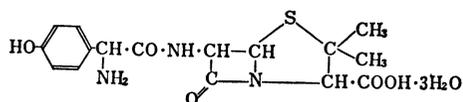


## 合成ペニシリン Amoxycillin にかんする細菌学的研究

中沢昭三・北中英良・大槻雅子・福井正憲

京都薬科大学微生物学教室

Amoxycillin は 1970 年英国ビーチャム社研究陣により開発された合成ペニシリンで、その化学構造は、Ampicillin の benzene 核の *para* 位に -OH 基を導入した  $\alpha$ -Amino-*p*-hydroxybenzyl penicillin trihydrate である。



その抗菌スペクトラムは Ampicillin (ABPC) と類似し、また内服できわめて吸収がよく ABPC と同量の内服で ABPC の 2 倍の血中濃度が認められるといわれている。

今回私どもは Amoxycillin にかんする *in vitro*, *in vivo* での細菌学的評価を、比較薬剤として ABPC を用いて検討を行なったので報告する。

## 実験方法

## (1) 抗菌スペクトラム

常法の日本化学療法学会感受性測定法に従がい、教室保存の標準菌種約 40 株について、その感受性 (MIC: mcg/ml) 測定を行なった。なおレンサ球菌群、肺炎球菌群、ジフテリア菌については 10% 馬血清液加寒天培地を、クロストリジウム属については TGC 培地を、ナイセリア属については GC 培地を使用した。

## (2) 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離されたブドウ球菌 100 株、大腸菌 37 株について上記同様その MIC を測定し、その感受性分布を調べた。

## (3) 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, 接種菌量の影響をブドウ球菌 209-P JC 株を試験菌として Heart infusion ブイオンを用いた液体希釈法により 37°C 20 時間培養後の MIC で求めた。

(4)  $\beta$ -Lactamase に対する安定性

臨床分離ペニシリン耐性ブドウ球菌 No. 87 株および大腸菌 No. 24 株から  $\beta$ -lactamase を抽出し、これに対する ABPC, Amoxycillin の安定性を検討した。

$\beta$ -Lactamase の抽出法は、Table 4 に示されるとお

りである。それぞれの菌を 37°C 20 時間寒天培地で培養後集菌し、生理食塩水で菌体を洗滌する。その菌体を凍結融解後 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。得られた沈殿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  $\beta$ -lactamase の各希釈液にそれぞれ 5 mcg/ml になるように、ABPC, Amoxycillin を加え、37°C 20 分間接触後、100°C 1 分間で  $\beta$ -lactamase を不活化し、枯草菌 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。

## (5) 抗菌作用型式

大腸菌 NIH JC 2 株を 1 白金耳トリプトソーヤブイオン培地に移植し、37°C 18 時間前培養した培養液を Heart infusion 培地にて  $10^8$  倍希釈した後、約 3 時間培養し対数期の途上において種々の濃度の薬剤を加えその増殖曲線を Biophotometer により測定するとともに、経時的に生菌数を 37°C 24 時間寒天平板培養によつて測定した。

## (6) 血中および臓器内濃度

体重 17~18 g の dd 系 (♂) マウスを 1 群 5 匹使用し、ABPC, Amoxycillin 250 mcg/mouse 経口投与後、経時的にマウスを屠殺し採血して、臓器は洗滌し M/15 PBS にてホモゲナイズし遠心上澄を検体とした。血清および臓器中の ABPC, Amoxycillin 濃度は、枯草菌を試験菌としカップ法による Bioassay にて測定した。

## (7) マウス実験的感染症に対する治療実験

i) マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する治療効果  
ブドウ球菌 Smith 株を 6% ムチン液に等量懸濁し、その 7 LD<sub>50</sub> を腹腔内に接種した。2 時間後種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を経口投与し、その生存率を観察した。

ii) マウス実験的肺炎球菌感染症に対する治療効果  
肺炎球菌 type III 株の 100 LD<sub>50</sub> をマウス腹腔内に接種し、その 2 時間後種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を経口投与しその生存率を観察した。

iii) マウス実験的 ABPC 耐性大腸菌感染症に対する治療効果

大腸菌 No. 24 株 (ABPC, Amoxycillin とも MIC :

