

T-1220 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

植尾健次・田井 賢・林 敏雄

福岡義和・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

T-1220 は 富山化学工業株式会社総合研究所で開発された新しいペニシリン系抗生物質である。今回、われわれは Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC) などを対照薬剤として *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について検討した。T-1220 はグラム陽性菌, グラム陰性菌に対しても幅広い抗菌作用を示す薬剤であり, 特にグラム陰性菌の *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus* に対してすぐれた抗菌作用を示し, T-1220 は殺菌的にも作用する薬剤である。T-1220 は Penicillinase (PCase) によって他の合成ペニシリン同様水解をうけるが, *P. aeruginosa* 産生 β -lactamase に対して分解されがたい点が1つの特徴である。

I. 実験材料および方法

使用菌株：各種病巣由来細菌は当教室保存株を用いた。対照としてグラム陽性, 陰性の標準菌株に対しての抗菌活性も測定した。

使用薬剤：T-1220, ABPC (富山化学工業株式会社), CBPC, Cefazolin (CEZ) (藤沢薬品工業株式会社), Penicillin G (PCG) (明治製菓株式会社), Sulbenicillin (SBPC) (武田薬品工業株式会社), Cephaloridine (CER) (鳥居薬品株式会社), Cephalothin (CET) (塩野義製薬株式会社) を用いた。

培地：Heart infusion broth (栄研, HIB), Brain heart infusion broth (栄研, BHB), MUELLER-HINTON agar (栄研, MHA), Tryptone-soy agar (栄研, TSA), Nutrient agar (栄研, NA), Brain heart infusion agar (栄研, BHIA), Heart infusion agar (栄研, HIA), 1%ペプトン水 (ポリペプトン, 10 g ; NaCl, 5 g, 1 l 蒸留水), Medium-B (酵母エキス, 2 g ; ポリペプトン, 10 g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7 g ; KH_2PO_4 , 2 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.2 g ; グルコース, 2 g ; MgSO_4 , 0.4 g, 1 l 蒸留水) を用いた。

MIC 測定：2段階希釈した各薬剤を含む HIA 培地に 1%ペプトン水37°C, 18時間培養菌液の100倍希釈した菌液の1白金耳を接種した。菌の増殖は37°C18時間培養後にその最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。この際 *Streptococcus pyogenes* は BHA 平板を使用し, *Pseudomonas aeruginosa* は前培養液として, 1%ペプトン水中

に 0.4% KNO_3 を加えたものを用いた。その他, 検査の方法は日本化学療法学会の方法に準じて行なった¹⁾。

人血清添加時の MIC 値は, 人血清を加えた HIB を用い液体希釈培養法により測定した。最終接種菌量 $10^4/\text{ml}$ とし, 37°C, 18時間培養後に MIC を求めた。

殺菌効果測定：殺菌効果は2通りの方法で他の薬剤と比較検討した。1つは増殖曲線におよぼす影響を調べたものである。BHB 37°C18時間培養菌液を BHB で $10^8/\text{ml}$ に希釈し, 振盪培養を行なった。振盪培養2時間後 MIC 値付近の濃度の薬剤を添加し経時的に生菌数を測定した。別に最小殺菌濃度 (MBC) を次の方法を用いて測定した。HIB にて37°C, 18時間培養菌液を希釈し, 倍々希釈して得られたシリーズの薬剤を含む HIB 中に最終接種菌量が約 $10^4/\text{ml}$ となるように接種した。37°C, 18時間培養後, 肉眼で濁度を判定し, 濁度の全くないところをもって MIC とした。MIC 近辺のチューブを薬剤を含まない HIA に1白金耳ずつ接種し, 37°C, 18時間培養後生菌の有無を判定した。生菌の全くないところをもって MBC とした。

β -lactamase に対する安定性の測定：BHB にて前培養した菌液を Medium-B にて大量培養した。6時間振盪培養後集菌し 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) にて洗浄後, 同一バッファーに懸濁し, 超音波処理により β -lactamase を抽出した。*P. aeruginosa* GN 918, *P. vulgaris* GN 76 は共に PCG により Induction をかけて培養した菌体から酵素を抽出した。各薬剤の加水分解速度は PERRET²⁾ の変法を用いて測定し, Penicillinase は PCG を100とした相対加水分解速度で表わし, Cephalosporinase は CER を100としたそれで表わした。蛋白定量は Lowry 法³⁾を用いて測定した。

50%菌発育阻止濃度 (ID_{50}) の測定：1%ペプトン水前培養菌液を希釈して約300個の菌を種々の濃度の薬剤を含む HIA 平板に接種し, 37°C, 18時間培養後, 各平板上のコロニー数を測定した。 ID_{50} 値はプロビット法により算定した。

試験管内耐性獲得の測定：BHB 前培養菌液を倍々希釈法によって用意した薬剤を含む NB 中に1白金耳ずつ接種し, 37°C, 24時間培養後, 肉眼観察により, 濁りの

