

## BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の嫌気性菌に対する抗菌力

渡辺邦友・沢 赫代・山岡一清・沢村治樹

青木 誠・小林とよ子・上野一恵

岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設

BRL 28500 の嫌気性菌に対する *in vitro* および *in vivo* における抗菌力を、TIPC および PIPC と比較検討した。

教室保存の嫌気性参考菌株 75 株の大部分の株に対して BRL 28500 は 6.25  $\mu\text{g/ml}$  で発育を阻止した。また、TIPC 耐性菌に対して、CVA 2.5  $\mu\text{g/ml}$  添加で TIPC の抗菌力の増強が認められた。

臨床分離の *B. fragilis* 114 株に対して、BRL 28500 は TIPC および PIPC より強い抗菌力を示し、特に  $\beta$ -lactamase 産生の 40 株に対しては抗菌力の増強が著明であった。

*B. fragilis* によるマウス実験の皮下膿瘍形成実験において BRL 28500 は、TIPC および CVA と比較して強い膿瘍形成阻止効果が認められた。

以上より、BRL 28500 は嫌気性菌感染症に対して高い有用性が期待できる。

BRL 28500 は、 $\beta$ -lactamase 阻害剤である clavulanic acid (CVA) と注射用ペニシリンである ticarcillin (TIPC) との 1:15 配合剤である。TIPC の抗菌力は好気性グラム陽性、陰性菌および嫌気性菌にまで及び、特に *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* などにも抗菌力を有していることが特徴とされた。しかし、TIPC は RICHMOND 分類による Ic, II, III, VI, V 型の  $\beta$ -lactamase に対し比較的不安定であったことから、これらの型の  $\beta$ -lactamase 産生菌の分離頻度が上昇している今日ではその有用性が低下しているといえる。CVA は、これらの  $\beta$ -lactamase に対し阻害作用を有し、TIPC との配合により、TIPC の抗菌スペクトラムおよび抗菌力の増大、回復が期待される。

嫌気性菌の中では、*Bacteroides fragilis* が Ic 型の  $\beta$ -lactamase を産生することが知られている<sup>3)</sup>。今回、私共は BRL 28500 の嫌気性菌に対する抗菌力を検討した。

## I. 材料と方法

## 1. 供試菌株

教室保存の参考菌株 75 株と臨床分離の *Bacteroides fragilis* 114 株を用いた。参考菌株の中には、*Streptococcus mutans*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Capnocytophaga gingivalis* および *Capnocytophaga ochracea* など好気培養または炭酸ガス培養で発育できる菌種・菌株も含まれている。これらは、すべて 15% スキムミルク水溶液を保護剤として  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存されていたものである。

## 供試薬剤

いずれも力価の明らかな原末を使用した。

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| BRL 28500             | ビーチャム薬品(株) |
| Ticarcillin (TIPC)    | ビーチャム薬品(株) |
| Clavulanic acid (CVA) | ビーチャム薬品(株) |
| Piperacillin (PIPC)   | 富山化学(株)    |

## 2. 最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) の測定

MIC は、寒天平板希釈法により行った。寒天平板希釈法は、日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup> に準じて行った。すなわち、薬剤含有培地は、GAM 寒天培地 (ニッスイ) を基礎培地として作製した。なお、vitamin K を 10  $\mu\text{g/ml}$  の最終濃度となるように添加した。接種菌液は  $10^8$  cfu/ml と  $10^9$  cfu/ml の 2 種類とし、GAM ブイヨン (ニッスイ) での 24~48 時間培養菌液から調整した。薬剤含有平板への菌の接種は、マイクロプランター (佐久間) を使用し可及的迅速に行い、培養は嫌気性グローブボックス (平沢) 内で  $37^{\circ}\text{C}$ , 48 時間行った。

3. *Bacteroides fragilis* GAI-0558 による実験的マウス皮下膿瘍に対する BRL 28500 の効果

ddy 系  $18 \pm 2$  g のマウスを 1 群 10 匹として実験を行った<sup>2)</sup>。*B. fragilis* GAI-0558 の PYG broth (Scott) での 24 時間培養液を同量の Autoclaved caecal contents (以下 ACC) に加えたもの 0.4 ml をマウス皮下に接種した。この 0.4 ml 中には、*B. fragilis* が  $6.4 \times 10^7$  cells 含まれる。