>100 mcg/ml) を 6% ムチンに等量懸濁し、その 3LD<sub>50</sub> をマウス腹腔内に接種し、その 2, 6 時間後に種々の濃度の ABPC, Amoxycillin の 0.5% CMC 懸濁液を 2 回経口投与し、その生存率を観察した。

iv) マウス実験的肺炎桿菌感染症に対する治療効果

肺炎桿菌株を 10LD<sub>50</sub> マウスに腹腔内接種した。そして 2, 6 時間後に種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を 2 回経口投与し、その生存率を観察した。

v) マウス実験的変形菌感染症に対する治療効果

a) 変形菌 1287 株を 3LD<sub>50</sub> マウス腹腔内に接種した。2 時間後に種々の ABPC, Amoxycillin を経口投与し、その生存率を観察した。

b) 変形菌 No. 7 株の 6LD<sub>50</sub> をマウス腹腔内に接種し、2 時間後種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を経口投与し、その生存率を観察した。

vi) マウス実験的サルモネラ菌感染症に対する治療効果

サルモネラ株を腹腔内接種し、2 時間後種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与し、その生存率を観察した。

vii) マウス実験的緑膿菌感染症に対する治療効果

緑膿菌 C-5 株 10LD<sub>50</sub> をマウスに腹腔内接種した。2 時間後に種々の濃度の ABPC, Amoxycillin を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与し、その生存率を観察した。

#### 実験結果

抗菌スペクトラムについては、Table 1, 2 に示すとおり、グラム陽性、グラム陰性菌群すべてについて ABPC と Amoxycillin はほぼ同程度の抗菌力を示した。

臨床分離株の感受性分布については、Fig. 1, 2 に示すとおりである。すなわち、ブドウ球菌については、ABPC, Amoxycillin とも高度耐性から中等度、低度そして感受性株とだたらと巾広い同様の感受性分布を示した。次に大腸菌では高度耐性の山と感受性の山と 2 峰性の分布が見られ、ABPC と Amoxycillin の間に差異は認められなかった。

抗菌力におよぼす諸因子の影響の中で、培地

Table 1 Antibacterial spectrum  
a) Gram-positive bacteria

Test strain	ABPC	Amoxycillin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.1	0.1
" Smith	0.1	0.1
" Terajima	0.2	0.39
" Neumann	0.2	0.39
" E-40	0.1	0.2
" No. 80 (PC-R)	>100	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.2	0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> S <sub>23</sub>	0.013	0.013
" Cook	0.025	0.025
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.56	1.56
<i>Streptococcus viridans</i>	3.12	1.56
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type I	0.025	0.025
" type II	0.05	0.05
" type III	0.05	0.05
<i>Sarcina lutea</i> PCI-1001	<0.013	<0.013
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.05	0.05
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.78	0.39
<i>Clostridium tetani</i>	0.39	0.39
<i>Clostridium perfringens</i>	0.39	0.39

MIC (mcg/ml)

Table 2 Antibacterial spectrum  
b) Gram-negative bacteria

Test strain	ABPC	Amoxycillin
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.05	0.05
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.1	0.1
<i>Escherichia coli</i> NIH JC	6.25	6.25
" NIH	1.56	1.56
" K-12	3.12	6.25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	25	50
<i>Salmonella typhi</i>	0.78	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.2	0.2
" B	0.39	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i>	3.12	3.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.78	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	3.12	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a	1.56	3.12
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	12.5
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	1.56
<i>Proteus vulgaris</i>	50	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	3.12	3.12
<i>Proteus morgani</i> Kono	100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100

MIC (mcg/ml)

