

Sulbactam および Sulbactam/Cefoperazone の抗菌活性

川崎 賢二・新美 博仕・沖 俊一

台糖ファイザー株式会社新薬開発センター生化学研究所

小酒井 望

順天堂大学医学部臨床病理学教室

小 栗 豊 子

順天堂大学医学部附属順天堂医院中央臨床検査室

Sulbactam (SBT) を Cefoperazone (CPZ) と併用すると、CPZ 耐性菌に対する抗菌作用において著明な協力作効が認められ、とくに *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*, *B. fragilis* において顕著であった。

CPZ 耐性菌に対する殺菌作用も CPZ に SBT を併用することにより増強された。

SBT と CPZ の至適配合比を *in vitro* および *in vivo* で各種の CPZ 耐性菌を用いて検討した結果、*in vitro* 抗菌力測定では SBT:CPZ の配合比率がほぼ 1:4 から 4:1 の範囲で最も低い MIC 値が得られ、マウス感染治療実験では SBT:CPZ の比率が 1:8 から 2:1 の範囲で最も併用効果が顕著であった。

種々の CPZ 耐性菌を用いたマウス感染治療実験において CPZ と比較して SBT 併用による治療効果は優れていた。また、感染マウスへ SBT を先行投与し、CPZ の投与を 60 分まで遅らせてもマウス生存率は SBT および CPZ の同時投与の場合と等しく、SBT の β -lactamase 不活化作用は 60 分間以上持続し、SBT が先行しても、CPZ の抗菌力に対する併用効果は維持されることが示唆された。

Sodium sulbactam は Pfizer 社が開発した β -lactam 系化合物で、それ自身の抗菌力は弱い各種 β -lactamase に強い阻害作用を有し、Cefoperazone などの β -lactam 抗生物質と併用すると β -lactamase 産生菌に対して協力的に作用し、抗菌力が増強されることが報告されている。¹⁾

本報では、SBT と CPZ の *in vitro* および *in vivo* での併用効果について検討した成績を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬物

Sodium sulbactam (以下 SBT と略す。890 μ g 力価/mg. 台糖ファイザー) および Sodium cefoperazone (以下 CPZ と略す。930 μ g 力価/mg. 台糖ファイザー), Cefoxitin (CFX. 900 μ g 力価/mg. Merck), Piperacillin (PIPC. 906 μ g 力価/mg. 富山化学) を使用した。SBT/CPZ は両成分を力価比 1:1、あるいは種々な比率に混合調整して用いた。薬液は滅菌生食塩液で用時調整した。

SBT/CPZ の MIC, MBC および ED₅₀ を表示する場合は、両薬物の総和で示した。

2. 使用菌株

標準菌株は当研究所で継代保存しているものを用い、

臨床分離株は国内の臨床施設より分与を受けた新鮮分離株を使用した。

3. MIC 測定

日本化学療法学会標準法²⁻³⁾に準じ、Mueller-Hinton agar (Difco) を用いて寒天平板希釈法によって測定した。ただし、*Streptococcus* 属、*Haemophilus* 属、*Neisseria* 属、*Corynebacterium* 属には 5% 馬脱線維血液を添加した培地を用いた。また *Bacteroides* 属には GAM 培地 (日水) を使用し、培養は GAS-PAK 法で行った。10⁸ および 10⁶ cells/ml の菌浮遊液をスタンプ法で接種した。

抗菌力に対する培地の種類の影響は、nutrient agar (栄研)、heart infusion agar (栄研)、brain heart infusion agar (栄研)、tryptose agar (栄研) および Mueller-Hinton agar (Difco) を用いて検討した。

至適配合比の検討では、CPZ に 10⁸ cells/ml で 400 μ g/ml 以上の MIC を示す各種 CPZ 耐性菌を用い、SBT と CPZ の配合比を 17 段階に変化させて MIC の測定を行った。

4. 殺菌作用の検討

倍数希釈濃度の被験薬物を含む Mueller-Hinton bro-

th (Difco) に試験菌を 10^5 cells/ml 接種し 37°C 、18時間培養後、生菌数を 10^2 cells/ml 以下に減少させた最小薬物濃度を MBC とした。

増殖曲線に及ぼす影響については、一夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2 および *E. coli* 603 を、Mueller-Hinton broth で 10,000 倍に希釈し、 37°C で振盪培養し、菌数が約 5×10^5 cells/ml に達したときに各薬物の 1/4 MIC, 1 MIC および 4 MIC 量を添加して経時的に生菌数を測定した。

5. 試験管内耐性獲得

Mueller-Hinton broth を用い、液体培地希釈法で MIC を測定した。対照と同程度の発育を示した最高薬物濃度含有試験管菌液を用い、倍数希釈濃度の被験薬物含有する Mueller-Hinton broth へ約 10^6 cells/ml となるように接種した。同様に 20 代継代してこの間の MIC の変動を観察した。

6. マウス実験感染に対する治療効果

感染菌は heart infusion agar (栄研) で 37°C 、18時間培養後滅菌生理食塩液、または 5% ムチン液に懸濁した。1 薬物濃度当り 1 群 10 匹の ICR 系雄マウス(体重 18

–20g) の腹腔内へ菌液 0.5 ml を接種した。感染 1 時間後に薬物を 1 回皮下投与し、7 日後のマウスの生存数より ED₅₀ を Litchfield-Wilcoxon 法で算出した。

SBT と CPZ の時間差投与による治療効果の変動観察には、*E. coli* 269 腹腔内感染マウスを 20 匹ずつの 11 群に分け、SBT および CPZ 各 500 mg/kg 同時投与群、SBT 先行投与後 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分に CPZ 投与を行う 7 群、SBT 単独投与群、CPZ 単独投与群および無処置群とした。薬物投与は、感染後 30 分より開始した。各群での治療効果はマウス生存率で比較し、実験は 2 度繰り返して行い成績を集計した。

治療時のマウス血中薬物濃度は SBT および CPZ をそれぞれ又は同時にマウス(ICR, 雄, 18–20g)へ皮下投与し、5, 15, 30, 60, 120 分後に 10 匹ずつ断頭採血し、得た血清をプールして bioassay⁴⁾ により測定した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトル

SBT, CPZ 単独および SBT と CPZ を 1:1 に併用したときの標準株に対する抗菌活性を Table 1 および 2 に示した。

Table 1 Antimicrobial spectrum of SBT, CPZ and SBT/CPZ against gram-positive bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	SBT		CPZ		SBT/CPZ(1:1) ^{a)}	
	10^8 ^{b)}	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	50	1.56	0.78	1.56	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	200	100	1.56	1.56	3.13	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMAN	200	200	1.56	1.56	3.13	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	200	100	1.56	0.78	1.56	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	100	50	1.56	0.78	3.13	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	100	50	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>Streptococcus pyogenes</i> S 8	100	50	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Streptococcus pyogenes</i> T 3	50	25	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Streptococcus viridans</i>	200	50	1.56	0.78	1.56	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I	100	50	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type II	100	50	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type III	100	50	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	100	25	3.13	1.56	3.13	3.13
<i>Listeria monocytogenes</i>	>800	>800	25	12.5	50	25

a) Values represent total β -lactam concentration.

b) Inoculum size (cells/ml)

Table 2 Antimicrobial spectrum of SBT, CPZ and SBT/CPZ against gram-negative bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	SBT		CPZ		SBT/CPZ (1:1) ^{a)}	
	10^8 ^{b)}	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> IID 839	0.39	0.39	≤ 0.045	≤ 0.045	0.09	0.09
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> IID 844	3.13	1.56	≤ 0.045	≤ 0.045	0.09	0.09
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50	25	0.39	0.19	0.78	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	50	25	0.09	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	50	25	1.56	6.25	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 17	100	25	1.56	0.39	3.13	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50	25	1.56	0.19	0.78	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	200	100	400	1.56	50	3.13
<i>Serratia marcescens</i>	800	200	800	400	400	100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	200	50	0.78	0.19	0.78	0.19
<i>Proteus vulgaris</i> IAM 1203	100	100	>800	1.56	12.5	1.56
<i>Proteus morgani</i> KONO	200	100	6.25	1.56	6.25	3.13
<i>Salmonella typhi</i> 0901	50	25	0.39	0.19	0.78	0.39
<i>Salmonella typhi</i> T _{ANAKA}	50	50	0.78	0.39	1.56	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a	25	25	0.19	0.09	0.39	0.19
<i>Shigella flexneri</i> 2b	12.5	12.5	≤ 0.045	≤ 0.045	0.09	0.09
<i>Shigella sonnei</i> EW 33	25	12.5	0.19	≤ 0.045	0.19	0.09
<i>Hafnia alvei</i>	100	50	12.5	0.78	25	1.56
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 9327	400	100	0.19	≤ 0.045	0.39	0.09
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 9334	400	100	0.19	≤ 0.045	0.39	0.09
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>800	>800	12.5	6.25	25	12.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>800	>800	100	50	100	50
<i>Pseudomonas putida</i>	>800	>800	>800	200	400	100
<i>Pseudomonas cepacia</i>	50	25	12.5	6.25	12.5	6.25
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	>800	>800	>800	100	800	100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0.19	0.19	0.78	0.39	0.19	0.19
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	200	50	3.13	0.78	3.13	1.56
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	400	200	12.5	6.25	25	12.5
<i>Alcaligenes faecalis</i>	400	200	25	3.13	12.5	6.25
<i>Bacteroides fragilis</i>	12.5	12.5	800	100	3.13	1.56

a) Values represent total β -lactam concentration.

