

Bacmecillinam (KW-1100) の *in vivo* 抗菌活性

——マウス腹腔内感染および上行性尿路感染モデルに於ける感染治療効果——

望月 治美・山下 錦也・佐藤 清・岡地 諒

協和醗酵工業株式会社医薬研究所

Bacmecillinam (KW-1100, BMPC) と pivmecillinam (PMPC) を実験的マウス腹腔内感染モデルにおいて感染治療効果を比較検討した。両薬剤は *E. coli* GN 2411-5, *E. coli* 2848, *K. pneumoniae* 8045 および *E. cloacae* F-1510 に対して ED_{50} 0.88~2.41 mg/kg の範囲で良好な治療効果を示し、薬剤間に有意差は認められなかった。*P. mirabilis* F-783 には BMPC が 47.5 mg/kg, PMPC が 62.1 mg/kg の ED_{50} を示した。

BMPC と nalidixic acid (NA), piromidic acid (PA), pipemidic acid (PPA) を同じく *E. coli* GN 2411-5, *K. pneumoniae* 8045 および *E. cloacae* F-1510 の実験的マウス腹腔内感染モデルで治療効果を比較したところ BMPC に有意に優れた治療効果が認められた。

マウス上行性尿路感染モデルで BMPC と PMPC はそれぞれ *E. coli* GN 2411-5 に対して 2.23, 2.20 mg/kg, *K. pneumoniae* 8045 に 5.35, 9.72 mg/kg, *P. mirabilis* F-783 に 2.34, 3.89 mg/kg, *E. cloacae* F-1510 に 1.98, 2.16 mg/kg の ED_{50} を示した。

Bacmecillinam (KW-1100, BMPC) はグラム陰性桿菌に強い抗菌力を示す mecillinam (amdinocillin, MPC) の経口吸収性を改善した pro-drug であり、経口投与されると生体内で速やかに活性体である MPC に変換して抗菌力を発現する。著者らは前報で MPC の *in vitro* 抗菌力について検討し、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* をはじめ主としてグラム陰性桿菌に強い抗菌力を示すことを報告した¹⁾。

本報ではマウスを用いたグラム陰性桿菌の実験的感染モデルに BMPC を経口投与した場合の治療効果について検討した結果を報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 供試菌株

協和醗酵工業株式会社医薬研究所に保存されている菌株のうち下記の菌株を使用した。

Escherichia coli GN 2411-5

Escherichia coli 2848

Klebsiella pneumoniae 8045

Proteus mirabilis F-783

Enterobacter cloacae F-1510

2. 供試薬剤

BMPC はスウェーデン Astra 社で合成されたもの (BMPC・HCl, MPC 換算 677 μ g/mg) を用いた。Pivmecillinam (PMPC) は Ricerchimica 社で合成された PMPC・HCl (MPC 換算 675 μ g/mg) を使用し、nalidixic acid (NA) は第一製薬 (株) のウィントマイロン錠

(Wintomylon, 250 mg 力価), pipemidic acid (PPA) は大日本製薬 (株) のドルコール錠 (Dolcol, 250 mg 力価), piromidic acid (PA) は大日本製薬 (株) のパナシッド錠 (Panacid, 250 mg 力価) をそれぞれ使用した。NA, PPA, PA は原末が入手できなかったため、有効期限内の市販製剤を使用し、MIC の測定により抗菌力を確かめた (Table 2)。BMPC, PMPC の投与量は MPC 換算量で表示し、尿路感染モデルの場合 (3 回均等分割投与) は、その総投与量で表示した。

3. 投与方法

いずれの薬剤も乳鉢で微粉末状に磨砕したあと 0.3% CMC 溶液に溶解または懸濁して所定濃度に希釈し、経口ゾンデを用いて感染後所定時間内にマウスの胃内へ直接投与した。投与量は腹腔内感染系の場合は 0.2 ml とし、上行性尿路感染系の場合は 1 回当たり 0.1 ml とした。

