

BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌作用および クラブロン酸の生菌中 β -lactamase に対する阻害効果について

中 沢 久¹⁾・井上松久²⁾・三橋 進¹⁾

¹⁾ エビゾーム研究所

²⁾ 群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

Clavulanic acid (CVA) と ticarcillin (TIPC) を 1:15 の比率で配合した注射用 β -lactam 剤である BRL 28500 の抗菌作用、ならびに生菌中に存在する β -lactamase に対する CVA の阻害効果について検討を行った。

(1) 標準菌株に対する BRL 28500 の抗菌力はグラム陽性菌で MIC 値が $\leq 0.05\sim 0.8 \mu\text{g/ml}$ 、グラム陰性菌で $0.2\sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ の範囲であり、TIPC 単独の抗菌力とほぼ同程度であった。

(2) β -lactamase 産生菌に対する BRL 28500 の抗菌力では、PCase および CXase 産生菌に対して BRL 28500 は TIPC 単独よりも遙かに強い抗菌力を有していた。しかし、CSase 産生菌に対しては TIPC 単独と同程度であった。

(3) 臨床分離株では *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* および *B. fragilis* に対して BRL 28500 は TIPC 単独より強い抗菌力を示した。また、 2.5 および $10 \mu\text{g/ml}$ の CVA を添加した場合の TIPC の抗菌力はさらに増強された。

(4) 生菌中の β -lactamase を阻害するために必要な CVA の量は、菌の β -lactamase 産生能および菌数により影響を受けた。大量に β -lactamase を産生する菌であっても、菌数が 10^9 cells/ml 以下であれば $2.0 \mu\text{g/ml}$ の CVA で 2 時間処理することによってほぼ完全な阻害効果がみられた。

β -lactamase 阻害剤である clavulanic acid (CVA) は 1976 年英国ビーチャム社によって発見された^{1,2)}。その後 CVA に関する数多くの研究が行われ、CVA とペニシリン系抗生物質の併用は β -lactamase を産生する菌に対して顕著な相乗効果を発揮することが証明されてきた^{3,4)}。これは CVA が临床上重大な問題となっているペニシリナーゼ (PCase) およびオキシイミノセファロスポリナーゼ (CXase) を強力に阻害するためである^{5,6)}。また、これらの β -lactamase に対する CVA 阻害機構について詳細な研究が行われ、CVA は β -lactamase と高い結合親和性を有するため、反応直後には競合的に阻害し、その後不可逆的に不活化することが知られている。しかし、現在までに行われた酵素学的検討のほとんどが精製された β -lactamase に対する CVA の作用機構であった。

今回、我々は注射用ペニシリンである ticarcillin (TIPC) と CVA の併用による抗菌作用および生菌中に正常な状態で存在している β -lactamase に対する阻害効果について検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CVA および TIPC はビーチャム薬品 (株) より分与

を受けた。また、CVA と TIPC を 1:15 の比率で配合し、BRL 28500 として使用した。Cephaloridin (CER) は鳥居薬品 (株)、penicillin G (PCG) は明治製菓 (株) よりそれぞれ分与を受けた。

2. 標準菌株

標準菌株および各種臨床分離細菌は、群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設の保存株を用いた。

3. 使用培地

感受性測定には Mueller-Hinton (MH) 寒天培地 (ニッスイ)、Proteose No.3 寒天培地 (Difco)、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地 (Difco) および GAM 寒天培地 (ニッスイ) を使用した。Bactericidal activity の測定には Antibiotic Medium 3 (ABM 3, Difco) を用いた。その他、BHI 液体培地 (Difco)、GAM 寒天培地、GAM 液体培地 (ニッスイ)、Trypticase soy 液体培地 (BBL)、BSG 溶液を使用した。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

日本化学療法学会標準法⁹⁾に従った。寒天平板希釈法により、感受性測定用ブイヨン培地で 37°C 、18 時間培養した試験菌液を約 10^8 cells/ml になるように BSG 溶液で希釈し、その $5 \mu\text{l}$ を薬剤含有平板に接種し、続いて 37°C で 18 時間培養後、その MIC を判定した。N.

gonorrhoeae の場合は 1% Hemoglobin (Difco), 1% Defined supplement (BBL) 加 Proteose No. 3 寒天培地で培養後, Trypticase soy 液体培地に菌を浮遊させ 10^8 cells/ml とし, 薬剤含有 1% Hemoglobin, 1% Defined supplement 加 Proteose No. 3 寒天培地に 5 μ l 接種し, 37°C で 18 時間ローソク培養を行い, MIC を求めた。*B. fragilis* の場合は GAM 寒天培地に菌を接種し MIC を求めた。各薬剤が被検菌の 50%, 75% および 90% の発育を阻止する MIC をそれぞれ MIC₅₀, MIC₇₅, MIC₉₀ とした。

5. 殺菌効果測定

試験菌を 37°C, 18 時間 ABM 3 培地で培養し, この菌液を希釈し, 菌数が 10^4 cells/ml となるよう新たな ABM 3 培地に接種し, 振とう培養を行った。培養 2 時間後, 薬剤を添加し, 経時的に生菌数を測定した。

6. β -lactamase の活性測定

β -lactamase の活性測定は UV 法¹⁰⁾により行った。基質として 500 μ M の PCG または 100 μ M の CER を用いた。

7. CVA の生菌中 β -lactamase に対する阻害効果の測定

A. 増殖を停止した菌に対する効果

β -lactamase 産生菌を ABM 3 培地で一夜培養し, その培養液を新たな ABM 3 培地で 20 倍に希釈し, 37°C で振とう培養を行った。培養液の OD₅₇₀ が 0.7 に達した時に遠心して集菌し, 菌体を BSG で 2 回洗浄した後, 約 10^8 cells/ml となるよう BSG に懸濁した。この懸濁液を 37°C で 2 時間加温した後, CVA を添加し, 静かに振とうしながらさらに 37°C の加温を続けた。この菌懸濁液を経時的に採取し, 冷却して遠心し, 液体を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄し, 同緩衝液に懸濁した。この菌液を超音波破碎し, 10,000 $\times g$ で 30 分間遠心し, 上清の酵素活性を測定した。

B. CVA の β -lactamase 阻害効果に対する菌数の影響

β -lactamase 産生菌を ABM 3 培地で上記と同様に培養し, 培養液の OD₅₇₀ が 0.7 に達した時に遠心して集菌し, 菌体を BSG で 2 回洗浄した後, 菌体を 10^8 ~ 10^{10} cells/ml の各種菌濃度となるように BSG 溶液に懸濁した。この懸濁液を 37°C で 2 時間加温後, CVA を最終濃度が一定となるよう添加し, さらに 37°C の加温を 2 時間続けた。その後, 遠心して集菌した菌体を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄し, 同緩衝液に懸濁して, 超音波破碎し, 10,000 $\times g$ で 30 分間遠心し, 上清の酵素活性を測定した。

