

緑膿菌に対する Apalcillin, Piperacillin および PC-455 の抗菌作用について

尾花 芳樹・西野 武志・故中沢 昭三

京都薬大微生物

(昭和 55 年 3 月 13 日受付)

我国で開発された Ampicillin あるいは Amoxicillin 誘導体の Apalcillin (APPC), Piperacillin (PIPC) PC-455 についてこの構造中に存在する 3 位の α 位の酸アミド結合置換基の抗菌作用に及ぼす影響について, Carbenicillin (CBPC) を比較薬剤として緑膿菌を用いて検討を行い, 次のような結果が得られた。

1) 抗菌作用型式について検討したところ, APPC, PIPC, PC-455 は CBPC に比べ菌量の影響を受けやすく, 菌量が 5×10^7 cells/ml の場合に薬剤を作用させたところ, CBPC では著明な殺菌作用が認められたが, APPC, PIPC, PC-455 では静菌的な作用しか認められなかった。

2) Spheroplast 形成に及ぼす影響では, CBPC 作用により, 高率に spheroplast が形成されるのに対して, APPC, PIPC, PC-455 作用ではほとんど形成が認められなかった。

3) リゾチーム, アミノ配糖体抗生物質との協力作用について検討を行ったところ, CBPC との併用では著明な協力作用を認めたが, APPC, PIPC, PC-455 との協力作用は CBPC の場合よりも劣っていた。

4) 各薬剤処理菌の菌体構成成分を定量したところ, APPC, PIPC, PC-455 処理菌は菌体内に RNA 分画の蓄積が認められるが, CBPC 処理菌ではこのような現象は認められなかった。

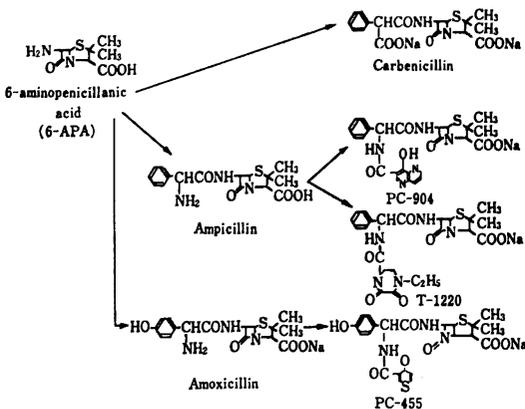
結 論

近年, 難治性緑膿菌感染症を目的とした抗生物質が世界各国で研究開発され, その中でも合成ペニシリンの開発は目ざましいものがあり, 英国では Ticarcillin¹⁾, 西独では Azlocillin²⁾, Mezlocillin³⁾, 我国では Apalcillin⁴⁾, Piperacillin⁵⁾, PC-455 などが合成された。そしてこれらの最近の開発の特徴としては Ampicillin あるいは Amoxicillin の 3 位の α 位の NH_2 基を電子吸引性の高い側鎖で置換し, 酸アミド結合を持たせたものが

多い。このようにして, Ampicillin から Apalcillin, Piperacillin, Mezlocillin, Azlocillin が, Amoxicillin から PC-455 が誘導合成された (Fig. 1)。これらの物質の抗菌力はグラム陽性菌および緑膿菌, インドール陽性変形菌を含むグラム陰性菌に良好な感受性を示す幅広い抗菌スペクトラムを有する。

そこで今回, 抗菌作用に及ぼす 3 位の α 位の側鎖の影響について検討するため, Apalcillin, Piperacillin および PC-455 の緑膿菌に対する抗菌作用について, 比較薬剤として既知合成ペニシリン Carbenicillin⁶⁾ を用いて検討を行い, 2, 3 の知見を得たので報告する。

