

Mecillinam に関する基礎的検討

川辺晴英・福岡義和・林 敏雄・沢田洋介・斉藤和子・三橋 進
群馬大学医学部微生物学教室

新合成ペニシリン Mecillinam¹⁾ について抗菌作用, β -lactamase に対する安定性, マウス感染治療効果などについて検討を行なったので報告する。

実験材料及び実験方法

1) 使用菌株

菌株はすべて人の病巣から分離されたものを使用した。

2) 使用薬剤

Mecillinam, Sulbencillin (SBPC) は武田薬品から分与された。Ampicillin (ABPC) は協和醸酵から, Carbenicillin (CBPC), Cefazolin (CEZ) は藤沢薬品より, Cephalexin (CEX) は東洋醸造より分与をうけた。

3) 使用培地

感受性測定には Heart infusion 寒天培地 (栄研) を使用した。殺菌効果の測定には, Brain heart infusion (BHI) 培地 (Difco) を, minimum bactericidal concentration (MBC) の測定には, 普通ブイオンを用いた。

4) 抗菌スペクトラム

菌株をペプトン水に接種し, 37°C で 1 夜培養したのち, 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml を各々 1 白金耳ずつ接種し, 37°C 18 時間後に判定した。

5) β lactamase の測定

PERRET 法²⁾により測定した。

6) マウス感染治療実験

ICR-JCR マウス 20 ± 1 g を使用した。試験菌には, *E. coli* ML 4706 (MLD 1.5×10^6 cells/mouse), *E. coli* ML 5476 (MLD 6×10^7 cells/mouse) を用い, 腹腔内感染後ただちに薬剤を皮下注射し, 3 日後に判定した。

実験成績及び考察

1) 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離の *Salmonella*, *Proteus* group, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Sta-*

phylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis* の 9 菌種, 各 25 株について, Mecillinam と ABPC との抗菌力を調べた。 10^8 cells/ml, 1 白金耳の接種では, *Salmonella*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* の菌種において Me-

Fig. 1 MIC distributions of Mecillinam, ABPC and CEZ against *E. coli*

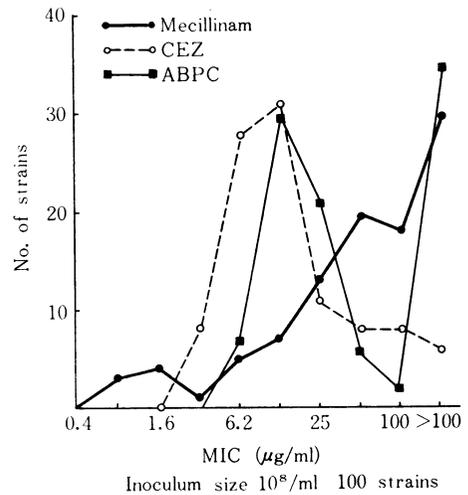
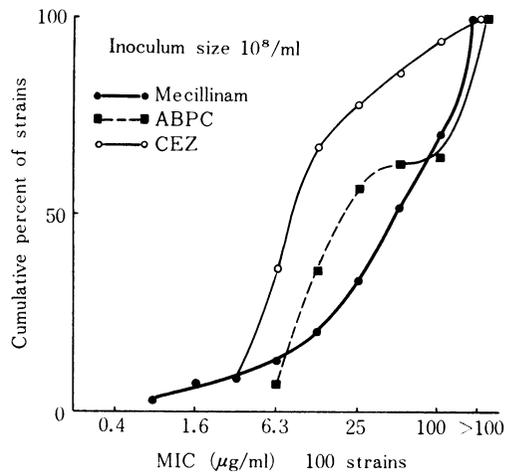


Fig. 2 Comparative susceptibility of *E. coli*



cillinam の MIC は ABPC よりも勝っていたが、その他の菌種では同等もしくは、やや劣っていた。*Pseudomonas* に対しては全く無効であった。そこで Mecillinam が有効であった *E. coli* と *Klebsiella* について菌株数をさらに増して同様の検査を行なった。なお、対照薬剤として ABPC, CEZ を用いた。Fig. 1 は 10^8 cells/ml を 1 白金耳接種した時の *E. coli* 100 株に対する 3 薬剤の感受性分布を示し、Fig. 2 には、その累積曲線を示した。Mecillinam の MIC 分布は CEZ, ABPC のそれより低い所に一つのピークを有したが、大部分の菌株において CEZ, ABPC に劣った。

