

Sultamicillin の抗菌力及びペニシリン結合蛋白に対する親和性

横田 健・鈴木 映子・吉田 玲子

順天堂大学医学部細菌学教室

Sultamicillin tosilate の基礎的な抗菌力の検討を行った。TEM 型 β -lactamase を産生する *E. coli* を使い、トシル酸は ABPC の抗菌力にも、sulbactam の β -lactamase 不活化力にも影響を与えないと考えられる成績が得られた。Sultamicillin は pH 7 以上の溶液状態では自然解離が速いので、そのまま MIC 測定が可能であった。

Sultamicillin は cephem 耐性 *S. aureus*, ABPC 耐性 *H. influenzae*, *B. fragilis* 等に ABPC, CCL, CEX より優れた抗菌力を示した。R plasmid 保有 *E. coli*, *Klebsiella* 等には、ABPC より抗菌力は強かったが、CCL や CEX より劣っていた。*P. vulgaris*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Serratia* 等にも抗菌域は ABPC より拡大し、その MIC 値は ABPC, CCL, CEX より小さかったが、その抗菌力が中等度にとどまるので、尿路感染等のように高濃度の薬剤移行が考えられる時以外は治療的な期待が少ない。

Sultamicillin は β -lactamase 産生菌も比較的低濃度で形態変化をきたしたが、それは SBT の β -lactamase 不活化作用によるものと考えられる。また菌の PBP に対しては、ABPC より高い親和性を持つという結果は得られなかった。

Sultamicillin は ampicillin (ABPC) と sulbactam (SBT) をエステル結合で一分子化したもののトシル塩である。これを経口投与すると、腸管で吸収される時、粘膜上皮細胞の esterase で分解され、当量の ABPC と SBT にわかれる。各々単独で経口投与した時より高い血中濃度が得られ、mutual pro-drug としての新しい価値を持つほか、遊離した SBT が ABPC 耐性菌の作る各種の β -lactamase を不活化するので、ABPC 非感受性菌にまで抗菌域が拡大される。すなわち、sultamicillin は ABPC の mutual pro-drug と β -lactamase inhibitor の併用効果の二つの面を持つことになる。本報告は sultamicillin の抗菌力を他の内服用 β -lactam 薬剤と比較するとともに、各種細菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する親和性を検討したものである。

I. 材料及び方法

1. Sultamicillin tosilate の抗菌力におけるトシル酸の影響

ABPC と SBT を 1 : 1 モル比で混合した標品を蒸留水に溶かし 125 μ g/ml になるように L-broth¹⁾に加えた。これを 5 倍段階希釈を行い、更に各種濃度の sodium p-toluenesulfonate を添加して *E. coli* CS 2 (RK20) を 1×10^5 /ml になるように接種した。37°C 1 夜振盪培養後、増殖の有無を肉眼で判定して checker board 法

でトシル塩の ABPC-SBT の抗菌力に対する影響を調べた。

2. 各種臨床分離細菌 23~59 株に対する sultamicillin の抗菌力

抗菌力の測定方法は、日本化学療法学会標準法²⁾で行った。すなわち、臨床材料から得られた 23~59 株の各種細菌を L-broth で 37°C 1 夜振盪培養後、M9-buffer³⁾でグラム陽性菌は 100 倍、グラム陰性菌は 1000 倍に希釈し、これを 10^6 CFU/ml の菌浮遊液として、sultamicillin (台糖ファイザー)、ABPC (万有製薬)、cefaclor (CCL) (塩野義製薬) 又は cefalexin (CEX) (塩野義製薬) の種々の濃度を含む Mueller-Hinton agar (Difco) にミクロプランターを用いてスポットし、37°C 24 時間培養後の増殖の有無から判定した。ただし、*S. pneumoniae* 及び β 型 Streptococci では感受性試験に Heart-infusion agar (HI) (栄研) に 5%-ヒツジ脱線維血液を加えたものを、*H. influenzae* には HI 寒天に Fildes extract (Oxoid)²⁾ を 5%に加えたものを、*B. fragilis* には GAM 寒天 (日水) を使用した。なお、*B. fragilis* の嫌気培養にはガスパック法 (BBL) を用いた。なお sultamicillin は酸性では安定であるが、pH 7 以上では比較的速やかに ABPC と SBT に自然解離するので、その抗菌力は特に esterase で処理しなくとも測定可能であ

る。

3. Sultamicillinによる *E. coli* と *P. vulgaris* の細胞形態変化の検討

E. coli CS 2 (RE28) 及び *P. vulgaris* 51を、5 ml の L-broth 中で37℃ 1夜振盪培養した。その0.2ml を37℃に加温した種々の濃度の sultamicillin を含む95 ml の L-broth に接種し、37℃で振盪培養を続け、4時間目に菌をスライドガラス上に塗抹し、クリスタル紫-シュウ酸溶液で染色して顕微鏡像を見た。また、走査電顕の検討には、4時間後の培養液10ml を4℃で遠心集菌し、0.1M phosphate buffer (pH7.0) で洗浄後2% グルタルアルデヒド溶液中で4℃ 2時間固定し、エタノールで脱水後、酢酸イソアミルで置換を行い、臨界点で乾燥し白金パラジウムを蒸着させて HITACHI 450 で観察した。

4. Sultamicillin の各種細菌 PBP に対する結合親和性の検討

E. coli NIHJ JC-2, *Serratia marcescens* 13 及び *Acinetobacter* 5 の膜画分の調製は SPRATT の方法⁴⁾ に準じて行った⁵⁾。膜画分浮遊液 (15mg protein/ml) に0.2~25 μ g/ml の ABPC 又は sultamicillin を加え30℃ 10分間反応させた後、0.1mM ¹⁴C-benzyl penicillin (50 μ ci/ μ mole) : Amersham を加え更に30℃ 10分間反応させた。PBP の acrylamide 平板電気泳動及びその fluorography は前報のとおりに行った⁶⁾。

5. Sultamicillin tosilate と ABPC の大腸菌外膜通過性の比較検討

E. coli NIHJ JC-2 の全菌体に1 μ g/ml の ABPC 又は sultamicillin を30℃ 10分間作用させた後、膜画分を調製し、これに対する ¹⁴C-PCG の競合結合をみた。これと薬剤未処理の菌から得た膜画分を ABPC 又は sultamicillin で前処理し、更に ¹⁴C-PCG を反応させたものとを比較する実験も行った。

