

Mecillinam および Pivmecillinam の *in vitro* 抗菌作用について

中尾雅文・山崎俊幸・土屋院司

武田薬品工業株式会社中央研究所

緒 言

現在幾つかの合成ペニシリンが広く臨床使用されているが、それらはいずれも6-aminopenicillanic acid の6位アミノ基にアシル残基が amido 結合したものである。LUND & TYBRING¹⁾は6-aminopenicillanic acid のN置換体について検討し、6位側鎖の結合様式が従来のペニシリンとは異なる6 β -amidinopenicillanic acid について報告した。Mecillinam, 6 β -[(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-methyleneamino]-penicillanic acid は6 β -amidinopenicillanic acid の1つで、その抗菌力はグラム陽性菌に対しては Ampicillin (ABPC) や Penicillin G (PCG) に劣るが、グラム陰性菌の多くに対しては ABPC より優れている。また *Escherichia coli* に Mecillinam を作用させると従来の β -ラクタム抗生物質の場合に見られる菌体の伸長化やスフエロプラストの形成はなく、卵形から球状に変形して徐々に溶菌に至ることが確認されている^{2)~7)}。さらに PARK³⁾らは Mecillinam は *E. coli* の増殖を抑制する薬剤濃度で菌の細胞壁合成に関与していると考えられている transpeptidase, D-alanine carboxypeptidase, endopeptidase などを阻害しなかったと報告している。また SPRATT⁸⁾ や JAMES⁹⁾らは Mecillinam が親和性を有する菌体表層タンパクは PCG, ABPC, Cephalexin (CEX), Cephaloridine (CER) などが親和性を有する菌体表層タンパクとは異なっていることを見出した。また Mecillinam の抗菌作用は培地中に含まれる NaCl などの塩の影響を受けるという報告もある⁴⁾¹⁰⁾。

Mecillinam の3位に pivaloyloxymethyl 基がエステル結合した Pivmecillinam は経口投与でよく吸収され、酵素的に加水分解されて速やかに Mecillinam に転換されて抗菌力を発揮すると考えられている¹²⁾。そこで主に Mecillinam について、また一部の実験においては Pivmecillinam, ABPC, Amoxicillin (AMPC), CEX, Fosfomycin (FOM) などと *in vitro* 抗菌作用を比較検討した。

実験材料および実験方法

1. 使用薬剤: Mecillinam および Pivmecillinam は武田薬品中央研究所で合成したものをを用いた。Ampicillin (ABPC), Amoxicillin (AMPC), Cephalexin (CEX), Fosfomycin (FOM) を対照薬剤として使用した。

2. 使用菌株: 標準株は当研究室で Trypticase soy agar (TSA) (BBL) あるいは10%牛血液加 TSA で継代保存した。臨床分離の *Staphylococcus aureus* (106株), *E. coli* (88株), ABPC 耐性 *E. coli* (37株), *Klebsiella pneumoniae* (70株), ABPC 耐性 *Klebsiella pneumoniae* (43株), *Serratia marcescens* (57株), *Proteus mirabilis* (77株), *Proteus vulgaris* (34株), *Proteus morganii* (90株), *Proteus rettgeri* (37株) はドルセットの卵培地 (ニッスイ) で継代保存した。

3. 抗菌力試験

i) 寒天平板希釈法: 2倍希釈濃度系列の薬剤を含む寒天平板培地に1白金耳の菌液を2cmの長さに塗抹し、37°Cで18~20時間培養後菌の発育の有無を肉眼的に判定した。発育の見られない最小薬剤濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

ii) 液体希釈法: Nutrient broth (NB) (エイケン) 4.4 ml に2倍希釈濃度系列の薬剤0.5 ml および Trypticase soy broth (TSB) (BBL) で1夜培養した菌を同培地で希釈し10⁸ CFU/ml 菌液としたもの0.1 ml を加え、37°Cで18~20時間培養した。肉眼的に培地の混濁が見られない最小薬剤濃度を MIC とした。また minimum salts medium を用いた実験では10⁸ CFU/ml 菌液を1白金耳接種した。

4. 殺菌作用: 定量培養法により検討した。接種菌量, 薬剤濃度, 薬剤添加時期, 菌の培養条件などについては各実験項目に示す。NB を用いて培養した菌液は経時的に分取し、滅菌生理食塩水で10倍希釈をくり返し、コロニー数測定に適した菌数を含む菌液1 ml に Nutrient agar (NA) (エイケン) 9 ml を添加して混和し、37°Cで24~48時間培養後生じたコロニー数より生菌数を

Table 1 Antibacterial spectra of Mecillinam, Pivmecillinam, Ampicillin and Amoxicillin

Organism	Medium	MIC in $\mu\text{g/ml}$			
		Mecillinam	Piv-mecillinam	ABPC	AMPC
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P	NA	25	100	0.1	0.1
" 308A-1	"	25	100	0.1	0.2
" 1840	"	>100	>100	100	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> E-14	Blood-NA	0.78	6.25	0.013	0.013
" Dick	"	0.78	12.5	0.025	0.025
" S-8	"	1.56	12.5	0.025	0.013
" NY-5	"	0.78	12.5	0.025	0.025
<i>Streptococcus mitis</i> America	"	3.13	25	0.39	0.2
<i>Streptococcus faecium</i> IFO 3128	"	>100	>100	3.13	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I	"	6.25	25	0.025	0.025
" Type II	"	3.13	12.5	0.013	0.013
" Type III	"	3.13	25	0.025	0.013
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Tront	"	0.1	0.78	0.006	0.006
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	NA	6.25	25	0.013	0.013
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	"	0.2	3.13	6.25	6.25
" Umezawa	"	6.25	25	1.56	6.25
" K-12	"	0.05	0.39	3.13	3.13
" O-78	"	1.56	25	6.25	6.25
" O-111	"	0.1	0.78	1.56	3.13
" T-7	"	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DT	"	12.5	100	0.78	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> A	"	3.13	12.5	1.56	0.78
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	"	0.39	1.56	3.13	3.13
<i>Salmonella hirschfeldii</i>	"	0.78	1.56	1.56	0.78
<i>Salmonella typhi</i> Boxhill-58	"	0.1	0.39	0.39	0.39
" Watson	"	0.1	1.56	0.78	0.78
<i>Salmonella typhimurium</i>	"	0.78	1.56	0.78	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-1	"	0.05	0.39	0.39	0.78
<i>Shigella flexneri</i> EW-10	"	3.13	25	1.56	3.13
" EW-40	"	0.39	0.78	1.56	3.13
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	"	0.2	25	1.56	3.13
<i>Vibrio colerae</i> Inaba	"	0.78	6.25	1.56	3.13
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	"	>100	>100	25	25
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	"	>100	>100	6.25	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	"	>100	>100	6.25	6.25
" OX-19	"	>100	>100	100	50
" OX-K	"	100	>100	0.78	1.56
<i>Proteus morgani</i> IFO 3168	"	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP	"	>100	>100	>100	>100
" U 31	"	>100	>100	>100	>100
" N 18	"	12.5	>100	100	50
" D 363	"	>100	>100	>100	>100
" N 10	"	>100	>100	>100	>100
" P 8	"	>100	>100	>100	>100

Inoculum size : A loopful of bacterial suspension (10^8 CFU/ml)

Medium : NA=Nutrient agar (Eiken)

Blood-NA=NA supplemented with 10% bovine blood

Table 2 Antibacterial spectra of Mecillinam, Pivmecillinam, Ampicillin and Amoxicillin

Organism		Medium	MIC in $\mu\text{g/ml}$			
			Mecillinam	Piv-mecillinam	ABPC	AMPC
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209 P	NA	25	50	0.05	0.1
"	308A-1	"	25	50	0.05	0.1
"	1840	"	100	>100	0.78	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i>	E-14	Blood-NA	0.78	3.13	0.013	0.013
"	Dick	"	0.78	3.13	0.025	0.013
"	S-8	"	0.39	0.78	0.013	0.006
"	NY-5	"	0.39	1.56	0.006	0.006
<i>Streptococcus mitis</i>	America	"	1.56	12.5	0.2	0.2
<i>Streptococcus faecium</i>	IFO 3128	"	>100	>100	0.78	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Type I	"	6.25	25	0.025	0.013
"	Type II	"	1.56	6.25	0.013	0.006
"	Type III	"	1.56	6.25	0.025	0.013
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Tront	"	0.1	0.78	0.006	0.006
<i>Bacillus subtilis</i>	PCI 219	NA	3.13	12.5	0.013	0.013
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2	"	0.2	0.78	3.13	3.13
"	Umezawa	"	0.025	0.2	0.39	0.78
"	K-12	"	0.05	0.39	1.56	3.13
"	O-78	"	0.05	0.39	3.13	6.25
"	O-111	"	0.05	0.39	0.78	0.78
"	T 7	"	25	≥ 100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	"	0.1	0.78	0.39	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i>	A	"	0.2	0.78	0.78	0.78
<i>Salmonella schottmuelleri</i>		"	0.1	0.39	0.39	0.39
<i>Salmonella hirschfeldii</i>		"	0.1	0.78	0.78	0.78
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	"	0.05	0.39	0.2	0.39
"	Watson	"	0.05	0.39	0.78	0.78
<i>Salmonella typhimurium</i>		"	0.2	0.39	0.78	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i>	EW-1	"	0.013	0.2	0.2	0.39
<i>Shigella flexneri</i>	EW-10	"	0.2	0.78	0.78	1.56
"	EW-40	"	0.1	0.39	0.78	1.56
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	"	0.1	0.39	1.56	3.13
<i>Vibrio colerae</i>	Inaba	"	0.78	3.13	0.78	0.78
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	"	0.39	1.56	12.5	12.5
<i>Proteus mirabilis</i>	IFO 3849	"	100	≥ 100	6.25	3.13
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	"	100	>100	1.56	1.56
"	OX-19	"	0.1	0.78	3.13	3.13
"	OX-K	"	100	≥ 100	0.2	0.2
<i>Proteus morganii</i>	IFO 3168	"	>100	>100	≥ 100	≥ 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SP	"	>100	>100	>100	>100
"	U 31	"	>100	>100	>100	>100
"	N 18	"	6.25	25	25	50
"	D 363	"	>100	>100	>100	>100
"	N 10	"	>100	>100	>100	>100
"	P 8	"	>100	>100	>100	>100

Inoculum size : A loopful of bacterial suspension (10^6 CFU/ml)

Medium : NA=Nutrient agar(Eiken)

Blood-NA=NA supplemented with 10% bovine blood

求めた。

5. 耐性獲得および耐性菌の感敏化：

i) 増量継代法：被検菌を薬剤の2倍希釈濃度系列を含むNBで24時間培養した。薬剤を含まない対照培地とはほぼ同程度の増殖を示した薬剤含有培地発育菌を同じかさらに高濃度の薬剤を含む培地にくり返し継代した。またこのようにして得られた耐性菌を薬剤を含まないTSBで24時間ごとに継代し、その都度菌の感受性を測定した。

ii) Population 分析：2ないし4倍希釈濃度系列の薬剤を含むNA平板にTSBで1夜培養した菌の10倍希釈系列菌液0.1mlをそれぞれコンラージ棒を用いて塗り広げ、37℃で培養し生じたコロニー数を測定して生残曲線を求めた。

iii) ディスク感受性試験：約 10^6 CFU/mlの被検菌を含むNA平板に予め100および1,000 μ g/mlの薬剤水溶液に浸して調製したペーパーディスク（東洋汙紙、直径8mm）をはりつけ、37℃で24時間培養後形成された阻止円について阻止円径を測定し、また阻止円内のコロニーの有無を検討した。

iv) 耐性菌の増殖速度：*E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT, *Serratia marcescens* IFO 12648についてMecillinam 1および10 μ g/ml含有NA平板に生じたコロニーを分離した。これをTSBで1夜培養後NBで希釈し $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml菌液としたものをL字管を用いて37℃で振盪培養した。薬剤無添加群および耐性菌の分離に用いた薬剤濃度の1/10、1および10倍量添加群について経時的に菌液を分取して生菌数を測定した。

v) 薬剤投与マウスの糞便中乳糖発酵菌数ならびにこれらの菌の薬剤感受性の変化：SLC-ICR、雄、4週令、体重17~18gのマウスにPivmecillinamあるいはABPCを1日1回経口投与した。経日的に新鮮糞便を採取し、100倍量の滅菌生理食塩水を添加しながらすりつぶし、適宜10倍希釈を行ないその0.1mlをMacCONKEY agar（エイケン）平板にコンラージ棒を用いて塗り広げ、37℃で24時間培養して生じた乳糖発酵菌のコロニー数を測定した。同時に薬剤含有MacCONKEY平板にも同様に菌液を塗抹培養した。

実験成績

1. 抗菌スペクトラム：MecillinamおよびPivmecillinamのグラム陽性菌（ 10^8 CFU/ml, 10^8 CFU/ml）に対する抗菌力はABPCおよびAMPCに比べ劣るが、グラム陰性菌（ 10^8 CFU/ml）に対するMecillinamの抗菌力はABPCおよびAMPCよりも4~16倍強く、Pivmecillinamのそれは*E. coli*では強いが、それ以外の菌種ではABPC、AMPCと同程度であった。しかしながらMecillinamおよびPivmecillinamは*Proteus* spp. や*Pseudomonas aeruginosa*に対してはほとんど抗菌力を示さなかった（Table 1, 2）。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

i) *Staph. aureus* (106株)： 10^8 CFU/ml菌液では、Mecillinamは12.5 μ g/ml以下の濃度ですべての菌株の発育を阻止せず、100 μ g/mlでも大多数の菌株の発育を阻止しなかった。ABPCのMICは $0.1 \sim >100$ μ g/mlの範囲に分布した。 10^6 CFU/ml菌液では、Mecillinam