Fig. 3 MIC distributions of Mecillinam, ABPC and CEZ against *E. coli*

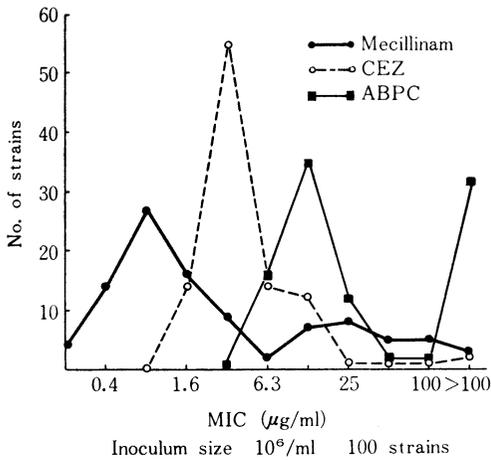
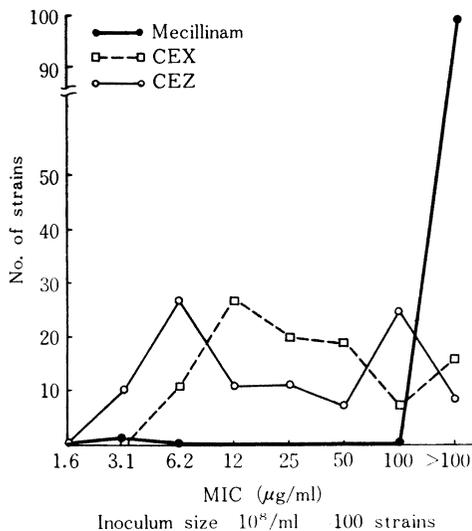


Fig. 5 MIC distributions of Mecillinam, CEZ and CEX against *Klebsiella pneumoniae*



累積曲線を見ると50%阻止は、Mecillinam は $50 \mu\text{g/ml}$, ABPC $20 \mu\text{g/ml}$, CEZ $8.5 \mu\text{g/ml}$ であった。

次に 10^6 cells/ml を 1 白金耳接種の場合は Mecillinam の MIC 分布の一つのピークは、 $0.8 \mu\text{g/ml}$ にあり、CEZ, ABPC のそれは各々 $3.1 \mu\text{g/ml}$, $12.5 \mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 3)。累積曲線より50%阻止をみると Mecillinam は約 $1 \mu\text{g/ml}$, CEZ は $2 \mu\text{g/ml}$, ABPC は $12.5 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 4)。

次に *Klebsiella pneumoniae* 100株を用いて同様に感受性分布を調べた。*E. coli* においては、Mecillinam の対照薬剤として CEZ, ABPC を用いたが、ABPC は *Klebsiella* にはほとんど無効である為、対照薬剤には、

Fig. 4 Comparative susceptibility of *E. coli*

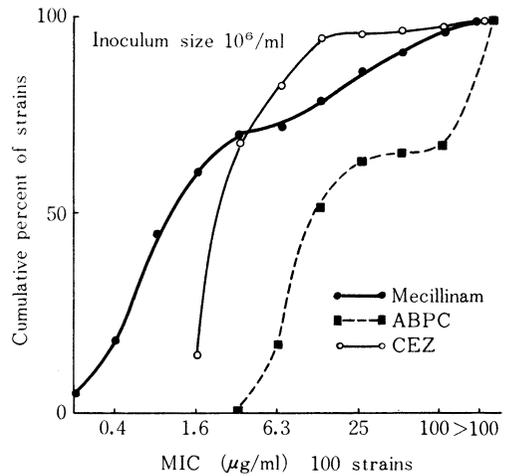
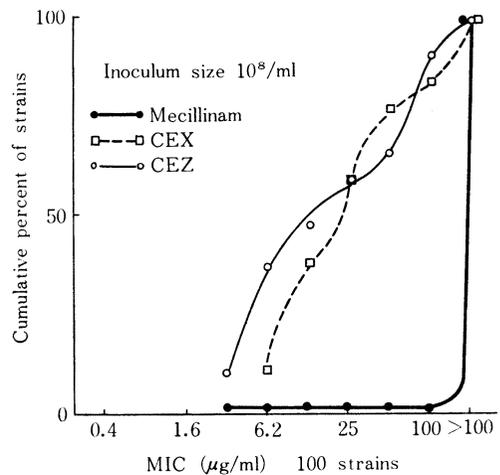