Table 1 Antibacterial spectrum

Test strain		T-1220	ABPC	SBPC	CBPC	CET	CEZ
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P	0.78	<0.1	1.56	0.39	0.2	0.39
	" Terashima	1.56	0.39	6.25	3.13	0.39	0.78
	" Smith	1.56	1.56	6.25	6.25	0.39	0.78
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> IID 866	0.78	0.39	1.56	3.13	<0.1	0.2
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	<0.1	0.39	0.2	<0.1	0.2
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.1	0.39	0.78	1.56	0.78	1.56
	<i>Salmonella typhosa</i> IID 611	0.39	0.2	1.56	1.56	0.39	1.56
	<i>Salmonella paratyphi</i> IID 605	1.56	3.13	25	25	3.13	1.56
	<i>Salmonella schottmuelleri</i> IID 607	0.2	0.39	6.25	3.13	0.39	1.56
	<i>Salmonella enteritidis</i> IID 604	1.56	0.78	3.13	3.13	1.56	1.56
	<i>Serratia marcescens</i> IID 620	0.78	25	3.13	1.56	>200	>200
	<i>Shigella flexneri</i> IID 642	0.39	3.13	12.5	12.5	3.13	1.56
	<i>Shigella boydii</i> EW 28	0.39	3.13	3.13	1.56	12.5	1.56
	<i>Shigella sonnei</i> EW 33	0.39	1.56	1.56	1.56	3.13	0.78
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IID 875	3.13	12.5	50	50	3.13	1.56
	<i>Proteus vulgaris</i> IID 874	0.78	200	1.56	3.13	>200	>200
	<i>Proteus morgani</i> IID 602	0.78	200	3.13	1.56	>200	200
	<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	6.25	>200	200	50	>200	>200
	<i>Enterobacter aerogenes</i> IID 972	0.78	6.25	3.13	1.56	50	100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1001	6.25	>200	50	100	>200	>200
	" IID 1002	3.13	>200	25	50	>200	>200
	" NCTC 10490	0.2	200	0.39	1.56	>200	>200
	" IFO 3445	3.13	>200	25	50	>200	>200

MIC ($\mu\text{g/ml}$), $10^6/\text{ml}$ 1 loopful.

ないところを MIC 値とした。この 1/2 MIC チューブ菌液を同一操作により薬剤を含む BHB 中にて継代培養し、以後10日間における MIC の変動を求めた。

マウス感染防禦実験の測定：ICR 系雄マウスを1薬剤濃度について1群15匹使用した。マウス腹腔内に感染させ、薬剤の投与は皮下注射を用いた。薬剤は *E. coli* の場合感染1時間後1回、*K. pneumoniae* では感染1時間、4時間後2回、*P. aeruginosa* では感染1, 4, 8時間後の3回投与した。算定方法は LITCHFIELD-WILCOXON 法⁴⁾に基づき、95%信頼限界値を計算により算定した。

II. 実験結果ならびに考察

1) 標準菌株を用いての抗菌スペクトラム

T-1220 の抗菌スペクトラムは既知のペニシリン系およびセファロsporin系薬剤を対照薬剤として比較検討した。その成績は Table 1 に示した。T-1220 の抗菌力はグラム陽性菌に対しては CBPC とほぼ同程度であり、ABPC よりは弱い抗菌力を示した。しかし、グラム陰性菌に対しては ABPC, CBPC をも含むすべての対照薬剤

よりも数倍強い抗菌力を示し、特に *P. aeruginosa*, *Proteus*, *K. pneumoniae* に対してすぐれていた。

2) 臨床分離株に対する感受性分布

グラム陽性菌、グラム陰性菌について当教室で分離された臨床分離株1,361株を用い T-1220 の抗菌作用を調べた。対照薬剤は ABPC, CBPC とした。

S. aureus : 100株に対する T-1220 の感受性分布は $3.13 \mu\text{g/ml}$ に感受性の山がみられ、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で、CBPC と同様全株の約70%の菌の発育を阻止し、ABPC では同濃度で約90%が阻止された (Fig. 1)。

S. epidermidis : 25株に対しては、T-1220, CBPC 共に感受性の山は $0.78 \mu\text{g/ml}$ にあり、ABPC よりもやや弱い抗菌力を示した (Fig. 2)。

S. pyogenes : 25株に対しては、T-1220 の感受性分布の山は $0.1 \mu\text{g/ml}$ にあり、CBPC より強いが、ABPC よりもやや弱い抗菌力を示した (Fig. 2)。

E. coli : 200株に対する T-1220 の感受性の山は $1.56 \mu\text{g/ml}$ と $50 \mu\text{g/ml}$ にあり、ABPC, CBPC に比べ強い抗菌

Fig. 1 Antibacterial activity of T-1220
S. aureus (100 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

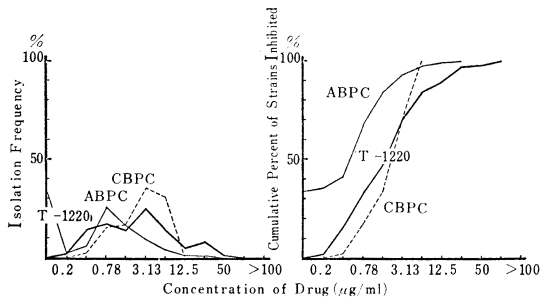


Fig. 2 Antibacterial activity of T-1220
 $10^6/ml$ 1 loopful
S. epidermidis (25 strains) *S. pyogenes* (25 strains)

