

Bacmecillinam (KW-1100) の *in vitro* 抗菌力および作用機作

佐藤 清・峯浦和幸・岡地 諒

協和醸酵工業株式会社医薬研究所

新しい経口吸収性プロドラッグであるバクメシリナム (KW-1100, BMPC) の *in vitro* 抗菌力を活性体であるメシリナム (MPC) とともに各種標準株、臨床分離株を対象として検討した。

1. KW-1100 はそれ自体ではグラム陽性菌、陰性菌に弱い抗菌力を示し、そのスペクトラムは MPC に類似していた。
2. KW-1100 の活性体である MPC の抗菌力は標準株のグラム陽性菌に対しては ABPC, AMPC, CBPC, CEX より劣っていたが *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* などのグラム陰性桿菌に対しては上記抗生物質より優れていた。
3. MPC に対する臨床分離株の感受性分布を検討した結果、MPC は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii* に対して ABPC, CEX より低い濃度で有効であった。
4. 臨床分離株に対する MPC と ABPC との感受性相関について検討した結果 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* および *C. freundii* では ABPC と MPC の間に交叉耐性を示す割合が少なく、たとえば *E. coli* では ABPC 耐性菌 (MIC: $> 50 \mu\text{g/ml}$) の 64.7% が MPC に感受性 (MIC: $< 3.12 \mu\text{g/ml}$) であった。
5. MPC の作用機作について検討し、MPC は無細胞抽出系で大腸菌のペニシリン結合蛋白 PBP-2 に特異的に結合することを確認した。

Bacmecillinam (BMPC, KW-1100) は1972年に報告された半合成ペニシリンである mecillinam (MPC, amdinocillin, FL-1060)¹⁾ の経口吸収性を改善することを目的として合成された pro-drug の1つであり、Fig. 1 に示したように MPC の3位に 1'-ethoxycarbonyloxye-

thyl ester 基をもつ新しい経口用抗生物質である。

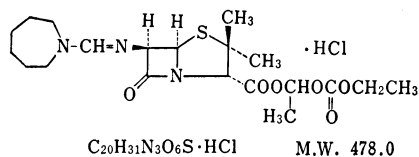
MPC は従来の半合成ペニシリンとは異なり、グラム陽性菌よりむしろグラム陰性菌を中心とした細菌に強い抗菌力を示すという特徴をもっていたが、経口で投与された場合消化管からの吸収が良くなかったので、経口吸収性を改善するためにすでに pivaloyloxymethyl ester を導入した pivmecillinam (PMPC, amdinocillin pivaloxil) が開発されているが、BMPC はそれとは異なり、前記の新しいエステル基を導入することによりさらに経口吸収性などの諸性質が改良されたものである²⁾。

BMPC はそれ自体では抗菌力をほとんど示さないが、経口で投与されると消化管壁等に分布する非特異的エステラーゼの作用により速やかに脱エステル反応を受け、活性体の MPC となって抗菌活性を発現するといわれている³⁾。

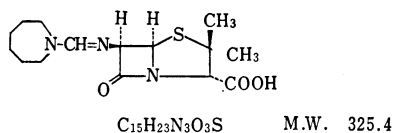
我々は今回 BMPC および MPC の *in vitro* 抗菌力について各種標準株および臨床分離株を被検菌として検討を行ない、さらにその作用機作の面から大腸菌のペニシリン結合蛋白への作用について検討を加えたので報告する。

I. 実験材料および実験方法

Fig. 1 Structures of bacmecillinam (KW-1100) and mecillinam



Bacmecillinam (BMPC; KW-1100)



Mecillinam (MPC; Amdinocillin)

1. 供試試薬

BMPC (Bacmceillinam, $\cdot$ HCl; MPC 換算 677 μ g/mg) はスウェーデンの Astra 社で合成されたものを使用した。MPC (lot. 43-780614, 99.4%) はデンマーク Leo 社より供与されたものを使用した。本研究における BMPC はすべて MPC としての力価で表示した。また ampicillin (ABPC; ampicillin $\cdot$ Na 920 μ g/mg) および amoxicillin (AMPC; amoxicillin 830 μ g/mg) は協和醸酵工業(株), carbenicillin (CBPC, グリペニン注射用, 注射用カルベニシリンナトリウム, 1 g 力価) は藤沢薬品工業(株), cephalixin (CEX, ケフレックスカプセル, 250 mg 力価) は塩野義製薬(株)のものを使用した。また [14 C] benzylpenicillin $\cdot$ potassium salt (14 C-PCG; Specific activity 54 mCi/mmol) は Amersham 社のものを使用した。

2. 供試菌株

抗菌力の測定に用いた標準株ならびに臨床分離株は協和醸酵工業(株)医薬研究所に保存してあるものを使用し、ペニシリン結合蛋白の実験には *E. coli* NIHJ JC-2 株を用いた。

3. 試験管内抗菌力の測定

被検菌の前培養には MUELLER HINTON Broth (MHB) 培地 (Difco Labs.) を用いた。最小発育阻止濃度(MIC)の測定には MUELLER HINTON Agar (MHA) 培地 (Difco Labs.) を使用した。日本化学療法学会標準法⁴⁾に従い、各薬剤の倍数希釈液を含む MHA 培地を調製し、その上にあらかじめ一夜前培養した被検菌を所定の接種菌量になるよう調製した菌液を接種し、37℃ で 18 時間培養後 MIC (μ g/ml) を測定した。接種菌量としては標準株に対する抗菌力の測定に 10^6 cells/ml を用い、臨床分離株の感受性の測定に 10^6 および 10^8 cells/ml を使用した。

