

Sultamicillin の *in vitro* 抗菌作用について

大槻 雅子・小泉 恭子・富永 博子・西野 武志・谷野 輝雄  
京都薬科大学微生物学教室

$\beta$ -lactamase inhibitor である sulbactam (SBT) と ampicillin (ABPC) をエステル結合した sultamicillin の *in vitro* 抗菌作用について検討を行った。

標準株を用いた sultamicillin の抗菌スペクトラムは ABPC 同様グラム陽性、陰性菌と巾広く認められたが、ABPC 耐性菌にも優れた抗菌力を示した。また、 $\beta$ -lactamase 産生の臨床分離 *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *M. Morganii* にも優れた抗菌力を示した。

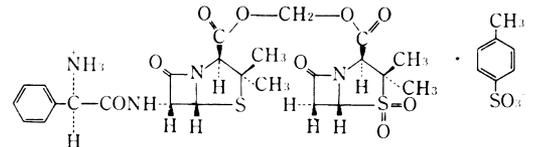
Checkerboard titration method により SBT と ABPC 間の協力作用について検討を行ったところ、 $\beta$ -lactamase 産生菌に対して著明な協力作用を認めた。

$\beta$ -lactamase 産生 ABPC 耐性菌に対して sultamicillin は殺菌作用を示し、*E. coli* を用いた形態変化の観察でも ABPC 耐性菌には sultamicillin が低濃度で菌体の伸長化、スフェロプラスト形成、溶菌をひき起こすことを認めた。

Sulbactam は1977年米国 Pfizer 社において開発された  $\beta$ -lactamase inhibitor である<sup>1,2,3)</sup> が、それ自体では抗菌剤としての有用性は少ない。しかし、各種の細菌が産生する penicillinase 型  $\beta$ -lactamase を不可逆的に不活化することが知られている<sup>4,5)</sup>。また、sulbactam はヒトでの経口投与時の吸収が悪く、経口剤としては用いることができない。一方、ampicillin は内服可能な広域 penicillin であるが、各種 penicillinase によって加水分解を受け、これらの酵素を産生する細菌には無効であった。しかし、ampicillin と  $\beta$ -lactamase 阻害剤である sulbactam の併用により、これら ampicillin 耐性菌に対して抗菌力を示すことが報告され<sup>4,5)</sup>、その有用性が期待されていた。

Sultamicillin は1979年、米国 Pfizer 社で新たに開発された半合成経口  $\beta$ -lactam 抗生剤で、 $\beta$ -lactamase 阻害剤である sulbactam と ampicillin をエステル結合により同一分子中に当量ずつ含有している。本物質は安定性を増すためにトシル酸塩が使用され、化学名を hydroxymethyl (+)-(2S, 5R, 6R)-6-(1-(R)-(2-amino-2-phenylacetamido))-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate, (2S, 5R)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate (ester)S, S-dioxide *p*-toluenesulfonate dihydrate といひ、分子式  $C_{25}H_{30}N_4O_9S_2 \cdot C_7H_8O_3 \cdot 2H_2O$ 、分子量802.88の白色ないし、類白色の結晶性粉末であり、その構造式は Fig. 1 に示すとおりである。本剤は経口投与により腸管から吸収され、腸壁のエステラ

Fig. 1 Chemical structure of Sultamicillin tosilate



ーゼにより加水分解され、生体内では ampicillin, sulbactam として作用するため、ampicillin 耐性菌に対して抗菌力が增強され、抗菌スペクトラムも拡大されると報告されている<sup>6)</sup>。

今回、われわれは sultamicillin の抗菌力について ampicillin, sulbactam, cefaclor を比較薬として *in vitro* で検討を行い、以下の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

Sultamicillin tosilate (sultamicillin; 690  $\mu$ g/mg), ampicillin (ABPC; 830  $\mu$ g/mg), sulbactam (SBT; 890  $\mu$ g/mg), cefaclor (CCL; 960.6  $\mu$ g/mg) を用いた。ただし sultamicillin tosilate は水に難溶なため、またエステル結合を加水分解するため dimethyl sulfoxide を用いて溶解、希釈した。

#### 2. 使用菌株

抗菌スペクトラムの検討には教室保存の標準のグラム陽性およびグラム陰性の好気性、通性嫌気性および嫌気性菌計61株を用いた。感受性分布の測定には  $\beta$ -lacta-

mase 産生の臨床分離の *S. aureus* 19株, *E. coli* 11株, *K. pneumoniae* 10株, *P. vulgaris* 4株, *M. morgani* 3株を用いた。その他の実験には目的に応じ上記菌株より選択して用いた。

### 3. 薬剤感受性測定法

日本化学療法学会感受性測定法<sup>7)</sup>に従い、前培養に tryptose broth (TSB; ニッスイ), 測定用培地に heart infusion agar (HIA; ニッスイ) 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。なお、*Streptococcus* 属, *Corynebacterium diphtheriae* については10%馬脱繊維血加 HIA を用いた。*Neisseria* 属においては1%の割合で supplement (栄研) を加えた gonococcus medium (GC; 栄研) を用い、37°C 48時間ローソク培養後に MIC を求めた。また、嫌気性菌は GAM agar (ニッスイ) を用い、anaerobic system model 1024 (Forma Scientific) 中 CO<sub>2</sub> 10%, H<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 80% の混合ガス存在下で37°C 24時間嫌気培養を行った。

### 4. $\beta$ -lactamase 産生の確認

$\beta$ -lactamase 産生能の有無は PCG と 0.1% Bromocresol purple を含ませた acidmetry disk と chromogenic cephalosporin を含ませた chromogenic ce-

phalosporin disk を用い定性的に確認した。

### 5. 併用効果の検討

ABPC と SBT の併用効果の検討は HIA を用いた checkerboard titration method により行い、これらの結果より minimum FIC index を求めた。

### 6. 殺菌作用の検討

$\beta$ -lactamase 産生の ABPC 耐性菌を用いた。これらの株の TSB 一夜培養菌を HIB で希釈し、37°C で振とう培養を行い、対数増殖期 (約  $10^7$  cells/ml) に種々の濃度の薬剤を作用させ、以後経時的に生菌数を測定した。

### 7. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬を含ませた HIA のフィルム寒天培地を作製し、一方対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天にかぶせ、回りをパラフィンで封じた。この標本を37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡 (Nikon) により観察した。

## II. 実験結果

### 1. 抗菌スペクトラム

Sultamicillin, ABPC, SBT, CCL の抗菌スペクトラムを Table 1~6 に示した。Table 1, 3, 5 は  $10^8$  cells/ml, Table 2, 4, 6 は  $10^6$  cells/ml 接種時の成績である。SBT は *Neisseria* 属を除き  $25\mu\text{g/ml}$  以上の