Fig. 1 Structure of penicillins



実験材料および方法

1) 使用菌株および薬剤

菌株としては臨床分離緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* E 2 株を使用した。薬剤としては Apalcillin (APPC), PC-904: 住友化学工業 K. K.), Piperacillin (PIPC, T-1220: 富山化学工業 K. K.), PC-455 (山之内製薬 K. K.), Carbenicillin (CBPC: 藤沢薬品工業 K. K.), 卵白リゾチーム (エーザイ K. K.), Gentamicin (GM: 塩野義製薬 K. K.) のいずれも力価の明らかなものを使用した。

2) 抗菌作用型式

Tryptosoya broth (TSB: Nissui) で前培養後 5%

の割合で、Heart infusion broth (HIB: Nissui) に接種し、対数期中期(約 1×10^8 cells/ml)まで 37°C で振とう培養する。この菌液を同培地で希釈し、 1×10^6 cells/ml および 5×10^7 cells/ml に調製後、各濃度の薬剤を添加し、3時間後の生菌数を混釈法により測定した。

3) Spheroplast

対数期中期の菌液を osmotic stabiliser として 15% sucrose を含む HIB に懸濁し、 1×10^8 cells/ml に調製する。この菌液に各薬剤を加え、3時間後の生菌数を、stabilizer を含む培地 (stabilized) と含まない培地 (shocked) で希釈し、stabilizer を含む寒天培地で測定した。

4) 菌体構成成分の定量

対数期中期の菌液を HIB で 5×10^7 cells/ml に希釈後、各薬剤を添加し、 37°C で培養する。1.5時間および3時間後に菌液をサンプリングし、M/15リン酸緩衝液で遠心洗浄後、菌体を PARK-HANCOCK⁷⁾ の方法で分画し、DNA 分画を Diphenylamine 法、RNA 分画を Orcinol 法、蛋白質分画を LOWRY-FOLIN 法でそれぞれ比色定量した。

5) 漏出菌体成分の定量

対数期中期の菌液を salt-glycerol 合成培地(K_2HPO_4 , 7g, KH_2PO_4 , 2g, Na_3 citrate $5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, glycerol 5g/l) に懸濁し、 5×10^7 cells/ml に調製する。この菌液に各薬剤を加え、 37°C で培養後、1, 2, 3時間後に菌液をサンプリングし、遠心操作およびミリポフィルターによる除菌後、上清中の DNA 分画、RNA 分画、蛋白質分画量をそれぞれ前述の方法により比色定量した。

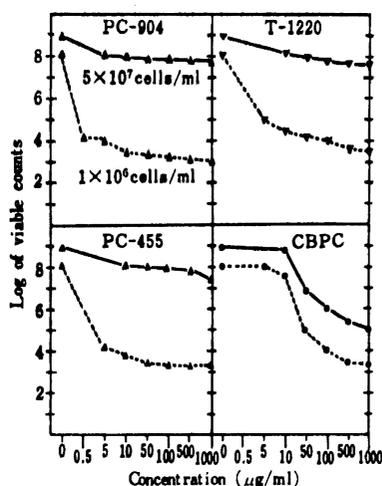
6) リゾチームとの協力作用

対数期中期の菌液を HIB で希釈し、 3×10^7 cells/ml に調製後、各薬剤と卵白リゾチーム (Ly.) を添加し、経時的に濁度の変化 (O. D. 550 nm) と生菌数を測定した。また ^{125}I でラベルしたリゾチームの取り込みについては、各薬剤を 60分間作用させた菌液に ^{125}I -lysozyme (4.8×10^6 cpm/tube) を加え、30分間作用後、菌体を生理食塩液で3回遠心洗浄後、Well-type scintillation counter (Aloka JDC-207) にて線量を計測した。

7) アミノ配糖体抗生物質との協力作用

対数期中期の菌液を HIB で希釈し、 3×10^7 cells/ml に調製後、各薬剤を添加し、 37°C で培養する。1時間後に Gentamicin (GM) を加え、さらに培養を続け、経時的に生菌数を測定した。また ^3H -Dibekacin (^3H -DKB) の取り込みについては、各薬剤を 60分間作用させた菌液に ^3H -DKB (3.2×10^{-8} $\mu\text{Ci}/\text{tube}$) を加え、15分間作用後、菌体を生理食塩液で3回遠心洗浄後、