II. 実験結果

1) 標準菌株に対する抗菌スペクトラム

標準菌株に対する BRL 28500 の抗菌力を TIPC, CVA および一定量の CVA を添加した場合の TIPC の抗菌力と比較検討した。結果を Table 1 に示す。BRL 28500 は, グラム陽性菌に対しては ≤ 0.05 から 0.8 μ g/ml, グラム陰性菌に対しては 0.2 から 12.5 μ g/ml でその発育を阻止し, 幅広い抗菌スペクトルを示した。*P. aeruginosa* に対しても MIC 1.56~12.5 μ g/ml と良好な値を示した。また, *K. pneumoniae* PCI 602 に対する抗菌力では, TIPC より 16 倍すぐれた値を示した。その他の菌に対しては, BRL 28500 と TIPC はほぼ同程度の抗菌力を示した。

2. β -lactamase の産生菌に対する抗菌力

代表的な β -lactamase を産生する菌に対する BRL 28500 の抗菌力を Table 2 に示す。全てのタイプのペニシラーゼ (PCase) およびオキシミノセファロスポリナーゼ (CXase) を産生する菌に対し BRL 28500 の抗菌力は TIPC より遙かに優れていた。また, 一定量の CVA を添加した場合の TIPC の抗菌力は CVA 添加量に相関して増強された。

3) 臨床分離細菌に対する感受性分布

臨床分離株の *S. aureus* (100 株), *S. epidermidis* (53 株), *E. coli* (175 株), *K. pneumoniae* (71 株), *C. freundii* (52 株), *E. cloacae* (54 株), *P. mirabilis* (109 株), *P. vulgaris* (38 株), *M. morgani* (50 株), *P. rettgeri* (54 株), *P. inconstance* (50 株), *S. marcescens* (50 株), *N. gonorrhoeae* (50 株), ampicillin (ABPC) 耐性 *H. influenzae* (46 株), *P. aeruginosa* (97 株), *X. maltophilia* (50 株), *A. calcoaceticus* (51 株), *B. fragilis* (37 株), *C. perfringens* (17 株), *C. difficile* (27 株) の計 20 菌種, 1,231 株に対する抗菌力について検討を行った。

グラム陽性菌の *S. aureus* および *S. epidermidis* に対して, CVA が 2, 5 および 10 μ g/ml 添加されることによって TIPC の抗菌力が増強した (Fig. 1, 2)。特に *S. aureus* では TIPC の MIC が 1.56 μ g/ml 以上の菌が 80% 以上であったが, CVA を 2 μ g/ml 添加することによって 90% 以上の株が 1.56 μ g/ml 以下の TIPC で発育を阻止された。

ABPC 耐性 (MIC > 100 μ g/ml) の *E. coli* 77 株に対する感受性を Fig. 3 に, その他の *E. coli* 98 株の結果を Table 3 に示した。ABPC 耐性の *E. coli* に対し, TIPC 単独ではほとんどの株が 200 μ g/ml 以上の MIC 値を示し, 50% 以上の株が 800 μ g/ml 以上の高度耐性株であった。しかし, CVA を 1 μ g/ml 添加するだけで 50% 以上の株が 25 μ g/ml 以下の MIC となり, 5 μ g/ml の

Table 1 Antibacterial activity of BRL28500 against standard strains of bacteria

(10⁶cells/ml)

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					CVA
	BRL28500	TIPC	TIPC+ CVA(2)*	TIPC+ CVA(5)*	TIPC+ CVA(10)*	
<i>S. aureus</i> FDA209P JCI	0.8	0.8	0.4	0.1	≤ 0.05	25
<i>S. aureus</i> Terajima	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	3.13
<i>S. aureus</i> MS353	0.8	0.4	0.1	≤ 0.05	≤ 0.05	6.25
<i>S. pyogenes</i> Cook	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	3.13
<i>M. luteus</i> ATCC9341	0.1	0.1	0.1	≤ 0.05	≤ 0.05	25
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.1	0.1	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	12.5
<i>E. coli</i> NIHJ. JC2	1.56	1.56	1.56	0.8	0.2	12.5
<i>E. coli</i> K12 C600	1.56	1.56	1.56	0.8	0.4	25
<i>K. pneumoniae</i> PCI602	1.56	25	0.4	0.2	0.05	12.5
<i>S. typhimurium</i> IID971	0.8	0.8	0.8	0.4	0.4	25
<i>S. typhi</i> 901	0.4	0.4	0.4	≤ 0.05	≤ 0.05	6.25
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	50
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4	25
<i>S. enteritidis</i> G14	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	25
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8	50
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	50
<i>P. aeruginosa</i> PA01	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	100
<i>P. morgani</i> IFO3848	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	50
<i>P. mirabilis</i> IFO3849	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	50
<i>P. vulgaris</i> OX19	0.4	0.4	0.4	≤ 0.05	≤ 0.05	12.5
<i>P. vulgaris</i> HX19	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	50
<i>P. rettgeri</i> IFO3850	0.2	0.2	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	50
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	1.56	1.56	1.56	3.13	6.25	25
<i>E. cloacae</i> 963	1.56	1.56	3.13	6.25	25	25

*In the presence of CVA

Table 2 Antibacterial activity of BRL28500 against β -lactamase producing strains(10⁶cells/ml)

Strains	Type of β -Lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					CVA
		BRL28500	TIPC	TIPC+ CVA(2)	TIPC+ CVA(5)	TIPC+ CVA(10)	
<i>E. coli</i> W3630 (Rms212)	PCase I	25	>800	12.5	6.25	3.13	25
<i>E. coli</i> W3630 (Rms213)	PCase II	12.5	50	6.25	3.13	1.56	25
<i>E. coli</i> ML1410 (Rte 16)	PCase III	25	>800	12.5	3.13	1.56	100
<i>E. coli</i> C (Rms149)	PCase IV	25	>800	12.5	3.13	0.8	25
<i>P. aeruginosa</i> MI (Rms139)	PCase V	50	>800	50	25	12.5	100
<i>E. coli</i> GN5482	CSase	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	25
<i>E. cloacae</i> GN7471	CSase	50	50	50	25	6.25	25
<i>C. freundii</i> GN7391	CSase	>100	>800	>100	>100	>100	50
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	CSase	12.5	12.5	12.5	12.5	2	200
<i>M. morgani</i> GN5407	CSase	0.8	0.8	0.8	1.56	3.13	50
<i>S. marcescens</i> GN10857	CSase	>100	>800	>100	>100	>100	200
<i>P. vulgaris</i> GN7919	CXase	12.5	200	3.13	0.8	0.2	25

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates : *S. aureus* (10^6 cells/ml)

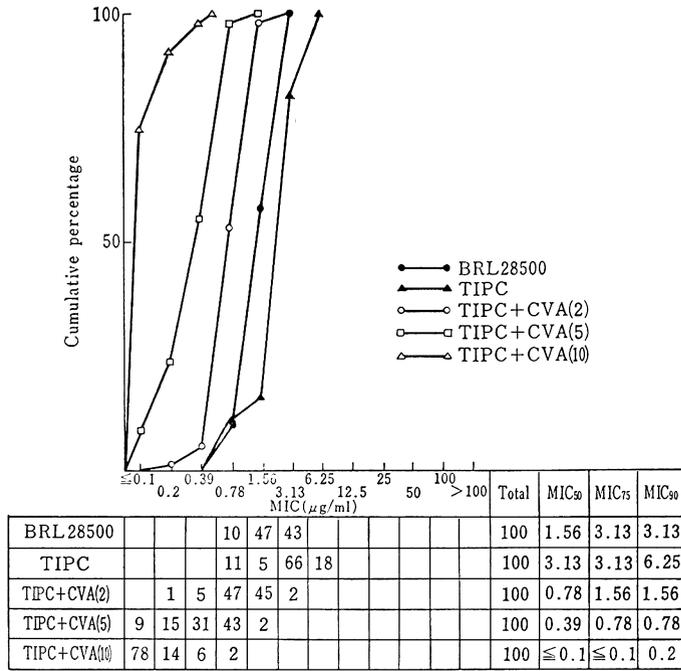


Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates : *S. epidermidis* (10^8 cells/ml)

