

新しい β -lactam 系抗生物質 Pivmecillinam および Mecillinam に関する細菌学的研究

中沢昭三・西野武志・後藤直正・米永かつみ

横手昌子・杉原芳樹・山田作夫

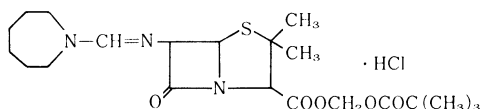
京都薬科大学微生物学教室

緒 論

Mecillinam は、1972年デンマーク Leo 社¹⁾で開発された新しい合成ペニシリンである。本物質は6位の側鎖が既存の合成ペニシリンのもつ acyl 結合ではなく、amidino 結合になっており、グラム陽性菌よりグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を有している²⁾³⁾⁴⁾。Pivmecillinam は、Mecillinam の pivaloyloxymethyl ester である。

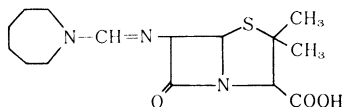
分子量は Mecillinam 325.41, Pivmecillinam 476.04

Pivmecillinam



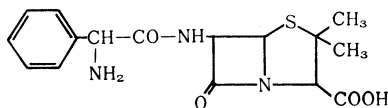
Chemical name ; Pivaloyloxymethyl 6 β -[(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-methyleneamino]-penicillanate hydrochloride

Mecillinam



Chemical name ; 6 β -[(Hexahydro-1H-azepin-1-yl)-methyleneamino]-penicillanic acid

Ampicillin



Chemical name ; Aminobenzyl-penicillin

で共に白色の微細粉末であり、水、クロロホルム、各種アルコールに易溶、エーテルに難溶である。

Pivmecillinam は、消化管からの吸収が良く、各臓器への移行性も良好で、同量では Ampicillin より優れた治療効果が得られ、毒性においては既存のペニシリンと同様の高い安全性があるといわれている。

Pivmecillinam は、経口投与されると、生体内で速やかに esterase の作用により、pivalic acid と Mecillinam の hydroxymethyl ester に加水分解され、次に、この様にして生成された Mecillinam hydroxymethyl ester は、Mecillinam と formaldehyde に自然分解し、抗菌力を示すといわれている。

従って、今回私共は、*in vitro* の抗菌力は、Mecillinam を、*in vivo* では、Pivmecillinam を用い、既知の Ampicillin⁵⁾⁶⁾⁷⁾を比較薬剤として同一条件下で検討を行ない、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1) 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群42株に対する試験管内抗菌力を、前培養に Tryptosoy ブイヨン、測定用培地に Heart infusion 寒天を用いて、日本化学療法学会感受性測定法⁸⁾により、37°C、20時間培養後の最小発育阻止濃度 MIC_i (μ g/ml) を求めた。なお、*Streptococcus* 群、*Streptococcus pneumoniae*、*Corynebacterium diphtheriae* については、10%馬血液加 Heart infusion 寒天培地を用いて、37°C、20時間後の MIC を、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis* については、GC 培地、嫌気性菌の *Clostridium tetani*、*Clostridium perfringens* には、TGC 培地を用いて、37°C、48時間培養後の MIC を求めた。

2) 臨床分離株に対する感受性分布

臨床的に分離された *Escherichia coli* 36株、*Klebsiella pneumoniae* 42株および、*Proteus* 30株に対する感受性分布を日本化学療法学会感受性測定法により求めた。

3) 抗菌力に及ぼす接種菌量の影響

Escherichia coli No. 29株を試験菌として、菌量を $1.2 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^4$ cells/ml にしたブイオンを用いて、37°C、20時間培養後の MIC で求めた。

4) 増殖曲線に及ぼす影響

a) *Staphylococcus aureus* 209-P JC 株について

Tryptosoya ブイオン37°C、18時間培養した菌液を、Heart infusion ブイオンで 10^{-4} 希釈し、これを biophotometer セルに8.1 ml ずつ分注した。そして、培養約4時間後の対数期途上、すなわち、濁度 (T%) が60% になった時に、Mecillinam を1, 5, 10, 20, 40, 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、薬剤添加後の殺菌作用の様子を濁度 (T%) と一定時間ごとの生菌数測定により検討した。

b) *Escherichia coli* NIHJ JC-2 株について

上記の場合と同様な方法で、Mecillinam の作用濃度を3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ として検討した。また、菌量により殺菌作用がどのような影響を受けるかを調べるために、Mecillinam の50 $\mu\text{g/ml}$ を biophotometer スタート直後、0.5時間、1時間、2時間、2.5時間後にそれぞれ作用させて殺菌作用の様子を検討した。そして、この薬剤添加時期の検討によって、最も殺菌効果の見られる菌量 10^5 cells/ml 前半時に Mecillinam の0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ作用させ、どのような殺菌作用が見られるかについても検討した。

c) *Escherichia coli* No. 29株について

上記、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 株の場合と同様に、biophotometer で培養1時間後に、Mecillinam を0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え殺菌作用の様子を検討した。

5) *In vitro* 耐性 mutant 出現率および耐性 mutant のマウスに対する毒性

Escherichia coli NIHJ JC-2, No. 14, No. 29, No. 33, *Proteus vulgaris* OX-19, *Klebsiella pneumoniae* の6株を用いて、Mecillinam の *in vitro* 耐性菌 mutant の出現率について検討をおこなった。すなわち、Mecillinam を50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 含んだ Heart infusion 寒天培地上に、Tryptosoya ブイオンで、37°C、18時間培養した液を Heart infusion ブイオンで希釈し、その希釈液を滴下、塗抹して、37°C、48時間培養後のコロニーを数えた。その後、耐性細胞菌のコロニーをひろい出して、培養を行い、4%ムチンと等量混合して、その菌液をマウス腹腔内に接種し、LD₅₀ を求めた。

6) Dicloxacillin との併用効果

β -lactamase に安定な Dicloxacillin (MDIPC) と

の併用効果を、*Staphylococcus aureus* No. 80, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, No. 8, No. 21, No. 33, *Klebsiella pneumoniae* No. 120の8株について、Chequer board titration 法により検討をおこなった。*Escherichia coli* NIHJ JC-2, No. 8, については、MDIPC と Mecillinam の配合率を変え、biophotometer による濁度の変化および生菌数測定でも検討した。

7) 好中球 PMN による Mecillinam 前処理 *Escherichia coli* の食菌現象

Escherichia coli NIH 株を用いて、Tryptosoya ブイオンで、37°C、18時間培養した液を Heart infusion ブイオンで 10^{-2} 希釈し、37°C、2時間振盪培養した後、Mecillinam を1 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、さらに37°C、4時間振盪培養する。その後、菌体を遠心 (5,000 r.p.m. 15 min.) により集め Eagle 組織培養液で、2回洗浄した後、Lab-Tek chamber を用いて、ヒトおよびモルモット PMN と CO₂ incubator 中で培養した。培養30分、60分後に、Giemsa 染色を行ない検鏡、PMN 中の細菌数を数えた。対照としては正常細菌すなわち Mecillinam 未処理 *Escherichia coli* を用いた。

8) 正常人血清の Mecillinam 前処理 *Escherichia coli* に対する抗菌作用

Escherichia coli NIH および No. 29を用い、Mecillinam 前処理 *Escherichia coli* は7)と同様な方法で調整し、検討をおこなった。すなわち新鮮および非働化人血清の2.7 ml と0.3 ml の菌液を混合して、37°Cで振盪培養し経時的に生菌数測定をおこなった。