Table 1 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL

Gram-positive bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.39	0.10	>100	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.20	0.10	>100	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	1.56	0.39	>100	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.39	0.10	>100	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.39	0.10	>100	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PC <sup>r</sup> )	12.5	>100	>100	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.78	0.39	>100	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.05	0.012	100	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.10	0.025	100	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.05	0.012	100	0.20
<i>Streptococcus faecalis</i>	6.25	3.13	>100	>100
Viridans group <i>Streptococcus</i>	6.25	3.13	>100	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.05	0.025	50	0.78
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	0.05	0.025	50	0.78
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	0.05	0.025	50	0.78
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.006	0.003	100	0.025
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.05	0.025	100	0.20
<i>Bacillus anthracis</i>	0.012	0.012	50	0.78
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.56	0.39	50	0.78

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

Table 2 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL  
Gram-positive bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.10	0.05	100	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.10	0.05	100	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	1.56	0.39	>100	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.20	0.05	>100	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.10	0.05	100	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PC <sup>r</sup> )	3.13	6.25	100	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.78	0.20	>100	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.05	0.012	50	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.05	0.025	100	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.05	0.012	50	0.20
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.56	0.78	>100	25
Viridans group <i>Streptococcus</i>	3.13	0.78	>100	50
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0.025	0.012	50	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	0.025	0.012	50	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	0.025	0.012	50	0.39
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	$\leq 0.003$	$\leq 0.003$	50	$\leq 0.003$
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.006	$\leq 0.003$	25	0.10
<i>Bacillus anthracis</i>	0.012	0.006	50	0.20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.78	0.20	50	0.78

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

MICを示し、抗菌力は弱かった。SultamicillinはABPCとほぼ同等で、CCLとほぼ同等かそれよりも優れた抗菌力を示し、ABPC耐性の *S. aureus*, *C. freundii*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, 嫌気性菌の *Bacteroides* 属にも抗菌力を有していた。

## 2. Checkerboard titration methodによる協力作用の検討

ABPCとSBT間の併用効果を checkerboard titration methodにより検討した結果を Fig. 2~22に示した。使用菌株は *S. aureus* 209-P JC株を除き産生量に差はあるが全て  $\beta$ -lactamase 産生株であり、いずれも  $10^8$  cells/ml 接種時の成績である。

### a) *S. aureus* の場合

$\beta$ -lactamase を産生する *S. aureus* S-18, *S. aureus* S-54, *S. aureus* 0297, *S. aureus* L-2 および  $\beta$ -lactamase 非産生の *S. aureus* 209-P JC株の成績は Fig. 2~6で、 $\beta$ -lactamase 非産生株では協力作用はほとんど認められなかったが、 $\beta$ -lactamase 産生株では両剤の併用により著しい協力作用が認められた。

### b) *E. coli* の場合

$\beta$ -lactamase 低産生の *E. coli* NIH JC-2, *E. coli* 32, 高産生の *E. coli* 33, *E. coli* 106, *E. coli* 113,

*E. coli* 127, *E. coli* 133での成績を Fig. 7~13に示した。 $\beta$ -lactamase 低産生株、高産生株いずれの菌株を用いても両剤間に協力作用を認めることができた。

### c) *K. pneumoniae* の場合

$\beta$ -lactamase 低産生の *K. pneumoniae* 121, *K. pneumoniae* 182, 高産生の *K. pneumoniae* NCTC 9632, *K. pneumoniae* 129, *K. pneumoniae* 200を用いて併用効果を検討した成績が Fig. 14~18である。いずれの場合も両剤の併用により協力作用が見られたが、図に示すように  $\beta$ -lactamase 高産生株では低産生株に比べ、より強力な協力作用が認められた。

### d) *P. vulgaris* の場合

$\beta$ -lactamase 低産生の *P. vulgaris* 109, *P. vulgaris* 115における成績を Fig. 19, 20に示した。2株とも  $\beta$ -lactamase 低産生株であるが、両剤の併用により、著しい協力作用が認められた。

### e) *M. morgani* の場合

$\beta$ -lactamase 低産生の *M. morgani* 101, 高産生の *M. morgani* 110を用いて検討した成績が Fig. 21, 22である。いずれの菌株においても同様な協力作用が認められた。

上記の結果より minimum FIC index を算出した

Table 3 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL

Gram-negative bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.10	0.05	0.39	0.10
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.10	0.05	0.78	3.13
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	12.5	6.25	50	25
<i>Escherichia coli</i> NIH	12.5	6.25	50	12.5
<i>Escherichia coli</i> K-12	6.25	1.56	50	6.25
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	50	>100	50	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.39	0.20	>100	1.58
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.39	0.20	50	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	0.20	>100	3.13
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.78	0.20	>100	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.56	0.39	50	1.56
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	6.25	3.13	50	25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	6.25	1.56	50	12.5
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	3.13	50	12.5
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	3.13	1.56	25	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	1.56	0.78	50	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	12.5	50	100	3.13
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12.5	12.5	50	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	>100	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	50	25	50	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	100	100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	6.25	>100	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	0.39	100	6.25
<i>Morganella morganii</i> KONO	50	>100	>100	>100
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	25	12.5	100	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	100	12.5	100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ATCC 13637	>100	>100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 12552	>100	>100	>100	>100

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

Table 4 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL

Gram-negative bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.10	0.05	0.39	0.05
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.10	0.05	0.39	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	12.5	6.25	25	3.13
<i>Escherichia coli</i> NIH	6.25	3.13	50	1.56
<i>Escherichia coli</i> K-12	3.13	1.56	50	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	25	25	50	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.39	0.10	>100	0.39
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.39	0.20	25	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	0.10	>100	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.39	0.20	50	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.56	0.20	25	0.39
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	3.13	1.56	25	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	1.56	25	0.78
<i>Shigella boydii</i> EW-28	3.13	3.13	50	1.56
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	0.78	25	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	1.56	0.39	50	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	6.25	12.5	50	0.78
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6.25	6.25	50	6.25
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	>100	>100	>100	>100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	25	12.5	25	50
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	100	50	100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	3.13	12.5	100	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	0.39	50	3.13
<i>Morganella morganii</i> KONO	25	50	>100	>100
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	0.20	0.05	100	1.56
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	50	12.5	50	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ATCC 13637	>100	>100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 12552	>100	>100	>100	>100

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

Table 5 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL

Anaerobic bacteria ( $10^8$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Clostridium tetani</i>	1.56	0.39	50	6.25
<i>Clostridium perfringens</i>	3.13	0.39	200	3.13
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.20	0.20	25	6.25
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	3.13	12.5	50	200
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	3.13	12.5	12.5	400
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	50	>400	200	>400
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	6.25	200	25	>400
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	6.25	200	25	>400
<i>Bacteroides distasonis</i> Clin-99-3	50	200	25	>400
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	3.13	12.5	25	400
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	3.13	25	25	400

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

Table 6 Antibacterial spectrum of Sultamicillin, ABPC, SBT, and CCL

Anaerobic bacteria ( $10^6$  cells/ml)

Organisms	Sultamicillin	ABPC	SBT	CCL
<i>Clostridium tetani</i>	0.10	0.025	50	1.56
<i>Clostridium perfringens</i>	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	25	0.05
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.20	0.012	25	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	1.56	6.25	12.5	100
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.78	6.25	12.5	200
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	6.25	200	12.5	>400
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	6.25	100	12.5	>400
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	3.13	200	12.5	>400
<i>Bacteroides distasonis</i> Clin-99-3	25	100	12.5	>400
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	1.56	6.25	12.5	50
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	3.13	12.5	12.5	200

