

Clavulanic acid と Amoxicillin の併用による *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

西野 武志・大瀬満寿代・佐治 弓子・谷野 輝雄
京都薬科大学微生物学教室

β -lactamase inhibitor である Clavulanic acid (CVA) を Amoxicillin (AMPC) と併用した場合の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について検討を行ない、以下のような成績を得た。

1. 教室保存の標準株に対する抗菌スペクトラムについて検討を行なったところ、CVA は単独で弱いながらも抗菌力を示したが、1/4 MIC 以下の濃度を AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の比率で AMPC と併用した場合、AMPC 感受性菌に対しては AMPC の MIC に影響を与えず、AMPC 耐性の *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* などに対して著しい AMPC の MIC の低下を認めた。

2. 臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* に対する感受性分布および感受性相関では、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ともに、AMPC 耐性菌に抗菌力を示し、Cephalexin (CEX) の抗菌力と比較しても優れていた。MIC を AMPC と CVA の合計濃度でみた場合、平均すれば (2 : 1) が (1 : 2) にはほぼ同等であり、(8 : 1) より約 1.5 倍小さかった。

3. Checkerboard dilution method でも上記菌種の AMPC 耐性臨床分離株で AMPC と CVA 間の著しい協力作用が認められた。

4. AMPC の一定濃度 (3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$) に CVA を併用して AMPC 耐性の臨床分離株を阻害するに要する濃度を求めたところ、その濃度は菌種により異なり、同一菌種でも 2 相性の分布を示すものも認められた。

5. AMPC 耐性の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* に対する AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の殺菌作用を検討した結果、MIC 濃度で著明な殺菌作用が見られ、両剤の併用による協力作用を認めた。

6. AMPC 耐性の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgareis* を用いたマウス実験的感染症に対する治療効果では *in vitro* 同様 AMPC と CVA の併用により著明な協力作用を認めた。また AMPC と CVA の合計の ED₅₀ 値と比較すると、総合すれば AMPC : CVA の比が (2 : 1) の場合に最も優れた治療効果が得られた。

Clavulanic acid は 1977 年放線菌 *Streptomyces clavuligerus* の代謝産物として発見された β -lactam 抗生物質であり^{1,2)}、Fig. 1 のような構造を有する。このままの形では不安定であるが Na または K 塩とすると安定性が増す。このものは β -lactamase 阻害作用を有し、特に penicillinase 型 β -lactamase を不可逆的に不活化するといわれている³⁻⁵⁾。

一方、Amoxicillin は長い歴史でその有効性や安全性また体内動態などもよく知られている内服可能な penicillin であるが、各種 penicillinase によって加水分解され、これらの酵素を産生する菌には無効であった。したがって β -lactamase 阻害剤である Clavulanic acid を Amoxicillin と併用すれば Amoxicillin 耐性菌に対

する有効化が期待できる。

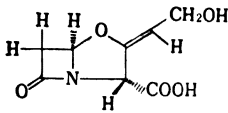
今回われわれは Clavulanic acid (CVA) と Amoxicillin (AMPC) の併用効果について *in vitro* および *in vivo* で細菌学的検討を行ない、以下のような成績を得たので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬

Clavulanic acid (CVA) および Amoxicillin (AMPC) のいずれも力価の明らかな標品を用いた。また AMPC と CVA を (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の割合で併用した時、これをそれぞれ AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) と示した。対照薬としては Cephalexin (CEX) を用いた。

Fig.1 Chemical structure of clavulanic acid



2. 使用菌株

抗菌スペクトラム検討用には、教室保存のグラム陽性およびグラム陰性の通性嫌気性および好気性菌 45 株を用いた。

感受性分布の測定には臨床分離の *Staphylococcus aureus* 52 株, *Escherichia coli* 52 株, *Klebsiella pneumoniae* 56 株, *Proteus vulgaris* 30 株, *Proteus mirabilis* 24 株を用いた。その他の実験用には上記菌株より目的に応じ選択して用いた。

3. 薬剤感受性測定法

日本化学療法学会感受性測定法⁹⁾に従い前培養に tryptose broth (TSB; 日水), 測定用培地に heart infusion agar (HIA; 日水) を用いた寒天平板希釈法により, 37°C 18~20 時間培養後の最小発育阻止濃度 MIC ($\mu\text{g/ml}$) を求めた。菌量としては 10^8 cells/ml および 10^6 cells/ml の接種菌量を用いて検討した。なお *Streptococcus* 群, *Corynebacterium diphtheriae* については 10% 馬血液加 HIA を用いた。

ただし、ここで AMPC と CVA の併用時の MIC については AMPC の濃度で求めて表示した。すなわち AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の 3 種の比率での検討を行なったが、その際 AMPC の濃度が最高 100 $\mu\text{g/ml}$ より 2 倍希釈となるように調製し、その結果、例えば AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の MIC がすべて 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であったということは、それぞれ AMPC 6.25 $\mu\text{g/ml}$ + CVA 12.5 $\mu\text{g/ml}$, AMPC 6.25 $\mu\text{g/ml}$ + CVA 3.13 $\mu\text{g/ml}$, AMPC 6.25 $\mu\text{g/ml}$ + CVA 0.78 $\mu\text{g/ml}$ の併用であることを意味する。このような MIC の表示法をとった理由は、CVA の β -lactamase inhibitor としての作用を評価する場合、従来の剤の評価時のように 2 剤の合計濃度の MIC を求めるよりも、AMPC の MIC に及ぼす影響の検討や、併用されている CVA 濃度の算出が容易で、より適切であると考えたためである。

4. 併用効果の検討

CVA と AMPC の併用効果の検討を HIA を用いた checkerboard dilution method により行なった。使用菌株は 3. の実験で CVA の併用により AMPC の MIC の低下のみられた AMPC 耐性菌を中心に、一部標準株についても行なった。接種菌量は 10^8 および 10^6 cells/ml について行なったが、実験結果のところでは 10^8 cells/ml の結果のみを示した。

5. CVA の併用濃度の検討

臨床分離の AMPC 耐性菌 (10^8 および 10^6 cells/ml での MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上のもの) について、AMPC の一定濃度 (3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$) に CVA を併用してその増殖を阻止するに要する濃度を求めた。*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* を試験菌種とし、HIA を用いて 10^8 および 10^6 cells/ml の接種菌量で検討を行なった。ただし *S. aureus* は 10^6 cells/ml で AMPC に感受性を示すため、 10^8 cells/ml のみとした。

6. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

AMPC, CVA, AMPC : CVA (2 : 1) および CEX の抗菌力に及ぼす培地 pH の影響は pH 6.0, 7.2, 8.0 に調製した HIA を用い、試験菌としては *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* の 4 菌種 11 菌株を用いて検討した。接種菌量としては 10^8 と 10^6 cells/ml の両方につき、また AMPC : CVA (2 : 1) の他に (1 : 2), (8 : 1) についても行なったが、結果にはその一部を示した。

また接種菌量の影響は 10^8 , 10^6 , 10^7 , 10^9 cells/ml について pH 7.2 の HIA を用い、同じく 11 株について検討した。AMPC : CVA (2 : 1) の他に (1 : 2), (8 : 1) についても検討したが、結果には (2 : 1) の場合のみ示した。

血清の影響については非働化馬血清を 10, 25, 50% の割合で添加した heart infusion broth (HIB; 日水) を用い、*S. aureus* および *E. coli* の AMPC 耐性菌各 1 株につき検討した。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) について、 10^9 cells/ml 菌液の一白金耳接種で行なった。

7. 殺菌作用の検討

試験菌株は先の checkerboard dilution method による併用効果の検討で、CVA と AMPC 間に著しい協同作用が認められた AMPC 耐性の *S. aureus* S-14, *E. coli* No. 33, *K. pneumoniae* No. 129, *K. pneumoniae* No. 182, *P. vulgaris* No. 109 および *P. vulgaris* No. 202 の 6 株を用いた。これらの菌株を TSB で一夜前培養し、HIB で 10^{-4} 希釈して 37°C で振とう培養を行なった。約 3 時間後の対数増殖期 (約 10^7 cells/ml) に

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の MIC 付近の濃度を作用させ 1, 2, 4 および 24 時間後に菌液をサンプリングし、生菌数測定を行なった。また同時に AMPC および CVA 単独作用時の増殖曲線に及ぼす影響についても検討した。

8. マウス実験の感染症に対する治療効果の検討

臨床分離の AMPC 耐性株である *S. aureus* S-14, *E. coli* No. 33, *K. pneumoniae* No. 182, *K. pneumoniae* No. 129 および *P. vulgaris* No. 202 の計 5 株を用いて検討を行なった。すなわち nutrient broth (NB ; 日水) で前培養した試験菌株を L 字管に入れた NB に一白金耳接種し、37°C 16~18 時間振とう培養後、毒力に応じて NB で適宜希釈し、6% ムチン (Orthana-Kemisk Fabrik) と等量混合した。この菌液を 1 群 10 匹の ddY-S δ マウス (17~18g) の腹腔内に接種し、2 時間後 1 回、0.5% CMC に溶解または懸濁した AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) および CEX で経口治療した。ED₅₀ は 1 週間後のマウスの生死により LITCHFIELD-WILCOXON 法⁷⁾により求めた。

9. マウス血清中 CVA および AMPC 濃度の測定

CVA, AMPC の単独投与時および AMPC : CVA (1 : 2), (1 : 1), (2 : 1), (8 : 1) の同時投与時のマウス血清中濃度を測定した。

すなわち 0.5% CMC に懸濁した各薬剤を 1 群 4 匹の ddY-S δ マウス (17~18g) に経口投与し、15, 30, 60, 90, 120 分後に腋下動脈より採血して 4 匹分を一緒にし、すみやかに水中で冷却後、血清を遠心分離した。

AMPC の定量は *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とし、disc 法による Bioassay により行なった。検定用培地には nutrient agar (NA ; 日水) を用い、これに *B. subtilis* ATCC 6633 の孢子懸濁液を最終濃度 1×10^5 cells/ml となるように混ぜてシャーレに分注し、0.1 M リン酸 buffer (pH 7.0) で希釈したサンプルおよび標準液を disc に含ませ、この上においた。16 時間培養後の阻止円の直径を測定し、サンプル中の AMPC 濃度を求めた。またこの時サンプル中に含まれる CVA が AMPC の阻止円の径には影響を与えないことを確かめた。

他方、CVA の定量は β -lactamase 産生の *K. pneumoniae* ATCC 29665 を検定菌とし、この前培養菌液を 4% の割合で NA に混ぜ、これにさらに penicillin G (PCG) を最終濃度 60 μ g/ml となるように添加したものをシャーレに分注し、0.1 M リン酸 buffer (pH 7.0) で希釈したサンプルおよび標準液を disc に含ませこの上においた。16 時間培養後の阻止円の直径を測定し、サンプル中の CVA 濃度を求めた。この方法は CVA が濃度に応じて検定菌の β -lactamase を阻害し、それに

よって PCG が分解されずに阻止円を形成することを利用して。また、この時サンプル中に含まれる AMPC が CVA の阻止円の径に影響を与えないことを確かめた。

以上のようにして CVA と AMPC の単独投与時の定量および同時投与時の分別定量が可能であった。

10. CVA の β -lactamase 阻害作用の検討

β -lactamase としては *E. coli* No. 21 の TEM 型 β -lactamase を用い、AMPC を基質とした際の CVA の阻害形式および K_i 値を求めた。すなわち *E. coli* No. 21 の対数増殖期の菌体を遠心集菌し、この菌体を 0.1 M リン酸 buffer で 2 回洗浄した後超音波破碎した。そして 13,000 rpm で 30 分間冷却遠心分離を行ない、その上清を β -lactamase の粗酵素液として使用した。なおサンプルの蛋白質の定量は Lowry 法により行ない、酵素活性はマイクロヨード法⁸⁾により測定した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) および CEX の抗菌スペクトラムを Table 1~4 に示した。10⁸ cells/ml の場合、AMPC は幅広い抗菌スペクトラムを有し、抗菌力も優れていたが、MIC が 100 μ g/ml 以上の耐性菌も認められた。一方、CVA の単独の抗菌力 (MIC) はグラム陽性菌では 12.5 μ g/ml 以上がほとんどで、グラム陰性菌では 25 μ g/ml 以上であり、抗菌力そのものは弱かった。しかし、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の比率で AMPC と併用した場合、AMPC 感受性菌に対しては AMPC の MIC に影響を与えず、AMPC 耐性の *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* などに対し、著しい MIC の低下を認めた。また、その際の CVA の併用濃度は CVA の MIC の 1/4 以下であった。10⁸ cells/ml の場合も、同様な結果が得られたが、10⁸ cells/ml で AMPC に耐性の *S. aureus* が 10⁶ cells/ml では感受性化した。

2. 臨床分離株の感受性分布と感受性相関

a. *S. aureus*

感受性分布および感受性相関の結果を Fig. 2~9 に示した。

10⁸ cells/ml について感受性分布とその累積 % をみると、*S. aureus* では AMPC の MIC は幅広い分布を示し、100 μ g/ml 以上の高度耐性を示す株も 40% 近く存在した。しかし、これに対し AMPC : CVA (2 : 1) の併用ではすべての株の MIC が 3.13 μ g/ml 以下に分布し、感受性化していた。またその抗菌力は CEX に比べても優れていた。一方、CVA の MIC はすべて 12.5~25 μ g/ml に分布していた。また、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の比較では MIC (併用中の AMPC 濃

Table 1 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^8 cells/ml)

Test strain	AMPC	CVA	* AMPC : CVA			CEX
			(1 : 2)	(2 : 1)	(8 : 1)	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.2	12.5	0.2	0.2	0.2	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.2	25	0.2	0.2	0.2	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.39	12.5	0.39	0.39	0.39	25
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.39	25	0.39	0.39	0.39	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.2	12.5	0.2	0.2	0.2	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80(PC-R)	>100	12.5	0.78	1.56	1.56	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.39	100	0.39	0.39	0.39	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.025	25	0.025	0.025	0.025	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK	0.025	25	0.025	0.025	0.025	1.56
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.56	>100	1.56	1.56	1.56	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	1.66	>100	1.56	1.56	1.56	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	0.025	25	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	0.025	25	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.006	50	0.006	0.006	0.006	0.05
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.05	25	0.05	0.05	0.05	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	1.56
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.39	6.25	0.39	0.39	0.78	1.56

* Figures of MICs represent concentration of AMPC in combination

MIC ($\mu\text{g/ml}$)Table 2 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)