b) Inoculum size (cells/ml)

グラム陽性菌に対する SBT の MIC は $25\mu\text{g/ml}$ 以上に分布した。SBT/CPZ の MIC は CPZ と同等ないし 2 倍の値を示した。

グラム陰性菌の中、*N. gonorrhoeae* および *A. calcoaceticus* に対して SBT はそれぞれ $3.13\mu\text{g/ml}$, $0.19\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止したが、腸内細菌科の各菌種および *B. fragilis* に対する SBT の MIC は $12.5\sim 800\mu\text{g/ml}$ に幅広く分布した。*P. aeruginosa* および他のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に対する SBT の抗菌力は弱かった。CPZ 感受性菌に対する SBT/CPZ の MIC は CPZ と同等ないし 2 倍の値を示したが、 10^8cells/ml で CPZ に比較的高い MIC を示した *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* および *B. fragilis* に対する SBT/CPZ の MIC は CPZ の $1/4\sim 1/250$ であった。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床検体からの検出頻度の高い菌種に対する SBT/CPZ (1:1), SBT/CPZ (1:2), CPZ, SBT および CFX の抗菌力を Table 3 および 4 に示した。

S. aureus 26 株に対する SBT/CPZ の平均 MIC は 10^8cells/ml で $13.5(1:1)$ および $12.5(1:2)\mu\text{g/ml}$ であり、CPZ の平均 MIC $36.3\mu\text{g/ml}$ に比べ 3 倍の抗菌力が認められた。 10^6cells/ml では SBT/CPZ (1:1) および (1:2), CPZ, CFX とともに同程度の抗菌力を示した。

S. epidermidis 46 株に対して SBT/CPZ, CPZ および CFX はほぼ同等の抗菌力を示し、平均 MIC は 10^8cells/ml で約 $15\mu\text{g/ml}$, 10^6cells/ml で約 $6\mu\text{g/ml}$ であった。

S. pyogenes 10 株, *S. pneumoniae* 45 株に対する SBT/CPZ および CPZ の MIC は $0.2\mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。CFX の両菌種に対する MIC 分布のピークは 10^8cells/ml で 0.39 および $0.78\mu\text{g/ml}$ にあった。

S. faecalis 20 株に対する SBT/CPZ および CPZ の MIC は $50\mu\text{g/ml}$ 前後に分布した。

E. coli 106 株に対する SBT/CPZ の平均 MIC は 10^8cells/ml で $1.61(1:1)$, $1.34(1:2)\mu\text{g/ml}$ で CPZ の $7.51\mu\text{g/ml}$ および CFX の $5.20\mu\text{g/ml}$ に比べ高い抗菌活性が認められた。また CPZ に対しては 106 株中 33 株が、CFX に対しては 3 株が $100\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示したが、SBT/CPZ の MIC は $50\mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。 10^6cells/ml では SBT/CPZ の抗菌力は CPZ とほぼ等しく、CFX に比べて約 4 倍の抗菌活性を示した。

K. pneumoniae 102 株でも *E. coli* の場合と同様の傾

向が観察されたが、SBT/CPZ に対しても MIC $100\mu\text{g/ml}$ 以上を示す菌株が 10^8cells/ml 接種時に一部認められた。

P. mirabilis 38 株は大半が CPZ 感受性のため平均 MIC では SBT/CPZ と CPZ の間に明らかな差はみられなかったが、 10^8cells/ml で CPZ に $1600\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す菌株が 5 株認められ、SBT/CPZ はこれらを $100\mu\text{g/ml}$ 以下で発育阻止した。

SBT と CPZ の併用効果は indole 陽性 *Proteus*, とくに *P. vulgaris* においてもっとも顕著であり 10^8cells/ml での CPZ の平均 MIC は $39.4\mu\text{g/ml}$ であったのに対して SBT/CPZ の MIC は、 $3.82(1:1)$ および $3.68(1:2)\mu\text{g/ml}$ であった。

P.morganii 32 株および *P. rettgeri* 31 株に対して、SBT/CPZ はそれぞれ $25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$ で全株の発育を阻止した。

C. freundii 42 株に対する SBT/CPZ の平均 MIC は 10^8cells/ml で $20.5(1:1)$ および $17.4(1:2)\mu\text{g/ml}$ を示し、CPZ の平均 MIC $114\mu\text{g/ml}$ に比べ明らかに強い抗菌活性が認められた。 10^6cells/ml では SBT/CPZ と CPZ の間に抗菌力の差はみられなかった。

Enterobacter 属に対しても SBT/CPZ は 10^8cells/ml で CPZ の 2~3 倍強い抗菌力を示した。

S. marcescens 174 株に対する SBT/CPZ の 10^8cells/ml での平均 MIC は $67.7(1:1)$ および $65.3(1:2)\mu\text{g/ml}$ を示したが、CPZ の平均 MIC は $300\mu\text{g/ml}$, CFX の平均 MIC は $179\mu\text{g/ml}$ にとどまった。 10^6cells/ml では SBT/CPZ, CPZ はほぼ同等の抗菌力(平均 MIC 約 $30\mu\text{g/ml}$) を示したが、CFX の平均 MIC は $120\mu\text{g/ml}$ であった。

H. influenzae 28 株は、SBT/CPZ および CPZ に極めて感受性であり、両薬物の MIC は $0.39\mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。

P. aeruginosa 127 株は SBT/CPZ および CPZ に同程度の感受性を示した。他の菌種の場合と同様に 10^8cells/ml で CPZ に $1600\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株においては SBT 併用による MIC の明らかな低下が観察された。

A. calcoaceticus 21 株に対する SBT の平均 MIC は 10^8cells/ml で $1.62\mu\text{g/ml}$, 10^6cells/ml で $0.808\mu\text{g/ml}$ であった。SBT/CPZ の MIC は SBT 単独の 2~3 倍の値を示した。

B. fragilis 59 株に対する SBT/CPZ の 10^6cells/ml での平均 MIC は約 $2\mu\text{g/ml}$ で、CFX の約 2 倍の抗菌

Table 3-1 Susceptibility distribution of clinical isolates

Organism	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Mean MIC									
		≤ 0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200		400	800	≥ 1600						
<i>S. aureus</i> (26 strains)	SBT/CPZ (1:1)							5	10			3	4	4										13.5
	(1:2)							5	10	1	4	2	4											12.5
	CPZ							3	5	7	1	2	1	3	3	1								36.3
	SBT CFX							9	5	1	5	3	2	1	13	2	7	3						379
<i>S. epidermidis</i> (46 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1		1	4	4	13	4	4	4	3	2	1	5								17.2
	(1:2)		1			1	4	8	12	1	6	2	4	1	2	4								14.3
	CPZ	1			2	2	2	10	9	2	4	3		2	2	4						3	15.0	
	SBT CFX							6	8	4	5	8	4	1	4	8	3	7	22					601
<i>S. pyogenes</i> (10 strains)	SBT/CPZ (1:1)			10																				0.0977
	(1:2)		2	8																				0.0850
	CPZ	10										8	2										0.0488	
	SBT CFX					10																		28.7
<i>S. pneumoniae</i> (45 strains)	SBT/CPZ (1:1)			4	41																			0.184
	(1:2)			4	41																			0.184
	CPZ	3	36	6																				0.102
	SBT CFX					1	41	3						1	27	17								64.0
<i>S. faecalis</i> (20 strains)	SBT/CPZ (1:1)												3	13	4									51.8
	(1:2)												3	9	7	1								45.1
	CPZ																							30.8
	SBT CFX			4																		20		1600
<i>E. coli</i> (106 strains)	SBT/CPZ (1:1)	2	6	11	12	10	16	13	17	5	8	2					2	15	3					1.61
	(1:2)	2	12	17	14	10	15	11	16	5	8	2												1.34
	CPZ	5		11	5	6	6	4	12	1	7	4	3	4	6	11								7.51
	SBT CFX				1	2	15	33	33	11	9						3							5.20
<i>K. pneumoniae</i> (102 strains)	SBT/CPZ (1:1)	2	5	5	30	18	7	11	7	3	5	2	6	1										1.40
	(1:2)		4	14	28	13	10	10	7	2	5	3	5	1										1.32
	CPZ		7	19	13	9	5	4	8	2	10	3	4	4	1	5	8							4.21
	SBT CFX						7	36	40	11	4	4												67.0
<i>P. mirabilis</i> (38 strains)	SBT/CPZ (1:1)		1		6	4	14	3	4	3	2	1												2.02
	(1:2)			4	12	10	4	2	2	1	2	1												1.03
	CPZ	1	1	4	5	12	6	1	1	1				1								5		2.25
	SBT CFX				1			18	9	7	1		22	13			1	1				2		141
<i>P. vulgaris</i> (38 strains)	SBT/CPZ (1:1)		2	2	4	6	1	12	6	5														3.82
	(1:2)			1	4	5	3	11	6	5														3.68
	CPZ		2		2	3	3	3	3	4	3	1	2	3	1	4	7							39.4
	SBT CFX							2	8	4	6	6	9			3								321
<i>P. morganii</i> (32 strains)	SBT/CPZ (1:1)			6	3	6	6	1	7	3														2.74
	(1:2)			7	6	3	5	1	9	1														2.31
	CPZ		5	4	2	7	1	1	1	4	2	1										4		4.93
	SBT CFX						1	1	14	7	2	1		4	2									135
<i>P. rettgeri</i> (31 strains)	SBT/CPZ (1:1)		2	2	3	5	3	3	3	3	7													5.00
	(1:2)		1	1	3	2	7	1	5	3	4	4												3.91
	CPZ		1	3	3	3	2	2	2	4	1		1	3	3	3								8.94
	SBT CFX						1	6	5	4	4	2	6	1	1	1						1		205
<i>C. freundii</i> (42 strains)	SBT/CPZ (1:1)			2	1	1	1	5	3	2	8	5	8	5	1									20.5
	(1:2)		1	2	1	1	1	5	3	4	6	6	11	2										17.4
	CPZ		2		1			2	2	1	5	2	4	4	4	3	12							114
	SBT CFX									1			3	7	12	9	4	7						151
<i>E. aerogenes</i> (23 strains)	SBT/CPZ (1:1)			2	4	2	2	1	3		4	2	2	1										4.62
	(1:2)			3	5	1	1	2	2			3	3	2	1									4.10
	CPZ		1	3	4		1	1			2		2	2		3	2	2						12.9
	SBT CFX												8	6	5	3	1							59.9
<i>E. cloacae</i> (34 strains)	SBT/CPZ (1:1)			2	6	2	2	1	3	2	3	4	1	3	3	1	1							10.8
	(1:2)			5	3	3	2		5		2	5		4	3	1	1							9.79
	CPZ		1	6	2	4			1	3			1	2	1	3	3	7						20.4
	SBT CFX												9	13	6	3	1	2						133