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





Fig. 14 Combination effect of ABPC and SBT on *K. pneumoniae* NCTC 9632

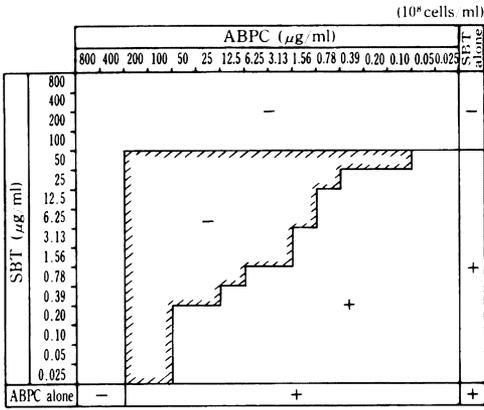


Fig. 15 Combination effect of ABPC and SBT on *K. pneumoniae* 121

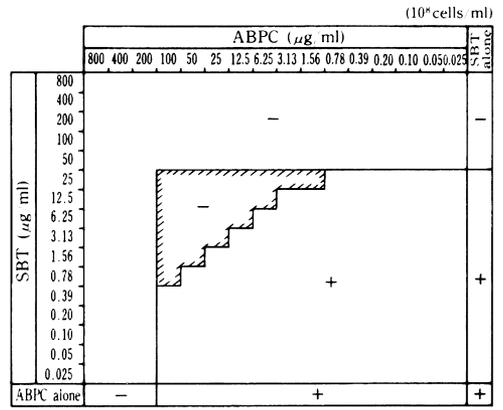


Fig. 16 Combination effect of ABPC and SBT on *K. pneumoniae* 129

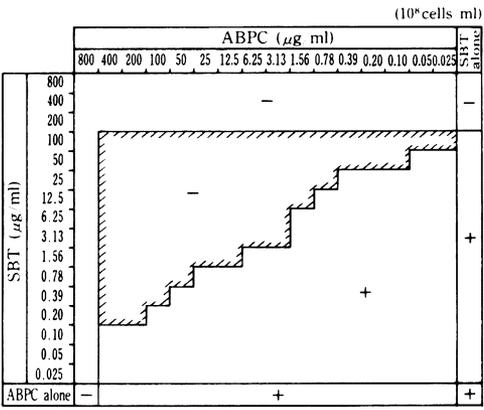


Fig. 17 Combination effect of ABPC and SBT on *K. pneumoniae* 182

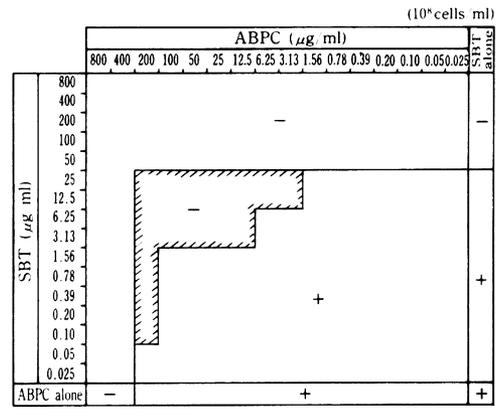


Fig. 18 Combination effect of ABPC and SBT on *K. pneumoniae* 200

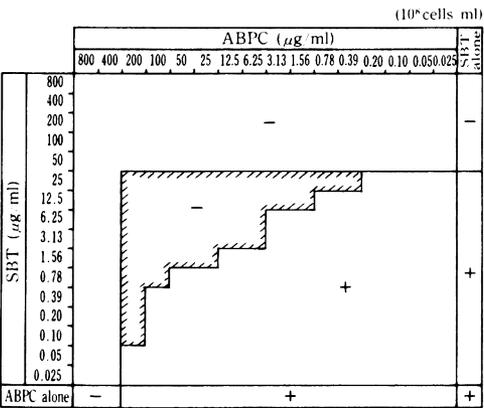


Fig. 19 Combination effect of ABPC and SBT on *P. vulgaris* 109

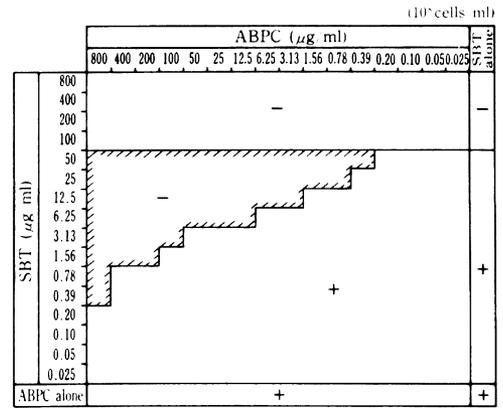


Fig. 20 Combination effect of ABPC and SBT on *P. vulgaris* 115

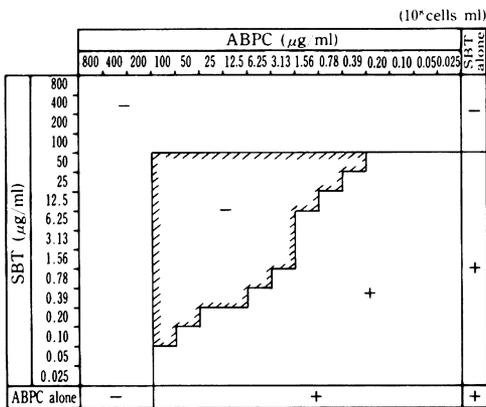


Fig. 21 Combination effect of ABPC and SBT on *M. morgani* 101

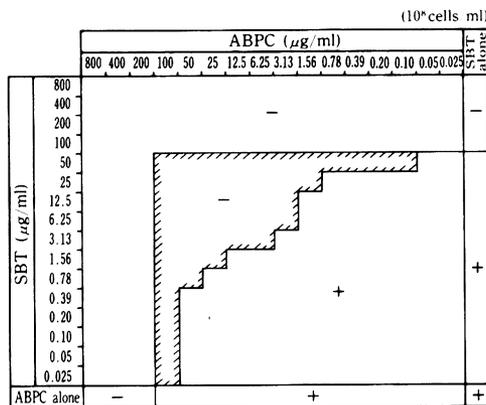
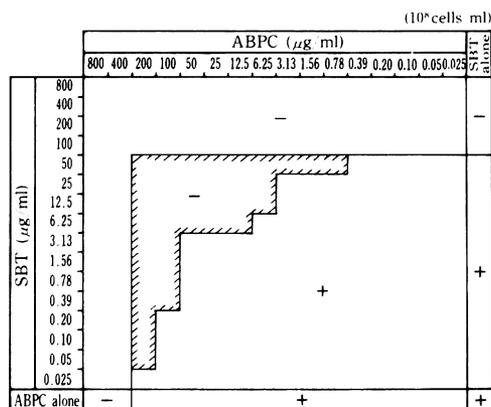


