

Mezlocillin の嫌気性菌に対する抗菌作用

望月 泉・渡辺邦友・今村博務・江崎孝行・甲畑俊郎・二宮敬宇・上野一恵・鈴木祥一郎
 岐阜大学医学部微生物学教室

新しい半合成ペニシリンである Mezlocillin (BAY f 1353) は、好気性菌に対しては広い抗菌スペクトラムを示し、グラム陽性菌に対する抗菌力は、Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC) と同等で、グラム陰性のうち腸内細菌科に対しては、ABPC, CBPC より優れた抗菌力を有するといわれている^{1,2)}。

著者らは Mezlocillin の嫌気性菌に対する抗菌作用について検討したので報告する。

I. 実験方法

1. 供試菌株

教室保育の嫌気性菌118株を用いた。内訳は嫌気性グラム陰性菌78株、嫌気性グラム陽性菌40株である。

2. 薬剤感受性測定法

主として GAM 寒天培地 (日水) を基礎培地とした平

板希釈法を用いた。GAM ブイヨン (日水) で24時間嫌気培養した被検菌を「渡辺の方法」^{3,4)}により希釈し、多目的アパラツスにて薬剤含有平板に接種し、24時間 anaerobic chamber 内 (ガス環境は N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%である。) で嫌気培養後、MIC を判定した。

3. MIC に及ぼす諸因子の影響

培地の差異による MIC の変動は、GAM 寒天培地と TEP 培地 (栄研)、5%ウサギ血液加 Brucella agar (BBL) および Brain Heart Infusion agar (BBL) を用いて比較検討した。さらに培地 pH および接種菌量の影響は、基礎培地に GAM 寒天培地を用いて検討した。

4. 試験管内耐性獲得

各濃度 (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 μ g/ml) の薬剤含有 GAM 半流動高層培地に被検菌の

Table 1 Antibacterial spectrum of Mezlocillin and other antibiotics

| Organism | Mezlocillin | ABPC | CBPC | CEZ | CLDM |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (Ku-15) | 12.5 | 12.5 | 25 | 100 | >100 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (J-1007) | 12.5 | 12.5 | 25 | 50 | >100 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>thetaiotaomicron</i> (S-44) | 25 | 50 | 50 | 100 | 3.13 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i> (HI-4) | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 25 | 0.39 |
| <i>B. praeacutus</i> (ATCC 25539) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 3.13 |
| <i>B. convexus</i> (Werner 6896) | 6.25 | 0.78 | 1.56 | 1.56 | 0.39 |
| <i>F. varium</i> (ATCC 8501) | 12.5 | 3.13 | 3.13 | 6.25 | 3.13 |
| <i>F. russii</i> (ATCC 25533) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 0.39 | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 |
| <i>F. nucleatum</i> (Mw-29) | ≤ 0.19 |
| <i>F. freundii</i> (ATCC 9817) | 6.25 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | ≤ 0.19 |
| <i>F. necrophorum</i> (S-45) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 6.25 | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 |
| <i>F. glutinosum</i> (Ju-21) | 25 | 3.13 | 1.56 | 12.5 | 6.25 |
| <i>F. mortiferum</i> (J-1012) | 12.5 | 50 | 6.25 | 25 | 0.39 |
| <i>V. parvula</i> (Kw-5) | >100 | >100 | >100 | >100 | ≤ 0.19 |
| <i>C. perfringens</i> (JAM-3-1) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 1.56 | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 |
| <i>E. limosum</i> | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 25 | 6.25 | ≤ 0.19 |
| <i>Bif. adolescentis</i> | 0.78 | 0.78 | 3.13 | 6.25 | ≤ 0.19 |
| <i>Bif. longum</i> | 0.78 | 0.78 | 3.13 | 25 | ≤ 0.19 |
| <i>P. variabilis</i> (ATCC 14956) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 1.56 | 1.56 | 0.78 |
| <i>P. prevotii</i> (ATCC 9321) | ≤ 0.19 | ≤ 0.19 | 0.78 | 0.78 | ≤ 0.19 |
| <i>Ps. productus</i> (ATCC 27340) | 25 | 0.78 | 6.25 | 3.13 | 0.78 |
| <i>P. magnus</i> (JO-26) | ≤ 0.19 | 0.39 | 1.56 | 3.13 | ≤ 0.19 |

1白金耳量を接種, 37°C, 24時間培養後, 最高薬剤含有培地に発育した菌株の1白金耳量を新しい系列の薬剤含有 GAM 半流動培地に移植する, いわゆる増量的継代

法により耐性上昇試験を行なった。被検菌は *B. fragilis* ss. *vulgatus* (4743), *F. varium* (1004) および *Ps. anaerobius* (B-38) を用いた。

