

BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌力, ペニシリン  
 結合蛋白に対する親和性, 及び血清補体と培養  
 マクロファージとの協力的殺菌作用

横田 健・鈴木映子・新井京子・加藤尚代  
 順天堂大学医学部細菌学教室

広域 PC, ticarcillin (TIPC) と  $\beta$ -lactamase 不活化剤, clavulanic acid (CVA) を 15:1 に配合した BRL 28500 の *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*,  $\beta$ -Streptococci, *S. pneumoniae*, *E. coli* (R<sup>+</sup>), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, 及び *B. fragilis* の 22~54 臨床分離株に対する MIC<sub>80</sub> は, それぞれ 12.5, 50, 25, 1.56, 0.78, 50, 50, 0.78, 6.25, 12.5, 50, >100, 50, 1.56, 50, 100, 25 及び 3.13  $\mu$ g/ml であった。さらに CVA 2  $\mu$ g/ml 存在下の TIPC の MIC<sub>80</sub> は上記の値より小さい場合が多かった。BRL 28500 は *E. coli* の PBP3, 1A, 2, 1B の順に結合親和性を示し, 殺菌力の高いことを伺わせた。*S. aureus* の PBP2 と 3 及び *P. vulgaris* の PBP1, 3A, 3B にも強い結合親和性がみられた。BRL 28500 は, TIPC 耐性 *E. coli* にも低濃度で補体との協力的殺菌作用を示し, その sub MIC 存在下でマウス培養 M $\phi$  は, *E. coli* の細胞をよく食菌消化した。

各種細菌の  $\beta$ -lactam 薬剤耐性臨床分離株は, 大部分が  $\beta$ -lactamase を産生し, この酵素が薬剤を加水分解するか, 強く結合して薬剤の作用点到達を妨げるかで抵抗性を示す場合が多い。したがって, その対策として薬剤が  $\beta$ -lactamase に水解されにくくだけでなく, 結合親和性も低い新誘導体を開発するか,  $\beta$ -lactamase 不活化剤を既存の薬剤と併用するかのいずれかが考えられる。penicillin 類(PCs) は cephem と異なり, 広域性を保ったまま  $\beta$ -lactamase に安定な誘導体を開発することは今のところ困難である。そこで PCs の耐性菌対策としては,  $\beta$ -lactamase inhibitor の併用が価値を持つ。

TIPC はブドウ球菌を含む Gram 陽性菌から, 緑膿菌を含む Gram 陰性菌にわたる広い抗菌域を持つが, 欠点として penicillinase (PCase) 型  $\beta$ -lactamase に加水分解されるため, 各種細菌に耐性株がみられる。一方, CVA は PCase 型酵素を強く不活化することが知られているので, 両者を組み合わせれば耐性菌対策の確立した広域 PC が作られる可能性がある。我々は TIPC 15 と CVA 1 を配合した BRL 28500 について, その抗菌力, 作用点である penicillin binding proteins (PBPs) に対する結合親和性, 及び血清補体や白血球との協力的食菌, 殺菌作用を検討したので報告したい。

### I. 材料及び方法

#### 1. 各種殺菌臨床分離株に対する MIC の測定法

順天堂大学附属病院中央検査室及び東京都養育院病院中央検査室から分与された *S. aureus* 50 株, メチリンセフェム耐性 *S. aureus* (MRSA) 58 株, *S. epidermidis* 29 株,  $\beta$ -Streptococci 23 株, *S. pneumoniae* 22 株, 異なった R(*bla*) plasmid 52 種類を伝達した *E. coli* CS2, *K. pneumoniae* 50 株, *P. mirabilis* 50 株, *P. vulgaris* 50 株, *M. morgani* 54 株, *E. cloacae* 45 株, *S. marcescens* 49 株, *C. freundii* 47 株, *P. aeruginosa* 50 株, *X. maltophilia* 29 株, *A. calcoaceticus* 48 株, ampicillin (ABPC) 耐性 *H. influenzae* 24 株及び *B. fragilis* 47 株に対する MIC は, 日本化学療法学会法(平板希釈法)<sup>1)</sup>に基づいて測定した。すなわち, 被検菌を 5ml の L-broth<sup>2)</sup> ( $\beta$ -Streptococci, *S. pneumoniae* は HI-broth, *B. fragilis* は GAM-broth)中で 37°C, 一夜振盪培養 (*B. fragilis* は静置)した。

滅菌生理食塩水で Gram 陽性菌は 100 倍, Gram 陰性菌は 1,000 倍に希釈し, 希釈菌浮遊液を各種濃度の薬剤含有平板にマイクロプランターで spot し, 37°C, 一夜培養して MIC を判定した。

#### 2. 各種細菌 PBPs への BRL 28500 の結合親和性の検討

*E. coli* NIHJ JC-2, *E. coli* CS2 (RK1), *S. aureus* 209 P, *S. aureus* 108-1 (MRSA) 及び *P. vulgaris* 33 の PBP 各画分に対する結合親和性は, SPRATT の原法<sup>3)</sup>を改良した競合結合実験<sup>4)</sup>で検討した。すなわち, 10 ml の

L-broth 中で 37°C、一夜振盪培養した菌液を、200 ml の L-broth 中に全量接種し、さらに 37°C、4 時間振盪培養して対数増殖期初期の細胞を得た。冷却遠心で集菌し、0.01 M MgCl<sub>2</sub> 加 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で一回洗浄し、同緩衝液 8 ml に再浮遊した。BRANSON SONIFIER で氷冷下 20 kc 効率 20% で 2 分間 3 回 (*S. aureus* は 2 分間 10 回) 処理し、細胞を破碎した。3,000×g、10 分の冷却遠心で未破壊細胞を除き、さらに上清を 100,000×g、30 分間超遠心して膜画分を得た。これを前記の緩衝液 5 ml で一回洗い、200 μl 前後の同緩衝液に、15 mg 蛋白/ml の濃度になるように再浮遊した。膜浮遊液 30 μl に終末濃度が 0.1~12.5 μg/ml になるように 3 μl の BRL 28500 又は TIPC 溶液を加え、30 °C、10 分保温後、3 μl の <sup>14</sup>C-PCG (50 μCi/ml) を加えさらに 30°C、10 分反応させた。Sarkosyl と非放射性 PCG 添加で反応を止め、10,000×g、30 分遠心で外膜成分を除き、SDS を加えて 100°C、2 分間加熱後、反応液全量を 10% acrylamide 及び 0.06% bis-acrylamide を含む平板 gel で電気泳動を行なった。50% メタノールと 7% 酢酸を含む液で蛋白を固定し、5% メタノール-7% 酢酸液で 3 回 gel を洗い、2,5-diphenyloxazole (PPO) をしみこませて乾燥し、KODAK X-Omat レントゲンフィルムに密着し、-80°C で 20 日間感光して蛍光オートラジオグラフィを行った。