4. ペニシリン結合蛋白への作用

4-1 *E. coli* のペニシリン結合蛋白(PBPs)の調製法 PBPs の調製は Spratt^{5,6)} および松橋⁷⁾ の方法に準じて行なった。*E. coli* NIHJ JC-2 を PENASSAY broth (Antibiotic Medium 3; Difco Labs.) に接種し、37℃ で対数増殖後期に達するまで振盪培養した。それを冷却下で遠心集菌し、0.01M phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗浄した。菌体を 0.14 M 2-mercaptoethanol 含有 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) に再浮遊し、氷冷下で超音波処理により破碎し、8,000 $\times$ g, 20 分の遠心上清を 100,000 $\times$ g, 30 分の超遠心にかけ細胞膜画分を得た。Folin 法で蛋白定量を行ない、蛋白含量が 20mg/ml になるように膜浮遊液を調製し PBPs 画分として使用した。

4-2 MPC と 14 C-PCG の competition 反応

上記 PBPs 画分 100 μ l と所定濃度の MPC 希釈液 5 μ l を混合し、30℃ 10 分間 pre-incubate した後 14 C-PCG (50 μ Ci/ml) 10 μ l を加え、30℃ で 10 分間保温した。ついで、非放射性 PCG (約 100 mg/ml) 5 μ l を加え、さらに Na-lauroyl-sarcosinate の 20% 溶液 5 μ l を添加して室温に 20 分間静置後、15,000 $\times$ g, 30 分間遠心した。上清 100 μ l に gel sample buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8; 3% SDS; 30% glycerol; 0.002% bromophenol blue) 50 μ l, 2-mercaptoethanol 10 μ l を加え 100℃ で 3 分間加熱した。

4-3 Fluorogram の作成

上記反応液 50 μ l を 7.5% SDS-polyacrylamide slab gel に charge し、約 4 時間電気泳動を行なった(25 mA)。泳動を終ったゲルは固定、洗浄後 dimethylsulphoxide に溶解した 2,5-diphenyloxazole (PPO) をしみ込ませ水洗、乾燥後、X-ray film (LKB Ultrafilm [3 H]) に密着し、-80℃ で 30 日間感光して fluorogram を作成した⁸⁾。各 PBP に対する 14 C-PCG の結合を 50% 阻害する MPC の量 (I_{50}) は X-ray film の黒化度を Dual-Wavelength TLC scanner CS-900 (島津製作所) を用いて測定した。

II. 実験結果及び考察

1. 標準株に対する試験管内抗菌力

グラム陽性菌、陰性菌を含む各種標準株に対する試験管内抗菌力を測定した結果を Table 1 に示した。BMPC はそのままで弱いながらグラム陽性菌、グラム陰性菌に広範囲な抗菌スペクトルを示し、そのスペクトルは後に示す MPC のそれと類似していた。BMPC は生体内の非特異的エステラーゼの関与により速やかに活性体である MPC に転換し抗菌力を発現するとともに、非酵素的にも徐々にではあるが MPC に転換することが知られており、ここで認められた BMPC の抗菌力は寒天希釈法による assay の操作中あるいは 37℃, 18 時間の培養中に部分的にエステル残基が加水分解を受け、離脱して生成した活性体である MPC にもとづく抗菌力であると考えられる。したがって、BMPC 試験管内抗菌力は MPC の抗菌力をもって論ずるのが適当と思われるので以降の *in vitro* の実験にはすべて MPC を用いることとした。

MPC の抗菌力に関してはすでに内外の研究者により多くの報告が見られるが^{1,9-11)}、本報でもそれらの結果にほぼ類似する結果が得られた。すなわち、MPC はグラム陽性菌に対する抗菌力は ABPC, AMPC, CBPC, CEX より弱い、それに反して *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *C. freundii* および一部の *Proteus* sp. な

Table 1 In vitro antibacterial activity against standard strains

	MIC($\mu\text{g/ml}$)					
	BMPC	MPC	ABPC	AMPC	CBPC	CEX
<i>S.aureus</i> 209-P	12.5	6.25	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
<i>S.aureus</i> Smith	50	12.5	<0.2	<0.2	<0.2	1.56
<i>S.epidermidis</i>	50	12.5	<0.2	<0.2	0.78	1.56
<i>S.pyogenes</i> F-10	6.25	1.56	≤ 0.01	≤ 0.01	0.02	0.39
<i>S.pyogenes</i> S-23	6.25	1.56	≤ 0.01	≤ 0.01	0.02	0.2
<i>S.pneumoniae</i> II	50	12.5	0.01	0.01	0.2	3.12
<i>S.pneumoniae</i> III	25	6.25	0.02	≤ 0.01	0.2	3.12
<i>E.coli</i> NIHJC-2	0.78	<0.2	12.5	6.25	12.5	12.5
<i>E.coli</i> GN 2411-5	0.39	<0.2	3.12	3.12	6.25	6.25
<i>E.coli</i> Juhl	0.78	<0.2	3.12	3.12	6.25	6.25
<i>E.coli</i> S 1112	12.5	1.56	*	*	*	6.25
<i>K.pneumoniae</i> 8045	<0.2	0.2	0.78	0.78	3.12	3.12
<i>K.pneumoniae</i> Y-60	12.5	0.78	*	*	*	50
<i>S.marcescens</i> F-26	1.56	0.39	100	100	25	*
<i>S.marcescens</i> T-55	3.12	0.78	12.5	6.25	6.25	100
<i>P.mirabilis</i> 1287	*	100	3.12	1.56	0.78	25
<i>P.vulgaris</i> 6897	*	*	12.5	50	0.78	25
<i>P.vulgaris</i> S 1117	0.78	<0.2	100	*	25	*
<i>P.morganii</i> KY 4298	*	100	*	*	0.78	*
<i>P.rettgeri</i> KY 4289	1.56	0.39	100	*	0.78	*
<i>C.freundii</i> S 1118	0.78	0.2	*	*	*	*