Table 2 MIC distributions of Mezlocillin against anaerobic bacteria (1)

| Organism | No. of strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|--|----------------|--------------------------|------|------|------|----|----|------------|
| | | ≤ 0.19 | 1.56 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | ≥ 100 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> | 24 | | | 7 | 12 | 3 | | 2 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>thetaiotaomicron</i> | 9 | | | 1 | | 7 | | 1 |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i> | 5 | | | 4 | 1 | | | |
| <i>B. fragilis</i> ss. <i>distasonis</i> | 1 | | | | 1 | | | |
| <i>B. praeacutus</i> | 1 | 1 | | | | | | |
| <i>B. convexas</i> | 1 | | | 1 | | | | |
| <i>F. varium</i> | 19 | | | 2 | 9 | 6 | 1 | 1 |
| <i>F. glutinosum</i> | 3 | | | | | 2 | | 1 |
| <i>F. russii</i> | 2 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>F. necrogenes</i> | 1 | | 1 | | | | | |
| <i>F. necrophorum</i> | 1 | 1 | | | | | | |
| <i>F. nucleatum</i> | 1 | 1 | | | | | | |
| <i>Fusobacterium</i> sp. | 5 | | | | 2 | 1 | 2 | |
| <i>F. freundii</i> | 1 | | | 1 | | | | |
| <i>F. mortiferum</i> | 1 | | | | 1 | | | |
| <i>V. parvula</i> | 2 | | | | 1 | | | 1 |
| <i>Veillonella</i> sp. | 1 | | | | | | | 1 |

Table 3 MIC distributions of Mezlocillin against anaerobic bacteria (2)

| Organism | No. of strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | |
|----------------------------|----------------|--------------------------|------|------|------|----|
| | | ≤ 0.19 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 25 |
| <i>C. perfringens</i> | 7 | 7 | | | | |
| <i>C. sporogenes</i> | 3 | 2 | | 1 | | |
| <i>C. histolyticum</i> | 1 | 1 | | | | |
| <i>C. sticklandii</i> | 1 | | 1 | | | |
| <i>C. tetani</i> | 1 | 1 | | | | |
| <i>E. limosum</i> | 3 | 3 | | | | |
| <i>Bif. adolescentis</i> | 3 | | | 3 | | |
| <i>Bif. longum</i> | 3 | | | 3 | | |
| <i>Bif. infantis</i> | 1 | | | | 1 | |
| <i>P. magnus</i> | 8 | 6 | | 2 | | |
| <i>P. variabilis</i> | 2 | 2 | | | | |
| <i>P. consrellum</i> | 2 | 2 | | | | |
| <i>P. asaccharolyticus</i> | 1 | 1 | | | | |
| <i>Ps. anaerobius</i> | 1 | | | | 1 | |
| <i>Ps. productus</i> | 1 | | | | | 1 |
| <i>P. prevotii</i> | 1 | 1 | | | | |
| <i>Peptococcus</i> sp. | 1 | 1 | | | | |

5. 自然耐性 mutant の分布

Ps. anaerobius (B-38) および *F. varium* (1004) の各濃度の菌液 0.1 ml ずつを、各濃度の Mezlocillin 含有 GAM 平板培地にコンラージ棒により一様に拡散塗抹、4 日間嫌気培養後、発育した集落について検討した。

6. 実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果

以上のような Mezlocillin の *in vitro* での抗菌作用が *in vivo* ではどのように反映されるかについて、マウスにおける実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果を検討した。感染菌株に *F. necrophorum* (S-45) を用いた。この菌株は dd-N 系マウスに生菌数 10^5 個以上を皮下接種すれば、2~3 日で局所に厚い被膜をもった膿瘍