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates  
a) *Staph. aureus*

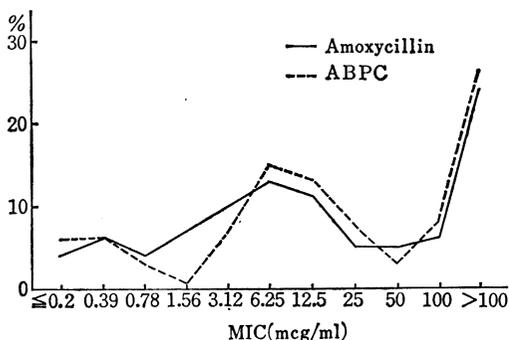


Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates  
b) *E. coli*

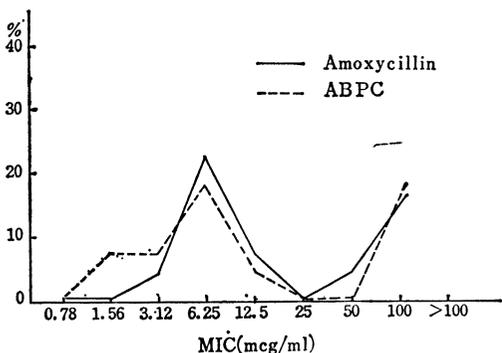


Table 3 Influence of various factors on activity

Factors		<i>Staph. aureus</i> 209-P JC	
		ABPC	Amoxycillin
pH	9	0.1	0.2
	8	0.1	0.1
	7	0.1	0.1
	6	0.05	0.1
	5	0.05	0.1
Human serum (%)	0	0.05	0.1
	10	0.05	0.1
	25	0.05	0.1
	50	0.05	0.1
Inoculum size (cells/ml)	$7.5 \times 10^8$	0.1	0.1
	$7.5 \times 10^7$	0.05	0.05
	$7.5 \times 10^6$	0.025	0.05
	$7.5 \times 10^5$	0.013	0.013

pH および人血清添加については、Table 3 に示すとおり、ABPC、Amoxycillin とほとんど影響は見られなかつた。次に接種菌量の影響については、同じ Table 3

に示すとおり、ABPC、Amoxycillin とともに  $10^5$  個/ml 以上で段階的に抗菌力の減弱がみられた。

$\beta$ -Lactamase に対する安定性については、Fig. 3, 4 に示すとおり、臨床分離のペニシリン耐性ブドウ球菌の

Fig. 3 Stability of ABPC and amoxycillin to  $\beta$ -lactamase  
*Staph. aureus* No. 87

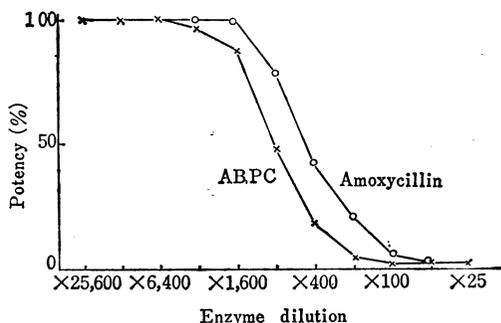


Fig. 4 Stability of ABPC and amoxycillin to  $\beta$ -lactamase  
*E. coli* No. 24

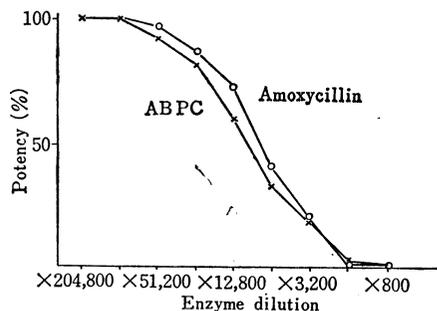


Table 4 Extraction and purification procedures of  $\beta$ -lactamase

<i>E. coli</i> No. 24 culture (20 hrs)	<i>Staph. aureus</i> No. 87 culture (20 hrs)
suspension of cells in P.B. (PH 7.2) treated sonically in supersonic vibrator for 10 min. at 0°C	
Broken cells centrifuged at 12000 rpm for 10 min. at 0°C	
Supernatant fluid	Precipitate (discard)
added to 30% saturated $(NH_4)_2SO_4$	
Supernatant fluid	Precipitate I
added to 60% saturated $(NH_4)_2SO_4$	
Supernatant fluid	Precipitate II
added to 100% saturated $(NH_4)_2SO_4$	
Supernatant fluid	Precipitate III
lactamase ( <i>Staph. aureus</i> ) precipitate I ( <i>E. coli</i> No. 24) precipitate III	