Fig. 1 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Staph. aureus* (106 strains)

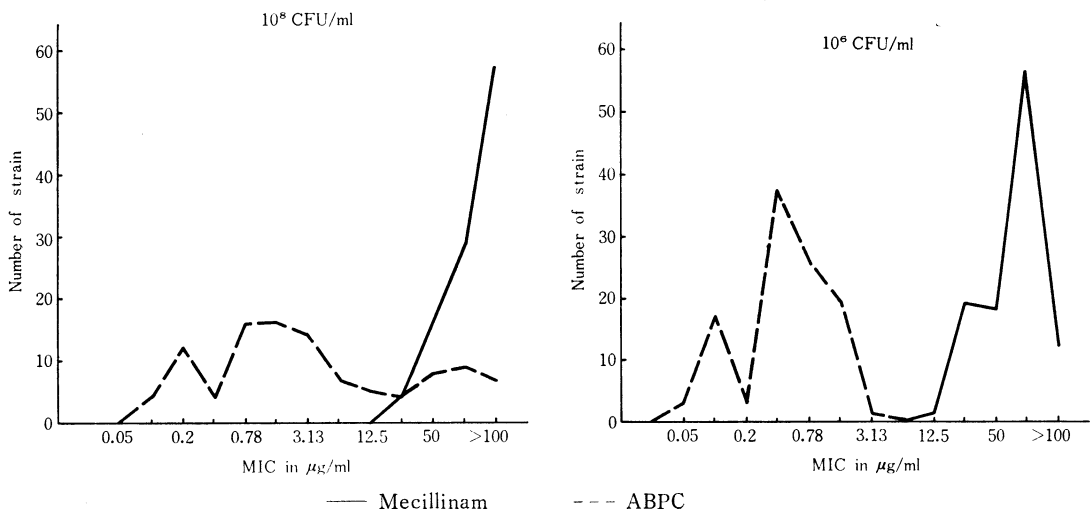


Fig. 2 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *E. coli* (88 strains)

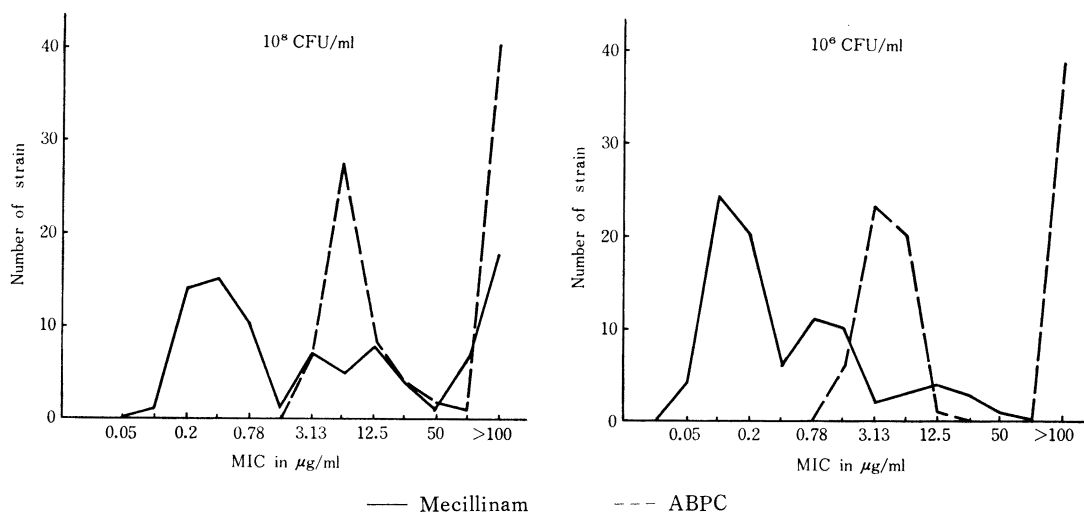
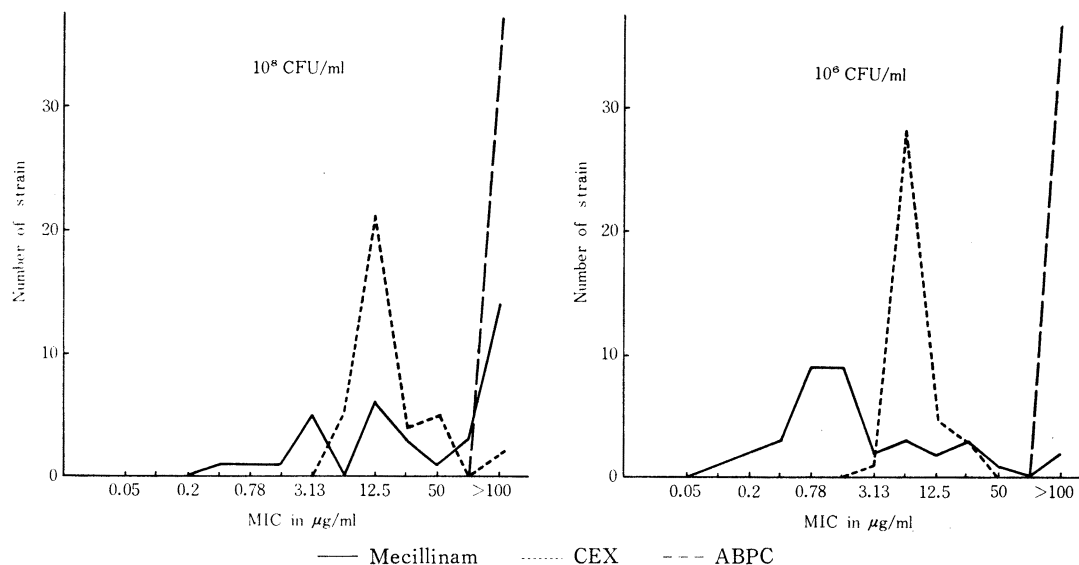


Fig. 3 Antibacterial activity of Mecillinam, Cephalexin and Ampicillin against clinical isolates of Ampicillin-resistant *E. coli* (37 strains)



の MIC は $12.5 \sim >100$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、ピークは 100 $\mu\text{g/ml}$ にあった。ABPC の MIC は $0.05 \sim 3.13$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と 0.39 $\mu\text{g/ml}$ にピークがあった (Fig. 1)。

ii) *E. coli* (88株) : 10^8 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC は $0.2 \sim 0.39$ $\mu\text{g/ml}$, $3.13 \sim 12.5$ $\mu\text{g/ml}$, >100 $\mu\text{g/ml}$ にそれぞれピークを有する 3 峰性の分布を示した。ABPC の MIC は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と >100 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する 2 峰性の分布を示した。 10^6 CFU/ml

菌液では、Mecillinam の MIC は $0.05 \sim 50$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、約 57% が $0.05 \sim 0.2$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、 >100 $\mu\text{g/ml}$ の菌株はなかった。一方 ABPC の MIC は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と >100 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する 2 つのグループに分れた (Fig. 2)。

iii) ABPC 耐性 *E. coli* (37株) : 10^8 CFU/ml 菌液での MIC は、Mecillinam は $0.39 \sim 3.13$ $\mu\text{g/ml}$ と $12.5 \sim >100$ $\mu\text{g/ml}$ に分布し、CEX は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ をピークとする分布を示した。 10^6 CFU/ml 菌液では、Mecillin-

Fig. 4 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (70 strains)

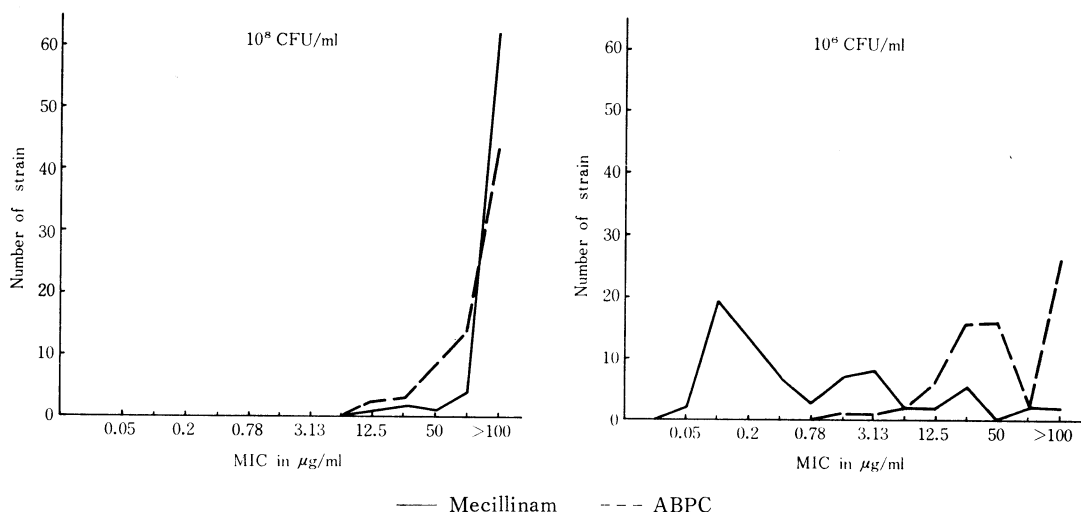
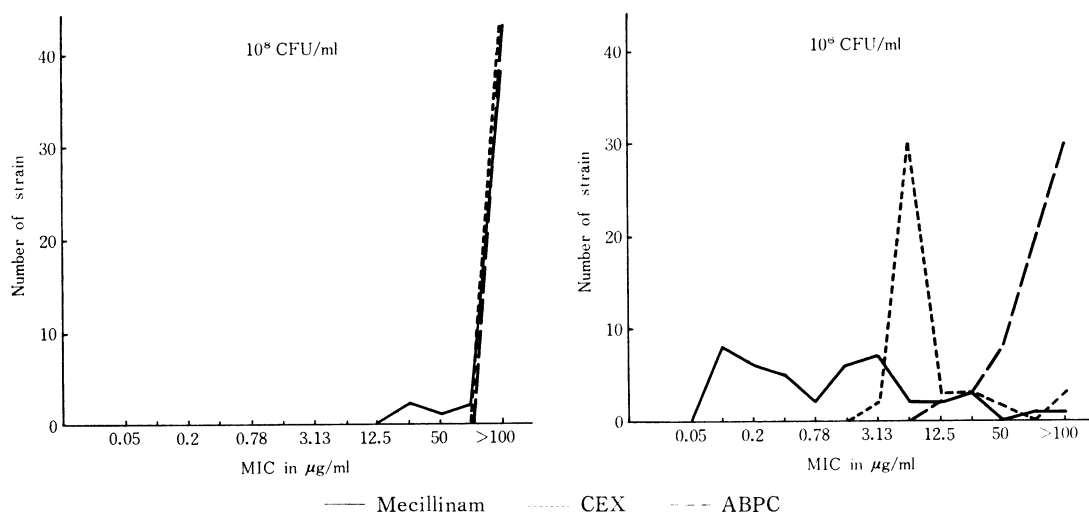


Fig. 5 Antibacterial activity of Mecillinam, Cephalexin and Ampicillin against clinical isolates of Ampicillin-resistant *Klebsiella pneumoniae* (43 strains)



am, CEX のいずれの MIC 値もやや低くなった (Fig. 3)。

iv) *Klebsiella pneumoniae* (70株) : 10⁸ CFU/ml 菌液での MIC は, Mecillinam, ABPC とともに 12.5~>100 µg/ml に分布し, Mecillinam では約94%, ABPCでは約81%の菌株が100 µg/ml ないしそれ以上であった。10⁶ CFU/ml 菌液では, Mecillinam の MIC は主として 0.1 µg/ml に分布し, ABPC のそれは25~50 µg/ml と >100 µg/ml にピークを有する分布を示した (Fig. 4)。

v) ABPC 耐性 *Klebsiella pneumoniae* (43株) : 10⁸

CFU/ml 菌液での MIC は Mecillinam, は25~>100 µg/ml に分布し, 約93%が100 µg/ml ないしそれ以上であった。また CEX はすべて100 µg/ml 以上であった。10⁶ CFU/ml 菌液では, Mecillinam, CEX とともに抗菌力が強くなり, Mecillinam の MIC は0.1~25 µg/ml に分布し, CEX のそれは6.25 µg/ml に大きなピークを有する分布を示した (Fig. 5)。

vi) *Serratia marcescens* (57株) : 10⁸ CFU/ml 菌液では, Mecillinam の MIC はすべて100 µg/ml 以上であった。ABPC のそれは50~>100 µg/ml に分布し,

Fig. 6 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Serratia marcescens* (57 strains)