Inoculum size : 1 loopful of 10^6 cells/ml * >100 $\mu\text{g/ml}$

どのグラム陰性桿菌には、いずれもこれらの抗生物質より強い抗菌力を示した。これらの菌株の中で *E. coli* S 1112, *K. pneumoniae* Y-60 株のような ABPC, AMPC, CBPC に対して耐性を示す株が MPC に対しては高い感受性を示すことなどの特徴が認められた。これらは後に述べるように MPC の作用機作が従来の β -ラクタム抗生物質の作用点とは大きく異なりペニシリン結合蛋白 (PBPs) の 2 に特異的に結合することも原因の一つになっていると考えられる。

一方で、MPC は *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* に対してはほとんど抗菌力を示さなかった。

2. 臨床分離株の感受性分布

臨床材料より分離された各種被検菌に対する MPC の感受性分布を ABPC, CEX を対照薬剤として比較した結果を Fig. 2 に示した。図から明らかなように *E. coli* (77株) は 10^6 , 10^8 cells/ml ともに MPC に対する感受性は他の 2 剤と比較すると非常に高く、 10^6 cells/ml の接種菌量で MIC₅₀ は MPC 0.20, CEX, ABPC ともに 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、 10^8 cells/ml では MPC 0.39, CEX 6.25, ABPC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。*K. pneumoniae* (62株) は 10^6 cells/ml では MPC に対して高い感受性を示

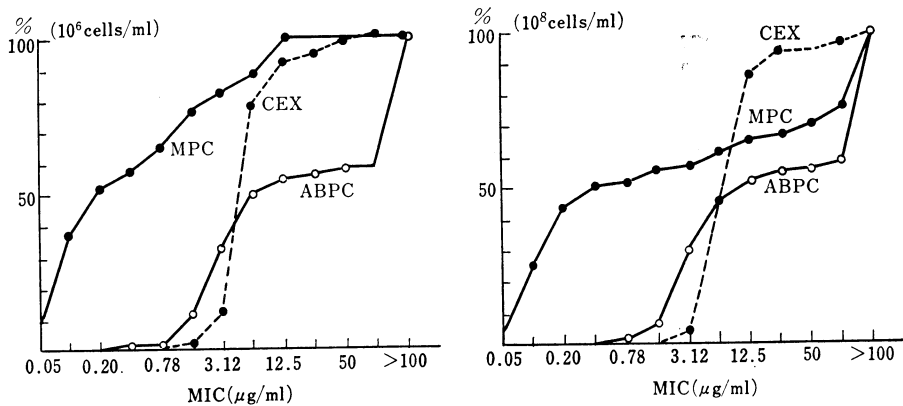
し MIC₅₀ が MPC 0.39, CEX 6.25, ABPC 50 $\mu\text{g/ml}$ であったのに反し、 10^8 cells/ml では MPC >100, CEX 3.12, ABPC >100 $\mu\text{g/ml}$ となって MPC は ABPC とともに接種菌量の影響を受け易い傾向が認められた。*P. mirabilis* に対しては MPC は ABPC, CEX, と比較すると感受性菌はより低い MIC をもつものの感受性分布曲線は ABPC, CEX より緩やかな勾配を示した。また *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* の 3 菌種に対しては他剤と同じくあまり有効でなかった。一方、MPC は *Enterobacter* および *Citrobacter* に対しては強い抗菌力を示し *E. cloacae*, *E. aerogenes* とともに 10^6 , 10^8 cells/ml の接種菌量で ABPC, CEX よりかなり高感受性側に寄った分布曲線を示した。また、*C. freundii* (65株) も 10^8 cells/ml の条件下では *Enterobacter* の場合と同じくやや耐性株が多く見られるものの MIC₅₀ は ABPC, CEX に比較すると非常に低い値が得られた。全般的に本剤は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* および *Citrobacter* に対し ABPC, CEX より優れた強い抗菌力を有し、その傾向はとくに低菌量 (10^6 cells/ml) の場合に顕著であるといえることができる。

3. 臨床分離株の感受性相関

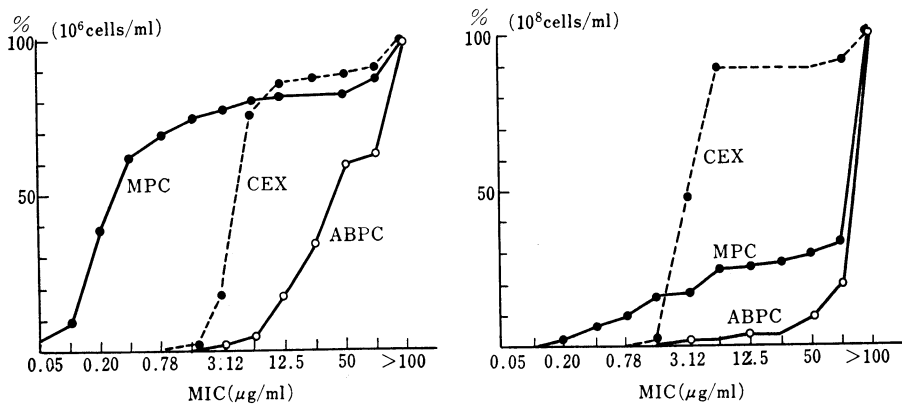
前記の臨床から分離された各菌株に対する MIC 値を

Fig. 2 Cumulative sensitivity distribution of MPC, ABPC and CEX against clinically isolated Gram negative bacteria