Fig. 22 Combination effect of ABPC and SBT on *M. morgani* 110



結果を Table 7 に示した。 *S. aureus* の場合を除き、ABPC と SBT の比率が 1 : 1 から 16 : 1 のときに min. FIC index が得られた。またその値は *S. aureus* 209-P JC および、 *E. coli* 113 を除いて 0.5 以下であり、ABPC と SBT 間に著明な協力作用が存在することがわかった。

### 3. $\beta$ -lactamase 産生臨床分離株に対する感受性分布および感受性相関

臨床分離の  $\beta$ -lactamase 産生 *S. aureus* 19 株、 *E. coli* 11 株、 *K. pneumoniae* 10 株、 *P. vulgaris* 4 株、 *M. morgani* 3 株に対する sultamicillin, ABPC, SBT, CCL の感受性および感受性相関を検討した結果を Fig. 23, 24 に示した。 Fig. 23 は  $10^8$  cells/ml 接種時の成績で MIC 値の小さい部分では CCL の感受性が良好であったが、MIC 値が大きくなると sultamicillin の感受性が

Table 7 Calculation of min. FIC index

Organisms	Min. FIC index	Mixed ratio ABPC:SBT
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0.500	1:1000
<i>S. aureus</i> S-18	0.093	1:2
<i>S. aureus</i> S-54	0.012	16:1
<i>S. aureus</i> 0297	0.039	1:8
<i>S. aureus</i> L-2	0.016	1:2
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0.313	2:1
<i>E. coli</i> 32	0.188	8:1
<i>E. coli</i> 33	0.250	16:1
<i>E. coli</i> 106	0.188	8:1
<i>E. coli</i> 113	0.563	2:1
<i>E. coli</i> 127	0.250	16:1
<i>E. coli</i> 133	0.266	1:1
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632	0.023	2:1
<i>K. pneumoniae</i> 121	0.188	8:1
	0.188	2:1
<i>K. pneumoniae</i> 129	0.020	1:1
<i>K. pneumoniae</i> 182	0.094	4:1
<i>K. pneumoniae</i> 200	0.019	2:1
<i>P. vulgaris</i> 109	0.070	2:1
<i>P. vulgaris</i> 115	0.032	2:1
<i>M. morgani</i> 101	0.062	2:1
<i>M. morgani</i> 110	0.094	2:1

Fig. 23 Sensitivity distribution of clinical isolates.

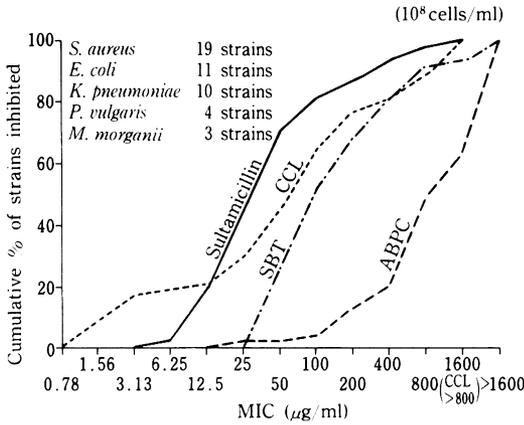
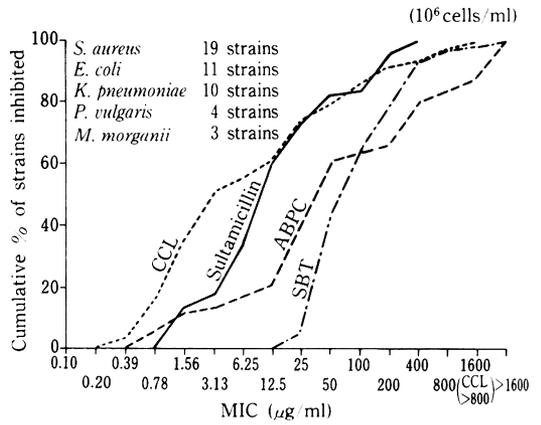
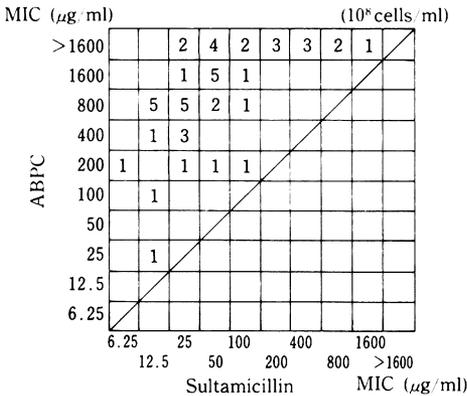


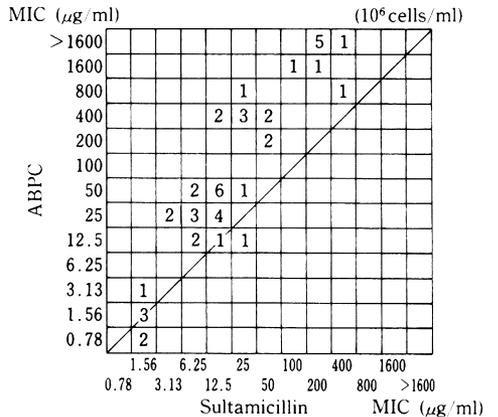
Fig. 24 Sensitivity distribution of clinical isolates



Cross sensitivity of Sultamicillin and ABPC



Cross sensitivity of Sultamicillin and ABPC



最も良く、次いで CCL, SBT, ABPC の順に感受性が良好であった。Fig. 24 の 10<sup>6</sup> cells/ml 接種では ABPC の感性化が認められ、10<sup>8</sup> cells/ml 接種では sultamicillin と ABPC の間で認められなかった相関性が一部で認められた。

4. 殺菌作用

β-lactamase を産生する *S. aureus* S-18, *E. coli* 33, *K. pneumoniae* 129, *K. pneumoniae* 200, *P. vulgaris* 109 を用いて殺菌作用を検討した成績が Fig. 25~29 である。Sultamicillin は MIC に相当する濃度を作用させると静菌的あるいは殺菌的な作用を示し、SBT も類似した作用を示した。Sultamicillin は ABPC 耐性菌に対して殺菌的な作用を示すことが認められた。また、sultamicillin 中の ABPC, SBT の含量を考慮すれば、

ABPC, SBT 単独よりも sultamicillin は強い殺菌作用を有しており、両剤による協力作用を認めた。

5. 位相差顕微鏡による観察

薬剤作用 2 時間目における *E. coli* の形態変化を位相差顕微鏡を用いて観察した結果を Fig. 30~35 に示した。Fig. 30~32 は ABPC 感受性の *E. coli* K-12 の形態変化を示している。ABPC 作用では 1.56 μg/ml で菌体の伸長化、スフェロプラスト形成、一部に溶菌像が観察され、6.25 μg/ml では菌体はあまり伸長化せずスフェロプラストを形成しているのが観察できた。SBT 作用では 25 μg/ml 以上の濃度で菌体の伸長化がみられ、100 μg/ml では溶菌像が観察できた。一方、sultamicillin 作用では 3.13 μg/ml で菌体の伸長化とスフェロプラスト形成が認められた。