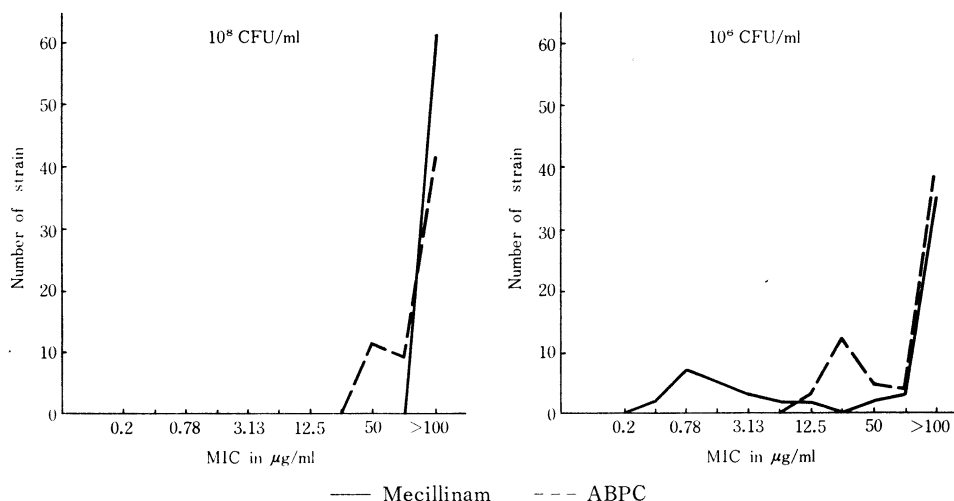
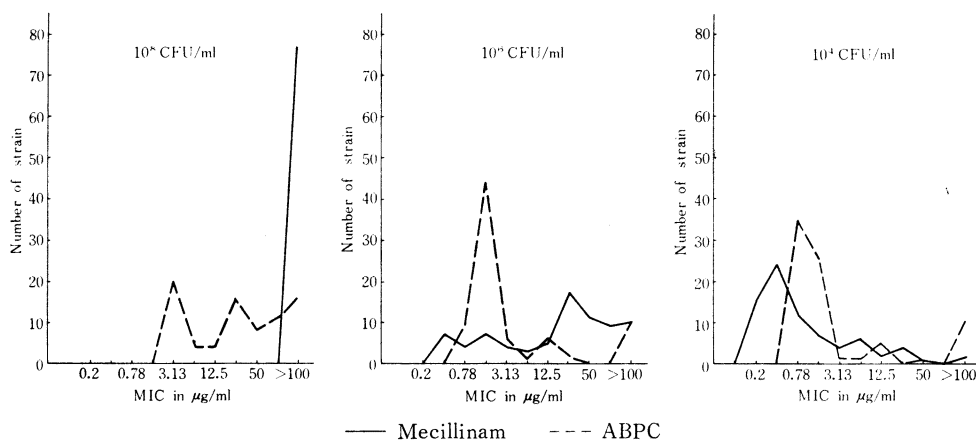


Fig. 7 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Proteus mirabilis* (77 strains)



約60%が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。 10^8 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC は約54%が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であったが、高い感受性を示す菌株もあった。一方 ABPC では 10^8 CFU/ml 菌液の場合とほとんど同じか、ごくわずかに感受性が高くなる程度であった (Fig. 6)。

vii) *Proteus mirabilis* (77株) : 10^8 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC はすべて100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。ABPC は3.13, 25および>100 $\mu\text{g/ml}$ にそれぞれピークを有する3峰性の分布を示した。 10^6 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の抗菌力は強くなり、MIC は0.39~>100 $\mu\text{g/ml}$ の広い範囲に分布した。ABPC は1.56 $\mu\text{g/ml}$ に大きなピークを有する分布を示した。

10^4 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の抗菌力はさらに強くなり、約81%が0.2~3.13 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。ABPC の抗菌力もやや強くなり、約79%が0.39~1.56 $\mu\text{g/ml}$ に分布した (Fig. 7)。

viii) *Proteus vulgaris* (34株) : 10^8 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC は100 $\mu\text{g/ml}$ ないしそれ以上であった。ABPC は1株だけ6.25 $\mu\text{g/ml}$ でその他はすべて100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。 10^6 CFU/ml 菌液では、Mecillinam に対して感受性を示す株が多くなり、0.39, 3.13, >100 $\mu\text{g/ml}$ にそれぞれ分布のピークがあった。ABPC の MIC は3株において1.56 $\mu\text{g/ml}$ であったが、大多数は100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。 10^4 CFU/ml

Fig. 8 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Proteus vulgaris* (34 strains)

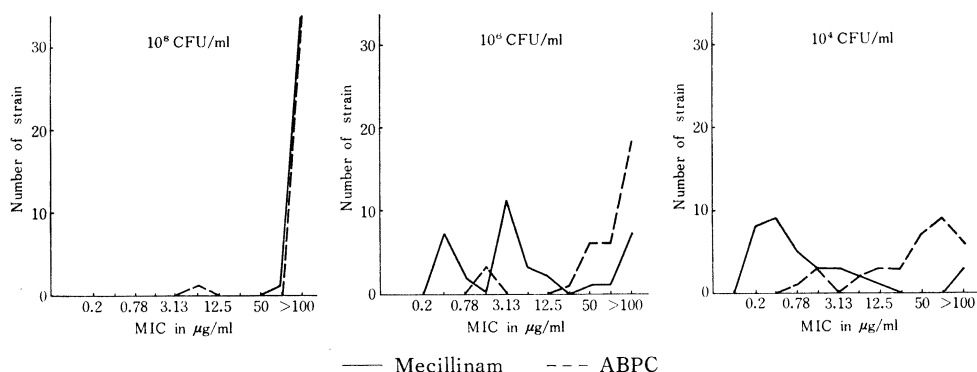


Fig. 9 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Proteus morganii* (90 strains)

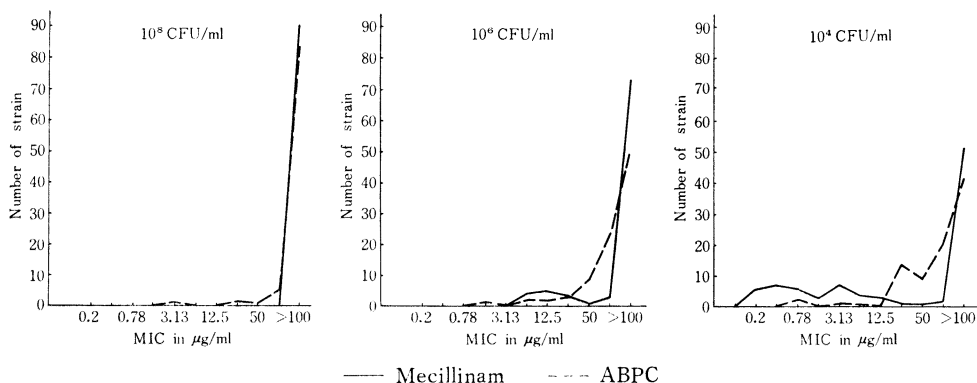
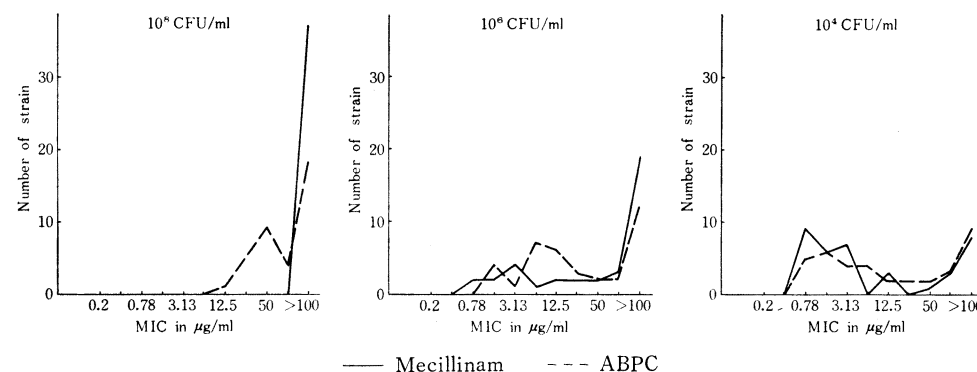


Fig. 10 Antibacterial activity of Mecillinam and Ampicillin against clinical isolates of *Proteus rettgeri* (37 strains)



菌液では、Mecillinam の MIC は $0.39 \mu\text{g/ml}$ をピークとする分布を示し、3 株のみ $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。ABPC もやや抗菌力が強くなる傾向が認められた (Fig. 8)。

ix) *Proteus morganii* (90 株) : 10^8 CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC はすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、ABPC は 91% が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。 10^6 CFU/ml 菌液でも、Mecillinam は $100 \mu\text{g/ml}$ で約 84% の菌株の

Table 3 Effect of horse serum on the antibacterial activity of Mecillinam and Pivmecillinam

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		Mecillinam				Pivmecillinam			
		0 %	10%	20%	50%	0 %	10%	20%	50%
<i>Staph. aureus</i>	FDA 209 P	25	25	25	25	50	50	50	50
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.2	0.2	0.2	1.56	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	0.05	0.05	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2	0.39
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	0.05	0.05	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2	0.39
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	0.1	0.1	0.1	0.39	0.2	0.2	0.2	0.39
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	0.39	0.39	0.39	3.13	1.56	1.56	1.56	6.25
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	50	50	50	50	100	100	100	100

Nutrient broth was used as the test medium.

Table 4 Effect of medium pH on the antibacterial activity of Mecillinam and Pivmecillinam

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		Mecillinam				Pivmecillinam			
		pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>Staph. aureus</i>	FDA 209 P	25	25	12.5	6.25	100	50	25	25
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.2	1.56	0.78	0.78	0.78	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	0.05	0.05	0.2	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	0.05	0.05	0.1	0.39	0.39	0.39	0.39	1.56
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	0.05	0.05	0.05	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	0.2	0.39	100	100	1.56	1.56	100	100
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	100	100	100	100	100	100	100	100

A loopful of bacterial suspension (10^6 CFU/ml) was inoculated.

Nutrient agar was used as the test medium.

発育を阻止しなかった。ABPC も約82%が100 $\mu\text{g/ml}$ ないしそれ以上であった。10⁴ CFU/ml 菌液では、Mecillinam の抗菌力は強くなる傾向にあったが、ABPC のそれは10⁶ CFU/ml 菌液の場合とほぼ同程度であった (Fig. 9)。

x) *Proteus rettgeri* (37株) : 10⁶ CFU/ml 菌液では、Mecillinam の MIC はすべて100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、ABPC のそれは12.5~>100 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。10⁶ CFU/ml 菌液では、Mecillinam, ABPC ともに少数の株において抗菌力が増強される傾向があった。10⁴ CFU/ml 菌液では、Mecillinam, ABPC ともに10⁶ CFU/ml 菌液の場合よりも低い MIC 値の分布を示し、Mecillinam は約60%の菌株の発育を0.78~3.13 $\mu\text{g/ml}$ で阻止した (Fig. 10)。

3. 抗菌作用におよぼす諸因子の影響

Staph. aureus FDA 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT, *Shigella sonnei* EW-33, *Sal-*

monella typhi Boxhill-58, *Serratia marcescens* IFO 12648および *Proteus vulgaris* IFO 3988について検討した。

i) 馬血清の影響 : *Staph. aureus* FDA 209P および *Proteus vulgaris* IFO 3988に対する抗菌力は、馬血清50%添加により変化しなかった。その他の菌株に対する抗菌力は20%以下の添加量では変化しなかったが、50%添加ではやや低下した (Table 3)。

ii) 培地 pHの影響 : *Staph. aureus* FDA 209P に対してはアルカリ側で、他の菌株に対しては酸性側で抗菌力が増強され、特に *Serratia marcescens* IFO 12648に対しては pH 7と8の間で著しい抗菌力の変動が認められた (Table 4)。

iii) 接種菌量の影響 : *Staph. aureus* FDA 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *Shigella sonnei* EW-33, *Salmonella typhi* Boxhill-58では接種菌量による著しい抗菌力の変化は認めなかった。*Klebsiella pneumoniae* DT では10⁶

Table 5 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of Mecillinam and Pivmecillinam

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
		Mecillinam					Pivmecillinam				
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
<i>Staph. aureus</i>	FDA 209 P	12.5	12.5	25	25	25	50	50	50	100	100
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.39	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	0.05	0.05	0.05	≥ 100	≥ 100	0.05	0.39	0.78	≥ 100	≥ 100
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.2	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	0.2	0.2	0.2	0.39	≥ 100	0.78	0.78	1.56	12.5	≥ 100
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	0.39	12.5	100	≥ 100	> 100	1.56	100	100	100	> 100

A loopful of bacterial suspension (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/ml, respectively) was inoculated.
Nutrient agar was used as the test medium.

Table 6 Effect of test medium on the antibacterial activity of Mecillinam and Pivmecillinam

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
		Mecillinam					Pivmecillinam				
		NA	TSA	MHA	HIA	BHIA	NA	TSA	MHA	HIA	BHIA
<i>Staph. aureus</i>	FDA 209 P	25	25	12.5	25	50	50	50	50	50	100
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	0.05	0.1	0.05	0.1	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	0.05	0.1	0.1	0.1	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	0.05	0.05	0.1	0.1	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	3.13
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	0.39	1.56	0.39	0.78	1.56	1.56	100	3.13	1.56	12.5
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	100	100	50	50	100	100	> 100	≥ 100	> 100	> 100

A loopful of bacterial suspension (10⁶ CFU/ml) was inoculated.