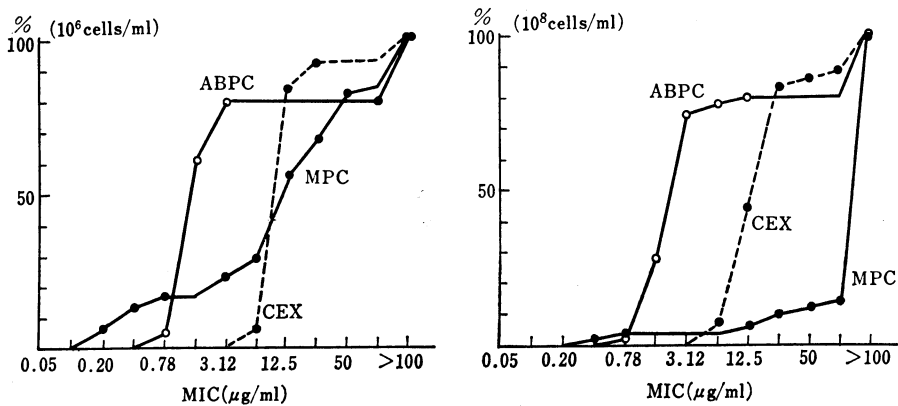
E. coli (77 strains)



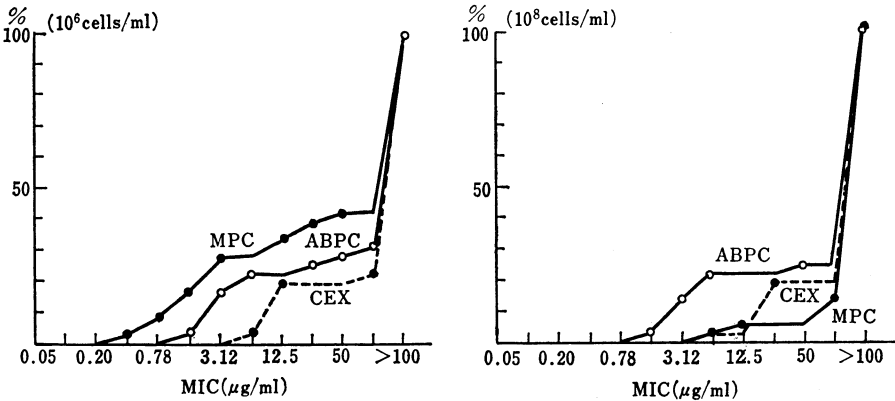
K. pneumoniae (62 strains)



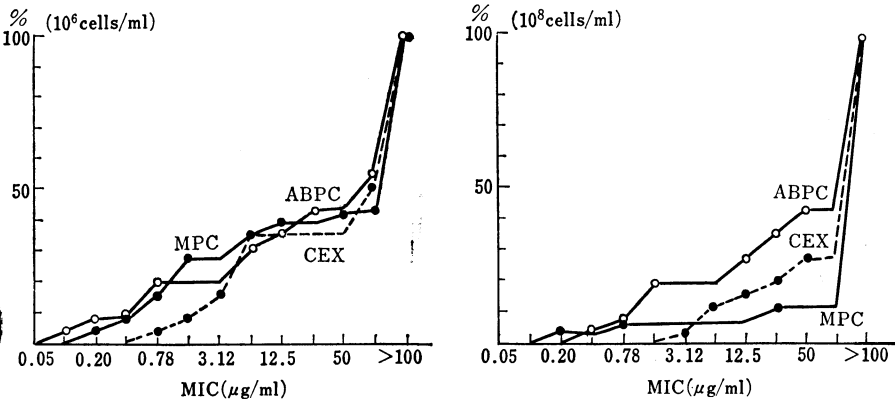
P. mirabilis (53 strains)



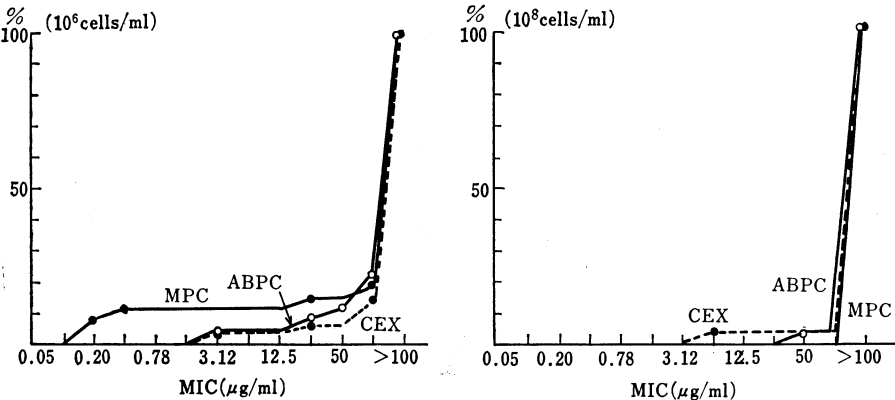
P.vulgaris (36 strains)



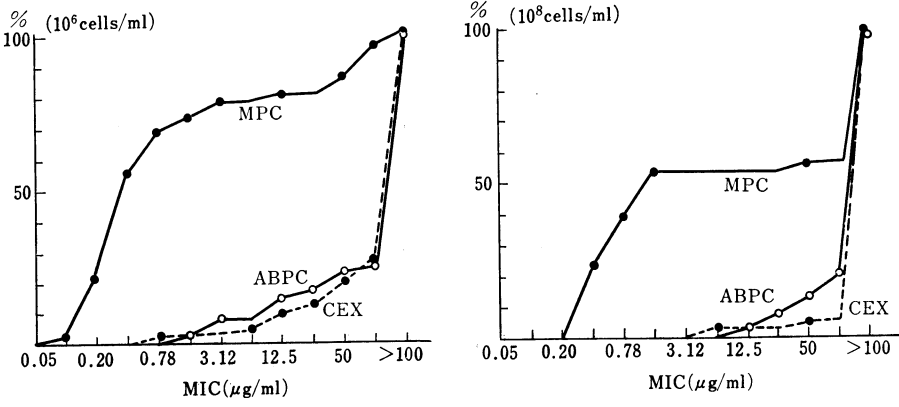
P.rettgeri (26 strains)