4. 菌株の培養および実験的腹腔内感染症

供試菌株を Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (Difco Labs.) にて 37°C, 17 hr 振盪培養し、その培養液 5 ml を新しい BHI 培地 50 ml に加えてさらに 37°C, 4 hr 振盪培養した。この培養液を生理的食塩水で所定の菌濃度に希釈し、等量の 10%-mucin (Bacto Mucin Bacteriological; Difco Labs.) と混合したものを感染菌液とした。

ddY 系, ♂, 4 週齢, 体重 19 $\pm$ 1 g のマウス (n=10) を用い、感染菌液を一匹当たり、0.5 ml 腹腔内に接種した。感染菌量は約 10 MLD 相当とし寒天希釈法で生菌

数を求め、マウス当りの投与菌量を cfu/mouse で表示した。感染マウスは薬剤投与群、非投与群とも 7 日間飼育して生死を観察し、7 日目のマウスの生存率から Litchfield-Wilcoxon 法により ED₅₀ (mg/kg) 値を算出した。

5. 実験的上行性尿路感染症

ICR 系、♀、4 週齢、体重 19 ± 1 g のマウス (n=5) を用いた。供試菌株を実験的腹腔内感染症の場合と同様の方法で前培養を行ない、生理的食塩水で希釈して感染菌液を調製した。マウスは菌接種 1 日前から絶水し、菌接種直前に排尿させ、感染菌液 50 μl を外尿道から接種し直ちに小型クリップで外尿道を閉塞し 1 時間後に解除した。薬剤は菌接種後 1, 3, 5 時間目に 1 回当たり 0.1ml を経口で投与し、薬剤無投与群は薬剤液のかわりに 1 回

当たり生理的食塩水 0.1ml を投与した。24 時間後にマウスを断頭放血死させ速やかに両腎を摘出し重量を測定後、氷冷下で生理的食塩水 2 ml を加えホモジナイズしたのち、滅菌ガーゼで濾過してスパイラルシステム²⁾により腎内の生菌数を測定した。治療効果の判定は薬剤投与後の両腎内の生菌数が 10² 以下になった個体を治癒したものと判定して、Litchfield-Wilcoxon 法により ED₅₀(mg/kg) 値を算出した。

II. 実験結果

1. 腹腔内感染症モデルでの治療効果

E. coli GN 2411-5 株, *E. coli* 2848 株, *K. pneumoniae* 8045 株, *E. cloacae* F-1510 株および *P. mirabilis* F-783 株の感染系における BMPC および PMPC の感染治療試験の結果を Table 1 に示した。両剤ともこれらの菌の感

Table 1 Protective effects of bacmecillinam (BMPC) and pivmecillinam (PMPC) against experimental infections in mice

Pathogens	Challenge dose (cfu/mouse)	Drug*	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit	MIC** (μg/ml)
<i>E.coli</i> GN 2411-5	2.5×10 ²	BMPC	2.27	1.76-2.93	0.1
		PMPC	1.66	1.25-2.21	
<i>E.coli</i> 2848	2.3×10 ³	BMPC	1.09	0.92-1.30	0.2
		PMPC	1.16	0.96-1.41	
<i>K.pneumoniae</i> 8045	1.8×10 ³	BMPC	1.32	0.88-1.98	0.1
		PMPC	2.41	1.17-4.98	
<i>E.cloacae</i> F-1510	1.4×10 ⁷	BMPC	0.88	0.56-1.41	0.1
		PMPC	1.12	0.80-1.56	
<i>P.mirabilis</i> F-783	1.3×10 ⁷	BMPC	47.5	30.8-73.2	0.78
		PMPC	62.1	35.2-110	

* Drug was administered p.o. immediately post infection.
** MIC was assayed by agar dilution method as MPC.

Table 2 Protective effects of bacmecillinam (BMPC), nalidixic acid (NA), piromidic acid (PA) and pipemidic acid (PPA) against experimental infection in mice.

