

Ampicillin と Dicloxacillin の協力作用に関する研究 IV

緑膿菌に対する抗菌作用の基礎的検討

諸星俊郎・溝口順三・嵯峨井 均・横井山繁行・水野公雄

東洋醸造株式会社研究所

辻 明 良・五島 瑳 智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 52 年 7 月 30 日受付)

緒 言

前報で Ampicillin(ABPC) と Dicloxacillin(MDIPC) の 2:1 併用剤の協力的抗菌作用を β -ラクタマーゼ、とくにセファロスポリナーゼ産生腸内細菌群を中心に *in vitro* で確認し、さらに生体内の吸収排泄および実験的感染治療においても有効であることを報告した¹⁻³⁾。近年、感染症の治療に合成ペニシリンやセファロスポリン剤等の広域スペクトル抗菌薬の使用範囲が拡大するとともに、それらの薬剤に感受性のない菌種が臨床材料から高率に検出さるようになり、その中でも緑膿菌、セラチアなどが増加し臨床上の問題となっている。先に五島らは緑膿菌と大腸菌の混合培養系における β -ラクタム系薬剤の影響をしらべ ABPC とセファロスポリン(CET, CEX, CEZ) では ABPC のほうが菌交代を起こしにくいことを報告した⁴⁾。本研究では ABPC-MDIPC 併用時の緑膿菌に対する作用を、緑膿菌と大腸菌の *in vitro* における混合培養系および感染治療実験により ABPC 単剤と比較し、さらに緑膿菌の β -ラクタマーゼに対する安定性についても検討し、併用による効果をみとめたので報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

Ampicillin(ABPC Na salt, 890 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 東洋醸造)Dicloxacillin(MDIPC Na salt, 890 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 東洋醸造)Cefazolin(CEZ Na salt, 920 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 藤沢薬品)Carbencillin(CBPC Na salt, 820 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 藤沢薬品)

なお、ABPC-MDIPC 併用剤はすべて ABPC : MDIPC = 2 : 1 の比で使用した。

2. 使用菌株

臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* 74 株*P. aeruginosa* IFO 3445*E. coli* NIHJ-JC 2

3. 使用培地

Heart infusion agar Difco(HIA)

Heart infusion broth Difco(HIB)

Tryptocase soy broth Difco

BTB 寒天培地 : 1 L 中にラクトース 10g, 肉エキス 5g, ペプトン 10g, 塩化ナトリウム 2g, 寒天末 15g を含み, pH 7.2 に調整し, Bromthymoleblue(BTB) を最終濃度 0.08% となるように加える。

4. 感受性測定

日本化学療法学会が定めた MIC 測定法に従って最小発育阻止濃度を測定した。

5. 増殖曲線測定法

HIB 培地で 37°C 1 夜培養した菌液を約 10^5 cells/ml になるように、HIB 培地に接種する。薬剤添加後 37°C で振盪培養し Biophotorecorder(東洋科学)により O.D. 660 m μ を自動測定した。

6. 混合培養系における生菌数の測定

HIB 培地で 1 夜培養した大腸菌と緑膿菌をそれぞれ 10^7 cells/ml, および 10^3 cells/ml になるよう混合接種後 ABPC および ABPC+MDIPC(2:1), CEZ をそれぞれ 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し, 37°C で振盪培養した。2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 および 24 時間後のそれぞれの生菌数を測定し, 対照(薬剤無添加)の生菌数と比較した。なお緑膿菌数の測定には 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Nalidixic acid 含有 BTB 培地を使用した。

7. β -ラクタマーゼの調製

緑膿菌を対数増殖期まで増殖させた後、培地に 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 6-アミノペニシラン酸を添加し、 β -ラクタマーゼを誘導させた。さらにこの菌体を 0.1 モルのリン酸緩衝液 (pH 6.9) で洗い冷却遠心後同じ緩衝液に懸濁し、超音波装置により菌体を破碎した後、冷却遠心分離し、その上清を酵素液とした。