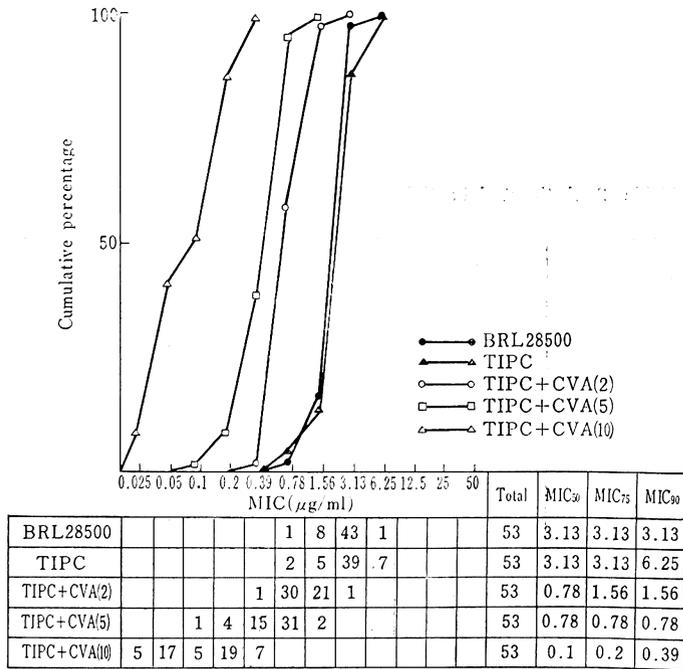
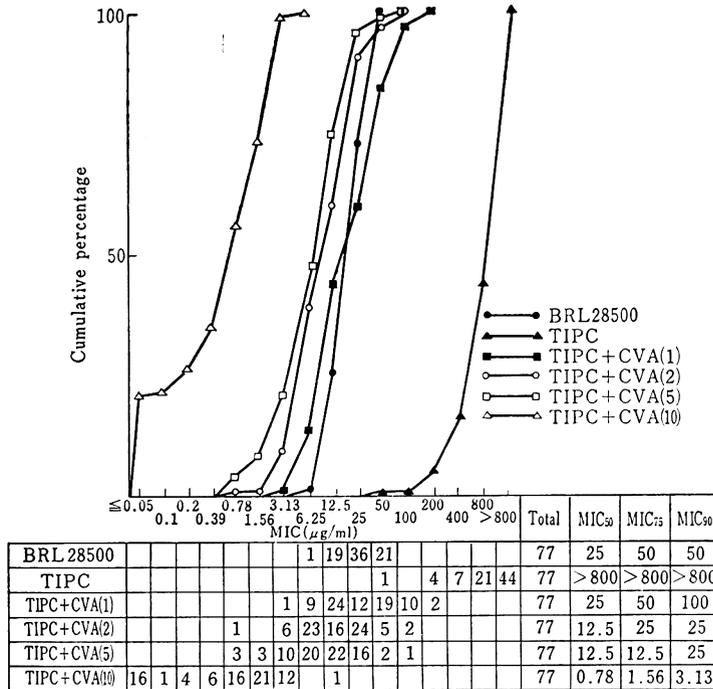


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates : ABPC-resistant *E. coli* (10^8 cells/ml)

CVA 添加では90%以上の株が12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下のMIC値となった。さらに10 $\mu\text{g/ml}$ のCVAが添加されると全株を12.5 $\mu\text{g/ml}$ のTIPCで発育阻止することができた (Fig. 3)。

K. pneumoniae ではTIPCに対して25 $\mu\text{g/ml}$ 以上のMICを示す株が80%以上であったが、CVAを2 $\mu\text{g/ml}$ 添加することによって約90%の株が6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下のMICとなった。MIC₉₀値で比較すると、TIPC単独では800 $\mu\text{g/ml}$ 以上であるのに対し、CVAを2 $\mu\text{g/ml}$ 添加すると、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の添加で6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 添加で1.56 $\mu\text{g/ml}$ と顕著な低下を示した (Fig. 4)。

TIPC耐性 (MIC \geq 12.5)の*P. mirabilis* 12株に対する感受性をFig. 5に、TIPC感受性の*P. mirabilis* 97株の成績をTable 4に示した。*P. mirabilis*ではTIPCに耐性を示した12株に対しCVAを添加した効果が認められ、TIPCのMIC値として8倍から32倍の抗菌力の増強が示された (Fig. 5)。TIPC感受性の株は、BRL 28500に対してもTIPCと同様の感受性を示し、MIC₉₀値はどちらも0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった (Table 4)。

P. vulgaris は染色体性のCXaseを産生する菌として知られているが、CVAはこのCXaseを阻害するため

TIPC単独よりもCVAを添加した場合の抗菌力は増強された。TIPC単独とCVAを2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合のMIC₉₀値はそれぞれ12.5と0.78, 0.78, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ で16倍から32倍の差が見られた (Fig. 6)。

ABPC耐性 (MIC \geq 0.78 $\mu\text{g/ml}$)の*H. influenzae*では70%以上の株がTIPCのMIC値0.78 $\mu\text{g/ml}$ から1.56 $\mu\text{g/ml}$ であったのが、2 $\mu\text{g/ml}$ のCVA添加によってMIC分布のピーク値が0.1 $\mu\text{g/ml}$ となり、0.2 $\mu\text{g/ml}$ で全株の発育を阻止した (Fig. 7)。

*N. gonorrhoeae*では試験した50株中5株がTIPC 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。TIPC耐性*N. gonorrhoeae* 5株の成績をFig. 8に、その他の45株の感受性をTable 5に示した。TIPC耐性株のTIPCに対するMIC₉₀値は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であったが、CVAを2 $\mu\text{g/ml}$ 添加することによって0.39 $\mu\text{g/ml}$ に低下した (Fig. 8)。しかし、TIPCのMIC値が0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下の株に対してはMIC₉₀値はTIPCで0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、BRL 28500でも0.78 $\mu\text{g/ml}$ と同程度であった (Table 5)。

嫌気性菌の*B. fragilis*もCXaseを産生する菌として知られているが、TIPCに対しMIC₉₀およびMIC₅₀値はそれぞれ>100と25 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、CVAを2 $\mu\text{g/ml}$ 添加することによってMIC₉₀およびMIC₅₀

Table 3 Sensitivity distribution of clinical isolates : *E. coli* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	>800	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500				5	22	28	13	1	10	11	8						98	1.56	12.5	25
TIPC				5	23	31	9		1			1	1	1	9	17	98	1.56	800	>800
TIPC+CVA(2)				8	33	29	11	9	4	9	1	4					98	1.56	6.25	25
TIPC+CVA(5)			4	15	31	23	10	6	5	2	2						98	0.78	1.56	6.25
TIPC+CVA(10)	26	3	14	23	17	8	4	2	1								98	0.39	0.78	1.56