Inoculum size: 10^8 cells/ml

(Continued)

Table 3-2 Susceptibility distribution of clinical isolates

Organism	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Mean MIC				
		≤ 0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200		400	800	≥ 1600	
<i>S. marcescens</i> (174 strains)	SBT/CPZ (1:1)					1	8	6	5	8	16	34	42	25	18	8	3	67.7	
	(1:2)					2	10	7	2	9	19	27	41	29	15	9	4	65.3	
	CPZ					2	10	4	5	2	5	8	18	9	10	19	82	300	
	SBT													24	44	64	31	11	342
	CFX																		179
<i>H. influenzae</i> (28 strains)	SBT/CPZ (1:1)	23			4	1												0.0641	
	(1:2)	19		4	3	2												0.0726	
	CPZ	20		3	3	2												0.0708	
	SBT										2	11	15					69.0	
	CFX																	2.83	
<i>P. aeruginosa</i> (127 strains)	SBT/CPZ (1:1)						2		11	34	23	31	12	12		2		30.6	
	(1:2)					1	1	4	36	15	20	28	10	10	2			22.2	
	CPZ					1	1	9	29	17	24	22	9	2	3	3	8	27.1	
	SBT										1	3	1	4	4	19	95	1130	
	CFX													1	3	6	117	1470	
<i>A. calcoaceticus</i> (21 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1		3	14	2		1								3.03	
	(1:2)			1		1	6	11		1	1							4.80	
	CPZ									2	3	9	4	3				55.2	
	SBT			2	2	13	3				1							1.62	
	CFX									3	7	10	1					67.3	
<i>B. fragilis</i> (59 strains)	SBT/CPZ (1:1)					2	9	30	8	10								3.73	
	(1:2)					3	20	18	9	7	2							3.24	
	CPZ						5	10	10	11	9	4	1			2	7	19.1	
	SBT							1		26	31		1					18.2	
	CFX					2	9	30	17	1								6.71	

MIC values for the combination represent total β -lactam concentration.
Inoculum size: 10^8 cells/ml

Table 4-1 Susceptibility distribution of clinical isolates

Organism	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Mean MIC			
		≤ 0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200		400	800	≥ 1600
<i>S. aureus</i> (26 strains)	SBT/CPZ (1:1)					1	1	11	4	4	2	3						6.42
	(1:2)					3	10	4	5	3	1							5.93
	CPZ					7	8	3	1	4			1	1	1			6.59
	SBT												6	10	5	5		254
	CFX					3	12		4	7								6.25
<i>S. epidermidis</i> (46 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1	1	1	5	12	10	2	6	2	4	2				7.16
	(1:2)			1	1	1	2	5	15	4	5	3	2	3	3	1		6.64
	CPZ	2			1	1	2	13	9	2	6	1	3	3	1	2		5.46
	SBT									1	2	5	8	8	7	15		451
	CFX					4	6	8	12	4	1	5	3	1	1	1		8.32
<i>S. pyogenes</i> (10 strains)	SBT/CPZ (1:1)			10														0.0977
	(1:2)	2		8														0.155
	CPZ	10																0.0850
	SBT									1	7	2						0.0488
	CFX				10													25.6
<i>S. pneumoniae</i> (45 strains)	SBT/CPZ (1:1)			15	30													0.391
	(1:2)	5		30	10													0.155
	CPZ	11		31	3													0.105
	SBT										2	4						0.0860
	CFX					1	1	42	1									51.6
<i>S. faecalis</i> (20 strains)	SBT/CPZ (1:1)										3	14	3					50.0
	(1:2)										1	6	13					37.9
	CPZ										3	12	5					26.8
	SBT															3	17	1440
	CFX													2	15	3		414
<i>E. coli</i> (106 strains)	SBT/CPZ (1:1)	9	12	11	16	19	17	14	4	3	1	1			2	15	3	0.659
	(1:2)	8	16	18	13	12	18	14	2	3	2							0.545
	CPZ	17	13	20	9	15	16	8	4	3	1			1				0.439
	SBT							1		7	72	19	5				1	29.1
	CFX			1	4	7	37	38	10	5	1	1	1	1	1			2.64
<i>K. pneumoniae</i> (102 strains)	SBT/CPZ (1:1)	5	23	28	10	11	7	5	6	3	3	1						0.432
	(1:2)	7	29	23	9	10	7	6	4	3	2	2						0.383
	CPZ	14	32	14	10	9	2	7	8	2	2	1	1					0.348
	SBT									2	3	69	15	11	2			31.9
	CFX					2	55	30	7	4	3	1						2.53

Inoculum size: 10^6 cells/ml

(Continued)