Test strain	AMPC	CVA	* AMPC : CVA			CEX
			(1 : 2)	(2 : 1)	(8 : 1)	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.1	12.5	0.1	0.1	0.1	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.2	12.5	0.2	0.2	0.2	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.39	12.5	0.39	0.39	0.39	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.2	25	0.2	0.2	0.2	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.1	12.5	0.1	0.1	0.1	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80(PC-R)	1.56	12.5	0.39	0.39	0.78	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.39	100	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.0125	12.5	0.0125	0.0125	0.0125	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK	0.025	25	0.025	0.025	0.025	0.78
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.78	>100	0.78	0.78	0.78	>100
<i>Streptococcus viridans</i>	0.78	>100	0.78	0.78	0.78	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.006	50	0.006	0.006	0.006	0.05
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.025	12.5	0.025	0.025	0.025	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.0125	6.25	0.025	0.025	0.025	1.56
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.2	6.25	0.2	0.2	0.2	0.78

* Figures of MICs represent concentration of AMPC in combination.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 3 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10^8 cells/ml)

Test strain	AMPC	CVA	* AMPC : CVA			CEX
			(1 : 2)	(2 : 1)	(8 : 1)	
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	12.5	50	6.25	6.25	12.5	25
<i>Escherichia coli</i> NIH	6.25	25	3.13	6.25	6.25	12.5
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10013-68	>100	50	12.5	50	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.39	25	0.39	0.39	0.39	6.25
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.39	50	0.39	0.39	0.39	6.25
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	50	0.78	0.78	0.78	12.5
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.39	25	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.78	50	0.78	0.78	0.78	12.5
<i>Shigella dysenteriae</i> EW 7	3.13	25	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	50	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	25	3.13	6.25	6.25	12.5
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	3.13	25	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.78	50	0.78	0.78	0.78	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC9632	>100	50	1.56	1.56	3.13	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC9394	>100	50	25	100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50	50	25	50	50	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC10006	>100	100	25	100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC9594	100	50	25	50	100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	100	50	100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	100	1.56	1.56	6.25	100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	50	0.78	0.78	0.78	25
<i>Proteus morgani</i> K100	>100	100	50	>100	>100	>100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH96	12.5	100	12.5	12.5	12.5	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH118	100	>100	50	100	100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	>100	100	50	100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	25	25	12.5	25	25	>100

* Figures of MICs represent concentration of AMPC in combination.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

度)の分布にわずかな差はあるが、ともに AMPC 耐性菌に有効であった。

10^8 cells/ml では 10^8 cells/ml でみられた AMPC 高度耐性株が感受性化する傾向がみられたが、その他は 10^8 cells/ml とほぼ同様の結果であった。

感受性相関については 10^8 cells/ml の結果のみ示したが、やはり AMPC : CVA (2 : 1) はすべての AMPC 耐性菌に有効であり、CEX よりも優れた抗菌力を有することがわかった。

AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) または (8 : 1) の相関については (8 : 1) > (2 : 1) > (1 : 2) の順に MIC (併用中の AMPC 濃度) が小さくなり、52 株の MIC の平均をとると (2 : 1) は (8 : 1) の 1.85 倍小さく (1 : 2) の 1.71 倍大きかった。したがって AMPC と CVA の合計濃度でみた場合には (2 : 1) は (8 : 1) の 1.38

倍小さく (1 : 2) の 1.03 倍小さくなることがわかった。

b. *E. coli*

感受性分布および感受性相関の結果を Fig. 10~17 に示した。

10^8 cells/ml について感受性分布とその累積%をみると、*E. coli* では AMPC の MIC は約 60% が 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有するが、残り約 40% は MIC が 100 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上の高度耐性株であった。これに対し AMPC : CVA (2 : 1) の併用では高度耐性株が消失し、MIC は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有し、3.13~50 $\mu\text{g/ml}$ に分布していた。またその抗菌力は CEX との比較でも優れていた。一方、CVA の MIC は 25~50 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、AMP C : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では、

Table 4 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10^6 cells/ml)

Test strain	AMPC	CVA	* AMPC : CVA			CEX
			(1 : 2)	(2 : 1)	(8 : 1)	
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25	12.5	3.13	6.25	6.25	6.25
<i>Escherichia coli</i> NIH	3.13	25	3.13	3.13	3.13	6.25
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	100	50	12.5	50	100	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.39	12.5	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.39	25	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	25	0.78	0.78	0.78	6.25
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.39	25	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.78	25	0.78	0.78	0.78	6.25
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	3.13	12.5	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	25	1.56	3.13	3.13	6.25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	12.5	3.13	6.25	6.25	12.5
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	25	1.56	1.56	1.56	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.78	25	0.78	0.78	0.78	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC9632	50	50	0.78	0.78	1.56	3.13
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC9394	>100	25	12.5	50	100	25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50	25	25	50	50	25
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC10006	>100	25	12.5	50	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC9594	50	50	25	50	50	100
<i>Serratia marcescens</i> IFO3736	100	100	25	100	100	>100
<i>Protus vulgaris</i> OX-19	25	25	0.78	1.56	1.56	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	25	0.78	0.78	0.78	12.5
<i>Proteus morgani</i> KONO	>100	100	25	100	>100	>100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.39	50	0.39	0.39	0.39	6.25
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	50	>100	50	50	50	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	>100	100	25	100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	12.5	25	3.13	12.5	12.5	>100

* Figures of MICs represent concentration of AMPC in combination.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

(2 : 1) に比べ (8 : 1) で MIC が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上での分布が出現し、(1 : 2) ではピークが $3.13 \mu\text{g/ml}$ に移るといような差がみられたが、いずれの場合も AMPC 耐性株に対する一応の有効性が認められた。 10^6 cells/ml でも 10^8 cells/ml とほぼ同様の結果が得られた。

感受性相関については 10^8 cells/ml の結果のみ示したが、AMPC : CVA (2 : 1) は AMPC 感受性株に対する MIC は AMPC 単独の場合と同等であるが、AMPC 耐性菌に対しある程度の抗菌力を有し、CEX との比較でも優れていた。また AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) または (8 : 1) の相関については (8 : 1) > (2 : 1) > (1 : 2) の順に MIC が小さくなり、52 株の MIC の平均をとると (2 : 1) は (8 : 1) の 1.67 倍小さく、(1 : 2) の 2 倍大きかった。したがって AMPC と CVA の合計濃度でみた場合には (2 : 1) は (8 : 1) の 1.21 倍小さく (1 : 2) と同じであった。

c. *K. pneumoniae*

感受性分布および感受性相関の結果を Fig. 18~25 に示した。

10^8 cells/ml の場合、すべての株で AMPC の MIC が $100 \mu\text{g/ml}$ または $100 \mu\text{g/ml}$ 以上となり高度耐性を示した。これに対し AMPC : CVA (2 : 1) の併用ではすべての株が感受性化し、MIC は $3.13 \mu\text{g/ml}$ にピークを有し、 $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に分布した。またその抗菌力は CEX と比較しても優れていた。CVA 単独の MIC はほとんど $50 \mu\text{g/ml}$ に集中していた。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では CVA の併用比が小さくなるほどピーク値が 2 倍ずつ高くなり、MIC の比較的高いところへの分布が多くなる傾向がみられたが、いずれの組合せでも AMPC 耐性株に有効であることがわかった。 10^6 cells/ml では AMPC に対する耐性度が 10^8 cells/ml に比べ低下する傾向がみ

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates

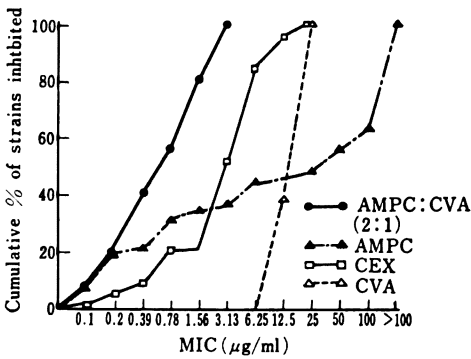
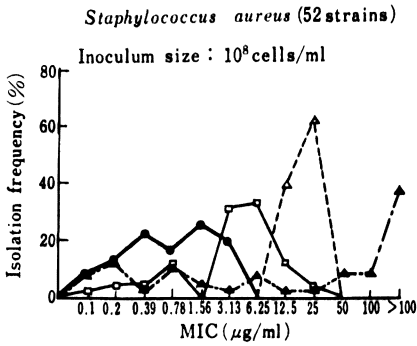


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates

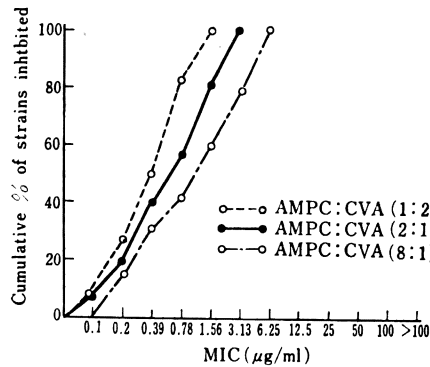
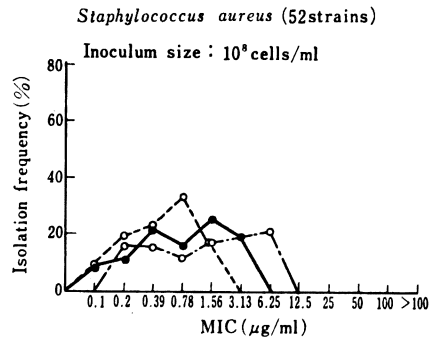


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates

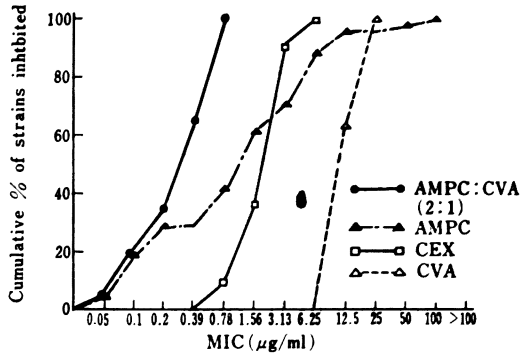
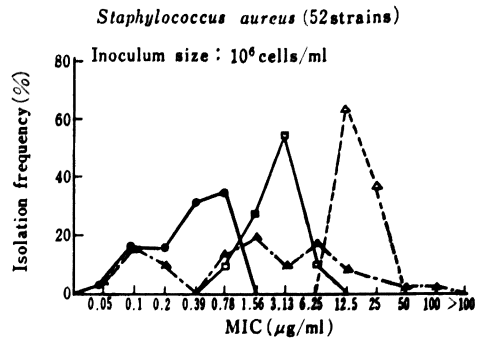


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates

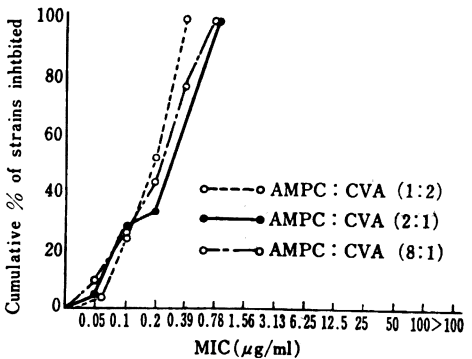
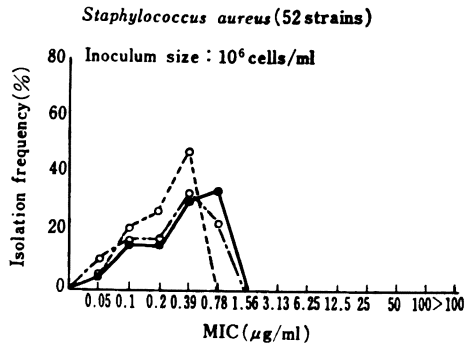


Fig. 6 Cross sensitivity of AMPC and AMPC : CVA (2 : 1)

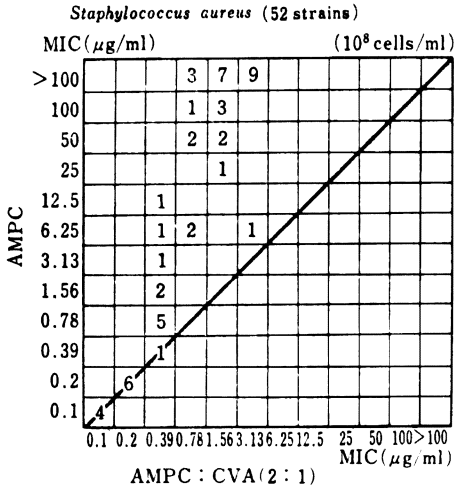


Fig. 7 Cross sensitivity of CEX and AMPC : CVA (2 : 1)

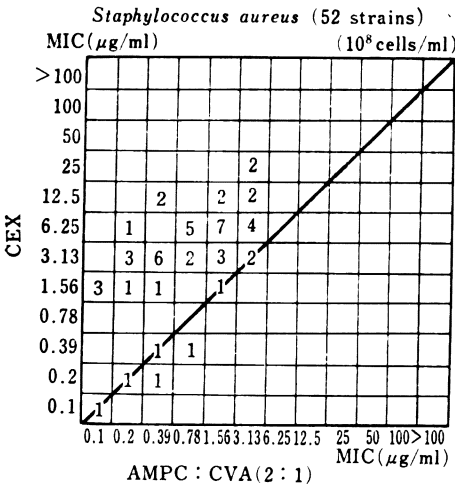


Fig. 8 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (1 : 2)

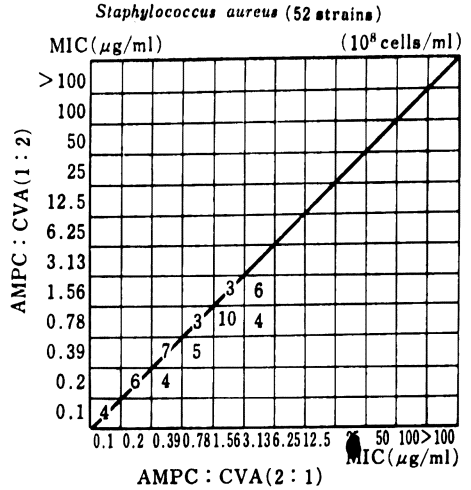
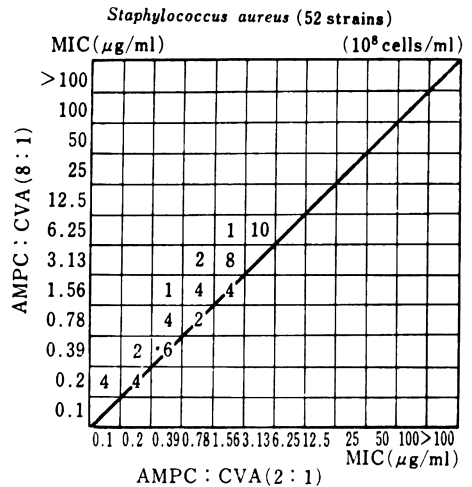


Fig. 9 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (8 : 1)