NA : Nutrient Agar

TSA : Trypticase Soy Agar

MHA : Mueller Hinton Agar

HIA : Heart Infusion Agar

BHIA : Brain Heart Infusion Agar

Table 7 Effect of brand of nutrient agar on the antibacterial activity of Mecillinam and Pivmecillinam

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Mecillinam			Pivmecillinam			
		Eiken	Nissui	Difco	Eiken	Nissui	Difco	
<i>Staph. aureus</i>	FDA 209 P	12.5	25	25	50	50	100	
<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.013	0.78	0.39	0.2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DT	0.05	0.1	0.025	0.78	0.39	0.2	
<i>Shigella sonnei</i>	EW-33	0.05	0.05	0.013	0.39	0.39	0.2	
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill-58	0.05	0.05	0.013	0.39	0.39	0.2	
<i>Serratia marcescens</i>	IFO 12648	0.2	0.39	0.05	1.56	1.56	0.39	
<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3988	50	100	6.25	100	100	3.13	

A loopful of bacterial suspension (10⁶ CFU/ml) was inoculated.

Table 8 Concentration of metal in culture medium

Medium	g/1000 ml					
	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe
BHIA (Difco)	4.316	0.624	0.0395	0.0307	0.000832	<0.00312
HIA (Eiken)	2.920	0.440	0.0760	0.0216	0.000960	<0.00240
TSA (BBL)	2.600	0.244	0.0840	0.0208	0.001080	<0.00240
NA (Eiken)	2.240	0.875	0.0980	0.0252	0.000735	0.00455
NA (Nissui)	2.275	0.910	0.0490	0.00875	0.002210	0.00322
NA (Difco)	0.391	0.253	0.0483	0.02300	0.000230	<0.00138
MHA (Eiken)	2.394	0.494	0.0608	0.00988	0.000228	<0.00228
NB (Eiken)	2.700	0.106	0.0061	0.00774	0.000432	0.00270

BHIA : Brain Heart Infusion Agar

HIA : Heart Infusion Agar

TSA : Trypticase Soy Agar

NA : Nutrient Agar

MHA : Mueller Hinton Agar

NB : Nutrient Broth

Table 9 Effect of salt on the antibacterial activity of Mecillinam against *E. coli* NIHJ JC-2

Salt	MIC(μ g/ml)						
	mg/ml						
	0	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
NaCl	0.1	—	—	0.2	0.2	0.39	50
KCl	0.1	—	—	0.1	0.2	0.39	50
MgCl ₂	0.1	0.1	3.13	6.25	12.5	50	—
NaNO ₃	0.1	—	—	0.2	0.2	0.39	50
KNO ₃	0.1	—	—	0.1	0.2	0.2	0.39
Na ₂ SO ₄	0.1	—	—	0.1	0.2	0.39	50
K ₂ SO ₄	0.1	—	—	0.1	0.1	0.1	0.39
MgSO ₄	0.1	0.1	1.56	6.26	12.5	50	—

Minimum salts medium (K₂HPO₄ 7.0g, KH₂PO₄ 3.0g, Na₂Citrate-2H₂O 0.5g, MgSO₄-7H₂O 0.1g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, Glucose 2.0g, H₂O 1000 ml, pH 7.0) was used as the test medium. A loopful of bacterial suspension (10⁸CFU/ml) was inoculated.

~10⁷ CFU/ml の間で, *Serratia marcescens* IFO 12648 では10⁷~10⁸ CFU/ml の間で, *Proteus vulgaris* IFO 3988では10⁴~10⁵ CFU/ml の間で著しく MIC が変化した (Table 5)。

iv) 培地種の影響 : Mecillinam および Pivmecillinam の抗菌力は NA では TSA, Mueller hinton agar (MHA), Heart infusion agar (HIA) と同程度かやや強く, Brain heart infusion agar (BHIA) では最も弱かった (Table 6)。また NA (エイケン) および NA (ニッスイ) では同程度の, NA (Difco) ではさらに強

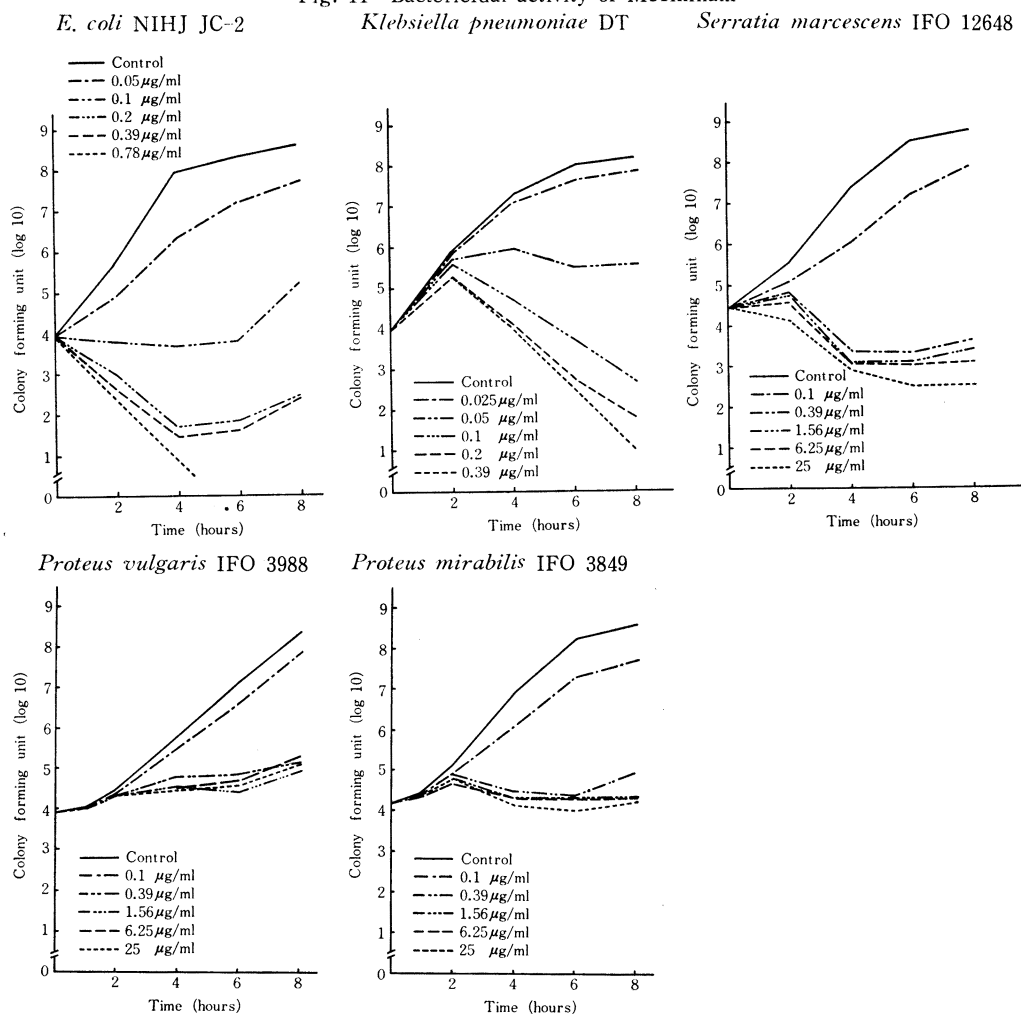
い抗菌力を示した (Table 7)。これら培地の原子吸光法で測定した金属含量は Table 8 に示すごとくで, Na 含量と抗菌力に関連性が見られ, Na 含量が最も少ない NA (Difco) での抗菌力が最も強く, Na 含量の最も多い BHIA で最も抗菌力が弱かった。その他の金属含量と抗菌力との間には明確な関連性は認められなかった。

v) 各種の塩の影響 : Mecillinam の抗菌力におよぼす各種の塩の影響を, *E. coli* NIHJ JC-2 を用いて検討した。Mecillinam の抗菌力は NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂SO₄ の10 mg/ml, MgCl₂, MgSO₄ の0.625 mg/ml 以上を添加すると明らかに低下した。しかし KNO₃ および K₂SO₄ は 10 mg/ml を添加してもほとんど抗菌力は変化しなかった (Table 9)。

4. 殺菌作用

i) 薬剤濃度と殺菌効果との関連性 : Biophotometer (Bio-LogII) (JASCOJOUAN) を用い約10⁴ CFU/ml の各被検菌液に菌接種と同時に薬剤を添加して37℃で振盪培養した。*E. coli* NIHJ JC-2 は0.05 μ g/ml でやや増殖が阻害された。0.1 μ g/ml では6時間後まで菌数はほとんど変化せず, その後増加した。0.2および0.39 μ g/ml では4時間後まで菌数は減少したが, それ以降は漸増増加した。0.78 μ g/ml では4時間以後菌数が10 CFU/ml 以下となった。*Klebsiella pneumoniae* DT では何れの薬剤濃度でも薬剤添加2時間後まで菌数の増加が見られた。0.05 μ g/ml では2時間以後ほとんど菌数は変化しなかった。0.1 μ g/ml 以上では薬剤濃度に応じて菌数が減少し, 8時間後まで再増殖は見られなかった。*Serratia marcescens* IFO 12648は0.39 μ g/ml 以上の薬剤濃度で菌数が減少したが, *E. coli* NIHJ JC-2や *Klebsiella pneumoniae* DT の場合ほど顕著ではなく, また

Fig. 11 Bactericidal activity of Mecillinam



薬剤濃度を高くしても菌数の減少はさほど増強されず、明確な dose response は認められなかった。*Proteus vulgaris* IFO 3988は0.1 $\mu\text{g/ml}$ でやや増殖が阻害され、0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上では明らかな増殖阻害が認められた。しかしさらに薬剤濃度を高くしても菌数の減少は見られなかった。*Proteus mirabilis* IFO 3849では何れの薬剤濃度でも薬剤添加後2時間まで菌数は増加した。0.1 $\mu\text{g/ml}$ でやや増殖阻害が見られ、0.39 $\mu\text{g/ml}$ では2時間以後ごくわずかに菌数が減少したが、8時間後には再び増加した。薬剤濃度をさらに高くしてもほぼ同様の経過をたどり、著明な菌数の減少は認められなかった (Fig. 11)。

ii) 殺菌作用におよぼす接種菌量の影響: L字管を用い $10^4 \sim 10^8$ CFU/ml の菌液に薬剤を最終濃度が1 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加して37℃で振盪培養した。*E. coli*

NIHJ JC-2は 10^8 CFU/ml 以下の接種菌量では薬剤添加後30分までは薬剤無添加の対照群と同様に菌数の増加が見られたが、その後著明に減少した。 10^7 CFU/ml 菌液では、菌数は薬剤添加後ほぼ一定であり、 10^8 CFU/ml 菌液では、菌数は1時間後までやや増加し、それ以後はほとんど変化しなかった。

Klebsiella pneumoniae DT は何れの接種菌量でも、薬剤添加後1時間までは菌数が増加した。それ以後 10^8 CFU/ml 以下の接種菌量では、明らかな菌数の減少が認められた。 10^7 CFU/ml 菌液では、菌数はやや減少傾向を示したが、 10^8 CFU/ml 菌液ではやや増加した。

Serratia marcescens IFO 12648 は 10^5 CFU/ml 以下の接種菌量で菌数の減少を示したが、その程度は *E. coli* NIHJ JC-2 や *Klebsiella pneumoniae* DT に比較するとわずかであった。 10^6 CFU/ml 菌液では、菌

Fig. 12 Effect of inoculum size on the bactericidal activity of Mecillinam
E. coli NIHJ JC-2 *Klebsiella pneumoniae* DT *Serratia marcescens* IFO 12648

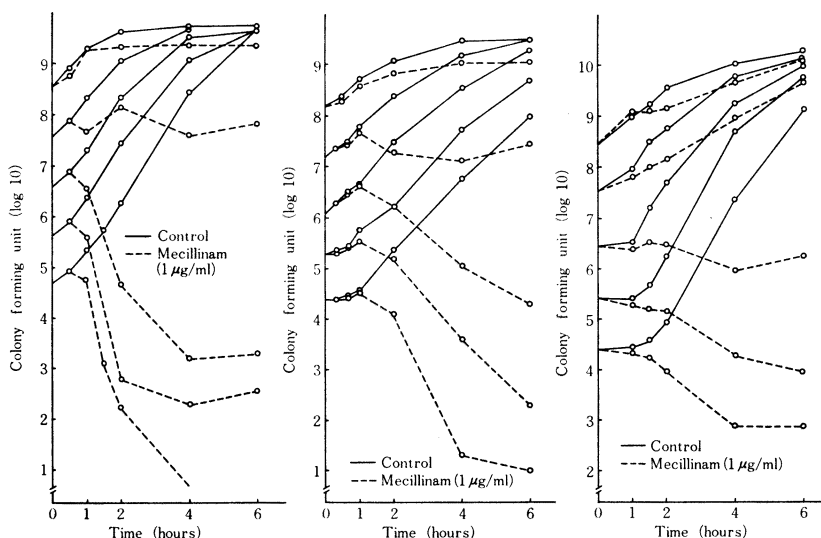
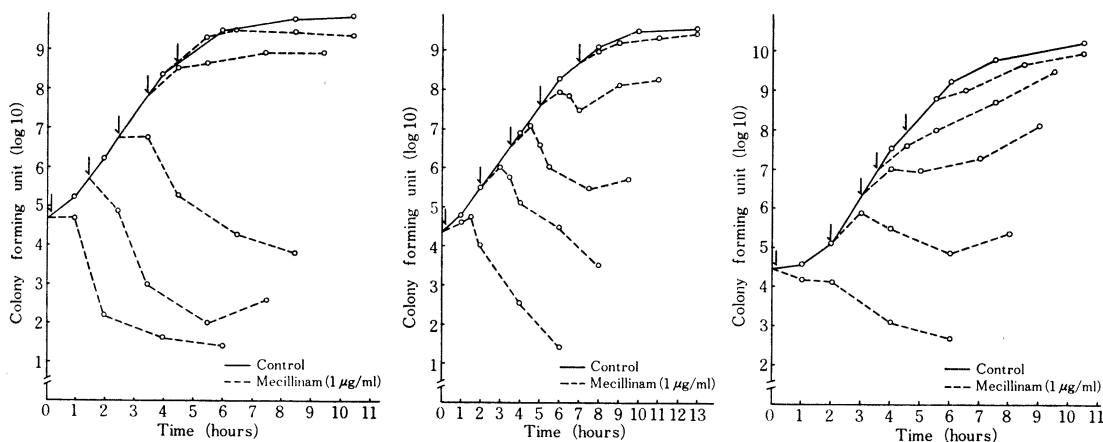