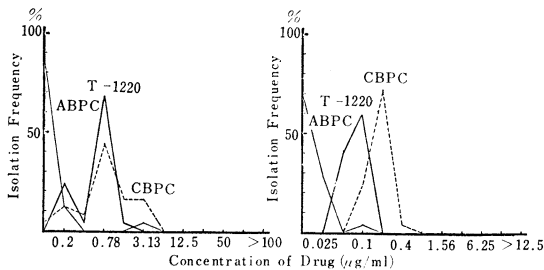
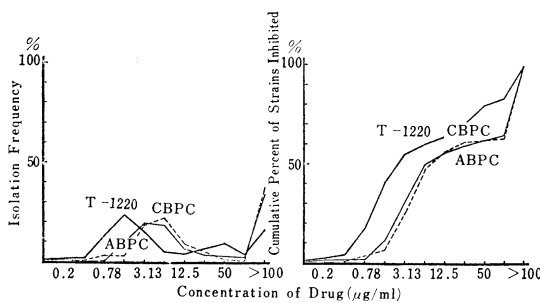


Fig. 3 Antibacterial activity of T-1220
E. coli (200 strains) $10^6/ml$ 1 loopful



力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度で T-1220 は全株の約55%，CBPC は約25%，ABPC は約30%の菌の発育を阻止した。また、高度耐性(MIC>100 $\mu g/ml$)を示す菌は T-1220 では約15%，CBPC, ABPC では約30%が存在していることが明らかになった (Fig. 3)。

K. pneumoniae : 200 株に対する感受性分布の山は T-1220 では 3.13 $\mu g/ml$, ABPC, CBPC ではそれぞれ 25 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ 以上であった。12.5 $\mu g/ml$ の薬剤濃度において T-1220 は臨床分離株の約60%を, ABPC は約10%, CBPC は約5%の菌の発育を阻止した。また、高度

Fig. 4 Antibacterial activity of T-1220
K. pneumoniae (200 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

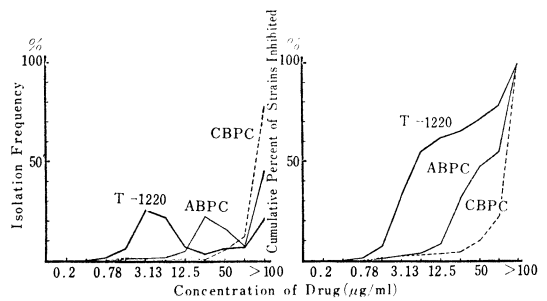


Fig. 5 Antibacterial activity of T-1220
P. mirabilis (100 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

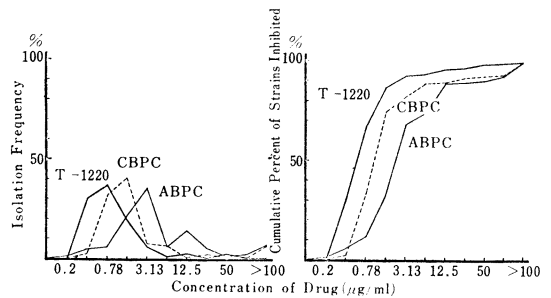
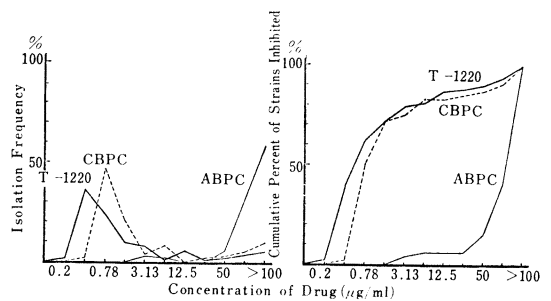


Fig. 6 Antibacterial activity of T-1220
P.morganii (75 strains) $10^6/ml$ 1 loopful



耐性菌は T-1220, ABPC, CBPC それぞれ約20%，約40%，約80%存在し，T-1220 は他の薬剤と比し強い抗菌力を示すことが明らかになった (Fig. 4)。

P. mirabilis : 100 株に対する感受性分布の山は T-1220 では 0.78 $\mu g/ml$ にあり, ABPC, CBPC より強い抗菌力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度において T-1220 は臨床分離株の90%以上を, CBPC は約80%, ABPC は約70%の菌の発育を阻止した。また、高度耐性菌は T-1220 ではほとんどみられず, ABPC, CBPC においては約10%存在していた (Fig. 5)。

Fig. 7 Antibacterial activity of T-1220
P. vulgaris (75 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

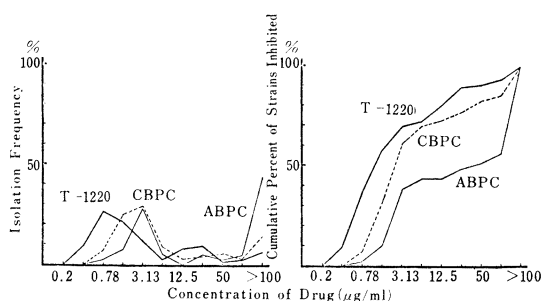


Fig. 8 Antibacterial activity of T-1220
P. rettgeri (25 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

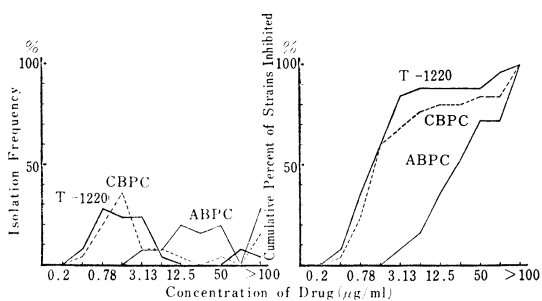
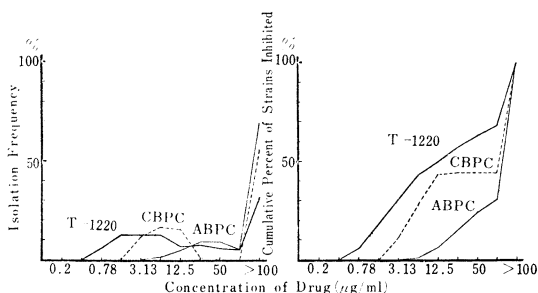