られたが、その他は 10^9 cells/ml とほぼ同様の結果であった。

感受性相関ではすべての株が AMPC に耐性を示す *K. pneumoniae* に対し、AMPC : CVA (2 : 1) は明らかに有効であり、CEX と比較しても多くの株で優れた抗菌力を示すことがわかった。また AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) または (8 : 1) の相関では、(8 : 1) > (2 : 1) > (1 : 2) の順に MIC が小さくなり、56 株の平均では (2 : 1) は (8 : 1) の 2.46 倍小さく、(1 : 2) の 2.07 倍大きかった。したがって AMPC と CVA の合計濃度でみた場合には (2 : 1) は (8 : 1) の 1.85 倍小さく、(1 : 2) にほぼ同等 (1.04 倍小さい) であった。

d. *P. mirabilis*

感受性分布および感受性相関の結果を Fig. 26~33 に示した。

10^8 cells/ml の場合、AMPC の MIC が $100 \mu\text{g/ml}$ またはそれ以上の耐性株は約 10% で残り約 90% は MIC が $1.56 \mu\text{g/ml}$ にピークを有し、 $0.78 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ に分布する AMPC 感受性株であった。AMPC : CVA (2 : 1) の併用では高度耐性株は消失し、MIC は $0.78 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ に分布し、 $1.56 \mu\text{g/ml}$ と $12.5 \mu\text{g/ml}$ にも小さなピークを有し、2 峰性を示した。また CEX と比較しても明らかに優れた抗菌力を有していた。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では MIC のより高いところに出る小さなピークが CVA

Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates

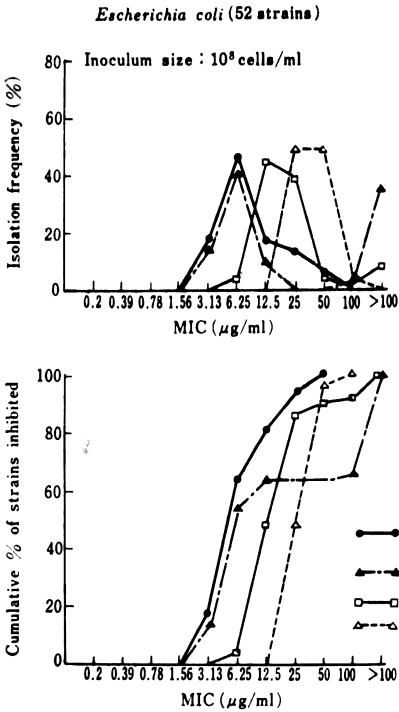


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates

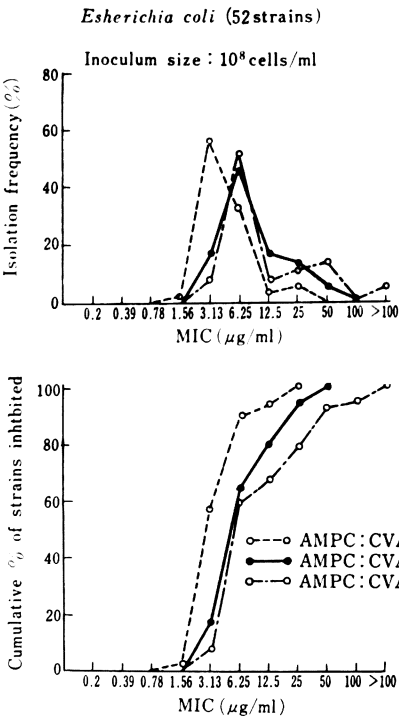


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates

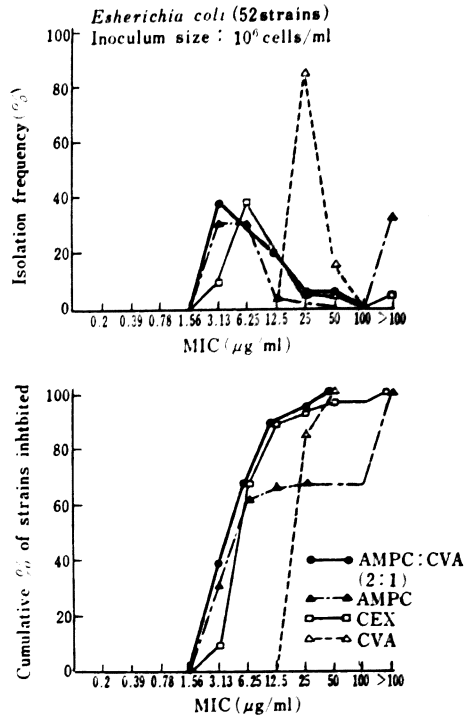


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates

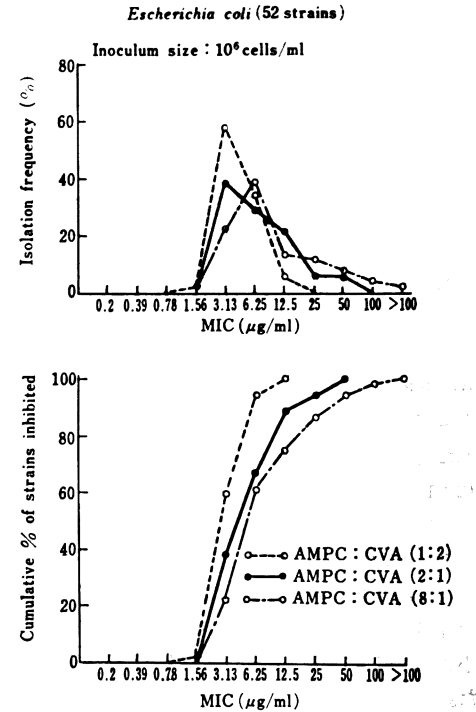


Fig. 14 Cross sensitivity of AMPC and AMPC : CVA (2 : 1)

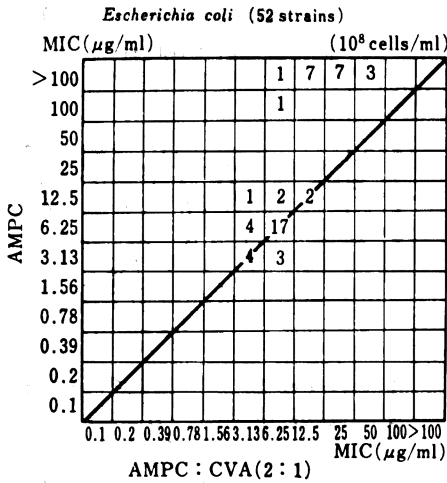


Fig. 15 Cross sensitivity of CEX and AMPC : CVA (2 : 1)

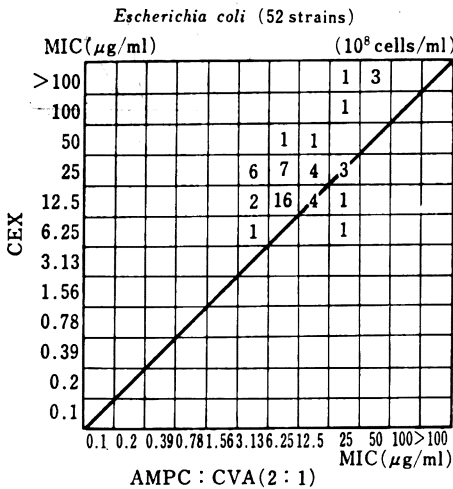


Fig. 16 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (1 : 2)

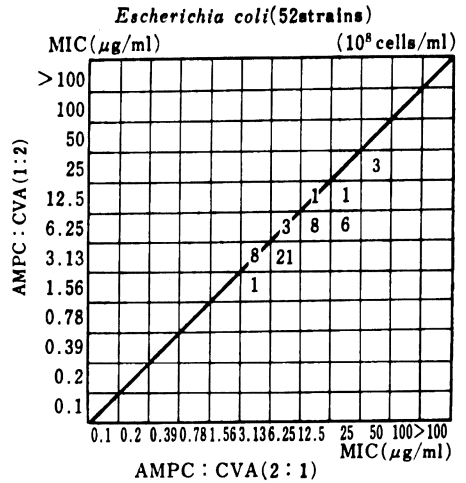
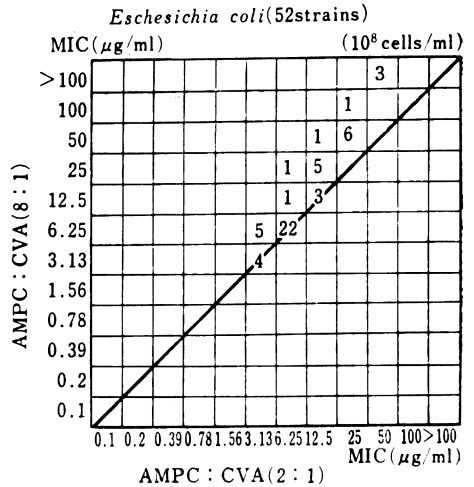


Fig. 17 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (8 : 1)



の併用比が小さくなるほど右にずれる他はほとんど差がなく、いずれの組合せでも AMPC 耐性菌に有効であった。10⁶ cells/ml でも 10⁸ cells/ml とほぼ同様の結果が得られた。

感受性相関では AMPC : CVA (2 : 1) は少数ではあるが存在する AMPC 耐性株に抗菌力を示し、AMPC 感受性株に対する MIC は AMPC 単独とほぼ同様であった。AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) 又は (8 : 1) の相関では (8 : 1) > (2 : 1) > (1 : 2) の順に MIC が小さくなり、24 株の平均をとると (2 : 1) は (8 : 1) の 1.29 倍小さく、(1 : 2) の 1.38 倍大きく、したがって AMPC と CVA の合計濃度では (2 : 1) は (8 : 1) にほぼ同等 (1.03 倍大きい) で、(1 : 2) より 1.45 倍小さく

なることがわかった。

e. *P. vulgaris*

感受性分布および感受性相関の結果を Fig. 34~41 に示した。

10⁸ cells/ml の場合、AMPC の MIC が 100 μg/ml 以上の高度耐性株が約 60% あり、残り約 40% は MIC が 1.56 μg/ml にピークを有し、0.78~3.13 μg/ml に分布していた。これに対し AMPC : CVA (2 : 1) の併用では高度耐性株がすべて消失し、MIC は 1.56 μg/ml と 6.25 μg/ml にピークを有し、0.78~25 μg/ml に分布していた。CEX の MIC は約 60% の株が 100 μg/ml 以上で、残り約 40% は 25 μg/ml にピークを有し、12.5~50 μg/ml に分布するため、AMPC : CVA (2 : 1)

Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates

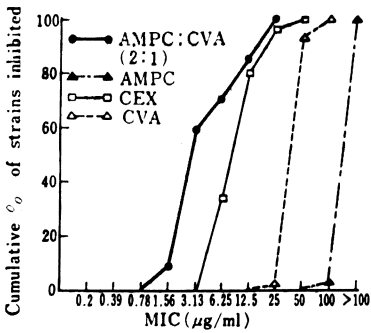
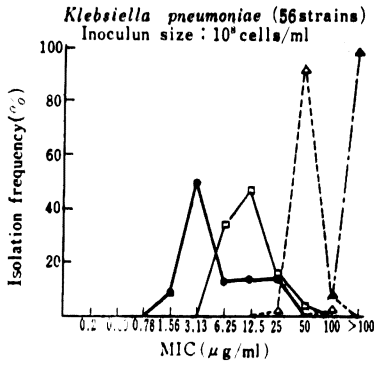


Fig. 19 Sensitivity distribution of clinical isolates

Klebsiella pneumoniae (56 strains)

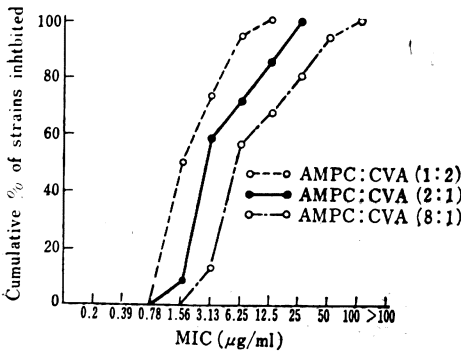
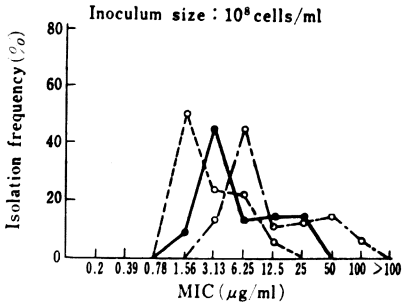


Fig. 20 Sensitivity distribution of clinical isolates

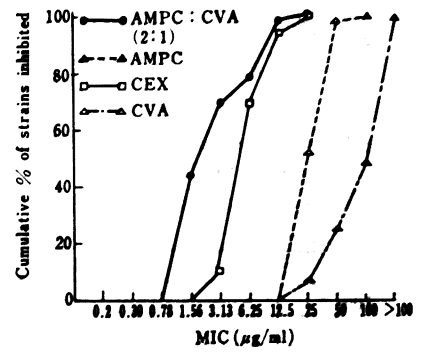
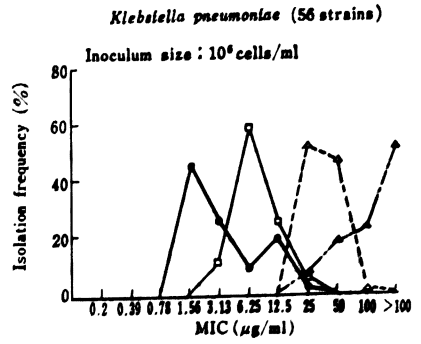


Fig. 21 Sensitivity distribution of clinical isolates

Klebsiella pneumoniae (56 strains)

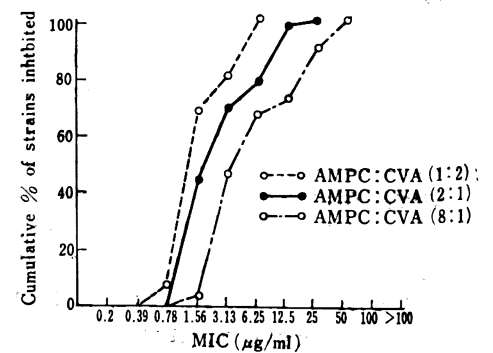
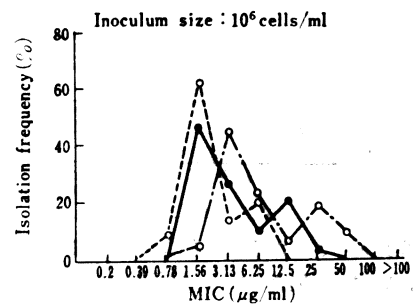


Fig. 22 Cross sensitivity of AMPC and AMPC : CVA (2 : 1)

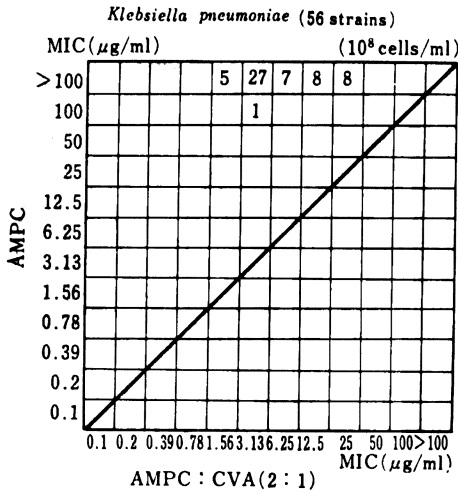


Fig. 23 Cross sensitivity of CEX and AMPC : CVA (2 : 1)