8. β -ラクタマーゼ活性測定法

PERRET のヨードメトリー法および NOVICK のミクロヨード法の改良法を用いて行った⁵⁾。なお酵素活性は 30°C において 1 時間に 1 μmole の基質を分解する活性を 1 unit と定めた。なお基質には ABPC を用い

Table 1 Resistance levels of *P. aeruginosa* to ABPC, MDIPC and ABPC+MDIPC

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	ABPC	MDIPC	ABPC+MDIPC
0801	>1600	>1600	800
0807	1600	>1600	400
0811	>1600	>1600	400
0812	>1600	>1600	800
0821	200	200	50
0831	800	>1600	400
0838	400	1600	200
0844	200	>1600	100

Inoculum size of bacteria is 10^8 cells/ml.

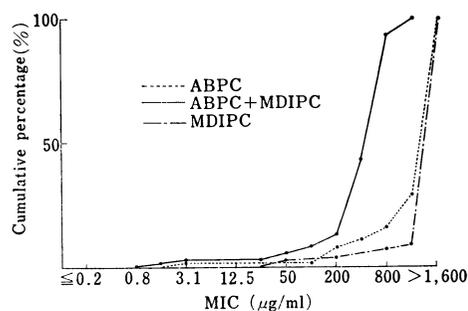
た。

9. β -ラクタマーゼ非産生株 (変異株) の分離

臨床分離株 *P. aeruginosa* 0812 を使用し, ADELBERG 等⁶⁾の方法によりニトロソグアニジン処理により変異させた。また変異株は ROSSETT⁷⁾等の方法により検出した。

10. マウスの実験的緑膿菌感染症に対する治療効果

マウスは SLC-ICR (4週令♂体重18~20g) を1群5匹で用い, *P. aeruginosa* 0811 株の10%馬血清加 HIA 18時間培養菌体をリン酸緩衝生理食塩水に浮遊し等量の10% ムチン (Difco) と混合して, その0.5 ml (約 10^8 cells) を腹腔内に接種した。薬剤は菌接種1, 4時

Fig. 1 Resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* to ABPC, MDIPC and their combinationTable 2 MIC of ABPC, ABPC+MDIPC, and CEZ against *E. coli* NIHJ-JC and *P. aeruginosa* IFO 3445

Test organism	Inoculum size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		ABPC	ABPC+MDIPC	CEZ	MDIPC
<i>E. coli</i> NIHJ-JC 2	10^8	3.1	3.1	0.8	400
	10^9	6.3	6.3	1.6	800
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	10^8	800	400	1600	>3200
	10^9	3200	800	>3200	>3200

間後の2回等量を皮下投与した。判定は7日後の生存と生残例の剖検所見によった。

実験成績

1. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床から分離した74株の緑膿菌に対するABPC, MDIPC および ABPC-MDIPC 併用時の最小発育阻止濃度を測定した。その成績の一部は Table 1 に示し, 全株の結果を Fig. 1 に表わした。

その結果, 緑膿菌のほとんどすべての株に対して ABPC-MDIPC 併用剤は協力作用を示した。

2. 増殖曲線に及ぼす影響

MIC 値において協力効果の認められた *P. aeruginosa* 0812 株について, 増殖曲線におよぼす ABPC, ABPC-MDIPC 併用剤の影響を調べた。Fig. 2 に示したように, 併用剤は MIC の1/2量の200 $\mu\text{g/ml}$ で15時間以上におわたる増殖抑制がみられた。

3. 混合培養系における生菌数に及ぼす影響

E. coli NIHJ-JC 2 株および *P. aeruginosa* IFO 3445 株を用いて混合培養系における ABPC-MDIPC 併用剤の抗菌作用を ABPC および CEZ と比較した。なお各菌株の 10^8 cells/ml および 10^8 cells/ml 接種による MIC 値を Table 2 に示した。

Fig. 3 a, Fig. 3 b は緑膿菌 10^8 cells/ml, 大腸菌 10^7 cells/ml の割合で混合培養したものを対照として薬剤を種々の濃度に添加し, 増殖曲線の変化によって抗菌作

