β-Lactamase inhibitorであるSulbactamとCefoperazoneの併用による*in vitro*, *in vivo*抗菌作用

五島瑳智子・小川　正俊・金子　康子
辻　　明良・宮崎　修一・桑原　章吾
東邦大学医学部微生物学教室

β-lactamase inhibitorとしての作用を各種細菌について，sulbactamとcefoperazoneとの併用により検討した。

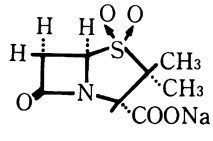
Sulbactam単剤では，従来の細菌に対し，抗菌力は弱く，単独では，抗菌剤として使用することはできないが，β-lactamaseに阻害作用を有する。

Sulbactamとcefoperazoneをそれぞれ1：1に併用した場合，*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *B. fragilis*に対し併用効果が認められた。

Sulbactamはβ-lactamaseのRICHMOND type 1に弱く，2～5に強い阻害作用がみられた。

マウス実験感染では，*E. coli*, *P. vulgris*, *B. fragilis*と*E. coli*の混合感染に対し，sulbactam, cefoperazone単剤が無効にもかかわらず，併用により，優れた治療効果がみられた。

Sulbactamは Pfizer 社で開発されたβ-lactamase inhibitor[1]で，化学名を sodium (2*S*, 5*R*)-3,3 dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo〔3. 2. 0〕heptane-2-carboxylate 4, 4-dioxide と称し，構造式を下記に示す。



Sulbactam単剤では，各菌種に対する抗菌力は弱いが，β-lactamaseに対し強い阻害作用を示し，既存のβ-lactam剤と併用すると耐性菌に対し抗菌力を発揮させるという。[2)~3)]

本報告はsulbactamとcefoperazoneをそれぞれ1：1の比率で併用した場合における抗菌力をそれぞれ単剤と比較した成績をまとめた概要である。

Ⅰ．実験材料および方法

1．使用菌株

教室保存株および臨床材料から分離されたグラム陰性菌の多数株を用いた。

2．薬　剤

1）Penicillin系薬剤

Benzylpenicillin（PCG, 1621.9unit/mg,萬有製薬）
Ampicillin（ABPC, 911μg/mg, 藤沢薬品）
Carbenicillin（CBPC, 790μg/mg, 藤沢薬品）
Sulbactam（SBT, 914μg/mg, 台糖ファイザー）

2）Cephem系薬剤

Cephaloridin（CER, 910μg/mg, 塩野義製薬）
Cephalexin（CEX, 900μg/mg, 萬有製薬）
Cefatridine（CFT, 843μg/mg, 萬有製薬）
Cefaclor（CCL, 960.6μg/mg, 塩野義製薬）
Cefroxadine（CXD, 881μg/mg, 日本チバガイギー）
Cefazolin（CEZ, 944μg/mg, 藤沢薬品）
Cefamandole（CMD, 960μg/mg, 塩野義製薬）
Cefuroxime（CXM, 971μg/mg, 新日本実業）
Cefotiam（CTM, 820μg/mg, 武田薬品）
Cefsulodin（CFS, 904μg/mg, 武田薬品）
Cefoxitin（CFX, 938μg/mg, 第一製薬）
Cefmetazole（CMZ, 953μg/mg, 三共）
Cefoperazone（CPZ, 947μg/mg, 富山化学）
Cefotaxime（CTX, 925μg/mg, ヘキストジャパン）
Ceftizoxime（CZX, 857μg/mg, 藤沢薬品）
Latamoxef（LMOX, 922μg/mg, 塩野義製薬）
Cefmenoxime（CMX, 945μg/mg, 武田薬品）

3．感受性測定法[4~5)]

日本化学療法学会標準法に準じて測定したが，測定用培地にはMueller Hinton agar（Difco）を用いた。

抗菌スペクトラムの検討にはsulbactamとcefoperazone併用の比率をそれぞれ1：1および1：2で，臨床分離株の感受性では併用の比率をそれぞれ1：1で測定し，それぞれ単剤と比較した。

4．殺菌作用

E. coli 91を用い，Mueller Hinton broth（Dif-

co）に接種し，菌数が10^6cells/mlになった時に，各々の抗生剤の1/2MIC，MIC，2MIC量を添加し，37℃で振盪培養した。添加後1，2，4，6，9，24時間毎に生菌数を測定した。

5．不活化酵素に対する安定性

1）酵素液の調製

E. coli 35, *E. coli* ML 1410 RGN 238, *E. coli* ML 1410 RGN 823, *E. coli* 121, *K. pneumoniae* GN 69, *C. freundii* GN 346, *E. cloacae* No. 91, *P. mirabilis* GN 79, *P. vulgaris* GN 79, *P. vulgalis* No. 9, *P. rettgeri* GN 624, *P. inconstans* GN 627, *S. marcescens* No. 78, *P. aeruginosa* No. 47, *P. aeruginosa* No. 11, *B. fragilis* No. 19, *B. fragilis* No. 32, *B. fragilis* No. 48, *B. fragilis* No. 69, *B. fragilis* GM 7000, *B. fragilis* GM 7002, *B. fragilis* GM 7004 の計22株を用い，Nutrient broth あるいはGAM broth で37℃，20時間培養した菌体を超音波破壊し，その遠心上清をミリポアフィルターにより沪過滅菌した液を粗酵素液とした。

2）酵素による不活化率の測定

薬剤はPCG，ABPC，CBPC，CER，CEX，CFT，CXD，CCL，CEZ，CMD，CFX，CMZ，CXM，CTM，CFS，CTX，CPZ，CZX，CMX，LMOX，SBTを用いた。

前述の酵素液に各薬剤液を50μg/mlになるように添加し，37℃で4時間作用させた後，100℃1分間の加熱処理により酵素を失活させたのち，薬剤の残存力価をディスク法によるBioassay法により測定した。検定菌としてPCG，ABPC，CBPC，CER，CEX，CFT，CCL，CXD，CEZ，CMD，CXM，CFX，CMZ，CEZには*B. subtilis* ATCC 6633，CPZ，CTXには*M. luteus* ATCC 9341を，CTM，CMXの場合には，*P. mirabilis* ATCC 21100を，CFSには*P. aeruginosa* NCTC 10490，LMOXでは*E. coli* 7437，SBTには*E. coli* 603を用いた。

