

## BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌作用

五島瑋智子・小川正俊・金子康子  
宮崎修一・辻明良・桑原章吾  
東邦大学医学部微生物学教室

$\beta$ -lactamase inhibitor である Clavulanic acid (CVA) と Ticarcillin (TIPC) との配合剤である BRL 28500 の臨床分離株に対する抗菌力は、TIPC に比べ明らかに抗菌力の増強がみとめられ、この傾向は、とくに *E. coli*, *Klebsiella*, *P. vulgaris* に対し著明であった。

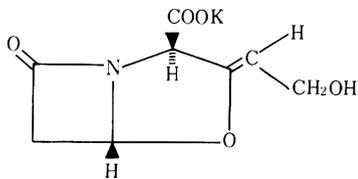
マウス実験感染に対する治療効果においても BRL 28500 は TIPC, Piperacillin (PIPC), Cefoperazone (CPZ) それぞれ単剤では無効な *P. vulgaris* GN 76, *E. coli* 121, *E. coli* ML 1410 RGN 823, *P. vulgaris* 9 の感染において治療効果が認められた。

*B. fragilis* と *E. coli* による混合感染においても、TIPC と CVA の強い併用効果が確認された。

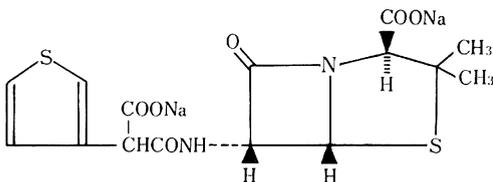
BRL 28500 は Clavulanic acid (CVA) と Ticarcillin (TIPC) とを 1:15 (力価比) の割合で配合した注射用製剤である。

CVA は  $\beta$ -lactamase inhibitor として知られ、とくに penicillinase 型の  $\beta$ -lactamase と不可逆的に結合し、不活化することが知られている。また、TIPC は Gram 陽性、陰性菌に有効なペニシリン系抗生剤であり、CVA の作用の弱い cephalosporinase 型の  $\beta$ -lactamase には安定であるといわれている。このことから TIPC と CVA の配合剤である BRL 28500 はすべての type の  $\beta$ -lactamase に安定となる<sup>1-4)</sup>。CVA と TIPC の構造式を Fig. 1 に示した。本報告は、BRL 28500 の各菌種に対する *in vitro*, *in vivo* 抗菌力を検討した実験成績である。

Fig. 1 Chemical structures of CVA and TIPC



Potassium clavulanate



Sodium ticarcillin

## I. 実験材料および実験方法

### 1. 使用菌株

教室保存株および臨床材料から 1980 年～1984 年に分離されたグラム陰性菌の多数株を用いた。

### 2. 薬剤

BRL 28500 (CVA, 55.5  $\mu$ g/mg, TIPC, 779  $\mu$ g/mg, ビーチャム薬品)

Ticarcillin (TIPC, 836.5  $\mu$ g/mg, ビーチャム薬品)

Clavulanic acid (CVA, 784  $\mu$ g/mg, ビーチャム薬品)

Piperacillin (PIPC, 918  $\mu$ g/mg, 富山化学)

Cefoperazone (CPZ, 949  $\mu$ g/mg, 富山化学)

### 3. 感受性測定法

日本化学療法学会標準法<sup>5)</sup>に準じて行った。測定用培地は Mueller Hinton agar (Difco) を用いた。嫌気性菌の測定には GAM 寒天培地 (日水) を使用した。

### 4. 殺菌作用

*P. aeruginosa* A 14 を用い、Mueller Hinton broth (Difco) で 37°C にて培養し、菌量が約  $10^8$  cells/ml になったときに、BRL 28500 を 1/4MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC 濃度にそれぞれ添加し、37°C にて振盪培養を行った。薬剤添加後 1, 3, 6 および 24 時間後に生菌数を測定した。対照として CVA, PIPC, TIPC, CPZ についても同様に処理した。

### 5. 不活化酵素に対する安定性

#### 1) 酵素液の調製

*E. coli* (4 株), *K. pneumoniae* (1 株), *Proteus sp.* (5 株), *C. freundii* (1 株), *E. cloacae* (1 株), *S. marcescens* (1 株), *P. aeruginosa* (2 株) は普通ブイヨン (栄研), *B. fragilis* (1 株) の場合には GAM broth (日水) を 250 ml にて、37°C 一夜振盪培養し、それぞれ遠心、集菌後、10ml の普通ブイヨンに浮遊したのち、超音

波破壊液を遠心後、無菌濾過し、その濾液を普通ブイヨン (pH 7.0) で 250 ml とし、被検酵素液とした。

## 2) 反応条件および bioassay 法

上記酵素液に TIPC : CVA を 15 : 1 の割合で、BRL 28500 を総量 50  $\mu\text{g/ml}$  (TIPC 46.88  $\mu\text{g/ml}$ , CVA 3.12  $\mu\text{g/ml}$ ) になるように加え、37°C で 0.5, 1, 2 および 4 時間静置したのち、100°C、1 分の熱処理にて酵素を不活化した。

対照として、TIPC, CVA, PIPC, CPZ などをそれぞれ単剤で同様に処理した。

反応液の薬剤残存力価をそれぞれの薬剤の検定菌を使用した薄層ディスク法により測定した。検定菌として、TIPC, PIPC は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株、CVA は *K. pneumoniae* ATCC 29665 株、CPZ は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 株を用いた。