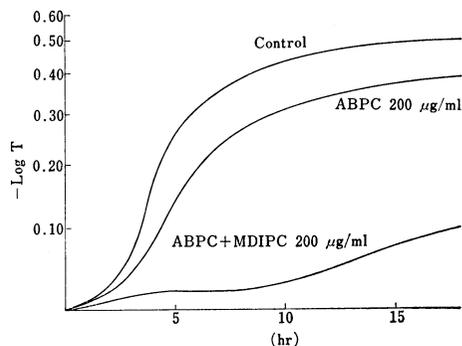
Fig. 2 Effect of ABPC and ABPC+MDIPC on growth of *P. aeruginosa* 0812

Fig. 3 Effect of ABPC, CEZ and a combination of ABPC and MDIPC on growth of *P. aeruginosa* IFO 3445 and *E. coli* NIHJ-JC 2 in mix culture

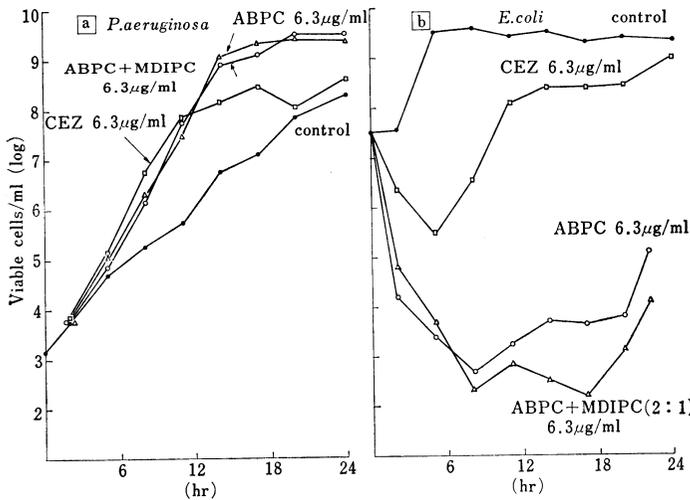
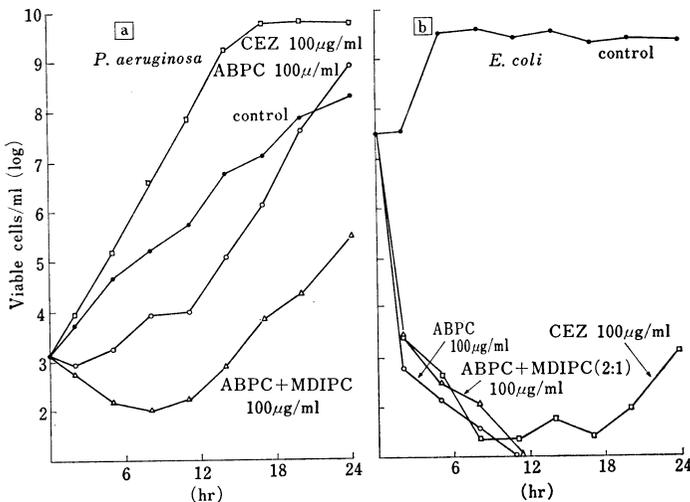


Fig. 4 Effect of ABPC, CEZ and a combination of ABPC and MDIPC on growth of *P. aeruginosa* IFO 3445 and *E. coli* NIHJ-JC 2 in mix culture



用を比較したものである。

Fig. 3 aは緑膿菌, Fig. 3 bは大腸菌の生菌数をまとめた。緑膿菌は薬剤濃度が $6.3 \mu\text{g/ml}$ のときはいずれの薬剤添加によっても対照より速く増殖し, これらの曲線は図中にはないが緑膿菌単独培養の時の薬剤無添加の増殖曲線とほぼ一致した。一方, 大腸菌は ABPC および ABPC-MDIPC 併用剤 $6.3 \mu\text{g/ml}$ 添加によりかなり長時間の増殖抑制がみられたが CEZ $6.3 \mu\text{g/ml}$ では早い時間に増殖状態に入っていた。薬剤濃度が $100 \mu\text{g/ml}$

Table 3 Inhibition of β -lactamase activity by MDIPC

Conc. of MDIPC ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)
0	0
100	93.7
50	87.5
25	81.2
12.5	75.0

β -lactamase was prepared from *P. aeruginosa* strain 0812.