6．マウス実験感染における感染防御効果

マウスはICR系，雄，体重19±1gを1群6匹使用した。

Table 1 Antibacterial spectrum

Organisms	MIC (μg/ml)			
	Sulbactam	Cefoperazone	Sulbactam 1 : Cefoperazone 1	Sulbactam 1 : Cefoperazone 2
S. aureus 209-P	>100	0.78	0.78	1.56
B. subtilis ATCC 6633	25	1.56	1.56	3.12
E. coli NIHJ JC-2	100	0.39	0.78	1.56
K. pneumoniae IFO 3512	12.5	≦0.19	0.78	0.78
K. oxytoca 1004	>100	>100	>100	100
S. flexneri 103R	25	100	100	50
S. typhi S60	25	0.78	1.56	1.56
S. paratyphi B	50	3.12	12.5	6.25
P. mirabilis 1287	100	100	>100	50
P. vulgaris IFO 3851	>100	6.25	25	12.5
P. morganii IFO 3848	>100	3.12	3.12	1.56
P. rettgeri IFO 13501	>100	12.5	6.25	3.12
P. inconstans IFO 12930	>100	>100	>100	>100
S. marcescens IFO 12648	>100	>100	>100	>100
P. aeruginosa IFO 3445	>100	25	25	12.5
P. fluorescens IFO 3081	>100	3.12	6.25	3.12
P. putida TMS 180	>100	25	50	50
P. maltophilia TMS 227	>100	>100	100	>100
P. cepacia TMS 201	50	50	50	50
A. calcoaceticus NCTC 7844	3.12	>100	6.25	50
A. faecalis NCTC 655	100	3.12	25	100
A. xylosoxidans TMS 73	>100	>100	>100	>100
F. meningosepticum TMS 462	12.5	12.5	6.25	6.25

inoculum size 10^8cells/ml

1) 単独感染実験

E. coli C11, *E. coli* ML 1410RGN823, *P. vulgaris* No. 2 を感染菌とし，それぞれの菌液をマウス腹腔内に感染させ，1時間後に sulbactam, cefoperazone および1：1の併用群を皮下投与した。観察は感染後5日間行い，マウスの生死により ED_{50} を算出した。

2) 混合感染実験

E. coli C11 と *B. fragilis* GM 7004 をそれぞれ 5×10^7 CFU/mouse (MLD 3×10^8 CFU/mouse)，3×10^7 CFU/mouse (MLD 5×10^9 CFU/mouse) をマウス腹腔内に混合感染させた。感染後1時間に sulbactam, cefoperazone および1：1の併用群を皮下投与し，マウスの生死により ED_{50} を算出した。また死亡マウスの血中分離菌の比率を調べるため，死亡直後のマウス心血から1白金耳量をとり，2 ml の生理食塩水に懸濁させ，それぞれの生菌数を測定した。検出用培地として，*E. coli* には BTB 寒天平板培地を用い，好気培養を行い，*B. fragilis* では CEZ 20 μg/ml 含有 GAM 寒天平板を用い，嫌気培養を行った

7. マウス血清中濃度測定法

実験感染に用いた同条件のマウス1群8匹を用い，sulbactam および cefoperazone をそれぞれ 1mg/mouse, 0.5mg/mouse 皮下投与し，5分，15分，30分，1時間，2時間後にそれぞれマウス1匹あたり 0.4ml 採血，1群8匹のマウス血液をプール，血清中濃度をディスク法で測定した。検定菌は sulbactam では *E. coli* 603, cefoperazone では *M. luteus* ATCC 9341 を用いた。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌，腸内細菌およびブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌の感受性を sulbactam と cefoperazone の単剤およびそれぞれ1：1，1：2の併用時について比較した成績を Table 1 ～ 2 に示した。

Sulbactam 単剤では，10^6cells/ml 接種で各菌種に対する抗菌力は弱い。しかしその中でも，*A. calcoaceticus*, *F. meningosepticum* には抗菌力を示し，MIC は

Table 2 Antibacterial spectrum

Organisms	MIC (μg/ml)			
	Sulbactam	Cefoperazone	Sulbactam 1 : Cefoperazone 1	Sulbactam 1 : Cefoperazone 2
S. aureus 209-P	100	0.78	0.78	0.78
B. subtilis ATCC 6633	25	0.78	1.56	0.78
E. coli NIHJ JC-2	25	≦0.19	0.39	0.78
K. pneumoniae IFO 3512	12.5	≦0.19	≦0.19	≦0.19
K. oxytoca 1004	12.5	0.78	0.78	0.78
S. flexneri 103R	25	0.39	≦0.19	0.39
S. typhi S60	25	≦0.19	≦0.19	0.39
S. paratyphi B	12.5	≦0.19	0.39	0.39
P. mirabilis 1287	50	≦0.19	≦0.19	≦0.19
P. vulgaris IFO 3851	25	≦0.19	≦0.19	≦0.19
P. morganii IFO 3848	50	≦0.19	≦0.19	≦0.19
P. rettgeri IFO 13501	>100	≦0.19	≦0.19	≦0.19
P. inconstans IFO 12930	>100	≦0.19	0.39	≦0.19
S. marcescens IFO 12648	100	0.39	0.39	0.78
P. aeruginosa IFO 3445	>100	6.25	12.5	6.25
P. fluorescens IFO 3081	>100	3.12	3.12	3.12
P. putida TMS 180	>100	25	50	25
P. maltophilia TMS 227	>100	6.25	12.5	12.5
P. cepacia TMS 201	25	12.5	6.25	12.5
A. calcoaceticus NCTC 7844	0.78	>100	1.56	3.12
A. faecalis NCTC 655	25	1.56	1.56	1.56
A. xylosoxidans TMS 73	100	1.56	1.56	3.12
F. meningosepticum TMS 462	3.12	1.56	0.78	0.78