菌接種後 2, 24 および 48 時間後に BRL 28500,

Table 1-1 Comparative antibacterial activity of clavulanic acid, ticarcillin, BRL28500 and piperacillin against anaerobic bacteria

| Stock No. | Strain                              | CVA             |                 | TIPC            |                 | BRL28500        |                 | PIPC            |                 |
|-----------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           |                                     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>8</sup> |
| ATCC14956 | <i>Peptostreptococcus magnus</i>    | ≤12.5           | ≤12.5           | 0.39            | 0.78            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 29328   | <i>P. magnus</i>                    | ≤12.5           | ≤12.5           | 0.20            | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 13953   | <i>P. asaccharolyticus</i>          | ≤12.5           | 25              | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.20            |
| WAL3218   | <i>P. asaccharolyticus</i>          | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC27337 | <i>P. anaerobius</i>                | 100             | 400             | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 6.25            | 0.39            | 6.25            |
| VPI5464-1 | <i>P. micros</i>                    | 25              | 50              | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | 1.56            | 0.39            |
| " 0546    | <i>Streptococcus parvulus</i>       | ≤12.5           | ≤12.5           | 1.56            | 1.56            | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.78            | 0.78            |
| ATCC25175 | <i>S. mutans</i>                    | 25              | 200             | 1.56            | 1.56            | 0.39            | 0.78            | 0.20            | 0.20            |
| " 27735   | <i>S. intermedius</i>               | 25              | 100             | 1.56            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.20            | 0.39            |
| " 27823   | <i>S. constellatus</i>              | 50              | 100             | 1.56            | 3.13            | 1.56            | 3.13            | 0.39            | 0.39            |
| " 6919    | <i>Propionibacterium acnes</i>      | 25              | 50              | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 25564   | <i>P. acnes</i>                     | ≤12.5           | 25              | 0.39            | 0.78            | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.20            | 0.39            |
| " 11828   | <i>P. acnes</i>                     | ≤12.5           | 50              | 0.39            | 0.78            | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.78            | 3.13            |
| " 11827   | <i>P. acnes</i>                     | 25              | 50              | 0.78            | 0.78            | ≤0.10           | 0.20            | 1.56            | 0.39            |
| " 8486    | <i>Eubacterium limosum</i>          | 50              | 50              | 25              | 25              | 25              | 25              | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 27803   | <i>E. cylindroides</i>              | 12.5            | 50              | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 1.56            | 3.13            |
| VPI0310   | <i>E. plauti</i>                    | ≤12.5           | 50              | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 0.39            | 0.78            |
| " 0311    | <i>E. plauti</i>                    | 25              | 100             | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 0.39            | 100             |
| ATCC25986 | <i>E. aerofaciens</i>               | 50              | 50              | 3.13            | 3.13            | 3.13            | 3.13            | ≤0.10           | 0.20            |
| " 15703   | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | 100             | 200             | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 14940   | <i>Clostridium symbiosum</i>        | 50              | 100             | 0.78            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 0.20            | 0.20            |
| " 14501   | <i>C. innocuum</i>                  | 400             | 400             | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 1.56            | 1.56            |
| " 25537   | <i>C. clostridiiforme</i>           | 25              | 50              | 0.78            | 1.56            | 0.39            | 1.56            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 13123   | <i>C. perfringens</i>               | 25              | 50              | 0.39            | 0.39            | 0.20            | 0.39            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 3624    | <i>C. perfringens</i>               | 25              | 50              | 0.20            | 25              | 0.20            | 12.5            | ≤0.10           | 25              |
| " 25582   | <i>C. ramosum</i>                   | 100             | 200             | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | ≤0.10           | 0.20            |
| " 9689    | <i>C. difficile</i>                 | >400            | >400            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 3.13            | 6.25            |
| " 10779   | <i>C. tetani</i>                    | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | 1.56            | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | 0.78            |
| " 19406   | <i>C. tetani</i>                    | 25              | 25              | 0.20            | 0.78            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.20            |
| " 19401   | <i>C. histolyticum</i>              | 25              | 100             | 0.39            | 0.39            | 0.39            | 0.39            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 19404   | <i>C. sporogenes</i>                | 100             | 200             | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.39            | 0.20            | 0.78            |
| " 3584    | <i>C. sporogenes</i>                | 50              | 100             | 0.39            | 0.39            | 0.39            | 0.39            | 0.20            | 0.20            |
| " 19402   | <i>C. novyi A</i>                   | ≤12.5           | ≤12.5           | 0.20            | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 19405   | <i>C. tertium</i>                   | 25              | 100             | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 6.25            | 3.13            | 6.25            |
| " 9714    | <i>C. sordellii</i>                 | ≤12.5           | 25              | 0.39            | 0.39            | ≤0.10           | 0.20            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 10790   | <i>Veillonella parvula</i>          | 25              | 25              | 1.56            | 1.56            | 0.39            | 0.39            | 25              | 25              |
| VPI4249   | <i>Fusobacterium mortiferum</i>     | 100             | >400            | 0.78            | 6.25            | 0.78            | 6.25            | 0.39            | 6.25            |
| B-108B    | <i>F. mortiferum</i>                | 200             | 200             | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 0.78            | 6.25            | 6.25            |
| " 917     | <i>F. mortiferum</i>                | 400             | >400            | 0.78            | 6.25            | 0.78            | 6.25            | 6.25            | 25              |
| VPI5696   | <i>F. mortiferum</i>                | 200             | 200             | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.39            | 0.39            |
| SPH-1     | <i>F. necrophorum</i>               | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC25281 | <i>F. necrophorum</i>               | ≤12.5           | 25              | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 10953   | <i>F. nucleatum</i>                 | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| F-1       | <i>F. nucleatum</i>                 | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC25586 | <i>F. nucleatum</i>                 | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 25              |
| VPI0482A  | <i>F. gonidiaformans</i>            | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 4381    | <i>F. gonidiaformans</i>            | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC8501  | <i>F. varium</i>                    | 200             | 400             | 1.56            | 6.25            | 1.56            | 1.56            | 6.25            | 6.25            |
| VPI4877   | <i>F. naviforme</i>                 | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC25285 | <i>Bacteroides fragilis</i>         | 25              | 25              | 12.5            | 50              | ≤0.10           | 0.78            | 3.13            | 50              |
| GM7000    | <i>B. fragilis</i>                  | ≤12.5           | 100             | 12.5            | 25              | ≤0.10           | 1.56            | 1.56            | 12.5            |