3. 補体及び Mφ と BRL 28500 との協力的殺菌効果の検討法

*E. coli* NIHJ JC-2 及び *E. coli* CS 2 (RE 28) の L-broth 37°C、一夜振盪培養液を新鮮 L-broth で希釈し、10<sup>6</sup>cells/ml の菌浮遊液をそれぞれ 4 本ずつ作った。1 本はそのまま、2 本目には 0.75 units/ml のモルモット補体及び 20% ヒト非働化血清 (Flow laboratories) を、3 本目には 50% 発育阻止濃度 (ID<sub>50</sub>) の BRL 28500 又は TIPC、4 本目には血清、補体及び薬剤のすべてを加えた。37°C で振盪培養を続けながら、経時的にその一部をとり、適当に希釈して McCONKEY 平板の上に 0.1 ml 塗布し、37°C、一夜培養後生ずる集落数から生菌数を測定した。

白血球と BRL 28500 の協力的食菌殺菌作用はマウス培養 Mφ を使用して検討した。4 週齢の ICR δ マウス腹腔を 10% fetal-carf serum 加 MCDB 103 培地 5 ml でよく洗い、正常 Mφ を集め洗浄後、径 15 mm のカバースリップを沈めた FALCON multi dish の各 well に約 10<sup>4</sup> cells 接種した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一夜培養し、浮遊細胞を除いた後、L-CM (conditioned medium of L-929) 20% を添加した 1 ml の MCDB 103 培地を各 well に加え、37°C、一夜培養して Mφ を活性

化した。これに 5×10<sup>5</sup> cells/well の被検菌を接種した。一部の区画には同時に 1~1/16 MIC の BRL 28500 又は TIPC を加えて 37°C、4 時間培養した。カバースリップを取り出し seline G で軽く洗浄後メタノール固定し、GIMSA 染色して顕微鏡で観察した。

II. 成績

1. 臨床分離株に対する BRL 28500 の抗菌力

*S. aureus* 50 株に対する BRL 28500 の抗菌力は TIPC とほぼ同じであるが、2 μg/ml の CVA 存在下の TIPC は、TIPC 単独よりも 1~2 管 (2~4 倍) 程度強い抗菌力を示した (Fig. 1)。58 株の MRSA に対しては、Fig. 2 のごとく BRL 28500 も 2 μg CVA 存在下の TIPC も TIPC 単独及び cefotaxime (CTX) よりも優れた抗菌力を示した。しかし感受性 *S. aureus* に対す

Fig. 1 Cumulative sensitivity of 50 clinical isolates of *S. aureus* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2 μg), CPZ+SBT (1:1) and CTX

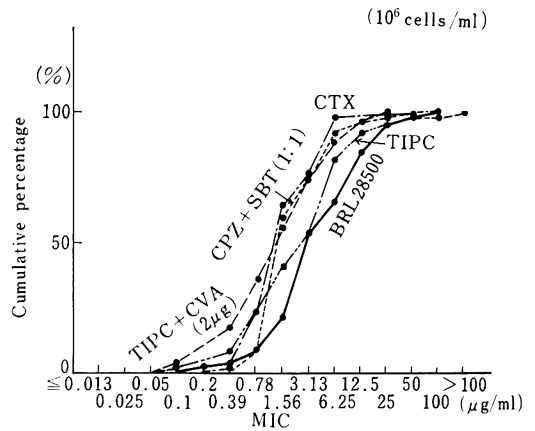


Fig. 2 Cumulative sensitivity of 58 clinical isolates of MRSA to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2 μg) and CTX

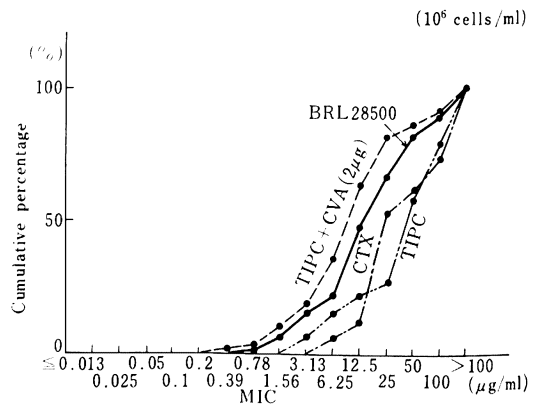


Fig. 3 Cumulative sensitivity of 29 clinical isolates of *S. epidermidis* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g) and ABPC

( $10^6$  cells/ml)

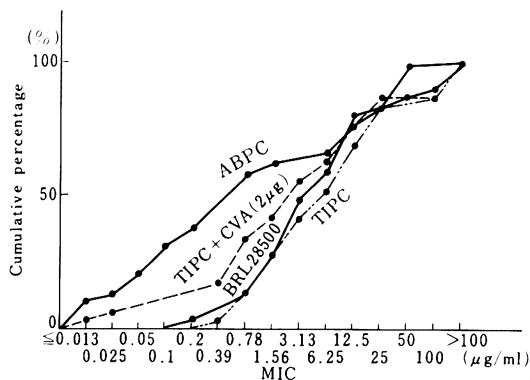


Fig. 4 Cumulative sensitivity of 23 clinical isolates of  $\beta$ -Streptococci to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g) and CTX

( $10^6$  cells/ml)

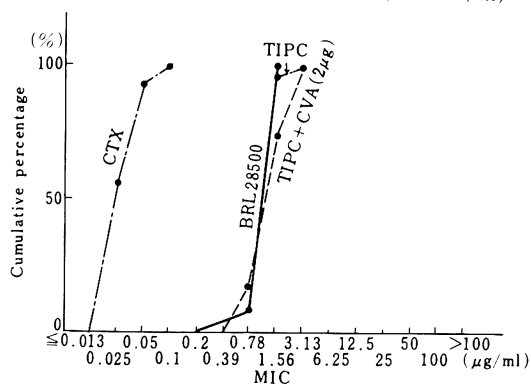


Fig. 5 Cumulative sensitivity of 22 clinical isolates of *S. pneumoniae* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g) and CTX