9) マウス実験的感染症に対する治療効果

a) *Escherichia coli* 感染症に対する治療効果

臨床分離の *Escherichia coli* No. 29を普通ブイオンに37°C、14時間培養後、普通ブイオンで希釈し、4%ムチンと等量混合した。上記の菌液の500 LD₅₀ を1群10匹の ddY-S 雄マウス (17~18 g) の腹腔内に接種して2時間後、1回 Mecillinam は皮下に、Pivmecillinam および Ampicillin (ABPC) は経口治療した。

b) Ampicillin 耐性 *Escherichia coli* に対する治療効果

臨床分離の ABPC 耐性 *Escherichia coli* No. 18および No. 33の2株を用いて検討をおこなった。すなわち a)と同様な方法で菌液を調整し、No. 18は10 LD₅₀ を、No. 33は100 LD₅₀ を1群10匹の ddY-S 雄マウス (17~18 g) の腹腔内に接種し、2時間後1回、Pivmecillinam および ABPC を経口投与した。

c) *Escherichia coli* 感染症における接種菌量による ED₅₀ の変化

Table 1 Antibacterial spectrum
 —Gram-positive bacteria— MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	Mecillinam		ABPC	
	10^8cells/ml	10^6cells/ml	10^8cells/ml	10^6cells/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	6.25	3.12	0.1	0.01
" Smith	25	12.5	0.1	0.05
" Terajima	25	25	0.2	0.2
" Neumann	50	25	0.2	0.1
" E-46	25	12.5	0.1	0.1
" No. 80(PC-R)	>100	>100	>100	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	12.5	0.2	0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	1.56	1.56	0.025	0.025
" Cook	6.25	3.12	0.025	0.025
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	3.12	0.78
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	>100	3.12	0.78
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	6.25	6.25	0.05	0.025
" type II	12.5	6.25	0.05	0.05
" type III	12.5	6.25	0.05	0.05
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3.12	3.12	0.2	0.2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC-9341	6.25	3.12	0.003	<0.001
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	6.25	6.25	0.05	0.01
<i>Bacillus anthracis</i>	12.5	12.5	0.025	0.025
<i>Clostridium tetani</i>	100	50	0.39	0.2
<i>Clostridium perfringens</i>	>100	>100	0.39	0.39

Escherichia coli No. 29を用いて a) と同じ方法で、5 LD₅₀, 200 LD₅₀, 20,000 LD₅₀ のそれぞれを腹腔内に接種し2時間後1回、Pivmecillinam, ABPC を経口投与し、その ED₅₀ 値を求めた。

d) *Escherichia coli* 感染症に対する投与時期によるマウス生存率の影響

Escherichia coli No. 29を用いて、Pivmecillinam の場合には、0.03 mg/mouse, 0.0156 mg/mouse, ABPC の場合には、2 mg/mouse, 1 mg/mouse のそれぞれを菌攻撃2時間前、菌攻撃直後、2時間、4時間、6時間、8時間後に経口投与して、マウスの生存率を求めた。

実験結果および考察

1) 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性および陰性菌に対する試験管内抗菌力について検討した結果は、Table 1, 2に示されるごとくである。

すなわち Mecillinam はグラム陽性菌に対する感受性は弱い、グラム陰性菌に関しては優れた感受性を示す。その抗菌力を比較すると、 10^8 cells/ml 1白金耳を接種した場合、グラム陽性菌群である *Staphylococcus*

aureus の標準株では Mecillinam $6.25\text{ }\mu\text{g/ml}$, ABPC $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ であり、その他の *Staphylococcus aureus* 5株には、Mecillinam $25\sim 50\text{ }\mu\text{g/ml}$, ABPC $0.1\sim 0.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ に感受性を示したが、臨床分離の penicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* No. 80株に対して両者とも $>100\text{ }\mu\text{g/ml}$ と感受性を示さなかった。*Streptococcus* 群中の *Streptococcus faecalis* および *viridans* に対し ABPC は、 $3.12\text{ }\mu\text{g/ml}$ の感受性を示したが、Mecillinam は $>100\text{ }\mu\text{g/ml}$ を示し感受性を示さなかった。*Streptococcus pneumoniae* に対しては、Mecillinam $6.25\sim 12.5\text{ }\mu\text{g/ml}$, ABPC $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ の感受性を示した。また、*Clostridium perfringens* に対して ABPC は $0.39\text{ }\mu\text{g/ml}$ と強い感受性を示すが、Mecillinam は $>100\text{ }\mu\text{g/ml}$ と感受性を示さない。グラム陰性菌では *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* に対して Mecillinam $0.78\sim 1.56\text{ }\mu\text{g/ml}$, ABPC $0.05\sim 0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し、グラム陽性菌の場合と同様に ABPC の方が Mecillinam よりも優れていることが判る。しかしながら、他のグラム陰性菌群に対しては Mecillinam は ABPC よりも強い感受性を示し、これは *Escherichia coli* において最も顕著であった。すなわち、*Escherichia coli* の

Table 2 Antibacterial spectrum
—Gram-negative bacteria—

Organism	Mecillinam		ABPC	
	10 ⁸ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	10 ⁸ cells/ml	10 ⁶ cells/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.78	0.78	0.05	0.05
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.56	1.56	0.1	0.1
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.78	0.39	6.25	6.25
" NIHJ	0.05	0.01	3.12	3.12
" NIH	0.1	0.1	3.12	1.56
" KP	0.1	0.1	3.12	1.56
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.78	0.2	25	3.12
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.1	0.025	0.2	0.2
" O-901	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.1	0.1	0.2	0.2
" B	0.1	0.1	0.78	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i>	6.25	0.2	1.56	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.2	0.1	0.78	0.39
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	12.5	6.25	3.12	1.56
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.2	0.2	1.56	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.2	0.1	6.25	6.25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.1	0.1	1.56	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	100	0.05	50	0.39
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	100	12.5	0.78	0.39
<i>Proteus morganii</i> Kono	>100	25	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100	>100
" NC-5	>100	>100	>100	>100

場合, Mecillinam は0.05~0.78 $\mu\text{g/ml}$, ABPC は3.12~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に感受性を示した。また, *Salmonella* や *Shigella* に対しても Mecillinam の方が良い感受性を示した。しかし, *Proteus* や *Pseudomonas* に対しては感受性が弱く, その MIC 値は ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ であった。

以上の結果, グラム陽性菌群, グラム陰性球菌群に対しては, ABPC の方が感受性が良く, それに反してグラム陰性桿菌群に対しては Mecillinam の方が優れた感受性を有することが判った。また, 既存の β -lactam系抗生物質とは異なり, Mecillinam はグラム陽性菌よりもグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を有しており, 化学構造と抗菌力の関係, そして生化学的な作用機作の点からも興味をもたれる。生化学的な作用機作については, PARK⁹⁾, MATSUHASHI¹⁰⁾らが, Mecillinam はペニシリン系物質の阻害する transpeptidase 反応, carboxypeptidase 反応, endopeptidase 反応を殆んど阻害しないと報告しており, さらに SPRATT¹¹⁾らは, Mecillinam と binding protein に関する研究で興味ある結果を発表している。

2) 臨床分離株に対する感受性分布および感受性相関

臨床的に分離された *Escherichia coli* 36株, *Klebsiella pneumoniae* 42株, *Proteus* 30株に対する感受性分布を検討した成績は Fig. 1~6 に示すとおりである。*Escherichia coli* の場合, Fig. 1 は10⁸ cells/ml を1白金耳接種して MIC を求めたものであり, Mecillinam は約60%が 0.04~1.56 $\mu\text{g/ml}$ の間に分布しピークは0.78 $\mu\text{g/ml}$ であり, >100 $\mu\text{g/ml}$ の高度耐性株および中等度耐性株も30%近くみられる。ABPC では1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に大部分が分布しピークは3.12 $\mu\text{g/ml}$ であり, 約20%が ABPC に対して耐性であった。

そして Fig. 2 に示す如く接種菌量を10⁶ cells/ml にさげると Mecillinam の感受性は2管程良くなり, ピークは0.19 $\mu\text{g/ml}$ 付近に存在した。ここで注目すべきことは10⁸ cells/ml 接種時に見られた Mecillinam 耐性菌が10⁶ cells/ml では感性化されていることである。一方, ABPC では菌量を下げてもあまり変化が認められない。

Klebsiella pneumoniae の場合, 10⁸ cells/ml を接種すると Fig. 3 に示す如く90%以上が Mecillinam に対

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* (36 strains)

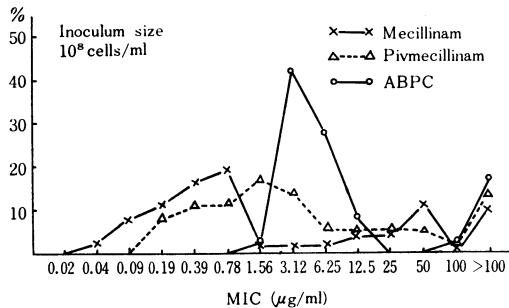


Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates *Escherichia coli* (36 strains)