inoculum size 10^6cells/ml

0.78μg/ml, 3.12μg/ml であった。cefoperazone はグラム陽性菌および腸内細菌科の各菌種に対する抗菌力が強く，0.78μg/ml 以下で発育を阻止した。ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に対しても，ほとんどの菌の MIC は 1.56～12.5μg/ml であった。そのためsulbactam,cefoperazone それぞれ1：1および1：2の併用群で著明な抗菌力の変動はみられなかった。

2. β-lactamase 産生菌に対する sulbactam と cefoperazone の併用効果

β-lactamase を産生する13菌種20菌株について sulbactam と cefoperazone の併用効果を調べた成績を Table 3 ～ 4 に示した。

10^8cells/ml 接種において，sulbactam と cefoperazone の併用により，RICHMOND type 1c の *P. vulgaris* GN 76, 2 の *P. mirabilis* GN 79, *E. coli* 121, 3 の *E. coli* ML 1410 RGN14, *E. coli* ML 1410RGN823, *E. coli* 18, 4 の *K. pneumoniae* GN 69, 5 の *P. vulgaris* 9 において優れた併用効果がみられた。

10^6cells/ml 接種では，cefoperazone が感受性を示すために併用効果は著明でなく，そのうち RICHMOND type 2 の *P. mirabilis* GN 79, 3 の *E. coli* ML 1410RGN823, *E. coli* 18 では併用効果が認められた。

Sulbactam と cefoperazone のそれぞれ1：1および1：2の併用において大きな差はみられなかった。

3. 臨床分離株の感受性

臨床材料から分離した *E. coli* 20 株, *K. pneumoniae* 20 株, *P. mirabilis* 20 株, *P. vulgaris* 15 株, *P. morganii* 20 株, *P. rettgeri* 20 株, *P. inconstans* 20 株, *B. fragilis* 27株の感受性を sulbactam, cefoperazone 単剤および1：1の併用について比較した成績を Fig. 1～8 に示した。

併用群では *E. coli* 20 株中16株, *K. pneumoniae* 20 株中17株, *P. mirabilis* 20 株中 16 株に強い併用効果がみられ，MIC は低い値を示した。

P. vulgaris は15株全てが sulbactam および cefoperazone に耐性を示すが，併用により15株が全て感受性を示した。

P. morganii 20 株中16株, *P. rettgeri* 20 株中12株に併用効果がみられたが，*P. inconstans* では20株中 8 株に併用効果が認められたのみであった。

B. fragilis に対しても sulbactam と cefoperazone の併用効果が認められた。

Table 3 *In vitro* activity of β-lactamase producing strains

Organisms \ Antibiotics	RICHMOND type	Sulbactam	Cefoperazone	Sulbactam 1 : Cefoperazone 1	Sulbactam 1 : Cefoperazone 2
S. aureus 35		200	6.25	6.25	6.25
S. marcescens 78	1a	>400	>400	400	400
P. morganii GN 125	1a	400	6.25	3.12	3.12
P. rettgeri GN 624	1a	400	50	50	50
P. inconstans GN 627	1a	400	200	100	200
E. cloacae 91	1a	200	200	50	50
C. freundii GN 346	1a	100	>400	100	50
E. coli 35	1b	25	0.39	0.39	0.39
P. vulgaris GN 76	1c	200	200	1.56	1.56
P. aeruginosa 11	1d	>400	>400	200	200
P. mirabilis GN 79	2b	400	>400	12.5	25
E. coli 121	2	100	>400	6.25	12.5
E. coli ML 1410 RGN 14	3	50	200	6.25	6.25
E. coli ML 1410 RGN 823	3	200	>400	50	50
E. coli 18	3	200	>400	12.5	12.5
K. pneumoniae 134	4	200	100	50	25
K. pneumoniae GN 69	4	100	>400	12.5	12.5
E. coli ML 1410 RGN 238	5a	100	6.25	6.25	6.25
P. vulgaris 9	5	400	>400	25	25
P. aeruginosa 47	5	>400	50	50	50

inoculum size 10^8cells/ml

Table 4 *In vitro* activity of β-lactamase producing strains

Organisms \ Antibiotics	Richmond type	Sulbactam	Cefoperazone	Sulbactam 1 : Cefoperazone 1	Sulbactam 1 : Cefoperazone 2
S. aureus 35		200	3.12	3.12	3.12
S. marcescens 78	1a	400	400	200	200
P. morganii GN 125	1a	50	0.78	1.56	0.78
P. rettgeri GN 624	1a	200	0.78	0.78	0.78
P. inconstans GN 627	1a	200	12.5	12.5	12.5
E. cloacae 91	1a	100	12.5	12.5	12.5
C. freundii GN 346	1a	50	25	12.5	12.5
E. coli 35	1b	25	0.09	0.19	0.09
P. vulgaris GN 76	1c	100	0.78	0.78	0.78
P. aeruginosa 11	1d	>400	50	100	50
P. mirabilis GN 79	2b	100	12.5	3.12	3.12
E. coli 121	2	50	0.78	0.78	1.56
E. coli ML 1410 RGN 14	3	50	0.78	0.78	0.39
E. coli ML 1410 RGN 823	3	100	12.5	6.25	6.25
E. coli 18	3	50	3.12	1.56	1.56
K. pneumoniae 134	4	25	0.09	0.09	0.09
K. pneumoniae GN 69	4	50	12.5	6.25	12.5
E. coli ML 1410 RGN 238	5a	25	0.19	0.19	0.19
P. vulgaris 9	5	50	1.56	1.56	0.78
P. aeruginosa 47	5	>400	25	25	25

inoculum size 10^6cells/ml

Fig. 1
Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone
inoculum size 10^8cells/ml *E. coli* 20 strains

