

BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について

西野 武志・笠井 隆夫・大槻 雅子
森下 睦子・藤本 千代子・谷野 輝雄
京都薬科大学微生物学教室

Clavulanic acid (CVA) と ticarcillin (TIPC) の合剤である BRL 28500 の抗菌作用について検討し、以下の結果を得た。

1) BRL 28500 のグラム陽性、陰性菌に対する抗菌スペクトルは、TIPC に類似していた。また、臨床分離株に対する BRL 28500 の抗菌力は、*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* において TIPC および piperacillin (PIPC) より優れており、*P. vulgaris* においては TIPC より優れていた。その他、*H. influenzae*, *P. rettgeri* に対しては、TIPC とほぼ同程度の抗菌力を示した。

2) CVA と TIPC の併用効果は、checkerboard dilution 法で TIPC 感受性菌および TIPC 耐性菌に対して幅広い濃度域にわたって認められた。

3) BRL 28500 の抗菌力は、一部の菌株において TIPC 同様、菌量を多くすると抗菌力が低下した。また、アルカリ側においても TIPC と同様、一部の菌種で抗菌力が低下したが、その程度は CVA より少なかった。その他、培地の種類、馬血清による抗菌力の影響は認められなかった。

4) TIPC 耐性菌の培養菌液中において、TIPC 単剤ではすみやかに分解されたが、BRL 28500 中の TIPC はきわめて安定していた。このような CVA の β -lactamase 活性阻害作用は抽出した β -lactamase を用いて測定した場合も同様に認められた。

5) マウスに BRL 28500 を投与した場合、TIPC と CVA の血清中における減衰パターンは非常に類似していた。

6) TIPC 耐性の *E. coli*, *K. pneumoniae* に BRL 28500 を MIC 近辺の濃度で作用させると、filament 状を呈し、所々に spheroplast 化した像が認められた。

7) TIPC 耐性の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* および *H. influenzae* による実験的マウス腹腔内感染症に対して BRL 28500 は治療効果を示した。

細菌の抗生物質に対する耐性の主な原因は、菌が産生する不活化酵素に起因する。

β -lactamase は β -lactam 系抗生物質を分解して抗菌作用を失活させる酵素で、その基質特異性から penicillinase, cephalosporinase などに分類されている。

Clavulanic acid (CVA) は、英国ビーチャム社で発見された抗生物質で、それ自身の抗菌力は弱い。しかし、penicillinase 活性を不可逆的に阻害することから、amoxicillin (AMPC), ticarcillin (TIPC) 等の β -lactam 剤の抗菌力を増強することができる¹⁾。

このような酵素学的知見から、既に AMPC と CVA の合剤 (BRL 25000) が経口剤として開発された²⁾。本報では、CVA と TIPC を 1:15 に配合した製剤 BRL 28500 の有効性について、それぞれの単剤との比較を *in vitro* および *in vivo* で行った。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

BRL 28500, CVA, TIPC および PIPC を使用した。BRL 28500, CVA および TIPC はビーチャム薬品(株)から、PIPC は富山化学(株)から供与されたいずれも力価が明らかでない純末を使用した。

2. 使用菌株

抗菌スペクトルの検討には、教室保存のグラム陽性、陰性菌計 30 株を使用した。感受性分布の測定には、臨床分離の *S. aureus* 49 株, *E. coli* 30 株, *K. pneumoniae* 23 株, *H. influenzae* 82 株, *P. vulgaris* 37 株, および *P. rettgeri* 16 株を使用した。

3. 薬剤感受性測定法

日本化学療法学会感受性測定法³⁾に従い、前培養に tryptose broth (TSB, 日水), 測定培地に heart infusion agar (HIA, 日水) を用い、寒天平板希釈法により、37°C,

18~20時間培養後、最小発育阻止濃度 MIC ($\mu\text{g/ml}$) を求めた。

抗菌力におよぼす諸因子の影響として、接種菌量は一夜培養菌液を約 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 および 10^4 cells/ml の5段階濃度に調製したものについて、HIA を用いて MIC を測定して検討した。培地 pH の影響は、HIA を滅菌後、1N-HCl および 1N-NaOH で pH 6.0, 7.0, 8.0, および 9.0 に調整した培地で MIC を測定した。培地の影響は HIA, trypto soya agar (TSA, 日水), nutrient agar (NA, 日水), Mueller Hinton agar (MHA, 日水) および感受性ディスク寒天培地 (SDA, 栄研) について、MIC を測定した。血清の影響は、非働化馬血清 (大阪大学微生物研究所) を HIA に 0, 10, 25 および 50% の割合で添加したものについて MIC を求めた。接種菌量はいずれも 10^8 cells/ml を用いた。

