

Cephalexin と Mecillinam の協力作用に関する研究

大槻雅子・奥 亨・西野武志・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

五 島 瑋 智 子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 56 年 12 月 3 日受付)

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp. に対して Cephalexin と Mecillinam の併用が *in vitro* において協力作用を示すことを Chequerboard titration method, Fixed combination method により確認し, *in vivo* における効果およびその作用機作についても検討を加えた。

増殖曲線に及ぼす影響を検討した結果, Cephalexin, Mecillinam 単独ではほとんど変化を示さない濃度を併用した場合に濁度の減少や殺菌作用の発現を認め, 両薬剤間に協力作用があることがわかった。マウスを用いた実験的感染症に対する治療効果の検討でも, 両薬剤を併用した場合, 協力作用がみられ, 治療効果が優れていた。また, そのときの血中における Cephalexin と Mecillinam の濃度比は *in vitro* で協力作用が認められる割合と一致していた。併用時の形態変化を位相差顕微鏡, 走査型電子顕微鏡により観察した結果, *Escherichia coli* では Cephalexin 作用で伸長化が, Mecillinam 作用で卵形細胞が形成され, 併用時には菌体はやや伸長化し, 中央部が膨化したスピンドル細胞の形成を認めた。この膨化した部分の内部構造を透過型電子顕微鏡で観察したところ菌体内や細胞壁部分に著明な変化は認められなかったが, 膨化した細胞壁の一部から細胞内容物が流出している像を捉えることができた。stabilizer を用いスフェロプラスト形成能について検討した結果, 各々単独ではスフェロプラスト形成が起こらない場合でもそれらの併用により, スフェロプラストが形成されることを確認した。Cephalexin はペニシリン結合蛋白質 (PBPs) の 1a と 3, Mecillinam は 2 に親和性を示し, 併用時にはこれらの PBPs へ相加的な親和性を示した。Cephalexin, Mecillinam それぞれ単独あるいは併用によりあらかじめ作用を受けた *Escherichia coli* のリン酸緩衝液中での溶菌活性は両薬剤で処理されることにより単独処理菌に比べ非常に高まっていた。

最近, penicillin の作用機作研究の一環として penicillin の標的酵素であるペニシリン結合蛋白質 (PBPs) と細菌細胞の形態変化との関連性が注目されてきている。1975 年 SPRATT¹⁾ は *Escherichia coli* の細胞質膜上に存在する β -lactam 抗生物質に親和性を示す 6 種の蛋白質について報告し, この中で PBP-1, PBP-2, PBP-3 がそれぞれ細胞の伸長, 形態決定, 分裂に対する必須蛋白質であると推論し, PBPs と細胞の形態変化との関係を明らかにした。PBP-1 はさらに PBP-1a と PBP-1bs に分離されたが, これらの蛋白質が阻害されると細胞は溶菌し, PBP-2 が阻害されると卵形細胞の形成, PBP-3 が阻害されると細胞の伸長化が起こる。Cephalexin は *Escherichia coli* の PBP-3 への親和性が強く, Cephalexin の作用を受けた細胞は伸長化菌を

形成する²⁾。一方, Mecillinam は PBP-2 に対して特異的な親和性を有しており, Mecillinam の作用を受けた細胞は卵形細胞を形成する^{3,4)}。

われわれは, このように Cephalexin と Mecillinam が *Escherichia coli* に対して異なった形態変化を示すことに興味をもち, 両薬剤を併用した場合に起こる細胞形態, さらに併用時の抗菌力の変化について検討を行なった。また, その作用機作についても若干の検討を加えた。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

実験には *Staphylococcus aureus* 1 株, *Escherichia coli* 19 株, *Klebsiella pneumoniae* 13 株, *Enterobacter aerogenes* 5 株, *Enterobacter cloacae* 6 株,

Serratia marcescens 11 株, *Proteus vulgaris* 11 株, *Proteus mirabilis* 12 株, *Proteus morgani* 11 株, *Proteus rettgeri* 1 株を使用した。また、血中濃度の測定には *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ を使用した。

2. 使用抗生物質

Cephalexin (CEX), Mecillinam (MPC), Pivmecillinam (PMPC), Benzylpenicillin (PCG) のいずれも力価の明らかな標品を用いた。[¹⁴C] benzylpenicillin ([¹⁴C] PCG) は The Radiochemical Center (Amersham, England) のものを使用した。

3. 協力作用の検討

CEX と MPC の協力作用の検討には、まず、heart infusion agar (ニッスイ) を用いた chequerboard titration method により行ない、37°C 18 時間培養後の菌の発育阻止効果で判定した。次いで CEX と MPC の割合を 8:1, 32:1 と固定した場合の最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。また、CEX と MPC 併用時の殺菌作用の検討には heart infusion broth (ニッスイ) を用い、Biophotometer BIO-LOG II (JASCO) で培養を行ない、対数期に薬剤を添加した。以後、経時的に濁度と生菌数の変化を測定した。

4. 実験的感染症に対する治療効果

6% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) と等量混合した *Escherichia coli* ST-0198 あるいは *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を 1 群 10 匹の ddY 系雄性マウスの腹腔内に接種した。菌接種 2 時間後に、CEX, PMPC および両者を経口投与し、7 日後の生存率を求め、LITCHFIELD-WILCOXON 法⁵⁾により ED₅₀ 値を算出した。

5. 血中濃度

ddY 系雄性マウスに CEX あるいは PMPC を経口投与し、経時的に 1 群 4 匹のマウスからエーテル麻酔下で腋窩動脈の切断により採血し、血清を分離した。CEX の測定には *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とし、Antibiotic medium 8 (Difco) を用いる方法⁶⁾、MPC の測定には *Escherichia coli* NIHJ を検定菌とする方法⁷⁾に準じ薄層ディスク法により行なった。

6. Ethylenediaminetetraacetic acid 存在下での抗菌力

外膜の透過障害について検討するために、*Escherichia coli* ST-0198 を 10⁶ cells/ml 含む heart infusion broth を用いる液体希釈法により 37°C 18 時間培養後の MIC を求め、同時に ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下での MIC も求めた。

7. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬剤を含有したフィルム寒天を作製し、これに菌液を塗抹したカバーガラスをかぶせパラフィンで封じた。これを倒立位相差顕微鏡 (NIKON, Japan) で観察した。

8. 電子顕微鏡による観察

対数増殖期途上で薬剤を添加し、経時的に菌体を集め、これを KILLENBERGER の方法⁸⁾で固定後エタノール系列で脱水した。その後、走査型電子顕微鏡の場合、臨界点乾燥⁹⁾を行ない、カーボンと金で蒸着し、走査型電子顕微鏡 JSM-35 (JEOL, LTD. Japan) を使用して菌体の表面構造を観察した。一方、透過型電子顕微鏡の場合、脱水後 LEFT の方法¹⁰⁾により、エポキシ樹脂に包埋し、Ultramicrotome 4801 A (LKB, Sweden) を用い切片を作製した。これを酢酸ウラニール、クエン酸鉛で 2 重染色¹¹⁾を行なった後、透過型電子顕微鏡 AKA-SHI S-500 (Japan) を用いて観察した。

9. スフェロプラスト形成能について

20% sucrose, 0.2% MgCl₂ を含んだ heart infusion broth (stabilized) とこれらを含まない同培地 (shocked) を用いて、薬剤の作用を受けた菌の 4 時間目のスフェロプラスト形成能について検討した。