Table 1-2 Comparative antibacterial activity of clavulanic acid, ticarcillin, BRL28500 and piperacillin against anaerobic bacteria

| Stock No. | Strain                         | CVA             |                 | TIPC            |                 | BRL28500        |                 | PIPC            |                 |
|-----------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           |                                | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>8</sup> |
| ATCC8482  | <i>B. vulgatus</i>             | 50              | 100             | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 3.13            | 12.5            |
| NCTC10941 | <i>B. ureolyticus</i>          | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| ATCC29799 | <i>B. capillosus</i>           | 50              | 100             | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 3.13            | ≤0.10           | ≤0.10           |
| GM7007    | <i>B. distasonis</i>           | ≤12.5           | 100             | 12.5            | 25              | 0.39            | 0.78            | 6.25            | 25              |
| ATCC8503  | <i>B. distasonis</i>           | 200             | 400             | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.39            | 1.56            |
| WAL2926   | <i>B. thetaiotaomicron</i>     | 25              | 100             | 25              | 25              | 0.78            | 1.56            | 25              | 25              |
| WAL3304   | <i>B. thetaiotaomicron</i>     | 25              | 25              | 25              | 50              | 0.78            | 0.78            | 25              | 50              |
| ATCC2974  | <i>B. thetaiotaomicron</i>     | 25              | 100             | 25              | 25              | 0.78            | 0.78            | 25              | 50              |
| GAI 0413  | <i>B. melaninogenicus</i>      | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| GAI 0410  | <i>B. melaninogenicus</i>      | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.39            | 0.39            |
| GAI 0411  | <i>B. melaninogenicus</i>      | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.20            |
| GAI 0416  | <i>B. intermedius</i>          | 200             | 200             | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.20            |
| ATCC25611 | <i>B. intermedius</i>          | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| JKI8      | <i>B. intermedius</i>          | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.39            | 0.39            |
| ATCC27754 | <i>B. eggerthii</i>            | ≤12.5           | 25              | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.78            |
| GAI0414   | <i>B. asaccharolyticus</i>     | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.39            | 0.78            |
| " 0415    | <i>B. asaccharolyticus</i>     | ≤12.5           | 400             | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| " 0412    | <i>B. asaccharolyticus</i>     | ≤12.5           | ≤12.5           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | 0.39            | 0.78            |
| ATCC25260 | <i>B. asaccharolyticus</i>     | >400            | >400            | ≤0.10           | 0.39            | ≤0.10           | 0.39            | ≤0.10           | 1.56            |
| " 8492    | <i>B. uniformis</i>            | ≤12.5           | 25              | 3.13            | 50              | ≤0.10           | 0.20            | 1.56            | 25              |
| " 8483    | <i>B. ovatus</i>               | 25              | 50              | 50              | 50              | 0.78            | 0.39            | 12.5            | 12.5            |
| # 6       | <i>Capnocytophaga ochracea</i> | 25              | 50              | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| # 27      | <i>C. gingivalis</i>           | 25              | 25              | 0.39            | 0.39            | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |
| 5531      | <i>C. ochracea</i>             | 50              | 100             | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           | ≤0.10           |