4. Checkerboard dilution method による併用効果の検討

TIPC と CVA について、チェス平板状に種々の濃度の組み合わせの HIA 平板を作製し菌液接種後、MIC の測定値より FIC index を常法により求めた。

5. 抗菌力の測定

(1) MBC の測定

Heart infusion broth (HIB, 日水) で薬剤の2倍系列希釈を作製し、各希釈液の 2 ml に一夜培養した菌液の 100 倍希釈液の 0.1 ml を加え (最終菌液は約 10^5 cells/ml となる)、 37°C 、18時間培養した。試験管に菌の発育が認められなかった最小濃度を MIC 値とし、発育の認められなかった試験管については、HIA を用いて生菌数を測定し、菌液添加時に比べ、99.9% の殺菌率を示した最小濃度を最小殺菌濃度 (MBC) とした。

(2) 増殖曲線におよぼす影響

TSB で一夜振盪培養した菌液を HIB で希釈し、 37°C で更に2時間振盪培養した。この菌液の光学的濁度 (O. D. 600 nm) を測定し、あらかじめ作製しておいた O. D. と生菌数の検量線から生菌数を約 3×10^7 cells/ml (O. D. 600 = 0.2) に調整した。この菌液に薬剤を加え、振盪培養を行い HIA を用いて経時的に生菌数を測定した。また、生菌数測定に供した菌液にエタノールを等量加え、遠心した上清について、別記の測定法により培養菌液中の残存活性を測定した。

6. 微分干渉装置付顕微鏡による形態観察

スライドガラス上に所要濃度の薬剤を含んだ HIA を約 1.5 mm の厚さに固化した。そして、このスライドガラスに対数増殖期の菌液を塗抹したカバーガラスをのせ、パラフィンで封入した。このようにして作製した標

本を 37°C の恒温装置付の微分干渉装置付顕微鏡 (Nikon NT) で観察した。

7. CVA の β -lactamase 活性阻害の測定

(1) β -lactamase の調製

TSB で一夜振盪培養した β -lactamase 産生菌液 20 ml を 180 ml の TSB に加え、4時間振盪培養した。培養菌液を冷却下で遠心、集菌後 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄し、同じ緩衝液 20 ml に懸濁した。この菌液を超音波で破碎し、 $12,000 \times \text{g}$ で30分間遠心して、その上清を粗酵素液とした。なお、*H. influenzae* の培養には 5% となるように羊消化血液 (Fildes extract, Difco) を加えた。

(2) I_{50} の測定

CVA の 50% β -lactamase 活性阻害濃度の測定は、ミクロヨードメトリー法で行った。基質として TIPC の 0.2 mM を用い、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製した。TIPC に種々の濃度の CVA を同時に加え、更に β -lactamase 粗酵素液を加え、 30°C で30分間反応させた後、タングステン酸溶液で反応を停止し、ヨードデンプン液を加えた。対照として、 β -lactamase 粗酵素液を加えないで、上記方法と同様に行ったものをおいた。各反応液の O. D. 595 nm を測定し、CVA の各濃度における O. D. の減少率 (CVA 非添加時の O. D. に対する) を対数確率紙にプロットし、その反応直線より 50% 阻害濃度 I_{50} ($\mu\text{g/ml}$) を求めた。

8. 実験的マウス腹腔内感染症に対する防禦効果

マウスは、ddy-s 系、雄、4週齢、18g~19g のものを使用した。

Nutrient broth (NB, 日水) で一夜振盪培養した菌液を NB 10 ml に一白金耳接種し、更に 37°C 、18時間振盪培養したものを接種用菌液とした。この菌液を毒力に応じて NB で所要濃度に希釈し、pH 7.0 に調製した 6% Gastric mucin 水溶液 (和光純薬) と等量混合し、マウス腹腔内に 0.5 ml 宛接種した。なお、*S. aureus*, *H. influenzae* の場合は、菌液 1 ml に対し 10% ムチン水溶液 9 ml の割合に混合したものを接種菌液とした。菌液接種2時間後、生理食塩水で調製した薬剤を1群10匹のマウス皮下に 0.2 ml 宛一回投与した。観察は7日間行い、生存マウス数から、LITCHFIELD-WILCOXON 法で ED_{50} を求めた。