10. ペニシリン結合蛋白質に対する親和性

B. G. SPRATT の方法¹⁾に従い、膜画分を調製し、[¹⁴C] PCG とのコンペティションにより実験した。また、薬剤の作用を受け形態変化を起こしている菌の膜画分についても同様の検討を行ない、[¹⁴C] PCG の親和性を求めた。

11. 緩衝液中での溶菌活性について

対数期の菌を薬剤で 25 分間処理を行ない 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0, 7.0, 8.0) 中に懸濁させた菌液の 550nm での濁度の減少を測定した。

II. 実験結果

1. Chequerboard titration method による協力作用の検討

種々の細菌に対する CEX と MPC の併用効果の有無を検討したのが Table 1 である。10⁶ cell/ml を 1 白金耳接種した成績で、表中の矢印は協力作用を示した CEX と MPC の配合比、*印はその場合に、minimum fractional inhibitory concentration index (min. FIC index)¹²⁾を示す CEX と MPC の割合を示している。21 株中 16 株において min. FIC index が 0.5 以下、残り 5 株の min. FIC index は 0.53~0.75 であり、21 株すべてにおいて CEX と MPC による協力作用を認めた。そして、菌株により協力作用を示す CEX と MPC の配合比が異なり、しかも同一菌株で協力作用を示す配合比の範囲が広いことがわかった。中でも CEX と MPC

Table 1 Combination effect of CEX and MPC on various organisms

Ratio CEX MPC																				
	≥2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	1	1	1	1	1	1		
Organisms	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	8	16	32	64		
1. <i>S. aureus</i> 209-P JC													*	*	→					
2. <i>E. coli</i> NIH JC-2								*	*	→										
3. <i>E. coli</i> NIH			←	*	-----	→														
4. <i>E. coli</i> K-12					←	*	-----	→												
5. <i>E. coli</i> No. 29			←	-----		*	-----	→												
6. <i>E. coli</i> ST-0198						←	*	-----	*	*										
7. <i>E. coli</i> KC-14					*	-----	*	-----	→											
8. <i>E. coli</i> 167				←							*	-----						→		
9. <i>K. pneumoniae</i> KC-1						←			*	→										
10. <i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632								←	-----	*	→									
11. <i>K. pneumoniae</i> 178	←	-----										*	→							
12. <i>S. marcescens</i> IFO 3736				←	*	-----												→		
13. <i>S. marcescens</i> T-55	←	-----					*	-----										→		
14. <i>E. aerogenes</i> KC-1							←	*	-----									→		
15. <i>E. cloacae</i> NCTC 9394							←	*	→											
16. <i>P. vulgaris</i> OX-19		←	-----						*	-----								→		
17. <i>P. vulgaris</i> 101				←	*	→														
18. <i>P. mirabilis</i> 1287		←	-----						*	-----								→		
19. <i>P. mirabilis</i> 181						←	-----		*	-----								→		
20. <i>P. morganii</i> Kono	←	-----		*	→															
21. <i>P. rettgeri</i> NIH 96		←	-----						*	-----								→		
No. of mim. FIC index			1	2	1	2	4	2	4	1	1		1	2						
No. of addition and synergism	←	3	7	7	11	9	14	16	16	12	11	11	10	9	9	7	5	4	3	→

Medium:heart infusion agar.
* Represents the ratio of minimum FIC index of CEX to that of MPC.
Horizontal arrows indicate the range of the synergistic effect.

の割合が 8 : 1 から 64 : 1 の付近に協力作用を示す株が多く認められた。

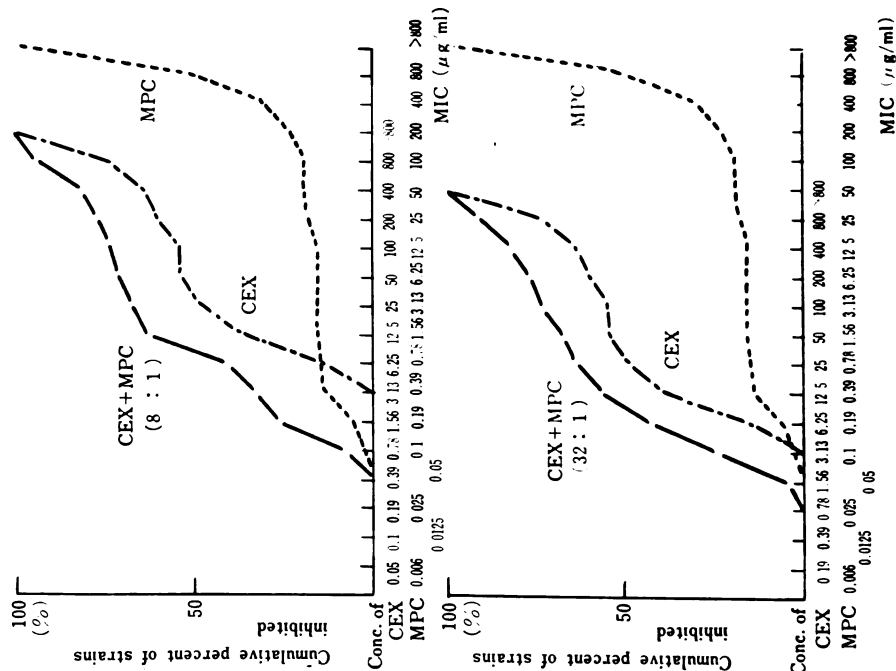
2. CEX と MPC の配合比を 8 : 1, 32 : 1 と固定した場合の種々の細菌の感受性

Chequerboard titration method で協力作用が認められたので CEX と MPC の配合比を 8 : 1, 32 : 1 と固定してさらに多くの菌株で協力作用が認められるか否かを検討した。10⁸ cells/ml を接種した場合の成績が Fig. 1 で、10⁶ cells/ml を接種した場合の成績が Fig. 2 である。いずれも上段は CEX と MPC の配合比が 8 : 1 の場合、下段は 32 : 1 の場合で *E. coli* 19 株、*K. pneumoniae* 13 株、*Enterobacter* spp. 11 株、*S. marcescens* 11 株、*P. vulgaris* 11 株、*P. mirabilis* 12 株、*P.morganii* 12 株の合計 89 株の感受性を累積分布で示したものである。MPC の添加により CEX の抗菌力が

8 : 1, 32 : 1 の割合のときにそれぞれ 2~32, あるいは 2~16 倍増強された。FIC index の値から相乗作用が認められたのは 10⁸ cells/ml 接種では 8 : 1, 32 : 1 で約 50%, 10⁶ cells/ml 接種では 8 : 1 で 60%, 32 : 1 で 45% であり、相加作用を含めるといずれの場合も約 80% であった。CEX : MPC 8 : 1 を例にとると *E. coli*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* spp. では 10⁸ cells/ml, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P.morganii* では 10⁶ cells/ml 接種で相乗効果を示すものが多く、*K. pneumoniae* では 10⁸, 10⁶ cells/ml 接種でほとんど差はみられなかった。32 : 1 の場合にもほとんど同じ傾向がみられた。