( $10^6$  cells/ml)

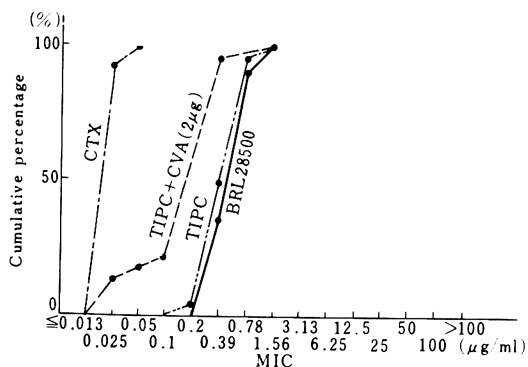


Fig. 6 Cumulative sensitivity of 52 subclones of *E. coli* CS2 carrying various R(*bla*) plasmids to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX

( $10^6$  cells/ml)

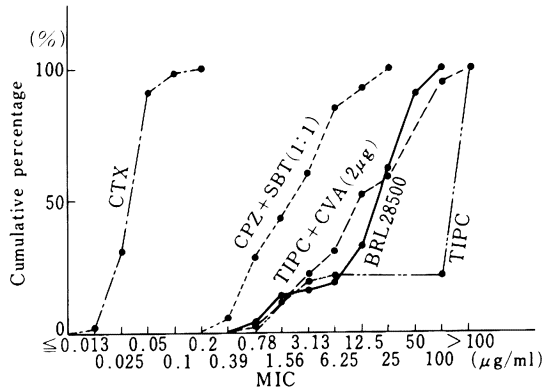
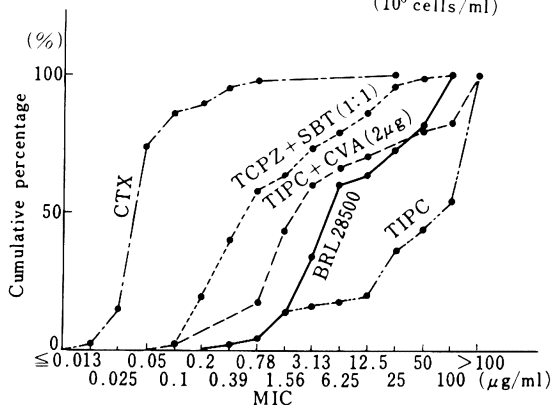


Fig. 7 Cumulative sensitivity of 50 clinical isolates of *K. pneumoniae* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX

( $10^6$  cells/ml)



る抗菌力は劣っていた。一方、*S. epidermidis* に対しては Fig. 3 のとおり TIPC 単独及び BRL 28500 はほぼ同じ抗菌力であったが、ABPC より抗菌力が弱かった。

$\beta$ -Streptococci 23 株には、CTX より 64 倍程度劣るものの Fig. 4 のとおり BRL 28500 は 1.56  $\mu$ g/ml ですべての株の増殖を抑えた。*S. pneumoniae* 22 株に対しては、TIPC 及び BRL 28500 は全株 1.56  $\mu$ g/ml で増殖を抑え、2  $\mu$ g/ml CVA 存在下では TIPC の抗菌力はさらに増強される (Fig. 5)。

52 種類の R(*bla*) を伝達した *E. coli* には、Fig. 6 のごとく一部の菌を除くと BRL 28500 も 2  $\mu$ g/ml CVA

Fig. 8 Cumulative sensitivity of 50 clinical isolates of *P. mirabilis* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX

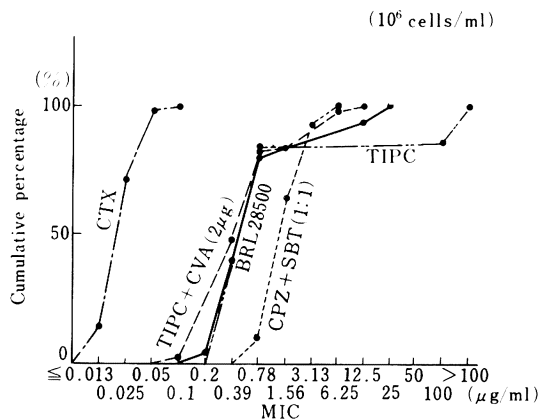
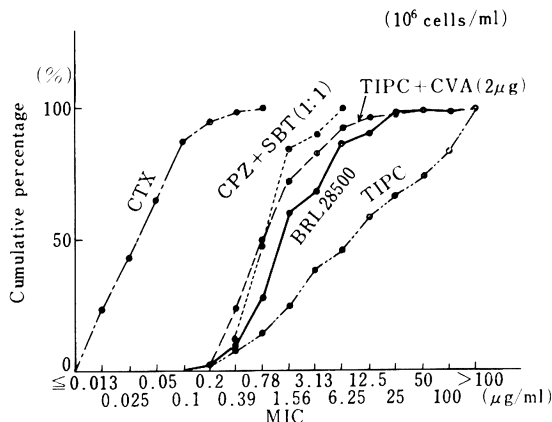


Fig. 9 Cumulative sensitivity of 50 clinical isolates of *P. vulgaris* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX



存在下の TIPC も、TIPC 単独よりはるかに強い抗菌力を示したが、cefoperazon (CPZ)/sulbactam (SBT) 合剤や CTX には劣った。*K. pneumoniae* 50 株に対しても Fig. 7 のごとく、BRL 28500 及び 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC は、TIPC 単独より強い抗菌力を示したが、CPZ/SBT や CTX には及ばなかった。

*P. mirabilis* は少数の株が PCase を作るので、Fig. 8 のとおり臨床分離株の 10% 程度は高度耐性を示す。BRL 28500 及び 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC は、これら TIPC 耐性株にも良好な抗菌力を表した。また、CPZ/SBT より強い抗菌力を示したが、CTX には及ばなかった。*P. vulgaris* は染色体性に PCase と cephalosporinase

Fig. 10 Cumulative sensitivity of 54 clinical isolates of *M. morgani* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX

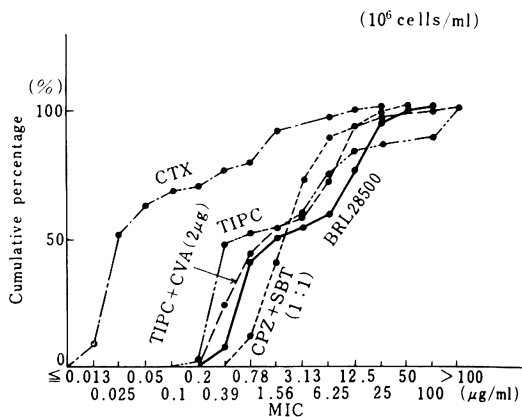
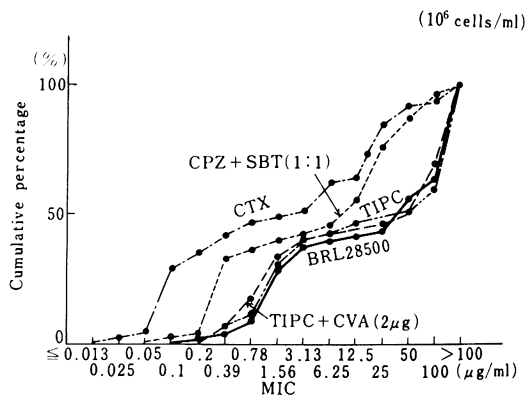


Fig. 11 Cumulative sensitivity of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+SBT (1:1) and CTX



(CEPase) 両方の性質を持つ Ic 型  $\beta$ -lactamase を作るので、Fig. 9 のとおり TIPC 単独の抗菌力はあまり強くない。これに対し BRL 28500 及び 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC は CPZ/SBT とほぼ同等の良好な抗菌力を示したが、CTX より劣っていた。*M. morgani* は染色体性に CEPase 型の Ia  $\beta$ -lactamase を産生する。この酵素によって TIPC は加水分解されないで、単独でも比較的良好な抗菌力を持ち、Fig. 10 のとおり CVA 添加の影響は少ない。*E. cloacae* も前者と同系の CEPase を作るので、CVA 添加は TIPC の抗菌力にあまり影響しない (Fig. 11)。*S. marcescens* の  $\beta$ -lactamase は Ia 型に分類されるが、Ic 型に近い性質も持ち、PCs もある程度水解する。その上 PCase 型を code する R 因

Fig. 12 Cumulative sensitivity of 49 clinical isolates of *S. marcescens* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+ SBT (1:1) and CTX

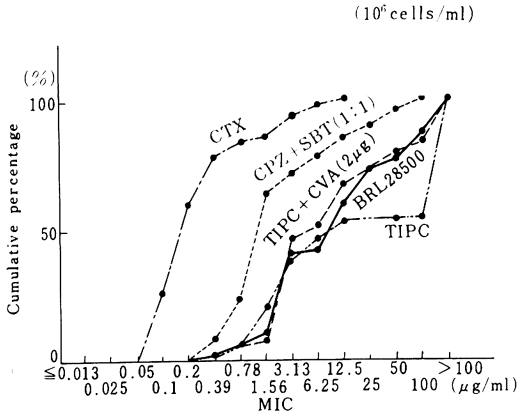
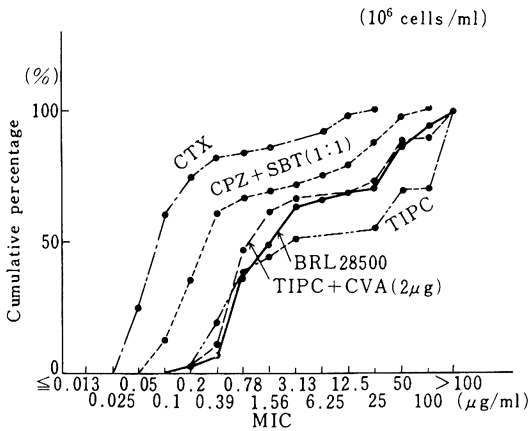


Fig. 13 Cumulative sensitivity of 47 clinical isolates of *C. freundii* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+ SBT (1:1) and CTX



子保有株も多いので、Fig. 12 のごとく TIPC 単独では半数近くが高度耐性株となる。BRL 28500 及び 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC はこれら耐性株にも弱いながら抗菌力を示すようになるが、しかし CPZ/ SBT や CTX には及ばない。*C. freundii* に対する TIPC 及び CVA と TIPC 混合時の抗菌力も Fig. 13 のように *E. cloacae* に対するものに近い。*P. aeruginosa* 50 株に対しては、Fig. 14 のごとく TIPC 単独よりも 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC の方が若干強い抗菌力を示す。Fig. 15 のとおり *X. maltophilia* には TIPC はほとんど抗菌力はないが、CVA 添加により TIPC の抗菌力は若干増加する。しかし、中程度である。*A. calcoaceticus* は作用点である PBP が  $\beta$ -lactam 薬

Fig. 14 Cumulative sensitivity of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g), CPZ+ SBT (1:1) and CTX

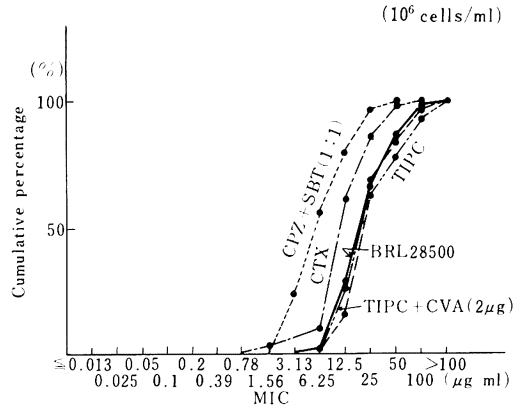
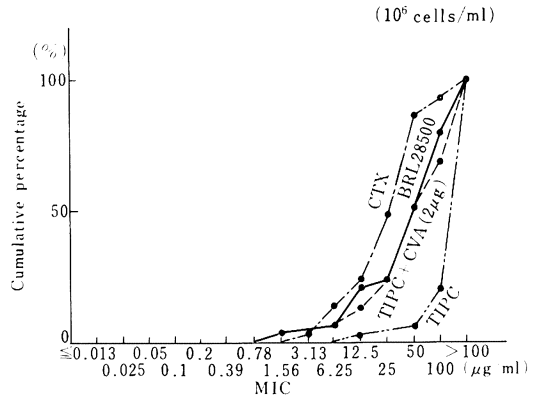


Fig. 15 Cumulative sensitivity of 29 clinical isolates of *P. maltophilia* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2  $\mu$ g) and CTX