Pathogens	Challenge dose (cfu/mouse)	Drug*	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit	MIC** (μg/ml)
<i>E.coli</i> GN 2411-5	1.15×10 ⁴	BMPC	0.93	0.40- 2.19	0.2
		NA	42.9	20.8 - 88.4	3.13
		PA	105	52.3 - 212	25
		PPA	15.7	8.21- 29.9	1.56
<i>K.pneumoniae</i> 8045	7.08×10 ³	BMPC	1.01	0.51- 1.98	0.2
		NA	34.4	18.9 - 62.1	3.13
		PA	93.2	53.2 - 162	12.5
		PPA	17.2	8.32- 35.4	1.56
<i>E.cloacae</i> F-1510	1.26×10 ⁷	BMPC	1.33	0.73- 2.43	0.1
		NA	32.1	16.8 - 61.1	6.25
		PA	695	370 -1310	25
		PPA	29.4	16.2 - 53.2	3.13

* Drug was administered p.o. immediately post infection.
** Assayed by agar dilution method. MIC of BMPC was assayed as MPC.

染症に対しては優れた治療効果を示し、両薬剤の間にはいずれの感染菌の場合にも推計学上有意な差は認められなかった。

つぎに、*E. coli* GN 2411-5 株、*K. pneumoniae* 8045 株、*E. cloacae* F-1510 株に対する BMPC の治療効果を NA, PA, PPA の 3 種の合成抗菌剤と比較した結果を Table 2 に示した。この結果から明らかなように *in vitro* では BMPC はこれら合成抗菌剤より優れた MIC 値を示したが、その傾向は *in vivo* にもよく反映され、いずれの菌の感染系においても BMPC は他の 3 種の薬剤より有意に優れた治療効果を示した。

2. 上行性尿路感染症モデルの病理組織所見

E. coli GN 2411-5 株、*K. pneumoniae* 8045 株、*P. mirabilis* F-783 株を所定の方法により感染させ、1 日経過後の腎を摘出し病理組織像を観察した結果を Plate 1 に示した。いずれの菌株による感染系の場合も感染菌が腎組織内に侵入していることが認められ、*E. coli*、*P. mirabilis* では腎盂腎炎の病変が、*K. pneumoniae* では腎盂炎の病変が認められた。

3. 上行性尿路感染症モデルでの治療効果

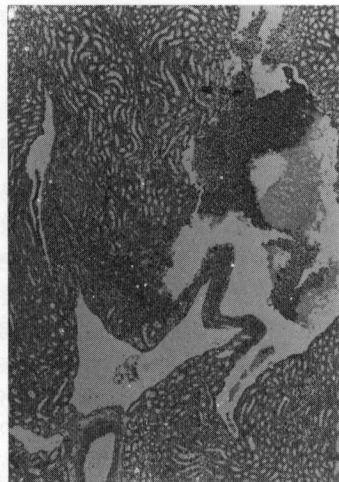
E. coli GN 2411-5 株を 1.15×10^5 cfu/mouse の接種菌量で経尿道的に感染させた系での BMPC および PMPC による治療効果を Fig. 1 に示した。本菌に対する BMPC の ED_{50} は 2.23 mg/kg (95% 信頼限界: 1.26~3.94) であり PMPC の ED_{50} は 2.20 mg/kg (0.81~6.00) と算出された。

K. pneumoniae 8045 株を 1.03×10^7 cfu/mouse の接種菌量で感染させた系での BMPC および PMPC の治療効果を Fig. 2 に示した。BMPC の本菌に対する ED_{50} は 5.35 mg/kg (2.46~11.7) であり、PMPC のそれは 9.72 mg/kg (4.52~20.9) であった。

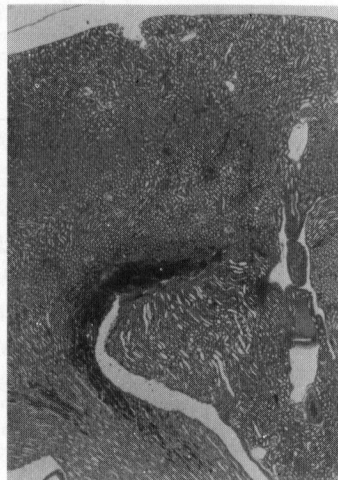
P. mirabilis F-783 株を 1.65×10^4 cfu/mouse の接種菌量で感染させた系での BMPC および PMPC の治療効果を Fig. 3 に示した。この場合の BMPC の ED_{50} は 2.34 mg/kg (1.18~4.66) であり、PMPC の ED_{50} は 3.89 mg/kg (1.48~10.2) であった。