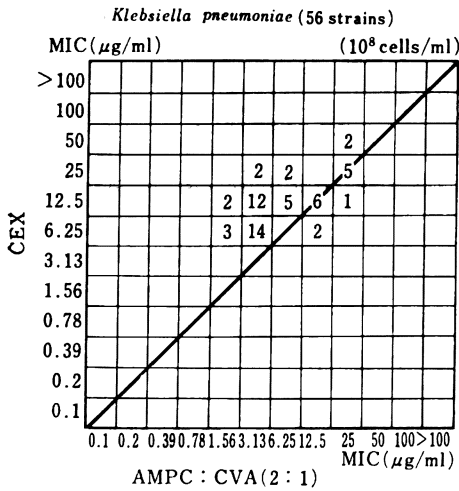


Fig. 24 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (1 : 2)

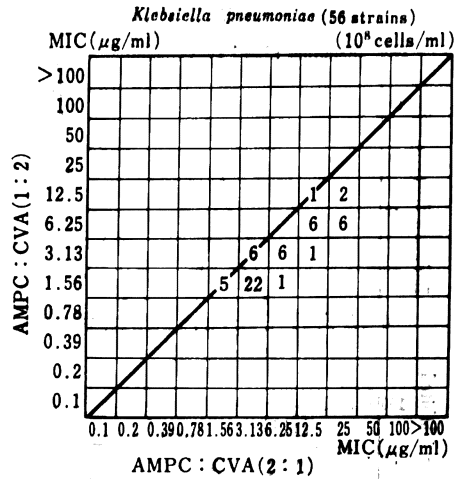
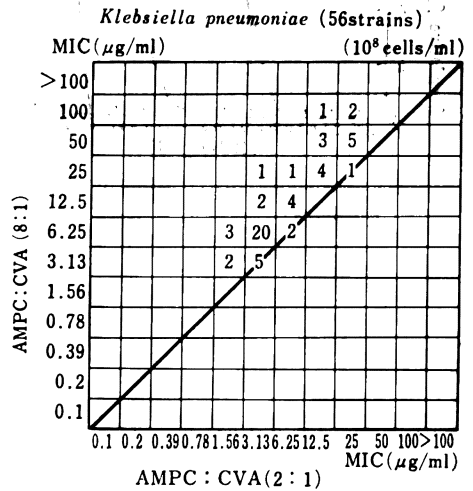


Fig. 25 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (8 : 1)



は CEX に比べても明らかに優れた抗菌力を有していた。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では、MIC の 2 峰性の分布の高い方のピークが CVA の併用比が小さくなるほど値の高い方へずれる傾向が認められたが、いずれの組合せでも AMPC の高度耐性株に有効であった。10⁸ cells/ml でも 10⁶ cells/ml とほぼ同様の結果であった。

感受性相関では AMPC : CVA (2 : 1) は AMPC 耐性菌に抗菌力を示し、感受性菌に対する MIC は AMPC 単独と同等であった。AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) または (8 : 1) の相関については (8 : 1) > (2 : 1) > (1 : 2) の順に MIC が小さくなり 30 株の平均では (2 : 1) は (8 : 1) の 2.27 倍小さく (1 : 2) の 1.7 倍

大きかった。したがって AMPC と CVA の合計濃度では (2 : 1) は (8 : 1) の 1.7 倍小さく、(1 : 2) の 1.18 倍小さいことがわかった。

以上の成績を総合すると AMPC : CVA の (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) を併用することにより臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* の AMPC 耐性菌に有効で、感受性菌に対しては AMPC 単独と同等の MIC を示した。またその抗菌力は CEX との比較でも優れていた。AMPC : CVA (2 : 1) と (1 : 2) または (8 : 1) との比較では用いた全部の株の MIC (併用中の AMPC 濃度) の平均をとると (2 : 1) は (8 : 1) の 1.93 倍小さく、(1 : 2) の 1.84 倍大きかった。したがって AMPC と CVA の合計濃度でみ

Fig. 26 Sensitivity distribution of clinical isolates

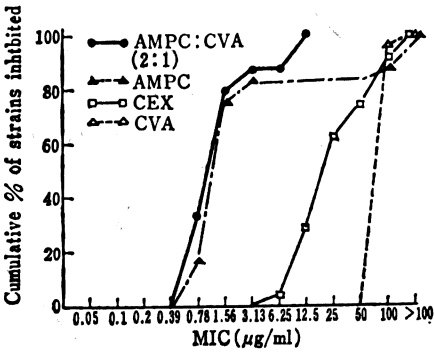
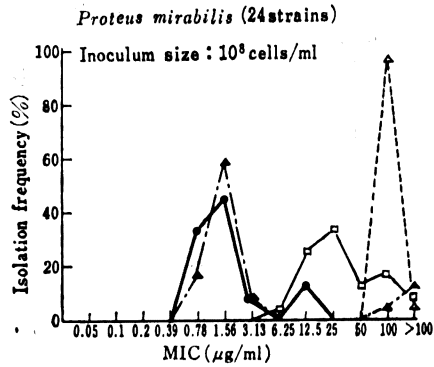


Fig. 27 Sensitivity distribution of clinical isolates

Proteus mirabilis (24 strains)

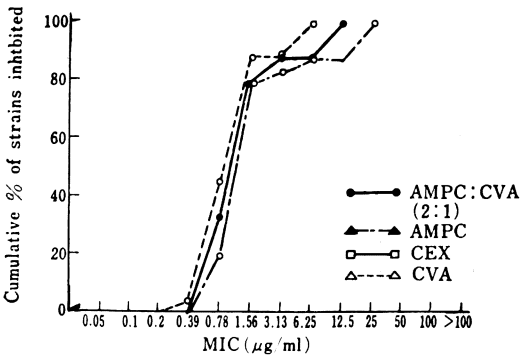
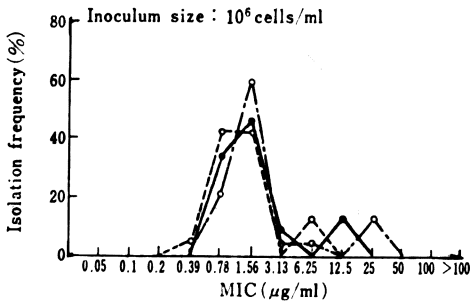


Fig. 28 Sensitivity distribution of clinical isolates

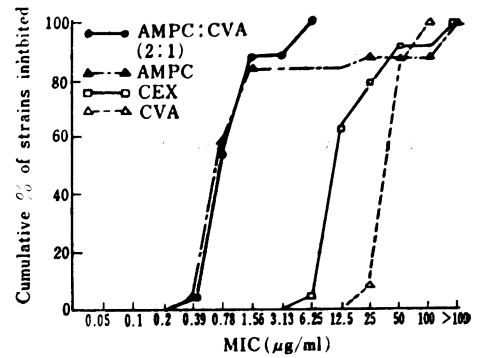
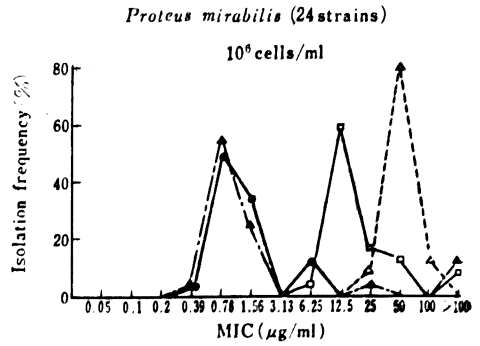


Fig. 29 Sensitivity distribution of clinical isolates

Proteus mirabilis (24 strains)

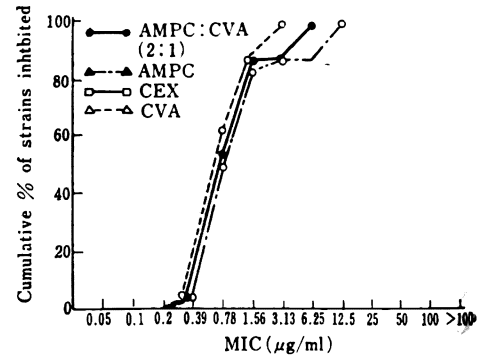
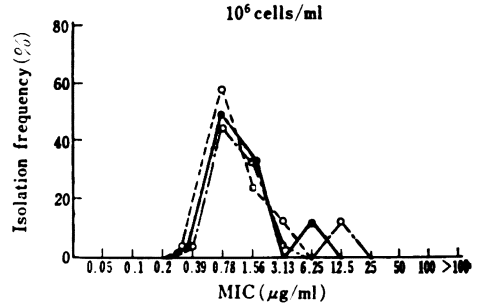


Fig. 30 Cross sensitivity of AMPC and AMPC : CVA (2 : 1)

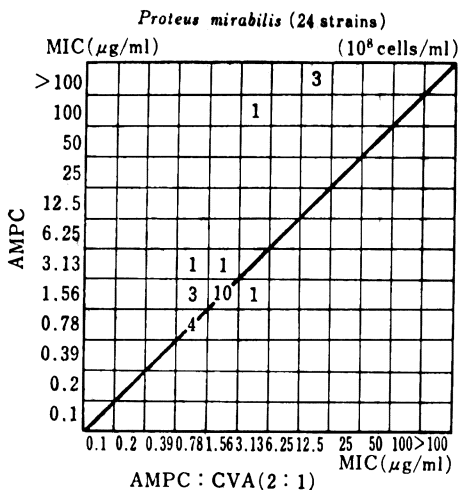
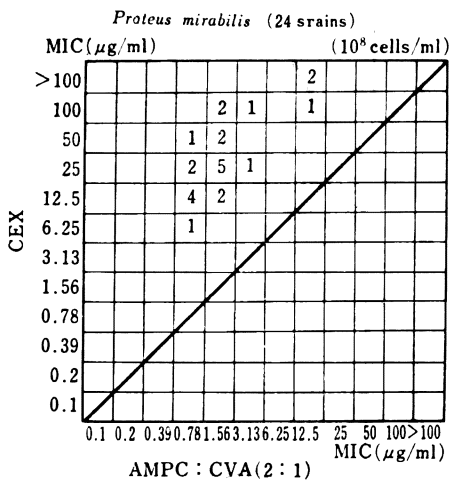


Fig. 31 Cross sensitivity of CEX and AMPC : CVA (2 : 1)



た場合には (2 : 1) は (8 : 1) の 1.45 倍 (約 1.5 倍) 小さく、(1 : 2) の 1.09 倍小さくほぼ同等であった。

Fig. 32 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (1 : 2)

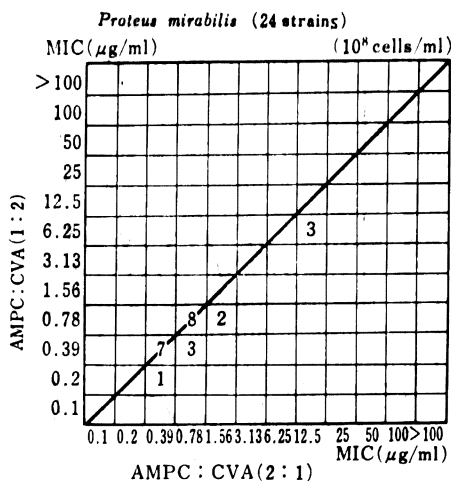
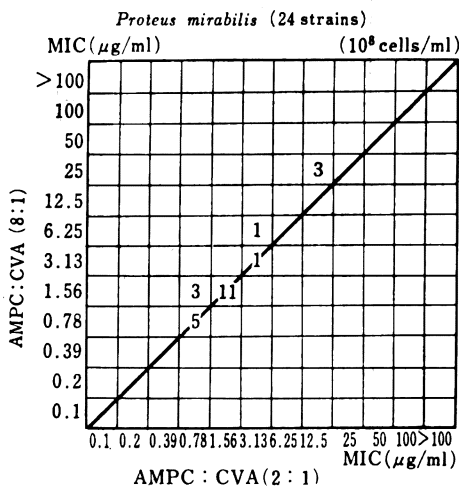


Fig. 33 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (8 : 1)



3. Checkerboard dilution method でみた併用効果
CVA と AMPC の併用効果を checkerboard dilution method により検討した結果を Fig. 42~52 に示した。接種菌量は 10^8 および 10^6 cells/ml の両方について行なったが、一般的に両菌量で同様の傾向が認められ、また AMPC 耐性 *S. aureus* では 10^6 cells/ml で AMPC の MIC が感受性化するということがあるため、 10^8 cells/ml での検討が適当と思われたので 10^8 cells/ml の結果のみ示した。

標準株のうち *S. aureus* 209-PJC および *E. coli* NIHJC-2 などの AMPC 感受性菌については、AMPC

と CVA 間に相加作用のみで著明な併用効果は認められなかったが、AMPC 耐性の *K. pneumoniae* NCTC 9632 では広い濃度範囲で著しい協力作用が認められた。

臨床分離の AMPC 耐性 *S. aureus* S-14, S-18 についての結果では AMPC と CVA 間に著しい協力作用が認められた。臨床分離の AMPC 耐性 *E. coli* No. 33, No. 113 についての結果では、No. 33 の場合広い濃度範囲で著しい協力作用が認められたのに対し、No. 113 の場合併用効果の範囲が小さかった。この両株はともに AMPC 高度耐性株ではあるが、CEX に対する感受性の面で異なり、No. 113 では CEX の MIC が 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml とともに $100 \mu\text{g/ml}$ 以上となり、耐性を示した。臨床分離の AMPC 耐性 *K. pneumoniae*