Fig. 6 Comparative susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*



CEZ, CEX を使用した。 10^8 cells/ml の菌液を用いた場合、Mecillinam の MIC は、ほとんどが $100 \mu\text{g/ml}$ 以上を示した (Fig. 5)。その時の50%阻止は Mecillinam $100 \mu\text{g/ml}$ 以上、CEZ $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、CEX $17 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 6)。

接種菌量を 10^6 cells/ml 1白金耳にすると、Mecillinam は $0.8 \mu\text{g/ml}$ に MIC ピークを示す一つの山がみられこれが全体の20%を占め、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上のものが30%を占めた。その時の CEZ, CEX の MIC はそれぞれ $3.1 \mu\text{g/ml}$, $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 7)。さらにこれの累積曲線から50%阻止を求めると、Mecillinam は $9 \mu\text{g/ml}$ 、CEZ は $3 \mu\text{g/ml}$ 、CEX は $6 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 8)。

2) 殺菌効果

E. coli 25株を用いて Mecillinam の MIC と MBC

Fig. 7 MIC distributions of Mecillinam, CEZ and CEX against *Klebsiella pneumoniae*

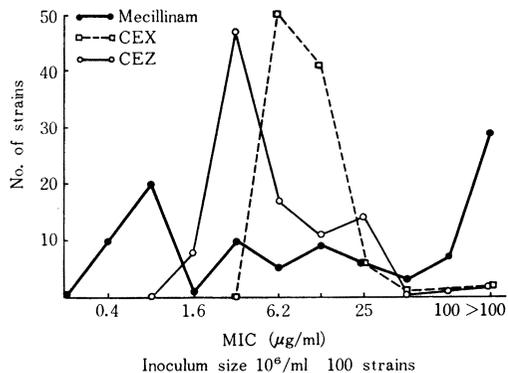


Fig. 8 Comparative susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*

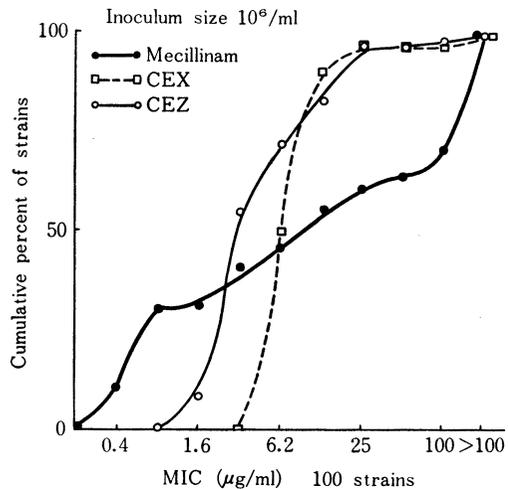


Fig. 9a Antibacterial activity of Mecillinam against *E. coli*

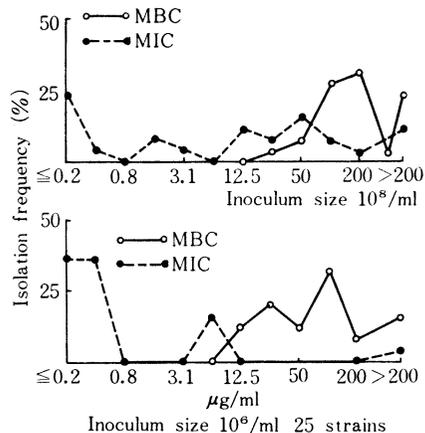


Fig. 9b Antibacterial activity of ABPC against *E. coli*

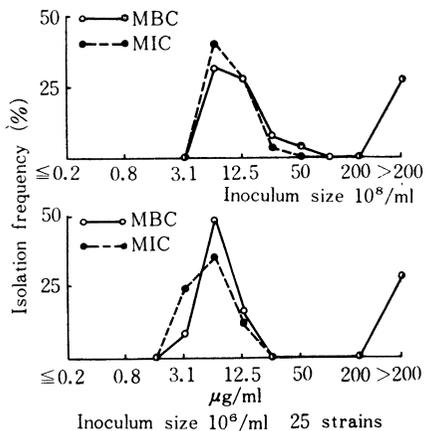


Fig. 9c Antibacterial activity of CBPC against *E. coli*

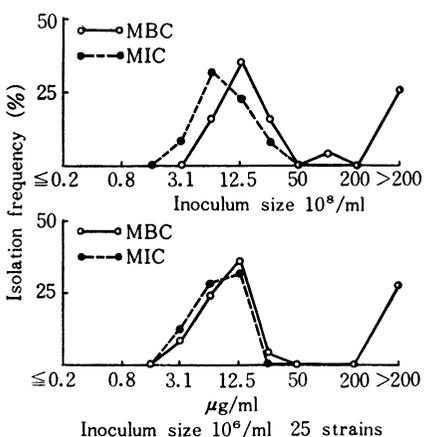


Fig. 10a Bactericidal effect of Mecillinam