剤に結合親和性が低いため、Fig. 16 のとおり TIPC 単独及びそれに CVA を添加した時も中程度の抗菌力しか示さない。

ABPC 耐性 *H. influenzae* に対する CVA の配合は Fig. 17 のとおり効果的である。これらの株は PCase 産生を支配する R 因子を持っているので、それが CVA で不活化されると Fig. 17 のように感受性菌同様の高い感受性を TIPC に示す。

嫌気性菌、*B. fragilis* は染色体性に Ic 型に近い  $\beta$ -lactamase を作り、PC<sub>s</sub> を水解するので、Fig. 18 のとおり TIPC に中等度以上の耐性を示す。CVA が配合された BRL 28500 及び 2  $\mu$ g/ml CVA 存在下の TIPC は、 $\beta$ -lactamase が不活化されるため、両者に対し高い感受

Fig. 16 Cumulative sensitivity of 48 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2 μg) and CTX

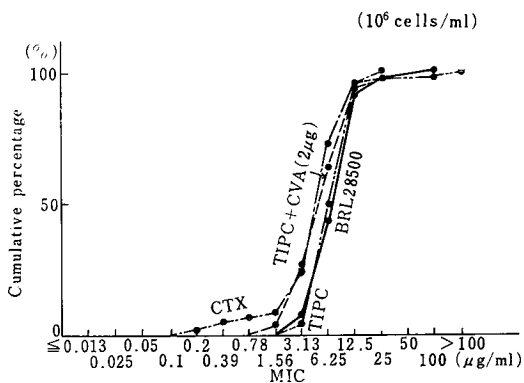


Fig. 17 Cumulative sensitivity of 24 clinical isolates of ABPC resistant *H. influenzae* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2 μg) and ABPC

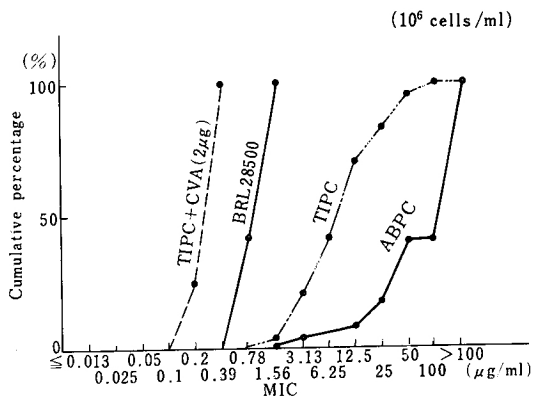


Fig. 18 Cumulative sensitivity of 47 clinical isolates of *B. fragilis* to BRL 28500, TIPC, TIPC+CVA (2 μg) and CPZ+SBT (1:1)

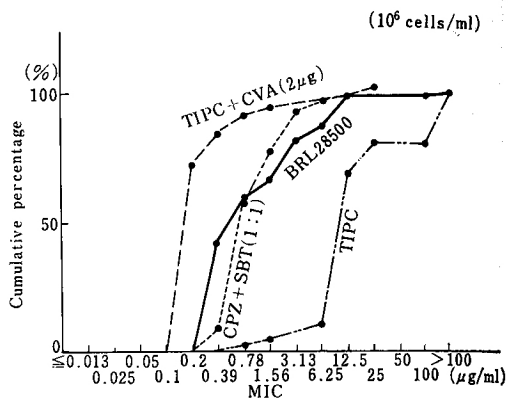


Fig. 19 Competition of BRL 28500 for penicillin binding proteins of *S. aureus* 209 P

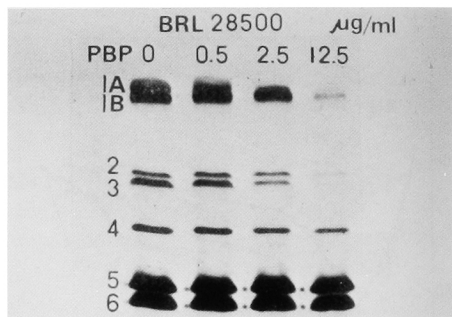
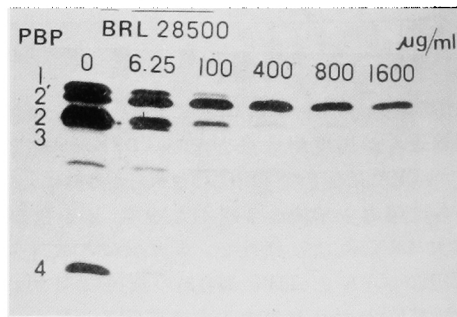


Fig. 20 Competition of BRL 28500 for Penicillin binding proteins of *S. aureus* 108-1



性がみられる。

2. BRL 28500 の各種細菌 PBP に対する結合親和性

BRL 28500 は *S. aureus* 209 P の必須の PBP 画分 PBP 2 及び 3 に低濃度でも結合するが、Fig. 19 のとおりそれらを完全に飽和するためには、12.5 μg/ml 以上を必要とするようである。TIPC のこの菌に対する抗菌力が ABPC 等に及ばないのは、作用点への親和性が若干劣るためであろう。

MRSA 108-1 株の PBP に対しては、比較的低濃度で感受性株と共通の必須画分 2 及び 3 を飽和するが、MRSA 特有の PBP 2' は 1,600 μg/ml の BRL 28500 でも飽和せず MRSA に対しては高い抗菌力が望めないこ

とを示している (Fig. 20)。

*E. coli* 感受性株 NIHJ JC-2 の PBP には、BRL 28500 は 12.5 μg/ml 濃度でほぼ完全に、必須画分の 1A, 1Bs, 2 及び 3 を飽和する。いわゆる第 3 世代 cephem のこの菌の PBP に対する親和性には及ばないが<sup>5)</sup>、細胞伸長時に要する架橋酵素, 1A 及び 1Bs

Fig. 21 Competition of BRL 28500 for penicillin binding proteins of *E. coli* NIHJ JC-2

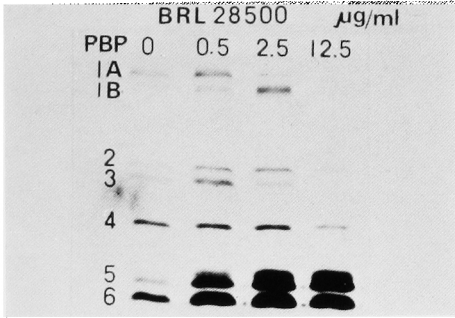


Fig. 22 Competition of BRL 28500 for penicillin binding proteins of *E. coli* CS 2/RK 1