E. cloacae F-1510 株を 1.31×10^6 cfu/mouse の接種菌量で感染させた系での治療効果を Fig. 4 に示した。BMPC は 1.98 mg/kg (1.09~3.61) の ED_{50} を示し、PMPC は 2.16 mg/kg (1.09~4.28) の ED_{50} を示した。

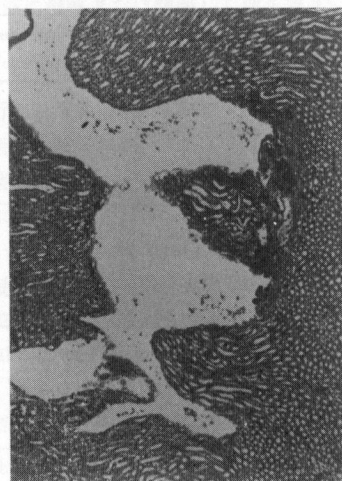
Plate 1 Histopathological aspects of the kidney of mouse infected with pathogens



(a) *E. coli* GN 2411-5



(b) *K. pneumoniae* 8045



(c) *P. mirabilis* F-1510

Fig. 1 Therapeutic effects of BMPC and PMPC on mouse ascending urinary tract infections with *E. coli* GN 2411-5

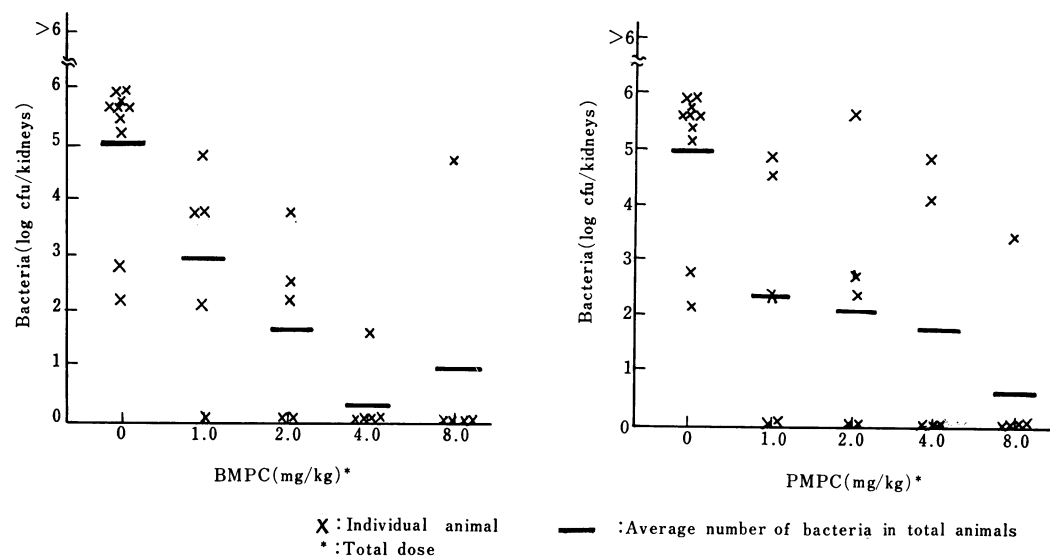


Fig. 2 Therapeutic effects of BMPC and PMPC on mouse ascending urinary tract infections with *K. pneumoniae* 8045