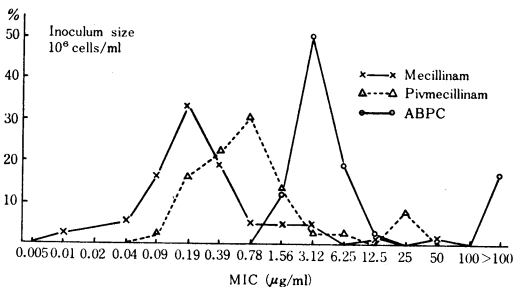
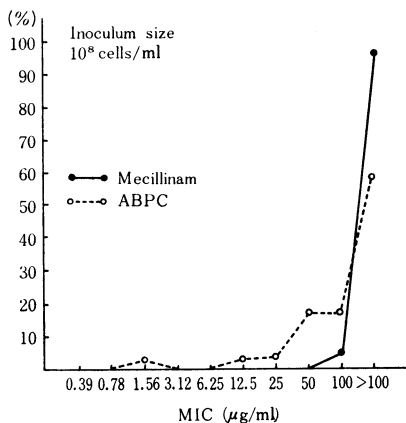


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* (42 strains)



して $>100 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性を示し、ABPC は $>100 \mu\text{g/ml}$ のところ約60%, 25~100 $\mu\text{g/ml}$ に30%以上が分布した。

接種菌量を 10^6 cells/ml に下げると Fig. 4 に示す如く、Mecillinam の感受性は非常に高くなり0.39~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に約50%が分布していた。しかし、 $>100 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性を示す株も約40%存在し、*Escherichia*

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* (42 strains)

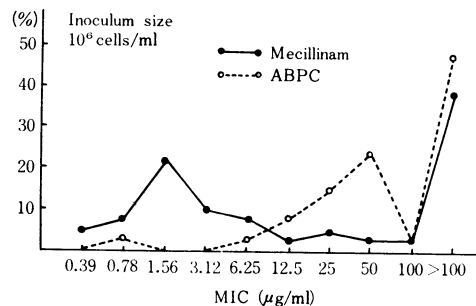


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus* group (30 strains)

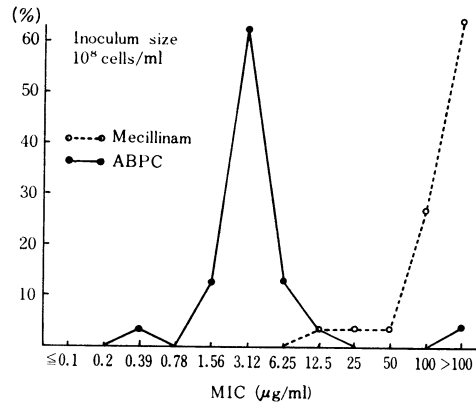
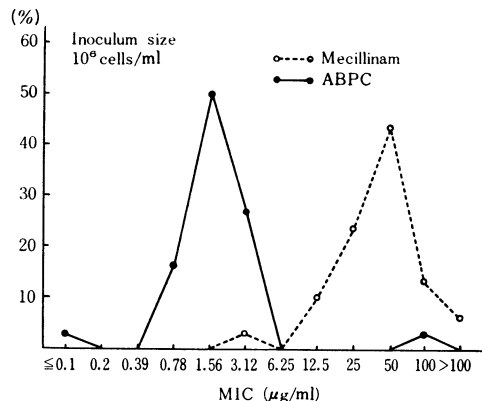


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates *Proteus* group (30 strains)



coli の場合とは異なっていた。ABPC においては *Escherichia coli* の場合と同様に菌量を下げても殆んど変化がみられなかった。

Proteus の場合 Fig. 5に示す如く Mecillinam は $>100 \mu\text{g/ml}$, 50~100 $\mu\text{g/ml}$ に約90%の菌株が分布した。

Table 3 Cross sensitivity
Escherichia coli (36 strains)

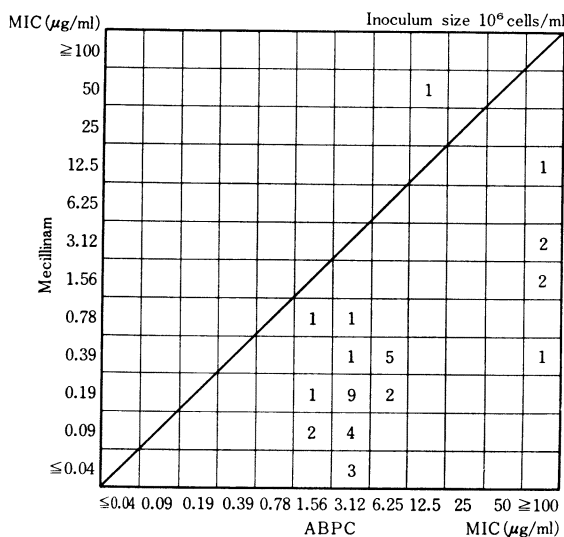
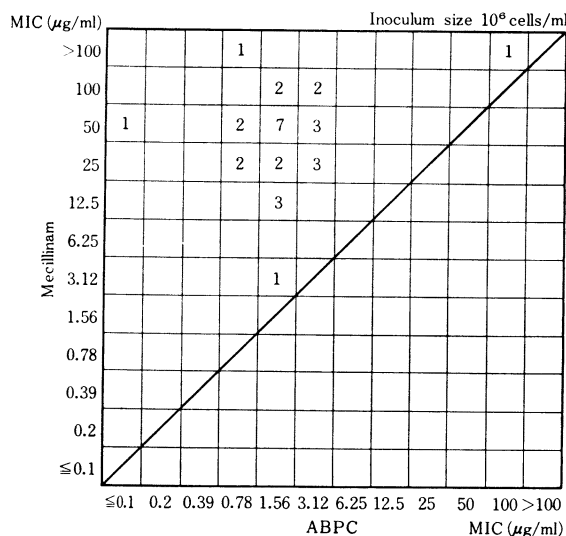


Table 5 Cross sensitivity
Proteus group (30 strains)



ABPC は1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に大部分が分布しピークは3.12 $\mu\text{g/ml}$ に存在する。

接種菌量を 10^6 cells/ml にさげると Fig. 6 に示す如く Mecillinam に対する $>100 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性株が10%程度に低下し、その分布も $12.5 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であり、 $50 \mu\text{g/ml}$ にピークが存在した。ABPC では1管程度感受性が良くなっている。

これらの場合の感受性相関は Table 3～5 に示され

Table 4 Cross sensitivity
Klebsiella pneumoniae (42 strains)

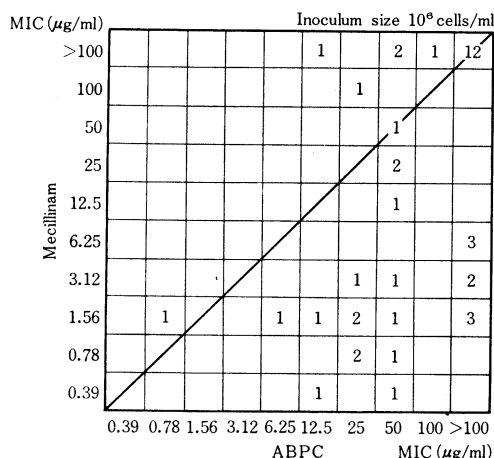


Table 6 Influence of inoculum size on MIC
E. coli No. 29

Antibiotics cells/ml	Mecillinam	ABPC
1.2×10^8	400	100
1.2×10^7	12.5	6.25
1.2×10^6	0.19	6.25
1.2×10^5	0.19	6.25
1.2×10^4	0.09	3.12

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

MIC($\mu\text{g/ml}$)

るとおりである。*Escherichia coli* の場合 Table 3 に示す如く Mecillinam の方が ABPC よりも感受性が良く、しかも ABPC に対して $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ の耐性株に対して Mecillinam は $0.39\sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ の感受性を示し相関関係は認められなかった。

Klebsiella pneumoniae の場合 Table 4 に示す如く Mecillinam, ABPC の両剤に対して $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性値を示す菌株が 12 株認められたが, ABPC 耐性株の中で Mecillinam に $1.56 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ の感受性を示す菌株も 8 株存在した。

Proteus 場合には *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* などの場合と異なり Table 5に示される如く ABPC の方が Mecillinam よりも優れた感受性を示し両剤間に相関関係は認められなかった。

以上臨床分離株に対する感受性分布，感受性相関を検討した結果，Mecillinam の抗菌力は接種菌量により著しく影響を受けることが判った。この原因の1つとして細菌の持っている β -lactamase に対する Mecillinam

の安定性が考えられる。

3) 抗菌力に及ぼす接種菌量の影響

Escherichia coli No. 29株を用い接種菌量の MIC におよぼす影響について検討をおこなった。

その成績は Table 6 に示す如く、Mecillinam の抗菌力は 1.2×10^6 迄、殆んど影響を受けないが 1.2×10^7 , 1.2×10^8 では著しく影響を受け抗菌力が低下しているのが判る。また、ABPC は Mecillinam より菌量の影響を受けにくく、 1.2×10^7 まで、その抗菌力に殆んど変動がみられなかった。