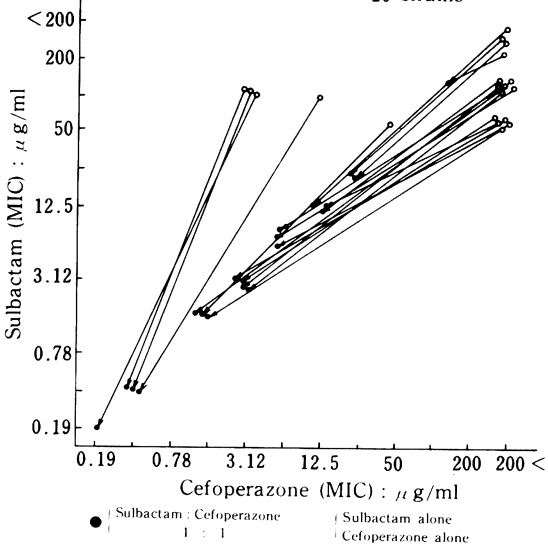


Fig. 2
Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone
inoculum size 10^8cells/ml *K. pneumoniae* 20 strains

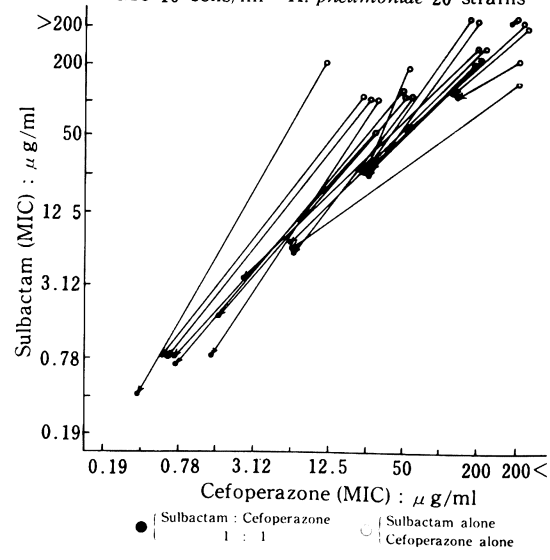


Fig. 3 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

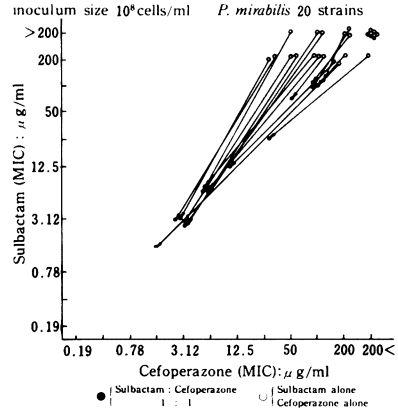


Fig. 4 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

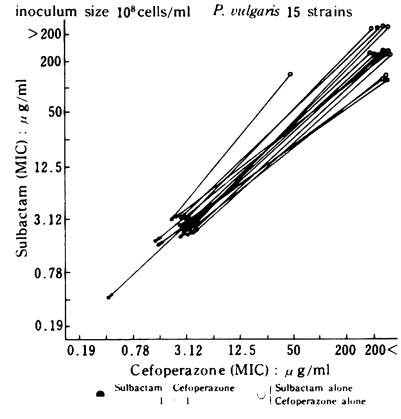


Fig. 5 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

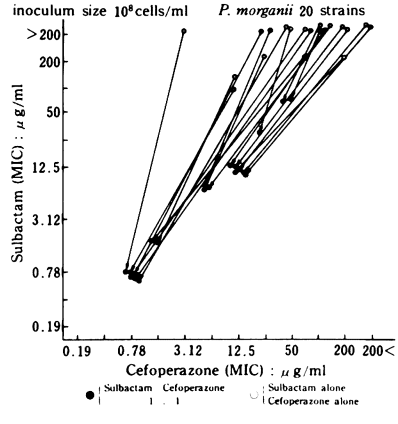


Fig. 6 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

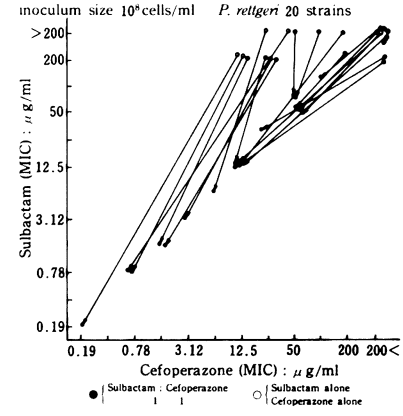


Fig. 7 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

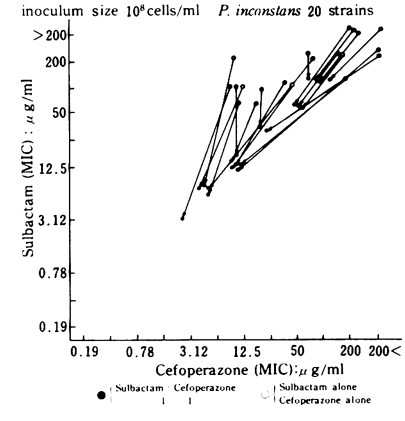


Fig. 8 Synergistic activity of Sulbactam and Cefoperazone

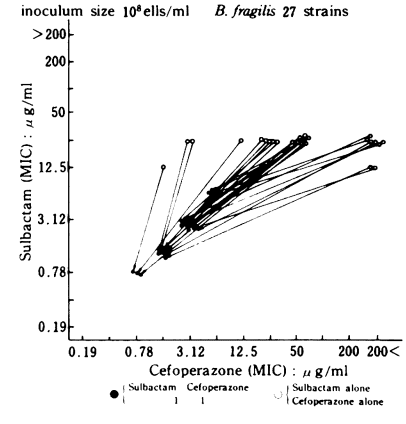
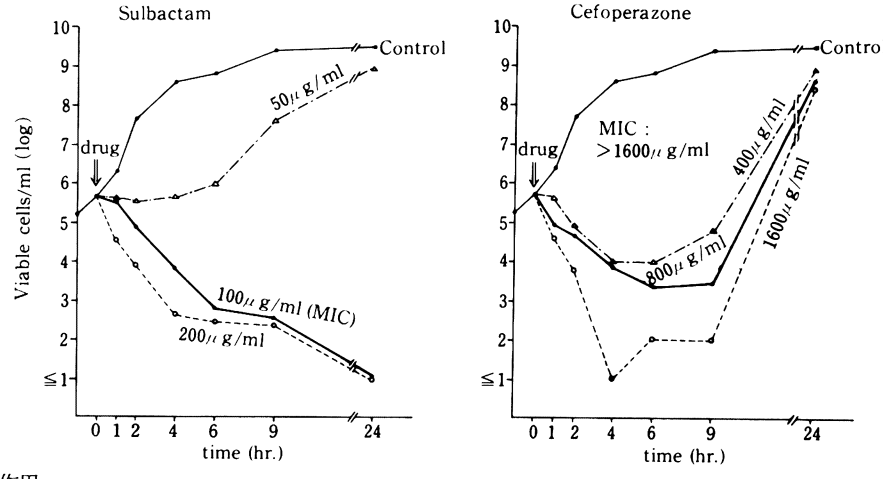


Fig. 9 Bactericidal activity of Sulbactam and Cefoperazone against *E. coli* 91



4. 殺菌作用

E. coli 91 に対する sulbactam, cefoperazone の単剤およびそれぞれ1：1の併用における殺菌作用を検討した成績を Fig. 9～10 に示した。

Sulbactam と cefoperazone 併用における total MIC は 50μg/ml (sulbactam : cefoperazone = 25 : 25 μg/ml) であるが, MIC 添加時では24時間まで増殖抑制作用が著明に認められるのに比べ, cefoperazone 1600μg/ml 添加においても 9 時間後に再増殖がみられ, また sulbactam 50μg/ml の添加でも, 6時間以降再増殖が認められた。