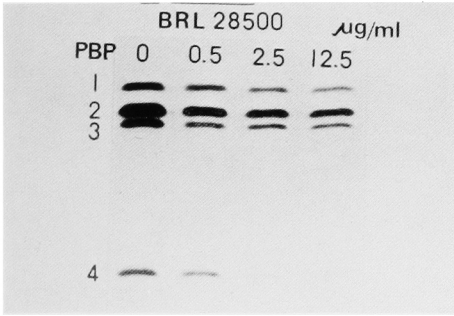
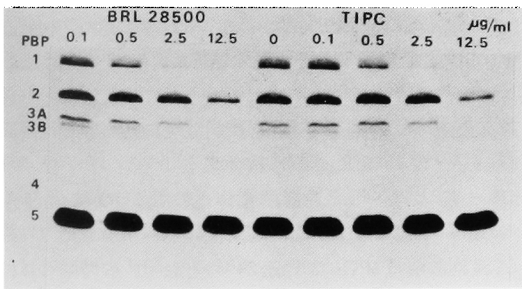


Fig. 23 Competition of BRL 28500 and TIPC for penicillin binding proteins of *P. vulugalis* 33



を PBP 2, 3 と同時に抑えるので、殺菌性が強いことが伺える (Fig. 21)。PCase を作る RKI plasmid 保有 *E. coli* CS 2 の PBP に対する BRL 28500 の態度は特長的である。薬剤無添加時には、膜画分に残る PCase のため、<sup>14</sup>C-PCG が水解されて PBP の放射性バンドは明確でない。これに 0.5 µg/ml の BRL 28500 を競合結合すると β-lactamase が不活化されるため、放射性バンドが明らかになるが、それより量を増すと TIPC が PBP 3 及び 1A を飽和するため、それらの放射性バンドが消失する。12.5 µg/ml の非放射性 BRL 28500

Fig. 24 Influence of ID<sub>50</sub> of TIPC (4.96 µg/ml) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* NIHJ JC-2

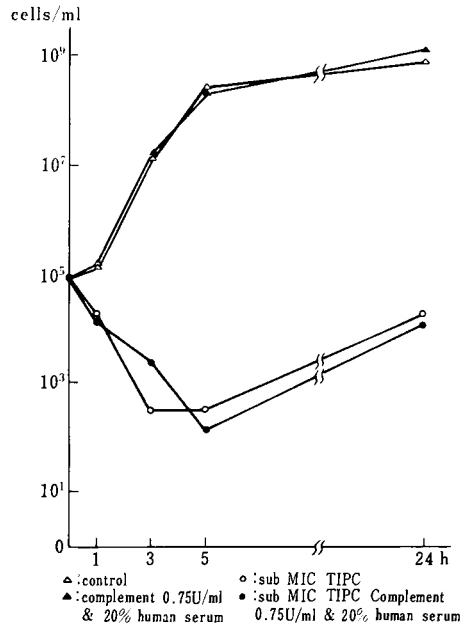


Fig. 25 Influence of ID<sub>50</sub> of BRL 28500 (4.34 µg/ml) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* NIHJ JC-2

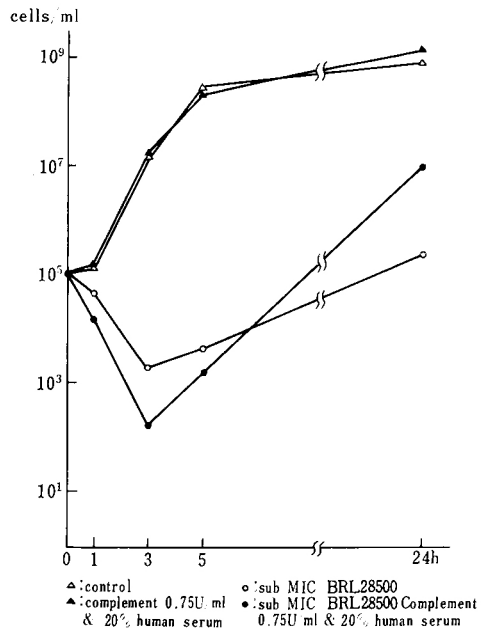


Fig. 26 Influence of ID<sub>50</sub> of TIPC (2398 µg/ml) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* CS 2/RE 28

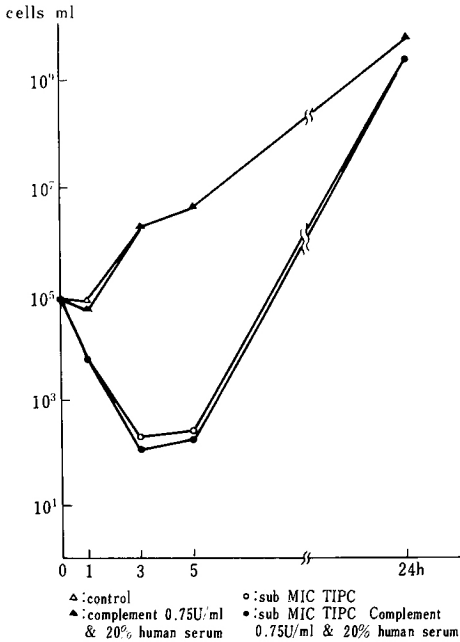


Fig. 27 Influence of ID<sub>50</sub> of BRL 28500 (18.6 µg/ml) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* CS 2/RE 28

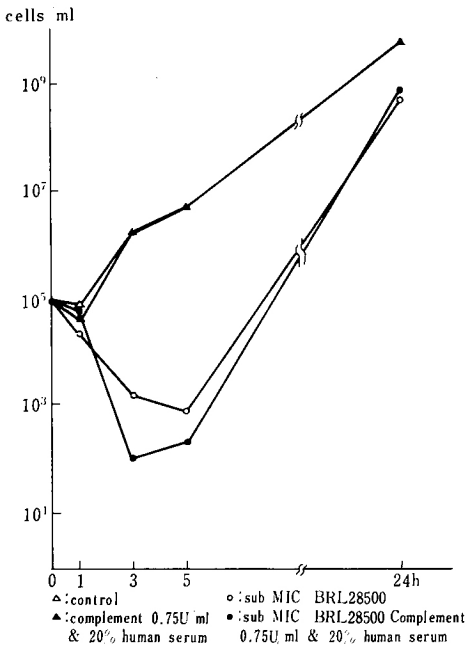
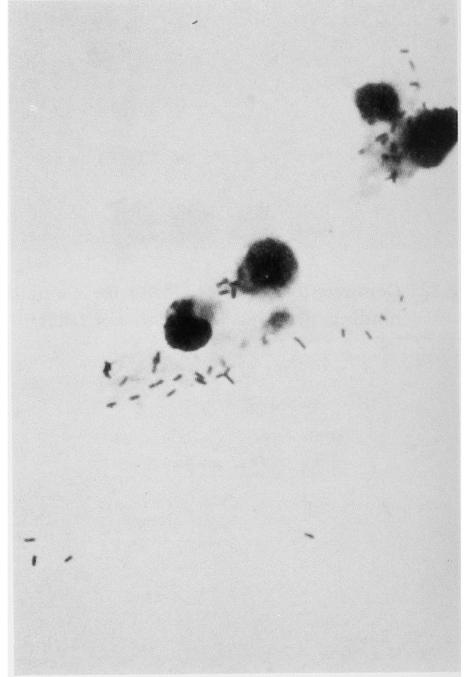


