

Pivmecillinam の *in vivo* 抗菌作用について

山崎俊幸・林 良吾・土屋皖司

武田薬品工業株式会社中央研究所

緒 言

Pivmecillinam は6位側鎖に amidino 結合を、3位 carboxyl 基に pivaloyloxymethyl が ester 結合した経口用合成 penicillin である。経口投与された Pivmecillinam は生体内で非特異的な esterase の作用によりすみやかに加水分解されて Mecillinam となり抗菌活性を示す¹⁾。Mecillinam は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. などに Ampicillin よりすぐれた抗菌力を示し²⁾³⁾⁴⁾、その作用機作は従来の β -lactam 系抗生物質と異なることが示されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。そこで実験のマウス腹腔内感染症における Pivmecillinam の予防効果を Ampicillin および Cephalexin のそれと比較検討した。

実験材料および実験方法

1) 薬剤: Pivmecillinam, Cephalexin (CEX) は武田薬品工業株式会社で合成したものを、また Ampicillin (ABPC) は市販のソルシリン「タケダ」を用いた。

2) マウス: SLC-ICR, 4週令, 雄, 体重20~24g のものを1群5匹として用いた。

3) 感染菌および感染方法: 下記の菌株を用いた。

Staphylococcus aureus 308A-1 (保存株)

Escherichia coli O-111 (保存株)

Escherichia coli No. 2 (臨床分離株)

Escherichia coli No. 23 (臨床分離株, ABPC 高度耐性)

Klebsiella pneumoniae DT (保存株)

Klebsiella pneumoniae No. 8 (臨床分離株, ABPC 高度耐性)

Proteus vulgaris IFO 3988 (保存株)

Proteus vulgaris No. 2 (臨床分離株, ABPC 高度耐性)

Proteus mirabilis IFO 3849 (保存株)

Proteus mirabilis No. 31 (臨床分離株)

Proteus mirabilis No. 61 (臨床分離株, ABPC 高度耐性)

いずれの菌株も Brain Heart Infusion (BHI) (Difco) の1夜培養菌を5% mucin 懸濁液とし、その0.5ml をマウス腹腔内へ注射した。

4) 薬剤投与方法: 薬剤は蒸留水で溶解希釈し、所要濃度の薬液0.2ml を感染直後1回ゾンデを用いて胃内に投与した。予防効果の判定は動物の生死を1週間観察した後 REED & MUENCH の方法⁸⁾により ED₅₀ (mg/kg) を算定した。

実験成績

I. グラム陽性および陰性菌感染マウスにおける予防効果

1) *Staph. aureus* 308A-1 感染マウスにおける Pivmecillinam および ABPC の ED₅₀ 値を Table 1 に示した。Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は534.4 mg/kg,

Table 1 Protective effect of Pivmecillinam and Ampicillin against *Staphylococcus aureus* 308A-1 infection in mice

Antibiotic		Pivmecillinam	ABPC
MIC in μ g/ml	10 ⁸ §	25*	0.1
	10 ⁶	25*	0.05
ED ₅₀ in mg/kg		328	1.01
		562	0.78
		571	0.69
		—	0.62
		—	0.87
		714	1.30
		497	1.40
Mean		534.4	0.95

Note: Mice were infected intraperitoneally with 10⁸ colony forming units (CFU) of the test organism in 5% mucin. Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

§ Inoculum size

* Minimum inhibitory concentration of Mecillinam

Table 2 Protective effect of Pivmecillinam, Ampicillin and Cephalaxin against *Escherichia coli* infection in mice

Challenge strain		O-111		No. 2		No. 23		
Challenged dose (CFU/mouse)		10 ⁴		10 ²		10 ⁴		
Antibiotic		Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	CEX
MIC in $\mu\text{g/ml}$	10 ⁸ §	0.1*	1.56	0.2*	50	>100*	>100	25
	10 ⁶	0.05*	0.78	0.1*	3.12	3.12*	>100	12.5
ED ₅₀ in mg/kg		0.14	7.02	2.19	112	9.93	>800	11.4
		—	4.96	2.78	130	8.86	>800	8.86
		0.12	6.25	2.20	124	8.80	>800	7.76
		0.10	4.46	2.36	70.9	9.61	>800	14.9
		0.24	5.58	2.23	130	8.86	>800	8.11
		0.13	5.34	—	—	—	—	—
		0.12	4.53	—	—	—	—	—
		0.14	6.25	—	—	—	—	—
Mean		0.15	5.55	2.35	113.4	9.21	>800	10.21

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organisms in 5% mucin.

Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

§ Inoculum size

* Minimum inhibitory concentration of Mecillinam

ABPC のそれは0.95 mg/kg であり, *Staph. aureus* 感染マウスにおける Pivmecillinam の予防効果は ABPC のそれよりかなり劣った。

2) *E. coli* 感染マウスにおける Pivmecillinam, ABPC および CEX の ED₅₀ 値を Table 2 に示した。ABPC に高い感受性 (MIC=0.78 $\mu\text{g/ml}$) を示す *E. coli* O-111感染マウスにおける Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は0.15 mg/kg, ABPC のそれは5.55 mg/kg であり, Pivmecillinam は ABPC の約37倍の効果を示した。また ABPC に標準的な感受性 (MIC=3.12 $\mu\text{g/ml}$) を示す臨床分離株の *E. coli* No. 2感染マウスにおける Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は2.35 mg/kg, ABPC のそれは113.4 mg/kg であり, Pivmecillinam は ABPC の約48倍の効果を示した。ABPC 耐性 (MIC=>100 $\mu\text{g/ml}$) の No. 23感染マウスにおいて ABPC は800 mg/kg を投与しても予防効果を示さなかったが, Pivmecillinam は9.21 mg/kg, CEX は10.21 mg/kg の ED₅₀ を示し, Pivmecillinam は ABPC 耐性菌感染マウスにおいて CEX と同程度の効果を示した。

3) *Klebsiella pneumoniae* 感染マウスにおける Pivmecillinam の予防効果は Table 3 に示すごとく DT 感染マウスにおける ED₅₀ の平均値は0.45 mg/kg, ABPC のそれは2.61 mg/kg であり, Pivmecillinam

は ABPC の約5倍の効果を示した。ABPC 耐性 (MIC =>100 $\mu\text{g/ml}$) の No. 8 感染マウスにおける Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は2.67 mg/kg, ABPC のそれは382.8 mg/kg, また CEX のそれは6.04 mg/kg であり, Pivmecillinam の効果は CEX の効果よりまさった。

4) *Proteus vulgaris* IFO 3988 感染マウスにおける Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は2.17 mg/kg, ABPC のそれは3.38 mg/kg であり, Pivmecillinam は ABPC よりわずかにすぐれた予防効果を示した。また ABPC および CEX に耐性 (MIC=>100 $\mu\text{g/ml}$) の臨床分離株の No. 2 感染マウスにおいて ABPC および CEX は800mg/kg でも予防効果を示さなかったが, Pivmecillinam の ED₅₀ の平均値は37.3 mg/kg であり, ABPC および CEX の無効な菌株で感染したマウスにおいても Pivmecillinam は効果を示した (Table 4)。

5) *Proteus mirabilis* 感染マウスにおける Pivmecillinam および ABPC の予防効果を Table 5 に示した。Pivmecillinam に高い MIC 値 (100 $\mu\text{g/ml}$) を示す IFO 3849 感染マウスにおいて Pivmecillinam は予防効果を示さなかった。しかし MIC 値の低い臨床分離株の No. 31 (MIC=1.56 $\mu\text{g/ml}$) および No. 61 (MIC=0.78 $\mu\text{g/ml}$) 感染マウスにおける Pivmecillinam の

Table 3 Protective effect of Pivmecillinam, Ampicillin and Cephalexin against *Klebsiella pneumoniae* infection in mice

Challenge strain		DT		No. 8		
Challenge dose (CFU/mouse)		10 ⁸		10 ²		
Antibiotic		Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	CEX
MIC in $\mu\text{g/ml}$	10 ⁸ §	12.5*	0.78	>100*	>100	12.5
	10 ⁶	0.1*	0.39	0.2*	>100	6.25
ED ₅₀ in mg/kg		0.50	2.20	2.21	465	7.02
		0.50	—	1.75	308	8.12
		0.30	2.21	2.19	282	4.40
		0.46	3.51	3.12	—	6.25
		0.50	2.50	4.06	476	4.43
Mean		0.45	2.61	2.67	382.8	6.04

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organisms in 5% mucin.

Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

§ Inoculum size

* Minimum inhibitory concentration of Mecillinam

Table 4 Protective effect of Pivmecillinam, Ampicillin and Cephalexin against *Proteus vulgaris* infection in mice

Challenge strain		IFO 3988		No. 2		
Challenge dose (CFU/mouse)		10 ⁵		10 ⁴		
Antibiotic		Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	CEX
MIC in $\mu\text{g/ml}$	10 ⁸ §	>100*	6.25	>100*	>100	>100
	10 ⁶	100*	1.56	12.5*	>100	>100
	10 ⁴	0.39*	0.78	1.56*	>100	>100
ED ₅₀ in mg/kg		—	2.23	32.3	>800	>400
		2.86	5.58	50.0	>800	>400
		3.12	4.43	25.0	>800	>400
		1.39	2.19	42.0	>800	>400
		2.15	3.12	—	—	—
	1.35	2.78	—	—	—	
Mean		2.17	3.38	37.3	>800	>400

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organisms in 5% mucin.

Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

§ Inoculum size

* Minimum inhibitory concentration of Mecillinam

ED₅₀ の平均値はそれぞれ12.4 mg/kg および6.82 mg/kg であり、No. 61株のごとく ABPC に高度耐性株感

染マウスにおいても予防効果を示した。

Table 5 Protective effect of Pivmecillinam and Ampicillin against *Proteus mirabilis* infection in mice

Challenge strain		IFO 3849		No. 31		No. 61	
Challenge dose (CFU/mouse)		10 ²		10 ³		10 ²	
Antibiotic		Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC
MIC in $\mu\text{g/ml}$	10 ⁸ §	>100*	6.25	>100*	100	>100*	>100
	10 ⁶	100*	6.25	1.56*	1.56	0.78*	>100
ED ₅₀ in mg/kg		>800	29.8	13.6	7.76	5.25	>800
		>800	22.3	9.47	9.61	5.58	>800
		>800	17.5	12.5	8.80	6.25	>800
		>800	29.1	8.80	8.11	8.11	>800
		>800	16.2	17.6	8.11	8.93	>800
		>800	19.2	—	—	—	—
Mean		>800	22.4	12.4	8.48	6.82	>800

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organisms in 5% mucin.

Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

§ Inoculum size

* Minimum inhibitory concentration of Mecillinam

Table 6 Influence of challenge dose on the protective effect of Pivmecillinam and Ampicillin against *Escherichia coli* O-111 infection in mice

Challenge dose (CFU/mouse)	10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶		10 ⁷	
	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC
ED ₅₀ in mg/kg	0.08	2.79	0.20	8.12	0.62	19.2	>800	112
	0.13	4.06	0.33	7.76	0.87	17.6	>800	320
	0.06	2.31	0.22	5.58	0.55	9.47	>800	112
	0.10	—	0.22	9.06	0.78	—	>800	167
	0.14	4.06	0.35	9.61	1.33	19.2	>800	284
Mean	0.10	3.31	0.26	8.02	0.83	16.4	>800	199.0

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organism in 5% mucin.

Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

II. Pivmecillinam の予防効果 (ED₅₀) におよぼす感染菌量の影響

ABPC 感性および耐性 *E. coli* および *Klebsiella pneumoniae* を感染菌とし、前者では ABPC を後者では CEX を対照薬剤として感染菌量を変えて Pivmecillinam の予防効果 (ED₅₀) を比較検討した。いずれの感染マウスにおいても感染菌量の増加に伴って ED₅₀ 値の上昇がみられた。感染菌量が 10²~10⁶ CFU/mouse の間では Pivmecillinam の ED₅₀ 値の上昇率はそれぞれ対照に用いた ABPC および CEX のそれと著明な

差を認めなかった (Table 6, 7, 8, 9)。しかし Table 6 に示すような *E. coli* O-111 感染マウスでは感染菌量を 10⁷ CFU/mouse にした場合の ED₅₀ 値は 10⁶ CFU/mouse の場合の ED₅₀ 値の Pivmecillinam では約 1,000 倍, ABPC では約 12 倍にそれぞれ上昇した。

Table 7 Influence of challenge dose on the protective effect of Pivmecillinam and Cephalexin against clinically isolated Ampicillin-resistant *Escherichia coli* No. 23 infection in mice