Table 4-2 Susceptibility distribution of clinical isolates

Organism	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)															Mean MIC	
		≤ 0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800		≥ 1600
<i>P. mirabilis</i> (38 strains)	SBT/CPZ (1:1)		1	3	5	16	5	3	3	2								1.01
	CPZ (1:2)		1	4	12	10	4	2	2	2	1							0.840
	SBT	3	1	4	14	9			4	3		1	15	20			2	0.616
	CFX				1		4	24	5	2					1	1		4.11
<i>P. vulgaris</i> (38 strains)	SBT/CPZ (1:1)		2	4	2	9	11	8	1	1								1.09
	CPZ (1:2)		2	3	3	10	11	7	1	1								1.07
	SBT	3	2	6	11	9	4		1	1	1		2	12	21	3		0.990
	CFX							11	11	7	5	3	1					158
<i>P.morganii</i> (32 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1	5	6	7	4	2	7								1.94
	CPZ (1:2)			1	8	6	6	2	3	6								1.60
	SBT	5	2	3	4	6	1	3	6	2								1.46
	CFX						1	1	2	16	5	1		1	4	1		102
<i>P. rettgeri</i> (31 strains)	SBT/CPZ (1:1)			4	4	4	3	4	5	3	2	2						2.29
	CPZ (1:2)		2	1	8	3	5	2	4	2	1							1.71
	SBT	2	5	5	2	1	4	5	1	4	2							1.87
	CFX					10	2	6		3	6	2				2		10.2
<i>C. freundii</i> (42 strains)	SBT/CPZ (1:1)		1	5	1	2	5	2	3	6	5	10	2					6.35
	CPZ (1:2)		2	4	1	2	5	2	4	6	7	8	1					5.66
	SBT	1	6		1	2	5	1	3	4	3	12	3	1				6.15
	CFX						1			1	7	15	7	5	5	2		83.4
<i>E. aerogenes</i> (23 strains)	SBT/CPZ (1:1)		1	5	2	1	3	2	2	2	2	1						2.24
	CPZ (1:2)		4	3	2	1	3	2	1	3	2	1	1					1.66
	SBT	2	6	1	1	1	3		2	2	3	1		1				1.30
	CFX							1	2	1	9	8	2	2			1	50.0
<i>E. cloacae</i> (34 strains)	SBT/CPZ (1:1)	1	3	3	2	3	4	1	1	3	3	2	3	2	2	1		5.10
	CPZ (1:2)	1	4	4	4		2	2	2	4	2	3		3	3			3.91
	SBT	4	4	4	1		2	2	2	1	4	1	4	1	1	3		3.99
	CFX							1	1		1	2	6	8	7	6	2	204
<i>S. marcescens</i> (174 strains)	SBT/CPZ (1:1)			3	8	6	7	4	17	35	41	28	12	10	3			31.8
	CPZ (1:2)		1	1	7	6	5	5	12	11	23	57	20	13	9	4		26.4
	SBT	1	1	7	6	5	5	12	11	23	57	20	13	9	4			28.7
	CFX			1				2	2	13	14	28	36	32	20	9	17	120
<i>H. influenzae</i> (28 strains)	SBT/CPZ (1:1)	26	1	1														0.0526
	CPZ (1:2)	26	1	1														0.0526
	SBT	26	1	1														0.0526
	CFX					1	17	7	3		3	2	14	9				51.3
<i>P. aeruginosa</i> (127 strains)	SBT/CPZ (1:1)				1	3	13	3		1								14.8
	CPZ (1:2)				1	1	5	18	34	21	31	13	3					10.7
	SBT				1	2	8	34	23	18	26	9	4	1		1		8.91
	CFX									1	1	4	3	6	7	28	77	902
<i>A. calcoaceticus</i> (21 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1	3	13	3		1									1.62
	CPZ (1:2)				1	7	10		2	1								2.74
	SBT				5	12	3		1		6	8	4	1				21.9
	CFX											4	12	5				0.808
<i>B. fragilis</i> (59 strains)	SBT/CPZ (1:1)			1	8	14	28	5	3									51.7
	CPZ (1:2)			3	10	21	17	7	1									2.41
	SBT				4	12	26	2	2	4	2	1	4	1	1			1.93
	CFX					2	2	5	44	5	1							5.62
					6	15	31	7										11.4
																		4.94

MIC values for the combination represent total β -lactam concentration.Inoculum size: 10^6 cells/ml

力が認められた。

3. 抗菌力に対する諸因子の影響

培地の種類、培地 pH、接種菌量および血清添加による抗菌力の変動を *S. aureus* 209-P, *E. coli* NIHJ JC-2, *E. coli* CSH2 RK1, および *K. pneumoniae* GN69 を用いて検討した結果を Table 5~8 に示した。

SBT/CPZ の抗菌力は培地の種類による影響を受けなかった (Table 5)。Table 6 に示すように培地 pH を変化した場合、*E. coli* および *K. pneumoniae* に対する SBT/CPZ および CPZ の抗菌力は中性、アルカリ性側で上昇した。一方 *S. aureus* では酸性側で抗菌力が上昇した。

Table 7 に示したように β -lactamase 産生 *E. coli* CSH2 RK1 および *K. pneumoniae* GN 69 に対する CPZ の抗菌力は接種菌量の増加に伴い著しく低下した。SBT を CPZ に併用すると接種菌量の増加に伴う MIC

値の変動幅は小さくなった。

Table 8 に示すように、SBT/CPZ の抗菌力は馬血清添加の影響を受けなかった。

4. 殺菌作用

Table 9 に示すように SBT, CPZ および SBT/CPZ は *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *E. cloacae* および *B. fragilis* に殺菌的に作用し、MIC と MBC の隔たりは 2 管以内であった。*P. aeruginosa* ATCC 27853 に対して CPZ の MIC は $12.5\mu\text{g/ml}$, MBC は $800\mu\text{g/ml}$ 以上であったが、SBT/CPZ (1 : 1) の MBC は $50\mu\text{g/ml}$ で、殺菌作用が増強された。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli NIHJ JC-2 に対しては SBT/CPZ (1 : 1), (1 : 2), CPZ および SBT いずれも MIC 濃度で殺菌的に作用した (Fig. 1)。1/4 MIC 濃度では SBT/CPZ (1 : 1), (1 : 2) および CPZ は薬剤添加後 5 時間

Table 5 Effect of medium on antimicrobial activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ

Organism	Medium	SBT/CPZ (1:1)		SBT/CPZ (1:2)		CPZ		SBT	
		$10^{8.5}$ ^{a)}	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>S. aureus</i> 209-P	NA ^{b)}	$1.56^{\text{c)}}$	0.78	0.78	0.39	0.78	0.39	100	100
	HI	1.56	0.39	1.56	0.78	0.78	0.39	200	100
	BHI	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	0.78	100	100
	TS	3.13	0.78	1.56	0.78	0.78	0.39	200	100
	MH	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	0.39	200	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	NA	0.39	0.09	0.19	0.09	0.19	0.09	100	25
	HI	0.39	0.09	0.19	0.09	0.09	0.09	100	25
	BHI	0.39	0.09	0.19	0.09	0.19	≤ 0.05	50	25
	TS	0.39	0.19	0.19	0.09	0.19	≤ 0.05	50	25
	MH	0.39	0.09	0.39	0.09	0.19	0.09	50	25
<i>E. coli</i> CSH2 RK1	NA	50	25	50	12.5	>800	12.5	400	200
	HI	50	25	50	12.5	>800	12.5	200	100
	BHI	50	25	50	25	>800	25	200	100
	TS	50	25	25	12.5	>800	25	200	100
	MH	50	25	50	12.5	>800	12.5	200	100
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	NA	25	6.25	50	6.25	800	12.5	200	50
	HI	25	6.25	25	6.25	800	12.5	200	50
	BHI	25	3.13	25	3.13	800	6.25	200	50
	TS	50	6.25	25	3.13	800	6.25	200	100
	MH	25	3.13	25	1.56	800	6.25	100	50

^{a)}: Inoculum size (cells/ml)

^{b)}: Abbreviations of media: NA; nutrient agar, HI; heart infusion agar,

BHI; brain heart infusion agar, TS; tryptosoy agar, MH; Mueller-Hinton agar

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

Table 6 Effect of pH on antimicrobial activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ

Organism	pH of Medium	SBT/CPZ (1:1)		SBT/CPZ (1:2)		CPZ		SBT	
		10 ⁸ a ¹)	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>S. aureus</i> 209-P	5	≤0.05 ^{b)}	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	12.5	6.25
	6	0.78	0.39	0.39	0.19	0.39	0.19	100	100
	7	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	0.39	200	100
	8	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	0.39	200	200
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	5	1.56	0.39	0.78	0.39	0.78	0.19	100	50
	6	0.39	0.19	0.39	0.19	0.19	0.09	100	50
	7	0.39	0.09	0.39	0.09	0.19	0.09	100	25
	8	0.19	0.09	0.19	0.09	0.09	≤0.05	100	50
<i>E. coli</i> CSH2 RK1	5	200	25	100	25	> 800	100	200	100
	6	50	12.5	50	12.5	> 800	50	200	100
	7	50	25	50	12.5	> 800	50	200	100
	8	25	6.25	12.5	6.25	> 800	25	100	100
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	5	100	3.13	100	1.56	> 800	6.25	800	200
	6	25	3.13	50	3.13	> 800	6.25	100	50
	7	25	3.13	25	1.56	> 800	6.25	100	50
	8	6.25	3.13	12.5	1.56	> 800	1.56	100	50

a¹): Inoculum size (cells/ml)b¹): MIC (μg/ml)

Table 7 Effect of inoculum size on antimicrobial activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ

Organism	Drug	Inoculum size (cells/ml)				
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
<i>S. aureus</i> 209-P	SBT/CPZ (1:1)	1.56 ^{a)}	1.56	0.78	0.39	0.39
	SBT/CPZ (1:2)	0.78	0.78	0.78	0.39	0.39
	CPZ	0.78	0.78	0.39	0.19	0.19
	SBT	100	100	50	50	50
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	SBT/CPZ (1:1)	0.39	0.09	0.09	0.09	0.09
	SBT/CPZ (1:2)	0.39	0.19	0.19	0.09	0.09
	CPZ	0.19	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05
	SBT	50	25	25	25	25
<i>E. coli</i> CSH2 RK1	SBT/CPZ (1:1)	50	25	12.5	6.25	6.25
	SBT/CPZ (1:2)	20	12.5	12.5	12.5	6.25
	CPZ	> 800	400	25	6.25	3.13
	SBT	50	50	50	50	50
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	SBT/CPZ (1:1)	6.25	6.25	3.13	3.13	1.56
	SBT/CPZ (1:2)	12.5	3.13	3.13	3.13	1.56
	CPZ	800	25	3.13	1.56	0.78
	SBT	50	50	50	25	25

a¹): MIC (μg/ml)

Table 8 Effect of horse serum concentration on antimicrobial activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ

Organism	Horse serum (%)	SBT/CPZ (1:1)		SBT/CPZ (1:2)		CPZ		SBT	
		10 ^{8 a)}	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>S. aureus</i> 209-P	0	1.56 ^{b)}	0.78	1.56	0.78	0.78	0.39	200	100
	5	1.56	0.78	1.56	0.39	0.78	0.39	200	100
	10	1.56	0.78	1.56	0.39	0.78	0.39	200	100
	20	1.56	0.78	1.56	0.39	0.78	0.39	200	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0	0.39	0.09	0.39	0.09	0.19	≤ 0.05	50	25
	5	0.19	0.09	0.19	0.09	0.19	≤ 0.05	50	25
	10	0.19	0.09	0.19	0.09	0.19	≤ 0.05	50	25
	20	0.09	≤ 0.05	0.19	≤ 0.05	0.09	≤ 0.05	50	25
<i>E. coli</i> CSH2 RK1	0	50	12.5	50	12.5	>800	12.5	100	100
	5	25	12.5	25	12.5	>800	12.5	100	100
	10	25	6.25	25	6.25	>800	12.5	100	100
	20	25	6.25	25	6.25	>800	6.25	100	100
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	0	12.5	3.13	25	3.13	800	6.25	100	50
	5	12.5	3.13	25	1.56	800	6.25	100	50
	10	12.5	3.13	12.5	1.56	800	3.13	100	50
	20	12.5	3.13	12.5	1.56	800	3.13	100	50

a): Inoculum size (cells/ml)

b): MIC (μg/ml)

まで静菌的に作用したが、SBTの1/4 MIC濃度では菌に対する発育抑制効果は認められなかった。CPZ耐性*E. coli* 603に対してもSBT/CPZはMIC濃度で殺菌的に作用し、SBT/CPZ(1:1)4 MIC濃度では薬物添加後5時間には生菌は認められなかった(Fig. 2)。しかしCPZはMIC濃度では完全な殺菌効果を示さず、薬剤添加後24時間に菌の再増殖が観察された。

6. 試験管内耐性獲得

S. aureus 209-Pでは20代の継代でSBTのMICは、100μg/mlから800μg/mlに上昇を示したにすぎなかったが、CPZでは0.39μg/mlから1600μg/mlへ、SBT/CPZでは0.78μg/mlから800μg/mlへと上昇が認められた。*E. coli* NIHJ JC-2を用いた場合、SBT、CPZおよびSBT/CPZいずれに対しても耐性獲得が進行し、SBTに対しては継代18代で、CPZには17代でMICが1600μg/mlとなった。SBT/CPZに対しては継代20代でもMICは400μg/mlにとどまった(Fig. 3)。

7. 至適配合比の検討

CPZ耐性の*E. coli* 38株、*K. pneumoniae* 20株、*P.*

vulgaris 20株、*P. rettgeri* 11株および*B. fragilis* 19株を用いてSBTとCPZの*in vitro*での至適配合比の検討を行った。SBTとCPZの配合比を17段階に変化させ、接種菌量10⁸ cells/mlでMICの測定を行い、その結果を50%または90%の供試菌株の発育を阻した両薬物の濃度と示した(Fig. 4~8)。

CPZ耐性*E. coli*ではSBT:CPZの比が4:1から1:4の範囲で抗菌力は最大となり、CPZ単独と比較して16倍以上の抗菌力増強が認められた。

*K. pneumoniae*に対する至適配合比はSBT:CPZの比2:1から1:4の範囲にあり、CPZ単独と比較して16倍以上の抗菌力増強が認められた。

*P. vulgaris*ではSBTが1:128の割合で配合されるだけで8倍の抗菌力増強が示され、SBT:CPZの比が4:1から1:8の範囲で最大の併用効果が認められた。2:1の比率ではCPZ単独に比べ128倍以上の抗菌力増強が示された。

*P. rettgeri*に対する至適配合比は1:8から8:1の範囲にあり、CPZ単独と比較し8~16倍の抗菌力増強

Table 9 Comparison of MIC and MBC values for SBT, CPZ and SBT/CPZ

Organism	SBT/CPZ (1:1)		SBT/CPZ (1:2)		CPZ		SBT	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> 209-P	0.78	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	100	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.19	0.19	0.19	0.19	0.09	0.09	50	50
<i>E. coli</i> 603	12.5	12.5	12.5	25	800	800	50	50
<i>K. pneumoniae</i> IID 979	6.25	6.25	3.13	3.13	3.13	6.25	25	25
<i>P. mirabilis</i> 1287	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	200	200
<i>P. vulgaris</i> IAM 1203	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	50	100
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	12.5	12.5	12.5	12.5	>800	>800	100	100
<i>S. marcescens</i> 25001	800	>800	800	>800	>800	>800	>800	>800
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12.5	50	12.5	100	12.5	>800	>800	>800
<i>B. fragilis</i> 60002	0.78	1.56	0.78	1.56	12.5	25	12.5	25

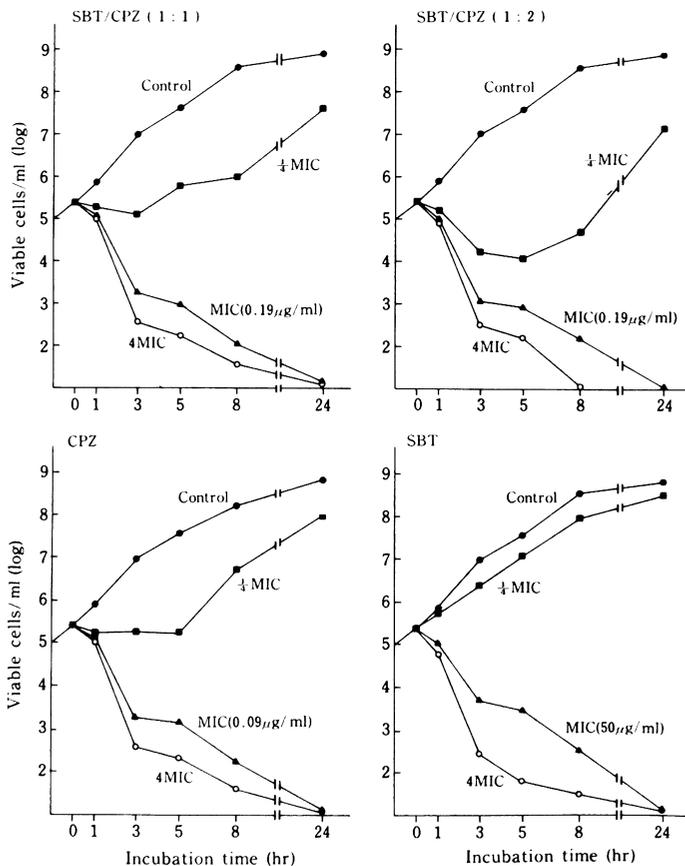
Inoculum size: 10^5 cells/ml($\mu\text{g/ml}$)Medium: Mueller-Hinton broth for aerobes; GAM broth for *B. fragilis*Fig. 1 Bactericidal activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ against *E. coli* NIHJ JC-2

Fig. 2 Bactericidal activity of SBT, CPZ and SBT/CPZ against *E. coli* 603

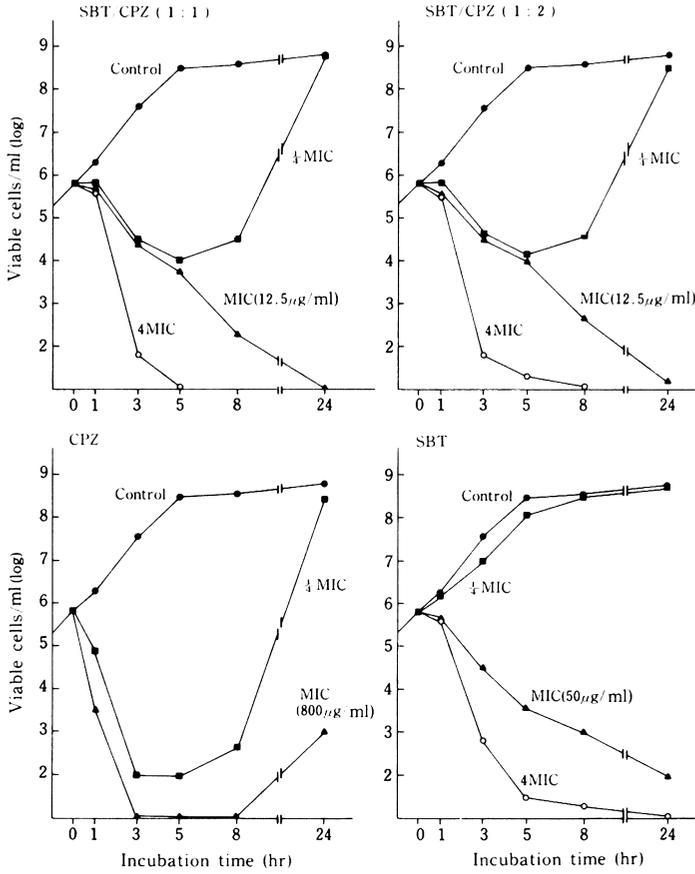


Fig. 3 Development of resistance of *S. aureus* 209-P and *E. coli* NIHJ JC-2 to SBT, CPZ and SBT/CPZ