Fig. 34 Sensitivity distribution of clinical isolates

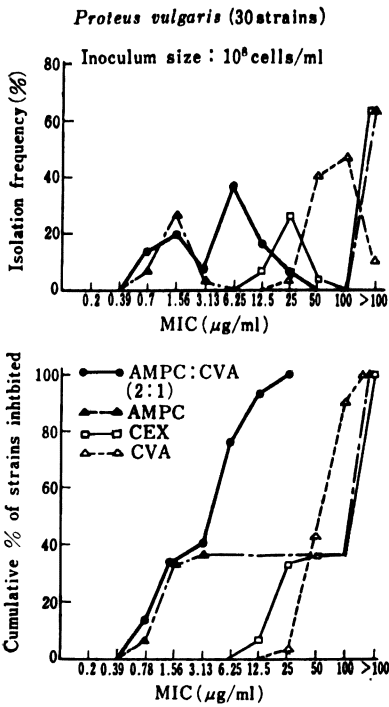


Fig. 35 Sensitivity distribution of clinical isolates

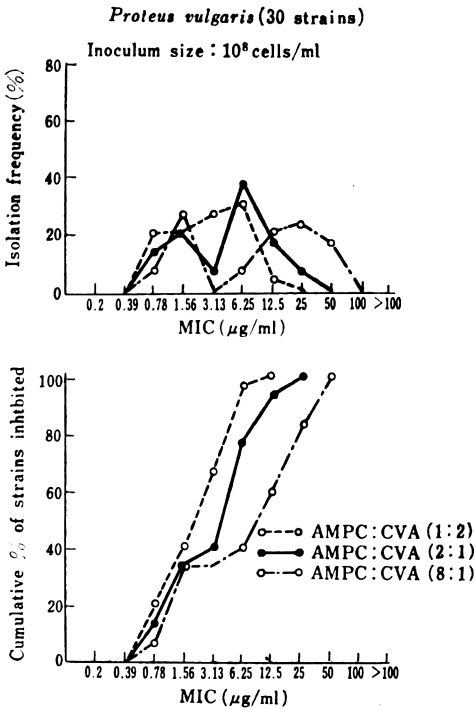


Fig. 36 Sensitivity distribution of clinical isolates

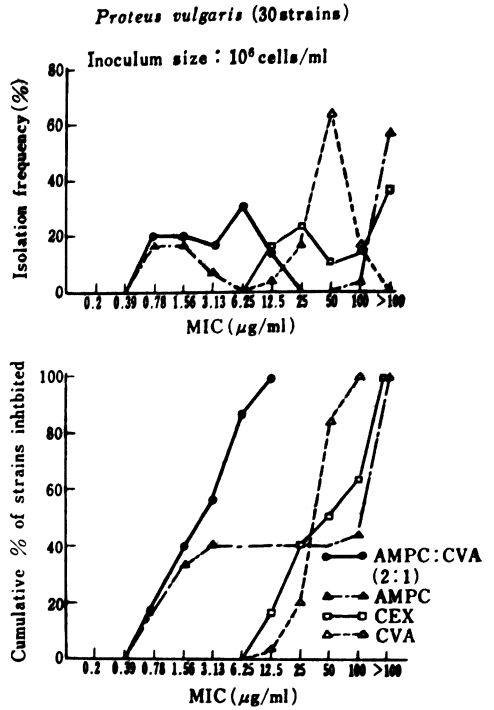


Fig. 37 Sensitivity distribution of clinical isolates

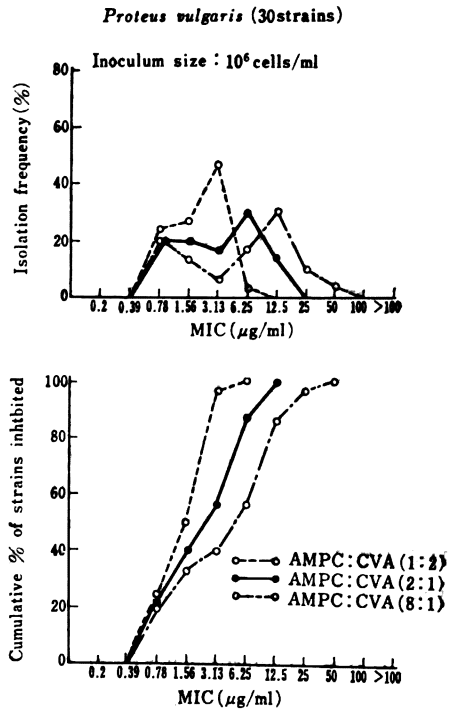


Fig. 38 Cross sensitivity of AMPC and AMPC : CVA (2 : 1)

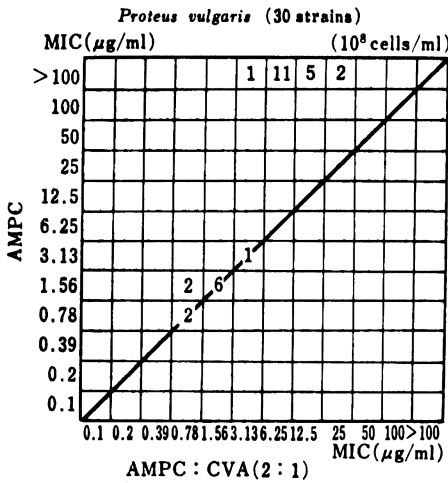


Fig. 39 Cross sensitivity of CEX and AMPC : CVA (2 : 1)

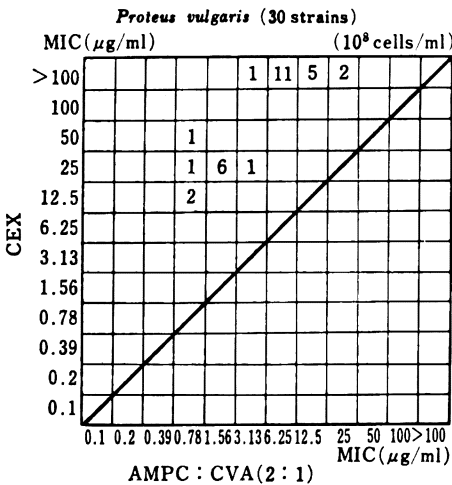


Fig. 40 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (1 : 2)

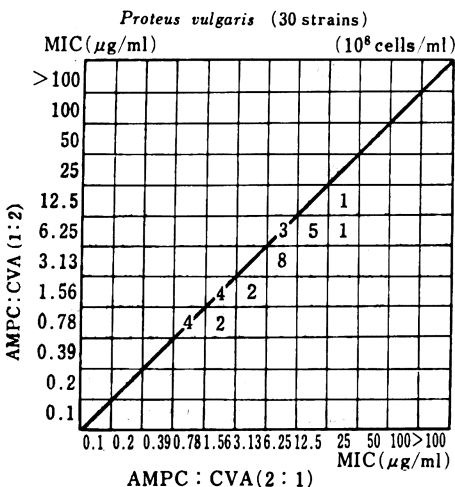


Fig. 41 Cross sensitivity of AMPC : CVA (2 : 1) and (8 : 1)

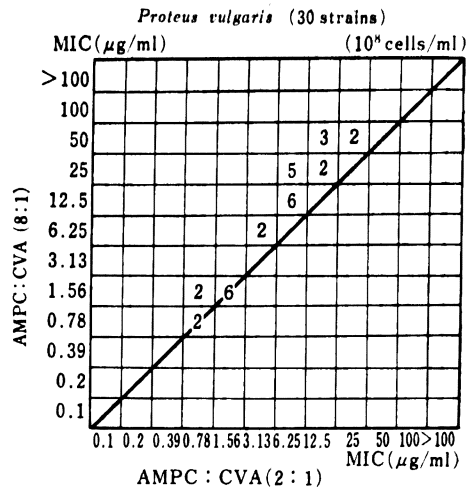


Fig. 42 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on Staphylococcus aureus 209-PJC

Clavulanic acid (μg/ml)	AMPC (μg/ml)											CVA alone				
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2		0.1	0.05	0.025	
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMPC alone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No. 129, No. 182 については、No. 182 で広い濃度範囲で著明な協合作用が認められ、No. 129 でも No. 182 ほどではないがやはり協合作用が認められた。AMPC 耐性 *P. vulgaris* No. 109, No. 202 に対してはともに広い範囲で著明な協合作用が認められた。

以上、CVA と AMPC の併用効果を checkerboard dilution method で検討した結果、AMPC 耐性の臨床分離 *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* において広い濃度範囲で著しい協合作用が認められ、この結果は CVA と AMPC の種々の比率での併用の有効性を裏づけるものと思われた。ただし詳しくみれば協合作用の発現の度合に菌株により強弱があることがわかり、協合作用の比較的現われにくい株については CVA

Fig. 43 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Staphylococcus aureus* S-14

		AMPC (μg/ml)												CVA		
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
AMPC alone	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 44 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Staphylococcus aureus* S-18

		AMPC (μg/ml)												CVA		
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
AMPC alone	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 45 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Escherichia coli* NIHJC-2

		AMPC (μg/ml)												CVA		
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0.025	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
AMPC alone	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 46 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Escherichia coli* No. 33

		AMPC (μg/ml)												CVA		
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
AMPC alone	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

と AMPC の併用の有効性が併用時の比率により左右される可能性も考えられる。

4. CVA の併用濃度の検討

臨床分離の AMPC 耐性菌 (10^8 および 10^9 cells/ml での MIC が 25 μg/ml 以上のもの) について、AMPC の一定濃度に CVA を併用してその増殖を阻止するに要する濃度について検討した結果を Table 5~8 に示した。

S. aureus では 10^8 cells/ml の接種菌量では AMPC 耐性が感受性化するため 10^8 cells/ml のみで検討したが、AMPC 6.25 μg/ml に対し CVA 3.13 μg/ml の併用ですべての株が、また 0.78 μg/ml の併用で約 90% の増殖が阻止された。この 90% 阻止の CVA 濃度は

AMPC 濃度を 2 倍上げて 12.5 μg/ml とすると 0.39 μg/ml となり、AMPC 濃度を 2 倍下げて 3.13 μg/ml とすると、1.56 μg/ml となるが、いずれにしても比較的低濃度の CVA の併用でよいことがわかった。

E. coli では 10^8 cells/ml の場合、AMPC 6.25 μg/ml に対しすべての株で CVA 3.13 μg/ml 以上の併用が必要であり、CVA 12.5 μg/ml で約 85% の株が阻止された。AMPC 12.5 μg/ml でも 85% 阻止の CVA 濃度は 12.5 μg/ml とかわらず、AMPC 3.13 μg/ml では CVA 12.5 μg/ml で阻止されるものは約 40% にすぎなかった。いずれにしても *S. aureus* とは対照的に *E. coli* では比較的高濃度の CVA を併用することが

Fig. 47 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Escherichia coli* 113

		AMPC (μg/ml)											CVA alone			
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3.13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.56	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.39	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.0125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMPC alone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 49 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Klebsiella pneumoniae* 129

		AMPC (μg/ml)											CVA alone			
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.0125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMPC alone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 48 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9632

		AMPC (μg/ml)											CVA alone			
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
AMPC alone	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fig. 50 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Klebsiella pneumoniae* 182

		AMPC (μg/ml)											CVA alone			
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	alone
Clavulanic acid (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
AMPC alone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

必要であり、10⁶ cells/ml でも同様の傾向を示した。

K. pneumoniae では併用すべき CVA 濃度は明らかに 2 相性の分布を示し、10⁸ cells/ml の場合 AMPC 6.25 μg/ml に対し CVA 3.13 μg/ml の比較的低濃度の併用で阻止される株 (約 70%) と、CVA 6.25 μg/ml 以上の比較的高濃度の併用が必要である株 (約 30%) の 2 種類に分かれていた。AMPC 濃度を 12.5 μg/ml または 3.13 μg/ml としても同様な現象がみられた。10⁶ cells/ml では分布が全体的に CVA 濃度の低い方へ移動し、やや菌量の影響をうけることがわかった。

P. vulgaris では 10⁸ cells/ml で AMPC 6.25 μg/ml および 12.5 μg/ml に対しやはり CVA 3.13 また

は 1.56 μg/ml 以下の併用で阻止されるものと、6.25 または 3.13 μg/ml 以上の併用が必要であるものとの 2 相性の分布がみられたが、AMPC 3.13 μg/ml に対しては CVA 3.13 μg/ml 以上の併用が必要となり、CVA 12.5 μg/ml 以上が必要である株が急にふえる傾向が認められた。10⁸ cells/ml では分布がかなりばらつく傾向があり、やはり菌量の影響を受けることがわかった。

以上の結果を総合してみると、併用すべき CVA 濃度は AMPC 濃度によっても多少異なるが菌種によって明らかに異なり、大まかにみて 3.13 μg/ml を境にしてそれ以下の比較的低い濃度でよい *S. aureus* に対し、*E. coli* では 3.13 μg/ml 以上の比較的高い濃度が必要で

Fig. 51 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Proteus vulgaris* 109

		AMPC($\mu\text{g/ml}$)											CVA alone				
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78		0.39	0.2	0.1	
Clavulanic acid ($\mu\text{g/ml}$)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPC alone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fig. 52 Combination effect of AMPC and clavulanic acid on *Proteus vulgaris* 202

		AMPC($\mu\text{g/ml}$)											CVA alone				
		800	400	200	100	50	20	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78		0.39	0.2	0.1	
Clavulanic acid ($\mu\text{g/ml}$)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0.0125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPC alone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

あった。

K. pneumoniae ではこの *S. aureus* と *E. coli* の 2 つのタイプが存在して 2 相性の分布を示し、*P. vulgaris* でも 10^8 cells/ml でやはりこの 2 相性の分布がみられるが、AMPC 3.13 $\mu\text{g/ml}$ では CVA の比較的高い濃度を必要とする株がほとんどとなるとともに 10^8 cells/ml での分布がばらつくという特殊な現象が見られた。

5. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

a. 培地 pH の影響

Fig. 53 に示すように、培地 pH の抗菌力に及ぼす影響は CVA の MIC が *S. aureus* 209-PJC と S-14 で酸性側で強く、アルカリ側で弱くなる傾向が認められた

Table 5 Distribution of β -lactamase inhibitory activity of clavulanic acid combined with AMPC AMPC-resistant *Staphylococcus aureus* (17 strains)

Inoculum size (cells/ml)	AMPC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC of clavulanic acid combined with AMPC ($\mu\text{g/ml}$)												
		0.006	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	>12.5
10^8	12.5			●				●●●●●●●●	●●					
	6.25				●			●●●●●●●●●●●●●●	●					
	3.13							●●●●●●●●●●●●●●	●●●●●●●●●●●●●●					

Table 8 Distribution of β lactamase inhibitory activity of clavulanic acid combined with AMPC
AMPC-resistant *Proteus vulgaris* (18 strains)

Inoculum size (cells/ml)	AMPC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC of clavulanic acid combined with AMPC ($\mu\text{g/ml}$)												
		0.006	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	>12.5
10^8	12.5							•	•••••	•	•••••	•••••	•••••	•
	6.25								•••••	••	••	•••••	•••••	•
	3.13										•	•••••	•••••	•••••
10^6	12.5			•		••		••	•••••	•••••	•			
	6.25			•		•		•••••	•••••	•••••	••	•		
	3.13					••		•••••	•	•••••	•••••	•••••	•	

Table 9 Effect of horse serum on antibacterial activity of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) and CEX

Organism	Serum (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		AMPC	CVA	AMPC : CVA (1 : 2)	AMPC : CVA (2 : 1)	AMPC : CVA (8 : 1)	CEX
<i>S. aureus</i> No. 80	0	100	25	0.78	1.56	1.56	12.5
	10	100	25	1.56	3.13	3.13	25
	25	100	25	1.56	1.56	3.13	12.5
	50	50	50	0.78	1.56	1.56	25
<i>E. coli</i> No. 33	0	>100	50	6.25	12.5	25	25
	10	>100	100	12.5	25	50	12.5
	25	>100	100	12.5	25	50	25
	50	>100	100	6.25	12.5	25	12.5

Method : Serial dilution method with heart infusion broth.
Inoculum size : A loopful of bacteria' suspension of $10^6/\text{ml}$.