Challenge dose (CFU/mouse)	10 ³		10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶	
	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX
ED ₅₀ in mg/kg	7.71	6.25	9.61	9.61	17.7	10.0	56.2	32.5
	4.46	—	11.2	12.5	19.2	16.2	50.0	35.5
	5.00	9.61	10.5	9.61	10.5	19.2	38.5	38.5
	5.43	6.25	11.2	10.5	12.5	17.6	62.1	35.4
	7.44	11.2	14.0	16.2	—	20.0	45.9	42.0
Mean	6.01	8.33	11.3	11.7	15.0	16.6	50.5	36.8

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organism in 5% mucin. Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

Table 8 Influence of challenge dose on the protective effect of Pivmecillinam and Ampicillin against *Klebsiella pneumoniae* DT infection in mice

Challenge dose (CFU/mouse)	10 ³		10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶	
	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC	Pivmecillinam	ABPC
ED ₅₀ in mg/kg	0.24	3.13	0.60	7.02	2.03	16.2	2.03	19.2
	0.20	3.13	0.55	6.25	1.07	12.5	1.76	16.2
	0.15	4.06	0.44	4.40	1.31	14.5	2.22	32.5
	—	—	0.45	4.37	—	8.8	1.76	21.0
Mean	0.19	3.44	0.51	5.51	1.47	13.0	1.94	22.2

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organism in 5% mucin. Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

Table 9 Influence of challenge dose on the protective effect of Pivmecillinam and Cephalexin against clinically isolated Ampicillin-resistant *Klebsiella pneumoniae* No. 8 infection in mice

Challenge dose (CFU/mouse)	10 ²		10 ³		10 ⁴		10 ⁵	
	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX	Pivmecillinam	CEX
ED ₅₀ in mg/kg	—	—	2.02	4.40	3.86	11.2	7.27	16.2
	—	—	2.31	—	3.51	—	3.51	11.2
	1.56	1.56	2.40	8.11	4.34	9.61	7.02	16.2
	1.10	2.26	2.21	6.25	3.88	9.61	7.02	12.5
	1.86	4.53	4.06	12.5	7.02	16.2	9.47	19.2
Mean	1.51	2.78	2.60	7.82	4.52	11.7	6.86	15.1

Note: Mice were infected intraperitoneally with the test organism in 5% mucin. Antibiotics were administered as single oral dose immediately after challenge.

考 察

実験的マウス腹腔内感染症における Pivmecillinam の予防効果は *Staph. aureus* 308A-1 感染マウスにおい

ては ABPC に劣ったが, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* 感染マウスにおいては ABPC の 5~50 倍強く, また *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* 感染マウスでも優れた効果を示し, これら菌株に対する ED₅₀ 値は少量菌

接種の場合の MIC 値と相関が認められた。Pivmecillinam は ABPC 耐性臨床分離株感染マウスにおいても予防効果を示し、ABPC 耐性 *E. coli* No. 2 や *Klebsiella pneumoniae* No. 8 感染において Pivmecillinam の効果は CEX に優り、また *Proteus vulgaris* No. 2 株のごとく CEX 耐性株感染マウスにおいても効果を示した。

抗菌剤の *in vitro* 抗菌力 (MIC 値) は接種菌量により変化する場合が多く、Mecillinam の *in vitro* 抗菌力も接種菌量を増すことにより MIC 値の著明な上昇を示す株を認めた⁹⁾。一方 Pivmecillinam の ED₅₀ 値も感染菌量の増加に伴い上昇したが、菌量の変化に伴う ED₅₀ 値の変動域は数倍であり、対照薬剤の ABPC または CEX にくらべ Pivmecillinam が特に感染菌量の影響をうけやすいという傾向は認められなかった。しかし *E. coli* の 1 株において極大量の感染菌量 (10⁷ CFU/mouse) を用いると 1,000 倍以上の ED₅₀ 値の上昇を示し、同一条件で行った ABPC の ED₅₀ 値の上昇率に比べて高かった。*In vitro* における Mecillinam の抗菌力が接種菌量により変動する要因は菌種、菌株により様でなく形態変化、殺菌作用発現までに要する世代数、耐性細胞出現率、β-lactamase 産生能などの要因が種々組み合わせられて表現される⁹⁾。感染マウスにおける感染菌量の変化に伴う Pivmecillinam の ED₅₀ 値の変動もこれら要因のいくつかが関与するかも知れないが、マウス腹腔内感染症における薬剤の予防効果は宿主側の種々の防禦機構、感染菌の毒力、増殖速度、薬剤の体内分布および薬剤濃度の経時的変化などの要因が加重された結果である。また、マウス実験的感染における抗菌剤の予防効果が感染菌量によって左右されることは数多く報告され^{10)~13)}、いずれも大量菌感染では予防効果を示さない、dose response がみられない。従って *E. coli* の同一感染条件で認められた Pivmecillinam と ABPC の効果の差違においても大量菌感染の結果を *in vitro* で見出された Mecillinam の性質の反映と考え、両薬剤の臨床効果の差違まで予測するのは適当でない。