産生する  $\beta$ -lactamase および臨床分離の ABPC 耐性大腸菌の産生する  $\beta$ -lactamase によつて、ABPC、Amoxycillin と同様の傾向で不活化された。

抗菌作用型式については、Fig. 5, 6 に示すとおり、比濁法、生菌数測定法いずれの場合も Amoxycillin の殺菌的作用が ABPC よりすぐれており、Amoxycillin の 6.25 mcg/ml は ABPC の 12.5 mcg/ml の殺菌効果とほぼ同一であつた。

Fig. 5 Bactericidal activity of ABPC and amoxycillin against *E. coli* NIH JC-2

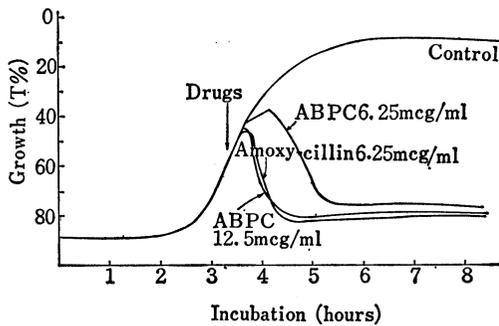
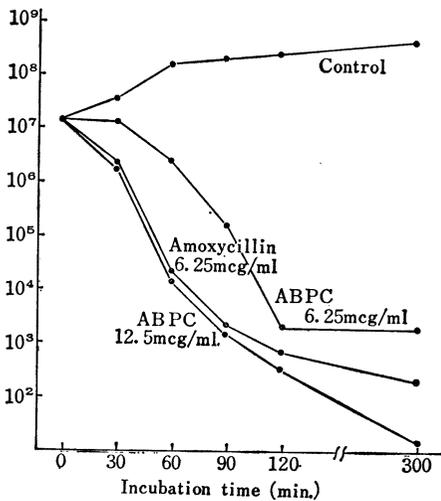


Fig. 6 Bactericidal activity of ABPC and amoxycillin against *E. coli* NIH JC-2



血中および臓器内濃度については、Fig. 7, 8 に示すとおり、ABPC では吸収のピーク値は薬剤投与15分後で、ピーク時の濃度は肝で約 4.3 mcg/g、腎、血清で 4.0 mcg/g or ml、肺では 1.5 mcg/g であつた。Amoxycillin では吸収のピーク値は薬剤投与後30分後でその時の濃度は腎で 14.6 mcg/g、肝で 5.5 mcg/g、血清で 3.7 mcg/ml、肺で 2.9 mcg/g であつた。

マウス実験的感染症に対する治療実験については、

Fig. 7 Tissues and serum levels after oral administration of ABPC in mice (250 mcg/mouse)

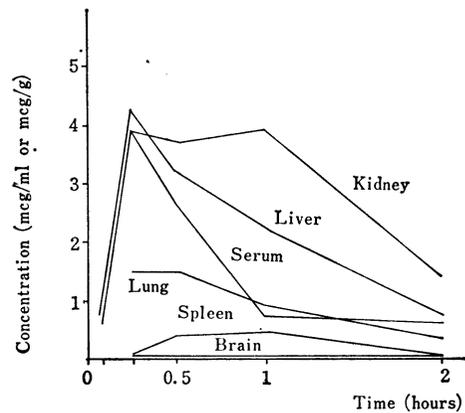


Fig. 8 Tissues and serum levels after oral administration of amoxycillin in mice (250 mcg/mouse)

