ -lactamase を強力に阻害し, マウス感染実験でも AB-PC と MDI-PC の併用で明らかな相乗効果があり, また AB-PC と他のいくつかの isoxazolyl 系ペニシリンの併用でも試験管内抗菌力において MDI-PC や MCI-PC と同様の理由による相乗効果を報告しており, 我々の実験においても, マウス感染実験でみられた合剤による相乗効果の発現の機作は, マウス生体内での MDI-PC による  $\beta$ -lactamase の阻害により AB-PC の分解が抑制されて, AB-PC の抗菌作用が発揮されたことによると考えられる。

感受性菌である *D. pneumoniae* III, *S. aureus* Smith, *S. hemolyticus* S 23 の3株では各薬剤とも同じ MIC 値であつたが、マウス感染実験では AB-PC と合剤の効果が MDI-PC よりも優れていた。これは AB-PC が MDI-PC よりも血中濃度の持続が長いこと、生体内抗菌力が優れていること等によるものと推定される。また、AB-PC を 2/3 あるいは 1/2 含む合剤の効果が、AB-PC 単剤とほぼ同程度であつたのはグラム陽性菌に対しては合剤が相加的作用であることを示すものと考えられる。

*S. aureus* 226 の感染実験では MDI-PC の皮下膿瘍形成抑制効果が最も強く、次いで合剤の相加的効果が認められたが、使用菌株の、*S. aureus* 226 が *E. coli* 0205 株や *P. morganii* 0237 株のように試験管内およびマウス感染実験で相乗効果が認められなかつたのは、MDI-PC の抗菌力が強く、合剤による  $\beta$ -lactamase 阻害により AB-PC が抗菌力を発揮するよりも MDI-PC の直接的な抗菌力が強く作用したためであろう。

配合比については、AB-PC : MDI-PC 2 : 1 合剤を選択すべきであると考えている。BACH<sup>11)</sup> らは、マウス感染実験で MDI-PC と AB-PC 合剤が相乗的效果を発現するためには、 $\beta$ -lactamase 阻害のために十分な量の MDI-PC が必要であるが、MDI-PC だけでは効果がないことは明らかで、AB-PC もまた十分な量が必要であると報告しており、我々もまた両剤の体内分布の成績も含め同様に考えている。

すなわち、前報<sup>2)</sup>で、2 : 1 合剤をウサギおよびヒトに経口投与した際の血中濃度は、力価比でほぼ AB-PC : MDI-PC = 1 : 1 となることを報告したが、今回マウス血中濃度試験でもそれに近い成績を得ている。臨床的には、MDI-PC に感受性の菌種の幅は AB-PC にくらべてせまく、とくにグラム陰性菌感染に対しては無効である。したがって、この2剤併用の理論的根拠は、あくまでも AB-PC の失活を MDI-PC により阻害しその作用を保持させることにあると考えられる。

合剤ではその配合比が臨床効果に重要な意味をもつことはいままでもないが、以上の基礎的検討結果から、十分な臨床効果が期待できる適正な配合比は 2 : 1 とされべきであることが示唆された。

#### ま と め

AB-PC, MDI-PC 合剤はマウス感染実験において、AB-PC 耐性の *E. coli* 0205 株と *P. morganii* 0237 株の2株で合剤による相乗的感染防禦効果が認められた。

AB-PC 感性菌によるマウス感染実験で AB-PC, MDI-

PC 合剤は、AB-PC の効果に匹敵する相加的効果が認められた。

AB-PC 耐性の *S. aureus* 226 のマウス皮下膿瘍感染実験でも、合剤による相加的効果が認められた。

AB-PC と MDI-PC の配合比は、その決定には種々の要因が考慮されるべきであるが、マウス感染治療実験では、1 : 1, 2 : 1 いずれもほぼ同程度で、かつ十分に臨床的効果が期待し得る成績であつた。

#### 文 献

- 1) 三宅 章, 嵯峨井 均, 齊藤 哲, 安藤拓司, 五島 瑛智子 : Ampicillin と Dicloxacillin の協力作用に関する研究, I 試験管内抗菌作用。Chemotherapy 21(6) : 1235~1240, 1973
- 2) 石川浩明, 鈴木忠清, 星野保夫, 安藤拓司, 五島 瑛智子 : Ampicillin と Dicloxacillin の協力作用に関する研究, II 吸収および排泄。Chemotherapy 21(6) : 1241~1247, 1973
- 3) 横井山繁行, 藤原公策 : マイクロタイター法による抗生物質血中濃度の測定法。Jap. J. Antibiotics 24 : 277~281, 1971
- 4) 田所一郎 : ブドウ球菌のマウス皮下感染実験法。モダンメディア 13 : 110~118, 1967
- 5) 大藺 卓, 矢野邦一郎 : マウス皮下感染を利用する抗菌性物質のスクリーニング。モダンメディア 13 : 121~126, 1967
- 6) 五十嵐 勇, 服部善八郎, 三沢 洋, 福田邦昭, 小此木丘 : ブドウ球菌の実験的感染に関する研究。マウスの皮下膿瘍形成について。三共年報 17 : 148~153, 1965
- 7) SABATH L. D. & E. P. ABRAHAM : Synergistic action of penicillins and cephalosporins against *Pseudomonas pyocyanea*. Nature 204 : 1066~1069, 1964
- 8) SABATH L. D.; M. JAGO & E. P. ABRAHAM : Cephalosporinase and Penicillinase activities of a  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. Biochem. J. 96 : 739~752, 1965
- 9) ACRED P. & R. SUTHERLAND : Antibacterial activities of combinations of ampicillin and cloxacillin. Antimicrob. Agents & Chemother. 53 : 58, 1966
- 10) 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, III 動物感染治療効果および吸収排泄について。Chemotherapy 17 : 986~992, 1969
- 11) BACH J. A.; N. BUONO, D. CHISHOLM, K. E. PRICE, T. A. PURSIANO & A. GOUREVITCH : In vitro and in vivo synergism of mixtures of penicillins. Antimicrob. Agents & Chemother. 328~336, 1966

## CHEMOTHERAPEUTICAL EFFECT OF THE COMBINATION OF AMPICILLIN AND DICLOXACILLIN ON THE EXPERIMENTAL INFECTIONS IN MICE

SHIGEYUKI YOKOIYAMA, MINORU TORIYA, YASUO HOSHINO and  
TAKUJI ANDO

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

SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

The combination therapy of AB-PC and MDI-PC has been studied with clinically isolated pathogenic bacteria in mice by oral administration, and shown marked synergistic effects against AB-PC resistant strains, *E. coli* strain 0205 and *P.morganii* strain 0237, and also considerable effect against *S. aureus* 226.

Though the amount of AB-PC in combination drug is of course lower than that of AB-PC alone used as reference, the former has shown similar effect to the latter against *D. pneumoniae* III, *S. aureus* Smith, *S. hemolyticus* S 23 and *S. typhimurium* H.

Based on the antimicrobial activity, broad antibacterial spectrum *in vitro* and the distribution pattern *in vivo* of AB-PC, the 2 : 1 combination (AB-PC : MDI-PC) was assumed to be suitable for clinical use rather than 1 : 1 combination.