Fig. 25 Effect of Sultamicillin, ABPC and SBT on viability of *S. aureus* S-18

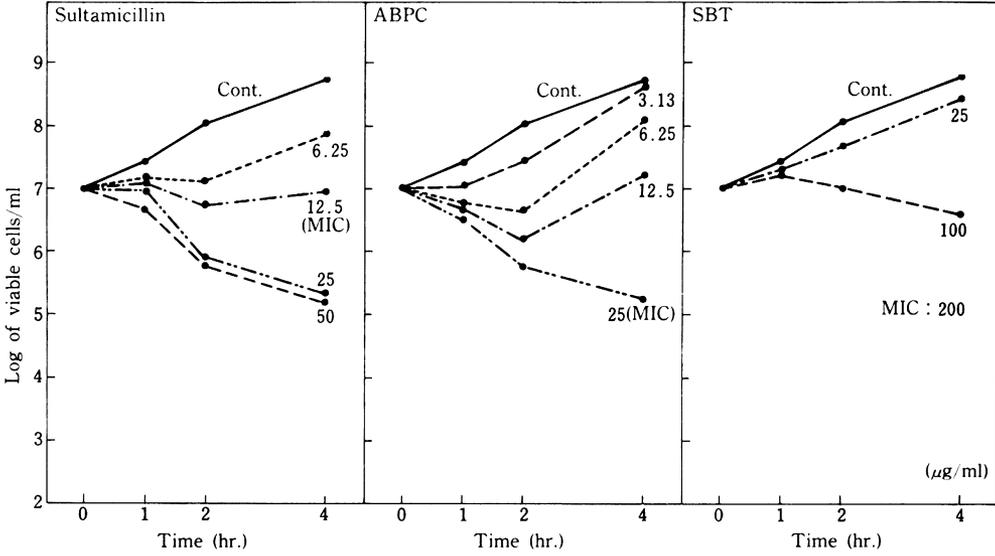


Fig. 26 Effect of Sultamicillin, ABPC and SBT on viability of *E. coli* 33

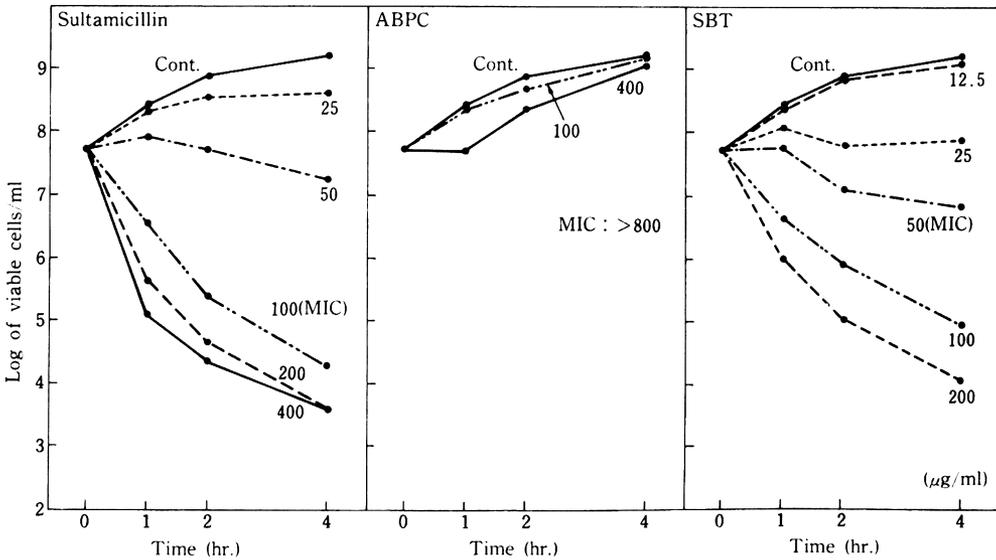


Fig. 27 Effect of Sultamicillin, ABPC and SBT on viability of *K. pneumoniae* 129

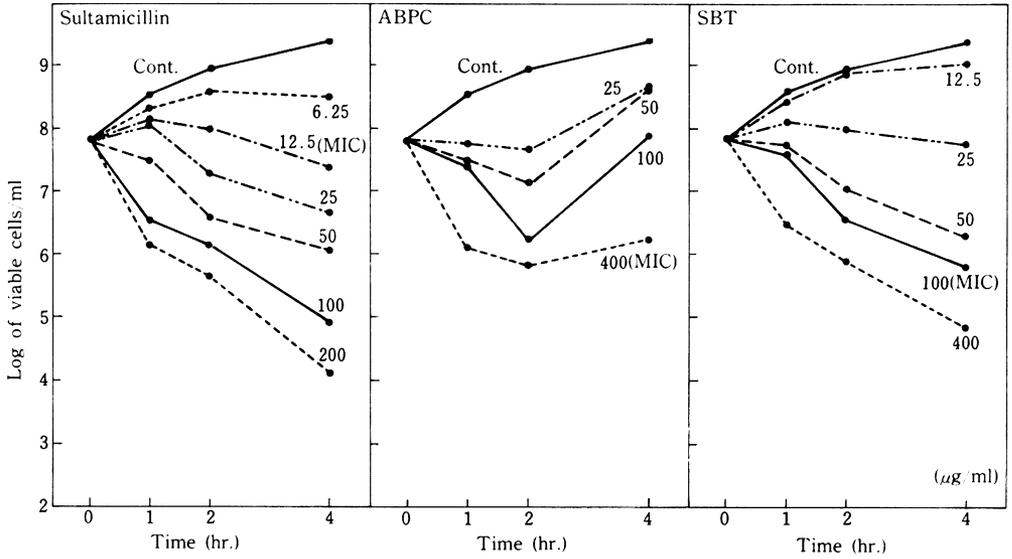


Fig. 28 Effect of Sultamicillin, ABPC and SBT on viability of *K. pneumoniae* 200