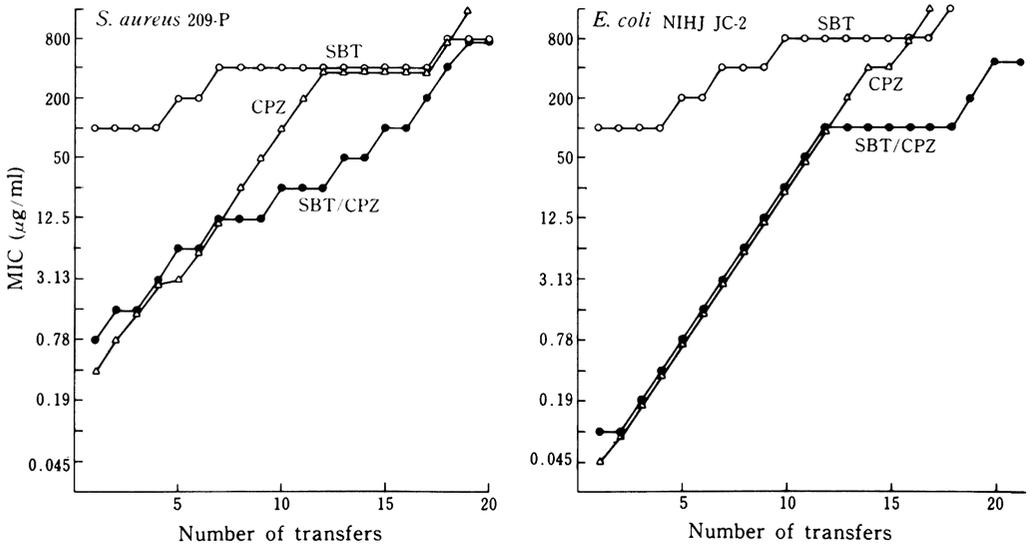


Fig. 4 Effect of combination ratio of SBT to CPZ on MIC against 38 strains of CPZ resistant *E. coli* (10^8 cells/ml)

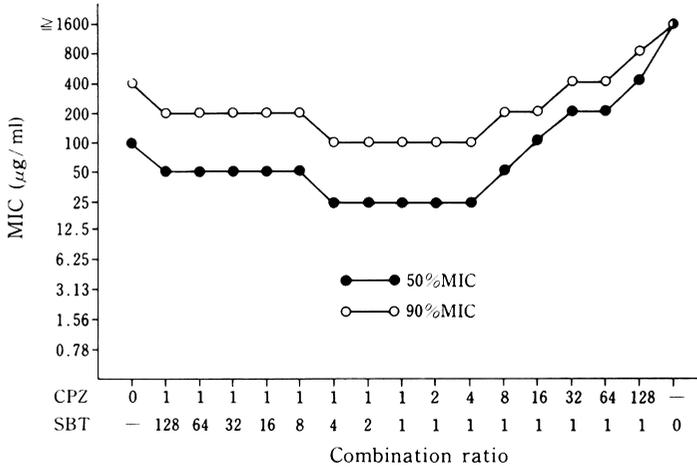


Fig. 5 Effect of combination ratio of SBT to CPZ on MIC against 20 strains of CPZ resistant *K. pneumoniae* (10^8 cells/ml)

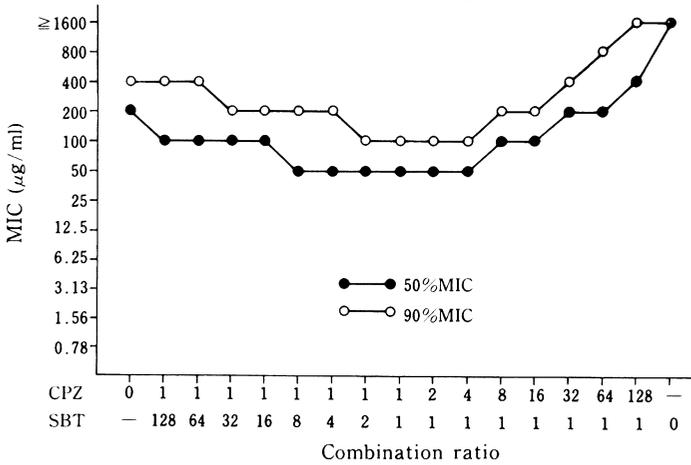


Fig. 6 Effect of combination ratio of SBT to CPZ on MIC against 20 strains of CPZ resistant *P. vulgaris* (10^8 cells/ml)

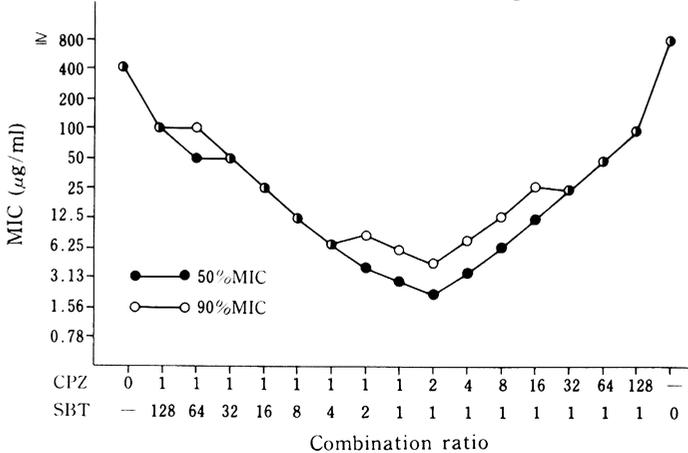


Fig. 7 Effect of combination ratio of SBT to CPZ on MIC against 11 strains of CPZ resistant *P. rettgeri* (10^8 cells/ml)

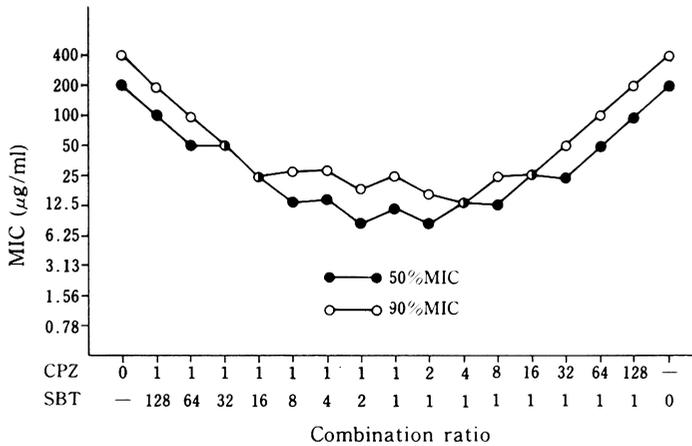
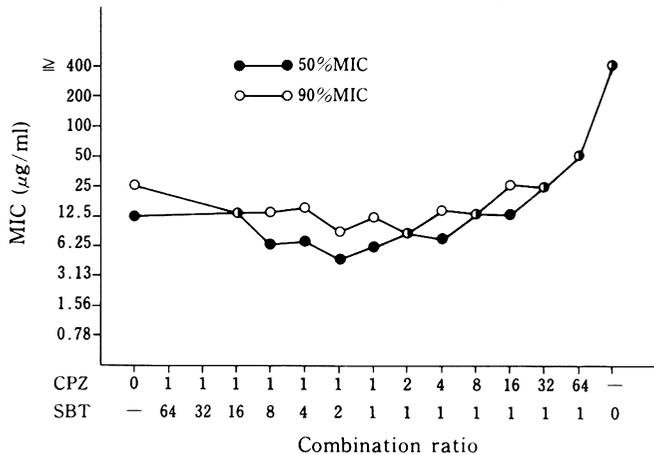


Fig. 8 Effect of combination ratio of SBT to CPZ on MIC against 19 strains of CPZ resistant *B. fragilis* (10^8 cells/ml)



が認められた。

B. fragilis に対して SBT と CPZ は配合比 1 : 8 から 4 : 1 の範囲で最大の抗菌力を示した。

in vivo での至適配合比の検討は、CPZ 耐性 *E. coli* 269, *K. pneumoniae* 76 および *P. vulgaris* 117 を用いてマウス感染実験で行った。SBT と CPZ の配合比を 13 段階に変化させ感染マウスの治療を行い、その結果を ED₅₀ で示した (Fig. 9)。