Table 4 Sensitivity distribution of clinical isolates : TIPC-sensitive *P. mirabilis* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500		3	48	46									97	0.39	0.78	0.78
TIPC		4	51	42									97	0.39	0.78	0.78
TIPC+CVA(2)		5	73	19									97	0.39	0.39	0.78
TIPC+CVA(5)		8	83	7									97	0.39	0.39	0.39
TIPC+CVA(10)	6	15	75	1									97	0.30	0.39	0.39

Table 5 Sensitivity distribution of clinical isolates : TIPC-sensitive *N. gonorrhoeae* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500	4	2	3	10	12	14	45	0.39	0.78	0.78
TIPC			3	8	21	13	45	0.39	0.78	0.78

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates : *K. pneumoniae* (10^6 cells/ml)

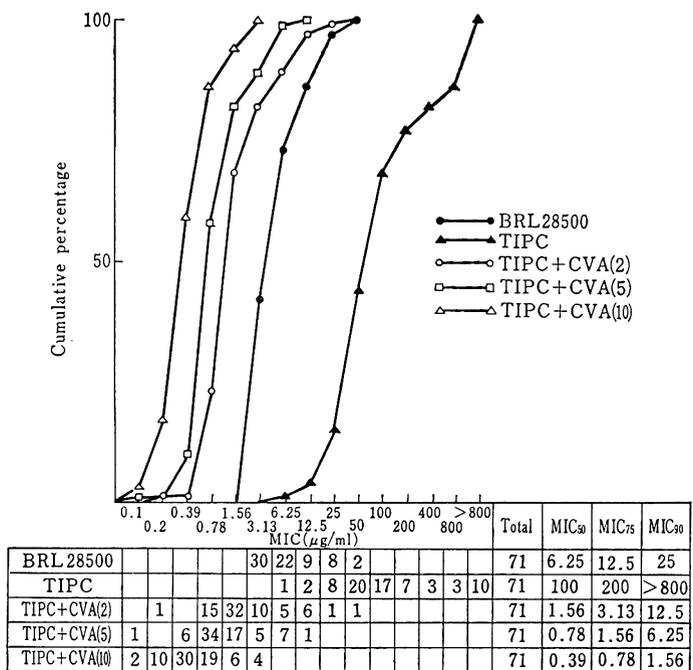


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates : TIPC-resistant *P. mirabilis* (10^6 cells/ml)

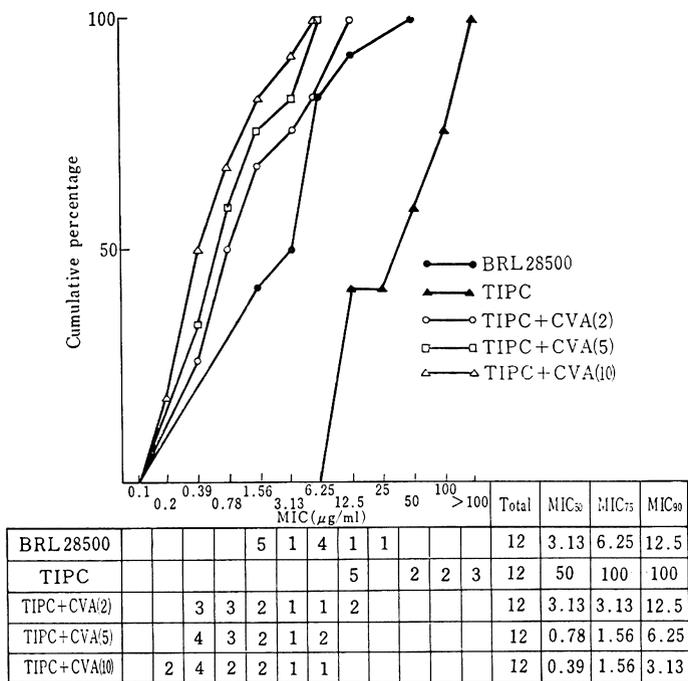


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates : *P. vulgaris* (10^6 cells/ml)

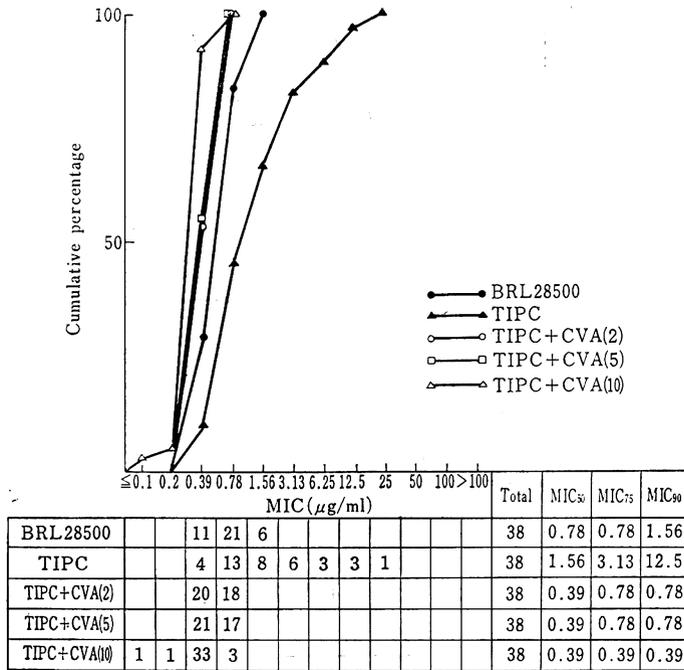


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates : ABPC-resistant *H. influenzae* (10^6 cells/ml)

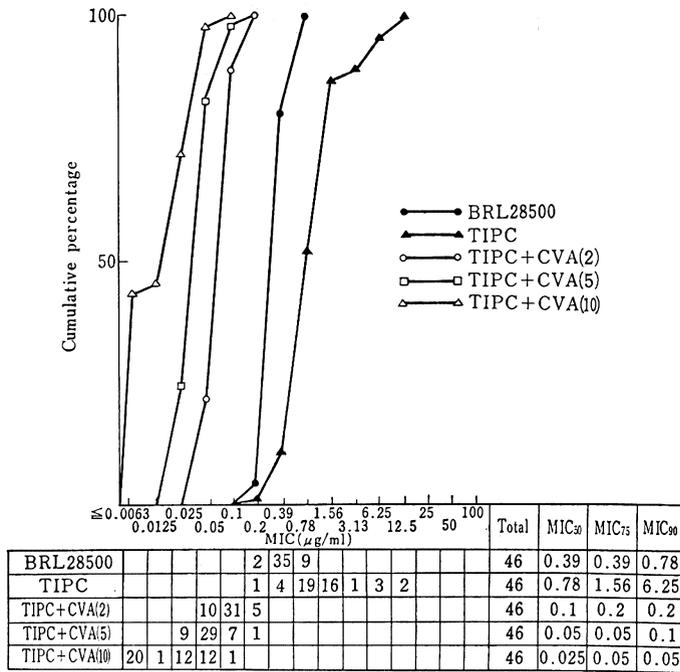
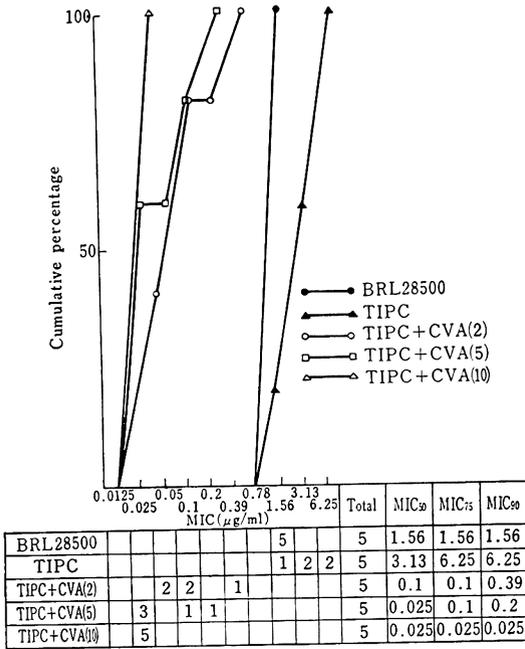