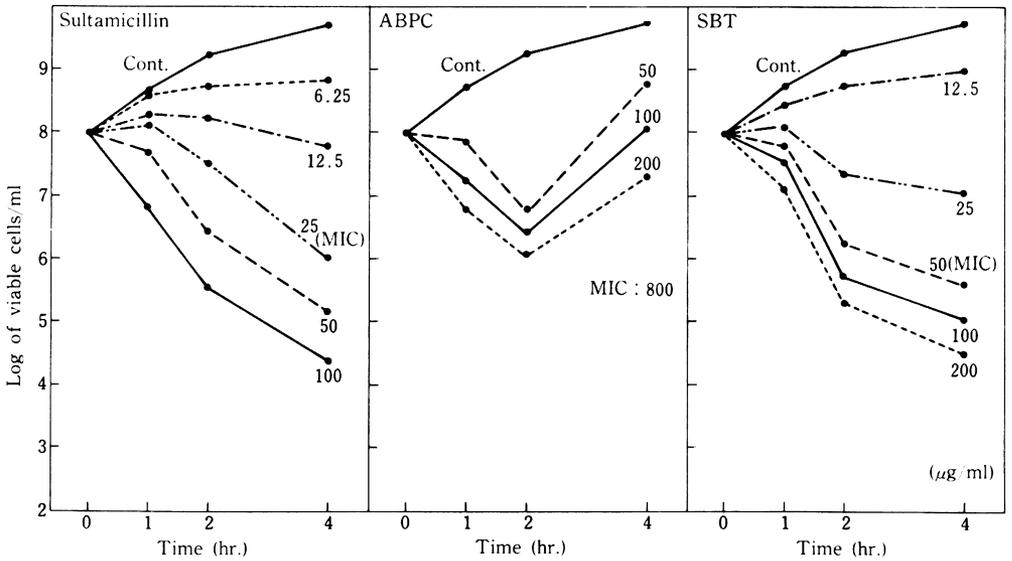


Fig. 29 Effect of Sultamicillin, ABPC and SBT on viability of *P. vulgaris* 109

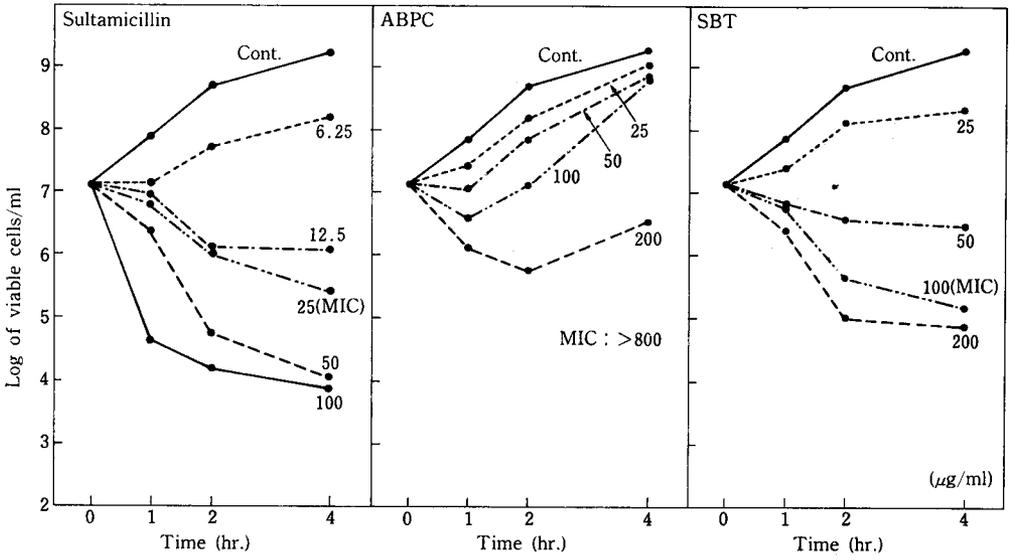


Fig. 30 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to ABPC for 2 hours

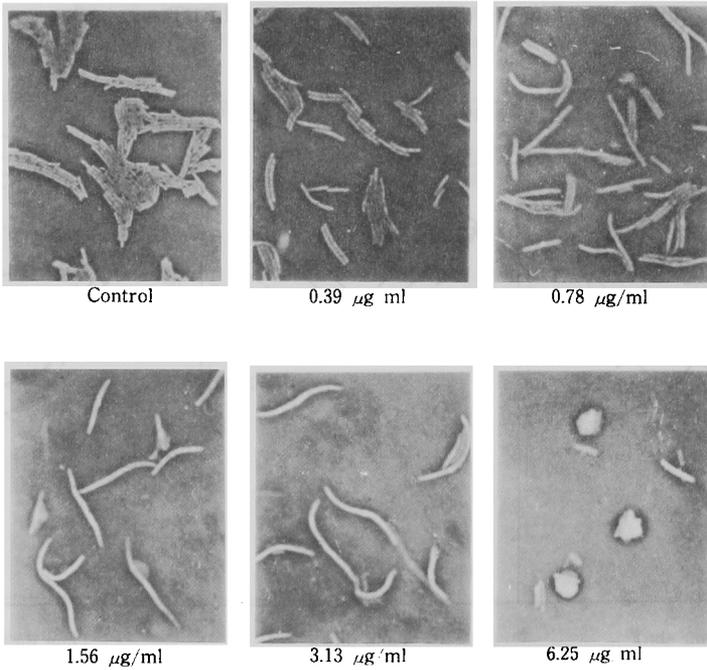


Fig. 31 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to SBT for 2 hours

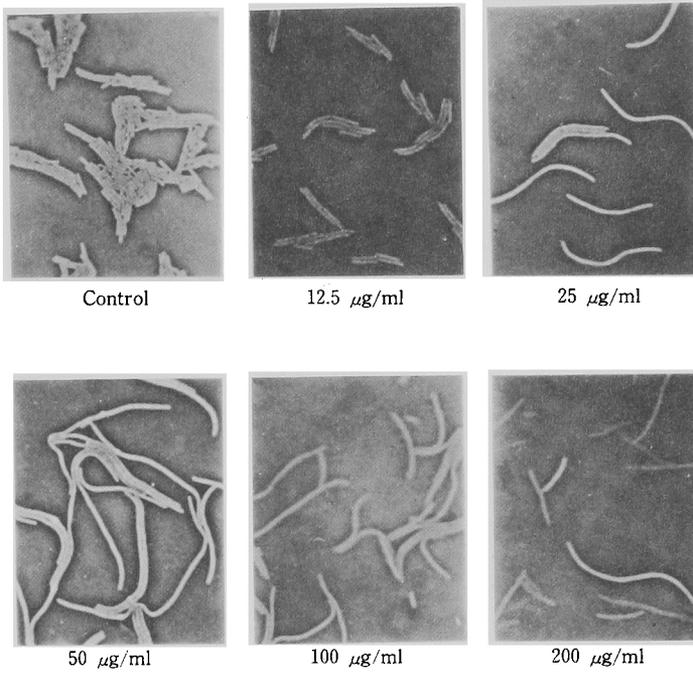


Fig. 32 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to Sultamicillin for 2 hours