Fig. 13 Effect of the time of drug addition on the bactericidal activity of Mecillinam
E. coli NIHJ JC-2 *Klebsiella pneumoniae* DT *Serratia marcescens* IFO 12648



数はほとんど変化せず、 10^7 CFU/ml 以上の菌液では増加した (Fig. 12)。

iii) 殺菌作用におよぼす薬剤添加時期の影響：約 10^4 CFU/ml の菌液をL字管を用いて振盪培養した。培養開始時ならびに 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml の各菌量に達した時点で薬剤を最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、培養を続けた。*E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT, *Serratia marcescens* IFO 12648 のいずれに対しても、培養開始から薬剤添加が遅れるに従って殺菌作用が減弱した (Fig. 13)。

iv) 殺菌作用におよぼす菌の培養条件の影響：*E. coli* NIHJ JC-2の 10^6 CFU/ml, *Klebsiella pneumoniae* DTの 10^5 CFU/ml, *Serratia marcescens* IFO 12648の 10^4 CFU/ml の各液に薬剤を最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加して2分し、それぞれ振盪および静置培養した。*E. coli* NIHJ JC-2 および *Klebsiella pneumoniae* DT の増殖は静置培養よりも振盪培養で良好であり、殺菌作用は振盪培養でより強く認められた。*Serratia marcescens* IFO 12648では培養初期は静置培養でより速やかな菌数の増加が見られたが、2時間以後では振盪培

Fig. 14 Effect of growth condition on the bactericidal activity of Mecillinam

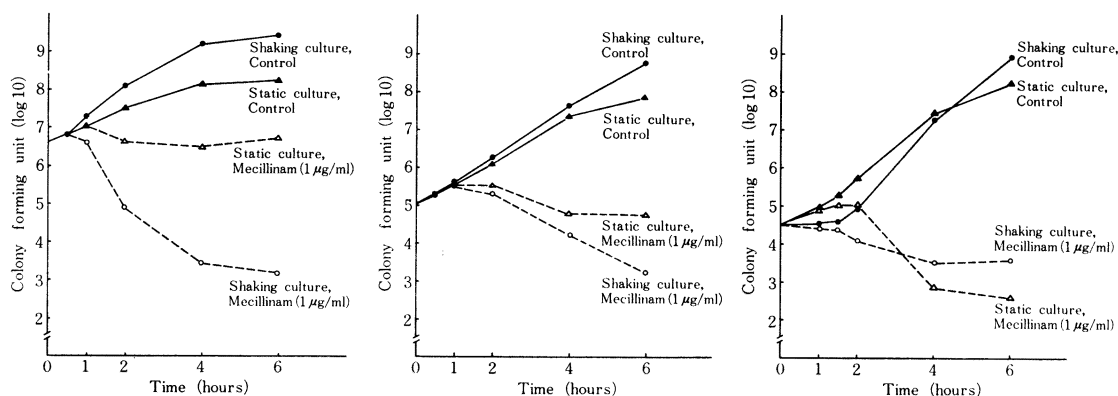
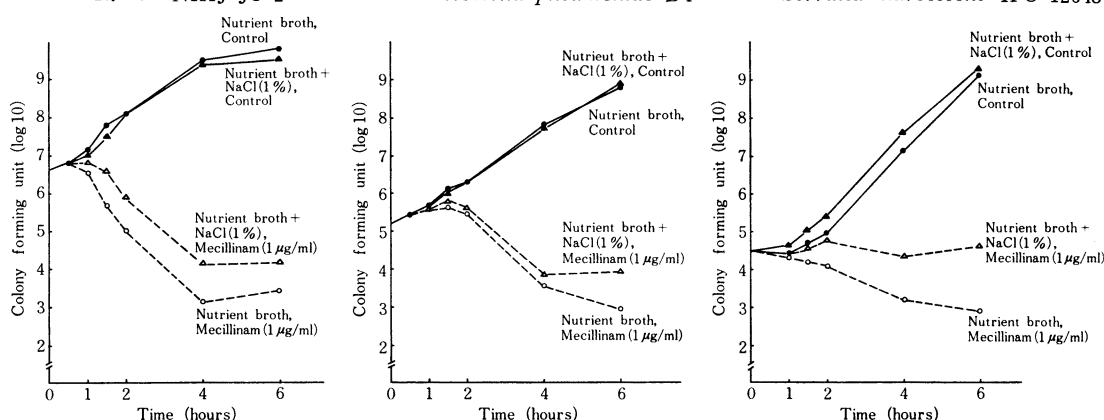
E. coli NIHJ JC-2*Klebsiella pneumoniae**Serratia marcescens* IFO 12648

Fig. 15 Effect of NaCl on the bactericidal activity of Mecillinam

E. coli NIHJ JC-2*Klebsiella pneumoniae* DT*Serratia marcescens* IFO 12648

養でより速やかに増殖した。一方薬剤添加による菌数の減少は静置培養でより著明で、*E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT の場合とは異なった (Fig. 14)。

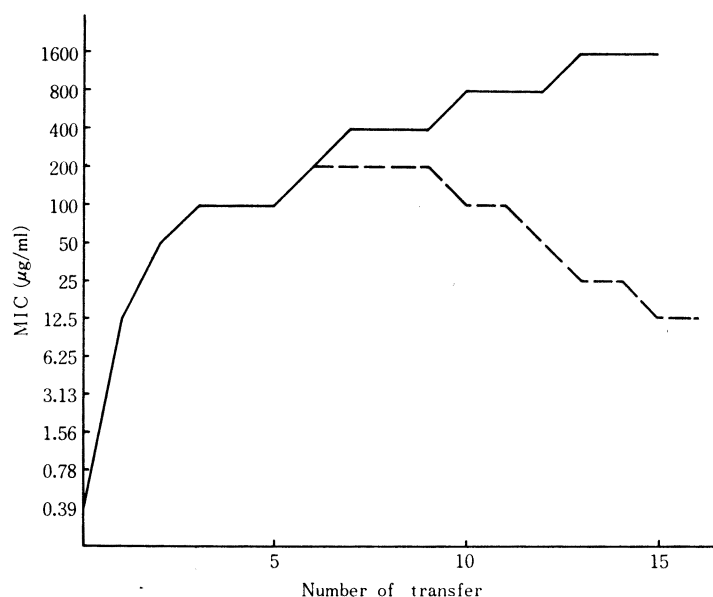
v) 殺菌作用におよぼす NaCl の影響：NB および NaCl 1% (w/v) 添加 NB に、*E. coli* NIHJ JC-2 は 10^6 CFU/ml, *Klebsiella pneumoniae* DT は 10^5 CFU/ml, *Serratia marcescens* IFO 12648 は 10^4 CFU/ml となるよう接種し、これに薬剤を最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるように加えて振盪培養した。*E. coli* NIHJ JC-2 および *Klebsiella pneumoniae* DT の薬剤無添加の対照培地における増殖は 1% の NaCl 添加によりほとんど影響を受けなかったが、*Serratia marcescens* IFO 12648 の増殖は 1% NaCl 添加培地でやや良好であった。一方薬剤の殺菌作用は何れの菌株でも NaCl により減弱した (Fig. 15)。

5. 耐性獲得および耐性菌の感化

i) 増量継代法：*E. coli* NIHJ JC-2 は継代初期に速やかな耐性上昇を示したが、その後の耐性上昇はゆるやかであった。また 6 継代後 MIC が $200 \mu\text{g/ml}$ になった耐性菌を薬剤を含まない培地で継代すると、段階的に MIC は低下した (Fig. 16)。

ii) Population 分析：TSB で 1 夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT, *Serratia marcescens* IFO 12648 および *Proteus vulgaris* IFO 3988 の同培地による 10 倍希釈系列の菌液をそれぞれ各濃度の Mecillinam を含む平板に塗抹して 37°C で培養し、生じたコロニー数を測定して生残曲線を求めた。なお平板上のコロニー数を肉眼的に正確に測定しうるまでに要する時間は被検菌により差があり、*E. coli* NIHJ JC-2 は 24 時間では検出できず、48~72 時間培養後にコロニー数測定が可能となった。その他の菌株では 24~48 時間培養後に

Fig. 16 Development and extinction of resistance to Mecillinam
E. coli NIHJ JC-2



測定できた。それぞれの菌株により異なったパターンの生残曲線が得られたが、*Serratia marcescens* IFO 12648 や *Proteus vulgaris* IFO 3988 では約 10^{-5} の割合で 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性の細胞が存在していた (Fig. 17)。次に *Serratia marcescens* IFO 12648 について 0.39, 6.25 および 400 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤を含む平板に生じたコロニーの population 分析を行なった。0.39 $\mu\text{g/ml}$ の平板より分離したコロニーの生残曲線は親株のそれとほぼ同様のパターンを示した。しかし 6.25 および 400 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤を含む平板より分離したコロニーの生残曲線は親株のそれとは異なり、特に 400 $\mu\text{g/ml}$ 含有平板より分離したコロニーでは何れも薬剤無添加培地および 400 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地における細胞数がほぼ同等であった (Fig. 18)。

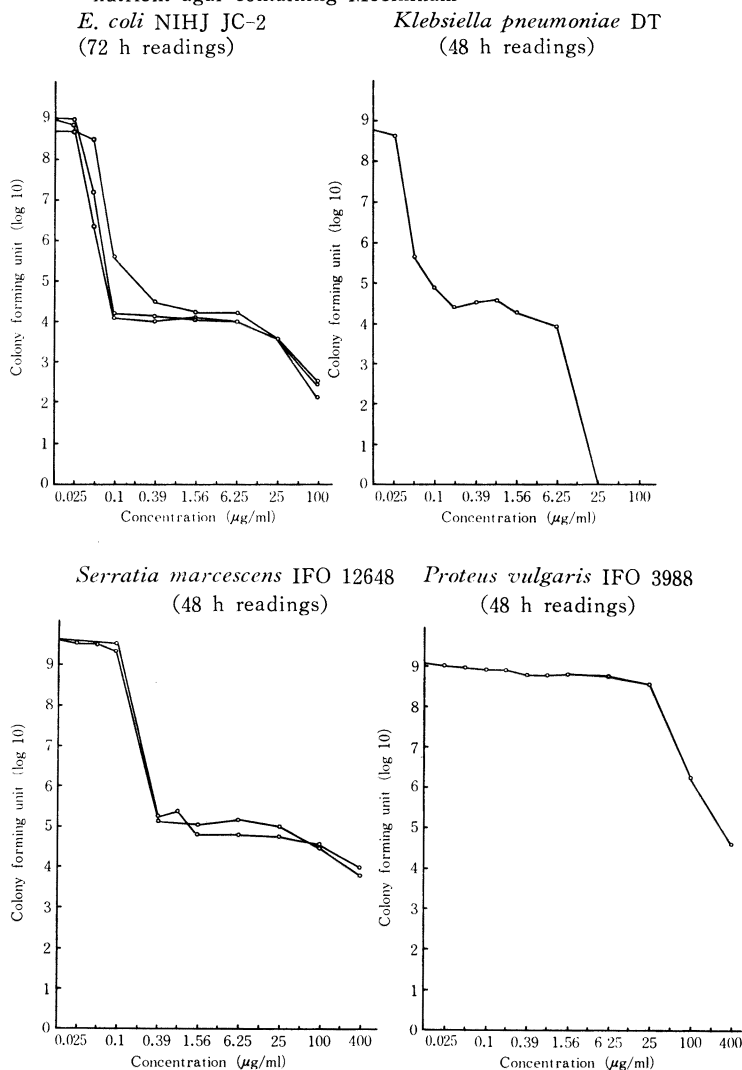
One step で Mecillinam に耐性となった菌の感性化について検討した。*E. coli* NIHJ JC-2 の Mecillinam 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 含有平板より分離した菌株では、継代とともに感性化の方向をたどり、8 代後にはほぼ親株の生残曲線に等しくなった。しかし 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤含有平板より分離した菌株では、100 $\mu\text{g/ml}$ 含有平板に生じるコロニー数は継代数に応じて減少したが、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度における生残曲線パターンにはほとんど変化が見られなかった (Fig. 19)。*Serratia marcescens* IFO 12648 の Mecillinam 400 $\mu\text{g/ml}$ 含有平板より分離した菌株では、5 継代後より感性化がおこり、8 継代後より親株