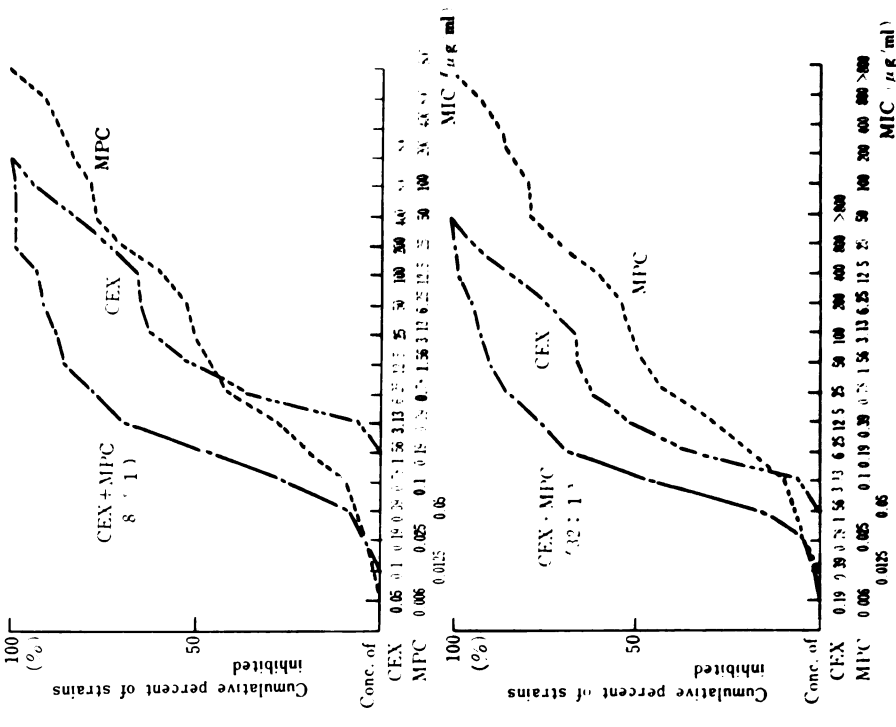
3. 併用時の溶菌および殺菌作用の検討
E. coli ST-0198 を用いて 2.5×10⁶, 1.6×10⁷ cells/ml の菌数で薬剤を作用させた場合の培地中での溶菌と

Fig. 1 Cumulative percentage of 89 strains susceptible to the combination of CEX and MPC



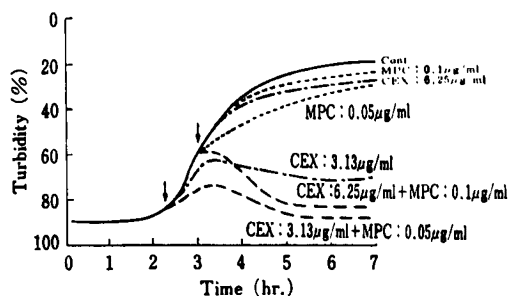
The inoculum size was 10^8 cells/ml.
Nineteen strains of *E. coli*, 13 strains of *K. pneumoniae*, 11 strains of *Enterobacter* spp., 11 strains of *S. marcescens*, 11 strains of *P. aeruginosa*, 12 strains of *P. mirabilis* and 12 strains of *P. morganii* were used for this experiment.

Fig. 2 Cumulative percentage of 89 strains susceptible to the combination of CEX and MPC



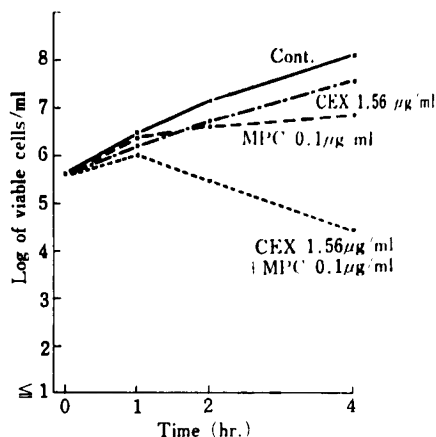
The inoculum size was 10^8 cells/ml.
Nineteen strains of *E. coli*, 13 strains of *K. pneumoniae*, 11 strains of *Enterobacter* spp., 11 strains of *S. marcescens*, 11 strains of *P. aeruginosa*, 12 strains of *P. mirabilis* and 12 strains of *P. morganii* were used for this experiment.

Fig. 3 Combination effect of CEX and MPC on the viability of *E. coli* ST-0198



殺菌効果を検討したのが Fig. 3, 4 である。いずれの菌量においても MPC 添加時には濁度の減少や殺菌作用は認められない。CEX 作用後の濁度は上昇するか少し増殖した後、一定の濁度を保っていた。しかし、生菌数の変化では徐々に減少するか再増殖の傾向がみられた。併用時には薬剤作用後濁度と生菌数の著しい減少がみられ、両薬剤間に協力作用を認めた。図には示していないが *E. coli* NIH JC-2, *E. coli* K-12 においても同様な結果が得られた。Fig. 5 は *K. pneumoniae* に両薬を作用させた場合の殺菌作用を検討した成績である。CEX あるいは MPC が静菌的に作用する濃度を併用した場合、生菌数の減少がみられ、両剤の併用により協力作用を認めた。図には示していないが *S. marcescens*, *P. vul-*

Fig. 5 Combination effect of CEX and MPC on the viability of *K. pneumoniae* KC-1



garis, *P. mirabilis* においても *E. coli*, *K. pneumoniae* と同様の協力作用を認めた。

併用する薬剤の添加時期と殺菌作用との関係を *E. coli* ST-0198 について検討したのが Fig. 6 である。CEX と MPC を同時に作用させた場合、CEX 作用 1 時間後に MPC を作用させた場合、逆に MPC 作用 1 時間後に CEX を作用させた場合の生菌数の変化を示したが、いずれの組み合わせにおいても生菌数の減少がみられた。*K. pneumoniae* についても検討したが同様な成績を得

Fig. 4 Combination effect of CEX and MPC on the viability of *E. coli* ST-0198

(A) shows the changes of viable cells when the drug was added to the culture of 2.5×10^6 cells/ml. (B) shows the changes of viable cells when the drug was added to the culture of 1.6×10^7 cells/ml.

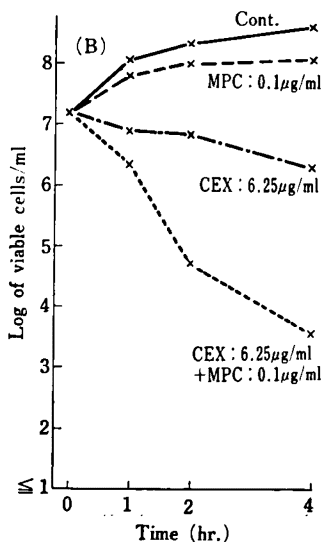
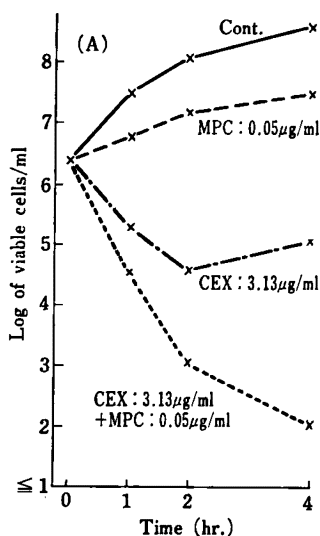
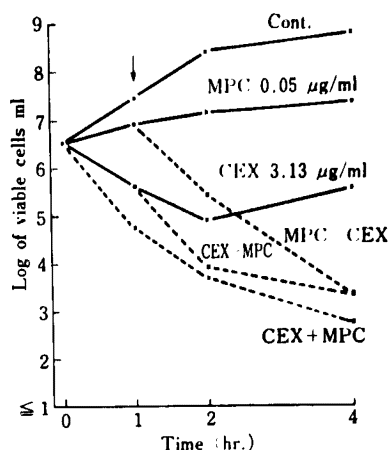