Fig. 28 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown without drugs at 4 hrs after the incubation



はすべての PBP 画分を飽和するので、感受性株同様、すべての必須の PBP 画分の放射性バンドは見られなくなる (Fig. 22)。

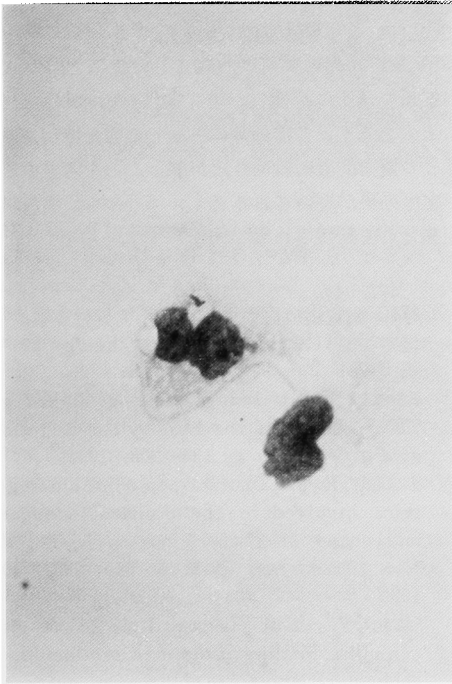
*P. vulgaris* の PBP に対する BRL 28500 の競合結合を、TIPC 単独のそれと比較すると、Fig. 23 に示すとおり、両者の結合親和性にほとんど差がない。すなわち両者とも *P. vulgaris* の PBP 1 及び 3 B に最も親和性が高く、続いて 3 A, 2 の順に結合する。

3. BRL 28500 と血清、補体との協力的殺菌作用  
TIPC 単独でも *E. coli* 感受性株に対する殺菌力は強く、ID<sub>50</sub> の TIPC で Fig. 24 のとおり、5 時間目には生菌数が 1/1000 に低下する。これに補体が共存しても殺菌力はそれほど増強されない。BRL 28500 では補体と ID<sub>50</sub> の薬剤を共存させると、Fig. 25 のとおり若干殺菌的協力的作用が見られる。

R (*bla*) plasmid, RE 28 を持つ *E. coli* CS 2 は TIPC に高度耐性を示し、その ID<sub>50</sub> は 2,398 µg/ml となる。この濃度の薬剤と補体を共存させても、Fig. 26 のとおり TIPC の殺菌力は特に増強されない。BRL 28500 は配合された CVA がこの菌の TEM 型 β-lactamase (PCase) を不活化するため、ID<sub>50</sub> が 18.6 µg/ml と小さい値になる。この濃度の薬剤と 0.75 units/ml の補体を



Fig. 29 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2 MIC of BRL 28500 by cultured mouse macrophages at 4 hrs after the incubation



共存させると、若干の協合作用が認められる (Fig. 27)。

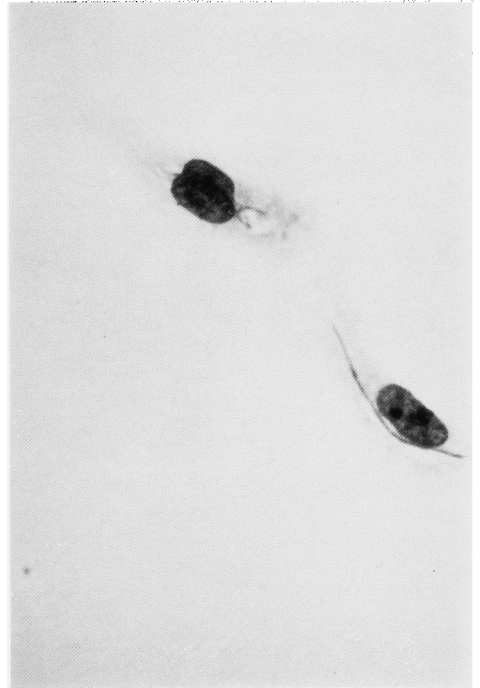
4. BRL 28500 と培養マウス M $\phi$  (マクロファージ) との協力的食菌殺菌作用

活性化した培養マウス M $\phi$  に *E. coli* NIHJ JC-2 を食菌させると、1~3時間によく菌細胞を取り込むが、感染後4時間以上たつと Fig. 28 のごとく、菌は細胞内で増殖し細胞を壊して外に遊出してくる。この場合 1/2 MIC の BRL 28500 を加えると、Fig. 29 のごとく若干 filament 化した細胞はよく食菌されるうえ、消化されて菌体は ghost 化し、M $\phi$  細胞は障害されない。Fig. 30 は 1/4 MIC の BRL 28500 存在下における食菌像であるが、この場合も菌細胞の良好な消化が認められる。さらに 1/8 MIC の BRL 28500 存在下でも M $\phi$  は多数の菌体を取り込み、消化しつつあることがわかる。

### III. 考 察

BRL 28500 の主剤である TIPC は、黄色ブドウ球菌から緑膿菌にわたる広範囲の細菌に平均した抗菌力を示す超広域 PC である。唯一の欠点は PCase 型  $\beta$ -lactamase に水解されるため、PCase 産生 *Staphylococci*, R 因子保有 Gram 陰性桿菌に耐性株が見られることである。これに PCase を強く永久不活化する CVA を 1/15 配合すると、ここに示したように PCase 型  $\beta$ -lacta-

Fig. 30 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/4 MIC of BRL 28500 by cultured mouse macrophages at 4 hrs after the incubation