Fig. 53 Effect of medium pH on antibacterial activity of AMPC, CVA, AMPC : CVA (2 : 1) and CEX

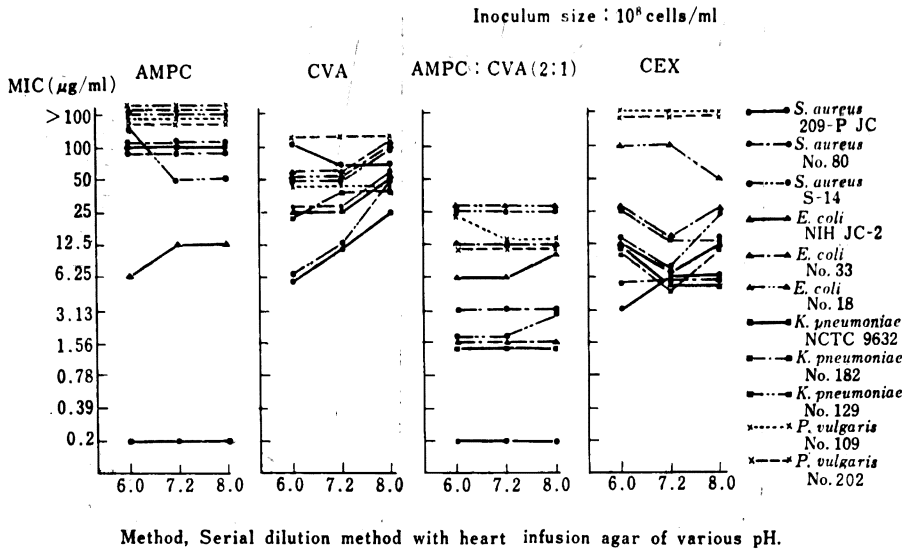
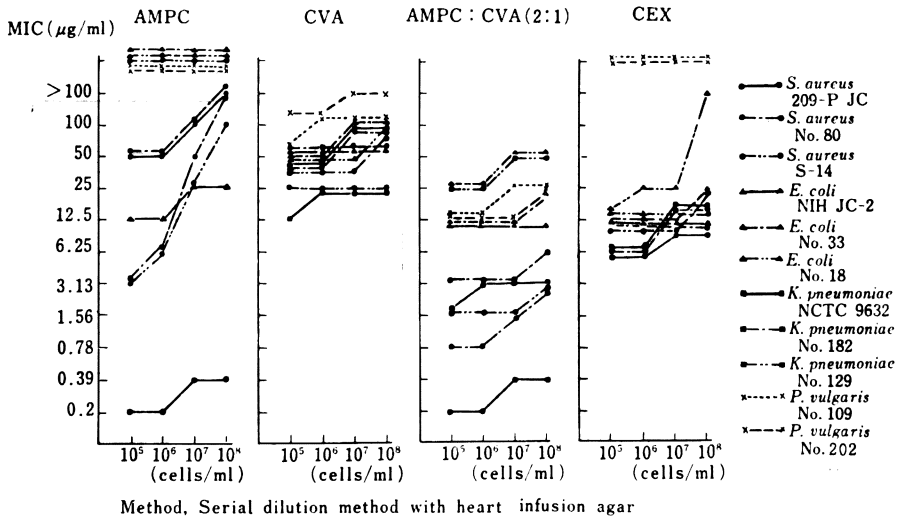


Fig. 54 Effect of inoculum size on antibacterial activity of AMPC, CVA, AMPC : CVA (2 : 1) and CEX



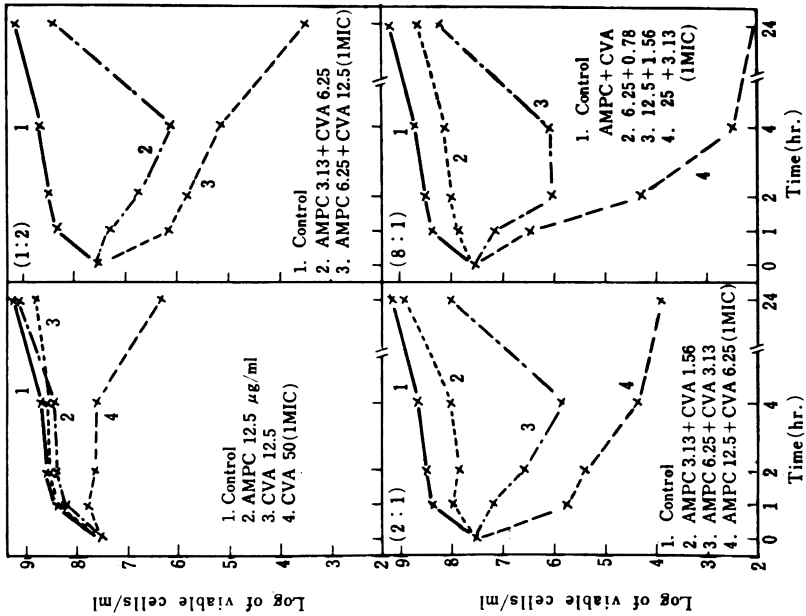
が、AMPC : CVA (2 : 1) の併用時にはこのような傾向は認められなかった。ここでは示さなかったが接種菌量 10^6 cells/ml について、また AMPC : CVA (1 : 2), (8 : 1) についても検討したが 10^8 cells/ml の (2 : 1) の場合と変わった傾向は認められなかった。

b. 接種菌量の影響

Fig. 54 に示すように、接種菌量の抗菌力に及ぼす影響は AMPC の MIC が 10^7 cells/ml から 10^8 cells/ml

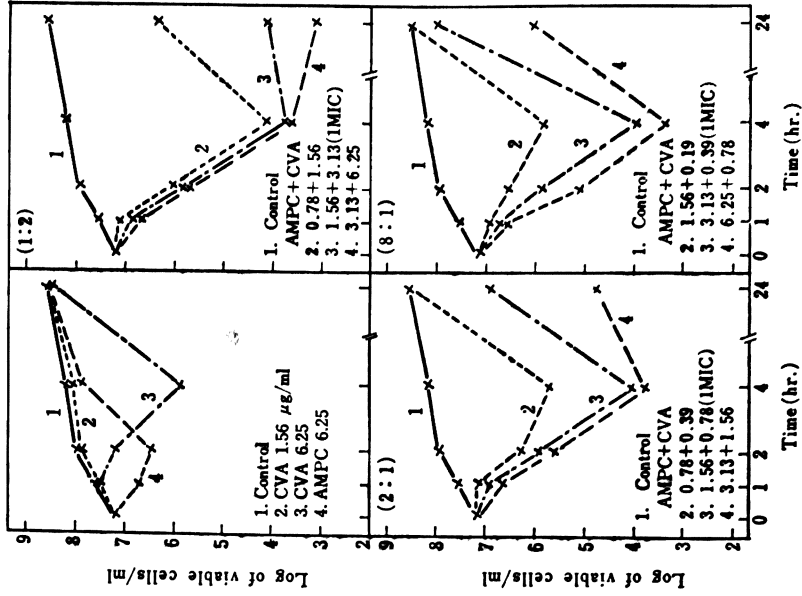
で AMPC 耐性の *S. aureus* No. 80, S-14 で大きく影響を受け、また *K. pneumoniae* NCTC 9632 と No. 182 でもやや影響を受けることが認められた。これに対し CVA および AMPC : CVA (2 : 1) ではこれらの株についても、またその他の株でもそのような傾向は認められなかった。AMPC : CVA (2 : 1) の他に (1 : 2), (8 : 1) についても検討したが、(2 : 1) の場合と変わった傾向は認められなかった。

Fig. 56 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on viability of *E. coli* No. 33



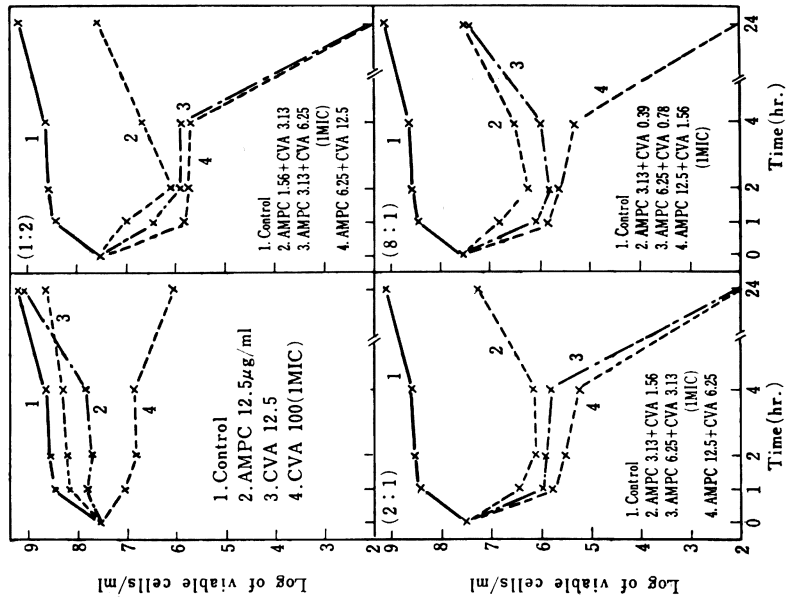
MIC : Agar dilution method, a loopful of 10⁸ cells/ml

Fig. 55 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on viability of *S. aureus* S-14



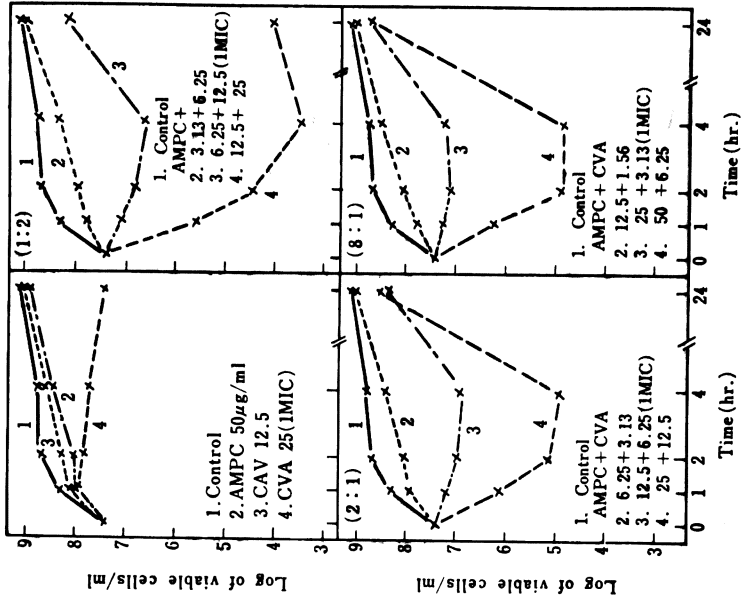
MIC : Agar dilution method, a loopful of 10⁸ cells/ml

Fig. 58 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on viability of *K. pneumoniae* 182



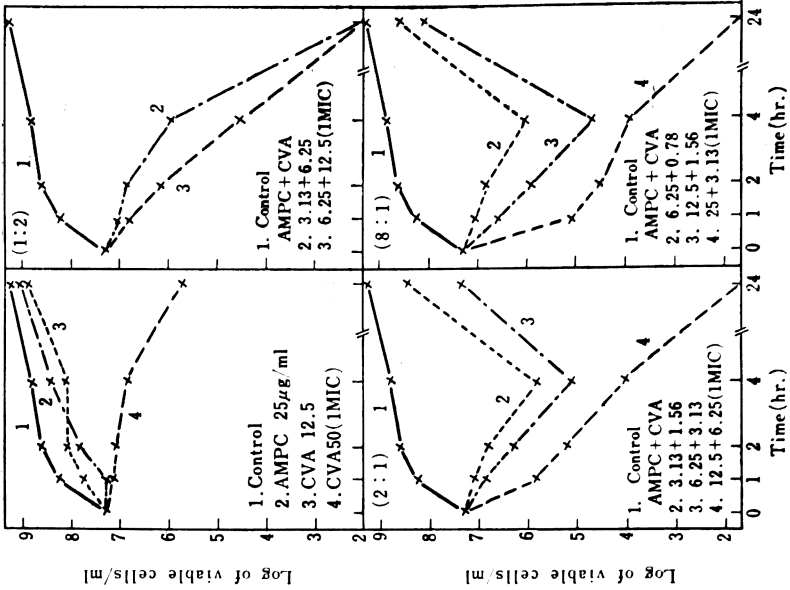
MIC : Agar dilution method, a loopful of 10⁸ cells/ml

Fig. 57 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on viability of *K. pneumoniae* 129



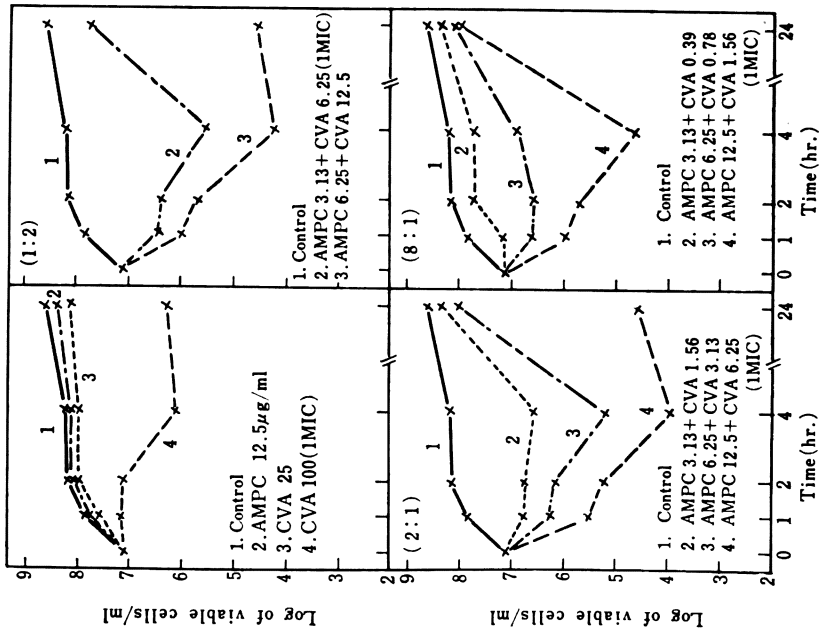
MIC : Agar dilution method, a loopful of 10⁸ cells/ml

Fig. 59 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1:2), (2:1) and (8:1) on viability of *P. vulgaris* 109



MIC : Agar dilution method, a loopful of 10^6 cells/ml

Fig. 60 Effect of AMPC, CVA, AMPC : CVA (1:2), (2:1) and (8:1) on viability of *P. vulgaris* 202