II. 成績

1. トシル塩の ABPC+SBT 抗菌力に対する影響

E. coli CS 2 (RK20) は、Fig. 1のとおり ABPC 単独では200 μ g/ml の MIC を示すが、当量の SBT を加えると RK20 の支配する β -lactamase が不活化されるため、ABPC+SBT の MIC は12.5 μ g/ml に低下する。Sodium *p*-toluenesulfonate が0.1~250 μ g/ml 共存しても、ABPC+SBT の抗菌力には全く影響を与えなかった。すなわちトシル塩は ABPC の抗菌力にも SBT の β -lactamase 不活化力にも全く影響を与えないことが明らかになった。

2. 臨床分離株に対する sultamicillin の抗菌力

Sultamicillin はその中に約2/3の ABPC を含むので、*S. aureus* に対する MIC 累積百分率をみると、Fig. 2のとおり感受性株では含まれる ABPC の量に相当し、若干 ABPC 単独よりも MIC が大きくなるが、耐性株では解離した SBT がこの菌の penicillinase (PCase) を不活化するので、MIC が小さくなる。CCL や CEX より sultamicillin の *S. aureus* に対する抗菌力は、はるかに強い。近年臨床的に重要視されつつある methicillin-cephem-resistant *S. aureus* (MRSA) (Fig. 3) に対しても CCL や ABPC より強い抗菌力を示すが、この種の菌株は作用点の変化による耐性株が多いので、sultamicillin の抗菌力も中等度にとどまる。*S. epidermidis* 29株に対しては、*S. aureus* 同様、感受性株で ABPC 単独より若干劣り、耐性株では ABPC より抗菌力が強い (Fig. 4)。*S. pneumoniae* では Fig. 5のとおり、 β -lactamase 産生による耐性株はないので、sultamicillin に含まれる ABPC の量的な関係から、sultamicillin の抗菌力は ABPC 単独よりも若干悪くなる。しかし、全株0.1 μ g/ml 以下で増殖が抑えられ、CCL や CEX よりもはるかに抗菌力は強い。B 群連鎖球菌を含む β 型 Streptococci でも同様に、ABPC と共に強い抗菌力を示した (Fig. 6)。

50株の臨床分離 *E. coli* に対しては、CEX より劣るものの ABPC 単独よりも明らかに高い抗菌力を示した (Fig. 7)。また、Fig. 8のとおり *E. coli* CS 2 に51種類の R plasmid を伝達したものについても、ABPC がほとんど高度耐性を示すのに対し、sultamicillin はある程度の増殖阻止力を示したが、CCL や CEX には劣った。Fig. 9のとおり47株の *K. pneumoniae* に対しても、CCL、CEX に劣り、ABPC に優る力を示した。*P. vulgaris* の産生する Ic 型 β -lactamase は SBT でよく不活化されるので、sultamicillin は Fig. 10のとおり、他の3剤よりも強い抗菌力を示す。*P.morganii* に対しても同様であるが、Fig. 11のとおりその力は中等度にとどまる。*P. rettgeri* についても Fig. 12のとおり同様である。*P. mirabilis* は例外的に β -lactamase 産生株が少なく、Fig. 13のとおり半数以上 ABPC 感受性であるが、耐性株では sultamicillin の方が ABPC より抗菌力が強い。*E. cloacae*、*C. freundii* 及び *Serratia* には SBT がこれらの菌の作る Ia 型 β -lactamase を弱いながら不活化するので、Fig. 14、15及び16に示すとおり、他の3剤より抗菌力が強い。しかし、その範囲は6.25 μ g/ml から100 μ g/ml にわたり、中等度の抗菌力である。

P. aeruginosa には Fig. 17のとおり他の3剤より sultamicillin はやや強い抗菌力がみられるが、MIC100 $\mu\text{g/ml}$ 以上となり臨床的には期待できない。Sultamicillin 中の SBT は、*Acinetobacter* や *Neisseria* には例外的にそれ自身で強い抗菌力を示す。Fig. 18のとおり49株の *Acinetobacter* の90%が6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の sultamicillin で増殖が阻止された。

H. influenzae には、近年 ABPC 耐性株が見られ、臨床分離株の10~20%に達するという。ABPC 耐性 *H. influenzae* に対しても sultamicillin は CCL や CEX より強い抗菌力を持つことが Fig. 19から明らかである。

嫌気性菌の *B. fragilis* は、cephem 系抗生物質に耐性株が多い。Sultamicillin はそれに含まれる SBT がこの菌の β -lactamase を強く不活化するため、CCL や

CEX よりはもちろん、ABPC よりかはるかに抗菌力が強い (Fig. 20)。

3. Sultamicillin による *P. vulgaris* 及び *E. coli* の細胞形態の変化

Fig. 21のとおり、*P. vulgaris* 51はIc型 β -lactamase を作り、ABPC 単独に対する MIC は200 $\mu\text{g/ml}$ で、その存在下で培養した菌も若干フィラメント化するにすぎない。SBT は単独でこの菌に対し100 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、その存在下では菌のフィラメント化と溶菌が認められる。両者を含む sultamicillin は、SBT が β -lactamase を不活化するために、MIC が6.25 $\mu\text{g/ml}$ となりその存在下で明らかな溶菌が認められた。電顕像で調べると Fig. 22のとおり、すでに1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/4MIC) でも細胞壁が疎となり一部バルジ形成が認められる。

Fig. 1 Influence of sodium *p*-toluenesulfonate on the antibacterial activity of sultamicillin

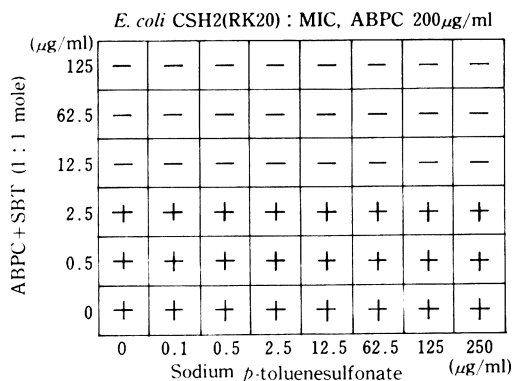


Fig. 3 Sensitivity distribution of 59 clinical isolates of methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

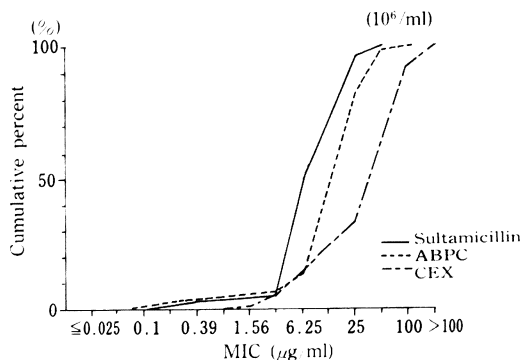


Fig. 2 Sensitivity distribution of 48 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