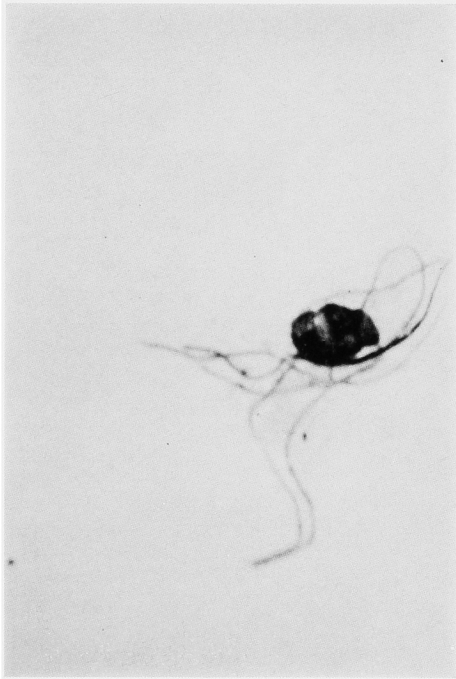


mase を産生する耐性株は感受性化するので、TIPC の抗菌力が再び発揮されるようになり、耐性菌対策としては理想の形となる。特に BRL 28500 を静脈投与した時、2時間近く血中に保持される 2  $\mu$ g/ml 以上の CVA 存在下では、TIPC の耐性菌に対する抗菌力は感受性菌に対するそれに近い値をとる。TIPC は CEPase ではほとんど水解されないの、CVA がなくとも緑膿菌を含め各種弱毒 Gram 陰性桿菌に相当程度の抗菌力を示し、CVA が CEPase を不活化できない弱点は不利とならない。

BRL 28500 は *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* の必須の PBP<sub>s</sub> ( $\mu$ レイン架橋酵素) に中等度以上の結合親和性を示し、R 因子保有 *E. coli* の PBP に対する結合親和性も、 $\beta$ -lactamase の存在によって障害されない。一般に PC<sub>s</sub> は菌細胞伸長時に要する PBP<sub>s</sub> に結合親和性が高いので、隔壁合成に要する PBP に結合親和性が高い、いわゆる第 1, 第 2 世代 cephem より殺菌力が高いと考えられる。TIPC も例外ではない。しかし、本剤は MRSA の特異画分 PBP 2' には結合親和性が低いので、MRSA に対する強い抗菌力は望みにくい。

BRL 28500 自身の殺菌力は強いが、血清補体との協力的殺菌作用はそれほど著明ではない。しかし、R 因子を持

Fig. 31 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/8 MIC of BRL 28500 by cultured mouse macrophages at 4 hrs after the incubation



ち TIPC 単独では高度耐性となる *E. coli* にも本剤は比較的濃度で強い殺菌作用を示す。

補体との協力作用はそれほど強くないが、BRL 28500 の培養マウス Mφ との協力的食菌殺菌作用は著明である。その 1/8 MIC 存在下でも若干 filament 化した *E. coli* 細胞はよく食菌され迅速に消化される。一般に菌の表面構造に影響を与える  $\beta$ -lactam 薬剤は、白血球との協力的殺菌作用が他の系統の抗生物質より強いことが知

られているが<sup>6)</sup>、1/8 MIC でも影響を与え得る BRL 28500 は  $\beta$ -lactam 薬剤の中でも Mφ との協力的殺菌作用が強い方である。

$\beta$ -lactam 薬剤の中で、PCs は呼吸器への組織移行が cephem より良好であるといわれる。BRL 28500 は MRSA を除く耐性菌対策の確立した超広域 PC で、一部の細菌にはその抗菌力が第 3 世代 cephem のそれに劣ることもあるが、各種細菌に平均した力を持つ点や、白血球との協力的食菌殺菌作用が強いことを考慮すると、高い臨床効果が期待される新しい  $\beta$ -lactam 薬剤同志の配合薬として期待される。

#### 文 献

- 1) 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 29 : 76~79, 1981
- 2) LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by the bacteriophage  $\phi$ . Virology 1 : 190~206, 1955
- 3) SPRATT, R. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 72 : 2999~3003, 1975
- 4) UTSUI, Y. & T. YOKOTA: Role of an altered penicillin binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 28 : 397~403 1985
- 5) 横田 健, 関口玲子, 東 映子: Cefmenoxime (SCE-1365) の各種  $\beta$ -lactamase およびペニリン結合蛋白質に対する親和性とその抗菌力との関係。Chemotherapy 29 (S-1) : 31~41, 1981
- 6) MILATOVIC, D. & I. BRAVENY: Wechselwirkungen zwischen antibiotika und phagozytose. Dtsch. med. Wschr. 107 : 1975~1979, 1982

BRL 28500 (CLAVULANIC ACID-TICARCILLIN), ITS ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY, AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEIN(PBP)S,  
AND SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECT WITH THE SERUM  
COMPLEMENT AND CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, EIKO SUZUKI, KYOKO ARAI and NAOYO KATO

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

BRL 28500 is a combination drug of clavulanic acid (CVA) that is a  $\beta$ -lactamase inhibitor, and broad spectrum-ticarcillin (TIPC), MIC<sub>80</sub> of BRL 28500 to 22 to 44 clinical isolates of *S. aureus*, MRSA, coagulase-negative staphylococci,  $\beta$ -Streptococci, *S. pneumoniae*, *E. coli* (R<sup>+</sup>), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *P. maltophilia*, *A. calcoaceticus* and *B. fragilis* were 12.5, 50, 25, 1.56, 0.78, 50, 50, 0.78, 6.25, 12.5, 50, 100, 50, 1.56, 50, 100, 25 and 3.13  $\mu$ g/ml, respectively. MIC<sub>80</sub> of TIPC in the presence of 2 $\mu$ g/ml of CVA which is minimum serum concentrations during 2 hrs after drip infusion of 3.2 g of BRL 28500, was smaller than that of BRL 28500, in many bacterial species.

BRL 28500 manifested strong binding affinity to PBP 3, 1 A, 2 and 1 Bs of *E. coli* in that order, suggesting its strong bactericidal effect. BRL 28500 bound strongly to PBP 2 and 3 of *S. aureus* and PBP 1, 3 A of *P. vulgaris*, also.

BRL 28500 showed a strong synergy of bactericidal effect with the complement even to TIPC-resistant strains of *E. coli* at rather low concentrations. Cultured mouse macrophages engulfed well and digested easily cells of *E. coli* in the presence of sub MICs of BRL 28500.