9. マウス血清中薬剤濃度の測定

ddy-s 系、雄、4週齢、18g~19g のマウス (1群3匹) に、BRL 28500 の 2 mg/mouse を皮下に1回投与し、経時的にマウスを屠殺し、血液を採取した。対照として、BRL 28500 の構成成分である TIPC 1.875 mg/mouse および CVA 0.125 mg/mouse を投与したものに

についても実施した。血清中の TIPC および CVA の濃度測定は下記の方法に準じて行った。

10. TIPC と CVA の濃度測定

TIPC の定量は、*P. aeruginosa* NCTC 10701 を検定菌とし disc 法による Bioassay 法で行った。検定用培地には NA を用い、これに NB で培養した菌液を最終

濃度が約 10^6 cells/ml となるように加え、シャーレに 10 ml ずつ分注して使用した。サンプルの希釈および標準液の希釈には 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。本定量法による TIPC の測定限界は $3.13 \mu\text{g/ml}$ であり、CVA が TIPC の阻止円の径に影響をおよぼさないことが確認された。

Table 1 Antibacterial spectrum of BRL28500, TIPC, PIPC and CVA
Gram-positive bacteria (10⁶ cells/ml)

Organisms	BRL28500	TIPC	PIPC	CVA
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	0.78	0.78	12.5
" Smith	0.78	0.78	1.56	12.5
" Terajima	3.13	3.13	3.13	12.5
" Neuman	0.78	1.56	1.56	12.5
" E-46	0.78	0.78	0.78	12.5
" No.80(PC ^r)	3.13	6.25	12.5	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	6.25	6.25	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.39	0.39	0.05	6.25
" Cook	0.39	0.39	0.10	25
<i>Viridans group streptococcus</i>	100	100	25	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	1.56	0.78	0.025	12.5
" type II	1.56	0.78	0.05	12.5
" type III	1.56	0.78	0.025	12.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	100	100	25	>100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.10	0.20	0.05	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.10	0.10	0.20	12.5
<i>Bacillus anthracis</i>	0.10	0.20	0.78	6.25
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6.25	6.25	6.25	6.25

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 2 Antibacterial spectrum of BRL28500, TIPC, PIPC and CVA
Gram-positive bacteria (10⁸ cells/ml)

Organisms	BRL28500	TIPC	PIPC	CVA
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	0.78	0.78	12.5
" Smith	1.56	1.56	1.56	12.5
" Terajima	3.13	6.25	3.13	25
" Neumann	1.56	1.56	1.56	25
" E-46	1.56	1.56	0.78	12.5
" No.80(PC ^r)	3.13	50	>100	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	6.25	6.25	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.39	0.39	0.10	12.5
" Cook	0.78	0.39	0.20	25
<i>Viridans group streptococcus</i>	>100	>100	100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	1.56	0.78	0.05	25
" type II	1.56	0.78	0.05	25
" type III	1.56	0.78	0.05	12.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	>100	>100	100	>100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.10	0.39	0.05	50
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.39	0.39	1.56	25
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	0.39	1.56	6.25
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6.25	12.5	6.25	6.25

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 3 Antibacterial spectrum of BRL28500, TIPC, PIPC, and CVA
Gram-negative bacteria (10⁶ cells/ml)

Organisms	BRL28500	TIPC	PIPC	CVA
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25	6.25	3.13	25
" NIH	3.13	3.13	0.39	25
" K-12	1.56	1.56	0.78	50
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	11.5	12.5	3.13	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.78	0.78	0.39	12.5
" O-901	0.78	0.78	0.39	25
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	0.78	0.39	25
" B	0.39	0.78	0.78	25
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.78	0.78	0.78	50
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	1.56	1.56	1.56	12.5
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	3.13	1.56	25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	1.56	1.56	0.39	25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.78	0.78	0.39	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	1.56	1.56	0.78	50
" NCTC 9632	3.13	50	0.78	50
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC9394	3.13	3.13	3.13	25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.78	0.78	0.39	50
" NCTC10006	3.13	3.13	6.25	25
<i>Hafnia alvei</i> NCTC9540	3.13	6.25	3.13	50
<i>Serratia marcescens</i> IFO3736	1.56	1.56	0.78	100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.78	1.56	0.025	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	0.78	0.10	50
<i>Morganella morganii</i> Kono	6.25	3.13	3.13	100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH96	0.20	0.39	0.0125	50
<i>Proteus inconstans</i> NIH118	1.56	1.56	0.78	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No.12	25	25	6.25	>100
" Nc-5	0.39	0.39	0.39	100
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC25416	12.5	12.5	1.56	>100
<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC13637	6.25	50	25	25
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO12552	100	100	100	50