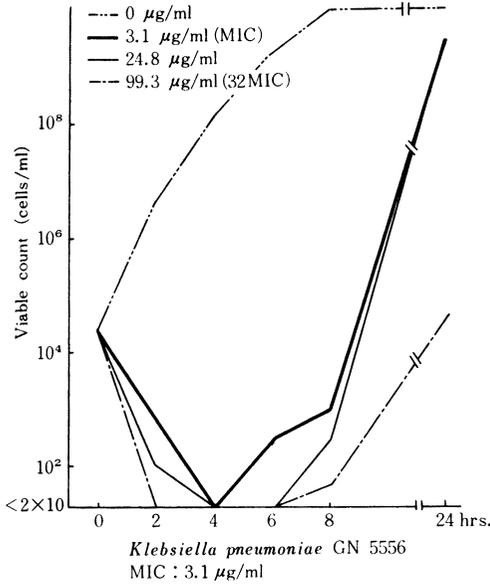


Fig. 10b Bactericidal effect of CBPC

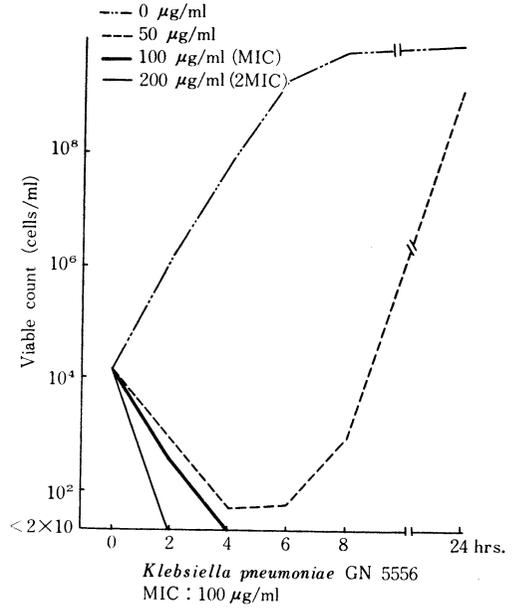


Fig. 10c Bactericidal effect of SBPC

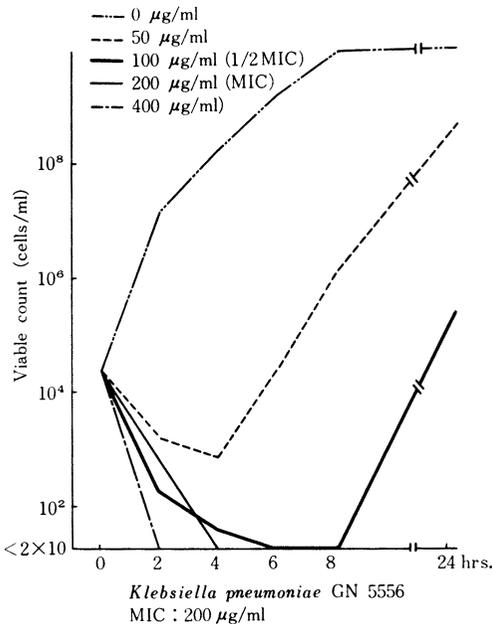
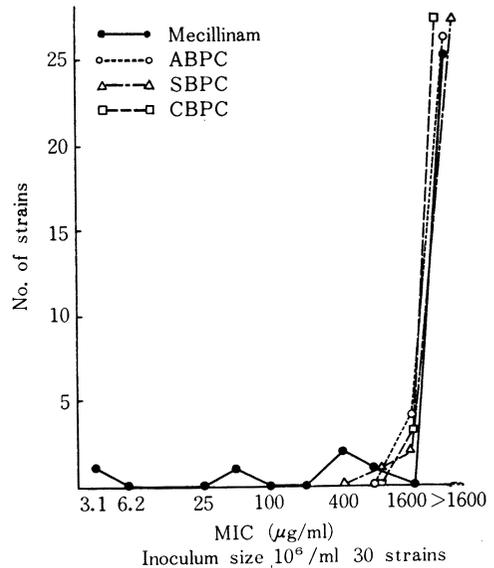


Fig. 11 MIC distributions of Mecillinam, CBPC and SBPC against ABPC resistant *E. coli* strains



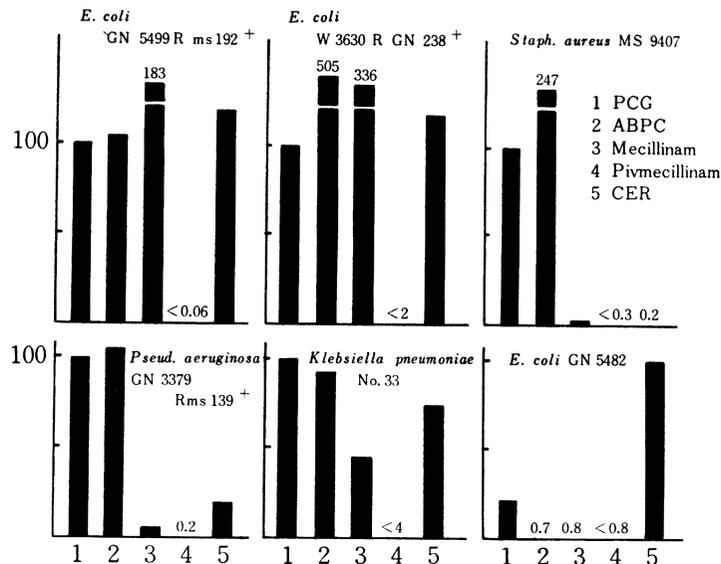
を比較検討した。Mecillinam は、MIC ピークに比し MBC ピークがかなり高い濃度にずれ、この薬剤の殺菌効果は、他の薬剤に比し弱いと思われた (Fig. 9a)。対照薬剤として ABPC、CBPC を用い同様な実験を行った。ABPC、CBPC の場合では接種菌量の影響は、ほ

とどなく MIC と MBC ピークは略一致した (Fig. 9b, 9c)。更に各薬剤を作用して経時的に生菌数を測定した。試験菌には、*Klebsiella pneumoniae* GN 5556 を用い、 2×10^4 cells/ml の場合には、MIC 量、8 MIC 量、32 MIC 量に相当する薬剤量を添加し、経時的に生