Fig. 6 Combination effect of CEX and MPC on the viability of *E. coli* ST-0198



た。

4. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウスに *E. coli* ST-0198 あるいは *K. pneumoniae* KC-1 を感染させた場合の治療効果を ED_{50} で示したのが Table 2 である。*E. coli* ST-0198 の場合、併用時の配合比は CEX:PMPC が 8:1, *K. pneumoniae* KC-1 では 4:1 である。この配合比は単独治療における各薬剤の ED_{50} 値の比から決定した。両菌株とも単独治療時の ED_{50} 値に比べ併用時の ED_{50} 値は小さく、Chequerboard titration method の項で示したと同様に ED_{50} 値を用いて fractional effective dose (FED) index を算出すると *E. coli* ST-0198 で 0.55, *K. pneumoniae* KC-1 で 0.33 という値が得られ、CEX と PMPC 間に協力作用を認めた。

5. 血中濃度

マウスにおける CEX と PMPC 投与時の血中濃度を測定し、15, 30, 60, 90, 120, 180 分目の CEX と MPC の割合を算出した。Fig. 7 と Fig. 8 は CEX あるいは PMPC 経口投与時の血中濃度の推移を示している。いずれの場合も 15 分後にピークを示し、dose response がみられた。これらの血中濃度から、併用時の感染治療

実験に用いた 100% マウスが生存する最低の投与量、すなわち *E. coli* ST-0198 の場合 CEX 0.125 mg/mouse と PMPC 0.0156 mg/mouse, *K. pneumoniae* KC-1 の場合、CEX 0.5 mg/mouse と PMPC 0.125 mg/mouse という投与量で得られる CEX と MPC の血中濃度の比はそれぞれ 6.7:1 から 27.5:1 で平均 17.4:1, 3.8:1 から 10:1 で平均 7.3:1 といずれの場合も *in vitro* で協力作用が認められる範囲内にあった。このように *in vitro* および *in vivo* で CEX と MPC の併用による協力作用を認めたので併用時の形態変化および抗菌作用機作についての検討を加えた。

6. Ethylenediaminetetraacetic acid 存在下での抗菌力

EDTA 存在下での抗菌力の変動により薬剤の *E. coli* ST-0198 の外膜透過性を検討したのが Table 3 である。CEX, MPC およびそれらの併用に EDTA の 1/2 MIC 量を添加しても EDTA 添加時の MIC は無添加時の MIC の 1~2 倍程度しか良くなり、*E. coli* ST-0198 株においてはこれらの薬剤は透過障害をほとんど受けないという結果を得た。

7. 位相差顕微鏡による形態変化の観察

位相差顕微鏡で *E. coli* ST-0198 の形態変化を観察した結果を Fig. 9 に示した。すなわち CEX 3.13 µg/ml と MPC 0.05 µg/ml のそれぞれ単独作用時と併用時の薬剤作用 1, 2, 4 時間目の変化であるが、時間の経過とともに CEX 作用では伸長化菌、MPC 作用では卵形細胞を観察することができ、両者の併用では菌体の中央部が非常に膨化しているスピンドル細胞の形成を観察できた。同様な変化は *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* KC-1 においても認められた。

8. 電子顕微鏡による形態変化の観察

位相差顕微鏡による形態観察をさらに詳しく検討するために電子顕微鏡による観察を行なった。走査型電子顕微鏡による観察結果が Fig. 10 である。正常な *E. coli* ST-0198 の走査型電子顕微鏡像では分裂時に相当すると思われる細胞もみられ、表面構造はなめらかな形状を示していた。CEX 3.13 µg/ml 作用では伸長化菌の形成

Table 2 Combination effect of CEX and PMPC on experimental infections with *E. coli* ST-0198 and *K. pneumoniae* KC-1 in mice

Organisms	ED_{50} (mg/mouse)			Ratio ^{a)}
	CEX	PMPC	CEX+PMPC	
<i>E. coli</i> ST-0198	0.15	0.017	0.039+0.0049	(8:1)
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0.90	0.27	0.16+0.040	(4:1)

a) The combination ratio of CEX to PMPC.

Fig. 7 Serum levels of cephalixin after single oral dose to mice

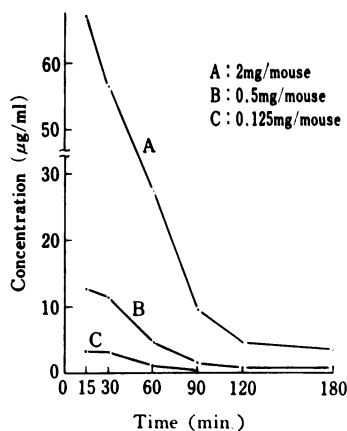
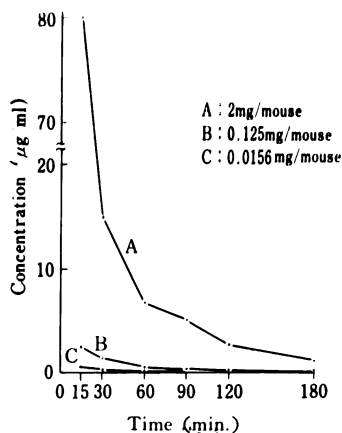


Fig. 8 Serum levels of mecillinam after single oral dose of pivmecillinam to mice



Dose	15min.	30min.	60min.	90min.	120min.	180min.
2 mg/mouse	67.2	56.5	27.5	9.7	4.7	3.6
0.5 mg/mouse	12.9	11.5	4.8	1.6	0.8	0.8
0.125mg/mouse	3.3	3.2	1.1	0.6	+	—

(μg/ml)

Dose	15min.	30min.	60min.	90min.	120min.	180min.
2 mg/mouse	80.00	14.93	6.69	4.99	2.65	1.08
0.125mg/mouse	2.52	1.45	0.48	0.24	0.21	0.08
0.0156mg/mouse	0.49	0.21	0.04	0.03	—	—

(μg/ml)

を、MPC 0.05 μg/ml 作用では卵形細胞の形成を観察できた。CEX 3.13 μg/ml と MPC 0.05 μg/ml の併用時には作用後1時間目で菌体はやや伸長し、中央部が膨化した像が観察された。2時間目では膨化部位からのスフェロプラスト様構造物の突出が観察でき、4時間目では溶菌したと思われる像を捉えることができた。併用時の菌体内部の変化を観察した透過型電子顕微鏡が Fig. 11 である。いずれも CEX 3.13 μg/ml と MPC 0.05 μg/ml の併用1時間目のバルジ部分の強拡大像である。両剤の併用によりバルジが形成される(写真A, B)が、細胞質内部には大きな変化は認められなかった。抗菌作用がさらに進行してバルジ部分の一部の細胞壁が裂け、細胞質内容物(写真Cの矢印)が流出し、溶菌、死滅(写真D)していくものと考えられる。このように電子顕微鏡観察の結果からも両剤の協力作用が確認できた。

9. スフェロプラスト形成能

E. coli ST-0198 株でのスフェロプラスト形成能について検討した結果が Fig. 12 である。stabilized culture と osmotic shocked culture における生菌数を比較すると、コントロールおよび CEX, MPC 単独作用時には両者間にほとんど差は認められなかった。しかし、併用時には両者間に大きな差が認められ、スフェロプラスト形成能が増強されていることがわかった。これらの結果は形態変化の観察結果と非常によく一致していた。