Fig. 9 Antibacterial activity of T-1220
S. marcescens (100 strains) $10^6/ml$ 1 loopful



P.morganii : 75株に対する感受性分布の山はT-1220では0.39 $\mu g/ml$ にあり, ABPC, CBPC より強い抗菌力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度でT-1220は全株の約80%を, CBPC, ABPC はそれぞれ約75%, 約5%の菌の発育を阻止した。また, 高度耐性菌はT-1220, CBPC, ABPC それぞれ約5%, 約10%, 約60%存在していた (Fig. 6)。

P. vulgaris : 75株に対する感受性分布の山はT-1220では0.78 $\mu g/ml$ にあり, ABPC, CBPC より強い抗菌力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度でT-1220は全株の約70

Fig. 10 Antibacterial activity of T-1220
E. cloacae (136 strains) $10^6/ml$ 1 loopful

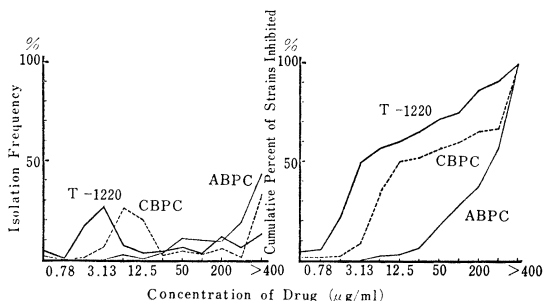
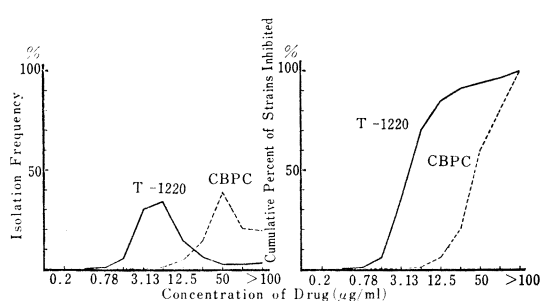


Fig. 11 Antibacterial activity of T-1220
P. aeruginosa (300 strains) $10^6/ml$ 1 loopful



%, CBPC, ABPC はそれぞれ約60%, 約40%の菌の発育を阻止した。また, 高度耐性菌はT-1220, CBPC, ABPC それぞれ約5%, 約15%, 約45%存在していた (Fig. 7)。

P. rettgeri : 25株に対するT-1220の感受性分布の山は0.78 $\mu g/ml$ にあり, 3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度で全株の約85%の菌の発育を阻止した。また, 高度耐性菌はT-1220, CBPC, ABPC それぞれ約5%, 約15%, 約30%存在しており, CBPC, ABPC より強い抗菌力を示した (Fig. 8)。

S. marcescens : 100株に対する感受性分布の山はT-1220では3.13 $\mu g/ml$ 付近にあり, ABPC, CBPC より強い抗菌力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度でT-1220は全株の約30%, CBPC では約10%の菌の発育を阻止した。しかしABPC では全く菌の発育を阻止できなかった。また高度耐性菌はT-1220, CBPC, ABPC それぞれ約30%, 約60%, 約70%存在していた (Fig. 9)。

E. cloacae : 136株に対する感受性分布の山はT-1220では3.13 $\mu g/ml$ にあり, ABPC, CBPC より強い抗菌力を示した。3.13 $\mu g/ml$ の薬剤濃度でT-1220は全株の約50%を, CBPC では約10%の菌の発育を阻止した。しかしABPC では全く菌の発育を阻止しなかった。また, 高

Table 2 Comparison of the antibacterial activities of T-1220, CBPC, and ABPC against clinical isolates^{a)}

Organism	No. of strains used	Percent of inhibition by 3.13 µg/ml of			Percent of inhibition by 12.5 µg/ml of		
		T-1220	CBPC	ABPC	T-1220	CBPC	ABPC
<i>S. aureus</i>	100	70	70	93	89	100	99
<i>S. epidermidis</i>	25	100	100	100	100	100	100
<i>S. pyogenes</i>	25	100	100	100	100	100	100
<i>E. coli</i>	200	55	25	31	64	57	56
<i>K. pneumoniae</i>	200	33	3	4	62	3	9
<i>P. mirabilis</i>	100	93	82	68	96	90	89
<i>P. morgani</i>	75	79	75	4	87	83	6
<i>P. vulgaris</i>	75	70	61	38	80	73	44
<i>P. rettgeri</i>	25	84	68	8	88	80	36
<i>S. marcescens</i>	100	31	11	0	50	43	6
<i>E. cloacae</i>	136	49	8	0	60	50	3
<i>P. aeruginosa</i>	300	35	0.5	N. T. ^{b)}	85	6	N. T. ^{b)}

a) Clinical isolates are the stock cultures of the Reference Laboratory of Drug-resistant Bacteria, School of Medicine Gunma Univ.

b) not tested.