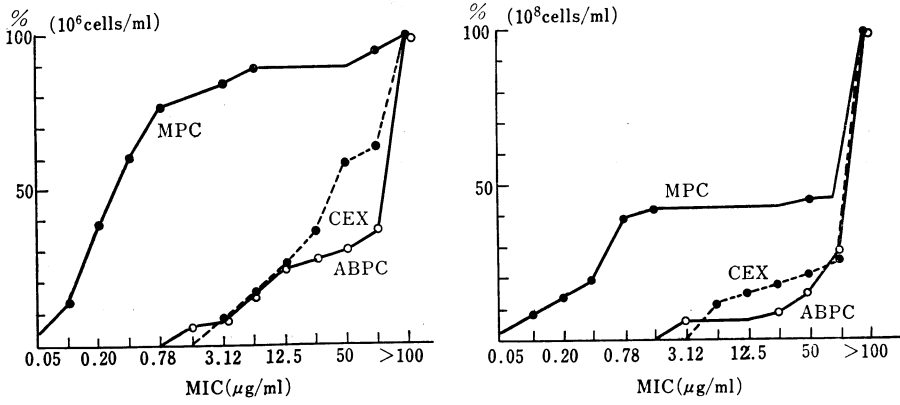
P.morganii (27 strains)



E. cloacae (41 strains)



E. aerogenes (36 strains)



C. freundii (65 strains)

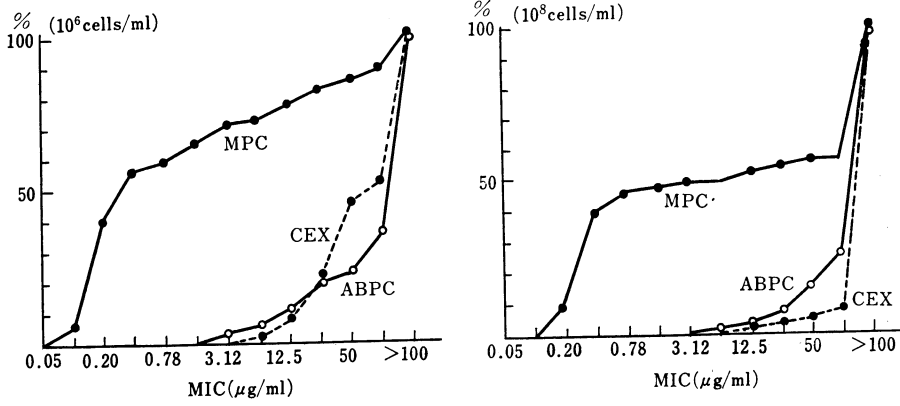