を形成する⁵⁾。この菌株に対する Mezlocillin の MIC は $0.19 \mu\text{g/ml}$ 以下である。

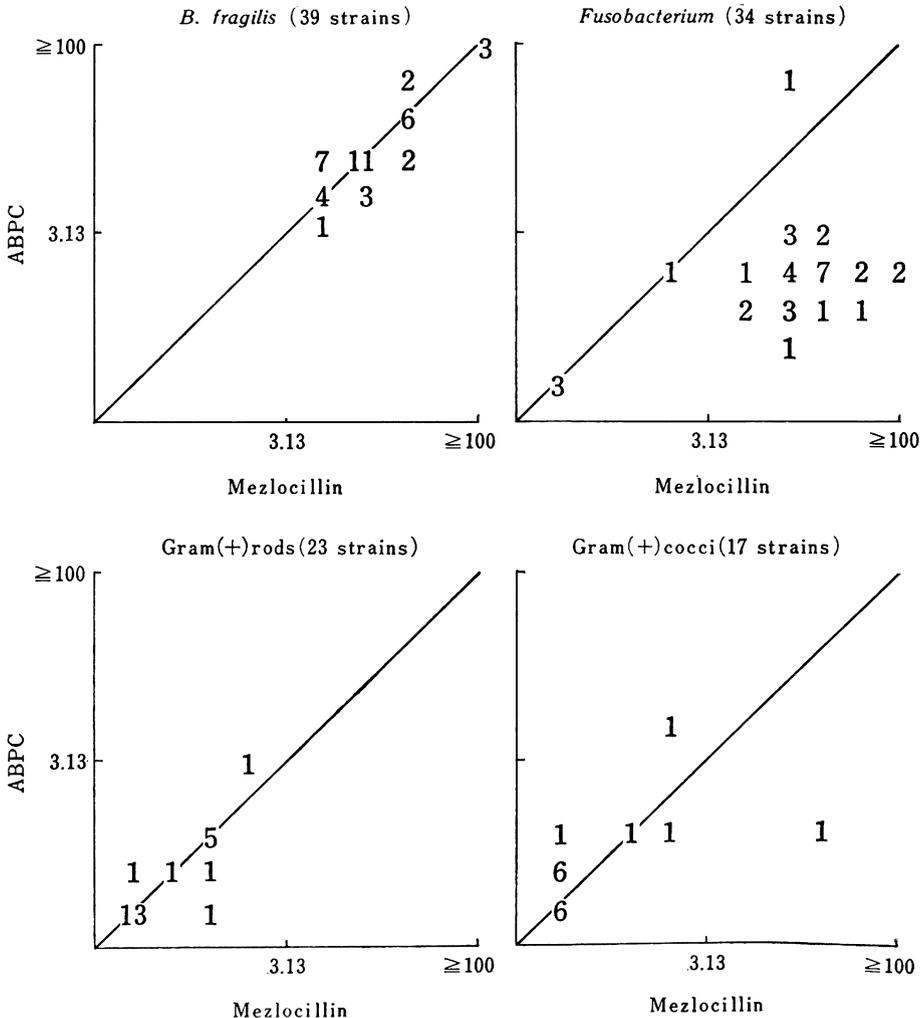
dd-N 系マウスに *F. necrophorum* (S-45) の 10^7 個/ml を皮下に接種し、3 日後触診によって局所に膿瘍形成を認めたものを実験に供した。1 群 5 匹とし、Mezlocillin の投与量を 1 日、マウス 1 匹あたり 1 mg, 5 mg, 10 mg とし、1 日 1 回、皮下接種および筋肉内注射で投与した。

膿瘍の消失および縮少の程度を触診で観察した。また 7 日間の投薬後、翌日マウスを屠殺剖検し、菌接種局所、脾、腎、肝、肺、心臓を培養した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

Fig. 1 Correlation of antibacterial activity of Mezlocillin with ABPC against anaerobic bacteria