## 6. マウス実験感染における治療効果

マウスは ICR 系、雄、体重 19  $\pm$  1 g、4 週齢を用い、*M. organii* GN 125, *E. coli* 35, *P. vulgaris* GN 76, *E. coli* 121, *E. coli* ML 1410 RGN 823, *K. pneumoniae* GN 69, *P. vulgaris* 9, *P. aeruginosa* A 14 株を腹腔内に感染させ、1 時間後に皮下投与にて治療を行った。

感染後 5 日間観察、マウスの生残率から ED<sub>50</sub> を算出した。ED<sub>50</sub> は VAN DER WAERDEN method により求

めた。

7. *B. fragilis* と *E. coli* の混合感染における治療効果  
前項の実験と同じマウスを用い、*E. coli* C 11 は MLD, *B. fragilis* GM 7004 は MLD 以下の感染菌量を腹腔内に混合感染させ、1 時間後に薬剤を皮下投与した。一方、死亡マウスの心血中の *E. coli* をドリガルスキー改良培地 (BTB 培地) を用いた好気培養により、*B. fragilis* は CEZ 20  $\mu\text{g/ml}$  含有 GAM 寒天培地を用いた嫌気培養によりそれぞれ生菌数を測定した。

## 8. マウス血清中濃度

実験感染と同種のマウスを用いた。薬剤は BRL 28500 (TIPC : CVA = 15 : 1) と CVA, TIPC, PIPC, CPZ を皮下投与したのち、5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間後にマウス 8 匹から採血した血液をフルシ、それぞれの時点での血清中濃度を測定した。

測定法としては TIPC, PIPC には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株、CVA は *K. pneumoniae* ATCC 29665 株、CPZ は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 株を検定菌とする薄層ディスク法を用いた。なお、各薬剤に対する検量線はマウス血清希釈によって求めた。

## II. 実験成績

### 1. 抗菌スヘクトラム

教室保存の各菌種に対する BRL 28500 の MIC を

Table 1 Antibacterial spectra of BRL28500, CVA, PIPC and CPZ

Inoculum size : 10<sup>8</sup> cells/ml

Species	BRL 28500	TIPC	CVA	PIPC	CPZ
<i>S. aureus</i> 209 P	0.78	1.56	12.5	0.39	1.56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.19	0.78	3.12	0.78	0.78
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	3.12	6.25	6.25	1.56	0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6623	3.12	6.25	6.25	1.56	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC2	3.12	6.25	50	0.78	0.19
<i>K. pneumoniae</i> IFO 3512	6.25	>100	12.5	0.39	0.012
<i>K. oxytoca</i> 1	12.5	50	50	1.56	0.025
<i>S. flexneri</i> 2a2	3.12	6.25	50	0.39	0.1
<i>S. typhi</i> S 60	0.39	0.78	25	0.39	0.05
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.39	0.78	12.5	0.19	0.05
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	0.19	0.39	50	0.19	0.05
<i>P. morganii</i> IFO 3848	0.19	0.39	50	0.19	0.025
<i>P. rettgeri</i> IFO 13501	0.39	0.78	100	0.19	0.025
<i>P. inconstans</i> IFO 12930	0.19	0.39	100	0.19	0.05
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	0.78	1.56	50	0.19	0.05
<i>C. freundii</i> 2	1.56	3.12	50	1.56	0.25
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	25	25	>100	1.56	50
<i>P. putida</i> ATCC 17464	100	>100	>100	3.12	50
<i>P. cepacia</i> ATCC 17759	0.19	25	25	0.78	50
<i>A. calcoaceticus</i> NCTC 7844	1.56	25	25	25	>100
<i>A. faecalis</i> NCTC 655	3.12	12.5	50	1.56	12.5
<i>A. xylosoxidans</i> TMS 73	3.12	6.25	6.25	1.56	100
<i>F. meningosepticum</i> TMS 466	100	>100	6.25	1.56	>100

TIPC, CVA, PIPC, CPZ と比較した成績を Table 1 に示した。

BRL 28500 はグラム陽性菌、陰性菌に幅広い抗菌スペクトルを有し、TIPC と比べ各菌種とも同等またはやや強い抗菌力をもち、とくに TIPC 耐性の *Klebsiella* 属に対して強い抗菌力を示した。また *P.cepacia*, *A. calcoaceticus* に対しても TIPC より強い抗菌力を示した。

2. 臨床分離株の感受性分布 (Fig. 2~16)

臨床材料から分離した *S. aureus* 50 株, Methicillin-resistant *S. aureus* 78 株, *S. epidermidis* 32 株, *E. faecalis* 30 株, *E. coli* 33 株, *K. pneumoniae* 30 株, *P. mirabilis* 30 株, *P. vulgaris* 20 株, *M. morgani* 20 株, *P. rettgeri* 20 株, *P. stuartii* 20 株, *S. marcescens* 20 株, *E. cloacae* 25 株, *C. freundii* 16 株, *P. aeruginosa* 25 株に対する BRL 28500, TIPC, CVA, PIPC, CPZ

の MIC 分布を比較した成績を Fig. 2~16 に示した。また TIPC に CVA 2  $\mu\text{g/ml}$  を加えた場合の MIC も同時に検討した。