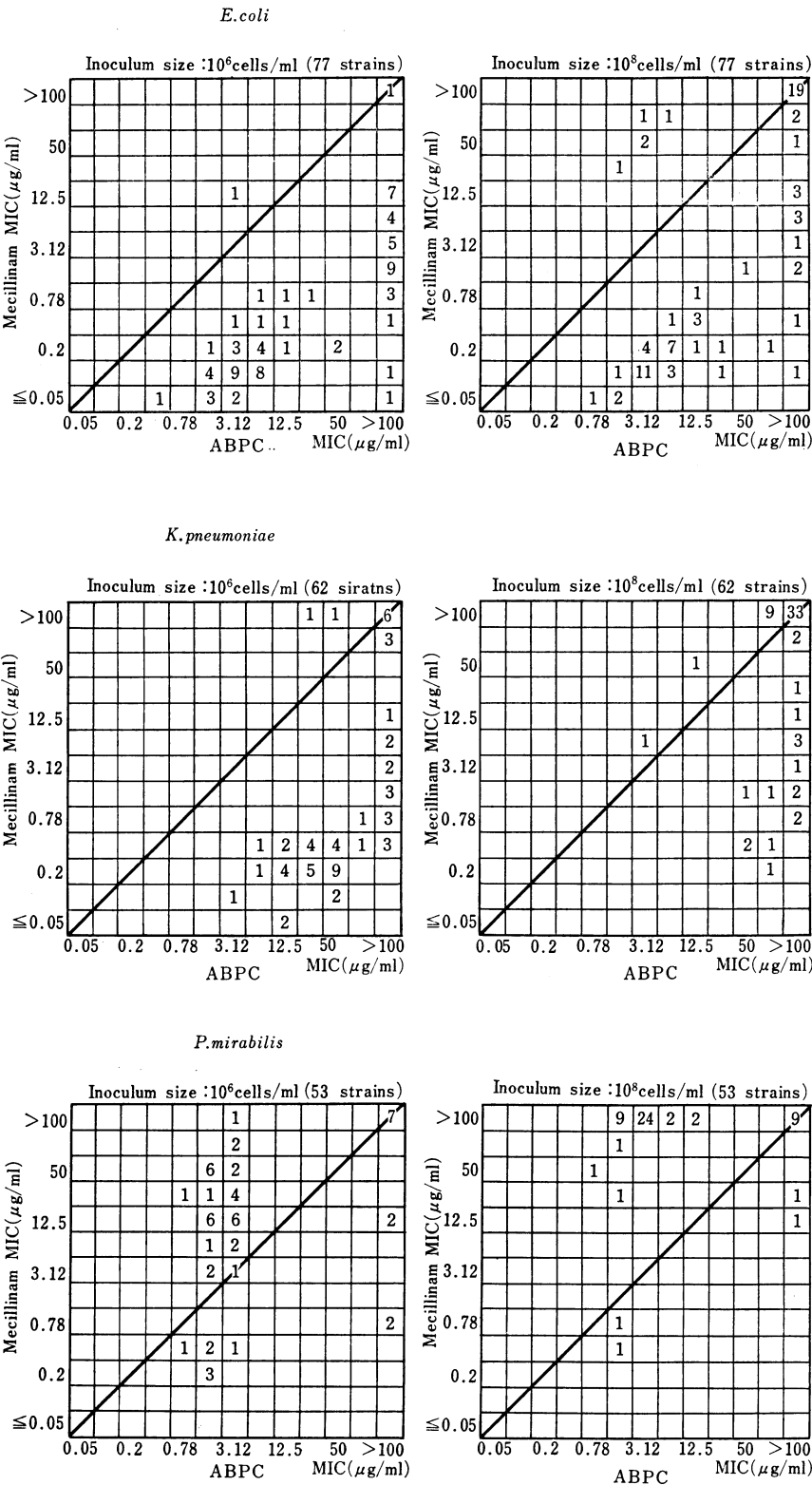
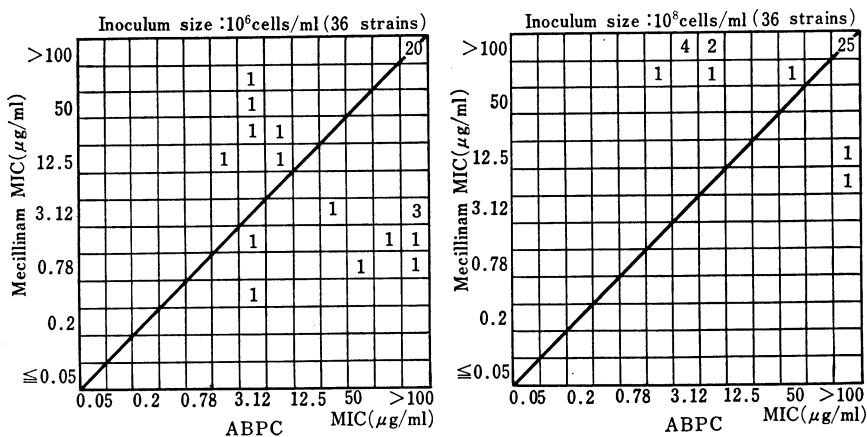
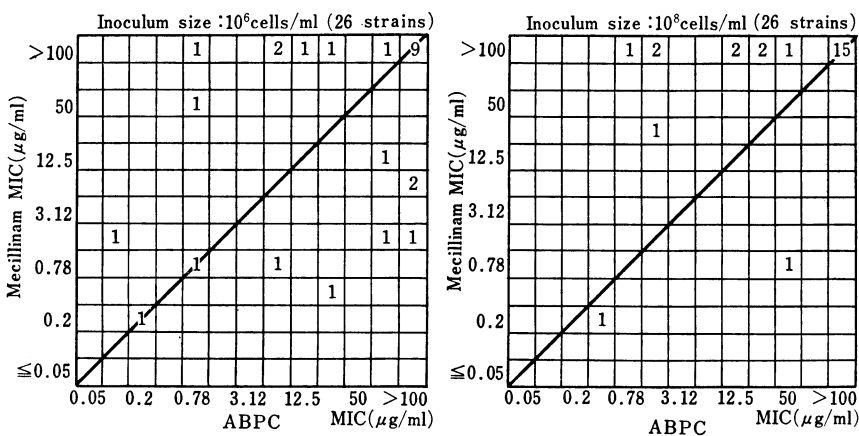
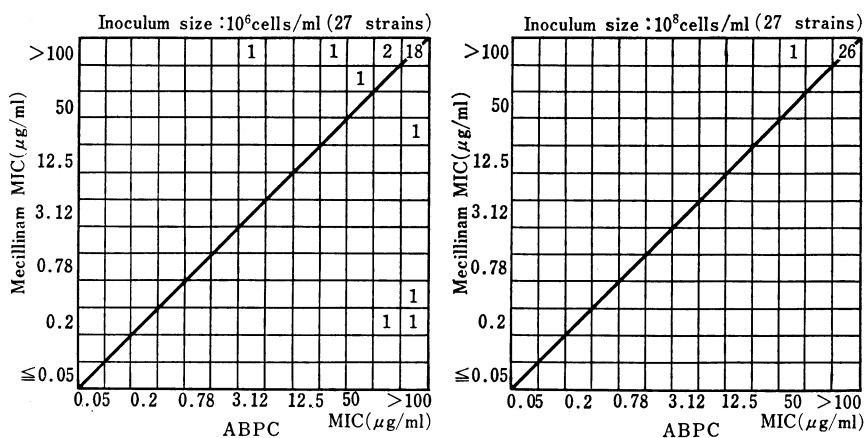
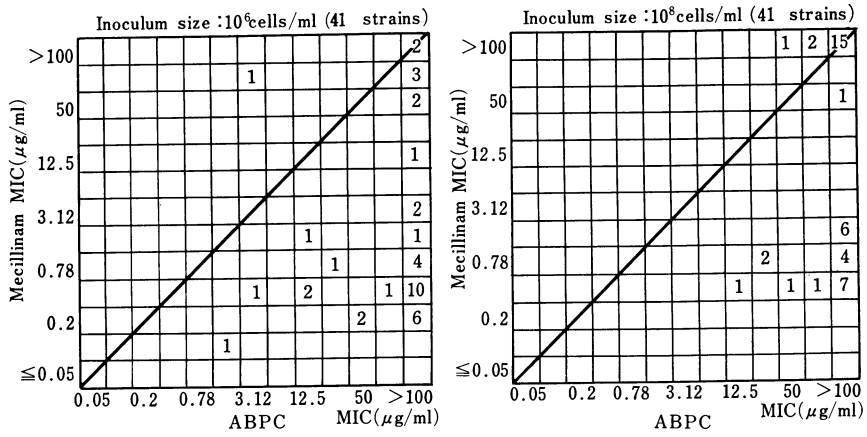