MIC(μ g/ml)

CVA の定量は、 β -lactamase 産生菌の *K. pneumoniae* NCTC 29665 株を検定菌として使用した。TSB で前培養した菌液を NA に 4% の割合で加え、更に benzylpenicillin (PCG) を最終濃度が 60 μ g/ml となるように加えシャーレに 10 ml ずつ分注し、検定平板とした。サンプルおよび標準液の希釈には TIPC の場合と同じ緩衝液を使用した。本方法による CVA の測定限界は、0.0313 μ g/ml で、TIPC の存在が CVA の阻止円の径に影響をおよぼさないことが確認された。

以上のようにして、BRL 28500 中の TIPC と CVA の濃度を分別定量した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトル

(1) グラム陽性菌群

Table 1 に接種菌量 10⁶ cells/ml の場合の各種菌株に対する MIC 値を示した。BRL 28500 は TIPC と同様

に *E. faecalis* および viridans group *Streptococcus* に対して抗菌作用を示さず、その他の菌種に対しては PIPC とほとんど同じ MIC 値を示した。PIPC は *Streptococcus* 群に対して BRL 28500 および TIPC より優れた抗菌作用を示した。CVA の抗菌力は、BRL 28500、TIPC および PIPC より劣っていた。Table 2 は接種菌量 10⁸ cells/ml の場合の MIC 値であるが、BRL 28500 は TIPC、PIPC 耐性の *S. aureus* No. 80 (PC^r) に対して優れた抗菌力を示した。その他は、10⁶ cells/ml の場合の MIC とほぼ同じ傾向であった。

(2) グラム陰性菌群

Table 3 に接種菌量 10⁶ cells/ml、Table 4 に 10⁸ cells/ml の場合の MIC 値を示した。そして TIPC 耐性の *K. pneumoniae* NCTC 9632、*X. maltophilia* ATCC 13637 株に対しては、MIC 値は低くなった。しかし、PIPC 感受性の菌株に対しては、PIPC より劣っていた。

Table 4 Antibacterial spectrum of BRL28500, TIPC, PIPC and CVA
Gram-negative bacteria (10⁸ cells/ml),

Organisms	BRL28500	TIPC	PIPC	CVA
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25	6.25	3.13	25
" NIH	12.5	12.5	0.78	25
" K-12	1.56	1.56	0.78	50
<i>Citrobacter freundii</i> NIH10018-68	100	100	100	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	1.56	1.56	0.39	25
" O-901	0.78	0.78	0.39	50
<i>Salmonella paratyphi</i> A	1.56	1.56	0.78	50
" B	0.78	0.78	0.78	25
<i>Salmonella enteritidis</i>	3.13	6.25	3.13	50
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	3.13	3.13	1.56	25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	3.13	3.13	0.78	50
<i>Shigella boydii</i> EW-28	1.56	1.56	0.78	25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	1.56	1.56	0.78	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	3.13	3.13	1.56	50
" NCTC 9632	6.25	100	12.5	100
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	100	25	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.56	1.56	1.56	50
" NCTC10006	>100	100	12.5	100
<i>Hafnia alvei</i> NCTC9540	25	25	25	50
<i>Serratia marcescens</i> IFO3736	12.5	12.5	1.56	100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	3.13	25	0.78	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.78	1.56	0.20	50
<i>Morganella morganii</i> Kono	25	25	50	100
<i>Proteus rettgeri</i> NIH96	25	25	0.78	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH118	3.13	3.13	1.56	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No.12	50	25	12.5	>100
" Nc-5	0.39	1.56	0.78	100
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC25416	12.5	12.5	3.13	>100
<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC13637	>100	>100	>100	25
<i>Achromobacter calcoaceticus</i> IFO12552	100	>100	>100	100

MIC(μ g/ml)