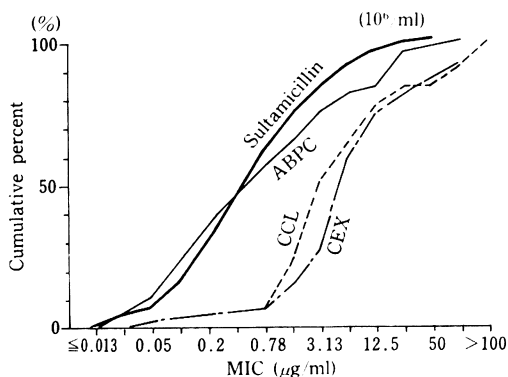


Fig. 4 Sensitivity distribution of 29 clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*

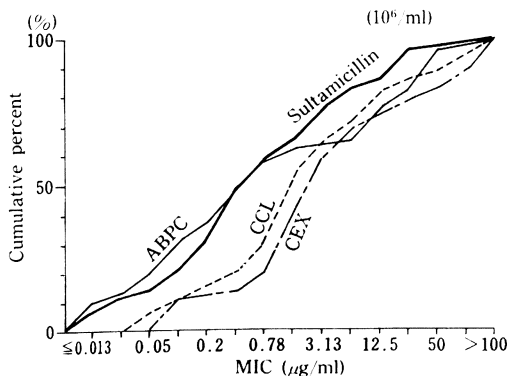


Fig. 5 Sensitivity distribution of 23 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*

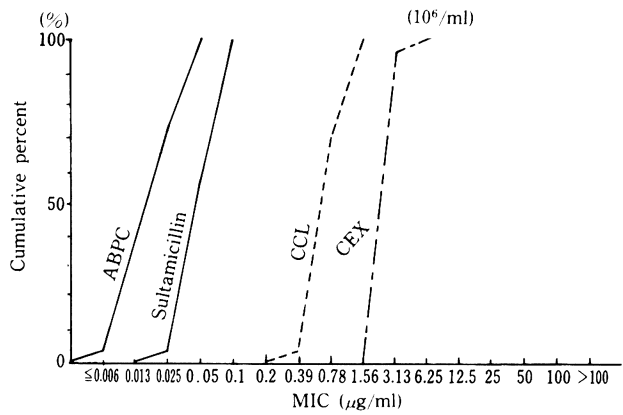


Fig. 6 Sensitivity distribution of 24 clinical isolates of β -haemolytic streptococci

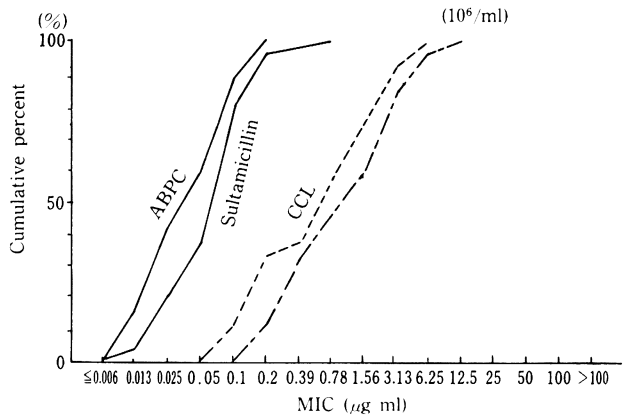


Fig. 7 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *Escherichia coli*

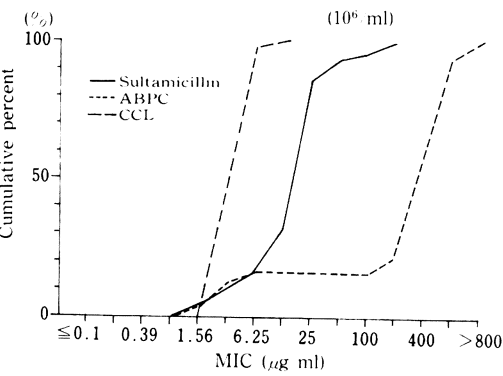


Fig. 8 Sensitivity distribution of 51 substrains carrying various R(bla) plasmids of *Escherichia coli* CS2

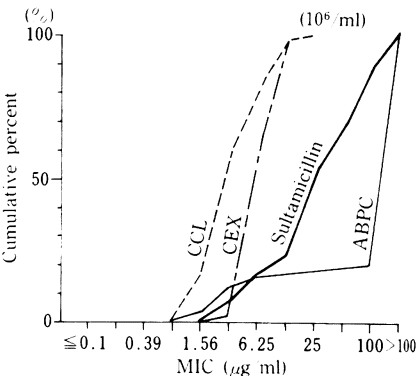


Fig. 9 Sensitivity distribution of 47 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