Fig. 2 Bactericidal effect of PC-904, T-1220, PC-455 and CBPC against *P. aeruginosa* E-2



soluene 100 (Packard Co., Ltd.) で溶解し、氷酢酸で中和後、toluene scintillator を加えて、Liquid scintillation counter (Packard Co., Ltd.) にて計測した。

8) 色素剤の取り込みについて

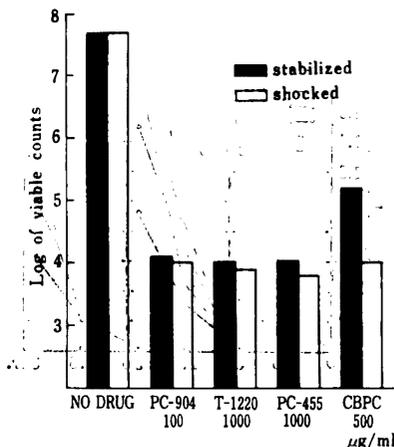
対数期中期の菌液を HIB で希釈し、 5×10^7 cells/ml に調製後、各薬剤および gentian-violet ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、 37°C で培養する。経時的に菌液をサンプリングし、遠心除菌後、上清を O. D. 590 nm で比色定量した。

実験結果

1) 抗菌作用型式

種々のペニシリンの緑膿菌に対する抗菌作用型式の結

Fig. 3 Comparison of the viable count of stabilized and osmotically shocked culture of *P. aeruginosa* E-2



果を Fig. 2 に示した。図中、実線が薬剤作用時の菌量が 5×10^7 cells/ml の場合、破線が 1×10^8 cells/ml の場合である。作用菌量が 5×10^7 cells/ml の場合、APPC, PIPC, PC-455 については、 $1,000 \mu\text{g/ml}$ の高濃度作用でも静菌的作用であり、生菌数の減少は認められなかった。一方、CBPC では最小発育阻止濃度 (MIC) に相当する $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で dose response のある生菌数の減少 (殺菌性) が認められた。作用菌量が 1×10^8 cells/ml の場合、APPC, PIPC, PC-455 については、MIC よりも低い濃度である $0.5 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ 作用でも強い殺菌性が認められたが、濃度を高くしても dose response のある殺菌性ではなかった。また CBPC については、 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で dose response のある殺菌性が認められた。

2) Spheroplast 形成能の測定

種々のペニシリン作用による spheroplast 形成能の測定の結果を Fig. 3 に示した。APPC ($100 \mu\text{g/ml}$), PIPC ($1,000 \mu\text{g/ml}$), PC-455 ($1,000 \mu\text{g/ml}$) 作用により生菌数は 99% 減少するが、stabilized と shocked の希釈系列にはほとんど生菌数の差は認められず、これらの薬剤作用により、ほとんど spheroplast 形成は起らないように思われる。一方、CBPC ($500 \mu\text{g/ml}$) 作用では stabilized と shocked の希釈系列に約 10 倍の生菌数の差が認められ、CBPC 作用により高率に spheroplast が形成されることが認められた。

3) 菌体構成成分の定量

ペニシリン作用による菌体構成成分の含量変化を定量化した結果を Fig. 4 に示した。APPC ($100 \mu\text{g/ml}$), PIPC ($1,000 \mu\text{g/ml}$), PC-455 ($1,000 \mu\text{g/ml}$) CBPC ($500 \mu\text{g/ml}$) 作用によっても DNA 分画の含量は無処置群とほとんど差は認められなかった。しかしながら、