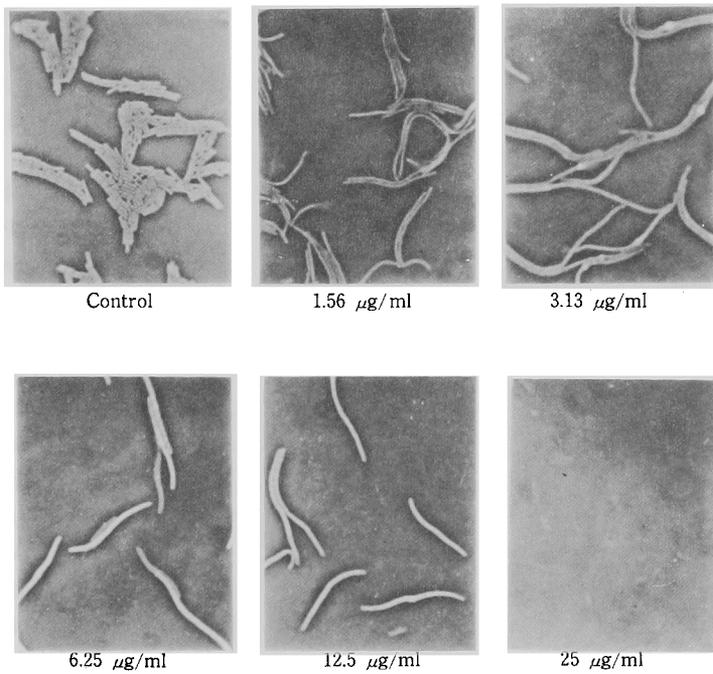


Fig. 33 Phase-contrast micrographs of *E. coli* 33 exposed to ABPC for 2 hours

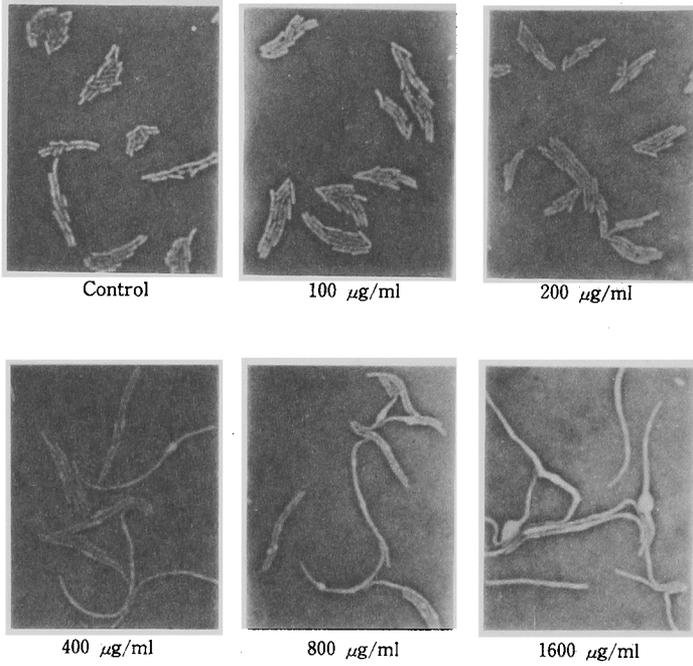


Fig. 34 Phase-contrast micrographs of *E. coli* 33 exposed to SBT for 2 hours

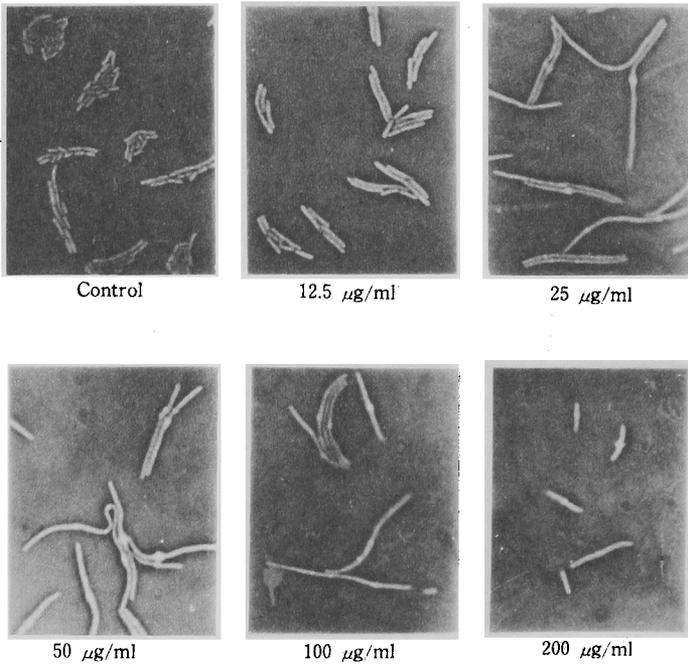


Fig. 35 Phase-contrast micrographs of *E. coli* 33 exposed to Sultamicillin for 2 hours

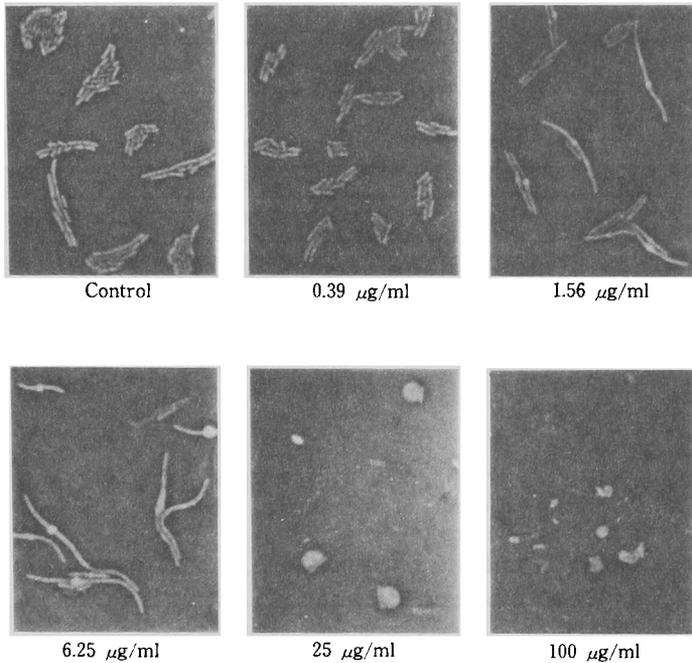


Fig. 33~35は ABPC 耐性 *E. coli* 33の形態変化を示している。ABPC作用では400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で菌体の伸長化とスフェロプラスト形成が認められた。SBT作用では25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌体の伸長化とスフェロプラスト形成が認められたが、作用濃度が高くなると伸長化の度合いが短くなった。Sultamicillin作用では1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌体の伸長とスフェロプラスト形成が観察されたが、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になると菌体の伸長化はみられず、スフェロプラスト形成や溶菌像が観察された。

上記の形態観察の結果をまとめ Fig. 36, 37に示した。ABPC感受性の *E. coli* K-12では ABPCの方が sultamicillinに比べ伸長化開始およびスフェロプラスト形成、溶菌開始の濃度が若干小さいようであったが、伸長化濃度域の中は大差ないと思われる。一方、ABPC耐性の *E. coli* 33では伸長化形成域の中はほとんど同じであったが、伸長化開始濃度やスフェロプラスト形成および溶菌開始の濃度は ABPCに比べ sultamicillinで著しく小さいことが認められた。

このように形態観察の結果からも、特に ABPC耐性菌に対して sultamicillinは ABPCや SBT単独よりも優れた抗菌作用を有することがわかった。

### III. 考 察

新しく開発された sultamicillinは ABPC 1分子と  $\beta$ -lactamase inhibitorである SBT 1分子がエステル結合した単一分子である。本剤は生体内で速やかに加水分解され、ABPCと SBTとして抗菌力を発揮すると言われている<sup>9)</sup>。