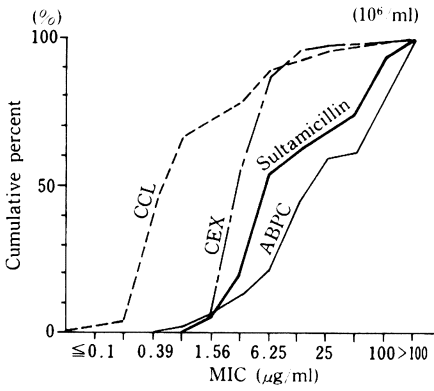


Fig. 10 Sensitivity distribution of 42 clinical isolates of *Proteus vulgaris*

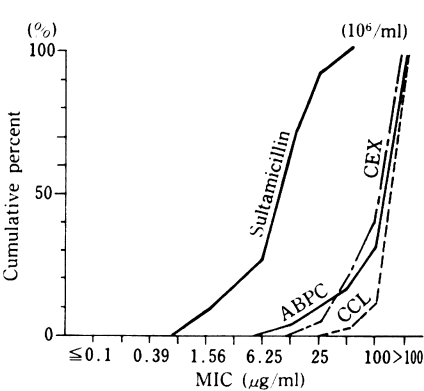


Fig. 11 Sensitivity distribution of 54 clinical isolates of *Proteus morganii*

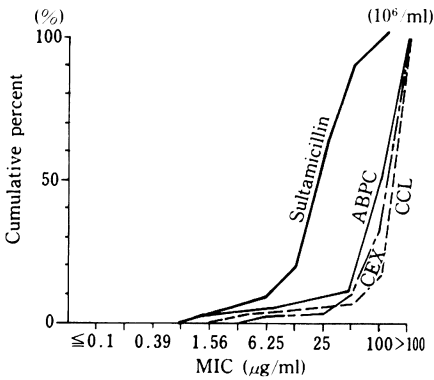


Fig. 12 Sensitivity distribution of 29 clinical isolates of *Proteus rettgeri*

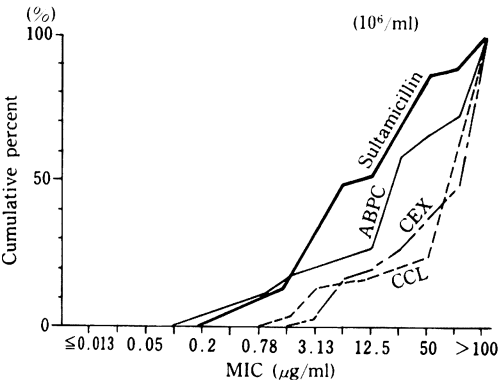


Fig. 13 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *Proteus mirabilis*

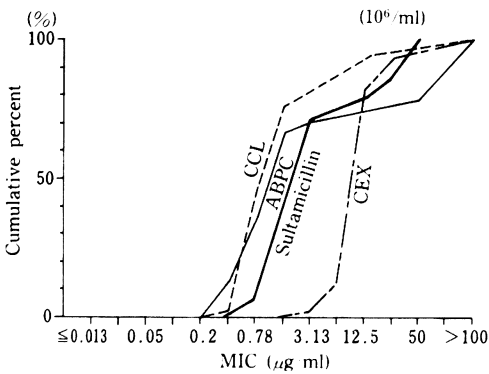


Fig. 14 Sensitivity distribution of 43 clinical isolates of *Enterobacter cloacae*

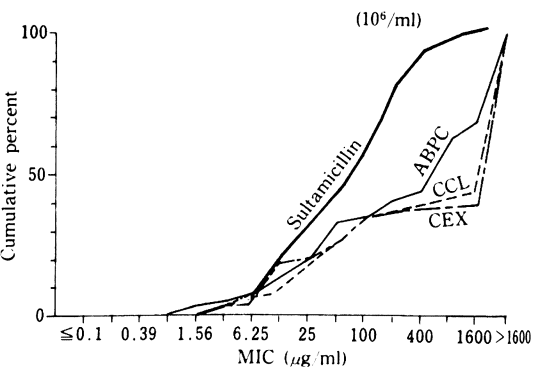


Fig. 15 Sensitivity distribution of 48 clinical isolates of *Citrobacter freundii*

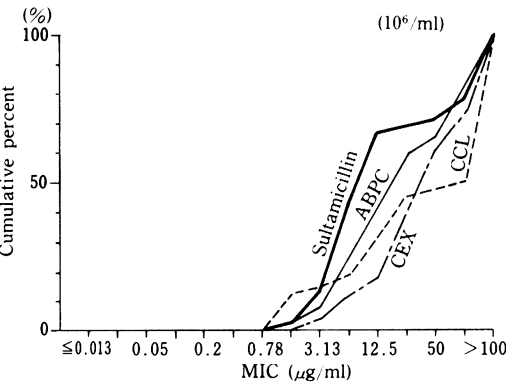


Fig. 16 Sensitivity distribution of 48 clinical isolates of *Serratia marcescens*

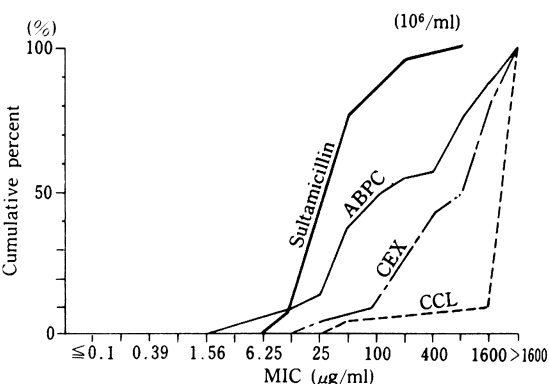


Fig. 17 Sensitivity distribution of 49 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

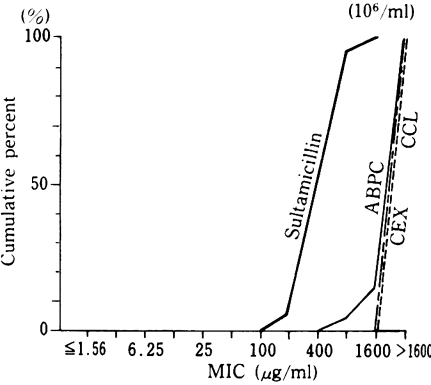


Fig. 18 Sensitivity distribution of 49 clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*

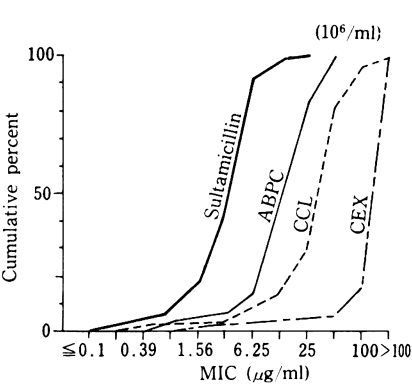


Fig. 19 Sensitivity distribution of 24 ampicillin-resistant clinical isolates of *Haemophilus influenzae*

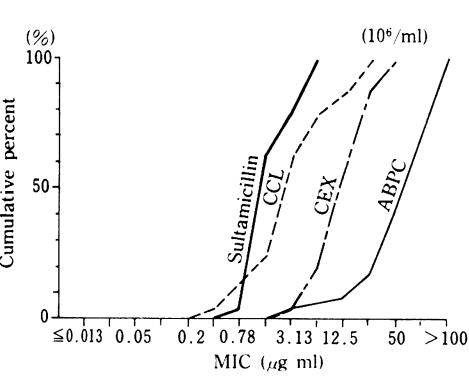


Fig. 20 Sensitivity distribution of 54 clinical isolates of *Bacteroides fragilis*