ABPC ($2.8 \mu\text{g/ml}$) was used as substrate.

の場合の結果を Fig. 4 a, Fig. 4 b に示した。

緑膿菌は CEZ 添加により対照より急激に増殖したが ABPC および併用剤添加では増殖が抑制され, とくに併用剤のほうが顕著に増殖を抑制した。大腸菌は ABPC 単剤, ABPC-MDIPC 併用剤で完全に死滅したが CEZ では 24 時間後で 10^3 cells/ml の生存が認められた。また緑膿菌単独培養の時の薬剤無添加の場合は Fig. 4 a の CEZ $100 \mu\text{g/ml}$ の曲線とほぼ一致した。

4. MDIPC による緑膿菌 β -ラクタマーゼの活性阻害と増殖に及ぼす影響

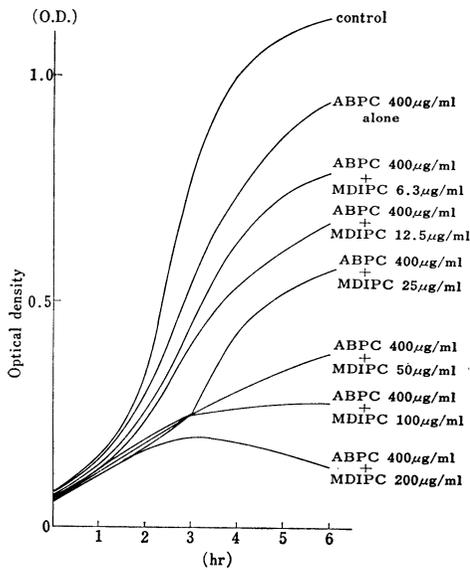
M. H. RICHMOND らが報告しているように緑膿菌は誘導型のセファロスポリナーゼを産生しており⁸⁾, ABPC-MDIPC 併用剤が ABPC 単剤にくらべ緑膿菌に対して抗菌力が優るのはセファロスポリナーゼによる ABPC 不活化を MDIPC が阻害しているためと考えられた。そこで *P. aeruginosa* 0812 株から β -ラクタマーゼを調製し, 種々の濃度の MDIPC 添加により β -ラクタマーゼの ABPC 分解活性が阻害されるかどうか検討した。Table 3 に示したように, いずれの濃度の MDIPC 添加に

Table 4 MIC and β -lactamase activity of *P. aeruginosa* strain 0812 and its β -lactamase less mutant

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			β -lactamase activity (units/mg)
	ABPC	MDIPC	ABPC+MDIPC	
0812	>3200	>3200	800	20.88
0812-M 2*	500	>3200	100	0.03

* β -lactamase less mutant of strain 0812

Fig.5 Effect of MDIPC concentration on growth of *P. aeruginosa* 0812



よっても β-ラクタマーゼの活性が阻害されたが、その阻害率は MDIPC の濃度に依存していた。

また *P. aeruginosa* 0812 において培養液中に ABPC 400 µg/ml を加えておき MDIPC を 100, 50, 25, 12.5 および 6.3 µg/ml 添加した時の増殖に与える影響を調

べた。その結果、緑膿菌の増殖は加えた MDIPC の濃度に依存して抑制が起こることがみとめられた (Fig.5)。

5. β-ラクタマーゼ非産生緑膿菌に対する抗菌力

P. aeruginosa 0812 株を用いて β-ラクタマーゼを産生しない変異株を分離し併用剤の効果が表われるか否かを調べた。Table 4 に親株と変異株の MIC 値および β-ラクタマーゼの活性を示した。

変異株では β-ラクタマーゼ活性が親株のそれにくらべて約 700 分の 1 に減少しており併用剤の協力作用は変異株に対しては認められなくなった。

6. マウスの実験的緑膿菌感染症に対する治療効果

緑膿菌で攻撃したマウスを ABPC-MDIPC 併用剤で治療したところ、Table 5 に示すように ABPC-MDIPC 併用剤は ABPC にくらべ明らかな協力効果を示した。