CVA の抗菌力は、BRL 28500、TIPC および PIPC に比べ明らかに劣っていた。10⁸ cells/ml での BRL 28500、TIPC および PIPC の抗菌力は、ともに *C. freundii* NIH 10018-18、*E. aerogenes* NCTC 1006、*P. vulgaris* OX-19、*M. morganii* KONO、*X. maltophilia* NCTC 13637 等で接種菌量の影響が認められ、MIC 値は高くなった。BRL 28500 は TIPC 耐性の *K. pneumoniae* NCTC 9632、*P. vulgaris* OX-19 株に対して優れた抗菌力を示した。その他 PIPC、CVA の抗菌力は、10⁸ cells/ml での MIC とほぼ同じ傾向であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

S. aureus、*E. coli* および *K. pneumoniae* については、メトロセフィンディスクとアシドメトリー法の両方で β -lactamase 産生が認められた株を用い、その他の菌株については、検討せず使用した。これら臨床分離株に対する 10⁶ cells/ml 接種における感受性分布と累積分布

を Fig. 1~6 に示した。

(1) *S. aureus* の場合 (Fig. 1)

BRL 28500 は 25 μ g/ml にピークを有する分布を示し、その抗菌力は TIPC、PIPC、CVA より優れていた。

(2) *E. coli* の場合 (Fig. 2)

BRL 28500 は 100 μ g/ml にピークを有する分布を示し、TIPC 耐性株に優れた抗菌力を示した。CVA が最も優れた抗菌力を示し、次いで BRL 28500、PIPC の順であった。

(3) *K. pneumoniae* の場合 (Fig. 3)

BRL 28500 は 6.25 μ g/ml にピークを有する分布を示し、その抗菌力は TIPC や PIPC より優れていた。

(4) *H. influenzae* の場合 (Fig. 4)

BRL 28500 の感受性ピークは 0.39 μ g/ml で、その抗菌力は TIPC と類似していた。*H. influenzae* に対しては、PIPC が最も優れた抗菌力を示し、CVA が最も劣

Fig. 1 Sensitivity distribution of β -lactamase producing clinical isolates

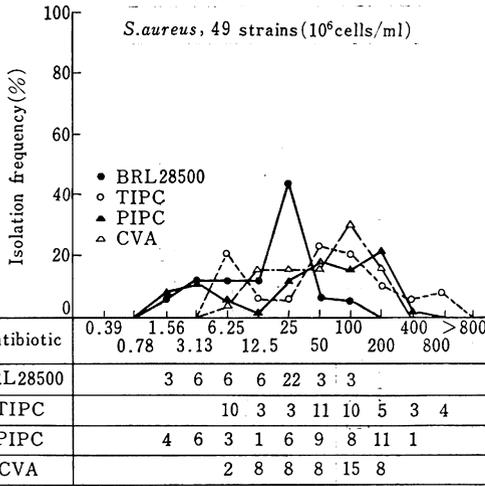
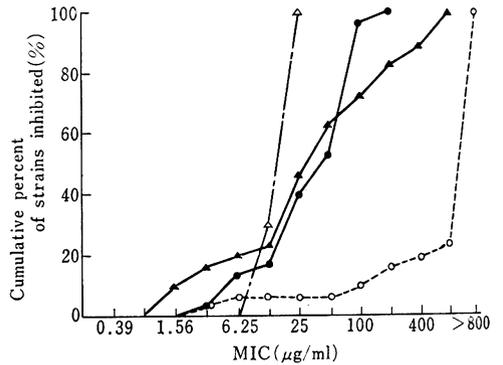
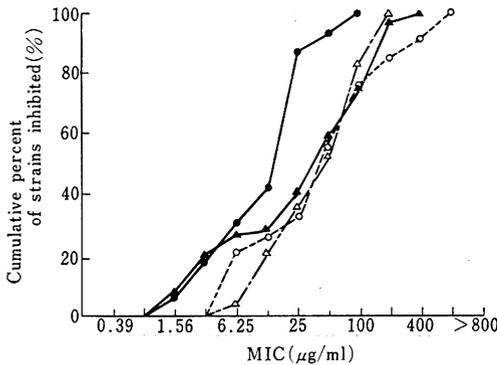
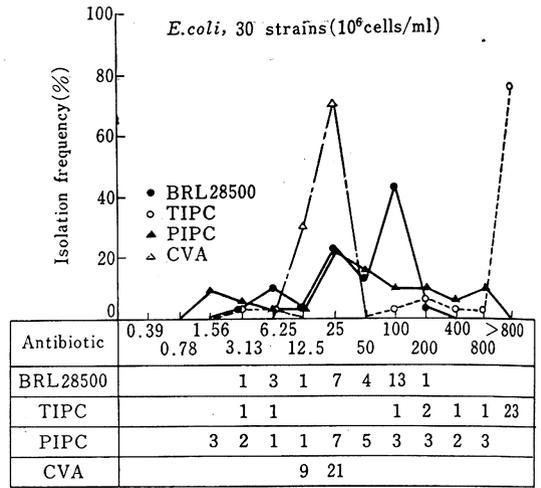