Fig 3 Correlogram of MICs of Mecillinam and ABPC against clinically isolated Gram negative bacteria

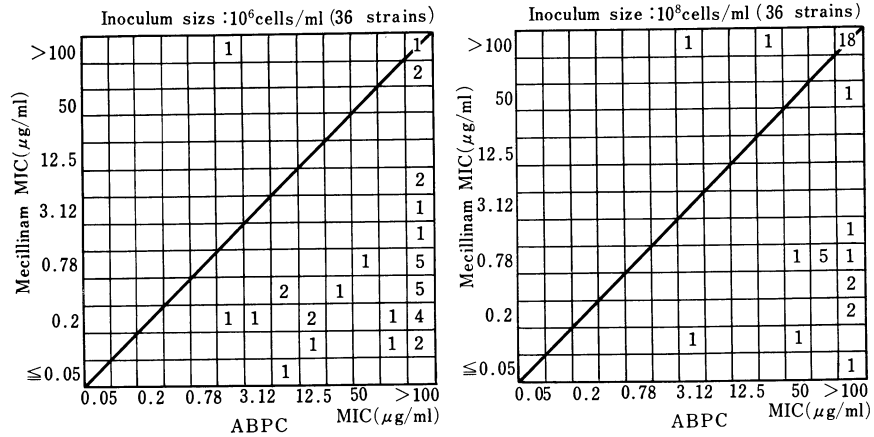


P. vulgaris*P. rettgeri**P.morganii*

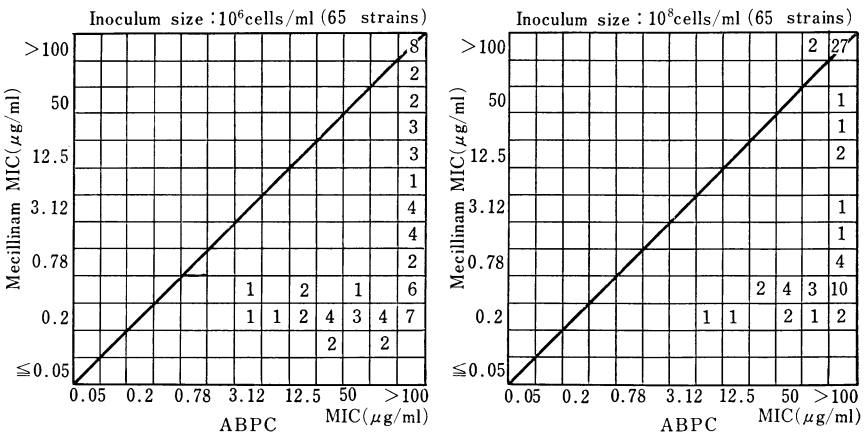
E. cloacae



E. aerogenes



C. freundii



もとに MPC と ABPC の感受性相関を Fig. 3 に示した。図から明かなように MPC は *E. coli* (10^6 cells/ml) に対して ABPC より相対的に優れた MIC を示し、ABPC 耐性菌 (MIC : $50 \mu\text{g/ml}$ 以上) 34 株のうち 64.7 % にあたる 22 株に対して $3.12 \mu\text{g/ml}$ 以下の低い MIC 値を示した。また *K. pneumoniae* の ABPC 耐性菌 (MIC : $50 \mu\text{g/ml}$ 以上) 41 株に対しても、その 68.3% に相当する 28 株に MPC は $3.12 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を示し、交叉耐性を示す割合は少なかった。ほぼ同様の傾向が *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii* においても認められたが、*P. mirabilis* およびその他の *Proteus* 属の菌に対しては逆の傾向が認められ、ABPC の方が全体的に良い感受性を示した。

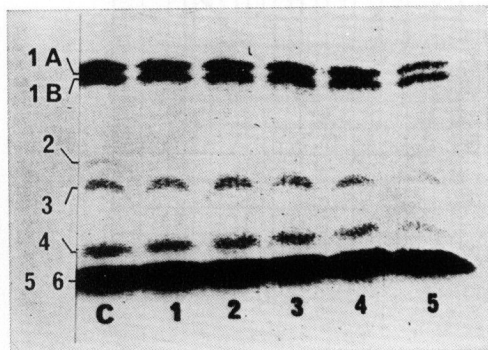
4. ペニシリン結合蛋白 (PBPs) への作用

E. coli NIHJ JC-2 株より調製した PBPs に対する MPC の作用を plate 1 に示した。この写真から明らかな

plate 1 Fluorogram of competition of MPC with ^{14}C -PCG for binding to *E. coli* NIHJ JC-2 PBPs

Concentration of mecillinam ($\mu\text{g/ml}$)