MIC : Agar dilution method, a loopful of 10^6 cells/ml

c. 血清の影響

Table 9 に示すように、どの薬剤についても馬血清添加の影響は認められなかった。

以上 AMPC, CVA 各単独では培地 pH および接種菌量の影響を受けることもあったが、AMPC と CVA の併用時には影響は認められず、また血清添加の影響も受けなかった。

6. AMPC 耐性臨床分離株に対する AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の殺菌作用

a. *S. aureus* S-14 について

Fig. 55 に示すような結果を得た。以下図および文中の MIC とは寒天平板希釈法による 10^8 cells/ml の場合の値を示す。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) では MIC 濃度作用 2~4 時間目において著明な殺菌作用を示すことが認められた。一方、併用濃度付近の AMPC および CVA 単独作用時には AMPC 6.25 μ g/ml, CVA 6.25 μ g/ml で弱い殺菌作用がみられたが、それぞれ 4 時間後、24 時間後に再増殖が認められた。しかし、それぞれの濃度の併用時にはそのような時間における再増殖は認められなかった。なお S-14 株に対する CVA 単独の MIC は 25 μ g/ml であった。

b. *E. coli* No. 33 について

Fig. 56 に示すように、AMPC : CVA の (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の併用により MIC 濃度で短時間内に著明な殺菌作用が認められ、24 時間後の再増殖もみられなかった。一方、併用濃度付近の AMPC および CVA 単独作用時には殺菌作用は全く認められなかった。CVA は MIC 濃度 (50 μ g/ml) で静菌的作用を示すが、併用時の MIC における CVA 濃度は CVA の MIC の $1/4 \sim 1/16$ であった。

c. *K. pneumoniae* No. 129 について

Fig. 57 に示すように、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) はそれぞれの MIC 濃度で静菌的作用を示し、2 MIC 濃度では短時間内に著明な殺菌作用を示すことが認められた。ただし 24 時間後には再増殖がみられた。一方、併用濃度付近での AMPC および CVA 単独作用時には殺菌作用は全く認められなかった。CVA は MIC 濃度 (25 μ g/ml) で静菌作用を示すが、併用時の MIC における CVA の濃度は CVA の MIC の $1/2 \sim 1/8$ であった。

d. *K. pneumoniae* No. 182 について

Fig. 58 に示すように、AMPC : CVA の (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の併用で短時間内に著明な殺菌作用を示すことが認められた。一方、併用濃度付近の AMPC および CVA 単独作用時には、殺菌作用は全く認められなかった。CVA は MIC 濃度 (100 μ g/ml) で静菌的作用を

示すが、併用時の MIC における CVA の濃度は CVA の MIC の $1/16 \sim 1/64$ であった。

e. *P. vulgaris* No. 109 について

Fig. 59 に示すように、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) は MIC 濃度で短時間内に著明な殺菌作用を示した。一方、併用濃度付近の AMPC および CVA 単独作用時には殺菌作用は全く認められなかった。CVA は MIC 濃度 (50 μ g/ml) ではほぼ静菌的作用を示すが、併用時の MIC における CVA の濃度は CVA の MIC の $1/4 \sim 1/8$ であった。

f. *P. vulgaris* No. 202 について

Fig. 60 に示すように、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の併用により著明な殺菌作用が認められた。CVA は MIC 濃度 (100 μ g/ml) ではほぼ静菌的作用を示すが、併用時の MIC における CVA の濃度は CVA の MIC の $1/8 \sim 1/64$ であった。

以上 AMPC 耐性の各種臨床分離株に対し AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) は MIC 濃度で短時間内に著明な殺菌作用を示した。ただし *K. pneumoniae* No. 129 では MIC 濃度では静菌的作用が認められ、2 MIC で殺菌作用が認められたが、24 時間後に再増殖がみられた。したがって同じ *K. pneumoniae* No. 182 に比べて殺菌作用の面での併用効果はより弱いということがいえるが、このことは checkerboard dilution method での併用効果の検討の際、やはり No. 129 が No. 182 より併用効果が現われにくい傾向が認められたことと対応した結果といえる。またグラム陽性菌の *S. aureus* S-14 の場合を除いて CVA は MIC 濃度で静菌的作用を示すが、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の併用の MIC における CVA の濃度は CVA の MIC の $1/4$ (ただし *K. pneumoniae* No. 129 は $1/2$) 以下であり、この濃度における CVA の増殖曲線に及ぼす影響はほとんど認められなかった。

7. マウス実験的感染症に対する治療効果

AMPC 耐性の各種臨床分離株を用いてのマウス実験的感染症に対する AMPC, CVA, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) および CEX の治療効果について検討した結果を Table 10~14 に示した。

a. *S. aureus* S-14 感染症

Table 10 に示すように、AMPC 単独では 16 mg/mouse 以上、CVA 単独では 6.56 mg/mouse という高い ED₅₀ 値であるのに対し、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ではそれぞれの ED₅₀ (AMPC+CVA) が 1.08(0.36+0.72)mg/mouse, 1.23(0.82+0.41)mg/mouse, 1.80(1.60+0.20)mg/mouse と小さな ED₅₀ 値を示し、AMPC と CVA の併用により優れた治療効果

Table 10 Protecting effect of AMPC : CVA (1 : 2) , (2 : 1) and (8 : 1) on experimental mice infection with *S. aureus* S-14

Drugs	* ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
		(10 ⁸ cells/ml)	(10 ⁶ cells/ml)
AMPC	>16	100	1.56
CVA	6.56 (3.65~11.8)	25	25
AMPC : CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA
(1 : 2)	0.36 + 0.72 (0.24~0.54) (0.48~1.08)	1.56 + 3.13	0.39 + 0.78
(2 : 1)	0.82 + 0.41 (0.59~1.13) (0.30~0.57)	1.56 + 0.78	0.78 + 0.39
(8 : 1)	1.60 + 0.2 (1.13~2.27) (0.14~0.28)	3.13 + 0.39	0.78 + 0.1
CEX	1.23 (0.89~1.71)	12.5	3.13

* LITCHFIELD WILCOXON method
 Inoculum size : 2.2×10^7 cells/mouse with 3% mucin.
 Challenge LD₅₀ : 10.6 LD₅₀
 () : 95% confidence limit

Table 11 Protecting effect of AMPC : CVA (1 : 2) , (2 : 1) and (8 : 1) on experimental mice infection with *E. coli* No. 33

Drugs	* ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
		(10 ⁸ cells/ml)	(10 ⁶ cells/ml)
AMPC	>16	>800	800
CVA	>8	50	50
AMPC : CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA
(1 : 2)	1.14 + 2.28 (0.95~1.35) (1.9~2.7)	6.25 + 12.5	6.25 + 12.5
(2 : 1)	1.74 + 0.87 (1.49~2.04) (0.75~1.0)	12.5 + 6.25	12.5 + 6.25
(8 : 1)	5.20 + 0.65 (3.74~7.23) (0.47~0.9)	25 + 3.13	25 + 3.13
CEX	0.69 (0.49~0.96)	25	6.25

* LITCHFIELD WILCOXON method
 Inoculum size : 1.2×10^5 cells/mouse with 3% mucin.
 Challenge LD₅₀ : 4.5×10^3 LD₅₀
 () : 95% confidence limit

Table 12 Protecting effect of AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on experimental mice infection with *K. pneumoniae* 182

Drugs	*ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
		(10 ⁸ cells/ml)	(10 ⁶ cells/ml)
AMPC	>16	>800	100
CVA	> 8	100	50
AMPC : CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA
(1 : 2)	1.28 + 2.56 (0.68-2.47) (1.36-5.12)	3.13 + 6.25	1.56 + 3.13
(2 : 1)	3.28 + 1.64 (1.87-5.74) (0.94-2.87)	6.25 + 3.13	3.13 + 1.56
(8 : 1)	4.24 + 0.53 (2.57-7.0) (0.32-0.88)	12.5 + 1.56	3.13 + 0.39
CEX	12.3 (5.6-27.1)	25	6.25

* LITCHFIELD WILCOXON method

Inoculum size : 1.73×10^3 cells/mouse with 3% mucin.

Challenge LD₅₀ : 3.3×10^3 LD₅₀

() : 95% confidence limit

Table 13 Protecting effect of AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on experimental mice infection with *K. pneumoniae* 129

Drugs	*ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
		(10 ⁸ cells/ml)	(10 ⁶ cells/ml)
AMPC	>16	>800	>800
CVA	> 8	25	12.5
AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA
(1 : 2)	6.08 + 12.16 (4.68-7.90) (9.36-15.8)	6.25 + 12.5	6.25 + 12.5
(2 : 1)	12.16 + 6.08 (6.24-23.7) (3.12-11.9)	12.5 + 6.25	12.5 + 6.25
(8 : 1)	38.4 + 4.80 (21.3-69.1) (2.66-8.64)	25 + 3.13	25 + 3.13
CEX	>16	6.25	3.13

* LITCHFIELD WILCOXON method.

Inoculum size : 7.0×10^7 cells/mouse with 3% mucin.

Challenge LD₅₀ : 5.6 LD₅₀

() : 95% confidence limit

Table 14 Protecting effect of AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1) and (8 : 1) on experimental mice infection with *P. vulgaris* 202

Drugs	* DE ₅₀ (mg mouse)		MIC (μg/ml)
	Experiment 1	Experiment 2	
AMPC	>16	>16	>800
CVA	>8	>8	100
AMPC : CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA	AMPC + CVA
(1 : 2)	5.60 + 11.2 (2.33~13.4) (4.66~26.9)	7.36 + 14.72 (2.63~20.6) (5.26~41.2)	3.13 + 6.25
(2 : 1)	2.32 + 1.16 (1.45~3.71) (0.73~1.86)	3.92 + 1.96 (2.48~6.19) (1.24~3.10)	6.25 + 3.13
(8 : 1)	2.40 + 0.30 (1.41~4.08) (0.18~0.51)	4.48 + 0.56 (2.99~6.72) (0.39~0.84)	12.5 + 1.56
CEX	>16	>16	>100

* LITCHFIELD WILCOXON method

Experiment 1 Inoculum size : 1.16×10^7 cells/mouse with 3% mucin.

Challenge LD₅₀ : 1.67 × 101.D₅₀

() : 95% confidence limit

Experiment 2 Inoculum size : 2.28×10^7 cells/mouse with 3% mucin.

Challenge LD₅₀ : 1.19 × 101.D₅₀

() : 95% confidence limit

が認められた。

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) 三者の比較では併用の ED₅₀ 中の AMPC 量でみれば (1 : 2) < (2 : 1) < (8 : 1) で約 2 倍ずつ多くなり, AMPC と CVA の合計の ED₅₀ 値でみれば (1 : 2) と (2 : 1) がほぼ同等で (8 : 1) がやや劣る傾向がみられた。また CEX の ED₅₀ は 1.23 mg/mouse であり, AMPC : CVA (2 : 1) と同等であった。

b. *E. coli* No. 33 感染症

Table 11 に示すように, AMPC 単独では 16 mg/mouse 以上, CVA では 8 mg/mouse 以上と高い ED₅₀ であるのに対し, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ではそれぞれの ED₅₀ (AMPC+CVA) が 3.42(1.14+2.28)mg/mouse, 2.61(1.74+0.87)mg/mouse, 5.85(5.20+0.65)mg/mouse という ED₅₀ 値で, AMPC と CVA の併用により優れた治療効果が認められた。

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では併用中の AMPC 量でみれば (1 : 2) < (2 : 1) < (8 : 1) の順で多くなるが, AMPC と CVA の合計の ED₅₀ 値でみれば (2 : 1) が最も小さく, 次いで (1 : 2), (8 : 1) の順であった。また CEX の ED₅₀ は 0.69 mg/mouse と比較的小さいものであった。

c. *K. pneumoniae* No. 182 感染症

Table 12 に示すように, AMPC 単独では 16 mg/mouse 以上, CVA で 8 mg/mouse 以上の高い ED₅₀ を示して治療効果が認められなかったが, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ではそれぞれの ED₅₀ (AMPC+CVA) が 3.84(1.28+2.56)mg/mouse, 4.92(3.28+1.64)mg/mouse, 4.77(4.24+0.53)mg/mouse という ED₅₀ 値で AMPC と CVA の併用により優れた治療効果が認められた。

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では併用中の AMPC 量でみれば (1 : 2) < (2 : 1) < (8 : 1) の順で多くなるが, AMPC と CVA の合計の ED₅₀ でみれば (2 : 1) と (8 : 1) がほぼ同等であり, (1 : 2) がやや小さいという結果であった。また CEX の ED₅₀ は 12.3 mg/mouse と比較的大きなものであった。

d. *K. pneumoniae* No. 129 感染症

Table 13 に示すように, AMPC 単独では 16 mg/mouse 以上, CVA では 8 mg/mouse 以上の ED₅₀ で治療効果がみられないのに対し, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ではそれぞれの ED₅₀ (AMPC+CVA) が 18.24(6.08+12.16)mg/mouse, 18.24(12.16+6.08)mg/mouse, 43.2(38.4+4.80)mg/mouse という ED₅₀ を示し, AMPC と CVA の併用により (8 : 1) の場合

を除き, 比較的大きい値ではあるが一応の治療効果が認められた。

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) 三者の比較では併用中の AMPC 量でみれば (1 : 2) < (2 : 1) < (8 : 1) の順で大きくなり, AMPC と CVA の合計の ED₅₀ でみれば (1 : 2) と (2 : 1) が同等で, (8 : 1) がかなり劣るという結果であった。一方 CEX の ED₅₀ は 16 mg/mouse 以上であった。

e. *P. vulgaris* No. 202 感染症

Table 14 に示すように, AMPC 単独では 16 mg/mouse 以上, CVA では 8 mg/mouse 以上の ED₅₀ で治療効果がみられないのに対し, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) ではそれぞれの ED₅₀ (AMPC+CVA) が 16.8(5.6+11.2)mg/mouse, 3.48(2.32+1.16)mg/mouse, 2.7(2.4+0.3)mg/mouse という ED₅₀ を示し, 特に AMPC : CVA (2 : 1), (8 : 1) で優れた治療効果が認められた。

AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では併用中の AMPC 量でみれば (2 : 1) と (8 : 1) が等しく, (1 : 2) が大きく, 他の株におけるような (1 : 2) < (2 : 1) < (8 : 1) の順とは異なっていた。したがって AMPC と CVA の合計の ED₅₀ でみる (8 : 1) が最も小さく, (2 : 1) がその次であり, (1 : 2) が大きく劣るという結果であった。また CEX は ED₅₀ が 16 mg/mouse 以上で治療効果が認められなかった。