Fig. 2 Sensitivity distribution of β -lactamase producing clinical isolates



っていた。

(5) *P. vulgaris* の場合 (Fig. 5)

BRL 28500 は 1.56 μ g/ml にピークを有する分布を示し、その抗菌力は TIPC より優れており、特に TIPC 耐性株に対し優れた抗菌力を示した。しかし、PIPC よりやや劣っていた。

(6) *P. rettgeri* の場合 (Fig. 6)

BRL 28500 は TIPC と類似した抗菌力を示した。特に、TIPC、PIPC 耐性株に対して BRL 28500 は最も優れた抗菌力を示した。

3. Checkerboard dilution method による TIPC と CVA の併用効果

S. aureus, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* および *M. morgani* に対する TIPC と CVA との併用効果を checkerboard dilution method で測定した結果を Fig. 7~14 に示した。接種菌量 10^6 cells/ml および 10^8 cells/ml と併用効果が認められたが、図には 10^6 cells/ml

の場合について示した。これらの結果から、算出した FIC index を Table 5 に示した。FIC index は *E. coli* NIH JC-2 を除いたいずれの菌株とも 0.5 以下の値を示し、TIPC と CVA の間に併用効果が認められた。FIC index は、 10^8 cells/ml に比べ低く算出される傾向を示した。TIPC と CVA の併用効果が *S. aureus* 209 P JC でも認められたことが注目される。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

本試験の試験菌としては、*S. aureus* 209 P JC, *S. aureus* L-6, *E. coli* NIH JC-2, *E. coli* No. 33, *K. pneumoniae* No. 112, *K. pneumoniae* No. 200, *S. typhi* 0-901, *S. marcescens* IFO 3736, *P. vulgaris* OX-19 の 6 菌種 9 株を用いた。

(1) 接種菌量の影響

Fig. 15 に接種菌量と抗菌力の関係を示した。BRL 28500 では接種菌量が 10 倍変化することにより、MIC が 2 倍以上上昇した株は、*S. aureus* L-6 と *K. pneu-*

Fig. 3 Sensitivity distribution of β -lactamase producing clinical isolates

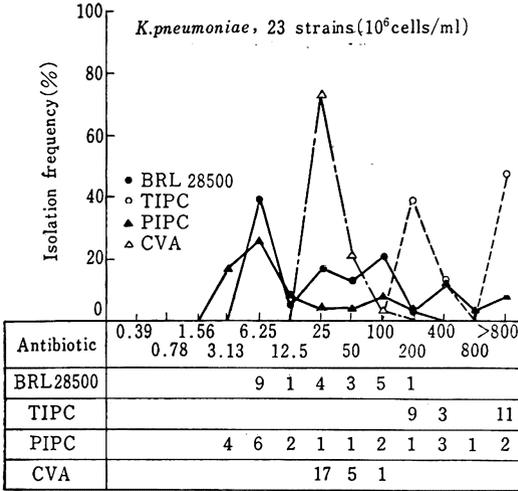
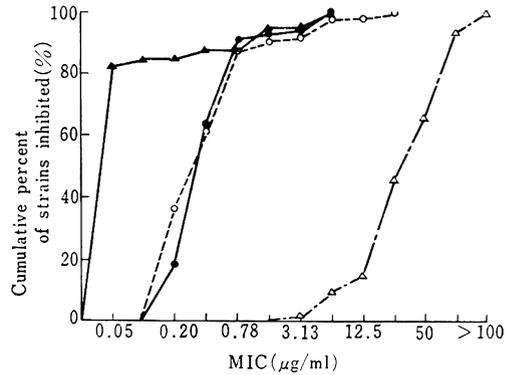
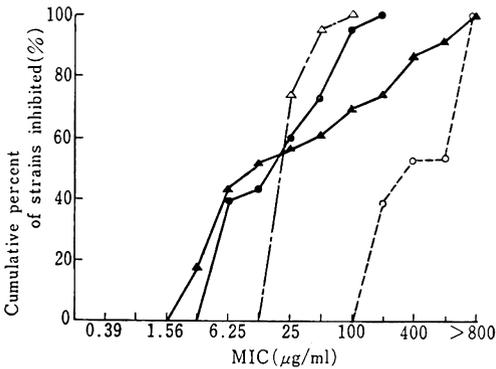
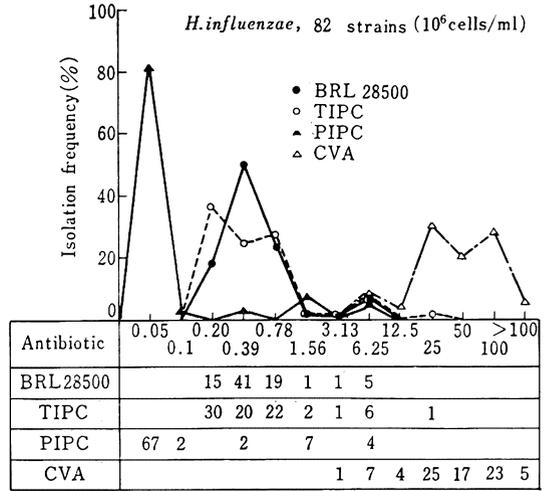