とほぼ同様の生残曲線パターンを示した (Fig. 20)。

iii) ディスク感受性試験：*E. coli* を被検菌として Mecillinam, FOM の各ディスクによる発育阻止円内のコロニーの有無から耐性細胞出現の有無を判定した。標準株 5 株の両薬剤により形成される阻止円は菌の増殖が肉眼的に認められない内側の阻止帯と、わずかに菌の増殖が見られる外側の阻止帯から成る二重円を示した。しかし Mecillinam ではいずれの菌株においても耐性細胞によると思われるコロニーは見出されなかった。一方 FOM では菌株により程度の差はあるが、いずれもコロニーの出現を認めた (Table 10)。さらに Mecillinam 感受性の臨床分離 *E. coli* (30 株) についても同様の検討を行った。両薬剤に対し幾つかの菌株の阻止円は一重であったが、その他の菌株における阻止帯は二重円であった。Mecillinam ではいずれの菌株においても発育阻止帯内にはコロニーの出現が見られなかったが、FOM では全菌株で阻止帯内にコロニーが認められた (Table 11)。

iv) Mecillinam 耐性菌の増殖速度：One step で分離した *E. coli* NIHJ JC-2 の Mecillinam 耐性株の増殖速度は薬剤無添加培地でも親株のそれよりもかなり遅く、耐性株分離に用いたのと同じおよびそれ以下の濃度の薬剤を添加した培地ではさらに増殖速度が低下した (Fig. 21)。*Klebsiella pneumoniae* DT の場合、薬剤無

Fig. 17 Survival curves for *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT, *Serratia marcescens* IFO 12648 and *Proteus vulgaris* IFO 3988 on nutrient agar containing Mecillinam



添加培地では親株と one step 耐性株との間にほとんど増殖速度の差がなかったが、耐性株の分離に用いたのと同じおよびそれ以下の濃度の薬剤を添加した培地では、耐性株は著しく増殖速度が低下した (Fig. 22)。 *Serratia marcescens* IFO 12648 より one step で分離した耐性株の薬剤無添加培地における増殖速度は 1 μg/ml 分離株よりも 10 μg/ml 分離株で遅かった。また耐性株の分離に用いたのと同じおよびそれ以下の濃度の薬剤を含む培地で増殖速度が低下する現象は *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* DT より分離した耐性株の場合と同様であった (Fig. 23)。

v) 薬剤投与マウスの糞便中乳糖発酵菌数ならびにこれらの菌の薬剤感受性の変化: Pivmecillinam あるいは ABPC をマウスに 3 日間経口投与し、投与前後の糞便中乳糖発酵菌数の変化を検討した。薬剤投与前には $10^4 \sim 10^6$ CFU/g feces であった菌数は Pivmecillinam を 0.1 あるいは 0.5 mg/mouse 投与してもほとんど変化しなかったが、2.5 mg/mouse 投与により明らかに減少した。また ABPC 0.5 あるいは 2.5 mg/mouse 投与では、菌数はほとんど変化しなかったが、12.5 mg/mouse 投与では 10^3 CFU/g feces 以下に減少した (Table 12)。

Pivmecillinam 0.5 および 1 mg/mouse, ABPC 2.5

Fig. 18 Survival curves for first-step resistant cells of *Serratia marcescens* IFO 12648 isolates from colonies of the stock culture growing on the plate containing 0.39, 6.25 and 400 $\mu\text{g/ml}$ of Mecillinam

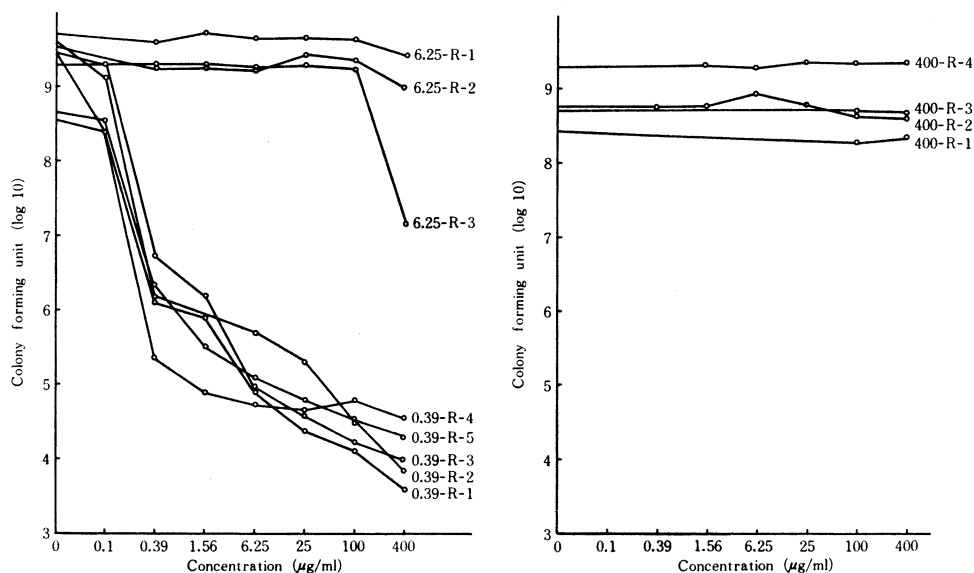
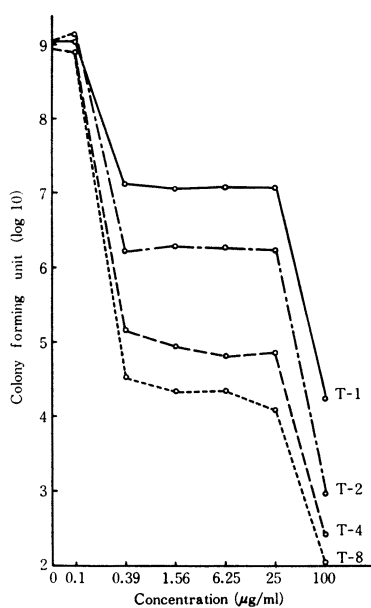


Fig. 19 Survival curves for Mecillinam-resistant cells of *E. coli* NIHJ JC-2 after transfers without Mecillinam

Culture originally isolated from
0.1 $\mu\text{g/ml}$ plates



Culture originally isolated from
1.56 $\mu\text{g/ml}$ plates

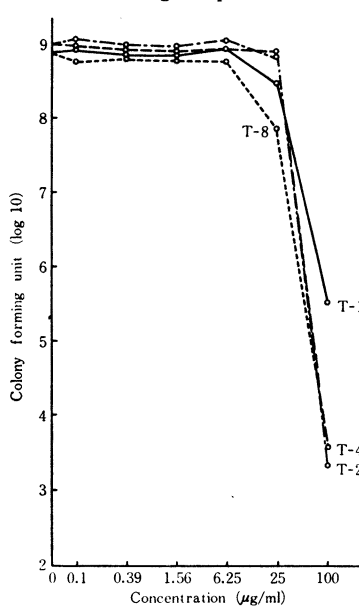
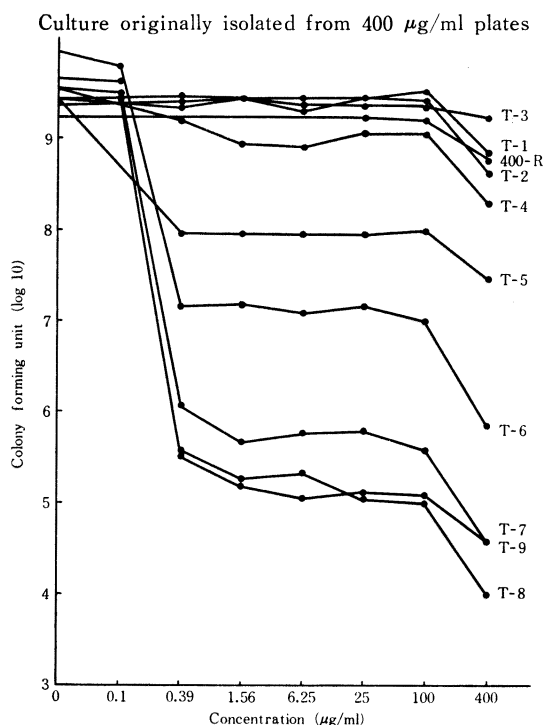


Fig. 20 Survival curves for Mecillinam-resistant cells of *Serratia marcescens* IFO 12648 after transfers without Mecillinam



および 5 mg/mouse を 2 匹のマウスに 7 日間連続投与して毎日、また投与終了 7 日後に薬剤無添加培地および Pivmecillinam の 0.2, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$, ABPC の 5, 25, 125 $\mu\text{g/ml}$ を含有した培地における乳糖発酵菌数を測定した。

薬剤投与を受けていない対照群のマウス糞便中乳糖発酵菌数は、実験期間中 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g feces の範囲にあった (Fig. 24)。

Pivmecillinam 0.5 mg/mouse 投与ではマウスの個体や糞便採取日により多少のばらつきはあったが、薬剤無添加培地における菌数に著変は認められなかった。しかし薬剤投与 3～4 日目より薬剤含有培地における分離菌数が増加し、7 日目には 2 例とも薬剤無添加および添加培地における分離菌数はほぼ同じであった。さらに薬剤投与終了 7 日後においても、薬剤無添加および添加培地における分離菌数はほぼ同じであった。Pivmecillinam 1 mg/mouse を 2 匹のマウスに投与すると、1 例では投与 2 日目から乳糖発酵菌を検出できなくなった。他の 1 例では 3 日後まで菌数の減少が見られたが、その後再び増加した。本例の薬剤含有培地に発育する菌数は一定せず、7 日後でも薬剤 1 および 5 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地における菌数は薬剤無添加培地におけるそれよりも著しく低かった。また薬剤投与終了 7 日後における薬剤無添加および添加培地での菌数は薬剤投与終了時とほぼ同程度であった (Fig. 25)。

ABPC 2.5 mg/mouse 投与により乳糖発酵菌数は翌日より顕著に増加し、薬剤投与期間中はほぼ不変であった。また投与 4 日目頃より 125 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性の菌が多くなる傾向が認められた。投与終了 7 日後では投与終了時に比べ分離される菌数が減少するとともに、125 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地に発育する菌は検出されなくなった。ABPC 5 mg/mouse 投与により菌数は一時的に増加するが、以後は減少した。投与終了 7 日後では、投与終了時に比べ菌数が著しく増加するとともに 125 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地での

Table 10 Comparison of the inhibition zone in the disk susceptibility test against *E. coli*

<i>E. coli</i>	Mecillinam		Fosfomycin	
	100 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
NIHJ JC-2	17* (25) **—***	20 (27) —	19 (22.5) †	28 (33) +
Umezawa	20.5 (26.5) —	23 (28.5) —	9 (18.5) —	20 (29) ††
K-12	19.5 (26) —	22.5 (29) —	18.5 (24) ††	28.5 (34) ††
O-78	19 (25) —	17 (28) —	18 (21) ††	26.5 (31.5) †
O-111	24 (28.5) —	28.5 (31.5) —	20 (22) +	28.5 (33) +

*: Inner inhibition zone diameter (mm)

**: Outer inhibition zone diameter (mm)

***: Colony formation in inhibition zone

Medium: Nutrient agar (Eiken)

Inoculum size: 10^6 CFU/ml

Disk: It was steeped into antibiotic solution at the indicated concentration.

Table 11 Comparison of the inhibition zone in the disk susceptibility test against clinically isolated strains of *E. coli*

<i>E. coli</i>	Mecillinam			Fosfomycin	
	MIC*	100 µg/ml	1000 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
E-2	0.1	16.5** (20)***-****	21 (26)-	17 (21)+†	27 (31)+††
-9	0.1	13 (20) -	18 (23.5)-	18.5(22.5)+†	27.5(30)+
-16	0.1	20.5 (23) -	23.5(27)-	16 (19)+†	26 +†
-19	0.1	19 (22) -	22.5(24.5)-	16.5(21)+†	25.5(30)+
-25	0.1	19 -	21.5 -	18.5(22)+	28.5(32.5)+†
-31	0.1	20.5 -	24 -	17 (20.5)+†	27 (31)+
-33	0.1	13 (20) -	18.5(22.5)-	14 (17.5)+	25.5(30.5)+
-37	0.1	18 -	19 -	16 (20)+†	25.5(29)+
-65	0.1	18.5 -	21.5 -	18 (22)+	29 (33)+
-68	0.1	19 (23) -	23 (26)-	18.5 +	28 (32.5)+
-73	0.1	20.5 -	21 -	17.5 +†	26 +
-74	0.1	20 -	23 -	20 (23.5)+	28 (32.5)+
-76	0.1	15 (19.5) -	17 (20)-	20 (22.5)+†	28.5(31)+††
-79	0.1	17 -	18.5 -	16 (21)+†	23.5(27.5)+
-81	0.1	13 (19) -	15.5(21)-	17 (21)+†	25.5(28.5)+
-83	0.1	17 (21) -	19.5(23.5)-	18 (2.15)+†	25.5(29)+
-30	0.2	20.5 -	22.5(25)-	16 +	27.5 +†
-36	0.2	18.5 (21.5) -	21.5(23.5)-	17.5(21)+†	26 (29.5)+
-44	0.2	11.5 (21.5) -	14 (22.5)-	17.5(21)+†	27 (31)+
-58	0.2	17.5 (20.5) -	19 (21.5)-	15.5(19)+†	25.5(30)+
-59	0.2	16.5 (20) -	20.5(23)-	19 (23)+†	27.5(32)+
-61	0.2	22 -	24 (27)-	21.5 +†	30.5 +
-62	0.2	17.5 (21.5) -	21 (25)-	21 +†	30 (33.5)+
-63	0.2	18 (21.5) -	19 (24.5)-	20.5(23.5)+†	28.5(32)+††
-64	0.2	21 -	23.5 -	13 +	21.5 +
-66	0.2	19 -	23.5 -	18 (22)+†	26 (30.5)+
-70	0.2	20.5 (24.5) -	22.5(26)-	20.5 +†	29.5(31.5)+
-85	0.2	14 (19) -	17.5(21)-	18 (22)+	26 (30)+
-89	0.2	15.5 (20.5) -	17 (22)-	19 (22)+	27 (31)+
-94	0.2	10 (16.5) -	17 -	16.5(21.5)+†	24.5(29.5)+†

* : 10⁶ CFU/ml

** : Inner inhibition zone diameter (mm)

*** : Outer inhibition zone diameter (mm)

**** : Colony formation in inhibition zone

Medium : Nutrient agar (Eiken)

Inoculum size : 10⁶ CFU/ml

Disk : It was steeped into antibiotic solution at the indicated concentration.