E. coli 269 感染では SBT を 1 : 8 の比率で併用すると顕著な ED₅₀ の低下が認められ、SBT : CPZ の配合比 1 : 4 から 2 : 1 で最大の抗菌力増強が観察された。

K. pneumoniae 76 感染に対する SBT と CPZ の至適配合比は 1 : 16 から 2 : 1 の範囲にあった。

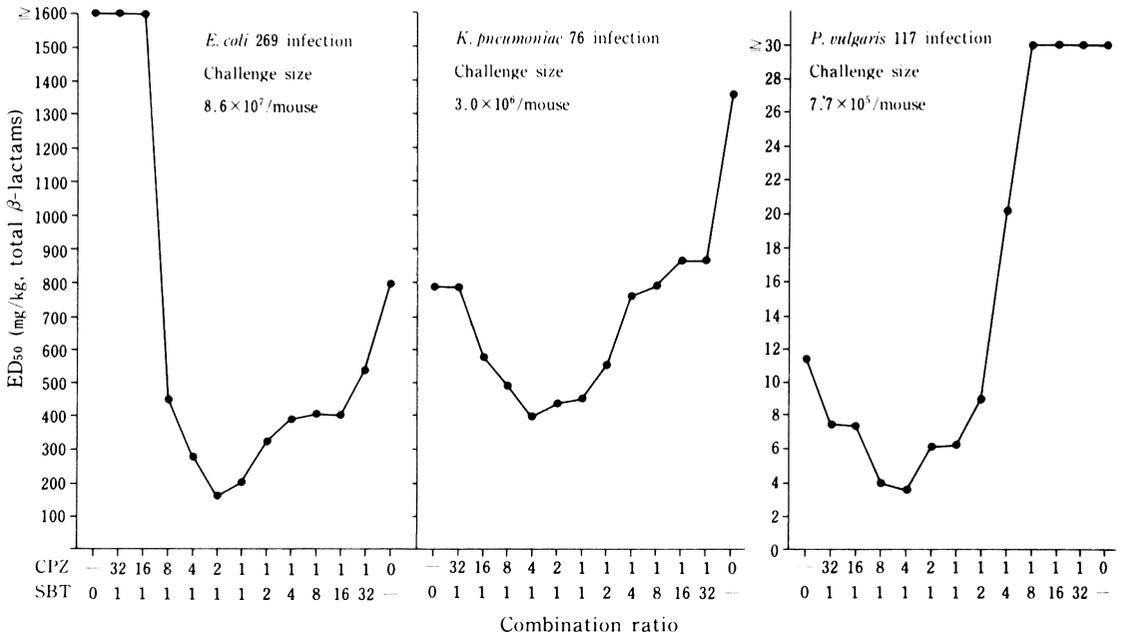
P. vulgaris 117 感染では SBT と CPZ を 1 : 32 から 1 : 1 の範囲の比率で併用したときに最大の抗菌力が認められ、1 : 4 の比率では、CPZ 単独に比べ約 3 倍の抗菌力増強が示された。

8. マウス実験感染に対する治療効果

E. coli 155, *E. coli* 269 および *K. pneumoniae* 76 を用いてマウス攻撃菌量の治療効果に及ぼす影響を検討した。Table 10 に示すように大量菌感染に対する CPZ の治療効果は低く、SBT の併用により著明な効果増強が認められた。少量菌感染においては SBT/CPZ の治療効果は CPZ と同等かまたは僅かに劣った。

CPZ 感受性菌感染に対する治療効果を Table 11 に示した。*E. coli* 3 株および *K. pneumoniae* 2 株に対する SBT/CPZ の ED₅₀ 値は CFX の 1/1 ~ 1/10, CPZ

Fig. 9 Protecting effect of SBT/CPZ in varied ratios against experimental infection in mice



の1~2倍の値を示した。一方、 10^8 cells/ml で MIC 200~400 μ g/ml と CPZ に耐性を示す *P. vulgaris*, *C. freundii* および *S. marcescens* による感染に対しては SBT の併用効果が認められ、SBT/CPZ は CPZ, CFX よりも強い治療効果を示した。

β -lactamase 産生 *P. aeruginosa* 373 感染に対して SBT/CPZ は治療効果を示したが、CPZ, PIPC の効果は認められなかった。

A. calcoaceticus 感染に対しては *in vitro* と同様 SBT の効果をもっとも高かった。

E. coli 269 感染に対して、SBT 500mg/kg および CPZ 500mg/kg を同時にまたは15~180分の時間差において皮下投与したときの両薬物の血中濃度、マウスの生存率を Fig. 10 を示した。

SBT を CPZ と同時にマウスへ皮下投与したとき、測定各時点の SBT:CPZ の血中濃度比は2:1から1:2の範囲にあった。

SBT, CPZ の同時投与では100%の生存率を觀察された。SBT を先行投与し、CPZ の投与を60分まで遅らせても併用効果は同時投与の場合と同様に認められ、マウスの生存率は100%であった。しかし投与間隔を90, 120, 150分と拡大してゆくとマウス生存率は85, 65, 40%と順次低下してゆき、投与間隔180分での生存率30%は SBT

単独投与での生存率27.5%および CPZ 単独投与での生存率20%と大差なかった。無処置群は感染後24時間までに全例死亡した。

III. 考 察

SBT を CPZ に併用すると、CPZ 感受性菌に対する CPZ の抗菌力には影響を与えず、CPZ 耐性菌に対して著しい抗菌力の増強が認められた。

併用による MIC の低下は CPZ 耐性の *Proteus* spp., *B. fragilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* において著明であり、*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, および *Staphylococcus* spp. においても認められた。各菌種で觀察された併用効果の強弱は、各菌種が産生する β -lactamase に対する SBT の親和性⁵⁻⁸⁾ とよく相関し、SBT が β -lactamase を不活化し、CPZ の分解を防ぐ結果、CPZ の抗菌力が増強されるものと考えられる。同様な効果は殺菌力やマウス実験的感染に対する治療効果でも認められた。

SBT と CPZ の配合比の検討の結果、CPZ 耐性株によるマウス感染治療実験で SBT:CPZ が2:1から1:8の範囲で強い協力作用が認められた。SBT/CPZ 2g をヒトに静注した場合、SBT と CPZ の血中濃度比は投与後6時間まで1:2から1:8の範囲にあり、尿中濃度比は投与後12時間まで4:1から1:3の範囲にあ

Table 10 Protective effect of SBT/CPZ against experimental infection in mice

Organism	Antibiotic	Challenge dose (cells/mouse)	MIC: $\mu\text{g/ml}$		ED ₅₀ (mg/kg)	
			Inoculum (cells/ml)			
			10 ⁸	10 ⁶		
<i>E. coli</i> 155	SBT/CPZ (1:1)		50	25	11.7 (7.10-19.2)	
	(1:2)		50	25	10.6 (7.05-15.8)	
	CPZ	9.8 × 10 ⁷ (4.9 MLD) with mucin	>800	25	7.38 (3.92-13.9)	
	SBT		100	100	>50	
	SBT/CPZ (1:1)		50	25	165 (105-260)	
	(1:2)		50	25	143 (98.7-208)	
	CPZ	7.3 × 10 ⁷ (6.1 MLD)	>800	25	>1600	
	SBT		100	100	1030 (611-1750)	
	<i>E. coli</i> 269	SBT/CPZ (1:1)		50	25	14.1 (12.9-26.1)
		(1:2)		100	25	8.75 (5.70-13.4)
CPZ		3.5 × 10 ⁸ (18 MLD) with mucin	>800	50	13.5 (9.00-19.5)	
SBT			200	100	>50	
SBT/CPZ (1:1)			50	25	263 (203-341)	
(1:2)			100	25	188 (107-331)	
CPZ		1.1 × 10 ⁸ (1.8 MLD)	>800	50	>1600	
SBT			200	100	588 (412-837)	
<i>K. pneumoniae</i> 76		SBT/CPZ (1:1)		50	12.5	362 (209-630)
		(1:2)		50	12.5	348 (248-489)
	CPZ	1.8 × 10 ² (18 MLD) with mucin	>800	25	273 (174-428)	
	SBT		100	100	>800	
	SBT/CPZ (1:1)		50	12.5	455 (322-645)	
	(1:2)		50	12.5	440 (310-625)	
	CPZ	1.8 × 10 ⁶ (9 MLD)	>800	25	790 (580-1070)	
	SBT		100	100	1350 (975-1870)	

Numbers in parenthesis indicate 95% confidence limit.