10. ペニシリン結合蛋白質に対する親和性

Fig. 13 は *E. coli* K-12 の膜画分を用いて [¹⁴C]PCG とのコンベクションにより PBP への親和性を検討したものである。CEX 作用時には PBP 1a, 3, 1bs, 4 への親和性が、MPC 作用時には PBP 2 への親和性が認められた。また、併用時には PBP 2, 1a, 3, 1bs, 4 への親和性が認められ、これらの結果を DUAL-WAVE LENGTH TLC SCANNERS-90 (Shimadzu, Japan) を用いて読みとり、コントロールを 100% として

Table 3 Effect of EDTA on the minimum inhibitory concentrations of CEX, MPC and the combination

Organism	CEX	MPC	CEX+MPC	EDTA*
None treated	3.13	0.05	1.56+0.025	50
<i>E. coli</i> ST-0198 EDTA treated**	3.13	0.025	0.78+0.012	
(fold)	(1)	(2)	(2)	

MIC (μg/ml) * : MIC (μmol/ml)

** : Treated with 1/2 MIC

Fig 9 Phase contrast micrographs of *E. coli* ST-0198 exposed to CEX, MPC and the combination

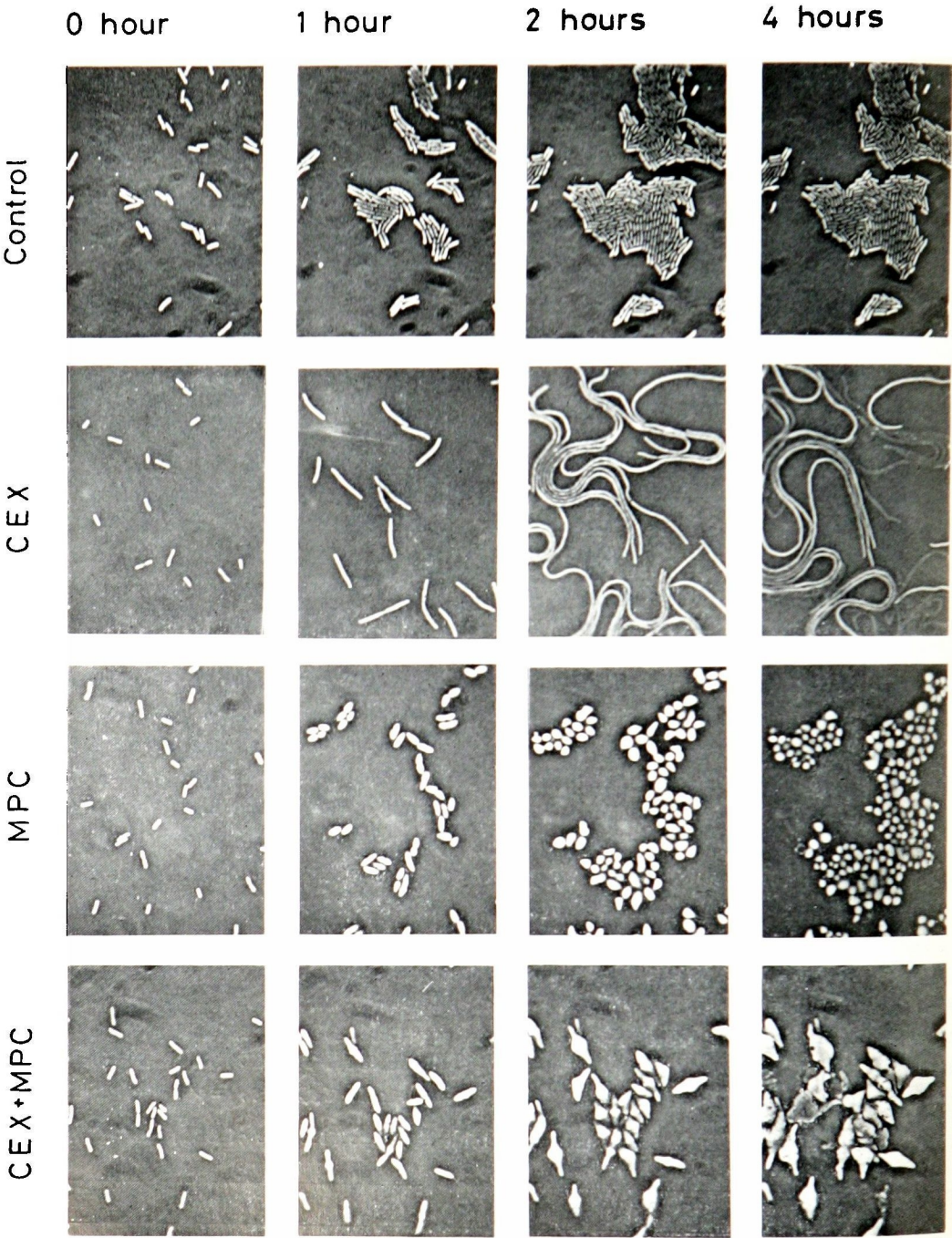


Fig. 10 Scanning electron micrographs of *E. coli* ST-0198 exposed to CEX, MPC and the combination