Fig. 21 Growth rate of *E. coli* NIHJ JC-2 and its Mecillinam-resistant mutant with and without Mecillinam

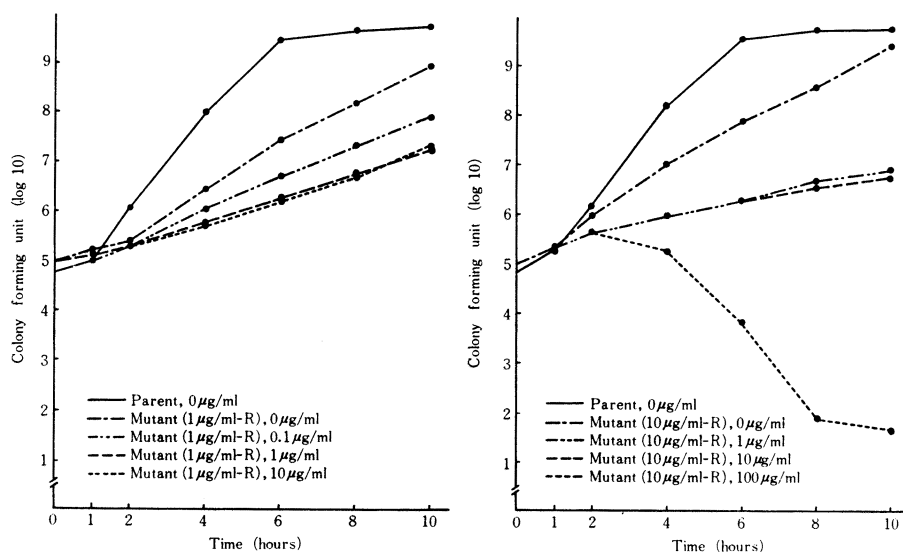


Fig. 22 Growth rate of *Klebsiella pneumoniae* DT and its Mecillinam-resistant mutant in nutrient broth with and without Mecillinam

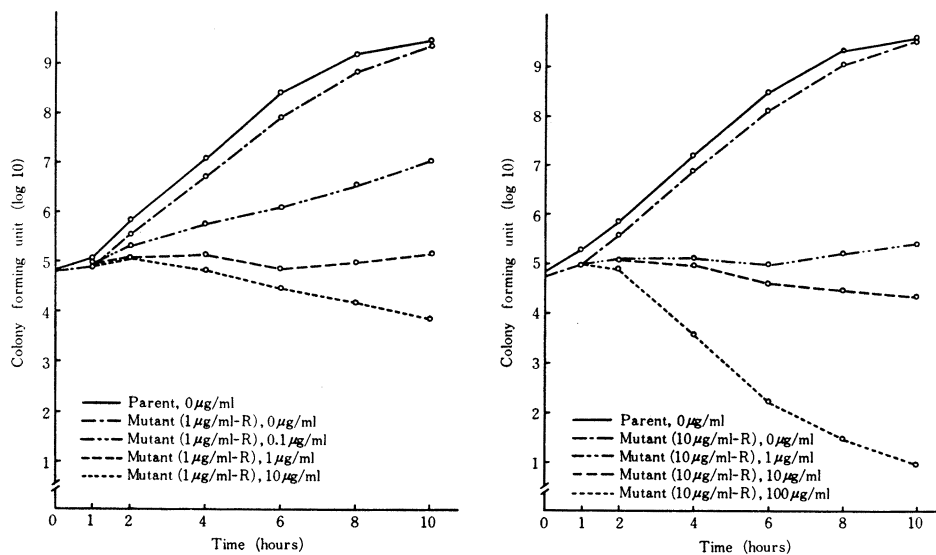


Fig. 23 Growth rate of *Serratia marcescens* IFO 12648 and its Mecillinam-resistant mutant in nutrient broth with and without Mecillinam

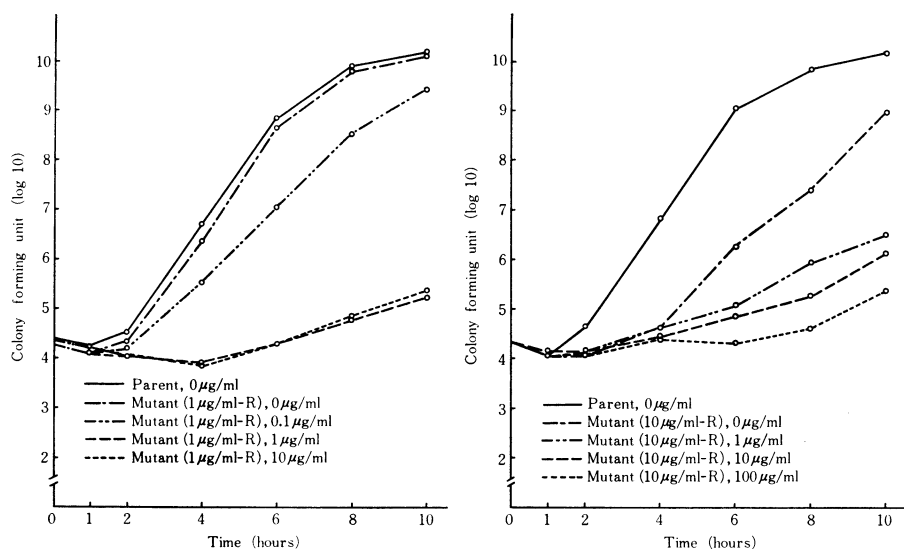


Table 12 Effect of Pivmecillinam and Ampicillin on the number of lactose-ferment bacteria in feces of mice

Antibiotic	Dose (mg/mouse)	Number of bacteria in feces (cfu/g)	
		Pre-treatment	Post-treatment
Pivmecillinam	0.1	8.7×10^4	1.6×10^4
	0.1	1.8×10^6	2.7×10^4
	0.5	2.4×10^5	2.9×10^5
	0.5	7.1×10^5	9.6×10^5
	2.5	2.8×10^4	$<10^3$
	2.5	3.3×10^6	2.0×10^3
ABPC	0.5	4.0×10^5	2.9×10^5
	0.5	3.0×10^6	3.3×10^6
	2.5	1.0×10^6	3.8×10^5
	2.5	2.0×10^6	3.2×10^6
	12.5	2.5×10^5	$<10^3$
	12.5	2.7×10^5	$<10^3$

Antibiotic was administered orally once a day for 3 days.

分離菌数も著しく増加した (Fig. 26)。

総括および考案

Mecillinam はグラム陽性菌よりも *Pseudomonas aeruginosa* を除くグラム陰性菌により強い抗菌力を示し、既知ペニシリンとは異なる抗菌スペクトラムを示し

た。また ABPC 耐性の臨床分離 *E. coli* や *Klebsiella pneumoniae* に対しても CEX より優れた抗菌力を示した。しかし本剤の抗菌力は各種の因子により変化した。その1つに培地種がある。抗菌力が強く発揮される培地ほど Na 含量が少ないことから Mecillinam の抗菌力は NaCl 含量により変化することが推測された。このことは各種塩類を種々な濃度に添加した完全合成培地による抗菌力試験でさらに確認された。GREENWOOD & O'GRADY⁴⁾ は NaCl 添加により浸透圧を変化させた培地における Mecillinam の抗菌力を検討し、浸透圧が低い培地で菌の増殖阻害が強くおこること、また浸透圧が高い培地で薬剤処理菌の再増殖が早くおきるなどのことを見出し、これは薬剤作用を受ける細胞集団には菌体内浸透圧の異なる細胞が存在し、浸透圧の低い細胞は溶菌しにくいと考察している。一方 TYBRING & MELCHIOR は¹⁰⁾ 基礎培地に種々の電解質あるいは非電解質を添加して培地の比電導度や浸透圧を変えて Mecillinam の溶菌作用を検討し、比電導度が高くなると溶菌作用が妨げられるが浸透圧そのものは溶菌作用に直接的には関与せず、本剤の作用機序が他のペニシリンとは異なることを強調した。

また本剤の抗菌力は接種菌量により影響を受けるが、その程度は被検菌により様ではない。実験室保存 *E. coli* では、接種菌量による感受性の変化はさほど明瞭でない。一方、臨床分離 ABPC 耐性 *E. coli* では、 β -lactamase 活性と菌量の影響を受ける程度とがほぼ平

Fig. 24 Number of lactose-ferment bacteria in feces of mice

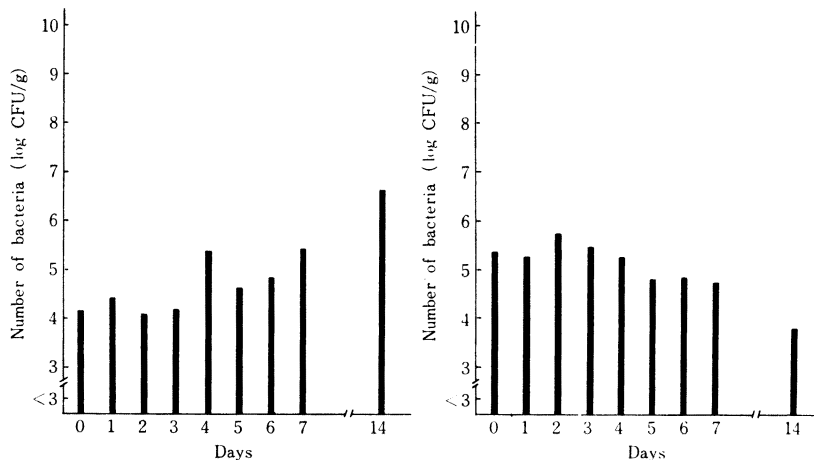
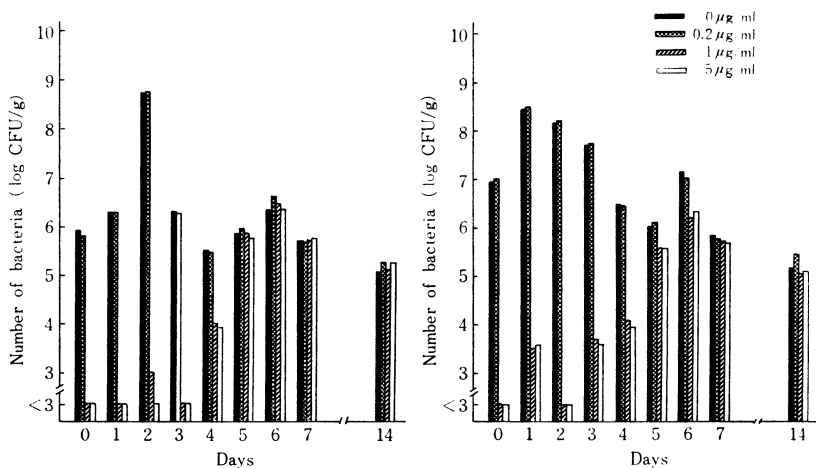


Fig. 25 Effect of Pivmecillinam on number of lactose-ferment bacteria in feces of mice