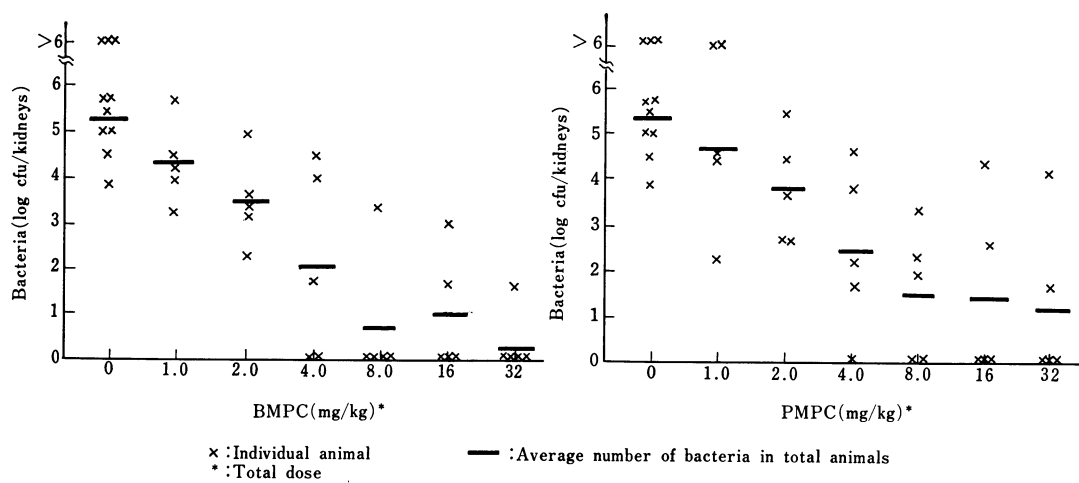


Fig. 3 Therapeutic effects of BMPC and PMPC on mouse ascending urinary tract infections with *P. mirabilis* F-783

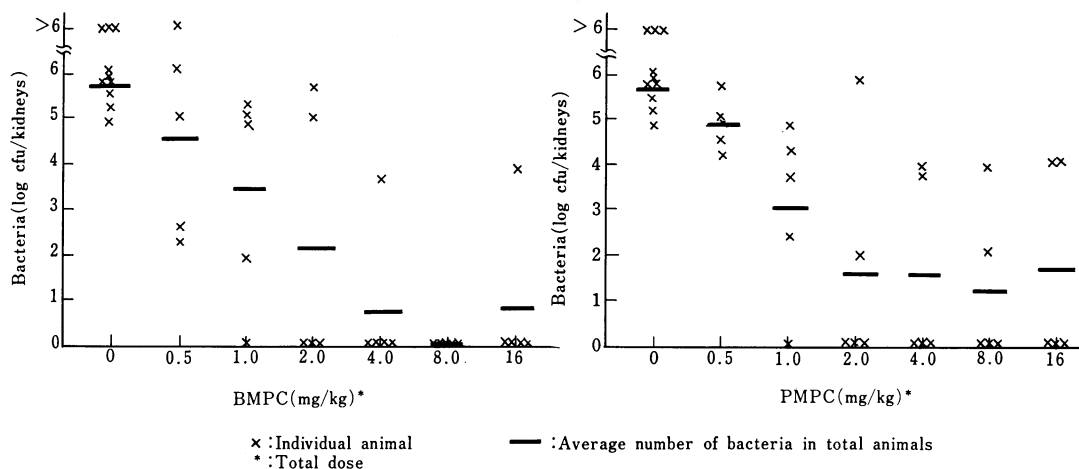
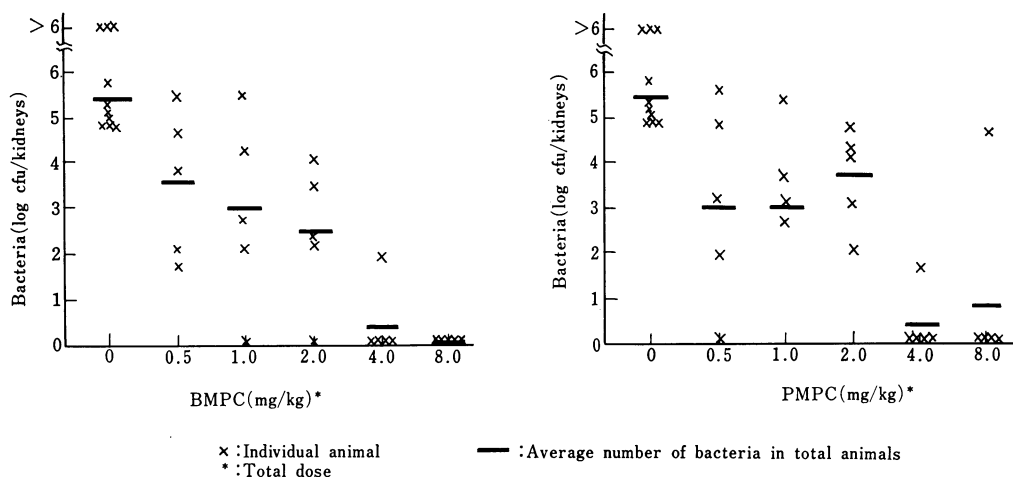