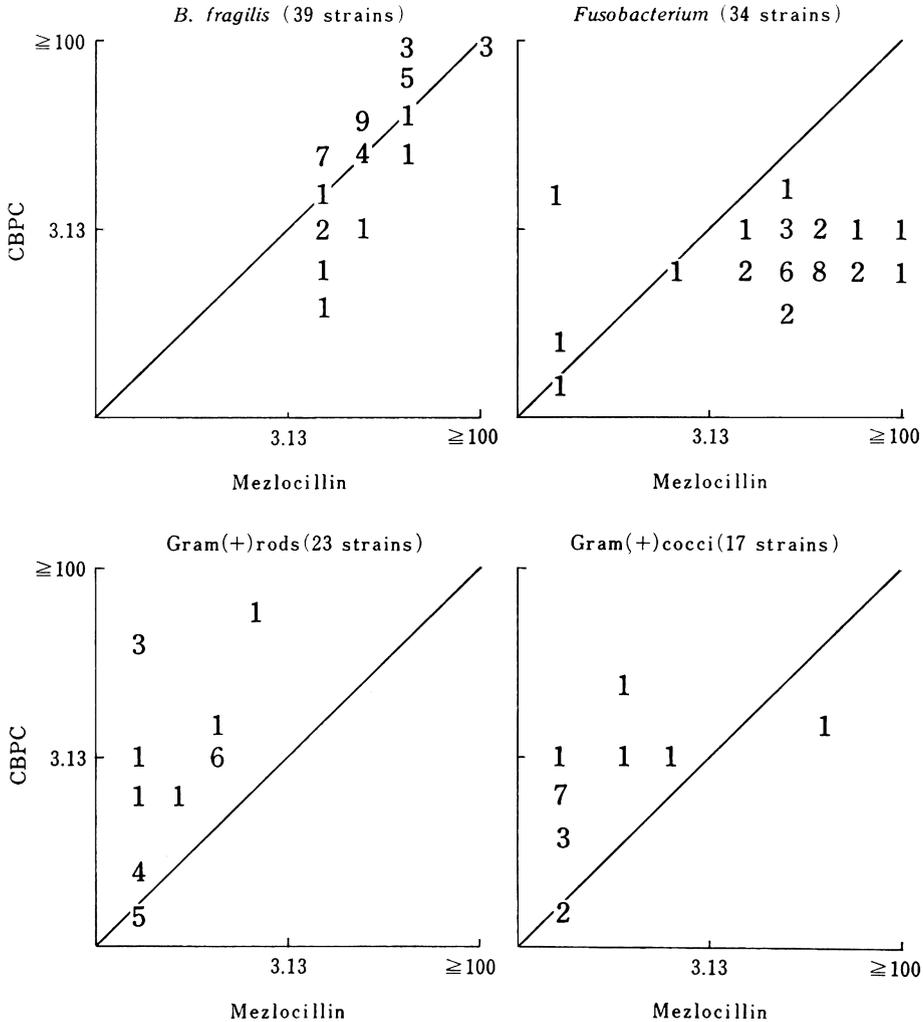
嫌気性グラム陰性菌に対する Mezlocillin の抗菌力を ABPC, CBPC, Cefazolin (CEZ) および Clindamycin (CLDM) と比較した成績を Table 1 に示した。 *B. fragilis* では、12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、ABPC, CBPC と同等であった。CLDM に 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性の *B. fragilis* ss. *fragilis* (Ku-15, J-1007) 2 株に対して、Mezlocillin, ABPC および CBPC の薬剤は CLDM 感受性菌と同等の抗菌力を有していた。

実験に供した *Fusobacterium* のうち、*F. varium*, *F. freundii*, *F. glutinosum* および *F. mortiferum* には 6.25~25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、*F. russii*, *F. nucleatum* および *F. necrophorum* には 0.19 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。他の薬剤もほぼ同様の MIC を示した。

嫌気性グラム陽性菌に対しては、*Ps. productus* が 25 $\mu\text{g/ml}$ であったのを除き、他はすべて 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC であった。これは ABPC, CLDM より少し劣るが、CBPC, CEZ よりは優れている。

Table 2 と Table 3 には、標準菌株11株と臨床分離株および常在フローラから分離した107株に対する成績を示した。Table 2 に示す如く、*B. fragilis* 39株に対しては、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。*Fusobacterium* 34株に対する Mezlocillin の感受性は2群に分れる。即ち、*F. russii*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum* および *F. nucleatum* の菌種に対しては、1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を示し、その他の *Fusobacterium* には 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。*Veillonella* では3株とも 12.5

Fig. 2 Correlation of antibacterial activity of Mezlocillin with CBPC against anaerobic bacteria



μg/ml 以上であった。

Table 3 にはグラム陽性菌の成績を示した。

Clostridium 13株には、すべて 0.78 μg/ml 以下の MIC を示し、無芽胞グラム陽性桿菌の10株に対しては 1.56 μg/ml 以下の MIC を示した。またグラム陽性球菌では17株中16株が 1.56 μg/ml 以下の MIC であった。