*S. aureus* に対し  $10^6$  cells/ml 接種では、BRL 28500 の抗菌力は PIPC とほぼ同程度で、TIPC および CVA より強い活性を示した。 $10^8$  cells/ml 接種での MIC は約 2 管 (4 倍) 程度高くなっていた。

また methicillin 耐性 *S. aureus* (培養温度;  $37^\circ\text{C}$ , MIC  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上を耐性とした) に対しては、全薬剤とも広い MIC 分布を示し、BRL 28500 は菌株の 80% は  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上の MIC を示した (Fig. 2, 3)。

*S. epidermidis* に対する BRL 28500 の抗菌力は  $10^6$  cells/ml 接種の場合、CPZ よりわずかに劣ったが PIPC, TIPC, CVA より強いことが認められた。 $10^6$  cells/ml 接種では、BRL 28500 の MIC 分布は  $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 25$

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates, *S. aureus* 50 strains

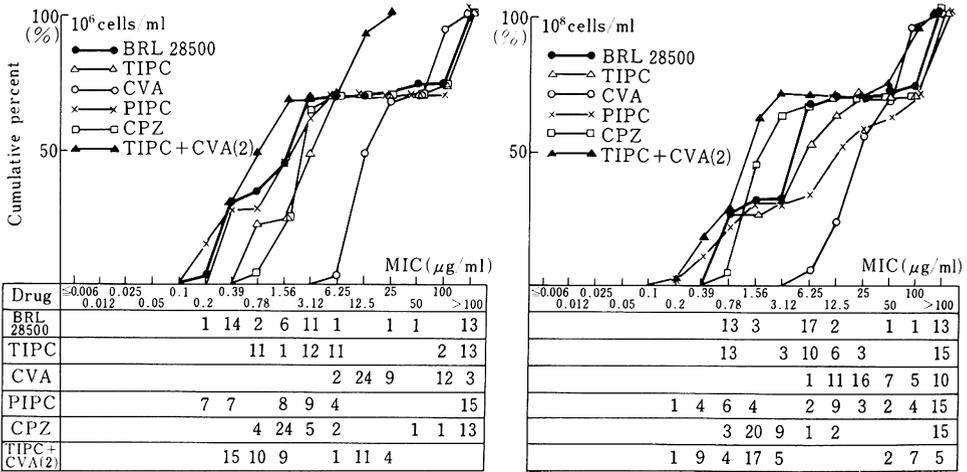


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates Methicillin-resistant *S. aureus* 78 strains

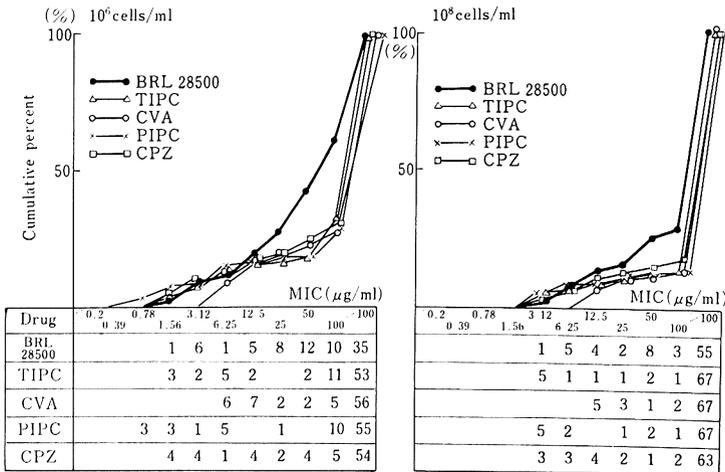


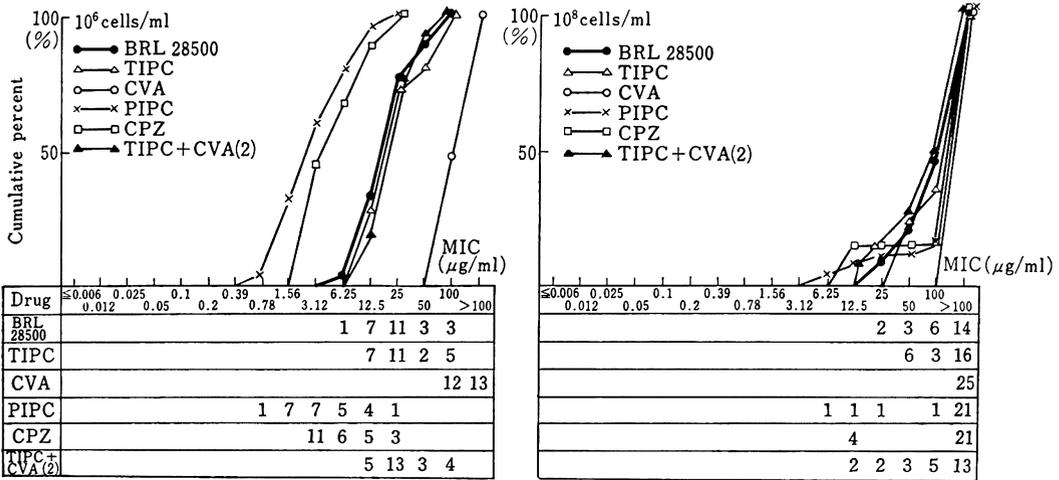








Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates, *P. aeruginosa* 25 strains