TIPC および CVA のそれぞれ 12 mg/mouse, 12 mg/mouse および 0.75 mg/mouse を皮下投与した。最終投薬後 3 日目にマウスを屠殺し、皮下の菌接種部を注意深く剝離し腫瘍の存在を、またその後切開を加え腫瘍中の膿汁の有無を調査した。また、25 μl の plastic loop を用いて膿汁のおおよその量を推定した。

なお、*B. fragilis* GAI-0558 に対する BRL 28500, TIPC および CVA の MIC は各々 1.56 μg/ml, 25 μg/ml および 100 μg/ml であった。

## II. 成績

1. 嫌気性菌の参考菌株に対する CVA, TIPC, BRL 28500 および PIPC の抗菌力

10<sup>8</sup> cfu/ml の成績でみると、CVA は嫌気性菌の多くの菌種の発育を阻止するのに 25~400 μg/ml 以上の濃度を必要とした。CVA の 12.5 μg/ml で発育阻止可能であった菌種は、*P. magnus*, *P. asaccharolyticus*, *S. parvulus*, *C. tetani*, *C. novyi A*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. gonidiaformans*, *F. naviforme*, *B. ureolyticus*, *B. melaninogenicus*, *B. intermedius* および *B. asaccharolyticus* であった。

TIPC は、嫌気性菌全般に強い抗菌力を示し、そのほとんどの菌種の発育を 6.25 μg/ml で阻止した。しかし、

*E. limosum*, *E. plauti*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tetani*, *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* に対しては、12.5~50 μg/ml が必要であった。

BRL 28500 は、*E. limosum*, *E. plauti*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. difficile* を除く全菌株の発育を 6.25 μg/ml で抑制した。特に、TIPC が 25~50 μg/ml の MIC を示した *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. ovatus* に対し、0.39~1.56 μg/ml という低い MIC を示した。また、その他の菌種についても BRL 28500 は TIPC 単剤に比し、強い抗菌力を示す傾向にあった (Table 1)。

2. CVA 添加量による TIPC の MIC の変化について

2.5, 5 および 10 μg/ml の CVA を加えた時の TIPC の抗菌力を、CVA の必要量を算出する目的で検討した。

TIPC に比較的高い MIC を示した菌株についてのみの成績を Table 2 に示した。

CVA の増量による抗菌力の変化は認められなかった。

3. 臨床分離の *B. fragilis* に対する MIC

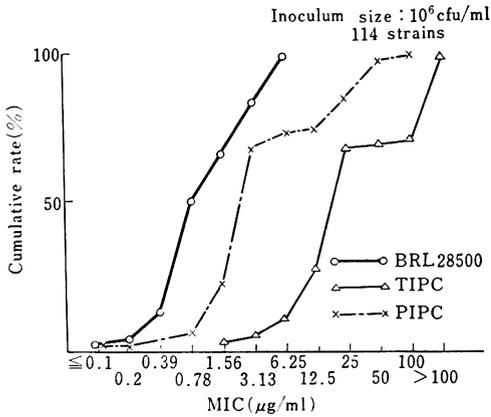
臨床分離の *B. fragilis* 114 株を用い、BRL 28500 の抗