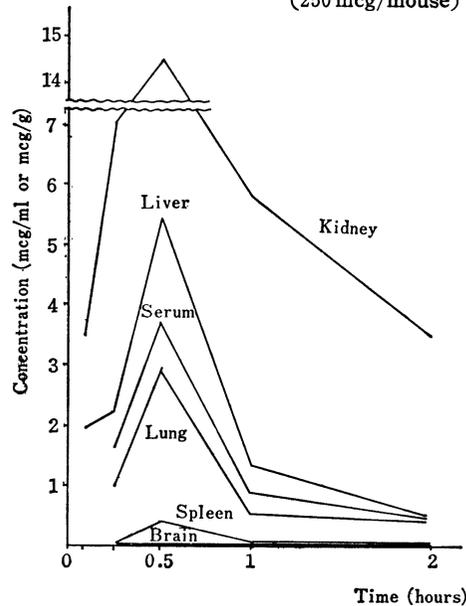


Fig. 9~16, Table 5 に示すとおり、マウス実験的ブドウ球菌感染症については、Amoxycillin は ABPC よりも約 1.7 倍の効果を示し、肺炎球菌感染症については約 3.5 倍、肺炎桿菌感染症については約 3 倍、変形菌感染症 (*Proteus mirabilis* 1287) については 1.8 倍と Amoxycillin は ABPC に比して強い効果を示した。しかしマウス実験的ペニシリン耐性大腸菌感染症、変形菌感染症 (*Proteus vulgaris* No.7)、サルモネラ菌感染症、緑膿菌感染症に対しては ABPC、Amoxycillin と効果認めなかつた。

Fig. 9 Protective effect with ABPC and amoxycillin for experimental *Staph. aureus* Smith infection in mice

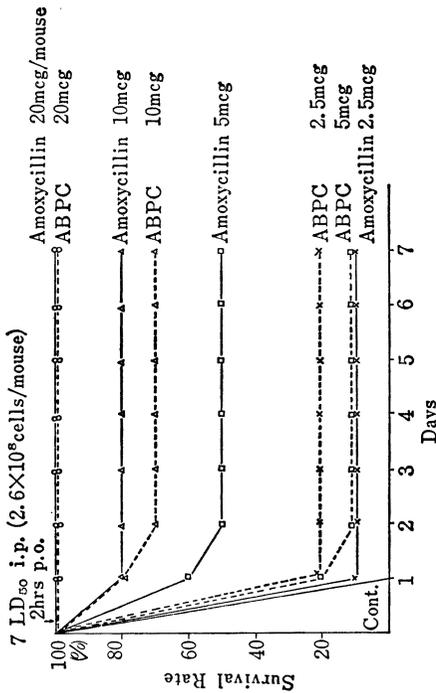


Fig. 10 Protective effect with ABPC and amoxycillin for experimental *Diplococcus pneumoniae* III infection in mice

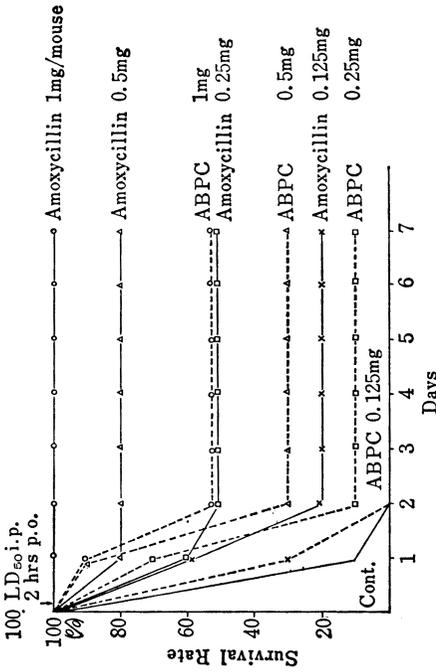


Fig. 11 Protective effect with ABPC and amoxycillin for experimental *Klebsiella pneumoniae* infection in mice

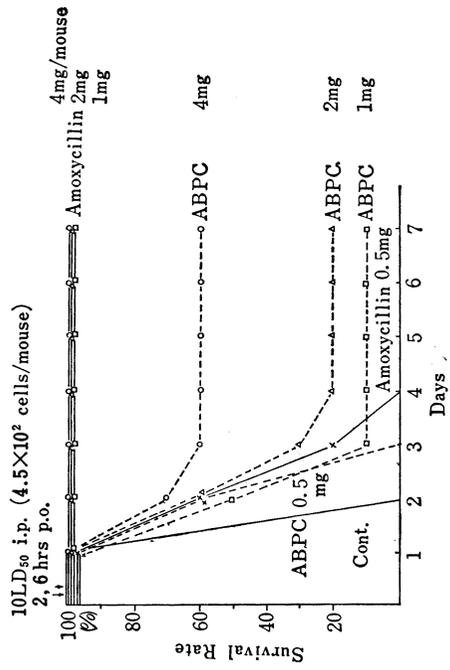


Fig. 12 Protective effect with ABPC and amoxycillin for experimental *Escherichia coli* No.24 infection in mice