Fig. 4 Therapeutic effects of BMPC and PMPC on mouse ascending urinary tract infections with *E. cloacae* F-1510



III. 考 察

現在経口用として用いられている抗生剤には β -ラクタム剤、マクロライド剤などの抗生物質をはじめキノロンカルボン酸系の合成抗菌剤など多くのものが知られている。これらの薬剤の大部分は抗菌力を示す活性物質それ自体が消化管壁から易吸収性であり、とくに化学修飾あるいは製剤上の工夫を行なわなくても経口用薬剤としての必要な性質を備えている。しかしながら一方で、活性物質自体が消化管壁から難吸収性であったり、あるいはその吸収効率が充分でない場合には分子に化学修飾（主にエステル化など）を加え吸収効率を上げ、かつ生

体内で加水分解酵素の働きにより活性物質を遊離させることを目的としたいいわゆる pro-drug が主として合成ペニシリンの中に多く開発されており、bacampicillin (BAPC), talampicillin (TAPC), carindacillin (CIPC), carfecillin (CFPC), pivmecillinam (PMPC) などがこの部類に入るものである。

本報で述べた BMPC も半合成ペニシリンの pro-drug に属し、上記の物質の中では PMPC にもっとも近い性質を示す。両物質とも 1972 年にデンマークの Leo 社で合成された半合成ペニシリン MPC の pro-drug であり、それぞれ 3 位に 1'-ethoxycarbonyloxyethyl ester あるいは

は pivaloyloxymethyl ester が導入されている。これと同じ置換基を導入した例が ampicillin (ABPC) でも見られ、それぞれ BAPC, pivampicillin (PVPC) が合成されその薬効、安全性等について検討が加えられた。その結果 BAPC は 1981 年から国内でも臨床に供されているが PVPC は副作用が多く³⁾ 現在臨床には用いられていない。BMPC と PMPC の場合も BAPC と PVPC の場合も活性物質はともに同一であるが導入されたエステル残基が前記のように異なっている。そのため BMPC, BAPC は生体内で代謝を受け生成する物質が生理的代謝産物であるエタノール、アセトアルデヒド、炭酸ガスであるのに反して、PMPC, PVPC の場合は非生理的代謝産物であるホルムアルデヒドと pivalic acid が生成するという違いが見られる。

本報ではマウス実験感染症での薬効の面から BMPC と PMPC の比較検討を行なった。腹腔内感染症モデルにおいては両物質間に有意な治療効果の差はなく、ともに *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* に対しては優れた治療効果を示した。*P. mirabilis* に対してはともに治療効果がやや低かったが、本菌に対しては MIC 値がやや低く、さらに別に実施した実験によると本菌の場合は接種菌量の影響が大きい傾向が認められ、その両方の影響が現れたものと考えられる。