Table 11 Protective effect against experimental infection in mice

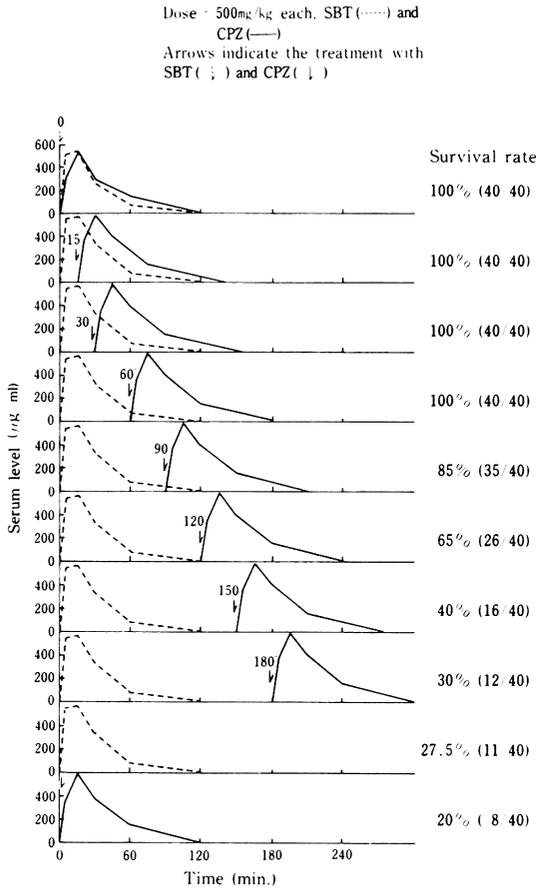
Organism	Antibiotic	Challenge dose (cells/mouse)	MIC: $\mu\text{g/ml}$		ED ₅₀ (mg/kg)
			Inoculum (cells/ml)		
			10 ⁸	10 ⁶	
<i>E. coli</i> 1	SBT/CPZ (1:1)		3.13	0.39	13.0 (10.5-16.4)
	CPZ	3.0 × 10 ³	1.56	0.39	9.60 (5.52-16.8)
	SBT	(27 MLD)	50	25	312 (230-424)
	CFX		3.13	1.56	57.6 (32.8-101)
<i>E. coli</i> 2	SBT/CPZ (1:1)		6.25	1.56	0.643 (0.374-1.06)
	CPZ	6.5 × 10 ⁴	12.5	1.56	0.624 (0.446-0.931)
	SBT	(26 MLD)	50	25	125 (80.2-194)
	CFX		3.13	1.56	3.12 (2.09-4.67)
<i>E. coli</i> 331	SBT/CPZ (1:1)		1.56	0.78	1.20 (0.859-1.68)
	CPZ	2.9 × 10 ⁴	25	0.78	0.624 (0.335-1.16)
	SBT	(430 MLD)	25	25	336 (174-648)
	CFX		3.13	1.56	12.0 (8.11-17.8)
<i>K. pneumoniae</i> 16	SBT/CPZ (1:1)		1.56	0.78	57.6 (33.6-90.7)
	CPZ	3.5 × 10 ²	1.56	0.39	76.8 (42.6-139)
	SBT	(35 MLD)	50	25	>500 154
	CFX		12.5	3.13	154 (87.8-260)
<i>K. pneumoniae</i> 142	SBT/CPZ (1:1)		25	6.25	115 (71.0-186)
	CPZ	7.5 × 10 ⁵	800	6.25	57.6 (30.5-109)
	SBT	(6.8 MLD)	400	50	>500 125
	CFX		50	25	125 (68.6-227)
<i>P. vulgaris</i> 117	SBT/CPZ (1:1)		1.56	0.78	6.0 (3.95-9.12)
	CPZ	7.7 × 10 ⁵	200	0.78	10.8 (0.43-18.1)
	SBT	(14 MLD)	200	200	>1000 12.0
	CFX		25	6.25	12.0 (7.92-18.2)
<i>C. freundii</i> 53	SBT/CPZ (1:1)		6.25	3.13	28.8 (15.3-54.2)
	CPZ	1.1 × 10 ⁷	200	1.56	168 (102-276)
	SBT	(11 MLD)	100	50	422 (264-672)
	CFX		200	100	37.4 (29.6-47.4)
<i>S. marcescens</i> 203	SBT/CPZ (1:1)		25	6.25	37.4 (29.6-47.4)
	CPZ	6.9 × 10 ⁶	400	6.25	166 (94.1-291)
	SBT	(9.2 MLD)	200	200	480 (267-864)
	CFX		50	50	42.2 (25.1-71.0)
<i>P. aeruginosa</i> 373	SBT/CPZ (1:1)		12.5	12.5	400 (257-620)
	CPZ	1.4 × 10 ⁶	100	25	>1000
	SBT	(13 MLD)	400	400	>1000
	PIPC		200	50	>1000
<i>A. calcoaceticus</i> 105	SBT/CPZ (1:1)		3.13	1.56	74.4 (47.6-116)
	CPZ	1.0 × 10 ⁷	100	50	>500
	SBT	(4.2 MLD)	1.56	0.78	46.1 (36.6-58.0)
	CFX		50	25	240 (134-429)

Mouse: ICR strain, male (19 ± 1 g), 10 mice/group

Infection: 5% mucin suspension, i. p.

Numbers in parenthesis indicate 95% confidence limit.

Fig. 10 Therapeutic effect and serum level of SBT and CPZ administered subcutaneously at various time differences in *E. coli*-infected mice



った。⁹⁾ ヒトでの血中および尿中での SBT と CPZ の濃度比は両薬物の相乗効果が期待できる範囲内にあり、SBT/CPZ は CPZ 耐性株にも優れた抗菌力を発揮するものと考えられる。またヒトでは SBT の排泄が早く、投与後の時間経過にしたがい両薬物の組織内濃度差が拡大する傾向がみられる。このような薬物動態においても SBT と CPZ の併用効果が発現することをマウス感染治療実験で確認した。すなわち、SBT の併用効果は CPZ を SBT 投与後 60 分にマウスへ投与した場合でも顕著で、マウス生存率は同時投与に等しかった。CPZ を SBT に 60 分遅れて投与したときのマウス血中 SBT 濃度は CPZ の t_{max} 時には CPZ の 1/10 以下のレベルにすぎず、*in vitro* 同様¹⁰⁾、*in vivo* においても先行投与された

SBT が β -lactamase を永久不活化し、その効果が 60 分以上持続したものと考えられる。したがって臨床的にも一時期 SBT の濃度が一定レベルに達すれば、SBT の β -lactamase 不活化作用が持続し、CPZ の抗菌力を増強することが推測される。

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) 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
- 3) 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
- 4) 加納 弘, 関口金雄, 立松 洋, 下岡新雄, 沖俊一: 微生物学的定量法ならびに GC または GC-MS 法による Sulbactam および Sulbactam/Cefoperazone の定量法。 *Chemotherapy* 32 (S-4): 131~141, 1984
- 5) 横田 健, 東 映子: Ceftizoxime (CZX) の各種 β -lactamase に対する安定性と結合親和性。 *Chemotherapy* 28 (S-5): 38~43, 1980
- 6) 横田 健, 関口玲子, 東 映子, 鈴木映子: Sulbactam の各種 β -lactamase 不活化作用とペニシリン結合蛋白に対する親和性。 *Chemotherapy* 32 (S-4): 11~19, 1984
- 7) FU, K. P. & H. C. NEU: Comparative inhibition of β -lactamase by novel β -lactam compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 171~176, 1978
- 8) ASWAPOKKEE, N. and H. C. NEU: A sulfone β -lactam compound which acts as a β -lactamase inhibitor. *J. Antibiotics* 31: 1238~1244, 1978
- 9) 齊藤 篤, 嶋田甚五郎, 大森雅久, 柴 孝也, 山路武久, 井原裕宣, 北条敏夫, 加地正伸, 三枝幹文, 宮原 正, 上田 泰: Sulbactam の臨床第 1 相試験。 *Chemotherapy* 32 (S-4): 192~201, 1984
- 10) 横田 健, 東 映子, 鈴木映子: Sulbactam と Cefoperazone 剤の各種細菌臨床分離株に対する抗菌力。 *Chemotherapy* 32 (S-4): 1~10, 1984

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SULBACTAM AND SULBACTAM/CEFOPERAZONE

KENJI KAWASAKI, HIROSHI NIIMI and TOSHIKAZU OKI

Biochemistry Laboratory, New Product Research Center, Pfizer Taito Co., Ltd.

NOZOMU KOSAKAI

Department of Clinical Pathology School of Medicine, Juntendo University

and

TOYOKO OGURI

Clinical Laboratories, Juntendo University Hospital

The *in vitro* antibacterial activity of CPZ against bacteria resistant to CPZ was markedly increased by the addition of Sulbactam (SBT), while the antimicrobial activity of SBT was generally weak, except for its powerful activity against species of *N. gonorrhoeae* and *A. calcoaceticus*. The combination of SBT and CPZ in the ratio of 1:1 displayed the marked synergy against β -lactamase-producing strains of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. and *B. fragilis*. This synergetic effect was also observed in other species of *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* and *Staphylococcus* spp..

The degree of synergetic effect of SBT and CPZ against various species was closely related to the affinity of SBT to the β -lactamase produced by the bacterial strains. The bactericidal activity of CPZ was also potentiated by the addition of SBT.

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of various ratios of SBT and CPZ were compared using CPZ-resistant *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. and *B. fragilis*, and the most effective ratio *in vitro* was found to be between 1:4 and 4:1, while the ratio between 1:8 and 2:1 was most effective against experimental infections in mice.

The simultaneous administration of SBT and CPZ to the mice infected with various CPZ-resistant bacteria demonstrated higher survival rate of mice than that by CPZ administration alone, and the administration of SBT 60 min. prior to that of CPZ showed full survival without lowering of the survival rate of mice.