Table 2 Comparative antibacterial activity of clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin plus clavulanic acid, BRL28500 and piperacillin against anaerobic bacteria

| Stock No. | Strain                      | CVA             |                 | TIPC            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 | BRL28500        |                 | PIPC            |                 |
|-----------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           |                             | CVA 0 µg/ml     |                 | CVA 2.5 µg/ml   |                 |                 | CVA 5 µg/ml     |                 |                 | CVA 10 µg/ml    |                 |                 | 10 <sup>6</sup> |                 | 10 <sup>8</sup> |                 | 10 <sup>8</sup> |                 |                 |
|           |                             | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>8</sup> |
| ATCC8486  | <i>Eubacterium limosum</i>  | 50              | 50              | 25              | 25              | 25              | 25              | 25              | 12.5            | 12.5            | 25              | 25              | 12.5            | 12.5            | 25              | 25              | ≤0.10           | ≤0.10           |                 |
| VPI0310   | <i>E. plauti</i>            | ≤12.5           | 50              | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 0.39            | 0.78            |                 |
| " 0311    | <i>E. plauti</i>            | 25              | 100             | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 6.25            | 25              | 6.25            | 0.39            | 100             |                 |
| ATCC14501 | <i>C. innocuum</i>          | 400             | 400             | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 1.56            | 1.56            |                 |
| " 3624    | <i>C. perfringens</i>       | 25              | 50              | 0.20            | 25              | 0.20            | 25              | 0.20            | 25              | 0.20            | 25              | 0.20            | 25              | 0.20            | 25              | 0.20            | ≤0.10           | 25              |                 |
| " 9689    | <i>C. difficile</i>         | >400            | >400            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 12.5            | 3.13            | 6.25            |                 |
| " 19405   | <i>C. tertium</i>           | 25              | 100             | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 12.5            | 6.25            | 3.13            | 6.25            |                 |
| " 25285   | <i>Bacteroides fragilis</i> | 25              | 25              | 12.5            | 50              | 1.56            | 1.56            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 50              |                 |
| GM7000    | <i>B. fragilis</i>          | ≤12.5           | 100             | 12.5            | 25              | 0.20            | 0.78            | 0.20            | 0.78            | 0.20            | 0.78            | 0.20            | 0.78            | 0.20            | 0.78            | 0.20            | 1.56            | 12.5            |                 |
| ATCC8482  | <i>B. vulgatus</i>          | 50              | 100             | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 1.56            | 0.78            | 3.13            | 12.5            |                 |
| GM7007    | <i>B. distasonis</i>        | ≤12.5           | 100             | 12.5            | 25              | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 0.78            | 0.39            | 6.25            | 25              |                 |
| ATCC8503  | <i>B. distasonis</i>        | 200             | 400             | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.39            | 1.56            |                 |
| WAL2926   | <i>B. thetaiotaomicron</i>  | 25              | 100             | 25              | 25              | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 3.13            | 0.78            | 25              | 25              |                 |
| " 3304    | <i>B. thetaiotaomicron</i>  | 25              | 25              | 25              | 50              | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 2               | 50              |                 |
| ATCC2974  | <i>B. thetaiotaomicron</i>  | 25              | 100             | 25              | 25              | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 25              | 50              |                 |
| " 8492    | <i>B. uniformis</i>         | ≤12.5           | 25              | 3.13            | 50              | 0.20            | 0.39            | ≤0.10           | 0.20            | 0.39            | ≤0.10           | 0.20            | 0.39            | ≤0.10           | 0.20            | 0.39            | 1.56            | 25              |                 |
| " 8483    | <i>B. ovatus</i>            | 25              | 50              | 50              | 50              | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.78            | 0.39            | 12.5            | 12.5            |                 |

