

Bacmecillinam (KW-1100) と amoxicillin の併用効果

— *In vitro* および実験的マウス感染症での検討 —望月治美・佐藤 清・岡地 諒
協和醸酵工業株式会社 医薬研究所

Bacmecillinam (BMPC, KW-1100) と amoxicillin (AMPC) を 5:1, 1:1, 1:5 の割合で混合し、その併用効果を *E. coli* F-2519, *S. marcescens* T-55 および *E. aerogenes* F-1949 を用いて *in vitro* およびマウス実験感染症モデルの系で検討した。

E. coli F-2519 は *in vitro* では MPC に 25, AMPC に 200 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示したが、両剤を併用すると MIC は 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$ となり、*in vivo* では BMPC 単剤では治療効果を示さず AMPC は 193 mg/kg の ED₅₀ を示したが併用すると ED₅₀ は 49.9~168 mg/kg となり著しい相乗効果が認められた。

S. marcescens T-55 は MPC に >400, AMPC に 100 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示したが、両剤を併用すると MIC は 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ となり、*in vivo* での ED₅₀ は BMPC 単剤では >2110, AMPC 単剤では 159 mg/kg であったが併用すると 75.3~329 mg/kg の ED₅₀ が得られ相乗効果が認められた。

E. aerogenes F-1949 の場合は MPC に 3.13, AMPC に >400 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示したが、両剤を併用すると MIC は 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ となり、*in vivo* での感染治療効果は単剤では両薬剤とも >4210 mg/kg の ED₅₀ であったが併用すると 91.6~280 mg/kg となり顕著な相乗効果が認められた。

Bacmecillinam (BMPC, KW-1100) は mecillinam (MPC, amdinocillin) の 3 位における 1'-ethoxycarbonyloxyethyl ester 誘導体であり、経口で投与すると生体内で速やかに活性体である MPC に変換し、グラム陰性菌に対する強い抗菌活性を発現する。

我々は前報で本剤の *in vitro* 抗菌力¹⁾ ならびに実験的マウス感染症モデルにおける *in vivo* 抗菌力²⁾ について報告した。MPC はその作用機作に関する研究から、従来の半合成ペニシリンとは異なり、ペニシリン結合蛋白の 2 に特異的に結合し抗菌力を発現することが知られている^{1,3)}。前報でも述べたように臨床分離株の中には本物質と ABPC, AMPC などとの間に交叉耐性を示さない株が多数存在し、両剤の間に異なった感受性のパターンが存在することが認められている。

そこで今回我々は BMPC と同じく経口剤でありながら異なる作用機作をもつ半合成ペニシリンの代表として AMPC を用いて *in vitro* あるいはマウスの実験的感染症モデルにおける *in vivo* での併用効果を検討し、両薬剤の間に著しい相乗効果を認めたので報告する。

I. 実験材料及び実験方法

1. 供試菌株

協和醸酵工業(株)医薬研究所に保存してある標準株お

よび臨床分離株のうちから下記の菌株を使用した。

Escherichia coli F-2519

Serratia marcescens T-55

Enterobacter aerogenes F-1949

2. 菌株の培養

各菌株とも Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (Difco Labs.) 50 ml を入れた 250 ml エルレンマイヤーフラスコに寒天斜面培養より 1 白金耳接種し、37℃で 17hr 振盪培養した。その後培養液 5 ml を新しい BHI 培地 50 ml に移してさらに 37℃, 4 hr 振盪培養した。

3. 感染菌液の調製および感染方法

培養を終了した菌液を生理的食塩水で所定の濃度に希釈し等量の 10%-mucin (Bact Mucin Bacteriological: Difco Labs.) と混合したものを ddY 系, δ , 4 週齢, 体重 19±1g のマウス (n=5) の腹腔内に 0.5 ml 接種した。