Fig. 4 Measurement of DNA, RNA and Protein of *P. aeruginosa* E-2

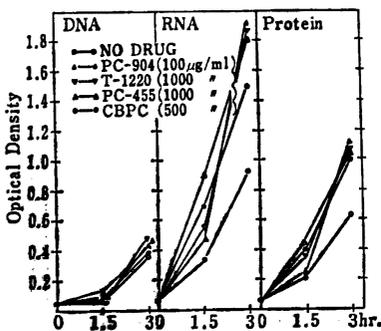
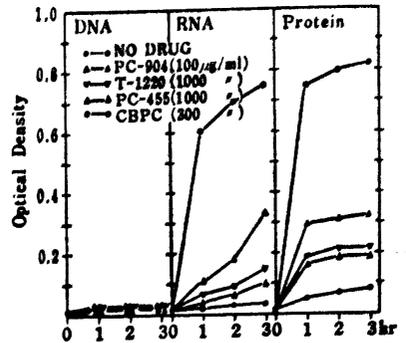


Fig. 5 Release of cellular constituents of *P. aeruginosa* E-2



RNA 分画と蛋白質分画に変動が認められた。すなわち CBPC 作用により、RNA 分画、蛋白質分画ともに無処置群よりも含量低下を来たすのに対して、APPC, PIPC, PC-455 作用では蛋白質分画は無処置群とほとんど差は認められなかったが、RNA 分画は異常に増加していることが認められた。

4) 漏出菌体成分の定量

ペニシリン作用による漏出菌体成分の定量の結果を Fig. 5 に示した。APPC ($100 \mu\text{g/ml}$), PIPC ($1,000 \mu\text{g/ml}$), PC-455 ($1,000 \mu\text{g/ml}$), CBPC ($300 \mu\text{g/ml}$) 作用によっても、DNA 分画の漏出量は無処置群とほとんど差は認められなかった。しかしながら、RNA 分画と蛋白質分画は CBPC 作用により漏出量はひじょうに多く、APPC, PIPC, PC-455 作用では無処置群よりもわずかに多い漏出がみられたに過ぎなかった。

5) リゾチームとの協力作用

細菌細胞壁溶解酵素リゾチームとの協力作用について検討した結果を Fig. 6, 7, 8 に示した。Fig. 6 は濃度の変化、Fig. 7 は生菌数を測定したものである。いずれも図中、実線は各種ペニシリン ($200 \mu\text{g/ml}$) 単独作用の場

Fig. 6 Combination effect of each penicillin and lysozyme on *P. aeruginosa* E-2

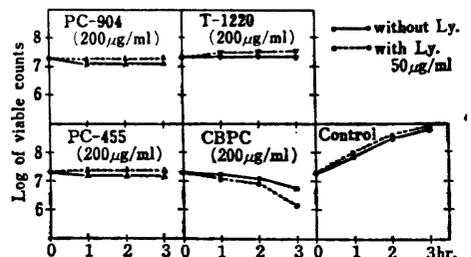


Fig. 7 Combination effect of each penicillin and lysozyme on *P. aeruginosa* E-2

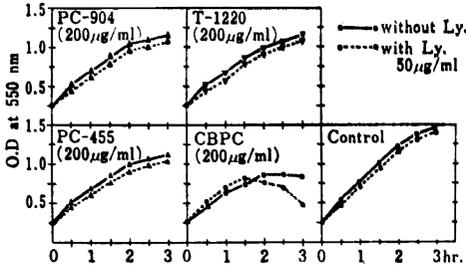
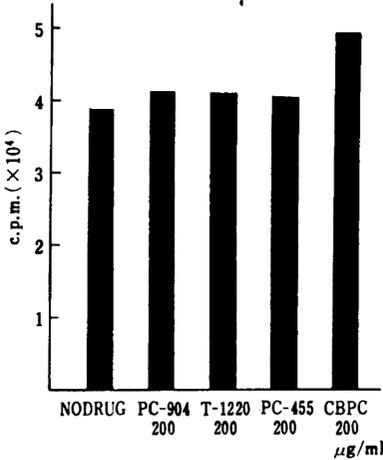