μg/ml で、CPZ とほぼ同程度で、PIPC よりやや弱い TIPC、CVA より強い抗菌力を示した (Fig. 4)。

*E. faecalis* に対する BRL 28500 の抗菌力は TIPC、CPZ と同様に弱く、全株 25 μg/ml 以上に分布し、PIPC に感性を示す株にも耐性であった (Fig. 5)。

*E. coli*、*K. pneumoniae* においては、接種菌量が 10<sup>8</sup> cells/ml の条件では、BRL 28500 は他剤より強い抗菌力を示したが、10<sup>6</sup> cells/ml 接種では CPZ、PIPC より抗菌力が劣り、その MIC のピークは 1.56 μg/ml ~ 3.12 μg/ml であった (Fig. 6, 7)。

*P. mirabilis* では、10<sup>8</sup> cells/ml 接種において 6 剤とも全株 25 μg/ml 以上に分布していたが、10<sup>6</sup> cells/ml 接種での BRL 28500 の MIC のピークは 0.78 μg/ml で TIPC と同等であったが、PIPC、CPZ より 2 管程度弱かった (Fig. 8)。

*P. vulgaris* の場合、BRL 28500 は PIPC より抗菌力が弱い、CPZ とは同程度、TIPC よりは強く、CVA 添加の効果が認められた (Fig. 9)。

*M. morgani*、*P. rettgeri*、*P. stuartii* では、接種菌量 10<sup>8</sup> cells/ml の場合、BRL 28500 の抗菌力は TIPC、PIPC、CPZ とほぼ同程度で、その MIC のピークは 0.39 ~ 0.79 μg/ml であった。この場合も接種菌量による MIC は著しく異なっていた (Fig. 10, 11, 12)。

*S. marcescens* では、BRL 28500 は PIPC、CPZ より抗菌力は弱い、TIPC に高度耐性を示した 10 株中 7 株の MIC は 25 μg/ml ~ 50 μg/ml に低下した (Fig. 13)。

*E. cloacae* に対し、BRL 28500 は 10<sup>8</sup> cells/ml 接種の場合に、TIPC、CPZ、PIPC よりやや抗菌力は強い傾向が認められた。しかし、10<sup>6</sup> cells/ml 接種では、その抗菌力は CPZ > PIPC > BRL 28500 > CVA の順であった

(Fig. 14)。

*C. freundii*、*P. aeruginosa* では、BRL 28500 の抗菌力は PIPC、CPZ より弱い傾向を示した (Fig. 15, 16)。

3. 殺菌作用における BRL 28500 の効果

Fig. 17 は *P. aeruginosa* A 14 株に対する BRL 28500、CVA、TIPC、PIPC、CPZ の殺菌作用を比較した成績である。

*P. aeruginosa* A 14 株に対する BRL 28500 および PIPC の MIC はともに 3.12 μg/ml で、TIPC および CPZ の MIC は 6.25 μg/ml である。BRL 28500 の 4 MIC および 2 MIC の添加において殺菌作用がみられ、24 時間まで再増殖が抑制されるのに比べ、CVA、TIPC、PIPC、CPZ の 2 MIC 添加時では、6 時間後に再増殖が認められた。

4. 不活化酵素に対する安定性

β-lactamase 産生菌 10 菌種 15 菌株よりえられた不活化酵素に対する BRL 28500 の安定性をペニシリン系薬剤およびセフェム系薬剤と比較した成績を Fig. 18 に示した。

BRL 28500 は *S. marcescens* No. 78 株の産生する RICHMOND type Ia の β-lactamase に不活化されたが、他の菌株の産生する不活化酵素には安定であった。

Fig. 19 は *B. fragilis* GM 7004 株の産生する β-lactamase に対する各薬剤の安定性をしらべた成績である。CPZ は 2 時間後に完全に不活化されたが、BRL 28500、CVA は作用 4 時間後まで安定であった。PIPC、TIPC はともに約 30% の力価の減少が認められた。

5. マウス実験感染における治療効果

1) β-lactamase 産生菌による感染 (Table 2)

*M. morgani* GN 125 株 (RICHMOND type Ia) を感

Fig. 17 Bactericidal activity of BRL 28500, TIPC, CVA, PIPC and CPZ against *P. aeruginosa* A 14