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates : TIPC-resistant *N. gonorrhoeae* (10^8 cells/ml)



値はそれぞれ 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ にまで低下した。また、MIC のピーク値も 12.5 $\mu\text{g/ml}$ から 0.39 $\mu\text{g/ml}$ まで低下して 32 倍の差がみられた (Fig. 9)。

その他の菌種に対しては、TIPC と BRL 28500 は同程度の抗菌力を示し、CVA を添加することによる相乗効果は顕著ではなかった (Table 6~16)。

4) 殺菌効果

PCase を産生する *E. coli* ML 5005, *K. pneumoniae* ML 5006 および CXase を産生する *P. vulgaris* ML 5008 に対する殺菌効果に関しても、TIPC と CVA との相乗作用があるか、TIPC および CVA 単独の場合と比較した。

E. coli ML 5005 では、800 $\mu\text{g/ml}$ の TIPC または 10 $\mu\text{g/ml}$ の CVA を添加しても control とほぼ同じ速度で菌が増殖するのに対し、TIPC 50 $\mu\text{g/ml}$ と CVA 5 $\mu\text{g/ml}$ 添加することによって 4 時間後には完全な殺菌効果がみられ、また CVA 濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ となった場合は TIPC 50 $\mu\text{g/ml}$ で 2 時間後に殺菌された (Fig. 10)。

K. pneumoniae ML 5006 でも、TIPC 800 $\mu\text{g/ml}$ または CVA 10 $\mu\text{g/ml}$ では菌の増殖を阻止できなかったが、TIPC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ と CVA 5 $\mu\text{g/ml}$ の添加によって完全に殺菌された。また、この条件で 24 時間後の再増殖も見られなかった (Fig. 11)。

Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates : *B. fragilis* (10^8 cells/ml)

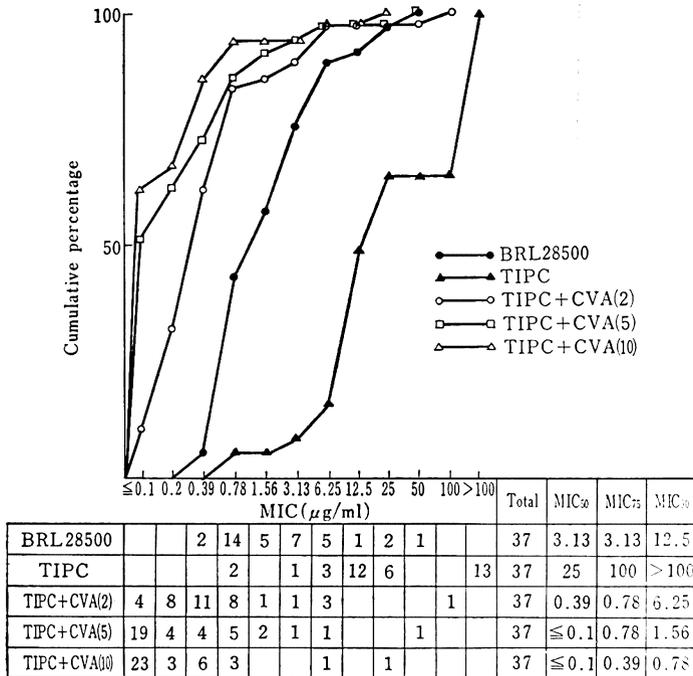


Table 6 Sensitivity distribution of clinical isolates : *C. freundii* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500			1	11	14	5	3	1	2	2	8	5	52	1.56	50	100
TIPC			1	14	10	6	3			4	5	9	52	3.13	100	>100
TIPC+CVA(2)			1	15	8	7	3		3	4	7	4	52	3.13	50	100
TIPC+CVA(5)				15	12	4	1	4	1	5	7	3	52	1.56	50	100
TIPC+CVA(10)	1		1	13	15	3	1	2	3	5	4	5	52	1.56	50	100

Table 7 Sensitivity distribution of clinical isolates : *E. cloacae* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500			2	1	17	3	1	1	1	9	11	8	54	50	100	>100
TIPC		1	1	5	14	3	1	4	1	5	4	15	54	12.5	>100	>100
TIPC+CVA(2)			1	4	15	2	2		2	7	16	5	54	50	100	100
TIPC+CVA(5)				4	14	3	2	1	3	10	8	9	54	25	100	>100
TIPC+CVA(10)	2		1	5	7	4		5	4	12	10	4	54	25	100	100

Table 8 Sensitivity distribution of clinical isolates : *M. morganii* (10^6 cells/ml)

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500		1	16	26	1	1	1	4					50	0.78	0.78	3.13
TIPC		1	20	22		1	1	4	1				50	0.78	0.78	6.25
TIPC+CVA(2)		1	16	21	3		2	2	5				50	0.78	0.78	12.5
TIPC+CVA(5)		1	12	15	7	6	3	1	5				50	0.78	3.13	12.5
TIPC+CVA(10)	1	1	1	8	9	8	8	7	3	4	1		50	3.13	12.5	25

Table 9 Sensitivity distribution of clinical isolates : *P. rettgeri* (10⁶ cells/ml)

MIC (µg/ml)	≥0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500	3	7	12	3	4	3	8	5	9				54	1.56	12.5	25
TIPC	3	8	11	4	6	1	3	3				15	54	1.56	>100	>100
TIPC+CVA(2)	4	7	4	6	6	13	5	4	5				54	1.56	6.25	12.5
TIPC+CVA(5)	5	6	3		12	8	10	5	5				54	3.13	6.25	12.5
TIPC+CVA(10)	6	4	2	2	7	12	10	6	5				54	3.13	6.25	12.5

Table 10 Sensitivity distribution of clinical isolates : *P. incostans* (10⁶ cells/ml)

MIC (µg/ml)	≤0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500	2	5	35	7	1								50	0.39	0.39	0.78
TIPC			17	29	4								50	0.78	0.78	0.78
TIPC+CVA(2)		2	18	24	5	1							50	0.78	0.78	1.56
TIPC+CVA(5)			15	15	17	3							50	0.78	1.56	1.56
TIPC+CVA(10)	2		12	7	20	9							50	1.56	1.56	3.13

Table 11 Sensitivity distribution of clinical isolates : *S. marcescens* (10⁶ cells/ml)