Fig. 8 ¹²⁵I-lysozyme uptake of *P. aeruginosa* E-2 treated with each penicillin



合であり、破線はリゾチーム (50 μg/ml) を併用した場合である。APPC, PIPC, PC-455 の場合、濁度の変化および生菌数ともに薬剤単独とほとんど差が認められなかった。一方、CBPC の場合、濁度の変化および生菌数ともに、薬剤単独とリゾチーム併用群では差が認められ、リゾチーム添加により溶菌作用(殺菌作用)が増強されるものと思われる。Fig. 8 は ¹²⁵I-lysozyme の取り込みを測定したものである。APPC, PIPC, PC-455 処理菌は薬剤無処理菌とほぼ同量、すなわち約 4×10⁴ c.p.m. のアイソトープを取り込むのに対して、CBPC 処理菌では約 5×10⁴ c.p.m. を取り込むことが認められた。

6) アミノ配糖体抗生物質との協力作用

アミノ配糖体抗生物質との協力作用について検討した結果を Fig. 9, 10 に示した。Fig. 9 は GM との協力作用について生菌数で検討したもので図中、実線は各種ペニシリン (200 μg/ml) 単独作用の場合であり、破線は GM (1 μg/ml) を併用した場合である。ほぼ静菌的作用

Fig. 9 Combination effect of each penicillin and GM on *P. aeruginosa* E-2

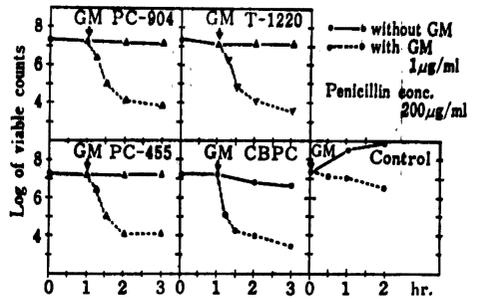
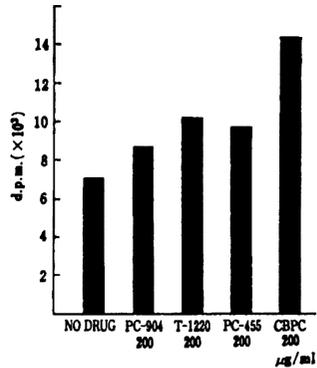


Fig. 10 ³H-DKB uptake of *P. aeruginosa* E-2 treated with each penicillin

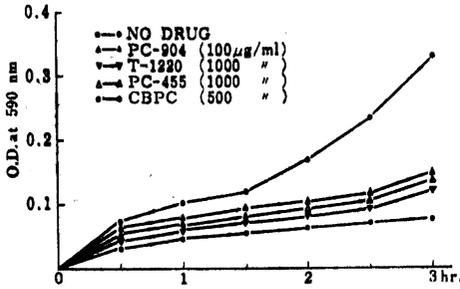


を示す濃度の GM を各種ペニシリン処理菌に作用させると、急激に生菌数の減少が認められ、殺菌性が增强されるが、15 分間という短時間での生菌数の減少は CBPC の場合が最も大きく、他のペニシリン処理菌の約 10 倍以上であった。Fig. 10 は ³H-DKB の取り込みを測定したものである。APPC, PIPC, PC-455 処理菌は薬剤無処理菌の約 1.3~1.5 倍に相当する 9×10⁸~1.05×10⁹ d.p.m. を取り込むが、CBPC 処理菌は無処理菌の約 2.1 倍に相当する 1.5×10⁹ d.p.m. のアイソトープを取り込むことが認められた。

7) 色素剤の取り込みについて

色素剤 (gentian-violet) の取り込みに対する影響について検討した結果を Fig. 11 に示した。APPC (100 μg/ml), PIPC (1,000 μg/ml), PC-455 (1,000 μg/ml) 作用により無処理菌よりもわずかに多くの色素を取り込むのに過ぎないが、CBPC (500 μg/ml) 作用では、90 分後から急激な取り込みが認められた。

Fig. 11 Effect of each penicillin on gentian-violet uptake of *P. aeruginosa* E-2