結 論

Pivmecillinam の実験的マウス腹腔内感染症における予防効果を ABPC および CEX のそれと比較した。

1) Pivmecillinam の経口投与による *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* 感染マウスにおける予防効果は ABPC より強く、*Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* 感染マウスにおけるそれは ABPC と同程度であり、*Staph. aureus* 感染マウスでは ABPC より弱かった。

2) Pivmecillinam は ABPC 耐性 *E. coli*, *Klebsiella*

pneumoniae および *Proteus vulgaris* 感染マウスにおいて CEX よりもすぐれた予防効果を示した。

3) Pivmecillinam の予防効果は ABPC および CEX のそれと同様、感染菌量の増加に伴い減弱した。

本実験は昭和49年2月から昭和50年1月にわたって実施された。

参 考 文 献

- 1) ROHOLT, K.; B. NIELSEN & E. KRISTENSEN: Pharmacokinetic studies with Mecillinam and Pivmecillinam. *Chemotherapy (Basel)* 21: 146~166, 1975
- 2) LUND, F. & L. TYBRING: 6β-Amidinopenicillanic acids—a new group of antibiotics. *Nature (New Biol.)* 236: 135~137, 1972
- 3) GREENWOOD, D.; H. 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
- 4) TYBRING, L.: Mecillinam (FL-1060), a 6β-amidino penicillanic acid derivative: *In vitro* evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8: 266~276, 1975
- 5) HELCHIOR, N. H.; J. BLOM, L. TYBRING & A. BIRCH-ANDERSON: Light and electron microscopy of the early response of *Escherichia coli* to a 6β-amidinopenicillanic acid (FL-1060). *Acta. Path. Microbiol. Scand. Section B.* 81: 393~407, 1973
- 6) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: The two sites of penicillin action in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 128: 791~794, 1973
- 7) MATSUHASHI, S.; T. KAMIRYO, P. M. BLUMBERG, P. LINETT, E. WILLOUGHBY & J. L. STROMINGER: Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. *J. Bact.* 117: 578~587, 1974
- 8) REED, L. J. & H. MUENCH: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493~497, 1938
- 9) 中尾雅文, 山崎俊幸, 土屋 皖司: Mecillinam および Pivmecillinam の *in vitro* 抗菌作用について。 *Chemotherapy* 25(1): 61~86, 1977
- 10) YURCHENCO, J. A.; M. W. HOPPER & G. H. WARREN: Therapeutic activity of aminoalicyclic penicillins in bacterial infections in mice. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1967: 602~608, 1968
- 11) MUGGLETON, P. W.; C. H. O'CHALLAGHAN, R. D. FOORD, S. M. KIRBY & D. M. RYAN: Laboratory appraisal of Cephalexin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1968: 353~360, 1969

- 12) 野藤隆夫：Sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防禦効果の相関 II. マウス実験感染における防禦効果と MIC との相関性について。Chemotherapy 20 : 646~652, 1972
- 13) 一色 義人：試験管内抗菌作用と感染防禦効果との相関について (2) Ampicillin, Cephalixin, Cyclacillin におけるマウス実験感染に対する防禦効果との関連性, とくに攻撃菌量と投与法の影響について。Chemotherapy 23 : 3790~3797, 1975

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PIVMECILLINAM

TOSHIYUKI YAMAZAKI, RYOGO HAYASHI and KANJI TSUCHIYA
Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

Protective effects of pivmecillinam in mice infected intraperitoneally with *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* were compared with that of ampicillin and cephalixin. Pivmecillinam showed considerably higher protective effect than ampicillin in mice infected with *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Comparable activity of pivmecillinam and ampicillin was observed in mice infected with *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*, whereas pivmecillinam was less active than ampicillin against infection with *Staph. aureus*. Pivmecillinam was found to be more active than cephalixin against infections with the highly ampicillin-resistant strains of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus vulgaris*. Protective effect of pivmecillinam decreased with increasing the challenge dose as in the case of ampicillin and cephalixin.