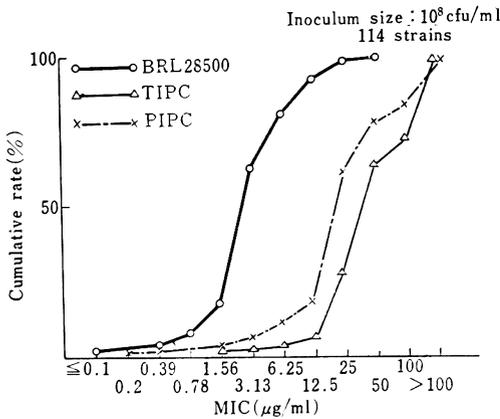
\*MIC of TIPC in the presence of CVA 0, 2.5, 5 and 10 µg/ml.

Fig. 1 Comparative MIC's of BRL 28500, TIPC and PIPC against clinically isolated strains of *B. fragilis*



|          | ≤0.1 | 0.2 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
|----------|------|-----|------|------|------|------|------|------|----|----|-----|------|
| BRL28500 | 1    | 2   | 7    | 48   | 27   | 13   | 16   |      |    |    |     |      |
| TIPC     |      |     |      |      | 3    | 4    | 5    | 20   | 47 | 1  | 1   | 33   |
| PIPC     | 1    | 1   |      | 5    | 19   | 52   | 5    | 5    | 9  | 16 | 1   |      |

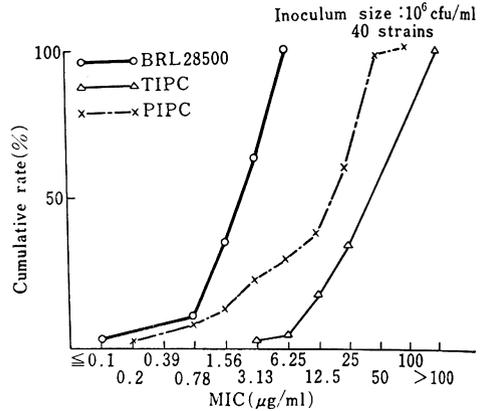
Fig. 2 Comparative MIC's of BRL 28500, TIPC and PIPC against clinically isolated strains of *B. fragilis*



|          | ≤0.1 | 0.2 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
|----------|------|-----|------|------|------|------|------|------|----|----|-----|------|
| BRL28500 | 1    |     | 2    | 5    | 11   | 52   | 20   | 14   | 8  | 1  |     |      |
| TIPC     |      |     |      |      | 1    | 1    | 1    | 4    | 24 | 41 | 7   | 35   |
| PIPC     |      | 1   | 1    |      | 1    | 4    | 7    | 6    | 49 | 19 | 7   | 19   |

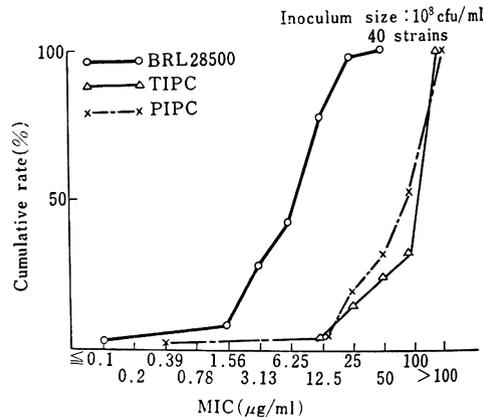
菌力を TIPC, PIPC のそれらと比較検討した成績を Fig. 1, 2 に示した。また, 114 株中  $\beta$ -lactamase high producer である 40 株だけについての成績を Fig. 3, 4 に示した。

Fig. 3 Comparative MIC's of BRL 28500, TIPC and PIPC against clinically isolated,  $\beta$ -lactamase producing strains of *B. fragilis*



|          | ≤0.1 | 0.2 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
|----------|------|-----|------|------|------|------|------|------|----|----|-----|------|
| BRL28500 | 1    |     |      |      | 3    | 10   | 11   | 15   |    |    |     |      |
| TIPC     |      |     |      |      |      | 1    | 1    | 5    | 7  |    |     | 26   |
| PIPC     |      | 1   |      | 2    | 2    | 4    | 3    | 3    | 9  | 15 | 1   |      |