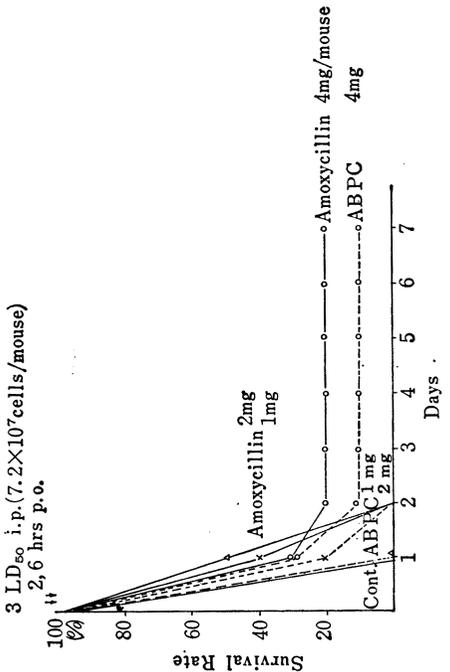


Fig. 13 Protective effect with ABPC and amoxicillin for experimental *Proteus mirabilis* 1287 infection in mice

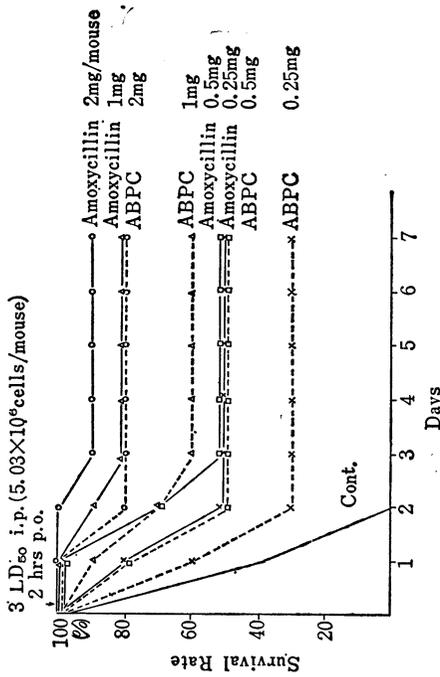


Fig. 14 Protective effect with ABPC and amoxicillin for experimental *Proteus vulgaris* NO.7 infection in mice

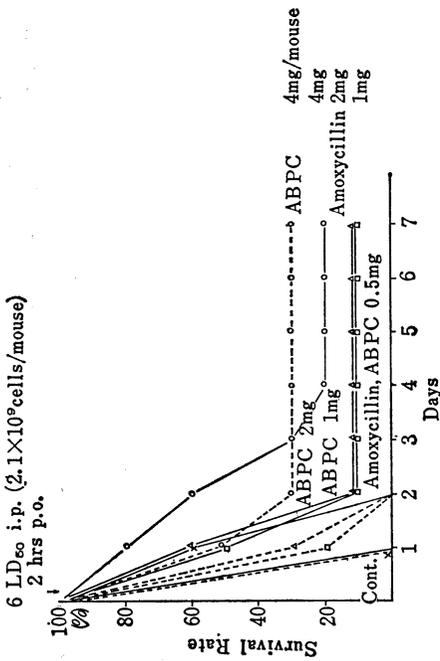


Fig. 15 Protective effect with ABPC and amoxicillin for experimental *Salmonella enteritidis* infection in mice