考 察

ABPC と MDIPC あるいは ABPC と MCIPC の併用効果については腸内細菌に対する効果を中心に報告されている⁹⁾。本実験では、緑膿菌に対する ABPC-MDIPC 併用剤について *in vitro* での抗菌力および *in vivo* の感染治療実験により検討を加えた。臨床分離緑膿菌 74 株のほとんどに対して併用剤は協力作用を示し、また増殖曲線の実験でも 1/2 MIC の濃度で 15 時間以上にわたる増殖抑制を示した。さらにマウスでの緑膿菌感染治療実験でも併用剤は ABPC 単独投与よりも治療効果を示し、その協力作用が *in vivo* でも確認された。β-ラクタマ

Table 5 Protective effect of ABPC, CBPC and ABPC+MDIPC against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice*

Dose(mg/kg)	Mortality on day 7 th	Gross lesions in survivals (Organs)	ED ₅₀ (mg/mg)
ABPC+MDIPC 2,000×2	0/5	0/5	670×2
1,000×2	0/5	0/5	
500×2	4/5	1/1 (Spleen, Liver, Kidney)	
250×2	5/5		
ABPC 4,000×2	5/5		> 4,000×2
2,000×2	5/5		
1,000×2	5/5		
500×2	5/5		
CBPC 1,000×2	0/5	0/5	225×2
500×2	0/5	2/5 (Spleen, Liver)	
250×2	1/5	2/4 (Spleen, Liver)	
125×2	5/5		
Control	5/5		

* Mice : Slc : ICR strain, male, 4 weeks old, 20g 5/group.
 Infection : *Pseudomonas aeruginosa* 0811, 10⁵ cells/mouse mucin (Difco) suspension, 0.5 ml/mouse, intraperitoneally.
 Therapy : 1 and 4 hrs after challenge, subcutaneously.
 ED₅₀ : Simple probit method.

ーゼを用いた実験では、基質としての ABPC に少量の MDIPC を添加することにより著しい β -ラクタマーゼ活性阻害が認められた。また *P. aeruginosa* 0812 株から分離した β -ラクタマーゼ非産生変異株に対しては併用剤の協力効果は認められなかった。これらの実験結果から緑膿菌に対する ABPC-MDIPC 併用剤の協力作用は既に腸内細菌に対する協力作用の解析で報告したように、ABPC を加水分解する β -ラクタマーゼ、とくにセファロスポリナーゼ活性を MDIPC が阻害することにより ABPC の抗菌力が保持されることにその主因があると考えられる。さらに緑膿菌と大腸菌との混合培養系においても ABPC-MDIPC 併用剤が両菌種の増殖を最もよく抑制したが CEZ では感受性大腸菌に対しても十分な抗菌力を示せなかった。これは緑膿菌の産生する β -ラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ) により CEZ が ABPC より容易に加水分解されるためと考えられる¹⁰⁾。このことはセファロスポリナーゼ産生菌と感受性菌との混合感染の場合はセファロスポリン系薬剤よりペニシリン系薬剤、とくにセファロスポリナーゼ阻害により協力作用を示す ABPC-MDIPC 併用剤のほうが有効で、菌交代によるセファロスポリナーゼ産生菌の増殖をセファロスポリン系抗生剤よりも強く抑制し菌交代現象防御の可能性について示唆するものである。しかし今回の混合培養系の実験が生体内での混合感染の状態をどれだけ反映しているか疑問が残るが、少なくとも尿路内に限ってみればかなり近い状態にあると考えられる。しかし ABPC-MDIPC 併用剤の MIC 値が 50~800 $\mu\text{g/ml}$ と比較的高いことから臨床的意義についてはさらに検討の余地があると思われる。