Fig. 4 Comparative MIC's of BRL 28500, TIPC and PIPC against clinically isolated,  $\beta$ -lactamase producing strains of *B. fragilis*



|          | ≤0.1 | 0.2 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
|----------|------|-----|------|------|------|------|------|------|----|----|-----|------|
| BRL28500 | 1    |     |      |      | 2    | 8    | 6    | 14   | 8  | 1  |     |      |
| TIPC     |      |     |      |      |      |      |      | 2    | 4  | 5  | 2   | 27   |
| PIPC     |      | 1   |      |      |      |      |      | 1    | 6  | 7  | 6   | 19   |

$10^8$  cfu/ml 接種での成績をみると, BRL 28500 の *B. fragilis* 114 株に対する MIC は, 6.25~0.1  $\mu$ g/ml 以下に分布し, そのピーク値は 0.78  $\mu$ g/ml にあった。一方, TIPC の MIC は 1.56  $\mu$ g/ml から 100  $\mu$ g/ml 以上に分

Table 3 Protective effect of BRL28500 against experimental mice abscess due to *B. fragilis*

| Group                | Incidence of abscess formation(%) |       |
|----------------------|-----------------------------------|-------|
| BRL28500(12mg/mouse) | 5/10                              | (50)  |
| TIPC (12mg/mouse)    | 8/10                              | (80)  |
| CVA (0.75mg/mouse)   | 10/10                             | (100) |
| Control              | 10/10                             | (100) |

布し、そのピークは 25  $\mu\text{g/ml}$  と 100  $\mu\text{g/ml}$  以上にある 2 峰性分布を示した。TIPC の MIC は 0.1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  に分布し、そのピークは 3.13  $\mu\text{g/ml}$  にあったが、50  $\mu\text{g/ml}$  の所にも小さな峰が認められた。

$10^8$  cfu/ml 接種での成績をみると、3 薬剤とも、 $10^8$  cfu/ml 接種時での成績より全体に耐性側に 2 管程度ずれこむ傾向が認められた。

$\beta$ -lactamase 産生菌に対しては、BRL 28500 の MIC は TIPC, PIPC より顕著な差が認められた (Fig. 3, 4)。

4. BRL 28500 の実験的マウス皮下膿瘍形成に与える効果

*B. fragilis* GAI-0558 の  $6.4 \times 10^7$  cells を ACC と同時にマウス皮下に接種すると、100% に膿瘍が生じた。

一方、BRL 28500 投与群では 10 匹中 5 匹で膿瘍形成が認められなかった。また、TIPC 投与群では 10 匹中 8 匹に膿瘍形成が認められ、また CVA 投与群では 100% に膿瘍形成を認めた (Table 3)。

### III. 考 按

Clavulanic acid (CVA) は RICHMOND Ic, II, III, IV および V 型に属する  $\beta$ -lactamase と不可逆的に結合し、それを永久的に阻害する。CVA は、既に amoxicillin (AMPC) と配合された経口剤 BRL 25000 として開発され、既に市販されている。また、この BRL 25000 の嫌気性菌に対する抗菌作用については、既に報告した<sup>4)</sup>。

今回、CVA は TIPC と配合され、注射用抗生物質 BRL 28500 として開発された。

私共はこの BRL 28500 の嫌気性菌に対する抗菌作用について検討した。TIPC は、*B. fragilis* を除く嫌気性菌に広い抗菌力を示すことが知られているが、RICHMOND Ic 型の  $\beta$ -lactamase を産生する *B. fragilis* に対しては抗菌力が及ばないことも知られている。

さて、私共はまず嫌気性菌の参考菌株に対する TIPC の抗菌力を検討した。

TIPC は *E. limosum*, *E. plautii*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tertium* などの *Eubacterium* および *Clostridium* のある菌種と *B. fragilis*, *B. theta-*

*iotaomicron*, *B. distasonis*, *B. uniformis*, *B. ovatus* などのいわゆる *B. fragilis* group に属する菌種に対し 12.5~50  $\mu\text{g/ml}$  という比較的高い MIC を示したが、その他の菌種に対しては全て 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以下の低い MIC を示すことが確認された。