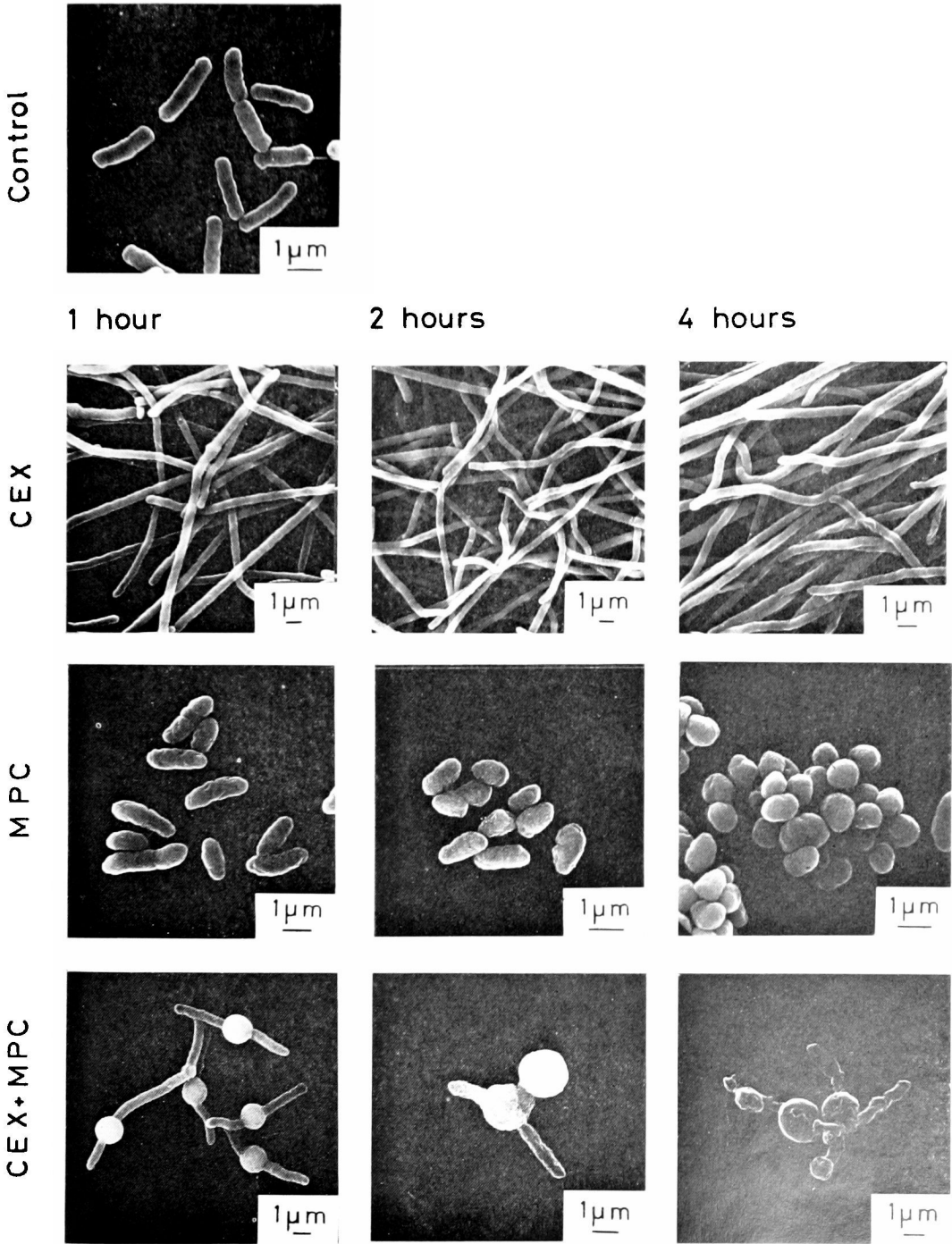


Fig. 11 Ultrathin sections of *E. coli* ST-0198 exposed to the combination of CEX (3.13 $\mu\text{g/ml}$) and MPC (0.05 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour

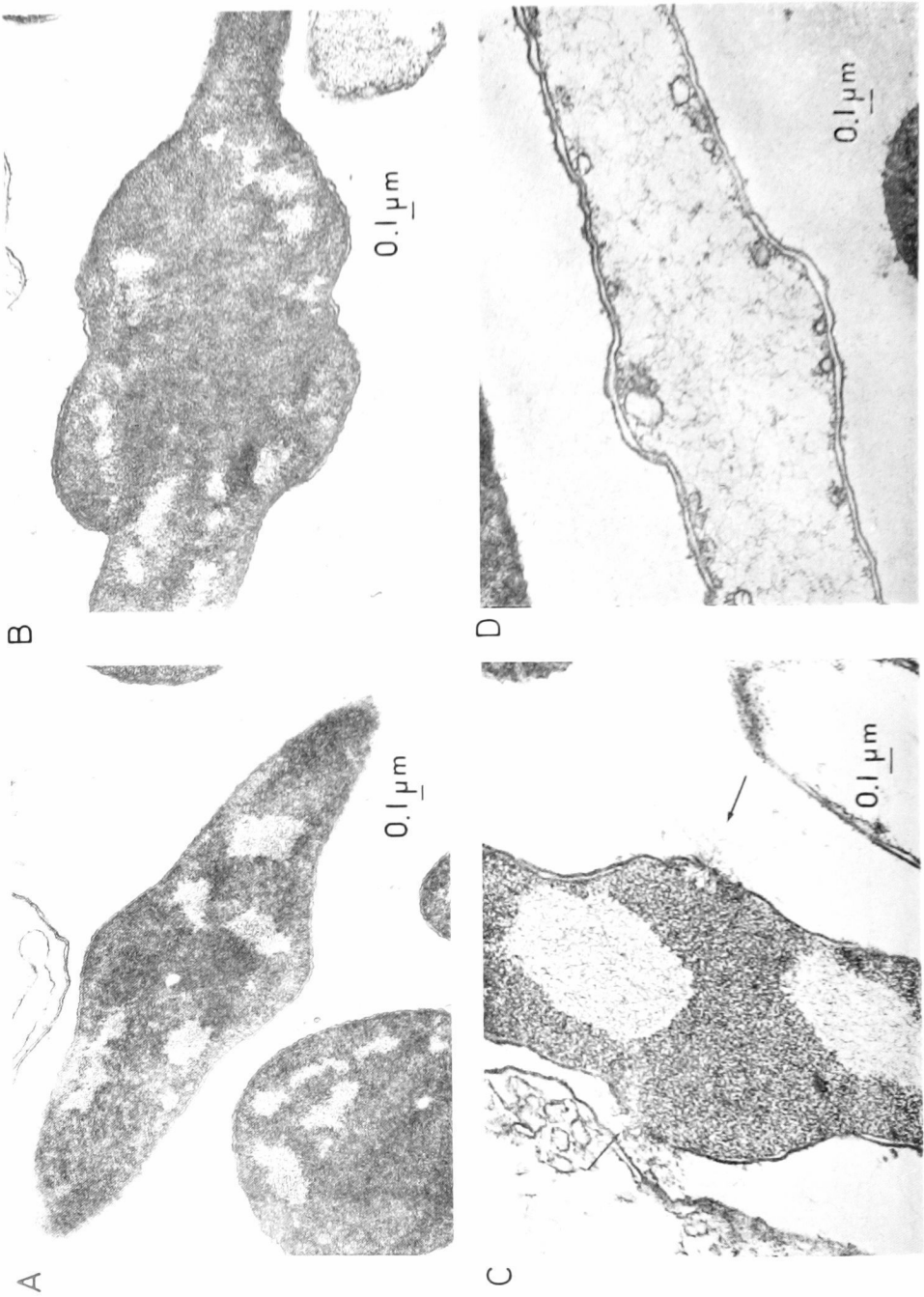


Fig. 12 Comparison of the viable counts of stabilized and osmotically shocked cultures

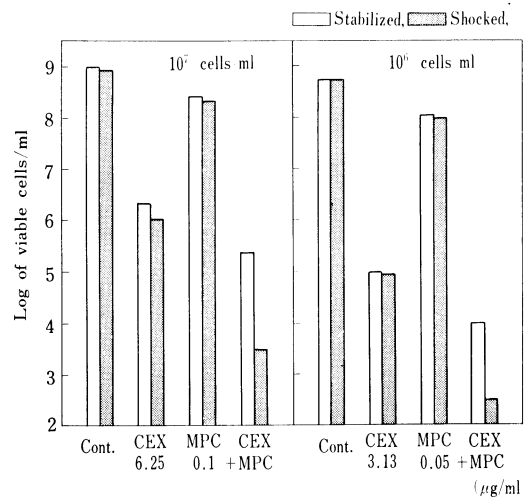


Fig. 13 Gel electrophoretic patterns of [14 C] penicillin G-binding proteins in *E. coli* K-12

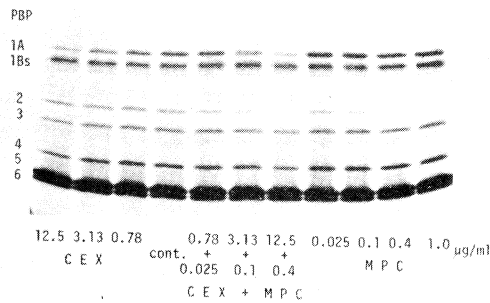
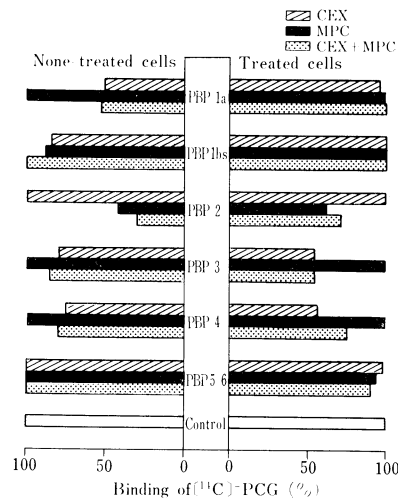


Fig. 14 Affinity of antibiotics for penicillin binding proteins in *E. coli* K-12