5. 不活化酵素に対する安定性

11菌種22菌株の産生する不活化酵素に対する sulbactam の安定性を各種β-lactam 剤と比較した成績を Fig. 11 および Fig. 12 に示した。

Sulbactam は使用した全菌株の産生する不活化酵素に対し安定であった。

B. fragilis GM 7004 の産生する酵素に対する sulbactam, cefoperazone 単剤および併用による効果を調べた成績を Fig. 13 に示した。cefoperazone 単剤では 2 時間で完全に不活化されたが, sulbactam と併用することにより, cefoperazone の力価の減少は 4 時間まで認められなかった。

6. マウス実験感染における感染防御効果

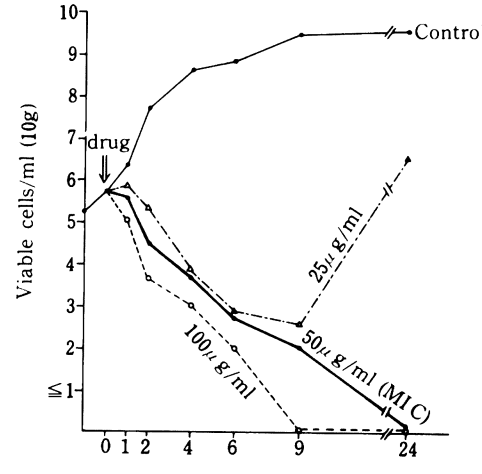
1) 単独感染

(1) *E. coli* 感染

β-lactamase 産生菌である *E. coli* 91, *E. coli* ML 1410 RGN 823 を感染菌とし, sulbactam, cefoperazone の併用効果を調べた成績を Table 5～6 に示した。

E. coli 91 の感染では sulbactam, cefoperazone 単剤では治療効果が無効であった。しかしそれぞれ1：1に併用した場合に ED_{50} 値が 12.58mg/mouse を示し, 治療効果がみられた。

Fig. 10 Bactericidal activity of Sulbactam : Cefoperazone (1 : 1) against *E. coli* 91



E. coli ML 1410 RGN 823 感染の場合, sulbactam, cefoperazone 単剤では治療効果がみられないが, 併用することにより, 治療効果が認められ, それぞれ1：1の併用での ED_{50} は 1.98mg/mouse を示した。

(2) *P. vulgaris* 感染

P. vulgaris No. 2 を感染菌とした成績を Table 7 に示した。

P. vulgaris No. 2 では sulbactam の ED_{50} は 0.0047 mg/mouse を示すが, cefoperazone では 20mg/mouse 以上を示した。しかし sulbactam と cefoperazone を1：1の比率で併用した場合の ED_{50} は 0.0029mg/mouse で併用効果が認められた。

Fig. 11 Enzymatic stability of Sulbactam, Penicillins, and Cephalosporins
incubation time : 4hrs.