2. Mezlocillin と他薬剤の嫌気性菌に対する MIC の 相関

Fig. 1 には ABPC との MIC の相関を示した。

Fusobacterium を除き、*B. fragilis*, グラム陽性桿菌, グラム陽性球菌には、ABPC とほぼ同等の抗菌力を示した。

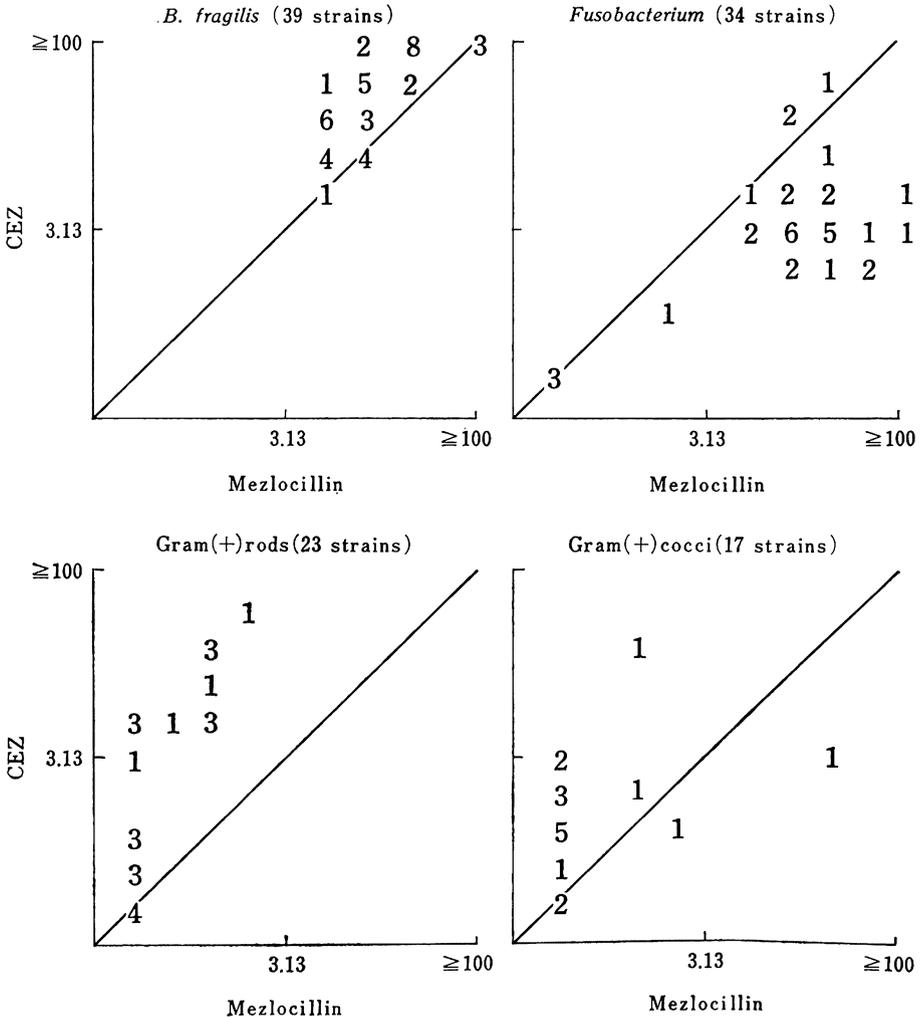
CBPC との比較では、Fig. 2 の如く *B. fragilis* に

対しては CBPC より1希釈濃度程度よい MIC を示すが、*Fusobacterium* に対しては、CBPC より劣る。グラム陽性桿菌, グラム陽性球菌に対しては CBPC より優れた MIC を示した。

CEZ との比較を Fig. 3 に示した。*B. fragilis*, グラム陽性桿菌, グラム陽性球菌等では、Mezlocillin の方が優れており、*Fusobacterium* に対しては CEZ の方が優れている。

CLDM との比較では、Fig. 4 の如く、*B. fragilis*, *Fusobacterium* に対しては CLDM より MIC が劣った。しかし *B. fragilis* の CLDM 耐性株に対しては、Mezlocillin は優れた MIC を示した。グラム陽性菌に対しては、Mezlocillin と CLDM は同等の抗菌力を示

Fig. 3 Correlation of antibacterial activity of Mezlocillin with CEZ against anaerobic bacteria



した。

3. MIC に及ぼす諸因子の影響

MIC 測定に用いる各種の基礎培地による MIC 値の変動を Fig. 5 に示した。

血液を加えない GAM と TEP 培地では、ほとんど同様の MIC 値を示したが、血液を加えた Brucella agar, BHIA では、菌株によっては1~2希釈段階程度の MIC の差が見られた。

接種菌量による MIC の変動は Fig. 6 の如くで、接種菌量によって MIC は大きく変動した。特に *B. fragilis* ss. *fragilis* および *C. perfringens* にその傾向が強く認められた。即ち、 10^8 CFU/ml の接種菌量では、 10^7 および 10^6 CFU/ml の接種菌量に比べ、5~3希釈段階

の MIC の変動が見られた。

培地 pH による MIC の変動は Fig. 7 に示した。全体としては一定の傾向は見られないが、グラム陰性菌の一部の菌種に対しては、アルカリ側でより強い抗菌力を示した。

4. 試験管内耐性獲得

Fig. 8 に示す如く、*B. fragilis* ss. *vulgatus* は薬剤含有培地の7代継代培養によって、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ から $100 \mu\text{g/ml}$ に、*F. varium* では6代の継代後に $6.25 \mu\text{g/ml}$ から $100 \mu\text{g/ml}$ にそれぞれ耐性が上昇した。また *Ps. anaerobius* は13代の継代により $1.56 \mu\text{g/ml}$ から $12.5 \mu\text{g/ml}$ の上昇を示した。それぞれの被検菌株の薬剤含有培地継代後の耐性獲得菌株を薬剤不含 GAM 半流動

Fig. 4 Correlation of antibacterial activity of Mezlocillin with CLDM against anaerobic bacteria