Table 3 Effect of various media and medium pH on MIC

		T-1220 (MIC, µg/ml)			CBPC (MIC, µg/ml)		
		<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. aureus</i> 209 P	<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. aureus</i> 209 P	<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490
Medium ^{e)}	MHA	0.05	0.78	0.10	0.78	0.78	0.39
	TSA	0.05	0.78	0.39	0.78	0.78	0.78
	NA	0.05	0.78	0.39	0.78	0.78	0.39
	BHIA	0.10	0.78	0.20	0.78	0.78	0.39
pH	6.0	0.20	0.39	0.20	0.78	0.39	0.39
	6.5	0.10	0.78	0.20	0.78	0.39	0.78
	7.0	0.10	0.78	0.39	0.78	0.78	0.78
	7.5	0.10	0.78	0.39	0.78	0.78	0.39
	8.0	0.10	0.78	0.39	0.78	0.78	0.78

a) Medium, see Materials for details.

10⁶/ml 1 loopful.

度耐性菌はT-1220, CBPC, ABPC をそれぞれ約25%, 約40%, 約70%存在していた (Fig. 10)。

P. aeruginosa : 300株に対する感受性分布の山はT-1220では6.25 µg/ml にあり, CBPC においては50 µg/ml であった。12.5 µg/ml の薬剤濃度においてT-1220は臨床分離300株の約85%の菌の発育を阻止したが, CBPC は約5%の阻止しか示さなかった。また, 高度耐性菌はT-1220では約5%, CBPC では約20%存在していた (Fig. 11)。

臨床分離株に対するT-1220, ABPC, CBPC の抗菌力を

Table 4 Effect of human serum on MIC of T-1220

Human serum ^{a)} (%)	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>S. aureus</i> FDA 209 P	<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490
0	0.39	1.56	0.78
10	0.39	1.56	0.78
40	0.20	1.56	0.78

a) MIC was determined by tube dilution method. See Methods for details.

Table 5 Correlation between MICs and MBCs of T-1220

Organism	T-1220		CBPC		ABPC	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> NIH JC-2	3.13	3.13	12.5	25	6.25	6.25
<i>E. coli</i> GN 6281	0.78	0.78	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>K. pneumoniae</i> IID 875	6.25	6.25	100	200	12.5	25
<i>K. pneumoniae</i> GN 5559	6.25	25	200	200	50	200
<i>P. morganii</i> IID 602	1.56	1.56	3.13	6.25	200	400
<i>P. morganii</i> GN 1893	1.56	1.56	0.78	1.56	200	>200
<i>P. vulgaris</i> IID 874	25	50	50	100	800	1600
<i>P. vulgaris</i> GN 1543	3.13	50	3.13	50	>200	>200
<i>P. mirabilis</i> GN 1537	0.78	0.78	≤0.39	0.78	1.56	3.13
<i>P. rettgeri</i> GN 1725	0.78	0.78	0.78	0.78	>200	>200
<i>P. inconstance</i> GN 2211	1.56	200	6.25	100	>200	>200
<i>S. marcescens</i> IID 620	0.78	3.13	6.25	12.5	25	50
<i>S. marcescens</i> GN 6467	0.78	1.56	6.25	50	3.13	100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.39	0.78	0.78	1.56	/	/
<i>P. aeruginosa</i> GN 6727	6.25	50	200	>200	/	/

MIC and MBC, see Methods for details.

Fig. 12 Bactericidal activity of T-1220 (MIC; —○—, MBC; ···○···) and CBPC (MIC; —●—, MBC; ···●···). See Methods for details

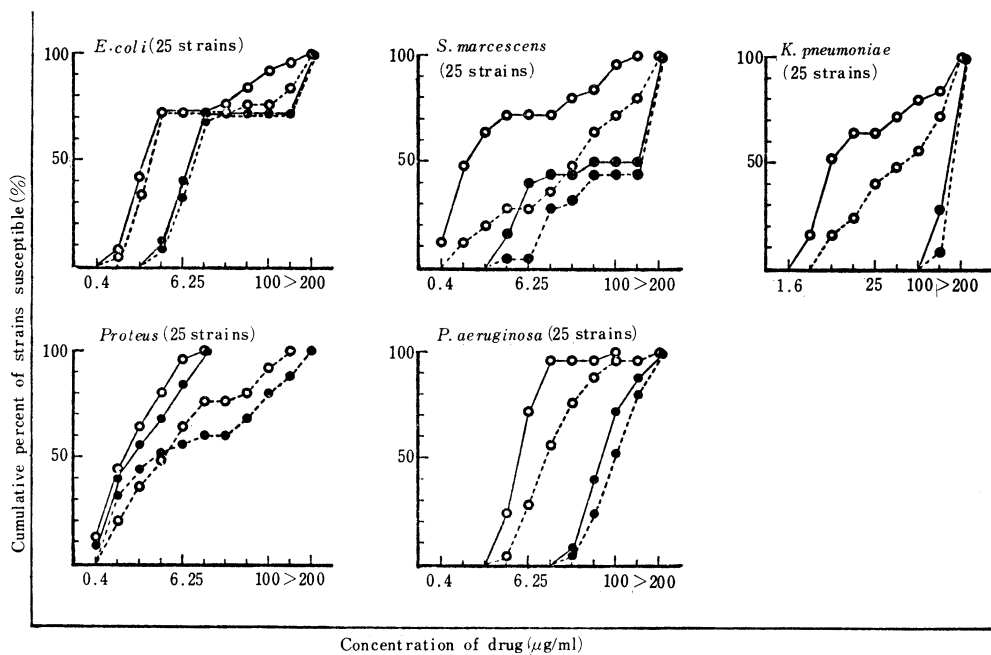


Table 2 にまとめた。各薬剤の3.13および12.5 $\mu\text{g/ml}$ によって発育を阻止される菌のパーセントをもって示したものである。表に示すごとく T-1220 は ABPC, CBPC よりすぐれた抗菌作用をもつことがわかる。