C; 0 2; 0.05 4; 5
1; 0.005 3; 0.5 5; 50



なごとく、MPC は $0.05 \mu\text{g/ml}$ の濃度で PBP-2 への ^{14}C -PCG の結合を選択的に阻害した。また、TLC-scanner で走査した結果を Fig. 4 に示したが、本図からも PBP-2 のピークが MPC $0.05 \mu\text{g/ml}$ 添加の条件下でほぼ完全に消失していることが認められる。一方、Fig. 5 に示したように本実験から求められた PBP-2 に対する MPC の I_{50} 値は $0.02 \mu\text{g/ml}$ であるのに反し、その他の PBPs に対する I_{50} 値はいずれも $50 \mu\text{g/ml}$ より大きい値を示し、この結果からも MPC が PBPs の中でもとくに PBP-2 に対して非常に高い特異性をもって結合することが示され、Spratt^{12,13)} により述べられている事実が改めて確認された。

文 献

1) LUND, F. & L. TYBRING : 6- β -Amidinopenici-

Fig. 4 Chart of competition of MPC with ^{14}C -PCG for binding to *E. coli* NIHJ JC-2 PBPs

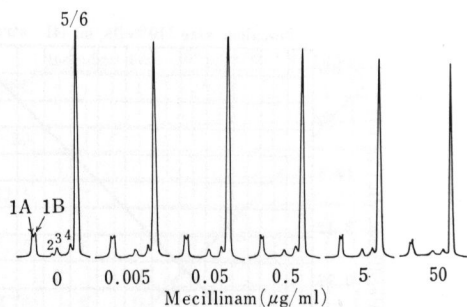
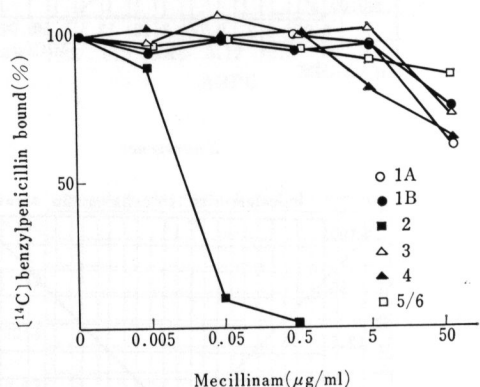


Fig. 5 Competition of MPC with ^{14}C -PCG for binding to *E. coli* NIHJ JC-2 PBPs



Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	I_{50} for PBPs ($\mu\text{g/ml}$)					
		1A	1B	2	3	4	5/6
Mecillinam	0.05	>50	>50	0.02	>50	>50	>50

a : I_{50} , Concentration of mecillinam required to inhibit ^{14}C benzylpenicillin binding by 50%

llanic acids—a new group of antibiotics. Nature New Biol. 236 : 135~137, 1972

- JOSEFSSON, K. ; T. BERGAN, L. MAGNI, B.G. PRING & D. WESTERLUND : Pharmacokinetics of bacmecillinam and pivmecillinam in volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol. 23 : 249~252, 1982
- WESTERLUND, D. ; B. PETTERSSON & J. CARLQVIST : Determination of bacmecillinam, an amdinocillin prodrug, in human and canine whole blood by reversed phase liquid chromatography. J. Pharm. Sci. 71 : 1148~1151, 1982
- 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
- SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 2999~3003, 1975
- SPRATT, B. G. : Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. Eur. J.

- Biochem. 72 : 341~352, 1977
- 7) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫: ペニシリン結合蛋白質——理論と実際——Chemotherapy 27:827~840, 1979
- 8) LASKEY, R. A. : Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56 : 335~341, 1975
- 9) GREENWOOD, D. ; H. L. BROOKS, R. GARGAN & F. O'GRADY : Activity of FL 1060, a new β -lactam antibiotic, against urinary tract pathogens. J. Clin. Pathol. 27 : 192~197, 1974
- 10) 川辺晴英, 福岡義和, 林 敏雄, 沢田洋介, 斉藤和子, 三橋 進: Mecillinam に関する基礎的検討。Chemotherapy 25 : 12~19, 1977
- 11) 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. Therapeu. Res. 31 : 475~484, 1982
- 12) SPRATT, B. G. : The mechanism of action of mecillinam J. Antimicrob. Chemother. 3 (Suppl. B): 13~19, 1977
- 13) SPRATT, B. G. : Comparison of the binding properties of two 6- β -amidinopenicillanic acid derivatives that differ in their physiological effects on *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 11 : 161~166, 1977

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND MODE OF ACTION OF BACMECILLINAM (KW-1100)

KIYOSHI SATO, KAZUYUKI MINEURA and RYO OKACHI

Pharmaceuticals Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
1188 Shimotogari, Nagaizumi, Sunto, Shizuoka, 411 JAPAN

In vitro antibacterial activities of new oral pro-drug bacmecillinam (BMPC, KW-1100) and its active form mecillinam (MPC) were investigated against standard and clinically isolated pathogens.

1. BMPC, in itself, showed weak antibacterial activities, against Gram positive and negative bacteria with the similar spectrum to MPC.
2. MPC, active form of BMPC, exhibited stronger antibacterial activities against standard strains of Gram negative rods including *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* etc. than ABPC, AMPC, CBPC and CEX, though it was less active against Gram positive strains than the latter antibiotics.
3. MPC exhibited stronger antibacterial activities against clinically isolated *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* and *C. freundii* than ABPC and CEX.
4. 64.7% of ABPC resistant (MIC : $> 50 \mu\text{g/ml}$) strains of *E. coli* was susceptible (MIC : $< 3.12 \mu\text{g/ml}$) to MPC. The rate of cross resistance between ABPC and MPC was relatively low in *E. coli*, as well in *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* and *C. freundii*.
5. MPC bound specifically to penicillin-binding protein 2 of *E. coli* NIHJ JC-2 in cell free system.