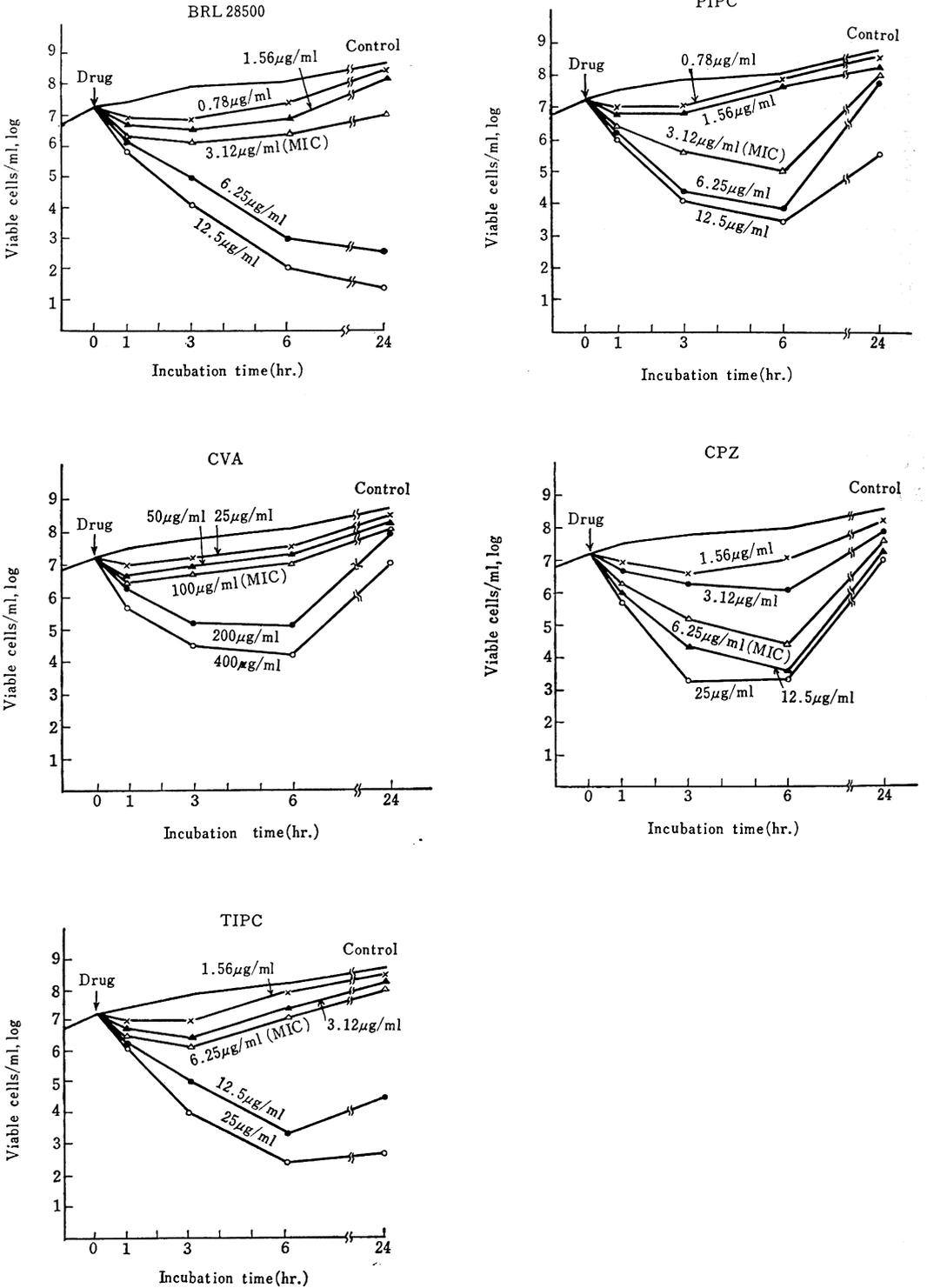


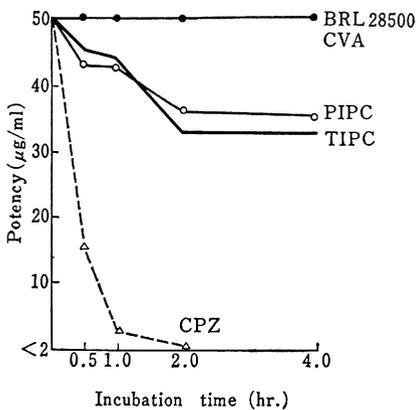
Fig. 18 Enzymatic Stability of Penicilins and Cephalosporins

Incubation time 4 hr.  
Initial potency : 50 $\mu$ g/ml

Richmond type	Source of enzymes													
	<i>P. rettigeri</i> GN 624	<i>P. incosons</i> GN 627	<i>C. frumigii</i> GN-346	<i>E. cloacae</i> No. 91	<i>S. aureus</i> No. 78	<i>E. coli</i> 35	<i>P. vulgaris</i> GN-76	<i>P. aeruginosa</i> No. 11	<i>P. mirabilis</i> GN-79	<i>E. coli</i> ML-1410 RGN-823	<i>K. pneumoniae</i> GN-69	<i>E. coli</i> ML-1410 RGN-238	<i>P. vulgaris</i> No. 9	<i>K. aeruginosa</i> No. 47
Ia														
Ib														
Ic														
Id														
II														
III														
IV														
V														
Drugs	PCG													
	ABPC													
	CBPC													
	SBPC													
	MZPC													
	APPC													
	PIPC													
	TIPC													
	MCIPC													
	CER													
	CEX													
	CFT													
	CXD													
	CCL													
	CEZ													
	CMD													
	CFX													
	CMZ													
	CXM													
	CTM								NT					
	CFS													
	CTX													
	CPZ													
	CZX													
	CMX													
	LMOX													
	CAZ													
	CVA													
	SBT													
	BRL28500													

Remaining potency( $\mu$ g/ml) □ : 50 □ : 50-35 □ : 35-20 □ : 20-2 □ : <2

Fig. 19 Enzymatic stability of BRL 28500 *B. fragilis* GM 7004



染菌としたマウス実験感染において BRL 28500 の ED<sub>50</sub> は 2.5 mg/mouse で、TIPC (3.9 mg/mouse), CVA (>20 mg/mouse), PIPC (5.0 mg/mouse), CPZ (7.9