考 察

今回私どもが使用した Apalcillin (APPC), Piperacillin (PIPC), PC-455 の緑膿菌に対する抗菌作用は既存の抗緑膿菌性ペニシリン系抗生物質 Carbenicillin (CBPC), Sulbenicillin (SBPC)⁹⁾ の作用とは若干の差違が認められた。すなわちまず第1に抗菌作用型式については、APPC, PIPC, PC-455 は薬剤作用時の菌量によって異なり、菌量が 10^6 cells/ml 以下では殺菌的作用を示すが、 10^7 cells/ml 以上では静菌的作用しか示さなかった。一方、CBPCはいずれの菌量に於いても殺菌的作用を示した。このように菌量の影響を受けやすいという原因の1つに薬剤不活化酵素 (β -lactamase) による薬剤の不活化が考えられる。事実、APPC や PIPC はCBPC よりも緑膿菌から得られた β -lactamase に抵抗性が低いと言われている⁹⁾。しかしながら酵素産生性の低い緑膿菌あるいは大腸菌を用いても、菌量の影響を受けやすいため、酵素だけの影響によるものとは考え難い。第2に APPC, PIPC, PC-455 により spheroplast 形成がほとんど認められなかった。この点に関しては既に電子顕微鏡観察でも認めており^{10,11)}、これらの薬剤が既存のペニシリン系抗生物質とは異なった作用をも有するのか興味もたれる。事実、広田¹²⁾らは PIPC の大腸菌に対する penicillin binding proteins (PBPS) について、¹⁴I でラベルした ureido 型ペニシリンとの competition で検討しており、PIPC · PBP 1A, 1Bs, 2, 3, 4, 5, 6 以外に新たに 1C にも結合すると報告しており、今後の研究成果が注目される。さらに HAMILTON-MILLER¹³⁾ はグラム陰性桿菌にペニシリン系抗生物質を作用させると細胞表層の permeability barrier に作用して透過性を変えると報告しており、また既に私どもも緑膿菌に SBPC を作用させた時に細胞表層の変化が生じると報告している¹⁴⁾。しかしながら APPC, PIPC, PC-455 はアミノ配糖体抗生物質、リゾチームとの併用性色素剤の取り込み、漏出菌体成分などの結果か

ら、これらの薬剤は少なくとも、CBPCよりは、細胞表層に与える damage が少ないものと考えられる。第3に菌体構成成分定量の結果から、APPC, PIPC, PC-455 処理菌は、DNA, 蛋白質分画の含量は薬剤無処理菌とほぼ同じであるが、RNA 分画の含量が異常に増加するということである。ペニシリン系抗生物質は細菌細胞壁合成阻害のため、DNA, RNA, 蛋白質の生合成には関与しないが、これらの薬剤は RNA に何らかの影響を及ぼすものと思われ、今後ラベル物質の取り込み実験により検討を加えたいと考えている。以上のような結果を考察してみると、APPC, PIPC, PC-455 は既存のペニシリン系抗生物質の作用機序、すなわち細菌細胞壁 (mucopeptide) 合成阻害の他に、自己溶解酵素 (autolytic enzyme) の活性抑制や、とくに RNA 系の高分子合成にも何らかの作用を有するものと思われる。また最近 APPC や PIPC の binding protein の研究がなされ、Penicillin G の結合する蛋白とは異なるという結果も発表されており¹⁵⁾、さらにこの点をも考慮した上で、さらに詳細な検討を加えている。