一方で上行性尿路感染症モデルの場合には *K. pneumoniae* 8045 株および *P. mirabilis* F-783 株で BMPC の方にやや優れた治療効果が認められた。マウスの上行性尿路感染症モデルについてはすでにいくつかの報告が見られるが^{4,5)}、本報で用いた感染モデル系では感染後 1 時間ですでに腎内に $10^5 \sim 10^6$ 個の感染菌が検出され解剖病理所見でも腎盂腎炎ないし腎盂炎の発症が認められた。

しかし、菌接種後自由給水下で飼育すると、腎内生菌数に乱れが生じ、各個体の腎内生菌数を一定に保つことが困難であった。そこで薬剤投与後も給水を断って飼育すると 24 時間後でも、接種菌量に応じた腎内生菌数が

観察され、安定した感染系を成立させることができた。一方、24 時間をこえて断水条件下で飼育することは困難であり、それ以降給水して飼育すると再び腎内生菌数は乱れはじめ、48 時間以降になると自然治癒マウスも認められた。従って薬剤の効果の判定は投与後 24 時間目に行なった。

本剤とキノロンカルボン酸系の薬剤との比較では、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* などの実験感染症モデルにおいて、試験した 3 剤との間には MIC の上からも明らかに差が認められ、*in vivo* の系でも BMPC の方が有意に優れた治療効果を示した。しかしながら、キノロンカルボン酸系の薬剤は最近進歩が著しく、開発中のものの中には本報で用いた薬剤より著しく抗菌力が改善されたものも報告されているのでこれらとの比較については今後検討を行ないたい。

謝 辞

終りにあたり組織病理学的所見の鏡検観察に御協力いただいた西村宏博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 佐藤 清, 峯浦和幸, 岡地 諒: Bacmecillinam (KW-1100) の *in vitro* 抗菌力及び作用機作。Chemotherapy 33 (S-3): 9~19, 1985
- 2) JARVIS, B.; V. H. LACH & J. M. WOOD: Evaluation of the spiral plate maker of the enumeration of micro-organisms in foods. J. Appl. Bacteriol. 43: 149~157, 1977
- 3) 北本 治, 小林宏行, 他: Pivampicillin の臨床効果に関する検討——二重盲検試験——。Chemotherapy 22: 482~489, 1974
- 4) 松浦真三, 三和秀明, 深尾 孝: 6059-S の *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 28 (S-7): 171~177, 1980
- 5) IWAHI, T. & K. TSUCHIYA: Comparative activities of cefotiam and cefazolin against urinary tract infection with *Proteus mirabilis* in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 257~263, 1980

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BACMECILLINAM (KW-1100) : PROTECTIVE EFFECTS IN EXPERIMENTAL MOUSE INTRAPERITONEAL AND ASCENDING URINARY TRACT INFECTION MODEL

HARUMI MOCHIZUKI, KINYA YAMASHITA, KIYOSHI SATO and RYO OKACHI

Pharmaceuticals Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

1188 Shimotogari, Nagaizumi, Sunto, Shizuoka, 411 JAPAN

Protective effects of bacmecillinam (KW-1100, BMPC) and pivmecillinam (PMPC) were tested in experimental mouse intraperitoneal infection model. Both drugs demonstrated the potent protective effects against *E. coli* GN 2411-5, *E. coli* 2848, *K. pneumoniae* 8045 and *E. cloacae* F-1510 infection with ED₅₀ of 0.88-2.41 mg/kg. ED₅₀ of BMPC and PMPC against *P. mirabilis* F-783 were 47.5 and 62.1 mg/kg, respectively.

BMPC protected the mice infected intraperitoneally with *E. coli* GN 2411-5, *K. pneumoniae* 8045 and *E. cloacae* F-1510 more effectively than nalidixic acid (NA), piromidic acid (PA) and pipemidic acid (PPA).

In mouse ascending urinary tract infection model, BMPC and PMPC exhibited ED₅₀ of 2.23, 2.20 mg/kg against *E. coli* GN 2411-5, 5.35, 9.72 mg/kg against *K. pneumoniae* 8045, 2.34, 3.89 mg/kg against *P. mirabilis* F-783 and 1.98, 2.16 mg/kg against *E. cloacae* F-1510, respectively.