Fig. 20 Therapeutic effect of BRL 28500 on mice infected simultaneously with *B. fragilis* and *E. coli*

Organisms (Challenge dose)	Dose of drug (mg/mouse)	Survival (%)	Viable cells in blood from died mice (cfu/mouse)							
			<i>B. fragilis</i>				<i>E. coli</i>			
<i>B. fragilis</i> GM7004 1.25 $\times 10^8$ cfu/mouse + <i>E. coli</i> C11 1.3 $\times 10^8$ cfu/mouse	0	0								
	0.31	0								
	1.25	20								
	5	60								
	20	100								

Fig. 21 Therapeutic effect of TIPC on mice infected simultaneously with *B. fragilis* and *E. coli*

Organisms (Challenge dose)	Dose of drug (mg/mouse)	Survival (%)	Viable cells in blood from died mice (cfu/mouse)							
			<i>B. fragilis</i>				<i>E. coli</i>			
<i>B. fragilis</i> GM7004 1.25 $\times 10^8$ cfu/mouse + <i>E. coli</i> C11 1.3 $\times 10^8$ cfu/mouse	0	0								
	0.31	0								
	1.25	0								
	5	40								
	20	100								

mg/mouse) より優れた治療効果が認められた。

RICHMOND type Ib, Ic の *E. coli* 35, *P. vulgaris* GN 76 においても同様の傾向が認められたが, *E. coli* 35 では CPZ とほぼ同等の ED<sub>50</sub> であった。

RICHMOND type II の *E. coli* 121, RICHMOND type III の *E. coli* ML 1410 RGN 823 を感染菌とした場合には, BRL 28500 のみが治療効果を示し, 他剤は無効であった。RICHMOND type IV の *K. pneumoniae* GN 69 では全薬剤とも治療効果は無効であった。

RICHMOND type V の *P. vulgaris* 9 を感染菌とした場合は BRL 28500 の ED<sub>50</sub> は 6.2 mg/mouse を示し, 他剤より小さい ED<sub>50</sub> を示した。

2) *P. aeruginosa* 感染 (Table 3)

*P. aeruginosa* A 14 を感染菌とした場合の成績を Table 3 に示した。BRL 28500 の ED<sub>50</sub> は 12.6 mg/mouse を示し, PIPC は 15.8 mg/mouse, TIPC は 20 mg/mouse, CPZ は 25.1 mg/mouse, CVA は >40 mg/mouse であり, BRL 28500 の治療効果が他剤に比べ良好であった (Table 3)。

3) *B. fragilis* と *E. coli* の混合感染に対する BRL 28500 の治療効果 (Table 4)。

Table 2 Protective effect of BRL28500 and related antibacterial drugs on infections with  $\beta$ -lactamase producing strains in mice

Organisms	RICHMOND type	Drugs	Challenge dose cfu/mouse	MIC( $\mu$ g/ml)		ED <sub>50</sub> * mg/mouse
				10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	
<i>M. organii</i> GN125	Ia	BRL28500	1 × 10 <sup>6</sup> (+)	6.25	1.56	2.5 (1.6–3.7)
		CVA		>100	25	>20
		TIPC		50	0.78	3.9 (2.9–5.3)
		PIPC		>100	0.19	5.0 (3.6–6.8)
		CPZ		6.25	0.78	7.9 (6.2–10.0)
<i>E. coli</i> 35	Ib	BRL28500	5 × 10 <sup>7</sup> (+)	50	25	1.5 (1.0–2.3)
		CVA		100	25	>20.0
		TIPC		50	25	5.0 (3.6–6.3)
		PIPC		50	12.5	20.0
		CPZ		1.56	0.39	1.2 (0.7–2.0)
<i>P. vulgaris</i> GN76	Ic	BRL28500	1 × 10 <sup>4</sup> (+)	12.5	0.78	10.0
		CVA		100	50	>20
		TIPC		50	25	15.8
		PIPC		25	3.12	>20
		CPZ		>100	0.78	20
<i>E. coli</i> 121	II	BRL28500	1 × 10 <sup>7</sup> (+)	>100	50	2.5 (1.6–3.7)
		CVA		>100	25	>20
		TIPC		>100	>100	>20
		PIPC		>100	>100	>20
		CPZ		>100	0.78	10
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	III	BRL28500	6 × 10 <sup>7</sup> (+)	100	25	13.1
		CVA		>100	50	>20
		TIPC		>100	100	>20
		PIPC		>100	25	>20
		CPZ		>100	25	>20
<i>K. pneumoniae</i> GN69	IV	BRL28500	3 × 10 <sup>6</sup> (+)	50	25	>20
		CVA		>100	25	>20
		TIPC		>100	25	>20
		PIPC		>100	25	>20
		CPZ		>100	12.5	>20
<i>P. vulgaris</i> 9	V	BRL28500	8 × 10 <sup>7</sup> (+)	>100	3.12	6.2 (4.7–8.4)
		CVA		>100	100	>20
		TIPC		>100	100	20
		PIPC		>100	0.78	15.8
		CPZ		>100	1.56	10