TIPC に対する MIC が 12.5~50  $\mu\text{g/ml}$  と比較的高かった菌種のうち、*E. limosum*, *E. plautii*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tertium*, では CVA との配合による抗菌力の改善は認められなかったが、*B. fragilis* group に対しては、4 管から 8 管程度の抗菌力の増強が認められた。*E. limosum*, *E. plautii*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tertium* は  $\beta$ -lactamase を産生せず、 $\beta$ -lactamase 以外の mechanism で TIPC に耐性を示すものと推測される。

また、TIPC 耐性菌に対する CVA の必要量を検討する目的で、2.5, 5 および 10  $\mu\text{g/ml}$  の一定量の CVA を添加して TIPC の MIC を検討した結果、嫌気性菌に対しては 2.5  $\mu\text{g/ml}$  で十分であることが認められた。

特に、臨床材料からしばしば分離される *B. fragilis* 114 株に対して、TIPC と CVA の配合は TIPC 単独よりも著明な抗菌力の増強を示した。 $\beta$ -lactamase detection paper (Oxoid) と Cefinase<sup>®</sup> disk (BBL) の両方で陽性となる  $\beta$ -lactamase high producer のうち、 $10^6$  cfu/ml 接種で TIPC 単独で 100  $\mu\text{g/ml}$  以上の MIC を示す株は CVA の添加で全て 6.25  $\mu\text{g/ml}$  の MIC となった。

また、JOINER らが作成したマウスにおける皮下膿瘍モデルを用いて、TIPC, CVA 単独と TIPC : CVA の配合の *in vivo* での抗菌力を比較した<sup>2)</sup>。

*B. fragilis* GAI-0558 と Autoclaved caecal contents の混合接種で、3~4 日目には 100% 膿瘍を形成したが、TIPC と CVA の配合薬剤投与により 10 匹中 5 匹で膿瘍形成を阻止し、また残りの 5 匹でも腫瘤中の膿汁の量は control 群に比し、明らかに少なく、TIPC 単独の場合よりもすぐれた効果がみとめられたことから、TIPC と CVA 配合の BRL 28500 は、TIPC 単独でその効果が期待できなかった  $\beta$ -lactamase 産生 *B. fragilis* の感染症に十分期待できると思われる。

## 文 献

- 1) 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 (1) : 76~79, 1981
- 2) JOINER, K. A.; A. B. ONDERDONK, J. A. GELAND, J. G. BARTLETT & S. L. GORBACH : A quantitative model for subcutaneous abscess formation in mice. Br. J. Exp. Pathol, 61 : 97~107, 1980
- 3) TAZIMA, K.; K. SAWA, K. WATANABE & K. UENO : The  $\beta$ -lactamases of genus *Bacteroides*. J. Antibiot. 36(4) : 423~428, 1983
- 5) 上野一恵, 渡辺邦友, 磯野美登利, 小林とよ子, 丸井利軌 : 嫌気性菌に対する  $\beta$ -lactam 系抗生物質の抗菌作用に及ぼす Clavulanic acid の *in vitro* 併用作用効果。Chemotherapy, 30 (S-2) : 30~38, 1982

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BRL 28500  
(CLAVULANIC ACID-TICARCILLIN)  
AGAINST ANAEROBES

KUNITOMO WATANABE, KAKUYO SAWA, KAZUKIYO YAMAOKA, HARUKI SAWAMURA,  
MAKOTO AOKI, TOYOKO KOBAYASHI and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

*In vitro* and *in vivo* studies of the antibacterial activity of BRL 28500, a formulation of ticarcillin with the  $\beta$ -lactamase inhibitor, clavulanic acid, against anaerobic bacteria have been conducted.

BRL 28500 at 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibited the growth of most of the anaerobic reference strains in our laboratory. Extremely potent anti-bacterial activity was seen against 114 clinically isolated of *B. fragilis*. When 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of clavulanic acid was combined with ticarcillin and BRL 28500 showed particularly strong activity against 40 strains  $\beta$ -lactamase producing strains.

In an *in vivo* study BRL 28500 showed strong activity against experimental subcutaneous abscesses in mice caused by  $\beta$ -lactamase producing *B. fragilis*.