4) 増殖曲線に及ぼす影響

a) *Staphylococcus aureus* 209-P JC の場合

培養約 4 時間後の対数期途上に Mecillinam を作用させ濁度の変化を観察したのが Fig. 7 であり、その時の生菌数の変化は Fig. 8 に示されるとおりである。

すなわち、5, 10, 20, 40, 100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では dose response のある殺菌および溶菌作用が見られ、20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度においては作用 24 時間後で完全に殺菌されており regrowth は認められなかった。

1948年 EAGLE¹²⁾らは Penicillin G を *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus* に作用させた場合、低い濃度

よりも濃度が高くなるに従って殺菌効果がむしろ減弱していくことを報告している。そして、私共¹³⁾も Cephalothin, Cephalexin, Cefazolin, Sulbenicillin, Carbenicillin などの β -lactam 系抗生物質を *Staphylococcus aureus* に作用させた場合に EAGLE らと同様な反転現象を認め、その時の形態変化について、既に報告している。Mecillinam は既存の β -lactam 系抗生物質とは異なり、きわめてユニークな作用を有することが判っており、Mecillinam でもこのような反転現象が見られるかどうか検討をおこなった。その成績は Fig. 9, 10 に示す如く 200 $\mu\text{g/ml}$ と 400 $\mu\text{g/ml}$ の間で反転が起きているのが判る。

他の β -lactam 系抗生物質と比較するために、その反転濃度をまとめたのが Table 7 であり、Mecillinam は他の薬剤よりその反転濃度が非常に高く、MIC の 64~128 倍の間に逆転が見られる。このような事から考えても Mecillinam は他の penicillin や cephalosporin とは違った作用を有するようになると思われる。

b) *Escherichia coli* NIHJ JC-2 の場合

MIC (0.78 $\mu\text{g/ml}$) 濃度を中心に *Escherichia coli*

Fig. 7 Effect of Mecillinam on growth curve of *Staph. aureus* 209-P JC

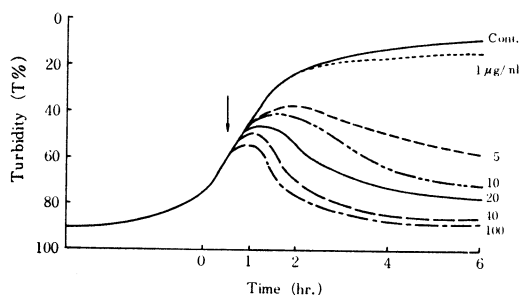


Fig. 8 Effect of Mecillinam on growth curve of *Staph. aureus* 209-P JC

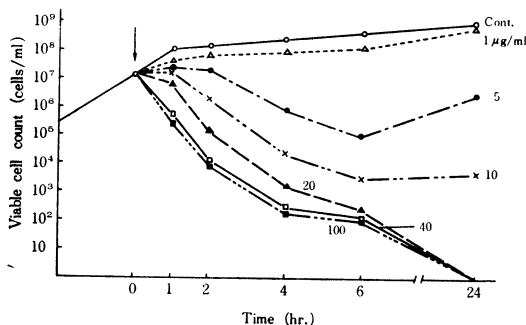


Fig. 9 Effect of Mecillinam on growth curve of *Staph. aureus* 209-P JC

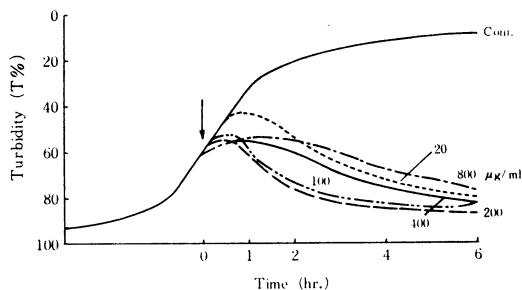


Fig. 10 Effect of Mecillinam on growth curve of *Staph. aureus* 209-P JC

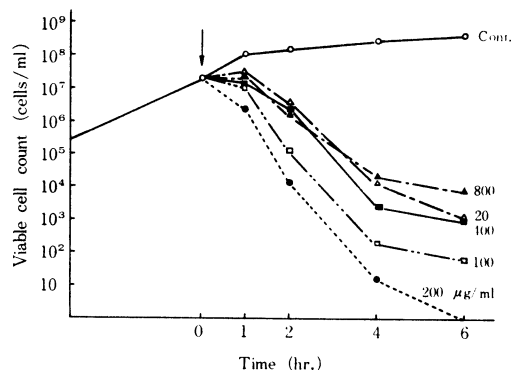


Table 7 Concentrations of selected β -lactam group antibiotics at which the inhibition of *Staph. aureus* 209-P was reversed

Antibiotics	Concentrations at which inhibition was reversed
CET	0.5~ 1(2~ 5×MIC)
CEX	20 ~ 40(7~ 13×MIC)
CEZ	0.5~ 1(2~ 5×MIC)
SBPC	10 ~ 20(2~ 3×MIC)
CBPC	5 ~ 10(2~ 3×MIC)
Mecillinam	200 ~400(64~128×MIC)

$\mu\text{g/ml}$

Fig. 11 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

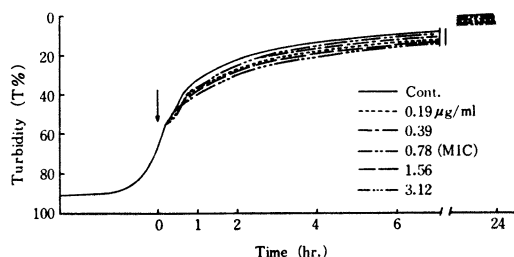


Fig. 12 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

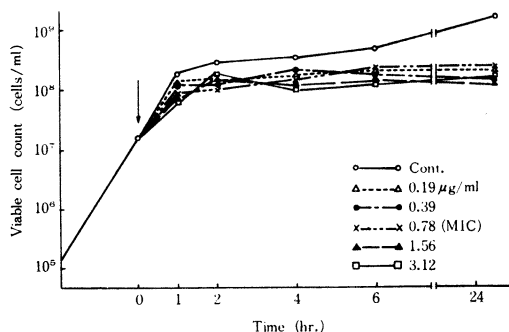


Fig. 13 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

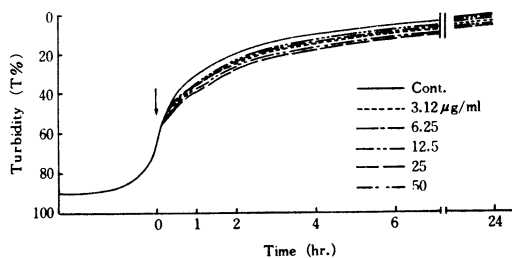


Fig. 14 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

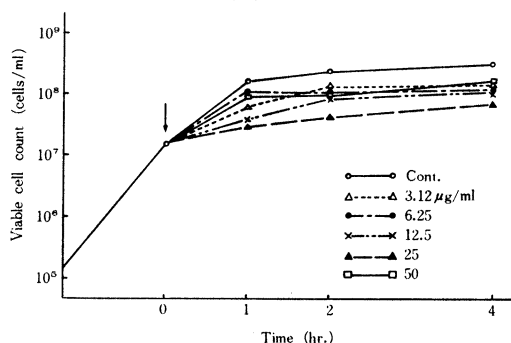
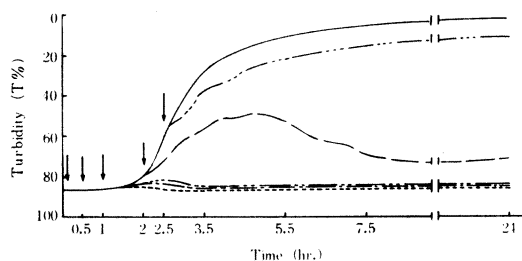


Fig. 15 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2
— 50 $\mu\text{g/ml}$ —



NIHJ JC-2 の増殖曲線におよぼす影響について検討をおこなったところ Fig. 11, 12 に示す如く 3.12 $\mu\text{g/ml}$ 作用でも殺菌および溶菌作用が見られなかった。

そこで、さらに Mecillinam の濃度をさらに上げて検討をおこなった成績が Fig. 13, 14 で 50 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度を作用させても全く殺菌作用が認められなかった。