4. 供試薬剤

BMPC は Astra 社で合成されたものを使用した (B MPC · HCl, 677 $\mu\text{g/mg}$)。AMPC は協和醸酵工業(株)で製造されたもの (830 $\mu\text{g/mg}$) を使用した。BMPC は実際の重量に 0.677 を乗じて MPC の力価として表示し、AMPC は 0.83 を乗じて力価で表示した。

5. 薬剤投与方法および結果の判定

BMPC および AMPC は秤量後所定の割合で混合し、乳鉢で磨砕し微粉末としたあと 0.3%—CMC 溶液で所定濃度に溶解または懸濁し、その 0.2 ml を経ロゾンデでマウスの胃内に直接投与した。薬剤の混合割合は 5:1, 1:1 および 1:5 (力価比率) とし、投与時間は感染直後とした。薬剤投与群、非投与群とも 7 日間飼育して生存率を求め Litchfield-Wilcoxon 法により ED₅₀ (mg/kg) 値を算出した。併用効果の判定は KAWAKAMI ら⁴⁾の方法に準じて行なった。すなわち各単剤の投与で得られた ED₅₀ 値から、所定の割合で 2 剤を併用して投与した場合に期待される相加的 ED₅₀ 値を求め Da 値とした。この Da 値を実験的に求めた実際の ED₅₀ 値で除して相乗比 (SR) とした。この SR 値が 1 以上の値を示した場合を相乗効果があるものと判定し、とくに 95%信頼限界における SR 値の下限が 1 以上である場合に有意な相乗効果があるものと判定した。

6. 試験管内抗菌力の測定

日本化学療法学会標準法⁵⁾に従って測定した。2 薬剤を併用した場合の抗菌力の測定は両薬剤を所定の割合で含む倍数希釈液を調製し、Mueller-Hinton Agar 培地 (Difco Labs.) で assay した。接種菌量は 10⁸ cells/ml を用いた。

II. 実験結果

1. *E. coli* F-2519 に対する併用効果

E. coli F-2519 は Table 1 に示したように *in vitro* では MPC に対して MIC 25 μg/ml, AMPC に対して MIC 200 μg/ml を示し両薬剤に中等度ないし高度耐性な臨床分離株である。MPC と AMPC を 5:1, 1:1 および 1:5 で混合したときの本菌の MIC はそれぞれ 0.78, 0.39 および 0.39 μg/ml であり強い相乗効果を示した。

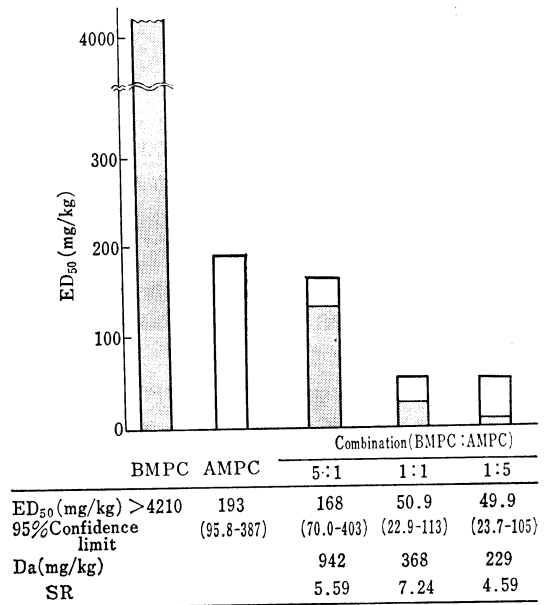
Table 1 *In vitro* antibacterial activity of MPC and AMPC alone and in combination
MIC (μg/ml)*

Test organism	MPC	AMPC	Combination (MPC : AMPC)		
			5 : 1	1 : 1	1 : 5
<i>E. coli</i> F-2519	25	200	0.78	0.39	0.39
<i>S. marcescens</i> T-55	>400	100	50	6.25	6.25
<i>E. aerogenes</i> F-1949	3.13	>400	1.56	1.56	3.13

* Assayed by agar dilution method.