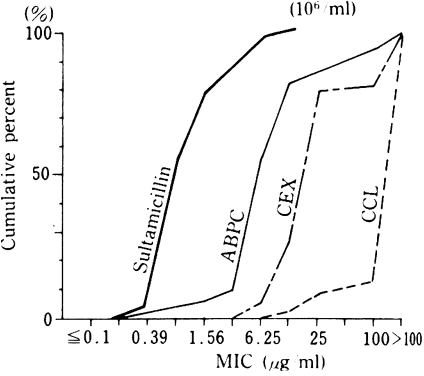


Fig. 21 Light-microscopy or cells of *Proteus vulgaris* 51 grown in L-broth containing and not containing various amounts of sultamicillin, ABPC or SBT at 37°C for 4 hrs

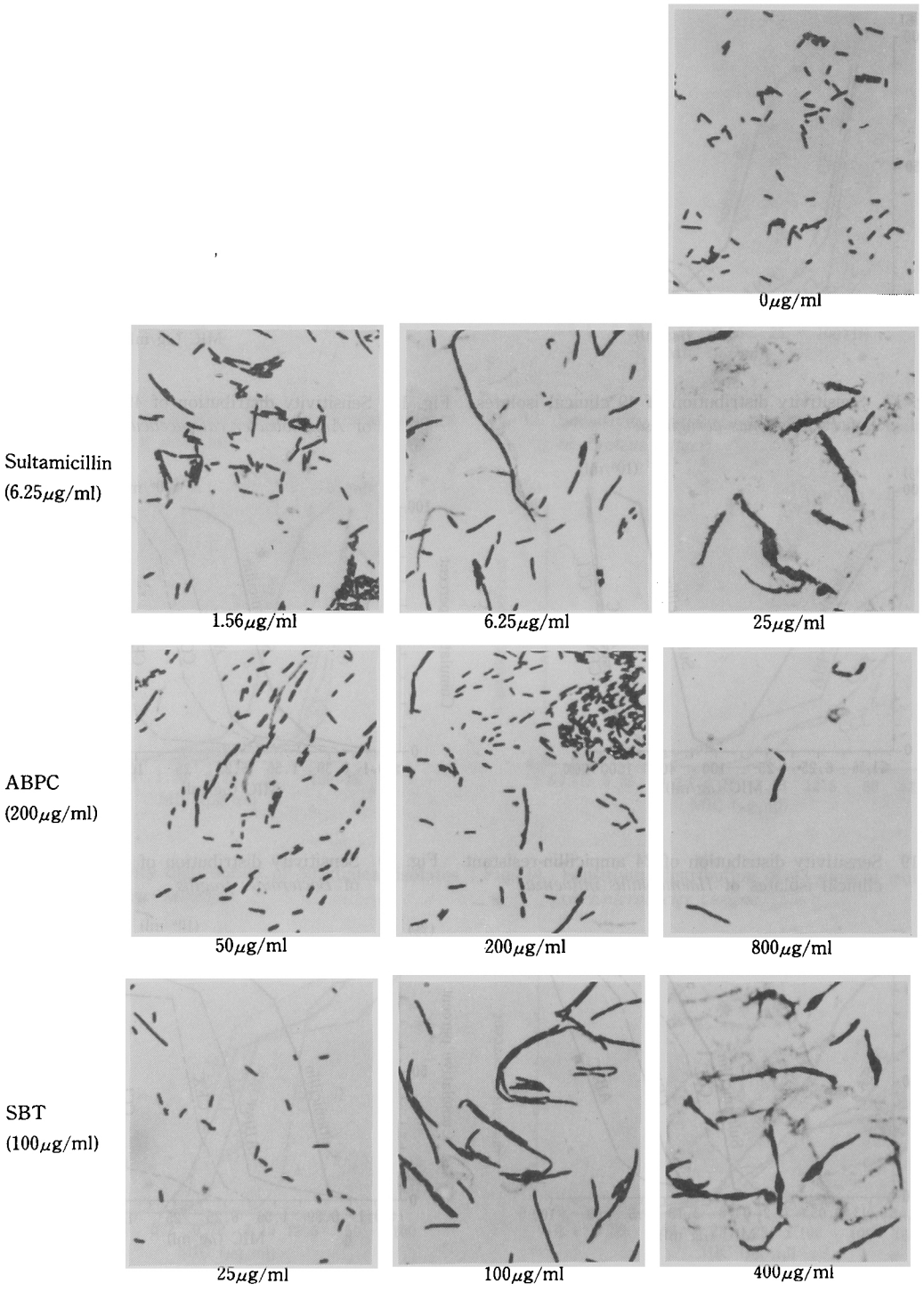


Fig. 22 Scanning electronmicroscopy of cells of *Proteus vulgaris* 51 grown in L-broth containing and not containing various amounts of sultamicillin, ABPC or SBT