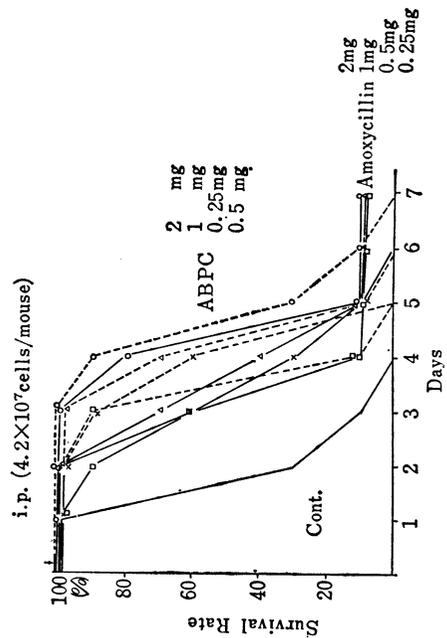


Fig. 16 Protective effect with ABPC and amoxicillin for experimental *Pseudomonas aeruginosa* C-5 infection in mice

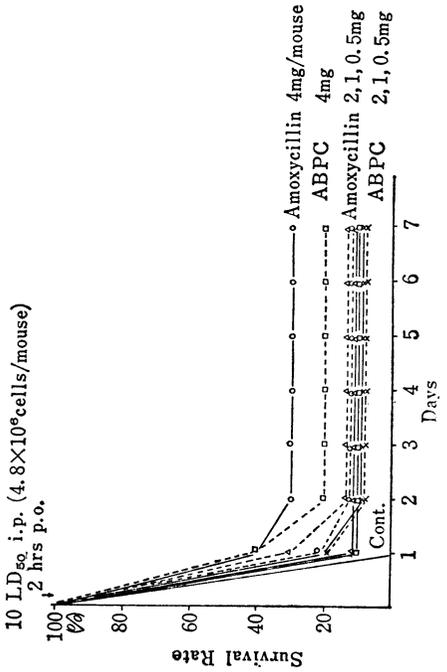


Table 5 Protecting effect of amoxycillin against experimental mice infections

Challenge strain	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)		a/b
	ABPC <sup>a</sup>	Amoxycillin <sup>b</sup>	
<i>Staph. aureus</i> Smith	0.0045	0.0025	1.73
<i>Diplo. pneumoniae</i> type III	0.87	0.25	3.48
<i>E. coli</i> No. 24 (ABPC MIC : >100 mcg/ml)	>4	>4	
<i>Kleb. pneumoniae</i>	3.48	1.10	3.16
<i>Prot. mirabilis</i> 1287	0.63	0.35	1.80
<i>Prot. vulgaris</i> No. 7	>4	>4	
<i>Salmonella enteritidis</i>	>2	>2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 5	>4	>4	

## 総括および考察

ピーチャム社研究所で開発された経口用合成ペニシリン Amoxycillin について構造類似の ABPC を比較薬剤としてその細菌学的評価を行なったところ、本剤は R. SUTHERLAND and G. N. ROLINSON<sup>1)</sup>の報告と同様に、グラム陽性、グラム陰性のすべての菌種に対して ABPC とほぼ同様の巾広い抗菌力を示し、また臨床分離ブドウ球菌および大腸菌に対する感受性分布においても同様の成績を示した。

抗菌力におよぼす培地 pH, 接種菌量, 人血清蛋白の影響についても ABPC とほとんど同様の傾向を示した。またペニシリン耐性ブドウ球菌 No. 87 株および ABPC 耐性大腸菌 No. 24 株由来の  $\beta$ -lactamase に対する安定性においても ABPC とほぼ同様の傾向であった。

抗菌作用型式について、R. SUTHERLAND and G. N. ROLINSON<sup>1)</sup>は大腸菌 NCTC 10418 株に、ABPC, Amoxycillin 各 5, 20 mcg/ml 作用させた後、経時的 (3, 6, 24 時間) に生菌数を測定した結果、ABPC と Amoxycillin との間に殺菌効果の差を認めなかつた。しかし私どもが薬剤作用後 (30', 60', 90', 120') と R. SUTHERLAND and G. N. ROLINSON の場合よりも薬剤作用後より早い時間内においてその抗菌作用型式を検討したところ、比濁法、生菌数測定法いずれの場合も Amoxycillin の殺菌的作用が ABPC より優れており、Amoxycillin の 6.25 mcg/ml は、ABPC の 12.5 mcg/ml の殺菌効果とほぼ同一の効果を示した。