一方、本菌の感染症に対する治療効果を Fig. 1 に示した。BMPC 単剤では ED₅₀ は 4210 mg/kg 以上となり治療効果は認められず、AMPC の ED₅₀ は 193 mg/kg

Fig. 1 Protective effects of BMPC, AMPC and combination of the two drugs on mouse experimental infection with *E. coli* F-2519



Challenge dose : 6.15 × 10⁷ cfu/mouse (ip)
Drug was administered p. o. immediately post infection.

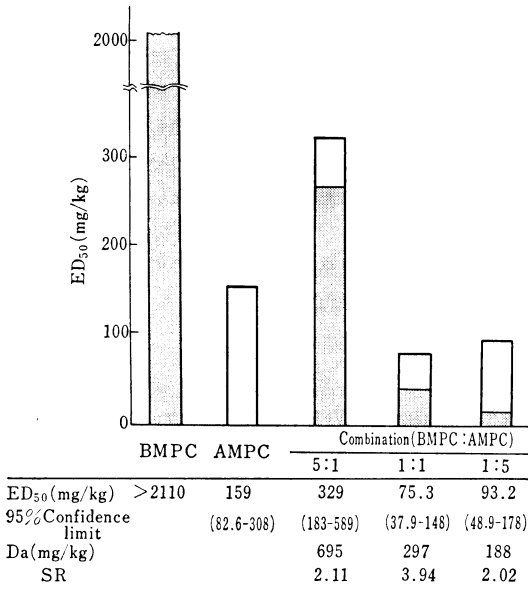
であった。ところが両剤を 5:1 で混合すると 168 mg/kg の ED₅₀ 値が得られ、この時の BMPC, AMPC の実際の投与量はそれぞれ 140 mg/kg, 28 mg/kg であった。BMPC の ED₅₀ 値を 4210 mg/kg として計算した Da 値は 942 mg/kg となり相乗比は 5.59 を示し、両剤の間に著しい相乗効果が認められた。同様に両剤を 1:1 の割合で併用した場合の ED₅₀ 値は 50.9 mg/kg であって、実際の BMPC および AMPC の投与量はともに 25.45 mg/kg であった。この場合の相乗比は 7.24 となりやはり顕著な相乗効果を示した。また、両剤を 1:5 の割合で併用したときの ED₅₀ 値は 49.9 mg/kg となり、その中に占める BMPC と AMPC の実際の投与量はそれぞれ 8.3 mg/kg, 41.6 mg/kg であった。この場合も相乗比は 4.59 となり著明な相乗効果が認められた。

2. *S. marcescens* T-55 に対する併用効果

S. marcescens T-55 は Table 1 に示したように *in vitro* では MPC に対し 400 μg/ml 以上の MIC を示し高度耐性株であった。一方、AMPC に対する MIC は 100 μg/ml で中等度の耐性を示した。本菌に対して MPC および AMPC を併用すると Table 1 に見られるように試験管内でも顕著な相乗効果が認められた。

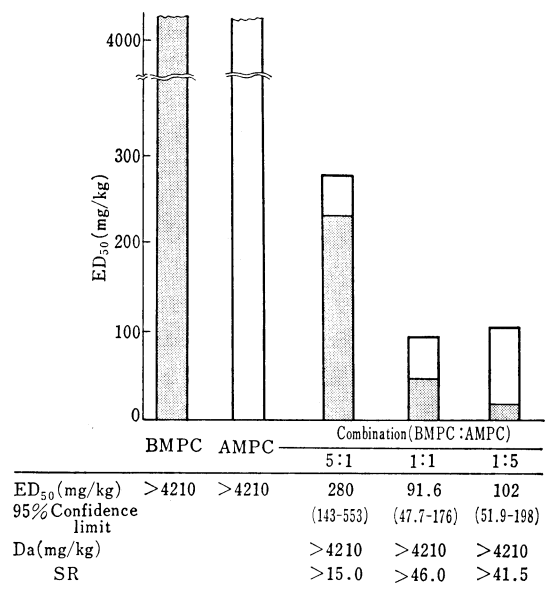
本菌の感染症に対する単剤および併用時での治療効果を Fig. 2 に示した。BMPC の ED₅₀ は単剤では 2110

Fig. 2 Protective effects of BMPC, AMPC and combination of the two drugs on mouse experimental infection with *S. marcescens* T-55



Challenge dose : 1.08×10^8 cfu/mouse(ip)
 Drug was administered p. o. immediately post infection.