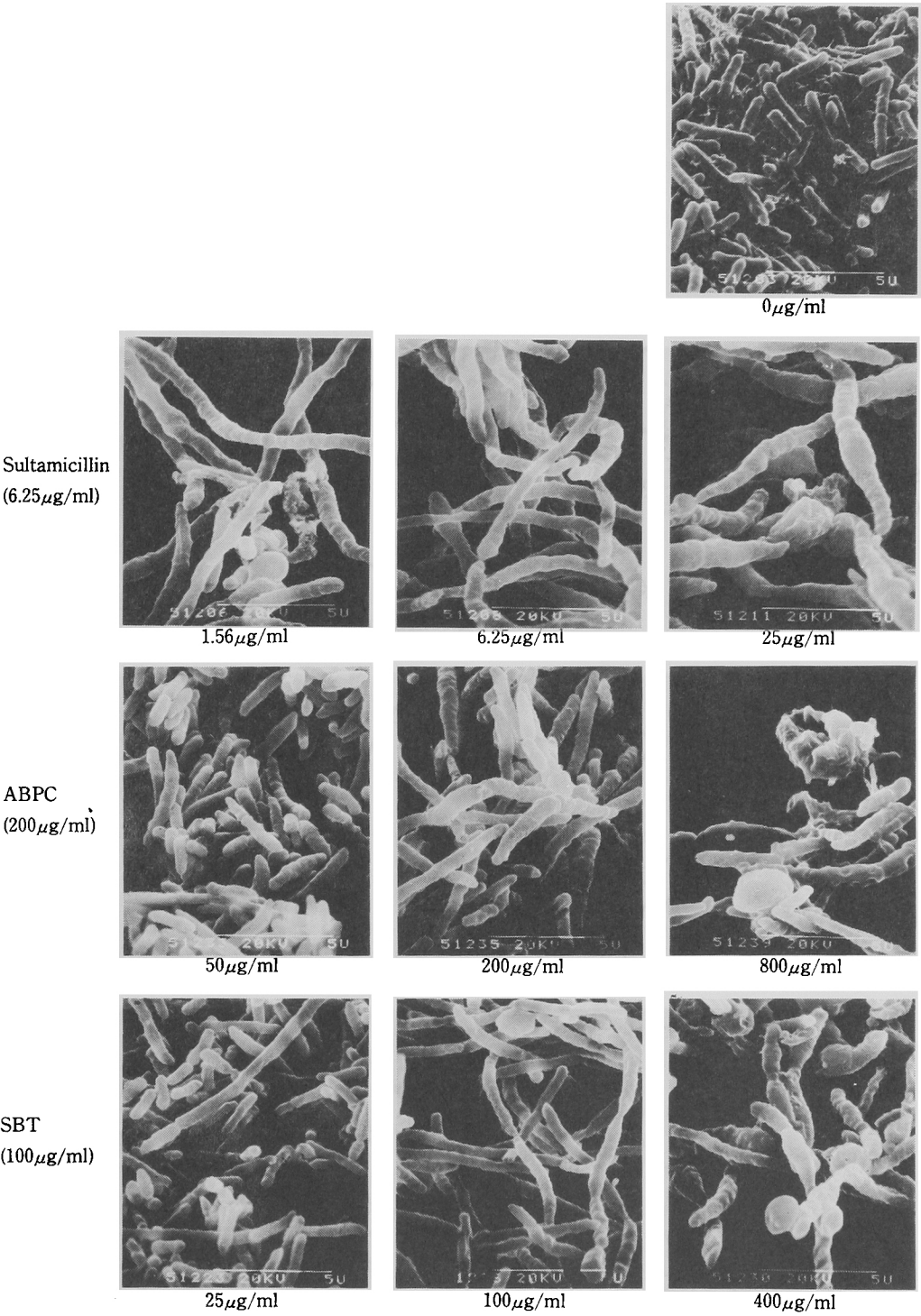


Fig. 23 Light-microscopy of cells of *Escherichia coli* carrying RE28 (bla) plasmid and grown in L-broth containing and not containing various amounts of sultamicillin, ABPC or SBT at 37°C for 4 hrs

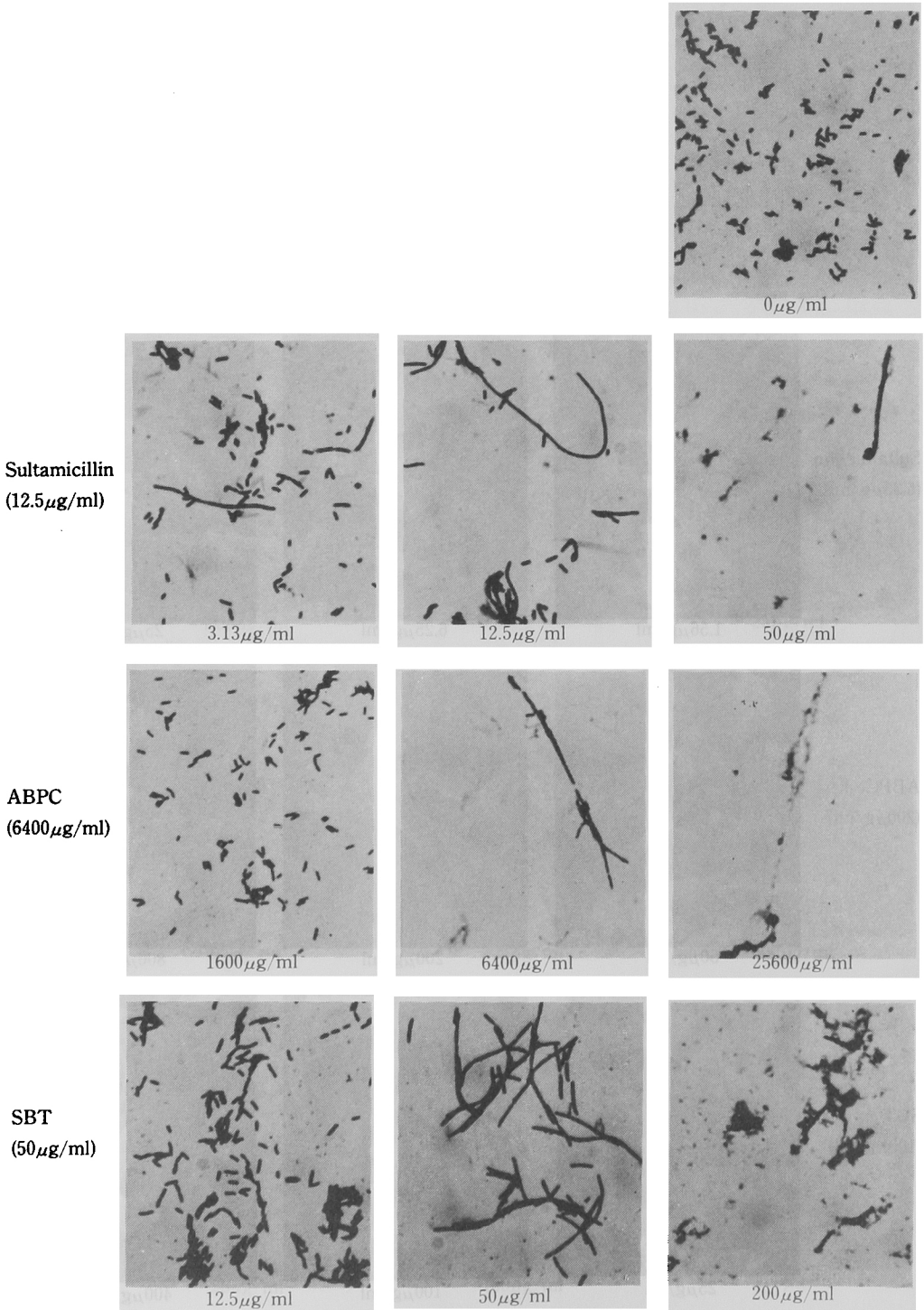
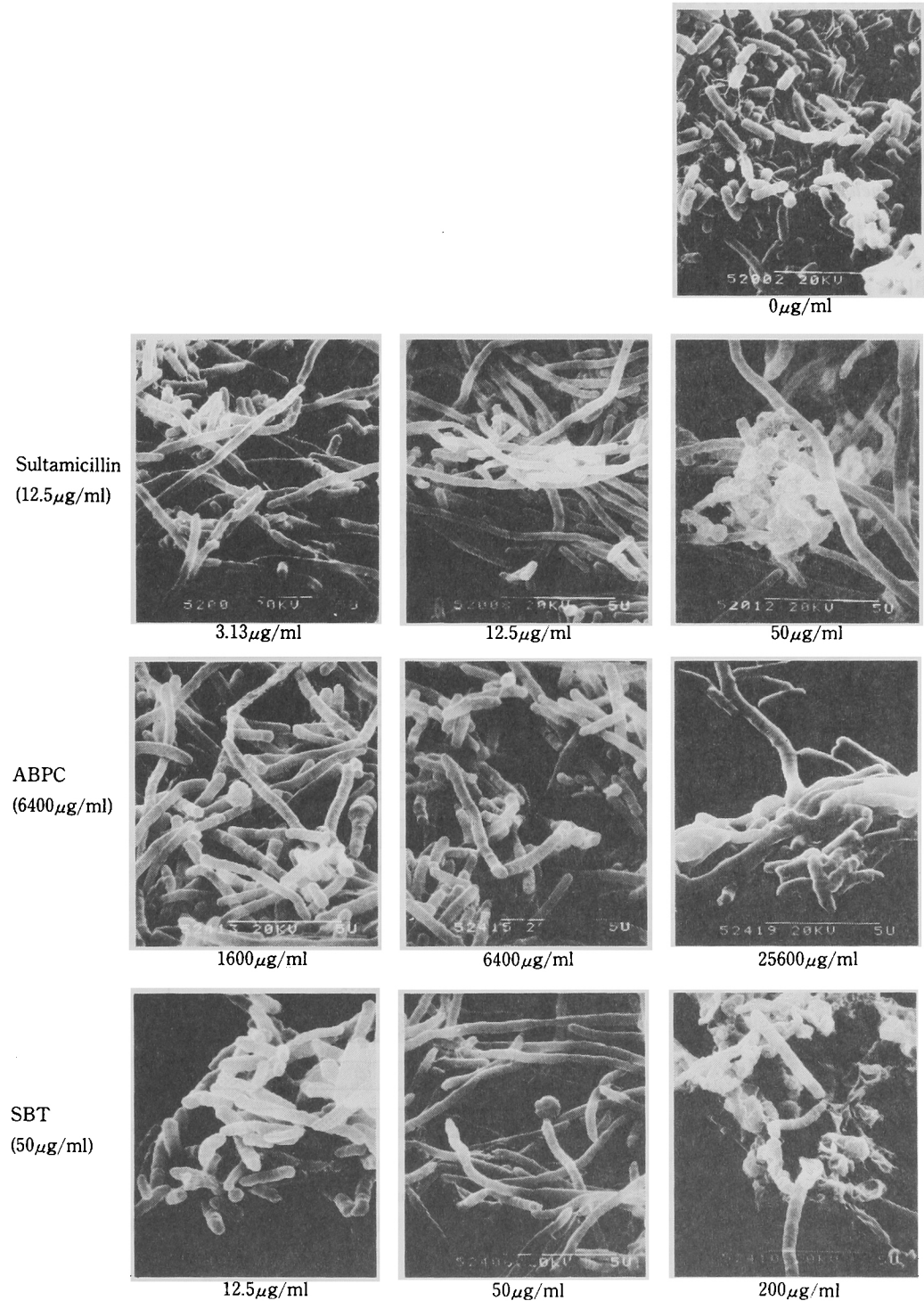