3) の実験により Mecillinam の抗菌力が接種菌量により著しく影響を受けることが判っていたので次に薬剤の添加時期について検討をおこなった。

その結果は Fig. 15, 16 に示す如く Mecillinam の 50 $\mu\text{g/ml}$ を培養直後、30分、1時間、2時間、2時間30分後に作用させたところ、培養1時間後すなわち菌量が 10^5 cells/ml の時は著明な殺菌作用が見られた。しかし菌量が多くなるとその殺菌作用は弱くなり、 10^7 cells/ml の時に作用させた場合には、ほぼ静菌的な作用しか見られなかった。

この著明な殺菌作用が見られた時期に Mecillinam の MIC 濃度を中心にして作用させ検討をおこなった。その結果は Fig. 17, 18 に示す如く 0.39~6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用で、薬剤濃度に応じて殺菌作用が認められた。しかし、24時間~48時間後になると、すべての濃度に於いて

Fig. 16 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

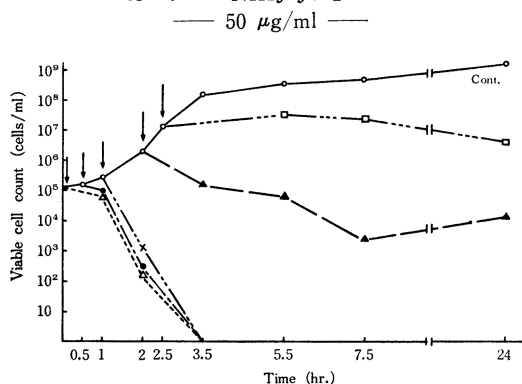


Fig. 17 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

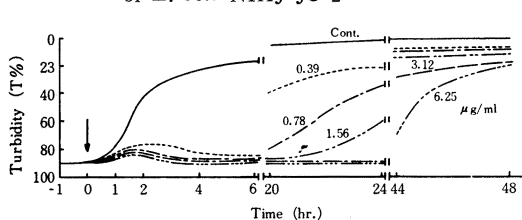


Fig. 18 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

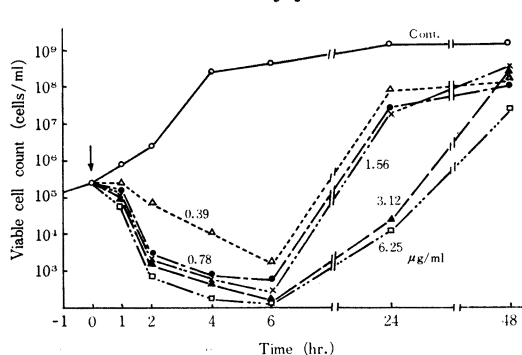
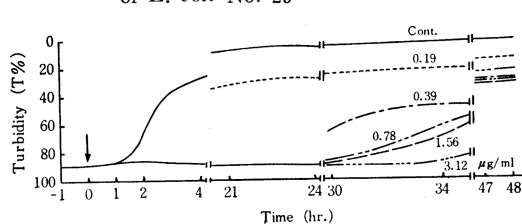


Fig. 19 Effect of Mecillinam on growth curve of *E. coli* No. 29



regrowth が見られた。これは恐らく one step mutation による耐性細胞によるものと思われる。

c) *Escherichia coli* No. 29の場合

Escherichia coli NIHJ JC-2 と同様な regrowth が見られるかどうか検討をおこなった。その結果は, Fig. 19に示す如く 0.39~3.12 µg/ml 作用で 24~48 時間後に再増殖を認めた。

この菌の Mecillinam に対する MIC 測定をおこなったところ, 親株では 0.39 µg/ml であるが, 再増殖した菌は 50 µg/ml の耐性値を示した。

5) *In vitro* 耐性 mutant 出現率および耐性 mutant のマウスに対する毒性

Mecillinam に対する耐性細胞の出現頻度について *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* を用いて検討をおこなった。その結果は Table 8, 9 に示す如く *Escherichia coli* でも菌株によってかなり差が見られた。また *Proteus vulgaris* では約 10^3 個に 1 個の割合で耐性細胞が存在するが, *Klebsiella pneumoniae* では全く認められなかった。

このような耐性細胞のマウスに対する病原性について検討をおこなったのが Table 10で *Escherichia coli* No. 33の場合親株に対する MIC は 1.56 µg/ml であり, その時の LD₅₀ は 8.0 cells/mouse である。ところ

Table 8 Frequency of resistant mutants to Mecillinam

Strain	Frequency
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.3×10^{-5}
<i>E. coli</i> No. 14	1.6×10^{-5}
<i>E. coli</i> No. 29	5.7×10^{-8}
<i>E. coli</i> No. 33	1.0×10^{-4}
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	4.0×10^{-3}
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$< 2.7 \times 10^{-8}$

Selective concentration (50 µg/ml)

Table 9 Frequency of resistant mutants to Mecillinam

Strain	Frequency
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.7×10^{-6}
<i>E. coli</i> No. 14	$< 9.4 \times 10^{-8}$
<i>E. coli</i> No. 29	5.7×10^{-8}
<i>E. coli</i> No. 33	1.5×10^{-4}
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	6.8×10^{-3}
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$< 2.7 \times 10^{-8}$

Selective concentration (100 µg/ml)

Table 10 Virulence of mutant isolated from *E. coli*

Strain		MIC* ($\mu\text{g/ml}$)	LD ₅₀ (cells/mouse)
<i>E. coli</i> No. 29	Origin	0.19	5.3×10^3
	Mutant	50	4.2×10^4
<i>E. coli</i> No. 33	Origin	1.56	8.0
	Mutant	>200	8.3×10^3

* MIC of Mecillinam

Table 11 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *Staphylococcus aureus* No. 80

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDI PC alone
		800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.09	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.04	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.02	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.01	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 12 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *E. coli* NIHJ JC-2

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDI PC alone
		3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

で、MIC が $>200 \mu\text{g/ml}$ の耐性細胞はその LD₅₀ が 8.0×10^3 cells/mouse であり、親株に比べて病原性が著しく低下している事が判った。

Escherichia coli No. 29 の場合も同様で耐性細胞の方が親株より病原性が弱くなっていることが判った。

6) Dicloxacillin との併用効果

Penicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* No. 80 を用いて Mecillinam と Dicloxacillin (MDIPC) の併用効果について検討をおこなったのが Table 11 であり、あまり著明な協力作用は認められなかった。

Escherichia coli NIHJ JC-2 の場合、Table 12 に示す如く chequer board titration 法では明瞭な併用効果が見られなかった。しかし、増殖曲線におよぼす影響を観察したところ Fig. 20, 21 に示す如く両剤の併用により著しい協力作用を示すことが判った。

なお、この時の形態変化を染色標本により顕微鏡観察をおこなったが、Mecillinam 作用では典型的な spherical form を形成し、MDIPC では filamentous cell が見られた。そして両剤を併用した場合には spindle form を形成しているのが観察できた。従ってこの形態学的観察より Mecillinam と MDIPC 間に相乗作用

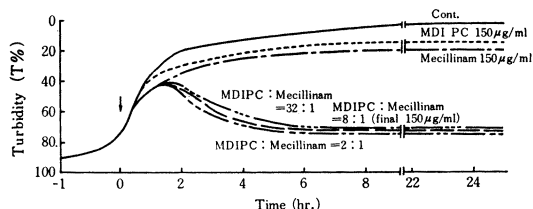
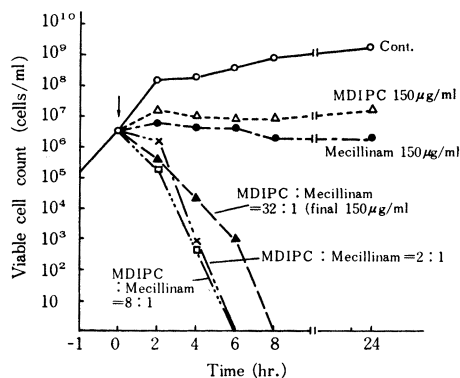
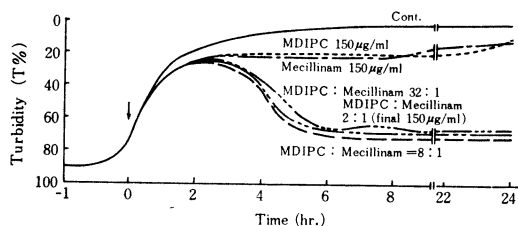
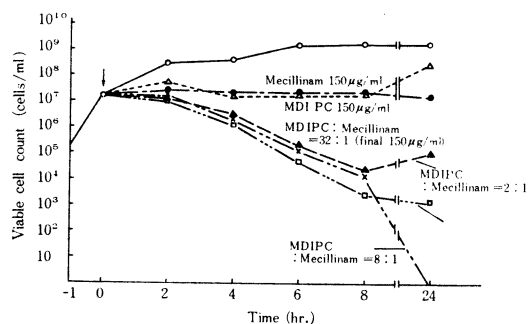
Fig. 20 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on the growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2Fig. 21 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on the growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