Fig. 3 Protective effects of BMPC, AMPC and combination of the two drugs on mouse experimental infection with *E. aerogenes* F-1949



Challenge dose : 1.83×10^9 cfu/mouse(ip)
 Drug was administered p. o. immediately post infection.

mg/kg 以上となり治療効果は認められず、一方 AMPC の ED₅₀ は 159 mg/kg であった。ところが両剤を 5 : 1 で混合すると 329 mg/kg の ED₅₀ 値が得られ、この場合の実際の投与量は BMPC が 274.2 mg/kg、AMPC が 54.8 mg/kg であり、BMPC 単剤の ED₅₀ を 2110mg/kg として計算した SR は 2.11 となり、両剤の間に相乗作用が認められた。さらに両剤を 1 : 1 で混合した場合には ED₅₀ 値は 75.3 mg/kg であり、その時の両剤の実際の投与量は 37.65 mg/kg となり、この混合比の場合にもっとも高い相乗効果が認められた。混合比が 1 : 5 になると ED₅₀ 値は 93.2 mg/kg とやや上昇したが、実際の BMPC 投与量は 15.5 mg/kg、AMPC は 77.7 mg/kg であってこの場合にも相乗効果が認められた。

3. *E. aerogenes* F-1949 に対する併用効果

本菌の両剤に対する *in vitro* 抗菌力を Table 1 に示したが、MPC に対しては MIC 3.13 μg/ml であり感受性を示すのに反して AMPC に対しては MIC 400 μg/ml 以上と高度耐性を示した。ところが本菌も両剤を 5 : 1、1 : 1、1 : 5 で混合した場合の MIC はそれぞれ 1.56、1.56、3.13 μg/ml となり、いずれも高い相乗効果を示した。

一方で、本菌の実験感染症モデルにおける感染治療効果を Fig. 3 に示した。本菌に対しては BMPC、AMPC

ともに ED₅₀ は 4210 mg/kg 以上であり単剤での治療効果はほとんど認められなかった。ところが両剤を 5 : 1、1 : 1、1 : 5 の割合で併用して投与すると ED₅₀ 値はそれぞれ 280、91.6、102 mg/kg と著しく改善された。各 ED₅₀ 値の中に占める BMPC と AMPC の実際の投与量は 5 : 1 の割合で併用した場合はそれぞれ 233.3mg/kg、46.7 mg/kg であり 1 : 1 の割合で併用の場合は両剤とも 45.8 mg/kg、1 : 5 の割合で併用の場合はそれぞれ 17 mg/kg、85 mg/kg であった。

III. 考 察

抗生剤の併用に関する研究は主に β-ラクタム抗生物質とアミノ配糖体薬との間で多くの研究が見られ、著しい相乗効果の認められる例が多数報告されている。一般に、2 種以上の薬剤の相乗効果が顕著に現れるためには、各薬剤の作用機作が各々異なっており、しかもそれらの薬剤を同時に使用しても *in vitro* では各薬剤の不活化が見られず、*in vivo* ではそれに加えて吸収、分布、代謝などの面での諸条件が満足され、それぞれの作用機作が単剤のときと同様に独立して発揮されることが必要である。β-ラクタム剤同志の併用効果についてもいくつかの報告があり、相乗効果が認められる場合もあるが、一般的には 2 薬剤の作用点が近いとその程度はアミノ配糖体薬と β-ラクタム剤の場合ほど顕著ではない。