示したものが Fig. 14 の左で、右は *E. coli* K-12 の正常細胞を各薬剤で 1 時間処理を行ない、形態変化を起こしている細胞から調製した膜画分を用い、[14 C]PCG の親和性を検討した結果を示している。いずれも CEX は 3.13 μ g/ml, MPC は 0.1 μ g/ml で、併用時は CEX 3.13 μ g/ml と MPC 0.1 μ g/ml の作用であり、この値は CEX, MPC 単独作用時の 1/4 MIC に相当する濃度である。併用時には PBP 2 と 3 においてそれぞれ単独作用に近い親和性を示すことを認めた。

11. リン酸緩衝液中での溶菌

薬剤処理により誘発される溶菌活性を測定した結果を Fig. 15 に示した。薬剤を含んだ培地中で 37°C 25 分処理を行なった *E. coli* ST-0198 のリン酸緩衝液中での溶菌は CEX, MPC 単独ではほとんど溶菌が起こらない濃度を併用したときに 5 分後より急速に溶菌が認められ、

Fig. 15 Effect of CEX, MPC and the combination on lysis of *E. coli* ST-0198 in phosphate buffer

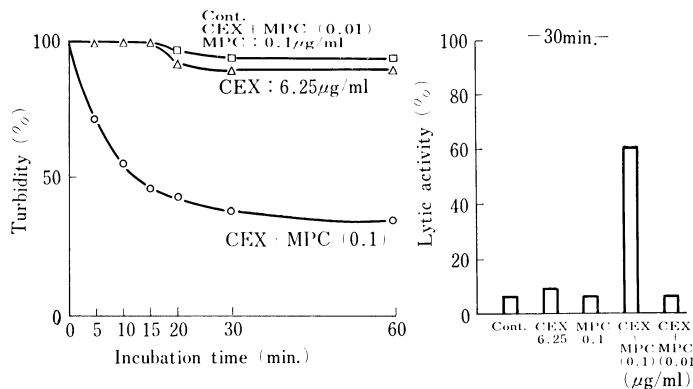
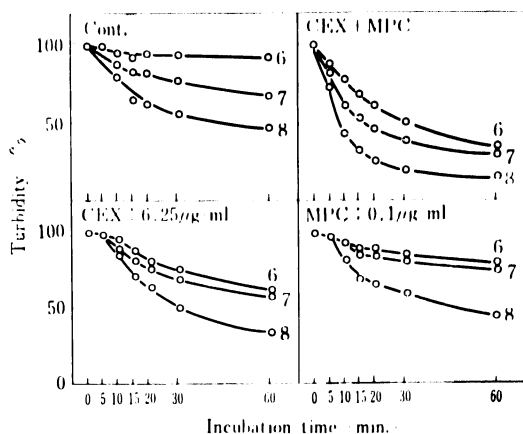


Fig. 16 Effect of CEX, MPC and the combination of *E. coli* ST-0198 in phosphate buffer



30 分後には約 60% の溶菌活性を示した。Fig. 16 は 50 mM リン酸緩衝液の pH を変化させた場合の溶菌速度をみたもので、いずれの場合もアルカリ側で溶菌活性が増加していた。また、正常菌では酸性側で溶菌がほとんど認められなかったが、CEX と MPC を併用した場合には CEX, MPC 単独に比べより活性化されていた。

III. 総括および考察

現在、抗菌スペクトルの拡大、抗菌力の増強、耐性菌の出現防止、副作用の軽減、相乗作用などを期待して、抗生物質や化学療法剤間の併用が行なわれている。

Mecillinam と penicillin あるいは cephalosporin 剤との併用により協力作用が得られるという報告は多い¹³⁻¹⁶⁾。しかし、協力作用発現の機作についての報告は認められない。

われわれは *Escherichia coli* に対して形態的に相異なる作用を示す Cephalixin と Mecillinam 間の併用効果について検討した。まず、種々の細菌を用いて Checkerboard titration method により協力作用の有無を検討した結果、使用したすべての菌性で協力作用が現われることを確認し、FIC index から両薬剤間の作用が協力作用であることがわかった。しかし、協力作用が現われる CEX と MPC の配合比は一定せず、菌種によってかなりの幅がみられた。そこで協力作用が多く現われる割合の中から CEX : MPC 8 : 1 と 32 : 1 を選びこの固定した配合比でどの程度の協力作用が現われるかを 89 菌株を用いて検討した。CEX に MPC が添加されることにより抗菌力が増強することを認めたが、CEX と MPC の併用により *Enterobacter*, *Serratia*, indole 陽性の *Proteus* に対しても抗菌力が増強することは興味深く思われた。そこで 2 剤間の協力作用を再確認する

ために併用時の殺菌作用についての検討を行なった。*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* でそれぞれ単独では殺菌されない濃度を併用することにより著しい殺菌作用の増強がみられた。また、Cephalixin と Mecillinam の作用時間をずらせその殺菌効果をみたが CEX と MPC の 2 剤が同時に存在した時、いずれの場合にも協力作用が現われた。そこでマウスを用いた実験的感染症に対してもこれらの 2 剤間で協力作用が発現するかどうかを調べた。*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* を感染させたマウスの敗血症による死亡に対する治療効果を一定の比率の Cephalixin と Pivmecillinam の組み合わせで検討し ED₅₀ を求めた結果、それぞれ 0.55、0.33 という FED index を得ることができた。そして、この実験で使用した投与量でのマウス体内濃度の比がどのようなものであるかを血中濃度を測定することにより推定した。治療に用いた投与量で得られる CEX と MPC の比率は 17.4 : 1 あるいは 7.3 : 1 と *in vitro* で協力作用が多く認められる比率の範囲内にあり、*in vivo* 併用効果の発現を裏付けることができた。これらの実験で Cephalixin と Mecillinam が種々の細菌に対して協力作用を示すことを確認できたので、この 2 剤間の協力作用のメカニズムについて *Escherichia coli* を用いて検討を加えた。

現在、β-lactam 剤が抗菌力を示す要因として、抗生物質の外膜透過性、β-ラクタマーゼに対する安定性、β-lactam 剤の標的酵素であるペニシリン結合蛋白質 (PBPs) への親和性、細菌が自己融解酵素の活性化の誘発などが考えられている。*Escherichia coli* ST-0198 に対する抗菌力が EDTA 存在下でもほとんど増強されなかったことから、併用時に外膜透過性が亢進したとも推測されず、また、*Escherichia coli* ST-0193 や *Escherichia coli* K-12 はほとんど β-ラクタマーゼを産生しないことからこの協力作用は β-lactam 剤の作用部位において現われたものであると考えられ、PBPs に対する親和性とオートリシン活性の誘発に興味もたれた。そこで Cephalixin と Mecillinam 併用時の形態変化について検討を行なった。位相差顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡観察から、Cephalixin および Mecillinam 作用で、それぞれ伸長化菌および卵形細胞を、併用時には伸長化した細胞の中央部にバルジが現われ、バルジ部分からのスファロプラスト様構造物の突出、溶菌に到る一連の過程を確認できた。GREENWOOD ら¹⁷⁾は走査型電子顕微鏡を用いて *Escherichia coli* において penicillin の作用部位は 2 箇所あり、伸長化した細胞に bulge を形成するが、Cephalixin, Mecillinam は作用部位を 1