Table 1 Antibacterial activity of Mecillinam, Pivmecillinam, ABPC and CER

Strain	MIC($\mu\text{g/ml}$)							
	Mecillinam		Pivmecillinam		ABPC		CER	
	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>Staph. aureus</i> MS9407	>1600	>1600	>1600	>1600	400	25	6.25	<3.2
<i>E. coli</i> GN5499R ms192 ⁺	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	400
<i>E. coli</i> W3630R GN238 ⁺	>1600	<3.2	>1600	<3.2	>1600	800	25	25
<i>Pseud. aeruginosa</i> GN3379R ms139 ⁺	>1600	400	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
<i>Klebsiella pneumoniae</i> No. 33	>1600	200	>1600	200	>1600	>1600	800	400
<i>E. coli</i> GN5482	>1600	<3.2	>1600	<3.2	>1600	400	>1600	100

Fig. 12 Substrate specificity of penicillinases



菌数を測定した。薬剤添加4時間後には、菌は死滅し検出不能であったが、MIC量では6時間、8MIC量では8時間、32MIC量を加えた群においてすら低いながら8時間目より菌の再増殖を認めた (Fig. 10a)。これらの結果はMIC値、MBC値を比較した先の結果と一致している。

次に対照薬剤としてCBPC、SBPCを用いて同時に同様な実験を行った。CBPCにおいては、MIC量の薬剤濃度では4時間、2MIC量においては2時間、 $\frac{1}{2}$ MIC量4時間まで生菌数の減少をみたが、8時間後には菌の再増殖が認められた (Fig. 10b)。SBPCでは、MIC量、および2MIC量においてCBPCの場合と全く同様な結果であったが $\frac{1}{2}$ MIC量では菌の再増殖がみられ

た (Fig. 10c)。

3) Ampicillin 耐性 *E. coli* に対する抗菌作用

ABPC耐性 *E. coli* 30株を用いて Mecillinam, CBPC, SBPC に対する抗菌力を接種菌量 10^6 cells/ml 1白金耳を用いて調べた (Fig. 11)。ABPCに高度耐性 *E. coli* に対して Mecillinam が $50 \mu\text{g/ml}$ 程度のMICを示す菌がわずかにみられたが、対照として用いたCBPC、SBPCでは全て交叉耐性を示した。

4) β -lactamase に対する安定性

各種 β -lactamase を産生する菌種に対する Mecillinam の安定性を調べた。Table 1には、用いた菌種の Mecillinam, ABPC, CER のMICを示した。接種菌量は 10^8 cells/ml 1白金耳 (10^6 cells) と 10^6 cells/ml 1白

Table 2 Antibacterial activity of Mecillinam against *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	MIC($\mu\text{g/ml}$)										
	Mecillinam		CBPC		SBPC		ABPC		CER		
	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	
ML4259 Rms241 ⁺	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
ML4259 Rms242 ⁺	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
ML4259 Rms243 ⁺	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
GN6711	>1600	>1600	100	200	50	100	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
GN6718	>1600	>1600	50	50	25	50	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600

Table 3 Substrate specificity of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*

Stain	Type	Specific activity (u/mg of protein)	PCG	Mecillinam	CBPC	SBPC	ABPC	CER
ML4255 Rms241 ⁺	PCase	152	100	12	123	62	103	17
ML4259 Rms242 ⁺	PCase	128	100	15	100	60	110	15
ML4259 Rms243 ⁺	PCase	156	100	12	117	66	117	20
GN6711	CSase	172 ^{a)}	21	0.2	0.1	0.1	1.3	100
GN6718	CSase	105 ^{b)}	34	0.2	0.1	0.1	1.3	100

PCG, inducer.

Table 4 Antibacterial activity of Mecillinam, ABPC, CBPC and CER

Strain	MIC($\mu\text{g/ml}$)							
	Mecillinam		ABPC		CBPC		CER	
	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
ML1410 Rms245 ⁺	200	50	>3200	400	>3200	1600	100	6.25
ML1410 Rms228 ⁺	>3200	>3200	>3200	1600	>3200	>3200	50	12.5
ML1410 Rms229 ⁺	>3200	100	3200	400	>3200	3200	100	6.25
ML1410 Rms230 ⁺	>3200	800	>3200	800	>3200	1600	50	3.2
ML1410 Rms231 ⁺	>3200	>3200	>3200	1600	>3200	>3200	50	12.5
<i>Klebsiella</i> GN5538	>3200	3.2	1600	50	1600	400	—	—
<i>Klebsiella</i> GN5555	>3200	>3200	3200	1600	3200	400	—	—
<i>Klebsiella</i> GN5565	1600	≤ 1.6	400	25	800	400	—	—
<i>Klebsiella</i> GN5586	>3200	400	1600	50	1600	400	—	—
<i>Klebsiella</i> GN5587	>3200	12.5	1600	25	800	400	—	—
<i>Klebsiella</i> GN5593	1600	50	3200	50	800	400	—	—
<i>E. coli</i> ML1410	400	3.2	12.5	6.25	50	6.25	6.25	3.2