Table 13 Combination effect of ABPC and MDIPC on *E. coli* No. 8

		ABPC ($\mu\text{g/ml}$)									MDIPC alone
		800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ABPC alone		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fig. 22 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on the growth curve of *E. coli* No. 8Table 14 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *E. coli* No. 8

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDIPC alone
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fig. 23 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on the growth curve of *E. coli* No. 8Table 15 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *E. coli* No. 18

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDIPC alone
		100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 16 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *E. coli* No. 21

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDIPC alone
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	400	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	200	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

が見られるのは、MDIPC の β -lactamase に対する inhibitor としての作用だけでなく、両剤の作用機作レベルでの協力作用により発現するものと思われる。

臨床分離 Mecillinam および ABPC 耐性 *Escherichia coli* No. 8 を用いて ABPC と MDIPC, Mecillinam と MDIPC の併用効果について検討をおこなった。その結果は Table 13, 14 に示す如く著しい協力作用が認められた。

この菌株を使用し Mecillinam と MDIPC とを併用した場合の増殖曲線におよぼす影響について検討をおこなった。その成績は Fig. 22, 23 に示す如く MDIPC と Mecillinam とを 8 対 1 の割合 (最終濃度 150 μ g/ml) で作用させた時に最も著明な協力作用が得られた。

Table 17 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *E. coli* No. 33

		Mecillinam (μ g/ml)									MDIPC alone
		100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	
MDIPC (μ g/ml)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Table 18 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *Klebsiella pneumoniae*

		Mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)									MDIPC alone
		1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	
MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Table 19 Combination effect of Mecillinam and MDIPC on *Klebsiella pneumoniae* No. 120

		Mecillinam (μ g/ml)									MDIPC alone
		25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	
MDIPC (μ g/ml)	800	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	400	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	200	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3.12	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mecillinam alone		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

さらに *Escherichia coli* No. 18, No. 21, No. 33, *Klebsiella pneumoniae*, No. 120 についても checker board titration 法により検討した。それらの結果は Table 15~19 に示す如く *Klebsiella pneumoniae* を除き (Table 18), いずれも著明な協力作用が認められた。

以上, *in vitro* では Mecillinam と MDIPC を併用した場合に著しい協力作用が得られた。今後さらに *in vivo* による詳細な検討が必要であろう。

Fig. 24 Phagocytosis of *E. coli* NIH treated with Mecillinam by guinea pig PMN

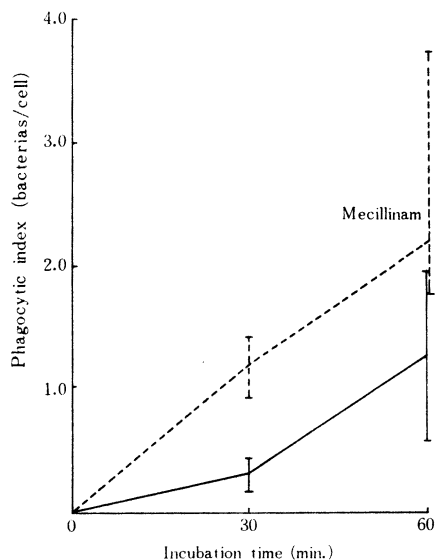
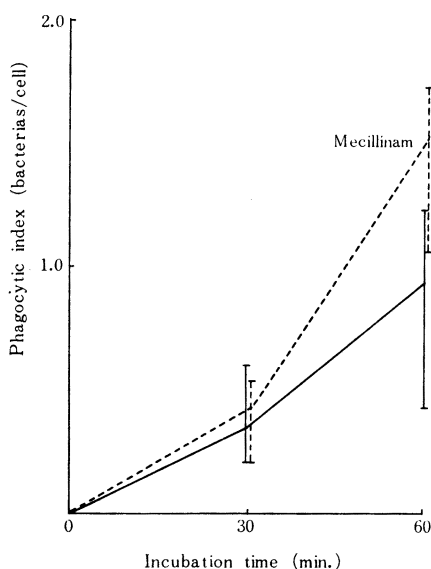


Fig. 25 Phagocytosis of *E. coli* NIH treated with Mecillinam by human PMN



7) 好中球 PMN による Mecillinam 前処理 *Escherichia coli* の食菌現象

Mecillinam の作用を受けて典型的な spherical form になった *Escherichia coli* NIH がヒトおよびモルモット PMN によりどのように食菌されるかについて検討をおこなった。

Fig. 24, 25 はいずれも 5 回実験を行なった平均値を示しており、Mecillinam の作用を受けて spherical form になった細胞の方が正常菌よりヒトおよびモルモット PMN にやや取り込まれやすい傾向が認められた。

また、chemotaxis についても検討をおこなったが、殆んど影響は認められなかった。

8) 正常人血清の Mecillinam 前処理 *Escherichia coli* に対する抗菌作用

Mecillinam の作用を受けて spherical form になった細胞が人血清により、どのように殺菌されるか検討をおこなった。その結果は Fig. 26, 27 に示す如く 56°C, 30 分加温処理した非働化血清 (Heat-inactivated serum) を作用させた場合正常菌と同様に増殖した。

fresh serum を作用させた場合、作用 1 時間 30 分後迄 Mecillinam の作用を受けた細胞の方が正常菌より殺菌されにくい傾向が見られた。しかし、*Escherichia coli* No. 29 に関しては、その後 Mecillinam の作用を受けた細胞の方が正常菌より殺菌されやすいことが判った。

9) マウス実験的感染症に対する治療効果

a) *Escherichia coli* 感染症に対する治療効果

Fig. 26 Effect of 25% human serum on *E. coli* NIH treated with Mecillinam

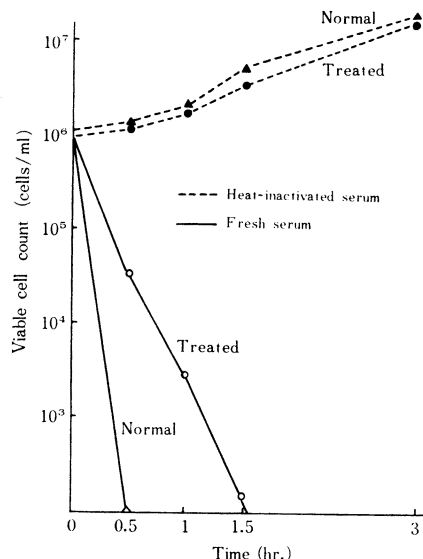
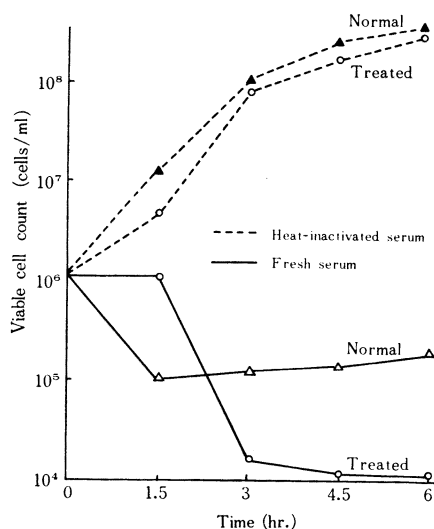


Fig. 27 Effect of 90% human serum on *E. coli* No. 29 treated with Mecillinam



Escherichia coli No. 29 感染症に対する治療効果は Fig. 28~30 に示すとおりである。Pivmecillinam および Mecillinam は ABPC に比べて優れた治療効果を示し、それらの ED₅₀ 値は Pivmecillinam の場合 0.0035 mg/mouse, Mecillinam は 0.0015 mg/mouse で、ABPC では 0.625 mg/mouse であった。

Pivmecillinam と ABPC に関しては 4 回実験をおこなっており、それらの ED₅₀ をまとめたのが Table 20

である。すなわち Pivmecillinam の ED_{50} は、0.0096 mg/mouse であり、ABPC は 0.795 mg/mouse で Pivmecillinam の方が優れた治療効果（約90倍）を有していることが判った。

その他の化学療法剤と比較する目的で動物実験を行ない、それらの ED_{50} をまとめたのが Table 21 であり、この実験下では Pivmecillinam や Mecillinam は他の