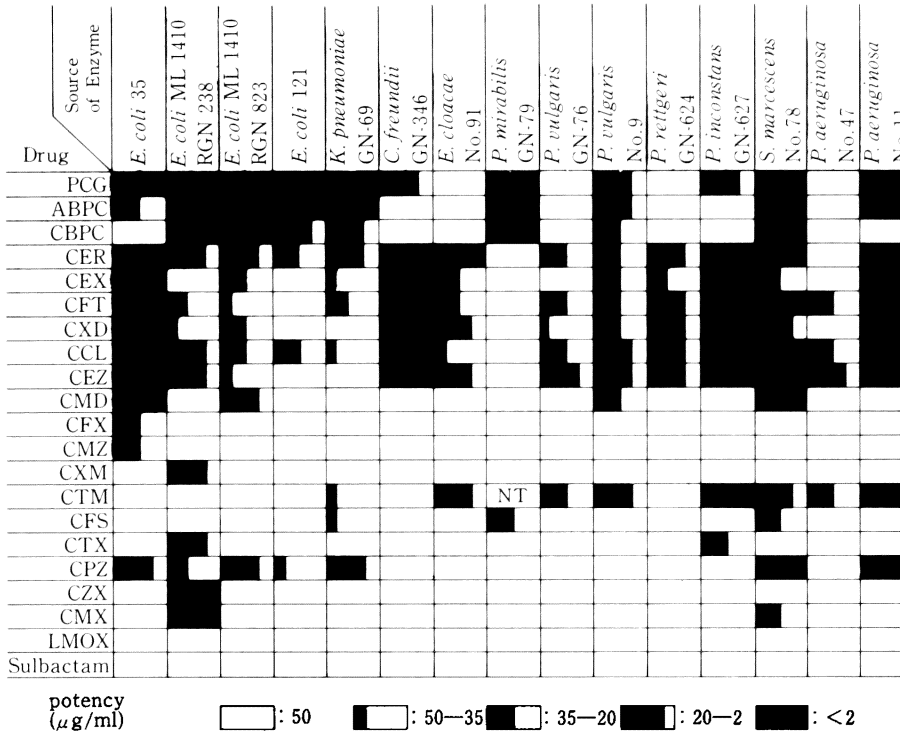


Fig. 12 Enzymatic stability of Sulbactam, Penicillins, Cephalosporins

incubation time : 4hrs.

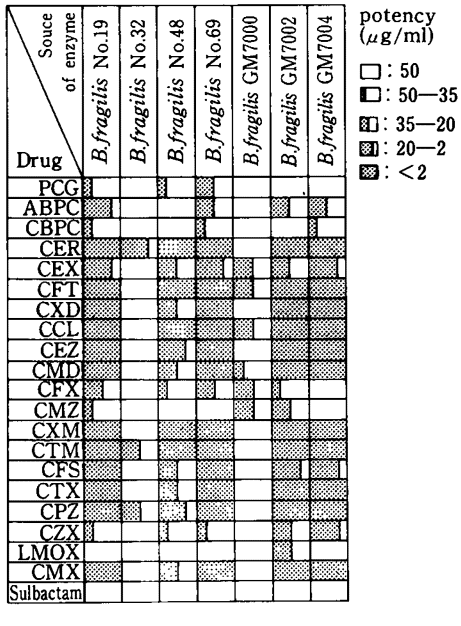


Fig. 13 Stability of Sulbactam : Cefoperazone (1 : 1) to β-lactamase. *B.fragilis* GM7004

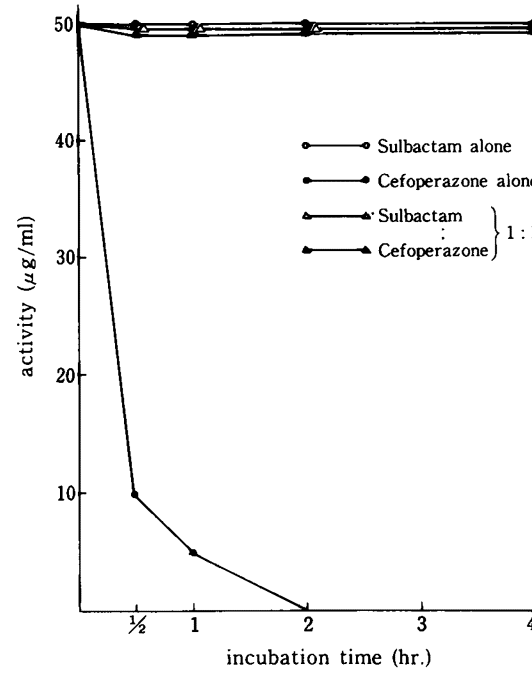


Table 5 Protecting effect of Sulbactam and Cefoperazone against experimental mice infection
E. coli 91

Antibiotic	Challenge dose	5% mucin	administration			MIC μg/ml		ED_{50} mg/mouse
			route	number	after the infection	10^8	10^6	
Cefoperazone	2×10^6	+	S. C.	1	1	>200	>200	>20
Sulbactam	2×10^6	+	S. C.	1	1	200	100	>20
Sulbactam : Cefoperazone 1 : 1	2×10^6	+	S. C.	1	1	50	12.5	12.58

MLD : 4.6×10^5 (5% mucin)
mouse : ICR, 4W, ♂ 19±1g 6 animals/group
ED_{50} : Van der Waerden method

Table 6 Protecting effect of Sulbactam and Cefoperazone against experimental mice infection
E. coli ML 1410 RGN 823

Antibiotic	Challenge dose	5% mucin	administration			MIC μg/ml		ED_{50} mg/mouse
			route	number	after the infection	10^8	10^6	
Cefoperazone	6×10^7	+	S. C.	1	1	>400	12.5	>40
Sulbactam	6×10^7	+	S. C.	1	1	200	100	>40
Sulbactam : Cefoperzone 1 : 1	6×10^7	+	S. C.	1	1	50	6.25	1.98 (1.48-2.65)

MLD : 6×10^7 (5% mucin)
mouse : ICR, 4W, ♂ 19±1g 6 animals/group
ED_{50} : Van der Waerden method

Table 7 Protecting effect of Sulbactam and Cefoperazone against experimental mice infection
P. vulgaris No. 2