金耳 (10^4 cells) を用いた。Fig. 12 に、Table 1 に示した菌株の産生する β -lactamase の基質特異性を示した。*E. coli* の産生する I 型 penicillinase (PCase) に対しては、ABPC よりもやや弱い傾向を示した。II 型 PCase (P_{GN238}) に対しては ABPC, Mecillinam 共によく水分解された。

Staph. aureus の PCase, *Pseud. aeruginosa* の PCase

や carbenicillinase に対しては全く安定であった。先に示した様に、*Pseud. aeruginosa* に対して Mecillinam が全く無効であるにもかかわらず *Pseud. aeruginosa* の β -lactamase に安定である事を知った。さらに菌株を増してこれらの事実を確かめた (Table 2, 3)。*Pseud. aeruginosa* の R 因子上にあるペニシリン耐性は PCase, carbenicillinase によるものがほとんどであるが、これ

Table 5 Substrate specificity and specific activity of penicillinases

Strain	Specific activity (u/mg protein)	Substrate				
		PCG	Mecillinam	ABPC	CBPC	CER
ML1410 Rms245 ⁺	89	100	28	124	6	42
ML1410 Rms228 ⁺	212	100	174	97	10	144
ML1410 Rms229 ⁺	58	100	29	173	8	58
ML1410 Rms230 ⁺	91	100	29	128	7	43
ML1410 Rms231 ⁺	201	100	196	122	10	153
<i>Klebsiella</i> GN5538	8	100	26	151	10	47
<i>Klebsiella</i> GN5555	11	100	28	148	9	72
<i>Klebsiella</i> GN5565	10	100	37	133	4	57
<i>Klebsiella</i> GN5586	7	100	118	161	12	94
<i>Klebsiella</i> GN5587	11	100	37	143	12	55
<i>Klebsiella</i> GN5593	12	100	35	134	13	54
<i>E. coli</i> ML1410	1	25	0.1	10	0.5	100

らの β -lactamase に対して Mecillinam は、やはり安定であった。*Pseud. aeruginosa* の chromosome 性の β -lactamase は、cephalosporinase であるが、これには当然 Mecillinam は安定であった。

次に Mecillinam は、*Klebsiella pneumoniae* による抗菌作用を示すので、*Klebsiella* 由来の R 因子を *E. coli* ML 1410 に移したものの 5 株と R 因子をもたない *Klebsiella* 6 株の各 PCase について Mecillinam の安定性をみた。これらの菌株の各種 β -lactam 抗生剤の MIC を Table 4 に示した。前述した如くほとんどの菌株において Mecillinam の MIC は、接種菌量によって強い影響をうけた。Table 5 に PCase の基質特異性を示した。上段は R 因子による I 型 PCase、下段は chromosome 性の PCase 産生株である。R 因子による典型的な I 型 PCase (Rms₂₂₈, Rms₂₃₁) においては一般的に Mecillinam は、ABPC にくらべてよく水解される傾向を示し、また Mecillinam の MIC も接種菌量を低下させても変動はなかった。次に R 因子による PCase ではあるが *Klebsiella* 菌特有の PCase (I 型 PCase に属す) をもつ菌 (Rms₂₄₅, Rms₂₂₉, Rms₂₃₀) においては、Mecillinam は ABPC に比し安定であった。またこれらの菌の Mecillinam に対する MIC は接種菌量の影響をうけた。下段に示した chromosome 性の PCase についても前述した R 因子による PCase の場合と同様な結果であった。