ところが、本報に述べた BMPC (活性体は MPC) と AMPC はともに β -ラクタム剤でありながら、前者は大腸菌のペニシリン結合蛋白 2 に特異的に結合し、桿菌形態の形成を阻害するため細胞は卵型を形成し、やがて溶菌にいたるのに反し、後者は 1 A, 1 B, 3 に主に結合し、細胞分裂の阻害を引き起し細胞は伸長してやがて溶菌にいたるといふ明瞭な違いが認められる。そこで、*in vitro* では MPC と ABPC⁶⁾、CEX⁷⁾ あるいはその他の β -ラクタム剤^{8,9)} との併用効果に関してすでに多くの研究がなされており、*in vivo* での併用効果についても MPC またはその Pro-drug の 1 つである PMPC と ABPC^{6,10)}、CEX⁷⁾ あるいはその他の β -ラクタム剤¹¹⁾ などとの併用が動物の実験感染症モデルで報告されており、臨床の場合でも PMPC と PVPC¹²⁾ との併用などが試みられている。2 剤の併用効果の検討に際して重要な因子の一つは両剤の配合比率である。本報では BMPC と同系統の薬剤としてすでに臨床に用いられている PMPC (50mg 製剤) と AMPC (250 mg 製剤) の量を参考として、BMPC : AMPC の配合比は 1 : 5 を基本とし、両剤を均等に併用した場合 (1 : 1)、ならびに両剤の比を逆転させた場合 (5 : 1) の 3 条件について検討を行なった。

本報では、*in vitro* で MPC と AMPC との間に *E. coli*, *S. marcescens*, *E. aerogenes* に対して強い相乗効果が認められたが、*Neu*⁹⁾ も *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* など一部の共通する菌について同様の知見を認めている。しかし、BMPC を用いて経口投与により *in vivo* で AMPC との併用効果について検討した例は過去にない。BMPC は単剤でも前報²⁾ に示したようにグラム陰性桿菌の腹腔内感染モデル系および上行性尿路感染モデル系において、感受性菌に対しては高い治療効果を示した。本報で用いた供試菌株は MPC, AMPC のいずれか一方あるいは両方に対し耐性を示す株であったが、両剤を併用するとこれらの耐性菌に対してもかなり良好な治療効果を得ることができた。

これらの菌の MPC および AMPC に対する耐性機構は明らかではないが PADAC 法¹³⁾ による β -ラクタマーゼ産生能試験の結果では *E. coli* F-2519 *E. aerogenes* F-1949 は β -ラクタマーゼ産生能を示さず、*S. marcescens* T-55 は弱い活性を示したに過ぎなかった。したがって、これらの菌株が両剤に耐性になっている主な理由は薬剤の酵素的分解ではなく、作用点との親和性の低下や透過性の問題など他の要因に基づくものと推定されるが、現在のところ明らかではない。

In vitro で MPC と AMPC を併用した場合、*E. coli* F-2519 の形態は MIC 値より低い濃度ですでに卵型を呈しており、*E. aerogenes* F-1949 でも同様の傾向が認

められ併用によりバクテリアの細胞壁合成経路上、異なるステップを阻害されたことによって単剤の場合とは異なった影響が現れていることが推測された。

In vivo での併用効果の場合、両剤の血中濃度を経時的に測定し、単剤で投与された場合と各混合比で併用投与された場合の各薬剤の吸収、排泄などに変化が出るか否かを検討したが、結果的には両剤とも単剤で投与された場合とほとんど同一の最高血中濃度ならびに血中半減期を示し、併用することによって薬剤の吸収性などを含む生体内動態因子への影響はほとんどないことが推定された。