3) 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす各種培地, pH, 血清の影響について T-1220 と CBPC について比較検討した。培地の種類および pH 6.0 から 8.0 まで変えてみたが両薬剤の抗菌力に

Fig. 13 a) Bactericidal activity of T-1220.
See Methods for details

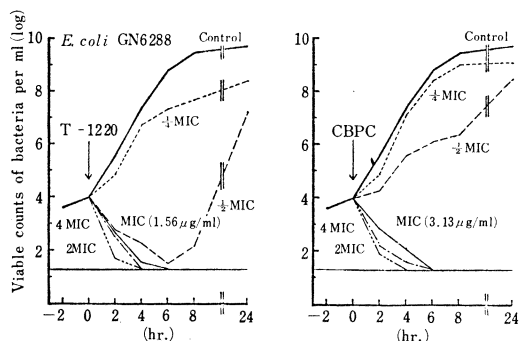


Fig. 13 b) Bactericidal activity of T-1220.
See Methods for details

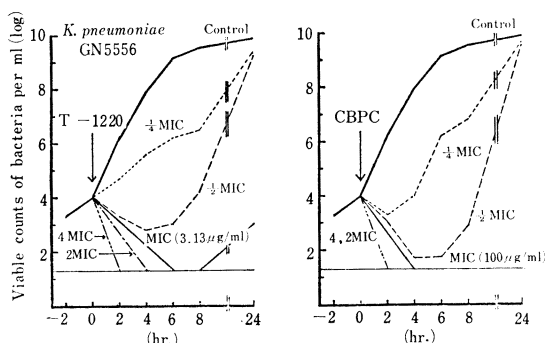
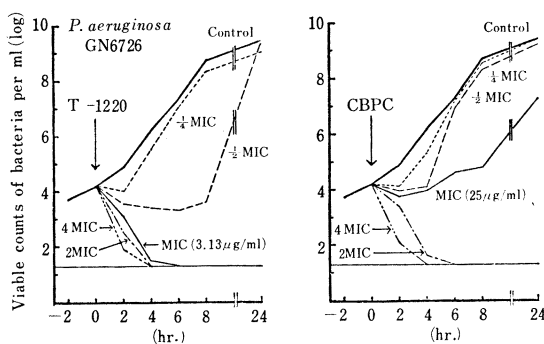


Fig. 13 c) Bactericidal activity of T-1220.
See Methods for details



ほとんど影響を与えなかった (Table 3)。また、人血清 40% 添加によっても T-1220 の抗菌力には強い変化がみられなかった (Table 4)。

4) 殺菌効果

T-1220 の抗菌作用がいわゆる静菌的か殺菌的かについて標準菌株および臨床分離株を用いて検討した。代表的な標準菌株、臨床分離株について MIC と MBC を比較検討したものを Table 5 に示した。表に示すごとく T-1220 は CBPC、ABPC と同様殺菌的に作用する薬剤で

Fig. 14 Antibacterial activity of T-1220 against *K. pneumoniae* GN 5703. Determination of ID_{50} , see Methods for details.

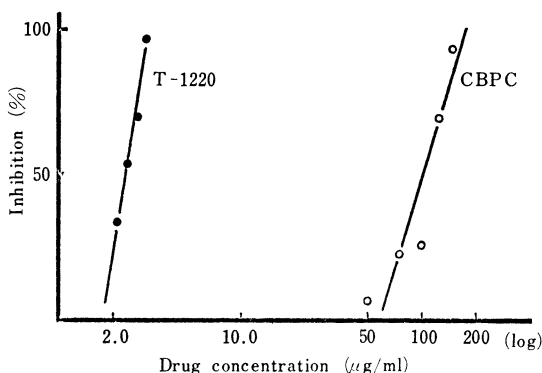
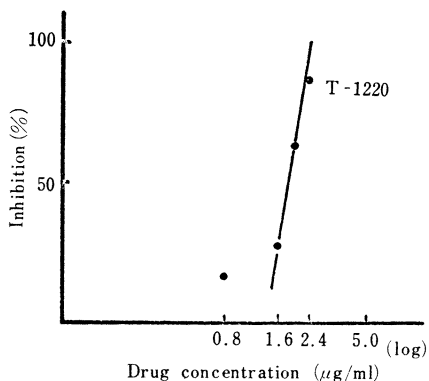


Fig. 15 Antibacterial activity of T-1220 against *S. marcescens* GN 6491. The ID_{50} of CBPC against *S. marcescens* was very high and was not determined.