Fig. 24 Scanning electronmicroscopy of cells of *Escherichia coli* carrying RE28 (bla) plasmid and grown in L-broth containing and not containing various amounts of sultamicillin, ABPC or SBT



TEM 型 β -lactamase を支配する RE28 保有の *E. coli* CS 2 (RE28) は、Fig. 23 のとおり、ABPC 単独では $6400 \mu\text{g/ml}$ の MIC であるが、SBT 単独では $50 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示す。両者を含む sultamicillin は $\text{MIC } 12.5 \mu\text{g/ml}$ となり $50 \mu\text{g/ml}$ (4 MIC) では著明な溶菌像が見られるのは Fig. 24 のとおりである。これらの詳細な変化をグラフ化したのが Fig. 25 である。

4. 各種細菌 PBP に対する sultamicillin の影響

Fig. 26, 27, 28 のとおり、*E. coli* でも *S. marcescens* でも *Acinetobacter* でも、単離した膜画分で未処理の sultamicillin と ^{14}C -PCG の競合結合を行うと、ABPC 単独よりも結合親和性が低いことがわかる。Sultamicillin 中に含まれる ABPC の絶対量の少ないことを考慮してもなお結合親和性が低いので、反応液中での sultamicillin の ABPC と SBT への自然解離が不十分な

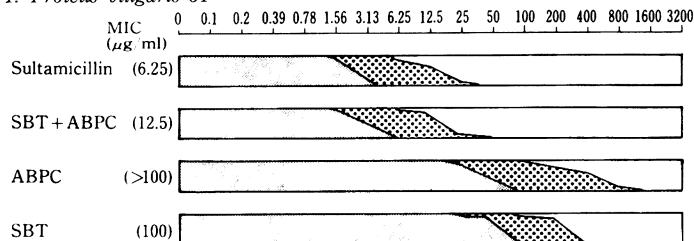
めであろう。Fig. 29 でみると全菌体では sultamicillin でも ABPC でも、ほぼ同程度の PBP への親和性が認められた。この場合には実験操作中にある程度以上の時間を要するので、解離が十分行われたためと考えられる。

III. 考 察

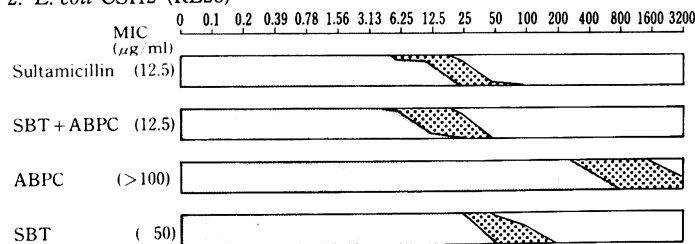
実験の結果から、ABPC と SBT がエステル結合で一分子化した sultamicillin tosylate は、トシル酸が ABPC の抗菌力にも SBT の β -lactamase 不活化力にも全く影響しないので、mutual pro-drug として経口後腸管から吸収され、ABPC と SBT に遊離後は ABPC の抗菌力に SBT の β -lactamase 不活化効果を反映した抗菌力を示すことが明らかになった。SBT は PCase 型と Ic 型 β -lactamase を強く、その他の cephalosporinase (CEPase) 型 β -lactamase を弱いながら不活化するので、sultamicillin は ABPC 耐性 *S. aureus* や、