血中および臓器内濃度については E. A. P. CROYDON and R. SUTHERLAND<sup>2)</sup>, P. ACRED *et al.*<sup>3)</sup>が詳細な実験結果を報告しているが、マウスにおける血中濃度について、彼らは 50 mg/kg 経口投与において、ABPC, Amoxycillin とも投与後 20 分で吸収は最大となり Amoxycillin は ABPC に比して約 5 倍余り多く吸収されることを認めている。しかし私どもがマウスにおける感

染実験条件、すなわち 250 mcg/mouse 経口投与において検討した結果、吸収の最大値は ABPC では投与後 15 分、Amoxycillin では投与後 30 分で Amoxycillin は ABPC に比して約 2 倍多く吸収されることを認めた。またマウス実験的感染症治療実験において、P. ACRED *et al.*<sup>3)</sup>はマウス実験的ブドウ球菌感染症において約 2 倍、肺炎球菌感染症において約 4~5 倍、肺炎桿菌感染症において約 3 倍、変形菌感染症において約 1.5 倍本剤が ABPC よりも ED<sub>50</sub> 値においてすぐれていることを報告しているが、私どももこれら菌株について実験的マウス感染症治療実験を行ない、本剤が ABPC に比しマウス実験的感染症においてすぐれた効果を有することを追試することが出来た。本剤が ABPC に比較してマウス実験的感染症においてすぐれている原因として本剤の血中および臓器中の高い移行性が考えられるが、今回私どもが明らかにしたように本剤が抗菌作用型式において ABPC に比較してその殺菌的作用がすぐれているという結果も本剤の有効性の原因の 1 つとも考えられ興味深く、今後さらに検討してゆきたいと考える。

## 参考文献

- 1) SUTHERLAND, R. & G. N. ROLINSON :  $\alpha$ -Amino-*p*-hydroxybenzyl-penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin : *In vitro* evaluation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1970: 411~415, 1971
- 2) CROYDON, E. A. P. & R. SUTHERLAND :  $\alpha$ -Amino-*p*-hydroxybenzyl-penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin : Absorption and excretion in man. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1970 : 427~430, 1971
- 3) ACRED, P.; P. A. HUNTER, L. MIZEN & G. N. ROLINSON :  $\alpha$ -Amino-*p*-hydroxybenzyl penicillin (BRL 2333), a new broad-spectrum semisynthetic penicillin : *In vivo* evaluation. *Antimi-*

- icrobial Agents and Chemotherapy-1970 : 416~422. 1971
- 4) 中沢昭三, 和島剛, 井沢武年, 津田三和, 原良子 : 合成ペニシリン Sulfobenzylpenicillin に関する細菌学的評価。Chemotherapy 19 : 867~864, 1971
- 5) 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 : 新しい合成ペニシリン Aminocyclohexyl-penicillin に関する細菌学的研究。Chemotherapy 18 : 311~317, 1970

## MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW SYNTHETIC PENICILLIN "AMOXYCILLIN"

SHOZO NAKAZAWA, EIRYO KITANAKA, MASAKO OHTSUKI and MASANORI FUKUI

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Amoxycillin, a new synthetic penicillin developed by Beecham in 1970, was evaluated microbiologically in comparison with ampicillin (ABPC) of an analogous structure, and the following results were obtained.

Firstly, there was no remarkable difference between this agent and ABPC in the experiments *in vitro* on antibacterial activity (MIC), antibacterial spectrum, sensitivity of *Staphylococci* and *Escherichia coli* isolated clinically, influence of various factors (pH, amount of inoculated bacterium, serum protein) on antibacterial activity, and stability to  $\beta$ -lactamase which is derived from penicillin-resistant *Staphylococci* and *Escherichia coli* isolated clinically. However, the authors obtained the first evidence from the experiment on the bactericidal effect of this agent and ABPC on the growth curve of *Escherichia coli* that this agent is quick in activity and about twice as effective as ABPC, and this fact will be the key to further morphological and biochemical studies on the mechanism of antibacterial activity of this agent.

Next in the experiments *in vivo*, it was confirmed that this agent is twice higher than ABPC in the concentration in the blood and organs of the mouse. Further, the therapeutic trials of experimental infections in mouse revealed the superiority of this agent to ABPC.