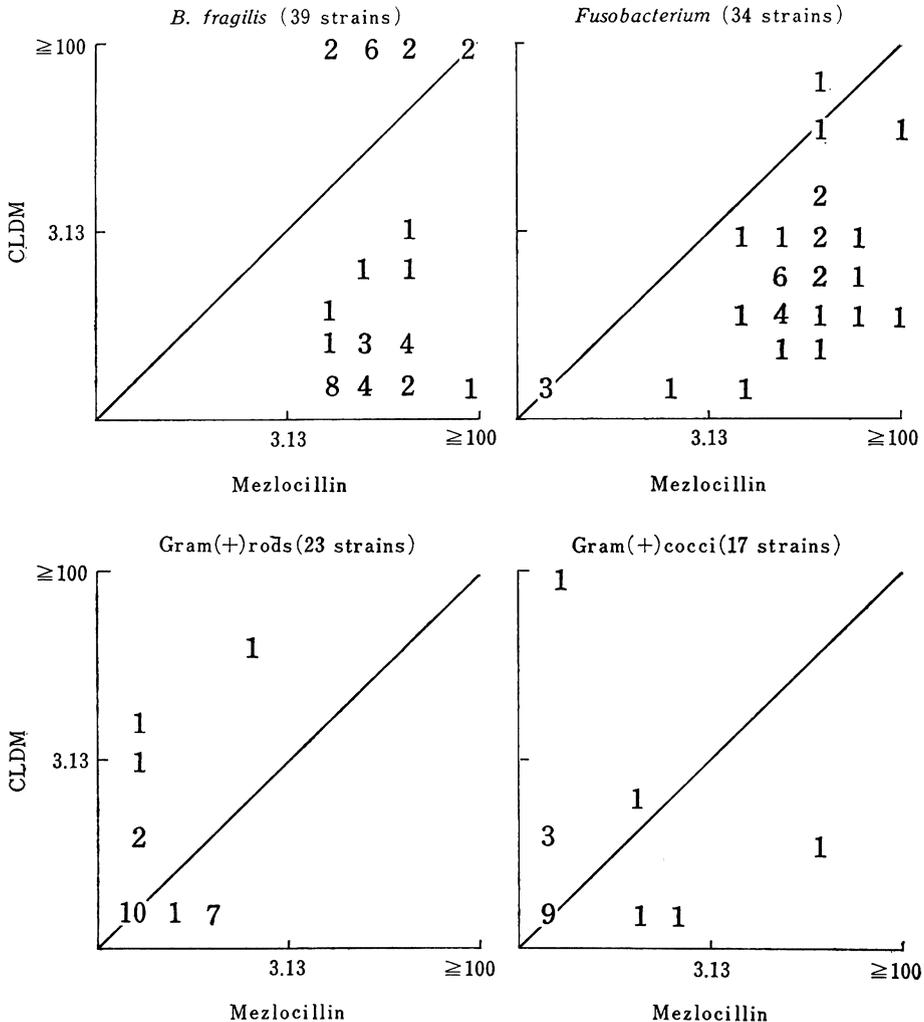


Fig. 5 MIC of Mezlocillin on various media

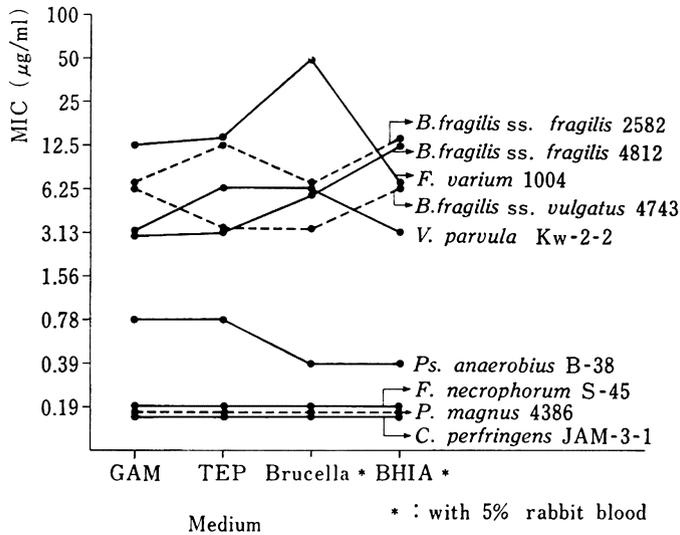


Fig. 6 Influence of inoculum size on antibacterial activity of Mezlocillin

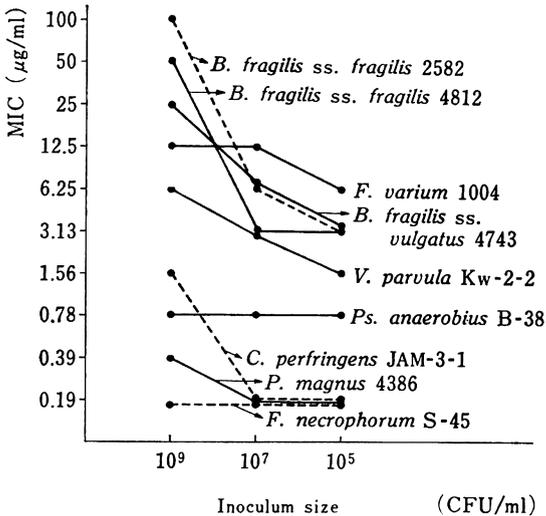
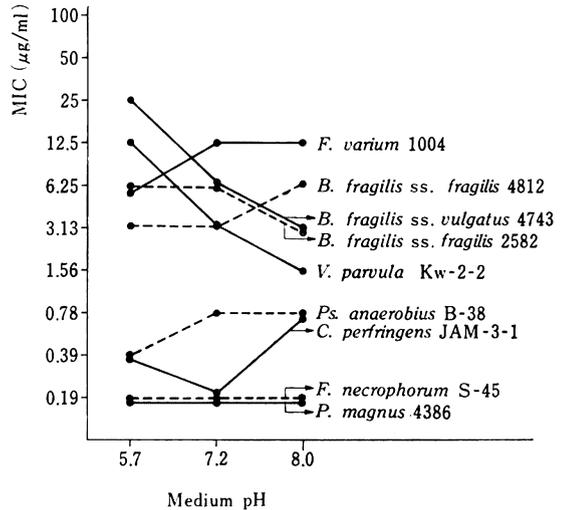


Fig. 7 Influence of medium pH on the activity of Mezlocillin



培地にて1代継代後、MICを測定した成績はFig. 8の如くで、それぞれ高度な耐性を獲得している事が認められた。

5. 自然耐性 mutant の分布

Table 4 に示す如く、*Ps. anaerobius* (B-38), *F. varium* (1004) の各菌株の 10⁹ CFU/ml 以下の接種菌量では、62.5 µg/ml から 1,000 µg/ml までの自然耐性 mutant の出現は認められなかった。

6. 実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果

成績は Table 5 に示すとおりで、膿瘍形成マウスに

対して薬剤の皮下投与群、筋肉内投与群のいずれの投与方法でも、5 mg/day, 10 mg/day では同様の成績を示した。即ち、これらの投与方法で各臓器の菌は消失し、局所膿瘍も消失した。また体重増加も認められた。一方 1 mg/day 投与群では、皮下および筋肉内投与方法で、それぞれ1匹ずつ局所膿瘍から *F. necrophorum* が検出された。

III. 考察および結論

Mezlocillin の *Fusobacterium* に対する抗菌力は ABPC, CBPC, CEZ および CLDM より若干劣るが、