Fig. 25 Representative diagram of morphological changes in cells of *Proteus vulgaris* 51 and *Escherichia coli* CSH2 carrying RE28 (bla) plasmid, which were grown in the presence or absence of various amounts of sultamicillin, ABPC or SBT

1. *Proteus vulgaris* 51



2. *E. coli* CSH2 (RE28)



□ normal

▨ filamentous

▨ lysed

Fig. 26 Competition of sultamicillin and ABPC for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2

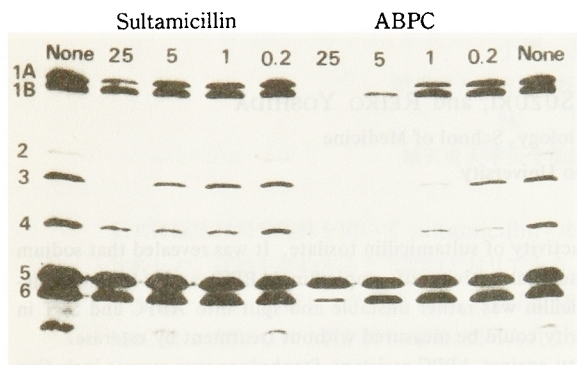


Fig. 27 Competition of sultamicillin and ABPC for penicillin-binding proteins of *Serratia marcescens* 13

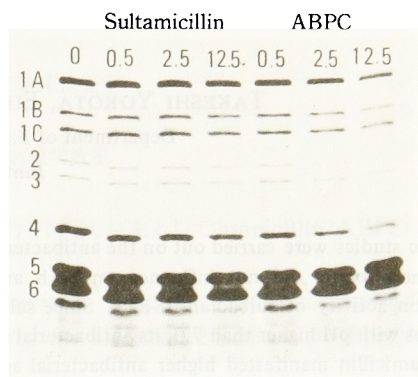


Fig. 28 Competition of sultamicillin and ABPC for penicillin-binding proteins of *Acinetobacter calcoaceticus* 5

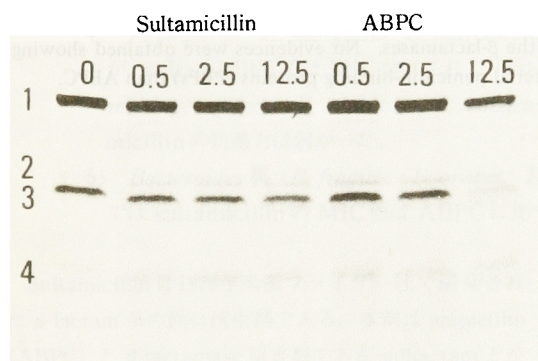
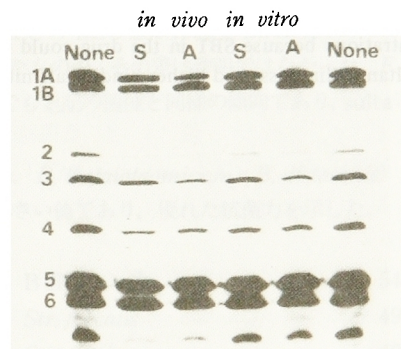


Fig. 29 Competition of sultamicillin and ABPC for penicillin-binding proteins in the whole cells (*in vivo*) of *Escherichia coli* NIHJ JC-2



A ; ABPC S ; Sultamicillin 1 μ g/ml

R(bla) plasmid 保有 *E. coli* 等に ABPC の抗菌力が期待できるようになるほか、CEPase 産生弱毒グラム陰性桿菌まである程度抗菌域が拡大する。後者の効果はそれほど強いものではないので、組織濃度の低いところでは臨床効果の期待が少ないであろうが、高い尿中濃度が得られる尿路感染等では弱毒菌に対する効果も考えられるかもしれない。これらの基礎的研究結果が、実際の臨床にどのように影響するか興味深い。

文 献

- 1) LENNOX, E. S. : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1 : 190~206, 1955
- 2) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 3) CLOWES, R. C. and W. HAYS : Experiments in

microbial genetics. p.187, JOHN WILEY and SONS, Inc., New York. 1968

- 4) SPRATT, R. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* k12. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 72 : 2999~3003, 1975
- 5) 横田 健, 関口 玲子, 鈴木 映子 : Ceftriaxone (Ro13-9904) の β -lactamase に対する安定性, ペニシリン結合タンパク質に対する親和性, および補体ならびにマクロファージとの協力的殺菌作用. *Chemotherapy* 32 (S-7) : 16~21, 1984
- 6) 横田 健, 関口 玲子 : Ceftizoxime (CZX) の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合タンパク質に対する親和性と殺菌力の関係. *Chemotherapy* 28 (S-5) : 44~49, 1980

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SULTAMICILLIN AND ITS AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS OF VARIOUS BACTERIA

TAKESHI YOKOTA, EIKO SUZUKI, and REIKO YOSHIDA

Department of Bacteriology, School of Medicine
Juntendo University

Basic studies were carried out on the antibacterial activity of sultamicillin tosylate. It was revealed that sodium *p*-toluenesulfonate did not influence on both antibacterial activity of ampicillin (ABPC) and β -lactamase inactivation activity of sulbactam (SBT). Since sultamicillin was rather unstable and split into ABPC and SBT in solutions with pH higher than 7.0, its antibacterial activity could be measured without treatment by esterase.

Sultamicillin manifested higher antibacterial activity against ABPC resistant *Staphylococcus aureus* including MRSA, ABPC-resistant *Haemophilus influenzae*, and *Bacteroides fragilis* than ABPC, cefaclor (CCL), and cephalexin (CEX), although it was inferior to CCL and CEX against *Escherichia coli* carrying R (bla) plasmids and *Klebsiella* spp. The antibacterial spectrum of sultamicillin was confirmed to expand to *Proteus vulgaris*, *P.morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* to which ABPC, CCL, and CEX could not work, the MICs of sultamicillin to those bacteria, however, were rather high.

Sultamicillin induced morphological changes of cells of β -lactamase producing *P. vulgaris* and *E. coli* at low concentrations because SBT in the drug could inactivate the β -lactamases. No evidences were obtained showing that sultamicillin possessed higher binding affinities to bacterial penicillin-binding proteins (PBPs) than ABPC.