Pivmecillinam 0.5 mg/mouse



Pivmecillinam 1 mg/mouse

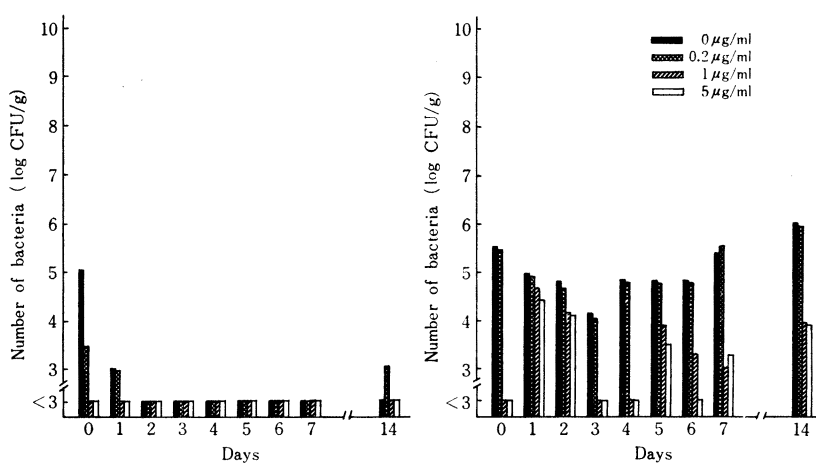
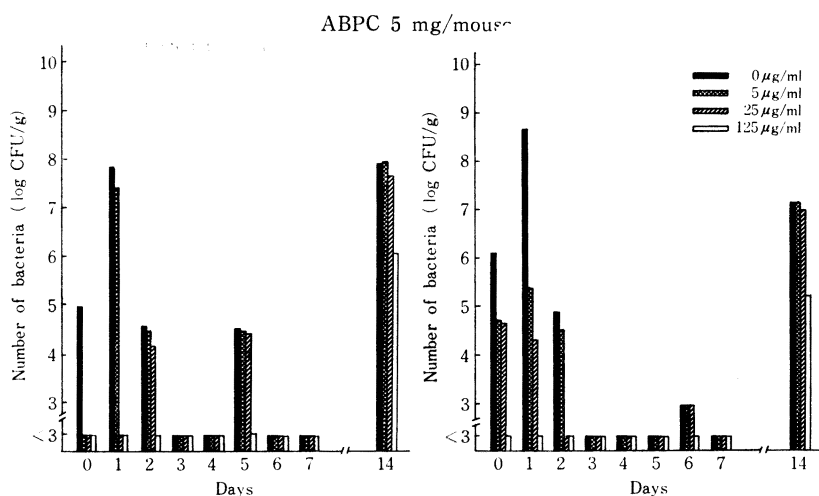
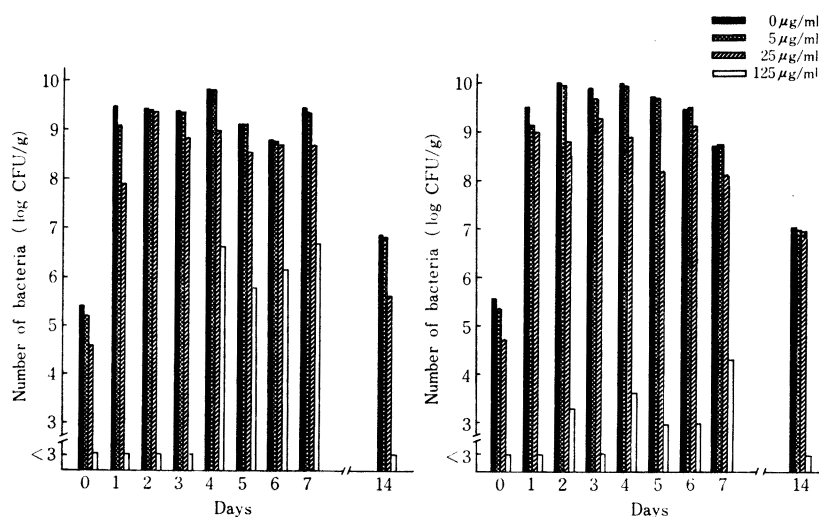


Fig. 26 Effect of Ampicillin on number of lactose-ferment bacteria in feces of mice
ABPC 2.5 mg/mouse



行することが認められている¹³⁾。*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp. などで接種菌量による抗菌力の変化が顕著であったが、その要因は菌種により多少異なった。*Serratia marcescens* や *Proteus vulgaris* では薬剤含有培地で薬剤耐性細胞いわゆる one step mutant が24時間培養で容易に得られることと、これらの菌に対する Mecillinam の殺菌・溶菌作用が弱いことなどが接種菌量による抗菌力の変化の要因として考えられる。*Klebsiella pneumoniae* では薬剤添加後殺菌作用発現までに約1.5時間を要し、かつ接種菌量が多くなると殺菌作用が減弱するなどの現象が認められた。Sulfa 剤も接種菌量により *in vitro* 抗菌力が著しく変化するが、その要因としては薬剤添加後作用発現まで

に数世代の分裂が行なわれるためであるとされている^{13)~15)}。

Mecillinamの殺菌作用は接種菌量やその他幾つかの培養条件の違いにより影響されたが、その程度は被検菌により異なっていた。*E. coli* や *Klebsiella pneumoniae* では接種菌量が多くなると殺菌作用が損なわれる傾向があったが、菌がゆっくりと増殖している時よりも活発に増殖している時に殺菌作用が強く発揮され、必ずしも菌量そのものが本剤の殺菌力を規制しているのではないように考えられる。JAMES¹¹⁾らが示しているように、本剤が菌の cell division cycle のある限られた時期の反応を特異的に阻害するものとすれば、接種菌量が多い場合には少ない分裂回数で静止期 (Stationary phase) に達す

るため、薬剤の作用を十分に受けない細胞が多く存在することが推察される。

ペニシリンの *in vitro* 耐性獲得は段階的に進行するのが一般的であるが、本剤では one step mutation によると思われる継代初期の急激な耐性上昇が見られた。しかし one step 耐性株は親株と比較して増殖速度が低下しており、さらにこれらの菌株に耐性値以下の濃度で薬剤を作用させても一層増殖が遅くなることが認められた。なお本剤以外にも幾つかの抗生物質で one step mutant が出現することが報告されている^{17)~20)}。一方マウスの糞便中乳糖発酵菌の Pivmecillinam に対する耐性獲得が ABPC と比較して特に早いという傾向はなかった。また薬剤を十分量投与した場合、耐性菌の出現は顕著には認められなかった。従って *in vitro* 耐性獲得の容易さが *in vivo* 耐性獲得の難易にただちに反映されるとは限らず、*in vivo* での耐性獲得についてはさらに臨床的に検討されるべきであろう。

ま と め

1. Mecillinam の *in vitro* 抗菌力を Pivmecillinam, ABPC および AMPC と比較検討した。Mecillinam はグラム陽性菌に対しては ABPC や AMPC に劣るが、*Pseudomonas aeruginosa* を除くグラム陰性菌の多くに対しては優れた抗菌力を示した。Pivmecillinam の抗菌力は Mecillinam より劣るが、両者の抗菌スペクトラムは同様であった。

2. Mecillinam は臨床分離の *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp. に抗菌力を示し、何れの菌種でも接種菌量を少なくすると感受性を示す菌株が多くなる傾向があり、特に *Proteus* spp. で著しかった。また本剤は ABPC 耐性 *E. coli* や *Klebsiella pneumoniae* に対しても抗菌力を示した。

3. Mecillinam の抗菌作用は培地種により変化した。これは主として培地中の NaCl 含量によるものであった。また接種菌量により抗菌力が著しく変化する菌種・菌株があるが、その要因には耐性変異率、薬剤添加から殺菌作用発現までの時間、あるいは β -lactamase 産生能などが複雑に関与し、かつ各要因の関与の程度は被検菌により異なった。

4. Mecillinam は *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* には明らかな殺菌作用を示したが、*Serratia marcescens* に対する殺菌作用は弱く、*Proteus vulgaris* や *Proteus mirabilis* に対しては静菌作用を示した。また本剤の殺菌作用は接種菌量、薬剤添加時期、菌の培養条件、NaCl の添加などにより変化した。

5. *In vitro* で Mecillinam の作用を一度あるいは連続的に受けた菌は、本剤に対して耐性を獲得した。また得られた耐性菌を薬剤を含まない培地で継代すると感敏化した。その様式は被検菌により異なった。本剤に耐性となった菌の増殖速度は親株のそれよりも遅く、さらに耐性菌の増殖速度は耐性値あるいはそれ以下の濃度の薬剤を含む培地では一層低下した。一方 Pivmecillinam あるいは ABPC を経口投与したマウスの糞便中乳糖発酵菌の耐性獲得は両薬剤間に大差を認めなかった。

本実験は昭和48年11月より51年1月までに行なわれた。

文 献

- 1) LUND, F. & L. TYBRING : 6 β -Amidinopenicillanic acids — a new group of antibiotics. *Nature* (London) **New Biol.** 236 : 135 ~ 137, 1972
- 2) MELCHIOR, N. H. ; J. BLOM, L. TYBRING & A. BIRCH-ANDERSEN : Light and electron microscopy of the early response of *Escherichia coli* to a 6 β -amidinopenicillanic acid (FL 1060). *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B.* 81 : 393~406, 1973
- 3) PARK, J. T. & L. BURMAN : FL 1060 : A new penicillin with a unique mode of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 (4) : 863~868, 1973
- 4) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY : FL 1060 : A new beta-lactam antibiotic with novel properties. *J. Clin. Path.* 26 : 1~6, 1973
- 5) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY : The two sites of penicillin action in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 128 (6) : 791~794, 1973
- 6) MATSUHASHI, S. ; T. KAMIRYO, P. M. BLUMBERG, P. LINNETT, E. WILLOUGHBY & J. L. STROMINGER : Mechanism of action and development of resistance of a new amidino penicillin. *J. Bact.* 117 : 578~587, 1974
- 7) GOODELL, E. W. & U. SCHWARZ : Sphere-rod morphogenesis of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 86 : 201~209, 1975
- 8) 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 (8) : 2999~3003, 1975
- 9) JAMES, R. : Identification of an outer membrane protein of *Escherichia coli*, with a role in the coordination of deoxyribonucleic acid replication and cell elongation. *J. Bacteriol.* 124 (2) : 918~929, 1975
- 10) TYBRING, L. & N. H. MELCHIOR : Mecillinam

- (FL 1060), A 6 β -amidinopenicillanic acid derivative : bactericidal action and synergy *in vitro*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8 (3) : 271~276, 1975
- 11) JAMES, R. ; J. Y. HAGA & A. B. PARDEE : Inhibition of an early event in the cell division cycle of *Escherichia coli* by FL 1060, an amidinopenicillanic acid. J. Bact. 122 (3) : 1283~1292, 1975
- 12) ROHOLT, K. ; B. NIELSEN & E. KRISTENSEN : Pharmacokinetic studies with Mecillinam and Pivmecillinam. Chemotherapy (Basel) 21 : 146~166, 1975
- 13) 小此木研二, 木田 誠, 土屋 航司, 米田 雅彦 : Mecillinam の大腸菌に対する抗菌力および β -lactamase に対する態度。Chemotherapy 25 : 94~99, 1977
- 14) KOHN, H. I. & J. S. HARRIS : Mode of action of the sulfonamides. I. Action on *Escherichia coli*. J. Pharmacol. 73 : 343~361, 1941
- 15) GARRETT, E. R. & O. K. WRIGHT : Kinetics and mechanisms of action of drugs on microorganisms. VII. Quantitative adherence of sulfonamide action on microbial growth to a receptor-site model. J. Pharm. Sci. 56 : 1576~1585, 1967
- 16) WOODS, D. D. : The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs. J. Gen. Microbiol. 29 : 687~702, 1962
- 17) BRYSON, V. & M. DEMEREC : Patterns of resistance to antimicrobial agents. Ann. New York Acad. Sci. 53 : 283~289, 1950
- 18) KNÜSEL, F. : Microbiological characteristics of rimactane : P 9 ~ 14, Symp. Rimactane. CIBA Ltd., Basel, 1968
- 19) AUSTIN, S. & J. SCAIFE : A new method for selecting RNA polymerase mutants. J. Mol. Biol. 49 : 263~267, 1970
- 20) HENDLIN, D. ; B. M. FROST, E. THIELE, H. KROPP, M. E. VALIANT, B. PELAK, B. WEISSBERGER, C. CORNIN & A. K. MILLER : Phosphonomycin III. Evaluation *in vitro*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 297~302, 1969

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MECILLINAM AND PIVMECILLINAM

MASAFUMI NAKAO, TOSHIYUKI YAMAZAKI and KANJI TSUCHIYA

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

The *in vitro* antibacterial activity of mecillinam and pivmecillinam was investigated and the following results were obtained.

1. Antibacterial activity of mecillinam against gram-positive bacteria was inferior to that of ampicillin (ABPC) and amoxicillin (AMPC), while it was superior to that of ABPC and AMPC against a wide range of gram-negative bacteria except *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Mecillinam was active against clinical isolates of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Proteus* spp.

It was demonstrated that the number of sensitive strains increased at small inoculum size and this was remarkable in *Proteus* spp. Mecillinam was also active against ampicillin-resistant strains of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

3. The kind of medium influenced the antibacterial activity of mecillinam and it was mainly due to the concentration of NaCl in the medium. Furthermore, the antibacterial activity of mecillinam against several bacterial species and strains was influenced by inoculum size.

As the cause of this phenomenon, mutation rate, time which requires to exhibit the bactericidal activity after the addition of the drug, or productivity of β -lactamase of the organism are complexly concerned. The degree of concern of these causes differs from one test organism to another.

4. Mecillinam acted bactericidally against *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*, but not so distinctly against *Serratia marcescens* and its action against *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* was bacteriostatic.

The bactericidal activity of mecillinam was influenced by inoculum size, time of drug addition, culture condition of the organism and addition of NaCl.

5. The organism, which had been exposed to mecillinam once or continuously *in vitro*, gained resistance to the antibiotic.

The resulting resistant strains became sensitive after transfers in the medium free from the antibiotic, and its process differed among the test organisms. The strains which became resistant to mecillinam grew more slowly than the parent strains and the growth speed of them still fell in the medium containing the antibiotic. The lactose-ferment bacteria in the feces of mice, which had been administered pivmecillinam or ampicillin orally, gained resistance to each antibiotic in a similar way.