5) マウス感染治療効果

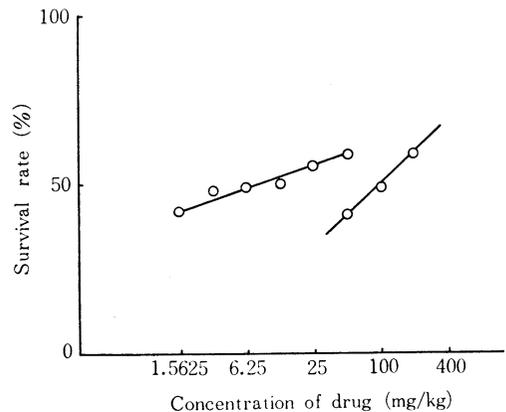
Mecillinam, ABPC に感受性を示す *E. coli* ML 4706 を用いて ICR-JCR マウスに対する Mecillinam の ED₅₀ を求めた。Mecillinam の ED₅₀ は 12.5 mg/kg、

Table 6 *In vivo* effect of Mecillinam on *E. coli* ML4706

Antibiotics	MIC	ED ₅₀ mg/kg (95% confidence limit)
Mecillinam	6.2	12.5 (11.3-13.7)
ABPC	3.12	50 (47.3-52.7)

Table 7 *In vivo* effect of Mecillinam on CEZ resistant *E. coli* GN5476

Antibiotics	MIC	ED ₅₀ mg/kg (95% confidence limit)
Mecillinam	<3	8.75 (6.80-10.7)
CEZ	100	100 (98.1-101.9)
ABPC	200	100 (98.1-101.9)

Fig. 13 *In vivo* effect of Mecillinam on CEZ resistant *E. coli* GN5497

ABPC のそれは50 mg/kg であった。なお、95%信頼限界値は () 内に示した (Table 6)。

次に CEZ 耐性を示す *E. coli* ML 5476 を用いて、Mecillinam の ED₅₀ を求めた。Mecillinam の ED₅₀ は8.75 mg/kg、CEZ および ABPC のそれは共に100 mg/kg であった (Table 7)。しかし Mecillinam は薬剤量を増しても生存率の上昇の割合の低い事が注目された (Fig. 13)。

要 約

- 1) Mecillinam は *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* に特に有効であった。その作用は静菌的であり MIC の測定値は、菌量の影響を大きくうけた。
- 2) Mecillinam は PCase の I 型 II 型により分解を

うけるが *Staph. aureus* の PCase, *Pseud. aeruginosa* の PCase および carbenicillinase に対しては、全く安定であった。しかしこれら菌種に対して Mecillinam は無効であった。

3) *E. coli* を用いたマウス感染治療実験では、Mecillinam の効果を認めたが、dose response が弱く、この薬剤の殺菌作用の低さを反映しているものと思われた。

文 献

- 1) LUND, F. & L. TYBRING: 6 β -Amidinopenicillanic acids - a new group of antibiotic. *Nature New Biol.* 236: 135~137, 1972
- 2) PERRET, C. J.: Iodometric assay of penicilligase. *Nature* 174: 1012~1013, 1954

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF MECILLINAM

HARUhide KAWABE, YOSHIKAZU FUKUOKA, TOSHIO HAYASHI,
YOSUKE SAWADA, KAZUKO SAITO and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi

In vitro and *in vivo* antimicrobial activities of mecillinam, a new semisynthetic penicillin were studied using various species of bacteria which were isolated from clinical specimens. The results obtained are summarized as follows.

(1) Mecillinam was found to be effective against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, but ineffective against *Pseudomonas aeruginosa*. MBC (minimum bactericidal concentration) test has disclosed that the antibacterial action of the drug is bacteriostatic.

(2) Mecillinam was hydrolyzed by both Type I penicillinase and Type II penicillinase. But mecillinam was not hydrolyzed by penicillinase produced by both *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, but was ineffective against these strains.

(3) *In vivo* effect of mecillinam was examined by mice infected with *E. coli*. Mecillinam exhibited to be more effective than ampicillin, but dose response of this drug was weaker than that of ampicillin.