Fig. 8 Development of resistance of *Ps. anaerobius*, *B. fragilis* ss. *vulgatus* and *F. varium* in vitro

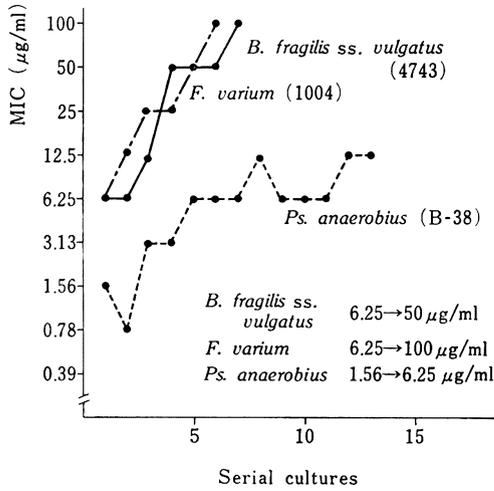


Table 4 Population of natural resistant mutants of anaerobes to Mezlocillin

| Organism | No. of mutant Inoculum size | Mezlocillin (µg/ml) | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------|-----|-----|-----|------|
| | | 62.5 | 125 | 250 | 500 | 1000 |
| <i>Ps. anaerobius</i> (B-38) | 1 × 10 ⁹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 × 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 × 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>F. varium</i> (1004) | 3 × 10 ⁹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 × 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 × 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 5 Subcutaneous abscess treatment of experimental mice infections due to *F. necrophorum* with Mezlocillin (ddN mouse 5 animals/group)