以上 AMPC 耐性の各種臨床分離株を用いたマウス実験の感染症に対し, AMPC または CVA 単独では治療効果が認められなかったが, AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) は優れた治療効果を有していた。AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の三者の比較では, 菌種菌株によりやや異なる結果が得られ, AMPC と CVA の合計の ED₅₀ でみれば *S. aureus* S-14, *E. coli* No. 33 で (1 : 2) と (2 : 1) がほぼ同等で (8 : 1) がわずかに劣り, *K. pneumoniae* No. 182 で (2 : 1) と (8 : 1) がほぼ同等で (1 : 2) がわずかに優れ, *K. pneumoniae* No. 129 で (1 : 2), (2 : 1) に比べ (8 : 1) が明らかに劣り, *P. vulgaris* No. 202 で (2 : 1), (8 : 1) に比べ (1 : 2) が明らかに劣る結果であり, これらを総合すれば (2 : 1) が最も適当であるとの結果が得られた。

8. マウス血清中の AMPC および CVA 濃度

AMPC および CVA の経口での単独投与時および AMPC : CVA (1 : 2), (1 : 1), (2 : 1), (8 : 1) の比率での同時投与時のマウス血清中濃度の測定結果を Fig. 61~63 に示した。

AMPC 4, 1, 0.25 mg/mouse 投与時には投与後 15~30 分にピークを有する dose response のある血清中濃

Fig. 61 Serum concentration of AMPC after oral administration in mice

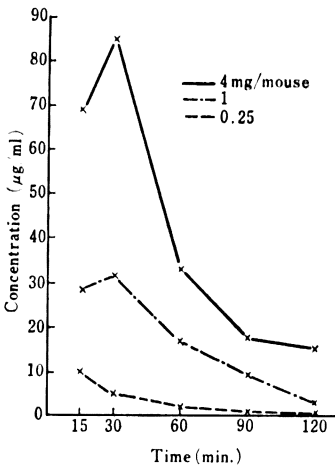


Fig. 62 Serum concentration of CVA after oral administration in mice

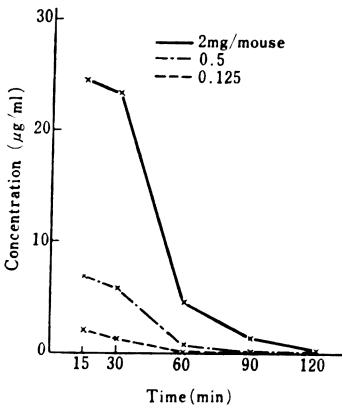
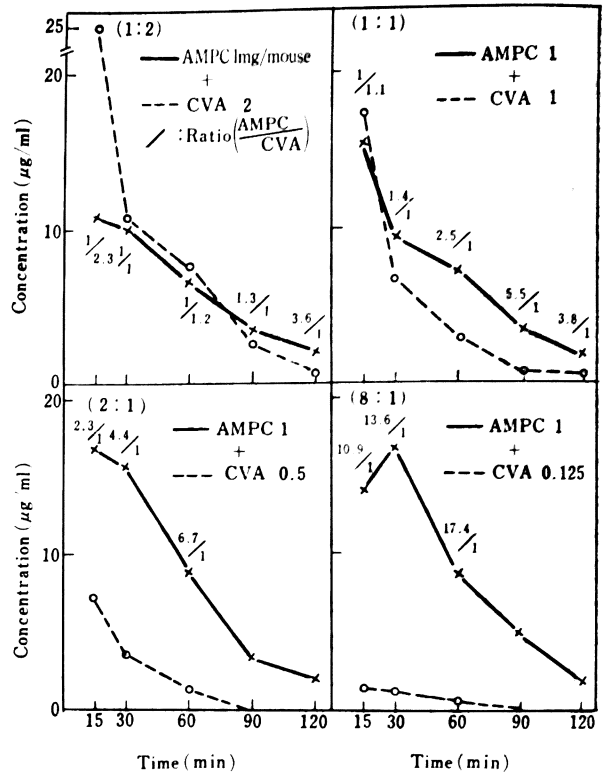


Fig. 63 Serum concentration of AMPC : CVA (1 : 2), (1 : 1), (2 : 1) and (8 : 1) after oral administration in mice



また図中に示した AMPC と CVA の濃度比 (AMPC/CVA) についてみればピーク時における両者の濃度比は投与の比率と比較的によく一致していたが、それ以後は時間の経過に伴い AMPC の比率が高くなる傾向があり、これは AMPC と CVA の両カーブの時間的推移の微妙なずれを反映するものと思われる。

9. CVA の β -lactamase 阻害作用

E. coli No. 21 の TEM 型 β -lactamase に対し、AMPC を基質とした際の CVA の阻害形式および K_i 値を求めた結果を Fig. 64~66 に示した。

まず AMPC の K_m および V_{max} を LINEWEAVER-BURK の plot により求めたところ、 $K_m=53.5 \mu M$ 、 $V_{max}=42.3 \mu moles/hr/mg$ of enzyme protein であった (Fig. 64)。次に種々の AMPC (基質) 濃度 S (25, 0, 100, 200 μM) に CVA (阻害剤) 濃度 I を 0, 0.5, 2 μM とかえて反応速度 V を決定し、 $1/S$ に対する $1/V$ の plot を行なったところ、 i によって V_{max} が不変であることにより、CVA の AMPC を基質とした際の TEM 型 β -lactamase に対する阻害形式は拮抗阻害で

度を得た。一方 CVA 2, 0.5, 0.125 mg/mouse 投与時には投与後 15 分付近にピークを有する dose response のある血清中濃度を得た。

AMPC : CVA (1 : 2), (1 : 1), (2 : 1), (8 : 1) 投与時には AMPC 1 mg/mouse にそれぞれ CVA 2, 1, 0.5, 0.125 mg/mouse を同時投与したが、破線で示した CVA の血清中濃度は CVA 単独投与時のように投与量に応じたピーク値を示して推移しているのに対し、実線で示した AMPC の血清濃度は投与量が一定であるにもかかわらず、同時投与の CVA による影響を受ける傾向があり、特に CVA の比率の大きい AMPC : CVA (1 : 2) の場合にはその影響が大きく (2 : 1), (8 : 1) の場合の約 2/3 のピーク値しか得られなかった。

Fig. 64 Kinetic plot of the hydrolysis of AMPC by *E. coli* type TEM β -lactamase

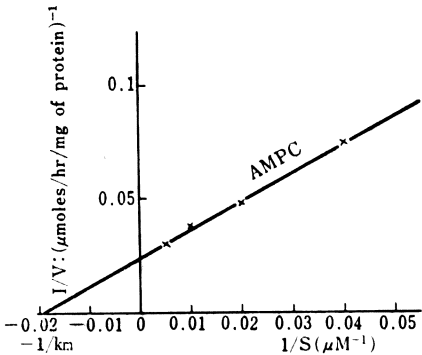


Fig. 66 Kinetic constant for inhibition of hydrolysis (K_i) of CVA

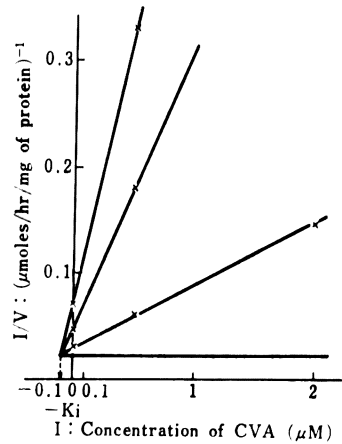
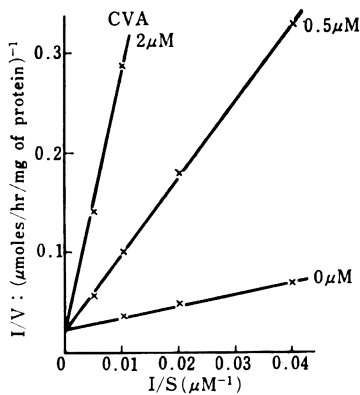


Fig. 65 Kinetic plot of the competitive inhibition of *E. coli* type TEM β -lactamase hydrolysis of AMPC alone and in the presence of CVA



あることが認められた (Fig. 65)。

また上記のデータより I に対する $1/V$ の plot (Dixon plot) を行ない、CVA の K_i を求めたところ、Fig. 66 に示すように $K_i = 0.1 \mu\text{M}$ となり、CVA の TEM 型 β -lactamase に対する親和性の大きさが証明された。

III. 考 察

β -lactamase inhibitor である CVA は AMPC と AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の比率で併用することにより、AMPC 感受性菌の MIC には影響を与えず、AMPC 耐性の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* の AMPC の MIC 値を著しく低下させることが明らかになった。またこの併用効果については checkerboard dilution method により、これらの AMPC 耐性菌で AMPC と CVA 間に広い濃度範囲における著明な協力作用が認められたことに

より裏づけられた。しかしこれらのデータをさらに詳しくみると AMPC と CVA の協力作用の発現はすべての菌種菌株において必ずしも一様でないことがわかった。すなわちこのことは臨床分離株の感受性分布において、AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) の MIC の比較的高い濃度への分布があることや、checkerboard dilution method で協力作用の発現の比較的低い *E. coli* や *K. pneumoniae* が存在したことによって明らかであり、特にこれらの株については AMPC と CVA の併用の有効性が併用の比率や濃度によって左右される可能性があると思われた。

一方、AMPC 耐性菌について AMPC の一定濃度 (3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$) に CVA を併用して、その増殖を阻止するに要する濃度を求めたところ、菌種により濃度的に明らかに異なる分布を示し、同一菌種内においても 2 相性の分布を示すものがあることが認められた。ここにおいては特に *E. coli*, *K. pneumoniae* の一部の株および *P. vulgaris* での AMPC 低濃度作用時に CVA の高い濃度 (12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上) の併用が必要であることがわかった。このような *in vitro* の MIC の結果と対応して殺菌作用および *in vivo* の治療効果の検討では、協力作用の発現の弱い *K. pneumoniae* (No. 129 株) で併用時の殺菌作用が比較的弱く、 ED_{50} 値でみた併用時の治療効果が全般的に悪く、また *P. vulgaris* (No. 202 株) では AMPC : CVA (1 : 2) で殺菌作用がやや弱くなる傾向があり、 ED_{50} も (1 : 2) で大きく劣るという結果が得られたが、これは他の菌種菌株では AMPC : CVA (1 : 2), (2 : 1), (8 : 1) でともに良好な殺菌作用と治療効果を有していたのとやや異なる傾向であった。

したがって併用の比率に関しては今回得られた限りの

データを総合すれば(2:1)が最も適当であるとの結論を得たが、さらに併用の実用化に際してはヒトにおける併用時の体内動態および毒性での検討が必要であろうと思われる。

また、今回、CVAの β -lactamase阻害作用に関する直接の証明は*E. coli* No. 21のTEM型 β -lactamaseについてしか行なわれなかったが、AMPC:CVA(1:2)、(2:1)、(8:1)での併用のMIC中のCVA濃度は先の一部のいわゆる“併用効果の現われにくい菌株”を除いてはCVA単独のMICの1/4以下であり、したがって大部分の併用効果の認められた菌種菌株については、併用効果はCVAの β -lactamase阻害作用によるものと推定される。一方、CVAは β -lactamase inhibitor^{3-5,9)}としての作用以外に、抗菌力は弱いながらもペニシリン結合蛋白質(PBP)の2に親和性を有しており¹⁰⁾、PBP3に親和性を有するCEXやPiperacillinとの併用にも興味を持たれる。実際、私どもはCVAとCEXやPIPとの併用効果について検討を行なったが、両剤の併用により協力作用を認めており、その時の形態変化を観察したところ併用時にbulge状の細胞が見られ、作用機作レベルでの両剤の協力作用が現われたものと考えられる。このようにCVAは β -lactamase inhibitorとしての作用以外に作用機作レベルでの協力作用も期待できるものと考えられる。

また、AMPCとCVAの併用により、現在臨床的にかんりの割合でAMPC耐性菌が存在すると思われる*S. aureus*、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis*、*P. vulgaris*に対するAMPCの有効性が増大されることの意義は大きいと思われるが、菌種、菌株により併用効果の現われ方の差が存在し、これについては各種 β -lactamaseに対するCVAの阻害作用が必ずしも一様でないことにも原因があると思われ、これらの現象について酵素学的な面よりの検討に興味を持たれる。

文 献

- 1) BROWN, A. G.; D. BUTTERWORTH, M. COLE, G. HANSCOMB, J. D. HOOD, C. READING & G. N. ROBINSON: Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29: 668~669, 1976
- 2) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid; a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 852~857, 1977
- 3) DURKIN, J. P. & T. VISWANATHA: Clavulanic acid inhibition of β -lactamase I from *Bacillus cereus* 569/H. *J. Antibiot.* 31: 1162~1169, 1978
- 4) NEU, H. C. & K. P. FU: Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 650~655, 1978
- 5) MILLER, J. M.; C. N. BAKER & C. THORNSBERRY: Inhibition of β -lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* by sodium clavulanate. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14: 794~796, 1978
- 6) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改定について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 7) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99~113, 1949
- 8) 小此木研二, 木田 誠, 土屋院可, 米田雅彦: Mecillinam の *Escherichia coli* に対する抗菌力および β -lactamase に対する態度。 *Chemotherapy* 25: 94~99, 1977
- 9) WÜST, J. & T. D. WILKINS: Effect of clavulanic acid on anaerobic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 130~133, 1978
- 10) SPRATT, B. G.; V. JOBANPUTRA & W. ZIMMERMANN: Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12: 406~409, 1977

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CLAVULANIC ACID AND AMOXICILLIN IN COMBINATION

TAKESHI NISHINO, MASUYO OHSE, YUMIKO SAJI and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of amoxicillin (AMPC) plus clavulanic acid (CVA), a recently developed β -lactamase inhibitor, were investigated and the following results were obtained.

1. Antibacterial activity was studied against standard strains stocked in our laboratories. CVA showed a low level of antibacterial activity. The addition of CVA to AMPC at ratios of 1 to 2, 2 to 1 and 8 to 1 (AMPC plus CVA) markedly potentiated the antibacterial activity of AMPC against resistant strains of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *P. vulgaris*, but had no effect on typically sensitive strains.

2. Similar results were obtained when these ratios were tested against a large number of clinical isolates and each of the ratios had antibacterial activity superior to that of cephalexin against AMPC resistant strains.

3. The potentiating effect of CVA on AMPC activity was further established in studies using the checkerboard dilution method.

4. The β -lactamase inhibitory activity of CVA was investigated in the presence of 12.5, 6.25 and 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of AMPC against AMPC resistant clinical isolates. As a result, the enzyme inhibitory activity of CVA was shown to vary depending on both the bacterial species and strains within species studied. For example against *K. pneumoniae* species two distribution peaks were obtained.

5. Synergism was observed in bactericidal kill curve experiments using the established MIC concentrations for each of the ratios (1 to 2, 2 to 1 and 8 to 1).

6. The *in vitro* results were substantiated by *in vivo* mouse experimental infection studies with AMPC resistant strains of *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. vulgaris*.

Analysis of ED₅₀ values showed that the 2 to 1 ratio was the most efficacious in these studies.