文 献

- 1) BODEY, G. P. & B. DEERHAK: *In vitro* studies of α -carboxy-3-thienylmethyl penicillin, a new semisynthetic penicillin. *Appl. Microbiol.* 21(1): 61~65, 1971
- 2) STEWART, D. & G. P. BODEY: Azlocillin: *In vitro* studies of a new semisynthetic penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 865~870, 1977
- 3) BODEY, G. P. & T. PAN: Mezlocillin: *In vitro* studies of a new broad-spectrum penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 74~79, 1977
- 4) NOGUCHI, H.; Y. EDA, H. TOBIKI, T. NAKAGOME & T. KOMATSU: PC-904, a novel broad-spectrum semisynthetic penicillin with marked antipseudomonal activity: Microbiological evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 9: 262~273, 1976
- 5) UEO, K.; Y. HAYASHI, T. YASUDA, H. TAKI, M. TAI, Y. WATANABE, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-1220, a new semisynthetic penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12: 455~460, 1977
- 6) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND: Carbenicillin, a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* -1967: 609~613, 1968
- 7) PARK, J. T. & R. HANCOCK: A fractionation of procedure for studies of the synthesis of cell wall mucopeptide and of other polymers in

- cells of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 22 : 249~258, 1960
- 8) 中沢昭三, 和島 剛, 井沢武年, 津田三和, 原良子: 合成ペニシリン Sulfobenzyl penicillin に関する細菌学的評価。Chemotherapy 19 : 867~874, 1971
- 9) 野口 浩, 久保雅子, 倉茂達徳, 三橋 進: PC-904 に関する細菌学的検討。Chemotherapy 26 : 17~27, 1978
- 10) 西野武志, 山岸純一, 平井若美, 中沢昭三: PC-904 による緑膿菌の形態変化について。Chemotherapy 26 : 79~93, 1978
- 11) 西野武志, 山岸純一, 渡辺泰雄, 中沢昭三: 緑膿菌に対する T-1220 の抗菌像について。Chemotherapy 25 : 755~764, 1977
- 12) 広田幸敏: 第 25 回日本化学療法学会東日本支部総会発表, 1978
- 13) HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Damaging effect of ethylen-diamine tetracetic acid and penicillins on permeability barriers in gram-negative bacteria. Biochem. J. 100 : 675~682, 1966
- 14) 尾花芳樹, 中沢昭三: Sulbenicillin の抗菌作用による緑膿菌の性状変化について。日細誌 32 : 337~343, 1977
- 15) IIDA, K.; S. HIRATA, S. NAKAMURA & M. KOIKE: Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by a new synthetic penicillin, Piperacillin. Antimicrob. Agents & Chemoth. 14 : 257~266, 1978

ANTIBACTERIAL ACTION OF APALCILLIN, PIPERACILLIN AND PC-455 AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

YOSHIKI OBANA, TAKESHI NISHINO and the late SHOZO NAKAZAWA
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Apalcillin (APPC), piperacillin (PIPC) and PC-455 developed in Japan as the derivatives of ampicillin or amoxicillin have an acid-amide combined substituent at the 3-position (α position) in the chemical structure. Possible influence of the substituent on the antibacterial action of these agents was studied using carbenicillin (CBPC) as the control drug and *Pseudomonas aeruginosa* as the test organism, and the following results were obtained.

1. The mode of antibacterial action of the test compounds was studied. APPC, PIPC and PC-455 were more liable to the influence by the inoculum size compared with CBPC. When these compounds acted with the inoculum size of 5×10^7 cells/ml, CBPC had a marked bactericidal action on the test organism, but APPC, PIPC and PC-455 had a bacteriostatic action.

2. Possible influence of the test compounds on formation of spheroplasts was studied and it was found that CBPC formed spheroplasts at a high percentage but APPC, PIPC and PC-455 scarcely produced spheroplasts.

3. Synergism produced when each of the test compounds was used in combination with lysozyme or an aminoglycoside antibiotic was investigated and it was found that there was marked synergism when CBPC was combined with lysozyme or an aminoglycoside antibiotic, but synergism produced when APPC, PIPC or PC-455 was combined with lysozyme or an aminoglycoside antibiotic was less pronounced.

4. The components of the bacterial cells treated with each of the test compounds were quantitatively determined. In the bacterial cells treated with APPC, PIPC or PC-455, accumulation of RNA fraction was found but such phenomenon was detected in the bacterial cells treated with CBPC.