MIC (µg/ml)	≤0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500					12	7	1	7	5	4	6	8	50	12.5	100	>100
TIPC					1	17	1	1	3			27	50	>100	>100	>100
TIPC+CVA(2)					1	19	5	3	4	5	3	10	50	6.25	100	>100
TIPC+CVA(5)						19	6	5	5	3	4	8	50	6.25	50	>100
TIPC+CVA(10)					2	15	10	5	5	3	5	5	50	6.25	50	>100

Table 12 Sensitivity distribution of clinical isolates : *P. aeruginosa* (10^6 cells/ml)

MIC (μ g/ml)	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100	100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500			1	5	31	42	7	4	6	1	97	12.5	12.5	25	
TIPC			1	1	44	42	6	1	2	97	12.5	12.5	12.5		
TIPC+CVA(2)			1	41	46	6	1	1	1	97	12.5	12.5	12.5		
TIPC+CVA(5)			1	26	58	9	2	1	97	12.5	12.5	12.5			
TIPC+CVA(10)	1		1	20	47	24	3	1	97	12.5	25	25			

Table 13 Sensitivity distribution of clinical isolates : *X. maltophilia* (10^6 cells/ml)

MIC (μ g/ml)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	> 100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500			7	4	17	9	4	3	2	1	3		50	1.56	6.25	25
TIPC						7	5	6	10	9	4	9	50	25	100	> 100
TIPC+CVA(2)			9	4	6	3	10	7	7	1	2	1	50	6.25	12.5	25
TIPC+CVA(5)			1	1	7	7	5	10	9	5	4	1	50	12.5	25	50
TIPC+CVA(10)			3	1	6	7	11	8	7	6	1		50	6.25	25	50

Table 14 Sensitivity distribution of clinical isolates : *A. calcoaceticus* (10^6 cells/ml)

MIC (μ g/ml)	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	> 100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500			1		3	7	17	16	7				51	6.25	12.5	25
TIPC			1		2	6	17	16	8	1			51	6.25	12.5	25
TIPC+CVA(2)				3	1	7	11	4	1				27	6.25	6.25	12.5
TIPC+CVA(5)	51												51	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
TIPC+CVA(10)	51												51	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1

Table 15 Sensitivity distribution of clinical isolates : *C. parvifringens* (10⁶ cells/ml)

MIC (μg/ml)	≤0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500	1	2	10	4									17	0.39	0.39	0.78
TIPC	1		12	4									17	0.39	0.39	0.78
TIPC+CVA(2)	1	3	13										17	0.39	0.39	0.39
TIPC+CVA(5)	2	3	12										17	0.39	0.39	0.39
TIPC+CVA(10)	2	2	13										17	0.39	0.39	0.39

Table 16 Sensitivity distrivity distribution of clinical isolates : *C. difficile* (10⁶ cells/ml)

MIC (μg/ml)	≤0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₉₀
BRL28500								17	4	6			27	12.5	25	50
TIPC								19	2	6			27	12.5	25	50
TIPC + CVA(2)								16	6	6			27	12.5	25	50
TIPC + CVA(5)						1		17	4	5			27	12.5	25	50
TIPC + CVA(10)						1		18	3	5			27	12.5	25	50

Fig. 10 Bactericidal activity of TIPC with CVA

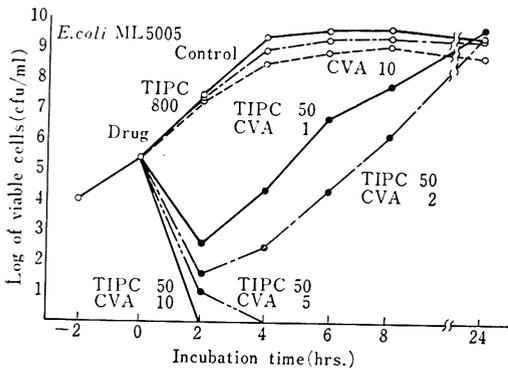


Fig. 11 Bactericidal activity of TIPC with CVA

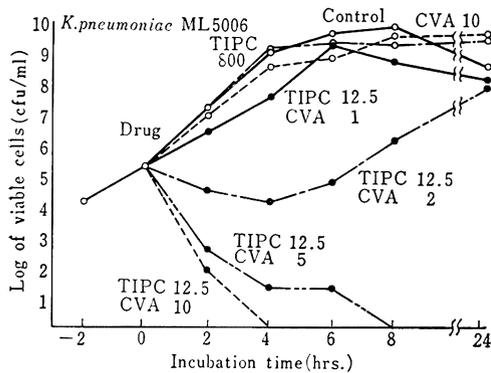
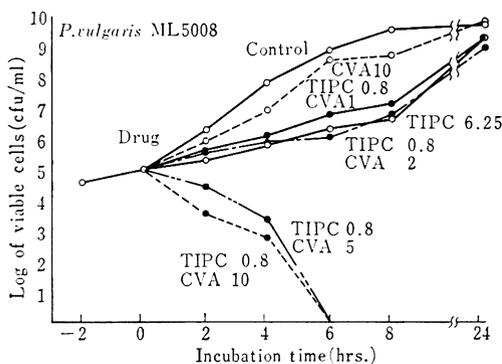


Fig. 12 Bactericidal activity of TIPC with CVA



P. vulgaris ML 5008 では、6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TIPC で完全な殺菌効果はみられなかったが、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TIPC 濃度でも CVA を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加することによって 6 時間後に殺菌された (Fig. 12)。

5) CVA の生菌中 β -lactamase に対する効果

生菌中に正常な状態で存在する β -lactamase に対する CVA の阻害効果を検討するため、増殖した菌を集め約 10^9 cells/ml の菌数で BSG 溶液に懸濁させて菌の増

Fig. 13 Inhibition of intracellular β -lactamase by CVA in BSG

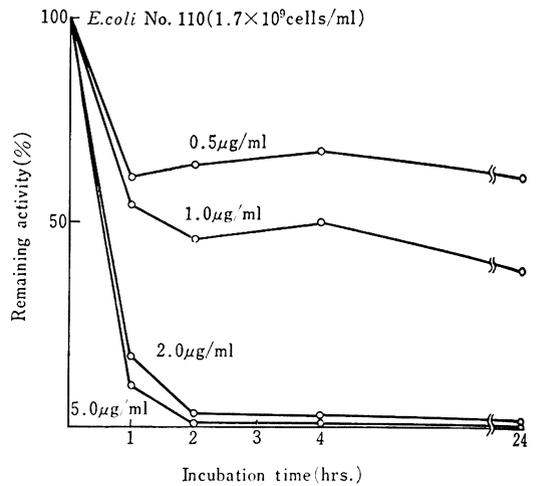
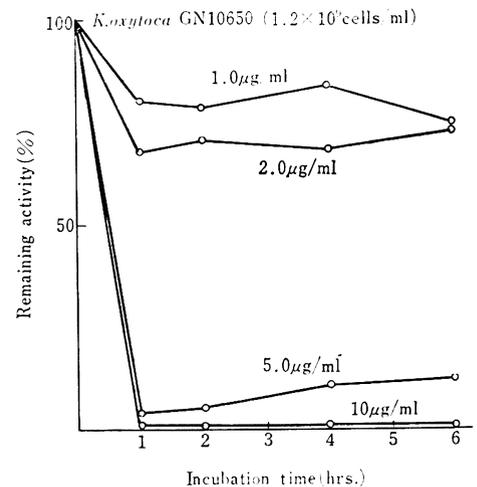