Antibiotic	Challenge dose	5% mucin	administration			MIC μg/ml		ED_{50} mg/mouse
			route	number	after the infection	10^8	10^6	
Cefoperazone	6.7×10^6	+	S. C.	1	1	800	0.39	0.0047 (0.003-0.0072)
Sulbactam	6.7×10^6	+	S. C.	1	1	200	100	>20
Sulbactam : Cefoperazone 1 : 1	6.7×10^6	+	S. C.	1	1	6.25	0.1	0.0029 (0.0022-0.0039)

MLD : 1×10^6 (5% mucin)
mouse : ICR, 4W, ♂ 19±1g 6 animals/group
ED_{50} Van der Waerden method

2) 混合感染

(1) *B. fragilis* GM 7004 と *E. coli* C11 による混合感染

B. fragilis GM 7004 と *E. coli* C11 の混合感染マウスに対し sulbactam, cefoperazone 単剤および1：1の併用の治療効果および死亡マウスの血中分離菌を Table 8, Fig. 14～16 に示した。

B. fragilis GM 7004 と *E. coli* C11 の混合感染に対し，sulbactam の ED_{50} は 0.0988mg/mouse, cefoperazone では 0.1953mg/mouse, それぞれ1：1併用での ED_{50} は 0.078mg/mouse を示し，併用効果がみられた。

Fig. 14 に示した sulbactam 投与における死亡マウス血中分離菌は control と同様 *B. fragilis, E. coli* 両菌種が検出された。

Cefoperazone 単剤投与では，cefoperazone の投与量が増量するに従い *E. coli* の検出が減少していることがわかった (Fig. 15)。

Sulbactam, cefoperazone の併用により，controle と比較して，*E. coli* の減少が認められた (Fig. 16)。

7. マウス血清中濃度

Sulbactam と cefoperazone をそれぞれ 1 mg/mouse, 0.5mg/mouse を皮下投与したマウスの血清中濃度の成績を Fig. 17 に示した。

Sulbactam は5分がピークて 1mg/mouse 投与の場合 63 μg/ml の値を示し，cefoperazone では15分がピークで 46 μg/ml であった。

Sulbactam と cefoperazone を 0.5mg/mouse 併用投与 (total 1mg/mouse) による各剤の血清中濃度は，sulbactam が cefoperazone より血清中濃度のピークが高く，単剤の場合と相関性がみられ，15分, 30分, 1時間の血清中濃度に差がみられなかった。

Table 8 Protecting effect of Sulbactam and Cefoperazone alone and combined in a fixed 1:1 ratio against experimental mouse infection with a mixture of *B. fragilis* and *E. coli*

Antibiotics	Challenge dose c. f. u./mouse		MIC μg/ml				*ED_{50} mg/mouse
	B. fragilis GM 7004	*E. coli* C11	*B. fragilis* GM 7004 10^8	*B. fragilis* GM 7004 10^6	*E. coli* C11 10^8	*E. coli* C11 10^6	
Cefoperazone	5×10^7	5×10^7	>100	>100	0.78	≦ 0.19	0.1953 (0.1223-0.312)
Sulbactam			50	12.5	50	25	0.0988 (0.0639-0.1528)
Sulbactam : Cefoperazone 1 : 1			50	3.12	0.39	≦ 0.19	0.078 (0.0574-0.1052)

*: Van der Waerden method administration: s. c. 1hr after infection

mouse: ICR, 4W male, 19±1g, 6 animals/group

MLD *B. fragilis* GM 7004 5×10^9 c. f. u./mouse

E. coli C-11 3×10^8 c. f. u./mouse

Fig. 14 Microbial flora and fatality of Sulbactam treated mice experimentally infected with a mixture of *B. fragilis* and *E. coli*

Organism (challenge dose)	administration (mg/mouse)	fatality (%)	bacteria detected from blood of dead mice (cells/mouse) *B. fragilis* 2 4 6 8	*E. coli* 2 4 6 8
B. fragilis GM7004 (5×10^7 cells/mouse) + *E. coli* C11 (3×10^7 cells/mouse)	0	100		
	0.005	100		
	0.02	90		
	0.078	40		
	0.3	20		
	1.25	20		
	5	0		

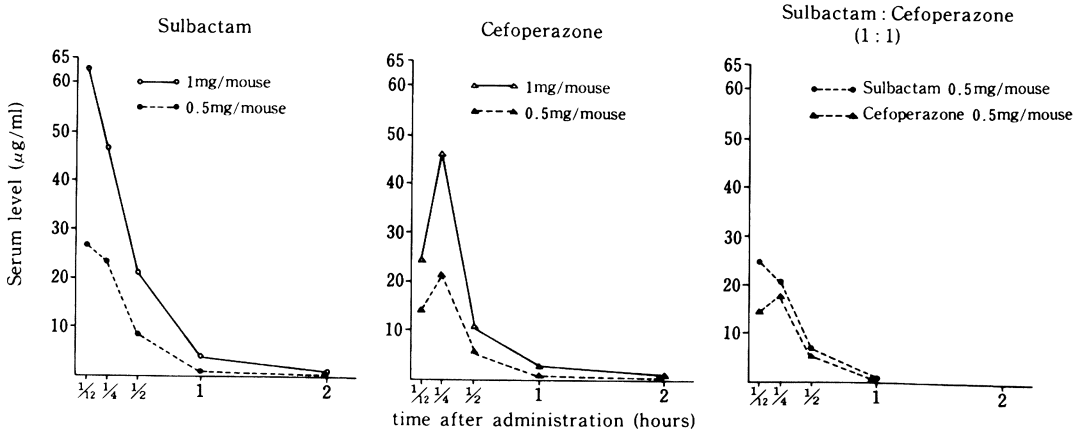
Fig. 15 Microbial flora and fatality of Cefoperazone treated mice experimentally infected with a mixture of *B. fragilis* and *E. coli*