あるといえる。そこで代表的菌種について株数を増やし、25株ずつ CBPC と比較検討してみた (Fig. 12)。*E. coli* に対しては T-1220、CBPC とともに殺菌的に作用した。*S. marcescens*、*K. pneumoniae* に対しては両薬剤ともに MIC 値と MBC 値の間にいくぶんかのずれがみられ、MBC 値の方が MIC 値よりやや高い傾向を示した。*Proteus* においては、*P. mirabilis*、*P. morganii*、*P. rettgeri* に対して両薬剤ともに殺菌的に作用するが、*P. vulgaris*、*P. inconstance* に対しては両薬剤共に、MIC と MBC の間に大きなひらきがみられ、MBC 値の方が MIC 値より大であった。*P. aeruginosa* に対しては T-1220、CBPC とともに殺菌的に作用した。また、細菌の増殖曲線に及ぼす影響を生菌数計算から、T-1220、CBPC について検討した (Fig. 13)。図に示すごとく、*E. coli* GN 6288 においては両薬剤ともに MIC の薬剤濃度で殺菌的に作用した。MIC の半分の濃度では殺菌作用がみられなかった。*K. pneumo-*

Table 6 Substrate profiles of various β -lactamases

Enzyme source	PCase ^{b)} type	Specific activity (u/mg protein)	Substrate				
			PCG	T-1220	ABPC	CBPC	CER
W 3630 Rms 212 ⁺	I	74	100	89	92	8	137
W 3630 Rms 213 ⁺	II	3	100	118	545	60	95
ML 4259 Rms 139 ⁺ a)	IV	285	100	5	105	96	18
ML 4259 Rms 149 ⁺ a)	IV	0.3	100	17	101	253	10
ML 4259 Rms 242 ⁺ a)	IV	128	100	8	110	100	15
ML 1410 Rms 227 ⁺	I	89	100	43	124	6	42

a) R-factors demonstrated from *P. aeruginosa* strains.

b) Penicillinase (PCase).

c) W 3630, ML 1410 ; substrains of *E. coli* K 12.
ML 4259 ; substrain of *P. aeruginosa* 1008.

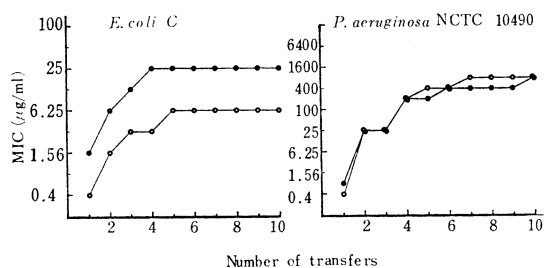
Table 7 Substrate profiles of various β -lactamases

Enzyme source ^{a)}	Specific activity (u/mg protein)	Substrate				
		PCG	T-1220	ABPC	CBPC	CER
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	253	20	1	0.8	0.2	100
<i>P. vulgaris</i> GN 76	189	8	8	8	0.6	100
<i>E. freundii</i> GN 346	1173	4	0.1	0.06	0.05	100
<i>E. coli</i> GN 5482	46	22	0.1	0.7	0.8	100

a) Cephalosporinase (CSase).

Fig. 16 Emergence of drug resistance to T-1220 (○) and CBPC (●).

The rate of development of resistance to T-1220 and CBPC were determined by the successive-transfer method every 24 hr in antibiotic-containing medium.



niae GN 5556に対しては MIC の薬剤濃度で T-1220は菌の再増殖をみたが、CBPC では増殖を抑えた。*P. aeruginosa* GN 6726 に対しては T-1220は MIC の薬剤濃度で殺菌的に作用したが、CBPC では MIC 濃度において殺菌作用を示さなかった。

5) 50%菌発育阻止濃度 (ID₅₀)

従来の抗菌性物質の力価測定と異なり、より正確に薬剤の抗菌作用を測定する目的で ID₅₀ の測定法が当教室

において開発された。約 300 個の菌を種々の濃度の薬剤平板に接種し、培養後そのコロニー数を算定することにより求められる薬剤の 50%菌発育阻止濃度を、*K. pneumoniae*, *S. marcescens* を用いて検討した。測定値は 5 枚の平板の平均値を用いて算出した。*K. pneumoniae* においては T-1220 の ID₅₀ は約 2 μg/ml であり、CBPC のそれは約 100 μg/ml であった。従って、T-1220 は CBPC の約 50 倍強い抗菌力を示した (Fig. 14)。*S. marcescens* では T-1220 の ID₅₀ は約 2 μg/ml であり、CBPC は薬剤濃度が高く、測定不能であった (Fig. 15)。

6) β -lactamase に対する安定性

T-1220のPenicillinase(PCase)およびCephalosporinase(CSase)に対する安定性を PCG, ABPC, CBPC および CER を対照薬剤として検討した。T-1220は PCase I 型および II 型⁵⁾ に対しては PCG とほぼ同程度に水解されるが、*P. aeruginosa* の産生する IV 型 PCase⁶⁾ に対しては大きな特徴を示した。PCG を 100 とする相対加水分解速度で表わすと、T-1220 は約 10 であり、CBPC と比較しても極めて安定であった (Table 6)。また、CSase に対する CER を 100 とする相対加水分解速度は T-1220, CBPC, ABPC 共に 1 以下であり、CSase に対しては T-1220 は水解されにくかった (Table 7)。

Table 8 *In vivo* antibacterial activity of T-1220 against systemic infection

Challenge organism	Challenge dose	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit	
<i>E. coli</i> ML 4707	2.5 × 10 ⁶ cells (5 × LD ₅₀)	CBPC	1.56	47.0	36.5–60.0	p > 0.05
		T-1220	1.56	48.0	37.5–61.5	
		ABPC	3.13	20.5	16.0–25.0	p < 0.05
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	1 × 10 ⁶ cells (25 × LD ₅₀) in 1% mucin	CBPC	800	550	350–870	p < 0.05
		T-1220	6.25	19.0	9.5–37.0	
		ABPC	100	37.5	26.0–54.0	p > 0.05
<i>P. aeruginosa</i> NC-5	3.5 × 10 ⁴ cells (100 × LD ₅₀) in 5% mucin	CBPC	200	1250	880–1775	p < 0.05
		T-1220	12.5	350	195–630	

Subcutaneous injection of each drug. Challenge, intraperitoneal injection with a saline suspension of each organism.