\* ED<sub>50</sub> : Van der Waerden method

Mice : ICR, 4W, 19 ± 1g, 6 animals/group

Administration : S.C. 1 hr after infection

(+) : 5% mucin

MLD : *M. organii* GN125*E. coli* 35*P. vulgaris* GN76*E. coli* 121*E. coli* ML1410 RGN823*K. pneumoniae* GN69*P. vulgaris* 98 × 10<sup>7</sup>(+) cfu/mouse2 × 10<sup>7</sup>(+) cfu/mouse2 × 10<sup>7</sup>(+) cfu/mouse3.6 × 10<sup>6</sup>(+) cfu/mouse6 × 10<sup>7</sup>(+) cfu/mouse3 × 10<sup>6</sup>(+) cfu/mouse4 × 10<sup>7</sup>(+) cfu/mouse

Table 3 Protecting effect of BRL28500 on infection with *P. aeruginosa* A14 in mice

Antibiotics	Challenge dose (cfu/mouse)	5% mucin	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		ED <sub>50</sub> (mg/mouse)
			10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	
BRL28500	5 × 10 <sup>6</sup>	+	25	3.12	12.6 (9.0-17.4)
TIPC	5 × 10 <sup>6</sup>	+	12.5	6.25	20
CVA	5 × 10 <sup>6</sup>	+	>100	100	>40
PIPC	5 × 10 <sup>6</sup>	+	>100	3.12	15.8 (12.5-20.0)
CPZ	5 × 10 <sup>6</sup>	+	>100	6.25	25.1

Strain : *P. aeruginosa* A14  
 (+) : 5% mucin  
 MLD : 8.4 × 10<sup>4</sup> (+) cfu/mouse  
 Mice : ICR. 4w, ♂, 19 ± 1g, 6 animals/group  
 Administration : S.C. 1 hr. after infection

Table 4 Protecting effect of BRL28500 and other related antibacterial drugs on mice infected simultaneously with *B. fragilis* and *E. coli*

Drugs	Challenge dose (cfu/mouse)		MIC $\mu\text{g/ml}$				ED <sub>50</sub> * mg/mouse
	<i>B. fragilis</i> GM 7004	<i>E. coli</i> C11	<i>B. fragilis</i> GM 7004		<i>E. coli</i> C11		
			10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	
BRL28500	1.25 × 10 <sup>8</sup>	3 × 10 <sup>8</sup>	12.5	0.78	>100	12.5	3.3 (2.4-4.4)
CVA			>100	12.5	50	50	10.0
TIPC			>100	50	1.56	0.78	5.7 (4.5-7.1)
PIPC			>100	50	25	0.78	5.7 (4.5-7.1)
CPZ			>100	>100	0.78	0.1	6.5 (5.3-7.4)

\* Van der Waerden method. Administration : S.C. 1 hr after infection

Mice : ICR, 4W, ♂, 19 ± 1g, 10 animals/group  
 MLD : *B. fragilis* GM 7004 5 × 10<sup>9</sup> cfu/mouse  
*E. coli* C11 3 × 10<sup>8</sup> cfu/mouse

*B. fragilis* GM 7004 と *E. coli* C 11 による混合感染に対する BRL 28500 の治療効果を TIPC, CVA, PIPC, CPZ と比較した成績を Table 4 に示した。

BRL 28500 の ED<sub>50</sub> は 3.3 mg/mouse を示し, CVA, TIPC, PIPC, CPZ より小さい ED<sub>50</sub> を示した。

死亡したマウス心臓からの検出菌を Fig. 20~21 に示した。BRL 28500, TIPC とも死亡マウスからは *E. coli*, *B. fragilis* の両菌種が検出され, control と同様の傾向であった。

#### 6. マウス血清中濃度

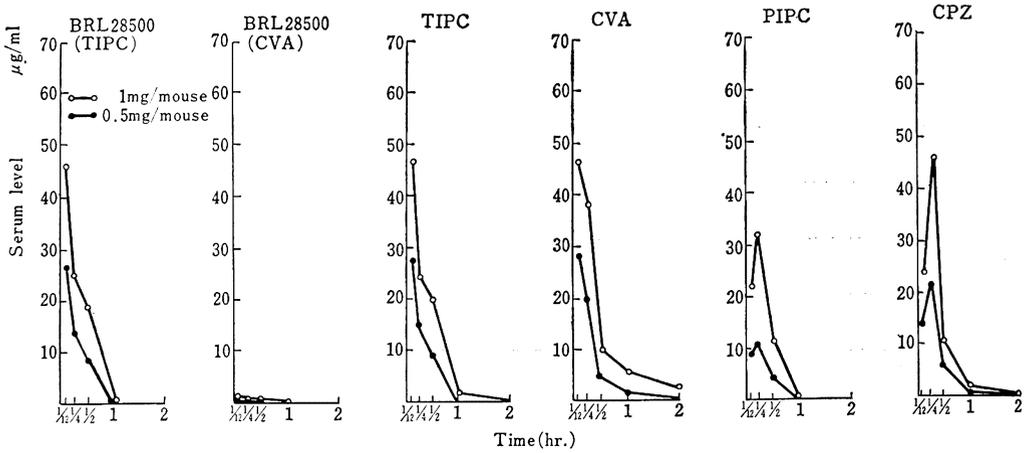
BRL 28500 の 1 mg/mouse および 0.5 mg/mouse を