Organism (challenge dose)	administration (mg/mouse)	fatality (%)	bacteria detected from blood of dead mice (cells/mouse) *B.fragilis* 2 4 6 8	*E.coli* 2 4 6 8
B.fragilis GM7004 (5×10^7cells/mouse) + *E.coli* C11 (3×10^7cells/mouse)	0	100		
	0.005	100		
	0.02	80		
	0.078	60		
	0.3	40		
	1.25	20		
	5	0		

Fig. 16 Microbial flora and fatality of Sulbactam : Cefoperazone (1 : 1) treated mice experimentally infected with a mixture of *B. fragilis* and *E. coli*

Organism (challenge dose)	administration (mg/mouse)	fatality (%)	bacteria detected from blood of dead mouse (cells/mouse) *B.fragilis* 2 4 6 8	*E.coli* 2 4 6 8
B. fragilis GM7004 (5×10^7cell/mouse) + *E.coli* C11 (3×10^7cells/mouse)	0	100		
	0.02	100		
	0.078	50		
	0.3	0		

Fig. 17 Serum level after subcutaneous administration of Cefoperazone and Sulbactam in mice



mouse : ICR, 4W, ♂, 19±1g 8 animals/group method : bioassay method

Ⅲ. 考　　察

本報告はβ-lactamase inhibitorとして開発されたsulbactamとcefoperazoneとの併用による*in vitro, in vivo*抗菌作用の特徴を各単剤と比較した成績である。

β-lactamase inhibitorとして，従来よりMCIPC, MFIPCなどが知られ，グラム陰性桿菌の産生するβ-lactamaseに対し阻害作用を持ち，ABPCとの併用で耐性菌にも抗菌力を示す合剤が開発されている。その後β-lactamaseの永久的不活化剤としてclavulanic acidが発見された。

Clavulanic acidは各菌種に対する抗菌力が弱いが，すでにamoxicillinとそれぞれ1：2の合剤として開発されている。しかしcephalosporinase typeに対しinhibitor作用は弱いことが報告されている。[6]

Sulbactamについては，すでにEnglish[1], Fu[2]らはsulbactamとampicillin, sulbactamとcephalothinの併用効果を検討し併用効果が認められると報告している。わが国ではsulbactamとcefoperazoneの併用が1：1の比率で検討がなされている。

そこで我々はsulbactamのβ-lactamase inhibitorとしての作用をcefoperazoneとの併用で基礎的に*in vitro, in vivo*の面から検討を加えた。

Sulbactamはcefoperazoneと併用することにより，β-lactamase産生菌のうちRichmond type 1の酵素に対する作用が弱く，2～5に強いβ-lactamase inhibitor作用が認められた。既ちpenicillinase typeには強い阻害作用を示すが，cephalosporinaseには弱いことが認められた。

臨床分離株では*E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. vulgaris, P. morganii, P. rettgeri*に対し，優れた併用効果が確認された。

E. coli 91によるマウス実験感染に対し，sulbactam, cefoperazone両剤とも単剤では治療効果が無効であるが併用することにより治療効果がみられた。その理由として，*in vitro*抗菌力におけるMICの低下および殺菌作用における併用効果により，24時間後でも再増殖を阻害することが考えられた。

β-lactamase産生菌の*E. coli* ML 1410 RGN 823の実験感染においても単剤では無効であるが，併用することにより，sulbactamがβ-lactamase inhibitorとしてcefoperazone耐性菌にも抗菌力を示すことが確められた。

B. fragilis（β-lactamase産生菌）と*E. coli*の混合感染において，併用効果がみられることは，*B. fragilis*の産生する不活化酵素に対し安定で，cefoperazoneでは2時間で不活化されるが，sulbactamと併用することにより，4時間まで不活化されないことが理由として考えられる。

Sulbactamはβ-lactamaseに対するinhibitorとしてcefoperazoneと併用することにより，優れた*in vivo*効果をもたらすことが認められた。

文　　献

1) English, A. R.; J. A. Retsema, A. E. Girard, J. E. Lynch & W. E. Barth: CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. Antimicrob. Agents Chemother. 14: 414-419, 1978

2) Fu, K. P. & H. C. Neu: Comparative inhibition of β-lactamase by novel β-lactam compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 171-176, 1978

3) Aswapokee, N. & H. C. Neu: A sulfone β-lactam compound which acts as a β-lactamase inhibitor. J. Antibiotics 31: 1238-1244, 1978

4) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度（MIC）測定法再改訂について。
Chemotherapy 29: 76-79, 1981

5) 日本化学療法学会嫌気性菌MIC測定法検討委員会：嫌気性菌の最小発育阻止濃度（MIC）測定法。
Chemotherapy 27: 559-560, 1979

6) Reading, C. & M. Cole: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 852-857, 1977

IN VITRO AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SULBACTAM, A β-LACTAMASE INHIBITOR, IN COMBINATION WITH CEFOPERAZONE

SACHIKO GOTO, MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO, AKIYOSHI TSUJI, SYUICHI MIYAZAKI, and SHOGO KUWAHARA
Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

The activity of sulbactam as a β-lactamase inhibitor, when combined with cefoperazone, was studied in a variety of bacteria.

Sulbactam by itself has little antibacterial activity against most bacteria, and thus cannot be used alone as a therapeutic agent. However, it has strong activity to inhibit β-lactamases.

When sulbactam and cefoperazone were combined in a ratio of 1:1, marked synergistic activity was obtained against *E. coli, K. pneumoniae, Proteus,* and *B. fragilis.*

Sulbactam exhibited strong inhibitory activity against β-lactamases of types 2 to 5 by Richmond's classification, and weak activity against type 1 β-lactamase.

In experimental infections in mice, excellent protective effects were obtained against *E. coli, P. vulgaris,* and a mixed infection of *B. fragilis* and *E. coli* with the combination of sulbactam and cefoperazone, even though neither sulbactam nor cefoperazone was effective by itself.