Fig. 14 Inhibition of intracellular β -lactamase by CVA in BSG



殖を停止し、CVA を各種濃度で一定時間作用させた。その後、添加した CVA を洗浄し β -lactamase の残存活性を測定した。

PCase を大量に産生する *E. coli* No. 110 に対しては、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA を 2 時間作用させることにより菌の持つ β -lactamase 活性がほぼ完全に阻害された。また、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA でも 50% 以上の活性が阻害され、阻害効果は 24 時間後まで持続した (Fig. 13)。

CXase を大量に産生する *K. oxytoca* GN 10650 に対しては、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で 1 時間処理することによりほぼ完全な阻害が見られた。また、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA でも約 30% 程度の阻害が持続した (Fig. 14)。

Fig. 15 Inhibition of intracellular β -lactamase by CVA in BSG

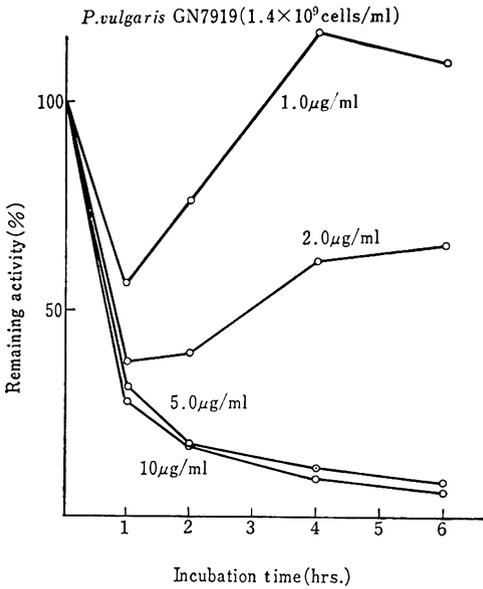


Fig. 17 Effect of cell number on inhibition of intracellular β -lactamase by CVA

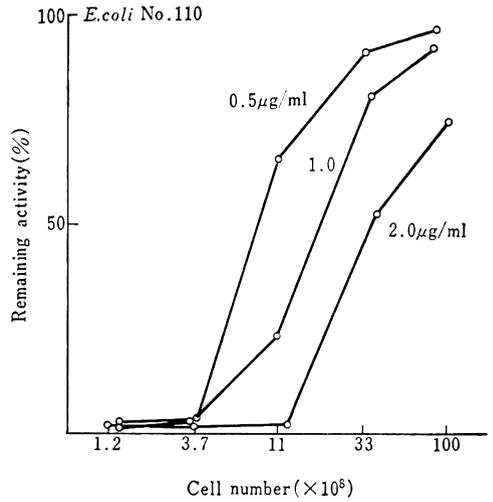
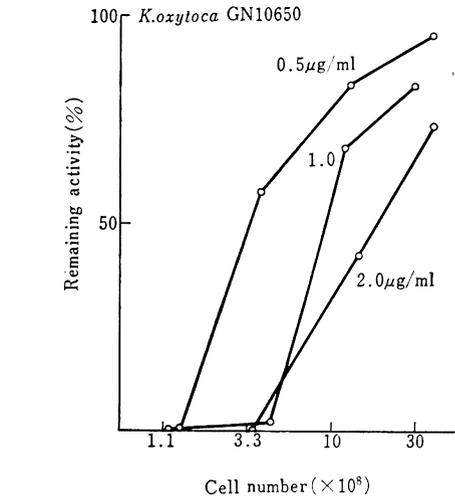
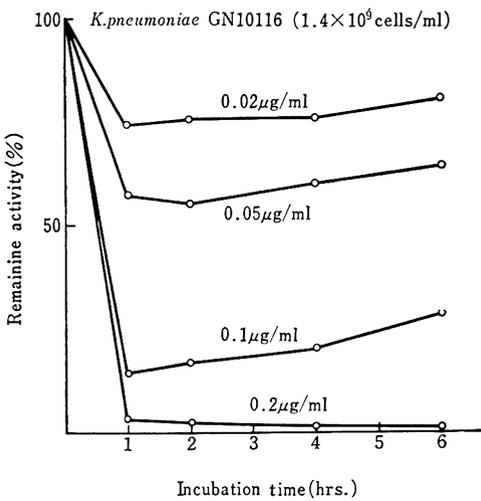


Fig. 18 Effect of cell number on inhibition of intracellular β -lactamase by CVA

Fig. 16 Inhibition of intracellular β -lactamase by CVA in BSG



P. vulgaris GN 7919 も CXase を大量に産生する菌であるが、この菌の β -lactamase に対して $5 \mu\text{g/ml}$ または $10 \mu\text{g/ml}$ の CVA で経時的に阻害の程度が増加した。また、 $2 \mu\text{g/ml}$ 以下の CVA では添加後 1 時間目が最も強い阻害を示した (Fig. 15)。

K. pneumoniae GN 10116 は PCase を中等度に産生する株であるが、この菌に対しては β -lactamase を大量に産生する他の菌種よりもはるかに低い濃度の CVA で十分な阻害が見られ、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ の CVA でも約 40~

50% 程度の阻害が持続した (Fig. 16)。

6) CVA の β -lactamase 阻害効果に対する菌数の影響

菌数の違いによる CVA の阻害効果の差を検討するため、菌数の異なる各種菌懸濁液を調製し、CVA 添加後 2 時間目の β -lactamase 残存活性を測定した。

E. coli No. 110 では菌数が $3.7 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 以下であれば $0.5 \mu\text{g/ml}$ の CVA で完全な阻害が見られ、約 10^9 cells/ml の菌数があっても $2 \mu\text{g/ml}$ の CVA で完全に阻害された。しかし、 10^{10} cells/ml の菌数では $2 \mu\text{g/ml}$ の CVA で 25% 程度しか阻害が見られなかった (Fig.

Fig. 19 Effect of cell number on inhibition of intracellular β -lactamase by CVA

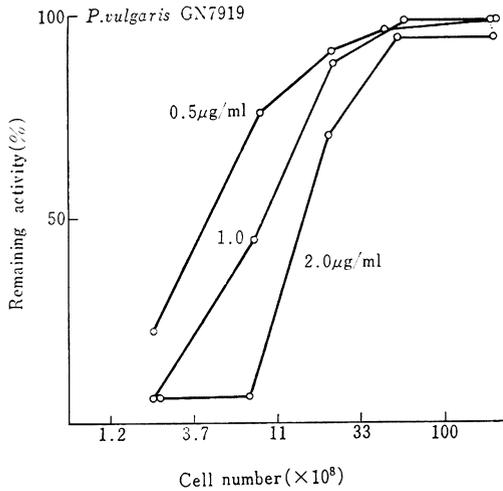


Fig. 20 Effect of cell number on inhibition of intracellular β -lactamase by CVA

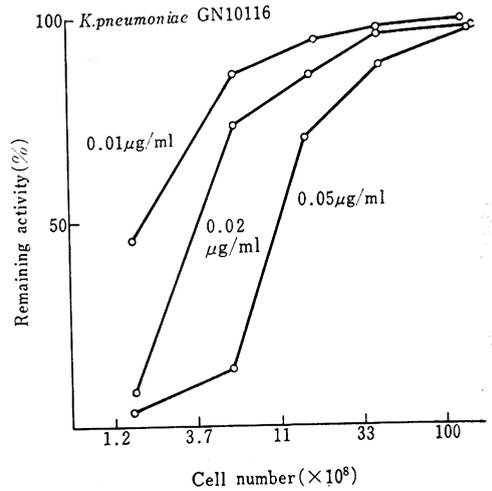


Table 17 Comparison of cell number of 50% inhibition

CVA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell No. of 50% Inhibition ($\times 10^8$ cells/ml)			
	<i>E. coli</i> No.110	<i>K. oxytoca</i> GN10650	<i>P. vulgaris</i> GN7919	<i>K. pneumoniae</i> GN10116
2.0	36	18	16	
1.0	18	9.0	9.1	
0.5	8.8	3.5	4.5	
0.05				11
0.02				3.9
0.01				1.9