マウスに皮下投与し, 経時的に血清中濃度を測定した成績を Fig. 22 に示した。

BRL 28500 は TIPC と CVA を 15 : 1 の割合に配合しているため, BRL 28500 の血清中濃度の表示は TIPC と CVA のそれぞれについて検討した成績を示した。BRL 28500 の TIPC での血清中濃度は投与 5 分でピークを示し, 1 mg/mouse 投与の場合 46  $\mu\text{g/ml}$  の値を示し, CVA での値は 1 mg/mouse 投与 5 分後で 1.0  $\mu\text{g/ml}$  であった。

TIPC と CVA の合剤である BRL 28500 は配合比が 15 : 1 で, TIPC が 93.75%, CVA が 6.25% であるに

Fig. 22 Serum levels in mice



Time (hr.)	Drug	1 mg/mouse						0.5mg/mouse					
		BRL28500		TIPC	CVA	PIPC	CPZ	BRL28500		TIPC	CVA	PIPC	CPZ
		TIPC	CVA					TIPC	CVA				
1/12		46.0	1.0	46.0	46.0	22.0	24.0	27.0	0.3	28.0	28.0	9.0	14.0
1/4		25.0	0.25	24.0	39.0	32.0	47.0	14.0	0.2	15.0	20.0	11.0	22.0
1/2		19.0	0.36	19.0	9.0	11.0	12.0	8.0	0.06	9.0	5.0	5.0	7.0
1		ND	ND	1.5	6.0	ND	2.0	ND	ND	1.5	1.5	ND	1.0
2		ND	ND	ND	3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Mice: ICR, 4W, 19±1g, 8 animals /group  
Route: S.C.  
ND: Not detected.

(µg/ml)

もかわらず、TIPC の血清中濃度は、TIPC 単独投与と同じレベルを示した。

III. 考察と結論

BRL 28500 は TIPC と CVA の配合剤であり、CVA の β-lactamase inhibitor としての作用が抗菌作用に反映されるかどうかを TIPC と比較した。

その結果、in vitro では臨床分離株に対する BRL 28500 の抗菌力は TIPC に比べて強く、TIPC と CVA 共存時に明らかな相乗的抗菌力増強が認められた。しかし、その程度は菌種により異なった。

すなわち E. coli, K. pneumoniae, P. vulgaris, E. cloacae において BRL 28500 の抗菌力が TIPC 単剤より増強されたが、Methicillin 耐性 S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, P. mirabilis, P. rettgeri, P. stuartii および C. freundii では弱かった。

しかし、P. aeruginosa に対する殺菌作用では、BRL 28500 は TIPC, CVA 単剤に比べ殺菌効果が著明で、長時間増殖が抑制され、明らかに殺菌効果の増強が認められた。

これは菌の産生する β-lactamase に対し、TIPC 単剤では失活するが、CVA との併用により、RICHMOND type I

a の S. marcescens No. 78 を除く、他の RICHMOND type すべてに TIPC が安定となる成績とも相関している。

マウス実験感染での成績は、in vitro の MIC の成績とほぼ相関し、BRL 28500 は TIPC 単剤では無効となった E. coli 121, RICHMOND type III, V の E. coli ML 1410 RGN 823, P. vulgaris 9 に対し強い治療効果がみられ、in vitro における β-lactamase に対する安定性と相関していた。

CVA を含有する BRL 28500 投与後の TIPC の血清中濃度は、TIPC 単剤投与とほぼ同じレベルで、このことが in vitro と in vivo が相関した成績をもたらしたと考えられる。

TIPC と CVA の配合剤である BRL 28500 はすべての菌種に同等ではないが、β-lactamase の種類によっては著しい阻害作用が認められ、臨床的にも有用性が期待できると考えられた。

文 献

1) READING, C. & M. Cole: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from Streptomyces clavuligerus. Antimicrob. Agents Chemother. 11(5): 852~857, 1977

- 2) WISE, R.; J. W. ANDREWS & K. A. BEDFORD: *In vitro* study of clavulanic acid in combination with penicillin, amoxicillin, and carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13(3): 389~393, 1978
- 3) WUST, J. & T. D. WILKINS: Effect of clavulanic acid on anaerobic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13(11): 130~133, 1978
- 4) 五島 堯智子, 小川正俊, 金子康子, 宮崎修一, 辻明良, 桑原章吾:  $\beta$ -lactamase 産生菌における Clavulanic acid の  $\beta$ -lactamase inhibitor の効果 —Clavulanic acid と Amoxicillin および Ampicillin との併用による抗菌作用の増強—. *Chemotherapy* 30 (S-2): 20~28, 1982
- 5) 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

## IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF BRL 28500 (CLAVULANIC ACID-TICARCILLIN)

SACHIKO GOTO, MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO, SHUICHI MIYAZAKI,  
AKIYOSHI TSUJI and SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine

The antibacterial effect of a combination of ticarcillin (TIPC) and the potent irreversible inhibitor of  $\beta$ -lactamase, clavulanic acid (CVA), was investigated both *in vitro* and *in vivo*.

The antibacterial activity of the combination BRL 28500 was enhanced against clinical isolates of various species, especially *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. vulgaris* compared with that of ticarcillin alone.

In treatment of single infections in mice due to *P. vulgaris* GN76, *E. coli* No.121, *E. coli* ML 1410 RGN 823 and *P. vulgaris* No.9, a single subcutaneous injection of BRL 28500 showed potent therapeutic activity, although no such activity was found with ticarcillin, piperacillin or cefoperazone alone. In a mixed infection due to *B. fragilis* and *E. coli*, again potent activity was found with the BRL 28500.