つしかもたないため伸長化菌あるいは卵形菌を形成すると考えていた。しかし、SPRATT¹⁾は *Escherichia coli* の細胞分裂、細胞伸長、細胞形態に対する β -lactam 剤の効果はペニシリン結合蛋白質の 1 から 3 の存在によることを示し、これらのペニシリン結合蛋白質が細菌の形態と密接に関係していることが確認され、その機能が詳細に検討されている。ペニシリン結合蛋白質 2、3 の機能についての詳しい報告はないが、松橋ら^{18,19)}によりペニシリン結合蛋白質と細胞分裂とのかかわりあいが見出されている。Cephalexin と Mecillinam の併用時に殺菌、溶菌作用が増強されることから、併用時にはそれぞれ単独で親和性を示す以外のペニシリン結合蛋白質への親和性が增大するという可能性も考えられ、コンペティションや薬剤処理を行ない形態変化を起こさせた *Escherichia coli* の膜画分を用いて検討したがペニシリン結合蛋白質 2 と 3 に対し相加的な親和性しか示さないことがわかった。そして、併用時にスフェロプラスト形成能が増強され、osmotic shock を受けやすくなっていることから、併用時に生じるスピンドルという形態が溶菌に対して何らかのかかわりあいを有していることが示唆された。リン酸緩衝液中での溶菌活性についての検討でも、短時間 Cephalexin と Mecillinam の処理を受けた細胞で、直ちに溶菌が開始し、その活性も単独処理時の細胞に比べ大きかった。正常な菌の場合、溶菌系を活性化する pH はアルカリ側に存在し、Cephalexin, Mecillinam 単独作用により誘発される活性は逆に酸性側に存在していた。一方、併用時に誘発される活性はいずれの pH 域でも同程度に認められることから、併用により 1 種あるいはそれ以上の溶菌系の活性化が誘発されていると考えられる。

以上の結果を総合的に考え、われわれは Cephalexin と Mecillinam の併用により *Escherichia coli* で協合作用が認められるのはペニシリン結合蛋白質 3 と 2 が阻害される結果、スピンドル細胞が形成され、このスピンドル細胞は形態維持能力が弱く、バルジ部分の細胞壁成分がこわれやすくなっているため、バルジ部分にスフェロプラストが形成されやすくなり、osmotic shock を受けやすくなっていること、さらに細胞の溶菌活性が非常に強く誘発されることがこの協合作用の発現をもたらしていると考えている。

最近、TOMASZ ら²⁰⁻²²⁾は *Escherichia coli* でペニシリン結合蛋白質と溶菌、細胞の死というものについて検討を加えている。ペニシリン結合蛋白質 1 では死につながる 3 種の仮説をあげているが、ペニシリン結合蛋白質 2 あるいは 3 と細胞の死というものの関係については不明であるとしている。

現在、 β -lactam 剤にトレラントな *Escherichia coli* の変異株やペニシリン結合蛋白質欠損株を用いて種々のペニシリン結合蛋白質の機能あるいは溶菌のメカニズムが検討されている^{23,24)}が、ペニシリン結合蛋白質 2 と 3 の阻害が溶菌という過程にどのようなかかわりあいをもっているのか興味もたれる。

文 献

- 1) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 72: 2999~3003, 1975
- 2) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Morphological changes in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* exposed to cephalixin. Japan J. Microbiol. 16: 83~94, 1972
- 3) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: FL-1060: A new beta-lactam antibiotic with novel properties. J. Clin. Pathol. 26: 1~6, 1973
- 4) MELCHIOR, N. H.; J. BLON, L. TYBRING & A. BIRCH-ANDERSEN: Light and electron microscopy of the early response of *Escherichia coli* to a 6 β -amidopenicillanic acid (FL 1060). Acta. Path. Microbiol. Second. Section B. 81: 393~407, 1973
- 5) LICHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 6) 吉田 正, 木村靖雄, 中清水 弘, 土肥正善, 棚野義博, 大坪 龍: Cefaclor の動物における吸収・排泄・代謝。Chemotherapy 27 (S-7): 105~115, 1979
- 7) 山崎俊幸, 畚野 剛, 土屋鏡司: Pivmecillinam の吸収、排泄および体内分布について。Chemotherapy 25: 109~114, 1977
- 8) KELLENBERGER, E.; A. RYTER & J. SECHAUD: Electron microscopy study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 671~678, 1958
- 9) HORIDGE, G. A. & S. L. YAMM: Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. Science 163: 817~818, 1969
- 10) LUFT, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409~414, 1961
- 11) REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208~212, 1963
- 12) ELION, G. B.; S. SINGER & G. H. HITCHINGS: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII.

- Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* 208 : 477~488, 1954
- 13) TYBRING, L. & N. H. MELCHIOR: Mecillinam (FL 1060), a 6 β -amidinopenicillanic acid derivative: Bactericidal action and synergy *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8 : 271~276, 1975
- 14) NEU, H. C.: Synergy of mecillinam, a beta-amidinopenicillanic acid derivative, combined with beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10 : 535~542, 1976
- 15) GRUNBERG, E.; R. CLEELAND, G. BESKID & W. F. DELORENZO: *In vivo* synergy between 6 β -amidinopenicillanic acid derivatives and other antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 9 : 589~594, 1976
- 16) SCHELD, W. M.; F. N. FINK, D. D. FLETCHER & M. A. SANDE: Mecillinam-ampicillin synergism in experimental *Enterobacteriaceae* meningitis. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16 : 271~276, 1979
- 17) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: The two sites of penicillin action in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 128 : 791~794, 1973
- 18) NAKAGAWA, J.; S. TAMAKI & M. MATSUHASHI: Purified penicillin binding proteins 1bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 43 : 1379~1380, 1979
- 19) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI: Thermosensitive mutant in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 74 : 5472~5476, 1977
- 20) TOMASZ, A.: From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 1 : 434~467, 1979
- 21) KITANO, K. & A. TOMASZ: Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16 : 838~848, 1979
- 22) KITANO, K.; R. WILLIAMSON & A. TOMASZ: Murein hydrolase defect in the beta-lactam tolerant mutants of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 7 : 133~136, 1980
- 23) KITANO, K. & A. TOMASZ: *Escherichia coli* mutants tolerant to beta-lactam antibiotics. *J. Bacteriol.* 140 : 955~963, 1979
- 24) NIKAIKO, T.; S. TOMIOKA & M. MATSUHASHI: Mutant of *Escherichia coli* tolerant to the lysis induced by cephalixin. *Agric. Biol. Chem.* 43 : 2639~2640, 1979

SYNERGISTIC EFFECT OF CEPHALEXIN WITH MECILLINAM

MASAKO OTSUKI, TORU OKU, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine

In vitro synergistic effects of cephalexin and mecillinam against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* and *Proteus* spp. were demonstrated by the checker-board titration and fixed combination method, and the *in vivo* effect of these two antibiotics and their mechanism of action were also discussed.

The growth curve after the exposure of cephalexin and mecillinam at the concentrations at which these antibiotics had no effects when given alone showed a decrease of the turbidity and the presence of a bactericidal effect. In experimental infection in mice, the combination of both drugs showed a synergistic effect and excellent therapeutic effect. The blood concentration ratio of cephalexin to mecillinam was coincident with the concentration ratio of these antibiotics at which the synergistic effect was observed *in vitro*. Phase-contrast and scanning electron micrographs of bacterial cells exposed to the combination of cephalexin and mecillinam showed somewhat elongated bacteria and formation of spindle cells with swelling in the central part; cephalexin caused formation of filamentous cells, while mecillinam caused formation of ovoid cells. Cephalexin showed an affinity for PBP-1a and 3, and mecillinam showed an affinity for PBP-2. When these antibiotics were used concurrently, they exerted an additive effect to increase the affinity for PBPs. The lytic activity was increased much more after the combination of two antibiotics than after a single exposure.