7) 試験管内耐性獲得

E. coli C と *P. aeruginosa* NCTC 10490 を用い、T-1220 と CBPC に対する *in vivo* 耐性菌出現状況について検討した。*E. coli* C に対しては CBPC は 4 日目に MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 、T-1220 は 5 日目に 6.25 $\mu\text{g/ml}$ となり、以後 10 日目まで耐性の上昇はみられなかった。*P. aeruginosa* NCTC 10490 に対しては、T-1220 は CBPC とほぼ同様のカーブで耐性上昇し、10 日間で両剤ともに MIC 値が 800 $\mu\text{g/ml}$ の耐性菌を得た。耐性の上昇した株は基株に比べ CSase 産生能が高く、そのために耐性を獲得したものと思われる (Fig. 16)。

8) マウス実験的感染症に対する治療効果

T-1220 の ICR 系マウス実験的感染症に対する治療効果を各薬剤濃度について 1 群 15 匹使用して検討した (Table 8)。マウス腹腔内に感染させ、薬剤の投与は皮下注射とし、その感染死防禦効果を調べた。薬剤は *E. coli* の場合は感染 1 時間後の 1 回、*K. pneumoniae* では感染 1 時間と 4 時間後の 2 回、*P. aeruginosa* では感染 1, 4, 8 時間後の 3 回投与した。

E. coli ML 4707 では T-1220 の ED₅₀ 値は CBPC と同程度であり、ABPC の方がいくぶんすぐれていた。

K. pneumoniae GN 6445 感染の場合では T-1220 の ED₅₀ 値は 19.0 mg/kg であり CBPC より 30 倍、ABPC より 2 倍程度すぐれていた。

P. aeruginosa NC-5 においても T-1220 の ED₅₀ 値は 350 mg/kg であり CBPC よりも 4 倍程度すぐれていた。

結 論

以上のような結果を総括し、次のような結果が得られた。

- 1) T-1220 は広い抗菌スペクトラムを示した。
- 2) グラム陽性菌においては ABPC よりやや劣り、

CBPC と同程度の抗菌力を示した。

3) グラム陰性菌においては、特に *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *S. marcescens* において他の薬剤に比し強い抗菌力を示した。

4) 培地の種類、培地の pH、人血清添加などは抗菌力に対しほとんど影響を与えなかった。

5) T-1220 は殺菌的に作用した。

6) 正確な抗菌作用測定による ID₅₀ 値の比較では、T-1220 の ID₅₀ 値は CBPC より遙かにすぐれていた。

7) *P. aeruginosa* 産生 IV 型 PCase に対して T-1220 は CBPC より非常に安定であり、他の PCase, CSase に対しては PCG とほぼ同様であった。

8) マウス実験的感染症に対して、T-1220 は ABPC, CBPC より強い治療効果を示した。

文 献

- 1) MIC 測定法改定委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 2) PERRET, C. J.: Iodometric assay for penicillinase. Nature 174: 1012~1013, 1954
- 3) ROWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGHT, A. L. FARR & R. J. RANDAAL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
- 4) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A Simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92: 99~113, 1948
- 5) MITSUHASHI, S. & T. SAWAI: Biochemical mechanisms of drug-resistant bacteria. In R factors. (ed. by Mitsuhashi, S.) University of Tokyo Press.: 135~156, 1971
- 6) SAWADA, Y.; S. YAGINUMA, M. TAI, S. IYOBE & S. MITSUHASHI: Plasmid-mediated penicillin beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9: 55~60, 1976

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF T-1220

KENJI UEO, MASARU TAI, TOSHIO HAYASHI,
YOSHIKAZU FUKUOKA and SUSUMU MITSUHASHI

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

A synthetic penicillin, T-1220, is a derivative of aminobenzylpenicillin. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-1220, ampicillin (ABPC) and carbenicillin (CBPC) were compared against gram-positive and gram-negative bacteria which were isolated from clinical specimens. The results were summarized as follows:

1) T-1220, ABPC and CBPC exhibited almost similar effectiveness against gram-positive bacteria.

2) *In vitro* antibacterial activities against gram-negative bacteria were compared using about 100–300 clinical isolates of each species of bacteria including *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* group, *S. marcescens*, *E. cloacae* and *P. aeruginosa*. T-1220 was found to be more effective than ABPC and CBPC, particularly against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus* group and *S. marcescens*.

3) Antibacterial activity of T-1220 was not affected by the changes of pH and media. Addition of human serum to culture media did not show any big effect on the antibacterial activity of T-1220.

4) Greater bactericidal activity was demonstrated with T-1220; minimum bactericidal concentration (MBC) toward various strains of gram-negative rod bacteria was almost the same as their minimum inhibitory concentration (MIC) values and was less than the MBCs of ABPC and CBPC.

5) The 50 percent inhibition dose (ID_{50}) of T-1220 was found to be much less than that of CBPC.

6) T-1220 as well as penicillin G was hydrolyzed by penicillinase (PCase). But T-1220 was very stable than CBPC against PCase derived from *P. aeruginosa*. Cephalosporinase (CSase) did not hydrolyze T-1220, CBPC and ABPC.

7) *In vivo* antibacterial activities of T-1220, ABPC and CBPC were compared using the systemic infections of mice with *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli*. The ED_{50} values (mg/kg) of T-1220 were consistently less than those of ABPC and CBPC.