Fig. 28 Protecting effect of ABPC against experimental mice infections with *E. coli* No. 29

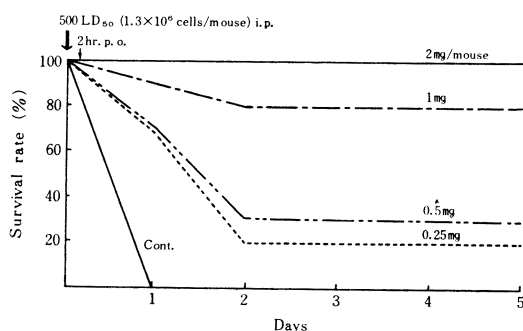


Fig. 29 Protecting effect of Pivmecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 29

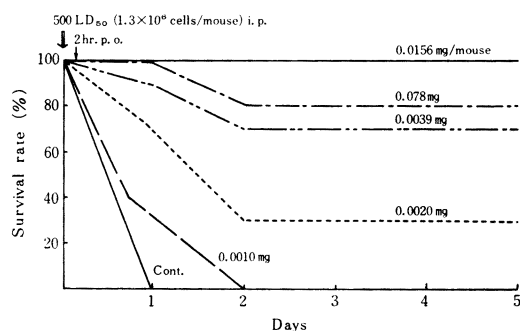


Fig. 30 Protecting effect of Mecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 29

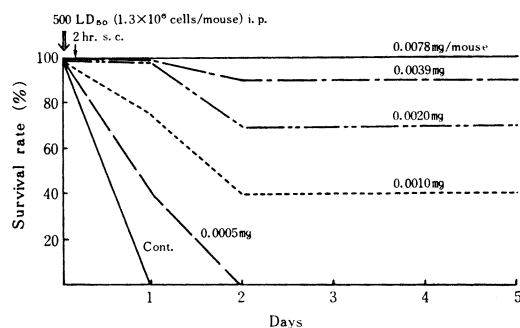


Table 20 Protecting effect of Pivmecillinam and ABPC against experimental mice infections with *E. coli* No. 29

Antibiotics		Pivmecillinam	ABPC
MIC* (μ g/ml)	10^8 cells/ml	0.78(0.39)**	3.12
	10^6 cells/ml	0.39(0.09)**	3.12
ED_{50} (mg/mouse)	1	0.0035	0.625
	2	0.012	0.85
	3	0.009	0.88
	4	0.014	0.825
	Average	0.0096	0.795

* Heart infusion agar

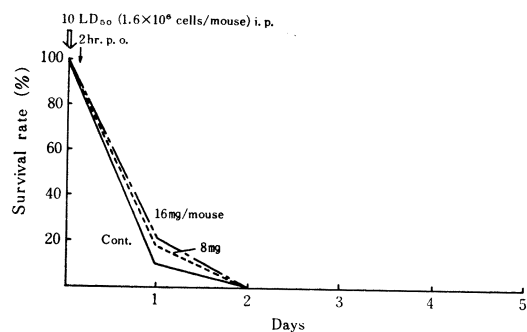
** MIC of Mecillinam

Table 21 Protecting effect of Antibiotics against experimental mice infections with *E. coli* No. 29

Antibiotics	MIC* (μ g/ml)	ED_{50} (mg/mouse)
ABPC	3.12	0.38
AMPC	3.12	0.1
CET	3.12	0.81
CEX	6.25	0.45
FOM	25	6.7
CP	3.12	1.52
KM	6.25	0.13
DB-2563	3.12	1.1
SMX	25	5.9
ABPC	3.12	0.795
Pivmecillinam	0.78	0.0096
Mecillinam	0.39	0.0015

* 10^8 cells/ml

Fig. 31 Protecting effect of ABPC against experimental mice infections with *E. coli* No. 18 (ABPC-R)



化学療法剤に比べて非常に優れた効果を有していることが判る。

b) ABPC 耐性 *Escherichia coli* に対する治療効果

ABPC 耐性 *Escherichia coli* No. 18 および No. 33 の 2 株を用いて検討をおこなった。*Escherichia coli* No. 18 の場合 Fig. 31, 32 に示す如く ABPC 投与群では 16

Fig. 32 Protecting effect of Pivmecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 18 (ABPC-R)

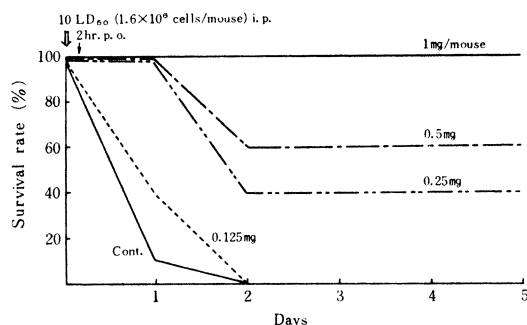


Fig. 33 Protecting effect of ABPC and AMPC against experimental mice infections with *E. coli* No. 33 (ABPC-R)

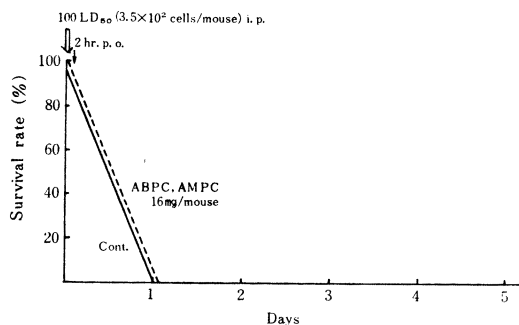


Fig. 34 Protecting effect of Pivmecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 33 (ABPC-R)

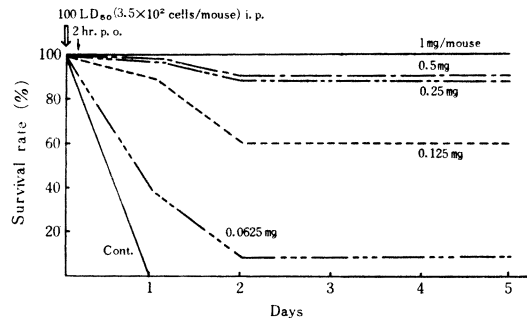


Table 22 Protecting effect of ABPC and Pivmecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 18

Antibiotics	MIC* ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁸ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	
ABPC	>100	>100	>16
Pivmecillinam	>100	25	0.36

* Heart infusion agar

Table 23 Protecting effect of ABPC, AMPC and Pivmecillinam against experimental mice infections with *E. coli* No. 33

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁸ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	
ABPC	>100	>100	>16
AMPC	>100	>100	>16
Pivmecillinam	25*	1.56*	0.14

* MIC of Mecillinam

Table 24 Influence of challenge dose on ED₅₀ *E. coli* No. 29

Antibiotics cells/mouse	Pivmecillinam	ABPC
1.5 × 10 ⁸	>16	5.4
1.5 × 10 ⁶	0.014	0.83
3 × 10 ⁴	0.0043	0.31

mg/mouse

mg/mouse でも 2 日以内にすべて死亡した。しかし、Pivmecillinam 投与群では 1 mg/mouse で 100%, 0.5 mg/mouse で 60%, 0.25 mg/mouse で 40% の治療効果がえられた。

これらの ED₅₀ をまとめたのが Table 22 であり、Pivmecillinam の ED₅₀ は 0.36 mg/mouse, ABPC では >16 mg/mouse であった。

Escherichia coli No. 33 の場合も同様で Fig. 33, 34 に示す如く ABPC, Amoxicillin (AMPC) 投与群では 16 mg/mouse でも 1 日ですべて死亡した。しかし Pivmecillinam 投与群では 1 mg/mouse で 100%, 0.5 mg/mouse, 0.25 mg/mouse で 90%, 0.125 mg/mouse で 60% の治療効果がえられた。

Table 23 はこれらの結果をまとめたものであり、ABPC, AMPC の ED₅₀ は >16 mg/mouse で、Pivme-

cillinam は、0.14 mg/mouse であった。

このように *in vitro* 同様、*in vivo* に於いても Pivmecillinam は ABPC の耐性菌に有効であることが判った。

c) *Escherichia coli* 感染症における接種菌量による ED₅₀ の変化

Mecillinam の抗菌力は *in vitro* で接種菌量により著しく影響を受けたので、*in vivo* で同様な傾向が見られるかどうか検討をおこなった。

その結果は Table 24 に示す如く Pivmecillinam, ABPC 共に 1.5×10^6 と 1.5×10^8 cell/mouse 接種との間で ED₅₀ に大きな変動が見られるが Pivmecillinam の方が極めて大きな影響を受けることが判った。