| Administration route | Dose mouse/day | Autopsy findings | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|----------------|------------------|-------------|-------------------|-------|-------|------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|--------|--------|-------|------|-------|
| | | Condition of fur | Body weight | Local findings | | | | Subcutaneous abscess | Splenomegaly ^{b)} | Recovery of organism from : | | | | | |
| | | | | Phyma | Crust | Ulcer | Cure | | | Subcutaneous abscess | Spleen | Kidney | Liver | Lung | Heart |
| s. c. | 1 mg | Good | ↑ | 2/5 ^{a)} | 3/5 | | | 1/5 | - | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 5 mg | Good | ↑ | | 2/5 | 3/5 | | 0/5 | - | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 10 mg | Good | ↑ | | | 5/5 | | 0/5 | - | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Control | | Poor | ↓ | 5/5 | | | | 5/5 | + | 5/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 |
| i. m. | 1 mg | Good | ↑ | 1/5 | 4/5 | | | 1/5 | - | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 5 mg | Good | ↑ | | 1/5 | 4/5 | | 0/5 | - | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 10 mg | Good | ↑ | | | 5/5 | | 0/5 | - | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Control | | Poor | ↓ | 5/5 | | | | 5/5 | + | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

a) No. of mouse positive in each finding/No. of mouse tested

b) Splenomegaly : treated group ; 0.22 g control group ; 0.54 g

Bacteroides, 嫌気性グラム陽性桿菌および球菌に対しては, ABPC, CLDM と同等で CBPC, CEZ よりは優れている事を認めた。

WERNER は⁶⁾. *Bacteroides* 89株に対して Mezlocillin の MIC を測定し, 16 µg/ml 以下の MIC は81%, 32 µg/ml 以下では96%以上であることを報告している。著者らも同様の成績を得た。即ち供試した *Bacteroides* 41株の内, 16 µg/ml 以下の MIC を示した菌

株は70%, 32 µg/ml 以下の MIC を示した菌株は92%であった。

また近年問題となってきた CLDM 耐性の *B. fragilis*⁷⁾ に対しては, Mezlocillin は優れた抗菌力を示した。

これらの結果は, 近年多く報告される *Bacteroides* による感染症に対し, 本剤が期待される薬剤の1つであることを示唆している。また実験的嫌気性菌感染症の治療実験を行ない, 本剤は有効な臨床効果を得た。

文 献

- 1) BODEY, G. P. & T. PAN: Mezlocillin: *In vitro* studies of a new broad-spectrum penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 74~79, 1977
- 2) KRASEMANN, C.: *In vitro* activity of mezlocillin and azlocillin against gram-negative rods and gram-positive cocci: 16th Interscience Conference on Antimicrob. Agents & Chemother. 346, 1976
- 3) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について, 第1報 MIC に影響する因子。 *Chemotherapy* 22: 1459~1465, 1974
- 4) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について, 第2報再現性について。 *Chemotherapy* 22: 1495~1501, 1974
- 5) 上野一恵, 二宮敬宇, 向坂 孝, 神谷春子, 鈴木祥一郎: *In vivo* における Metronidazole (Flagyl) の嫌気性菌に対する抗菌作用について。 *Clinical Report* 5: 737~739, 1971
- 6) WERNER, H & C. KRASEMANN: Susceptibility of *Bacteroidaceae* to mezlocillin, azlocillin and carbenicillin: 16th Interscience Conference on Antimicrob. Agents & Chemother. 347, 1976
- 7) 今村博務: Clindamycin に対する *Bacteroides fragilis* の耐性獲得に関する研究, 第1報 Clindamycin 服用による糞便内の Clindamycin 耐性 *B. fragilis* の出現。 *Chemotherapy* 25: 380~384, 1977

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MEZLOCILLIN AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

IZUMI MOCHIZUKI, KUNITOMO WATANABE, HIROMU IMAMURA, TAKAYUKI ESAKI,
SHUNRO KOUBATA, KEIU NINOMIYA, KAZUE UENO, SHOICHIRO SUZUKI
Department of Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

Antibacterial activity of Mezlocillin against anaerobic bacteria was tested in comparison with that of Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC), Cefazolin (CEZ) and Clindamycin (CLDM).

MIC of Mezlocillin against Genus *Fusobacterium* was inferior to ABPC, CBPC, CEZ and CLDM.

Mezlocillin showed low level of MIC against *Bacteroides*, Gram positive bacilli and cocci similarly to ABPC and CLDM, and its antibacterial activity was superior to CBPC and CEZ.

Natural resistant mutants of *Ps. anaerobius* and *F. varium* were not obtained on GAM agar plates containing 1000 $\mu\text{g/ml}$ to 62.5 $\mu\text{g/ml}$ of Mezlocillin.

Subcutaneous abscess treatment of experimental mice infections due to *F. necrophorum* with Mezlocillin proved to be effective when the causative organisms were sensitive *in vitro* against this drug.