結 論

今回、我々は ABPC-MDIPC 併用剤を用いて *in vitro*, *in vivo* で緑膿菌に対する効果を検討し、次のような結論を得た。

- 1) 臨床分離緑膿菌 74 株のほとんどに対して併用剤は協力作用を示した。
- 2) マウスでの緑膿菌感染治療実験でも併用剤は ABPC 単独投与よりも治療効果を示した。
- 3) 緑膿菌から分離した β -ラクタマーゼを用いて ABPC の分解を調べたところ、少量の MDIPC 添加により ABPC の分解は著しく抑制された。

4) β -ラクタマーゼ非産生緑膿菌においては協力作用は認められなかった。

以上から緑膿菌に対する協力作用は、菌の産生する β -ラクタマーゼ、とくにセファロスポリナーゼが MDIPC により阻害され、ABPC の抗菌力が発揮されるものと考えられる。

文 献

- 1) 三宅 章, 嵯峨井均, 斎藤 哲, 安藤拓司, 五島 瑳智子: Ampicillin・Dicloxacillin の協力作用に関する研究。I。試験管内抗菌作用。Chemotherapy 21(6): 1235~1240, 1973
- 2) 石川浩明, 鈴木忠清, 星野保夫, 安藤拓司, 五島 瑳智子: Ampicillin・Dicloxacillin の協力作用に関する研究。II。吸収及び排泄。Chemotherapy 21(6): 1241~1247, 1973
- 3) 横井山繁行, 鳥屋実, 星野保夫, 安藤拓司, 五島 瑳智子: Ampicillin・Dicloxacillin の協力作用に関する研究。III。マウス感染実験。Chemotherapy 21(6): 1241~1247, 1973
- 4) 五島瑳智子, 辻 明良, 高橋邦子, 金子康子, 桑原章吾: 日細誌 39, 295, 1977
- 5) PERRET, C. J.; Iodometric assay of penicillinase. Nature 174: 1012~1013, 1954
- 6) EDWARD, A. ADELBERG; MORTON MANDEL & GRACE CHEIN CHING CHEN; Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18 No. 5~6: 788~795, 1965
- 7) ROSSELET, A. & W. ZIMMERMANN; Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with impaired β -lactamase inducibility and increased sensitivity to β -lactam antibiotics. J. Gen. Microb. 76: 455~457, 1973
- 8) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES; The β -lactamase of gram-negative bacteria and their possible physiological role; Advanced in Microbial Physiology, Vol. 9 pp. 31~88, Academic Press, London & New York, 1973
- 9) NISHIDA, M.; Y. MINE & S. KUWAHARA; Synergistic activity of ampicillin and cloxacillin. Protective effect of cloxacillin on enzymatic degradation of ampicillin by penicillinase, and therapeutic activity of mixture of ampicillin and cloxacillin. J. Antibiotics 22: 144~150, 1969
- 10) GRINSTED, J. & R. B. SYKES; Properties of an R-factor which originated in *P. aeruginosa* 1822. J. Bact. 110: 529~537, 1972

SYNERGISTIC EFFECT OF AMPICILLIN AND DICLOXACILLIN
ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. IV

TOSHIRO MOROHOSHI, JUNZO MIZOGUCHI, HITOSHI SAGAI,
SHIGEYUKI YOKOIYAMA, KIMIO MIZUNO

Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd., Shizuoka-ken

AKIYOSHI TSUJI and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo

Synergistic effect of a combination of ampicillin (ABPC) and dicloxacillin (MDIPC) on *Pseudomonas aeruginosa* has been studied *in vitro* and *in vivo*.

The combined drug inhibited the growth of *P. aeruginosa* at relatively lower concentrations (50~800 $\mu\text{g/ml}$) than those of ABPC.

This synergistic effect on *P. aeruginosa* was also verified in experimental *P. aeruginosa* infection in mice, the ED₅₀ value was under one-fifth to that of ABPC alone.

Furthermore, in the experiment of mixing culture in which *E. coli* was coexistent with *P. aeruginosa* the combined drug exhibited a stronger inhibitory activity against both strains than ABPC alone or cefazolin.

These synergistic effects of the combined drug might attribute to the inhibiting action of MDIPC on β -lactamase of *P. aeruginosa*, and this is also suggested by the evidence that the susceptibility of β -lactamase less mutant of *P. aeruginosa* against the drug is unchanged.