以上 *in vivo* に於いても *in vitro* 同様、ABPC より菌量の影響を受けやすいことが判った。

d) *Escherichia coli* 感染症に対する投与時期によるマウス生存率の影響

薬剤の投与時期によりどのような治療効果が得られるか検討をおこなった。その結果は Fig. 35, 36 に示す如

く Pivmecillinam の場合、菌攻撃直後が最も生存率が良くそれに次いで 2 時間後が良かった。ABPC の場合には 2 時間後が最も良く、次に直後、4 時間後の順であった。

このように Pivmecillinam の治療効果が菌攻撃直後が良かったのは、恐らく菌量の影響によるものと思われる。

ま と め

新しく開発された Mecillinam, Pivmecillinam について Ampicillin (ABPC) を比較薬剤として細菌学的研究を行なった結果、次のごとき成績がえられた。

1. Mecillinam の抗菌力は ABPC とは異なりグラム陽性菌に対して弱く、グラム陰性桿菌に対して強かった。

2. 臨床分離 *Escherichia coli* に対する感受性分布では 10^6 cells/ml を 1 白金耳接種した場合 ABPC よりも優れた抗菌力を示し、しかも 10^8 cells/ml 接種時に見られた Mecillinam 耐性菌は感性化されていた。*Klebsiella pneumoniae* でも同様な傾向が見られたが、*Escherichia coli* 程著明ではなかった。

3. *Escherichia coli* を用いて接種菌量の MIC におよぼす影響を検討したところ、Mecillinam は ABPC より菌量による影響を受けやすかった。

4. 増殖曲線におよぼす影響では、*Staphylococcus aureus* の場合 dose response のある殺菌作用が見られた。*Escherichia coli* の場合菌量の影響を著しく受け、菌量が多くなると Mecillinam の高濃度を作用させても静菌的な作用しか見られなかった。

5. Mecillinam に対する *in vitro* 耐性菌の出現率について *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* を用いて検討をおこなったところ、菌種および菌株によってかなり差が認められた。また、このような耐性菌のマウスに対する毒性は親株に比べて低下していることが判った。

6. Mecillinam と Dicloxacillin の併用効果について *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* を用いて検討をおこなったところ著明な協力作用が認められた。

7. Mecillinam の作用を受けて spherical form になった *Escherichia coli* は正常菌よりヒトおよびモルモット好中球 PMN にやや取り込まれやすい傾向が認められた。またこのような spherical cell は正常人血清により正常菌と同様に殺菌された。

8. マウス実験的 *Escherichia coli* 感染症に対する治療効果は、Pivmecillinam が ABPC に比べて非常に優

Fig. 35 Influence of therapeutic time (*E. coli* No. 29)

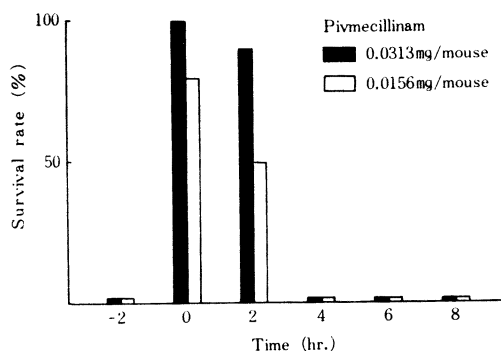
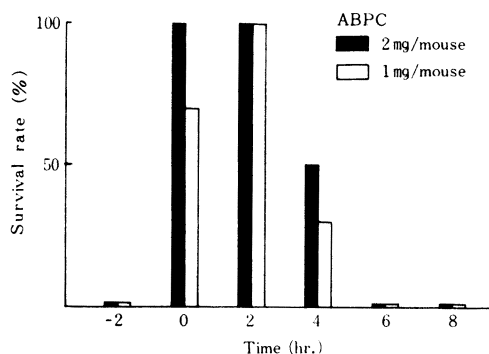


Fig. 36 Influence of therapeutic time (*E. coli* No. 29)



れた ED₅₀ 値を示した。また, ABPC 耐性 *Escherichia coli* にも Pivmecillinam は有効であった。しかし, 菌量の影響は *in vitro* 同様 Pivmecillinam の方が受けやすかった。さらに, Pivmecillinam の投与時期による検討をおこなったところ菌攻撃直後に治療をおこなった時が最も生存率が良かった。

文 献

- 1) LUND, F. & L. TYBRING : 6 β -Amidinopenicillanic acids - a new group of antibiotics. *Nature New Biol.* 236 : 135~137, 1972
- 2) GREENWOOD, D. ; H. L. BROOKS, R. GARGAN & F. O'GRADY : Activity of FL-1060, a new β -lactam antibiotic, against urinary tract pathogens. *J. Clin. Path.* 27 : 192~197, 1974
- 3) TYBRING, L. : Mecillinam (FL-1060), a 6 β -amidinopenicillanic acid derivative : *In vitro* evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8 : 266~270, 1975
- 4) TYBRING, L. & N. H. MELCHIOR : Mecillinam (FL-1060), a 6 β -amidinopenicillanic acid derivative : Bacteriocidal action and synergy *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8 : 271~279, 1975
- 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 19 : 867~874, 1971
- 6) 中沢昭三, 北中英良, 大槻雅子, 福井正憲 : 合成ペニシリン Amoxycillin に関する細菌学的研究。Chemotherapy 21 : 1375~1382, 1973
- 7) 中沢昭三, 田島政三, 大槻雅子, 天野真理子, 松下治恵 : 新しい広域合成ペニシリン Pivampicillin に関する細菌学的評価。Chemotherapy 22 : 319~328, 1974
- 8) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23 : 1~2, 1975
- 9) PARK, J.T. & L. BURMAN : FL-1060 : A new penicillin with a unique mode of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 : 863~868, 1973
- 10) MATSUHASHI, S. ; T. KAMIRYO, P. M. BLUMBERG, P. LINNETT, E. WILLOUGHBY & J. L. STROMINGER : Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. *J. Bact.* 17 : 578~587, 1974
- 11) SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 : 2999~3003, 1975
- 12) EAGLE, H. & A. D. MUSSELMAN : The rate of bacteriocidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J. Exp. Med.* 86 : 99~131, 1948
- 13) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA : A bacteriological study on effects of β -lactam group antibiotics [in high concentrations. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 9 : 1033~1042, 1976

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON PIVMECILLINAM AND MECILLINAM, NEW β -LACTAM ANTIBIOTICS

SHOZO NAKASAWA, TAKESHI NISHINO, NAOMASA GOTO, KATSUMI YONENAGA,

MASAKO YOKOTE, YOSHIKI SUGIHARA and SAKUO YAMADA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

In the bacteriological evaluation of mecillinam and pivmecillinam, newly developed penicillins, with ampicillin (ABPC) as a reference drug, the following results were obtained.

1) Mecillinam showed, unlike ABPC, more potent antibacterial activities against gram-negative bacilli than against gram-positive bacteria.

2) When the inoculum size was 10^6 cells/ml, clinically isolated *Escherichia coli* showed higher susceptibility to mecillinam than to ABPC. Such strains as were found resistant to mecillinam with 10^8 cells/ml inoculation turned sensitive to mecillinam with 10^6 /ml inoculation. The same phenomenon was observed with *Klebsiella pneumoniae*, but was less remarkable than with *E. coli*.

3) Influence of inoculum size upon MIC was studied with *E. coli*. Mecillinam received more influence than ABPC.

4) Influence of inoculum size upon growth curve was also studied. With *Staphylococcus*, dose-related bactericidal effect was found. While, with *E. coli*, inoculum size was highly influential and only bacteriostatic effect was shown even with high concentration of mecillinam when the size was large.

5) *In vitro* study on development of resistance to mecillinam was performed by use of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus* as test organisms. The resistance development varied with species and strains. Virulence of such resistant strains in mice was less potent than that of the original strains.

6) Studies on synergistic effect of mecillinam and dicloxacillin were conducted with *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* and a remarkable synergism was observed.

7) Spherical cells of *E. coli* which was formed by the action of mecillinam were a little more easily phagocytized by PMN of neutrophil of man and guinea-pigs than normal cells. Such spherical cells as well as normal cells were killed when treated with human serum.

8) In the mouse experimental infections with *E. coli*, pivmecillinam showed more potent therapeutic effect (lower ED_{50} value) than ABPC. In addition, pivmecillinam was effective against ABPC-resistant strains. However, mecillinam received more influence of inoculum size than ABPC as *in vitro* study. Pivmecillinam showed the highest survival rate when administered immediately after challenge.