17)。

K. oxytoca GN 10650 の場合も、 10^8 cells/ml 程度の菌数であれば $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で完全な阻害が見られた。しかし、菌数が多くなることにより阻害の程度は低下し、約 10^9 cells/ml の菌数では $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で約 30%、 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で約 60% の阻害であった (Fig. 18)。

P. vulgaris GN 7919 の場合も菌数の違いによって CVA の β -lactamase 阻害作用は大きな影響を受けた。 2×10^8 程度の菌数であれば $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で約 80%、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の CVA では 90% 以上の阻害が示されたが、約 10^9 cells/ml の菌数になると $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA がないと阻害がかかりにくくなった (Fig. 19)。

K. pneumoniae GN 10116 では β -lactamase の産生量が他の 3 菌種より少ないため、低濃度の CVA で β -lactamase の活性阻害が見られた。約 10^8 cells/ml の菌数であれば $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA で十分な阻害を示し、 $0.01 \mu\text{g}/$

ml の CVA でも 50% 以上の活性を阻害した (Fig. 20)。

Fig. 17 から 20 に示された各菌種の β -lactamase 活性を 50% 阻害する CVA 濃度と菌数の関係を Table 17 にまとめた。各菌種とも 50% 阻害の菌数は CVA 濃度に比例しており、CVA による生菌中の β -lactamase 阻害は菌数によって大きな影響を受けることが示された。また、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CVA が β -lactamase 活性の 50% を阻害する時の菌数は *K. oxytoca* GN 10650 と *P. vulgaris* GN 7919 の 2 菌種がほぼ同程度で 9×10^8 cells/ml、*E. coli* No. 110 では 2 倍の 1.8×10^9 cells/ml、*K. pneumoniae* GN 10116 は今回検討した株の中では最も菌数が多く 1.9×10^{10} cells/ml であった。

III. 考 察

BRL 28500 (CVA : TIPC = 1 : 15) はグラム陽性菌および *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有していた。特に PCase および CXase を産生する TIPC 耐性菌に対する抗菌力は TIPC

単独よりはるかに優れていた。これは CVA が PCase および CXase に対し強い阻害作用を有していることから、CVA の配合により TIPC の分解が防止されたためと考えられる。CVA による TIPC の抗菌力の増強は臨床分離菌に対しても確認され、*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *B. fragilis* 等の TIPC 耐性菌に対して CVA を添加することによる TIPC の抗菌力の増強が顕著であった。この TIPC と CVA の相乗効果は殺菌作用にも認められ、PCase または CXase を産生する TIPC 耐性 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* に対し強い殺菌効果を示した。

生菌中の β -lactamase に対して CVA の阻害効果は CVA 濃度と菌数に相関していた。これまでに報告された β -lactamase に対する阻害機構に関する検討の多くは単離精製された β -lactamase を用いたものであったが、今回、我々は生菌中に正常な状態で存在する β -lactamase に対する CVA の阻害効果を検討した。その結果、 β -lactamase を大量に産生する *E. coli*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris* でも菌数が 10^9 cells/ml 程度であれば $2.0 \mu\text{g/ml}$ の CVA を 2 時間作用させることによって生菌中の β -lactamase 活性を完全に阻害することができ、また β -lactamase の産生量が中等度の *K. pneumoniae* では $0.1 \mu\text{g/ml}$ という低濃度の CVA でも 10^9 cells/ml の β -lactamase 活性を完全に阻害できた。しかし、阻害の程度は菌数の増加によって低下した。これらの結果から、CVA の生菌中 β -lactamase 阻害効果は菌の持つ β -lactamase 産生能および菌数によって影響を受け、また 1 個の菌の β -lactamase 活性を 50% 阻害するのに必要な CVA の分子数は約 3×10^6 から 1×10^5 程度であろうと考えられた。

以上の *in vitro* の結果より、BRL 28500 は β -lactamase 産生菌による感染症に対して有効な薬剤であると考えられる。

文 献

- 1) BROWN, A. G.; D. BUTTERWORTH, M. COLE, G. HANSCOMB, J. D. HOOD, C. READING & G. N. ROLINSON: Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29(6): 668~669, 1976
- 2) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11(5): 852~857, 1977
- 3) MATSUURA, M.; H. NAKAZAWA, T. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI: Combined antibacterial activity of amoxicillin with clavulanic acid against ampicillin-resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17(6): 908~911, 1980
- 4) NEU, H. C. & K. P. FU: Clavulanic acid a novel inhibitor of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14(5): 650~655, 1978
- 5) MITSUHASHI, S. & M. INOUE: In β -lactam antibiotics, Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. (ed. by S. MITSUHASHI), pp. 41~56 Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1981
- 6) 中沢 久, 松浦正幸, 三橋 進: Clavulanic acid の β -lactamase 阻害効果および Amoxicillin との併用による抗菌作用について。 *Chemotherapy* 30 (S-2): 1~10, 1982
- 7) READING, C. & P. HEPBURN: The inhibition of Staphylococcal β -lactamase by clavulanic acid. *Biochem. J.* 179: 67~76, 1979
- 8) ROBERT, L. C.; J. FISHER & J. R. KNOWLES: Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM β -lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry* 17(11): 2185~2188, 1978
- 9) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 10) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780~789, 1974

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BRL 28500
(CLAVULANIC ACID-TICARCILLIN) AND INACTIVATION
OF INTRACELLULAR β -LACTAMASE IN INTACT
CELLS BY CLAVULANIC ACID

HISASHI NAKAZAWA, MATSUHISA INOUE and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute, Fujimi, Seta Gunma

and

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, Gunma University, School of Medicine

BRL 28500 is a formulation of the β -lactam antibiotic ticarcillin (TIPC, 15 parts) with the β -lactamase inhibitor clavulanic acid (CVA, 1 part). The *in vitro* antibacterial activity of BRL 28500 and inactivation of intracellular β -lactamase of whole live cells by CVA have been studied and the results were as follows :

(1) BRL 28500 showed a broad antibacterial spectrum against standard strains including *P. aeruginosa*.

(2) BRL 28500 was more effective than TIPC against PCase and CXase producing strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *H. influenzae* and *N. gonorrhoeae*.

(3) CVA inactivated intracellular β -lactamases when bacterial cells were incubated in BSG with CVA for 2 hours. The degree of inactivation was related to the number of cells and the concentration of CVA. If the cell population was less than 10^9 cells/ml even though a strain was a high producer of β -lactamase, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ of CVA was found to be sufficient for complete irreversible inhibition.