今後さらに上行性尿路感染モデルでの併用効果などについても検討を行ないたい。

文 献

- 1) 佐藤 清, 大橋洋一, 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) 望月治美, 山下錦也, 佐藤 清, 岡地 諒: Bacmecillinam (KW-1100) の *in vivo* 抗菌活性. *Chemotherapy* 33 (S-3): 20~26, 1985
- 3) SPRATT, B. G.: The mechanism of action of mecillinam. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 (Suppl. B): 13~19, 1977
- 4) KAWAKAMI, M.; Y. NAGAI, S. SHIMIZU & S. MITSUHASHI: Anti-microbial effect of combinations of colistin methanesulfonate and chloramphenicol. I. *in vitro* effect. *J. Antibiotics* 24: 884~891, 1971
- 5) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 6) VANDERVOGEL, G. B.; H. MATTIE & R. VANFURTH: The anti-bacterial activity of combinations of mecillinam and ampicillin *in vitro* and in normal and granulopenic mice. *Scand. J. Infect. Dis.* 15: 91~96, 1983
- 7) 大槻稚子, 奥 亨, 西野武志, 谷野輝雄, 五島瑳智子: Cephalixin と mecillinam の協力作用に関する研究. *Chemotherapy* 30: 939~953, 1982
- 8) MANY, W. J.; A. E. RUDERMAN, P. M. SOUTHERN & J. P. LUBY: The *in vitro* activity of mecillinam alone and in combination with other beta-lactam antibiotics. *Curr. Therapeut. Res.* 31: 475~484, 1982
- 9) NEW, H. C.: Synergy of mecillinam, a beta-amidinopenicillanic acid derivative, combined with beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 10: 535~542, 1976
- 10) SCHAAD, U. B.; L. M. GRIMM, G. BESKID, R. CLEELAND, J. D. NELSON & G. H. McCracken Jr.: Mecillinam alone and in combination with ampicillin or moxalactam in experimental *Escherichia coli* meningitis. *Infection* 10: 90~96, 1982
- 11) GRUNBERG, E.; R. CLEELAND, G. BESKID & W.

- F. DELORENZO: *In vivo* synergy between 6- β -amidino-penicillanic acid derivatives and other antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 9 : 589~594, 1976
- 12) БУКН, N. : A fixed combination of pivmecillinam and pivampicillin in complicated urinary-tract infections—double-blind comparison with pivmecillinam alone in hospitalized-patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 15 : 195~199, 1983
- 13) SCHINDLER, P. & G. HUBER : Use of PADAC, a novel chromogenic beta-lactamase substrate for the detection of beta-lactamase producing organisms and assay of beta-lactamase inhibitors/inactivators. In *Enzyme Inhibitors*. by U. Brodbeck (ed.) Verlag Chemie. Weinheim, pp. 169~176, 1980

SYNERGISTIC EFFECTS OF BACMECILLINAM (KW-1100) AND AMOXICILLIN : STUDIES IN VITRO AND IN EXPERIMENTAL MOUSE PROTECTION TESTS

HARUMI MOCHIZUKI, KIYOSHI SATO and RYO OKACHI

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

1188 Shimotogari, Nagaizumi, Sunto, Shizuoka, 411 JAPAN

Synergistic activity of bacmecillinam (BMPC, KW-1100) and amoxicillin (AMPC), in the combination ratio of 5 : 1, 1 : 1 and 1 : 5, was demonstrated *in vitro* and in experimental mouse protection tests infected with *E. coli* F-2519, *S. marcescens* T-55 and *E. aerogenes* F-1949.

E. coli F-2519 showed MIC of 25 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against MPC and AMPC, respectively, with the MICs between 0.39 to 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ when the two drugs were combined. ED_{50} of BMPC and AMPC was >4000 and 193 mg/kg alone in the mouse protection test infected with the organism, but the ED_{50} s were lowered to 49.9-168 mg/kg when the two drugs were administered in combination.

S. marcescens T-55 was resistant to MPC and AMPC with MIC of >400 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. In combination with the two drugs, the MICs were distributed between 6.25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. ED_{50} of BMPC and AMPC were >2000 and 159 mg/kg alone, but the ED_{50} s changed in a range of 75.3-329 mg/kg in combination, too.

E. aerogenes F-1949 exhibited MIC of 3.13 and >400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against MPC and AMPC. In the combination studies, the MICs were lowered to 1.56-3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Separately, neither of the two drugs were effective in mouse protection test, but the ED_{50} s of 91.6-280 mg/kg were obtained in combined administration.