現在、 $\beta$ -lactam系抗生剤の耐性機構としては、細菌の外膜透過性の低下、 $\beta$ -lactamase産生による $\beta$ -lactam剤の不活化、標的酵素である penicillin結合蛋白質への親和性の低下が知られている。Sultamicillinは $\beta$ -lactamase inhibitorである SBTを含有していることから上記の $\beta$ -lactamase産生による耐性菌への有効性が期待されている。

今回、われわれは sultamicillinの *in vitro* 抗菌作用を検討した結果、sultamicillinはグラム陽性、陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有し、ABPC感受性菌には ABPCとほぼ同程度の抗菌力を示すが、ABPC耐性菌に対しては ABPCに比べ優れていた。このことは $\beta$ -lactamase産生臨床分離株を用いた抗菌力測定や生菌数測定、また位相差顕微鏡による形態観察の面においても確認された。また、 $\beta$ -lactamase産生菌で ABPCと

Fig. 36 Morphological effects of Sultamicillin, ABPC and SBT on *E. coli* K-12 after 2 hours exposure

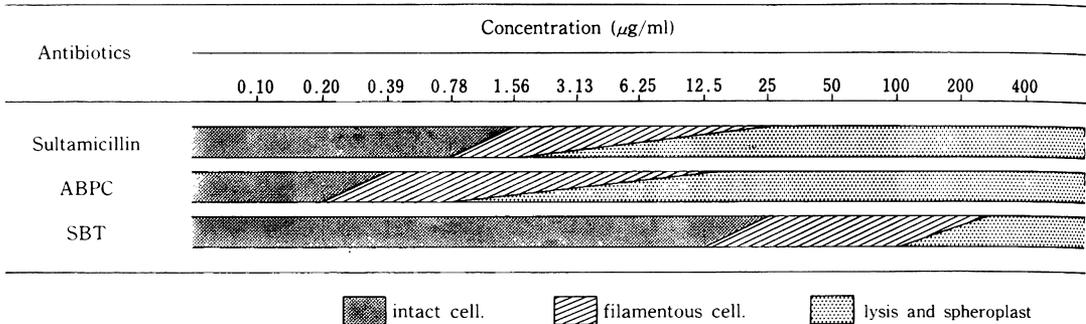
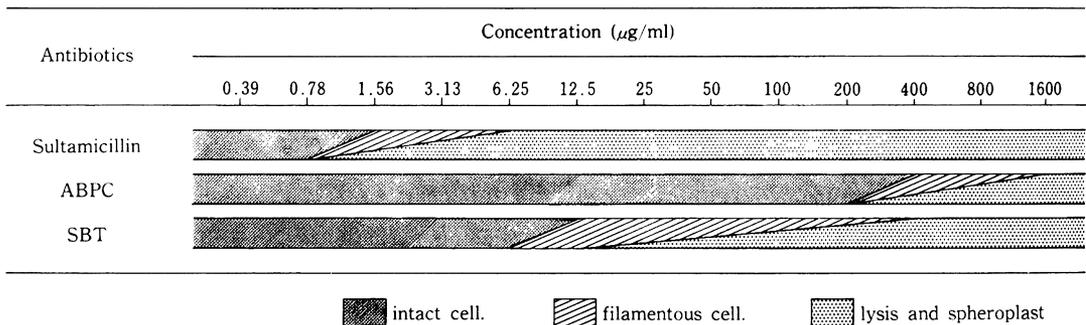


Fig. 37 Morphological effects of Sultamicillin, ABPC and of SBT on *E. coli* 33 after 2 hours exposure



SBTの併用を行ったところ、菌種、菌株により差はあるが両剤間に著しい協力作用が発現することが認められた。そしてABPCとSBTが最も強い協力作用を示す濃度比を $E_{LION}$ ら<sup>9)</sup>のFIC indexから求めたところ、*S. aureus*の場合を除きABPC: SBTの比率が1:1から16:1のとき最大の併用効果を示すことがわかった。Sultamicillinの生体内における血中濃度の推移は両剤ほぼ等しいことが報告されており<sup>9)</sup>、又、sultamicillin 100mgはABPC 58.8mg(力価)に相当することなどを考えると、今回検討した最大の併用効果を示す比率は生体内でも維持される可能性があると思われる。上記の抗菌作用の機作については $\beta$ -lactamase産生菌の場合、 $\beta$ -lactamaseに対して $\beta$ -lactamase inhibitorであるSBTが作用し、ABPCの抗菌作用が発揮されたものと

推定される。またSBTは $\beta$ -lactamase inhibitorとしての作用以外にpenicillin結合蛋白質の3にも親和性を有しており、ABPCとの併用においてこのような作用機作レベルでの協力作用も考慮する必要があるのかも知れない。

#### 文 献

- 1) ENGLISH, A. R., J. A. RETSEMA, A. E. GIRARD, J. E. LYNCH, and 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) ASWAPOKEE, N. and H. C. NEU: A sulfone  $\beta$ -lactam compound which acts as a  $\beta$ -lactamase

- inhibitor. J. Antibiotics 31 : 1238~1244, 1978
- 3) FU, P. K. and H. C. NEU : Comparative inhibition of  $\beta$ -lactamase by novel  $\beta$ -lactam compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 15 : 171~176, 1979
  - 4) RETSEMA, J. A., A. R. ENGLISH and A. E. GIRARD : CP-45,899 in combination with penicillin or ampicillin against penicillin-resistant *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae*, and *Bacteroides*. Antimicrob. Agents Chemother. 17 : 615~622, 1980
  - 5) WISE, R., J. M. ANDREWS and K. A. BEDFORD : Clavulanic acid and CP-45,899 : A comparison of their *in vitro* activity in combination with penicillins. J. Antimicrob. Chemother. 6 : 197~206, 1980
  - 6) 第32回 日本化学療法学会総会 新薬シンポジウム。Sultamicillin, 札幌, 1984
  - 7) 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
  - 8) ELION, G. B., S. SINGER and G. H. HITCHINGS : Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208 : 477~488, 1954

## IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SULTAMICILLIN

MASAKO OTSUKI, KYOKO KOIZUMI, HIROKO TOMINAGA,  
TAKESHI NISHINO, and TERUO TANINO  
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The *in vitro* activity of sultamicillin which is an ester of ampicillin (ABPC) with sulbactam (SBT) which is a  $\beta$ -lactamase inhibitor was investigated. While the antibacterial spectrum of sultamicillin against standard test strains broadly covered both gram-positive and gram-negative bacteria just as did that of ABPC, this compound was highly active against ABPC-resistant bacteria as well. In addition, sultamicillin exhibited high activity against  $\beta$ -lactamase-producing strains of *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* and *M. organii*.

A study of the effect of combination of SBT and ABPC by the checkerboard dilution method demonstrated a marked synergistic activity against  $\beta$ -lactamase-producing bacteria.

Sultamicillin acts bactericidally against  $\beta$ -lactamase-producing ABPC-resistant strains, and an examination of morphological changes of *E. coli* revealed that the compound causes cell elongation, spheroplast formation, and lysis.