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates



moniae No.112 の2株であった。TIPC では *S. aureus* L-6, *K. pneumoniae* No.200, *P. vulgaris* OX-19 の3株であったが、*P. vulgaris* OX-19 では $10^7 \sim 10^8$ cells/ml の変化で、32倍も MIC が上昇した。CVA では *S. aureus* L-6, *S. typhi* 0-901 においてわずかに MIC が変動した。

(2) 培地 pH の影響

Fig. 16 に培地 pH と抗菌力の関係を示した。BRL 28500 は、*E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* No.200, *S. typhi* 0-901, *P. vulgaris* OX-19 の株において、アルカリ側で MIC が高くなる傾向を示した。この傾向は、TIPC でも同じであった。CVA はすべての被検菌でアルカリ側で MIC が高くなる傾向が見られた。

(3) 培地種類の影響

Fig. 17 に5種類の培地における抗菌力の変化を示した。BRL 28500, TIPC および CVA とともに全ての株で大きな MIC の変動は認められなかった。

(4) 血清の影響

Fig. 18 に馬血清を培地に 10, 25 および 50% 加えた時の MIC の変化を示した。BRL 28500, TIPC および CVA の全ての株で、ほとんど抗菌力の変化は認められなかった。

5. 抗菌作用

(1) MIC と MBC の差

7菌種 10 株の MIC と MBC の値を Table 6 に示した。MIC と MBC の値に4倍以上の差が認められた株は BRL 28500 の場合、*S. aureus* 209 P JC, *S. aureus* L-6 の2株であったが、TIPC では *S. aureus* L-6, *K. pneumoniae* No.112, *S. typhi* 0-901, *P. vulgaris* OX-19 の4株であった。特に *S. aureus* L-6 では TIPC で8倍以上の差が認められた。CVA では BRL 28500 と TIPC の中間の結果であった。

(2) 増殖曲線におよぼす影響

Fig. 9 Combination effect of TIPC and CVA on *E. coli* NIHJC-2

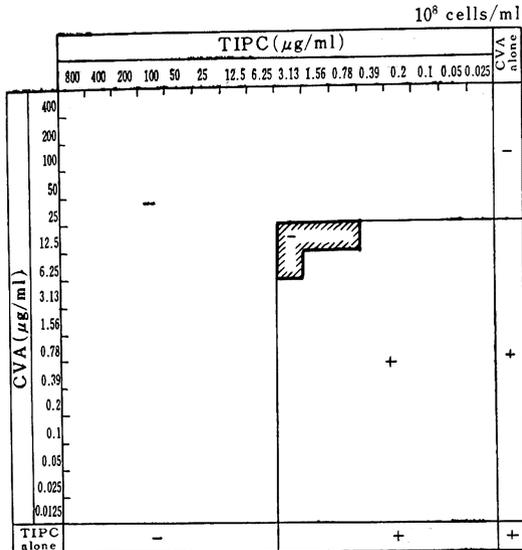


Fig. 10 Combination effect of TIPC and CVA on *E. coli* 33

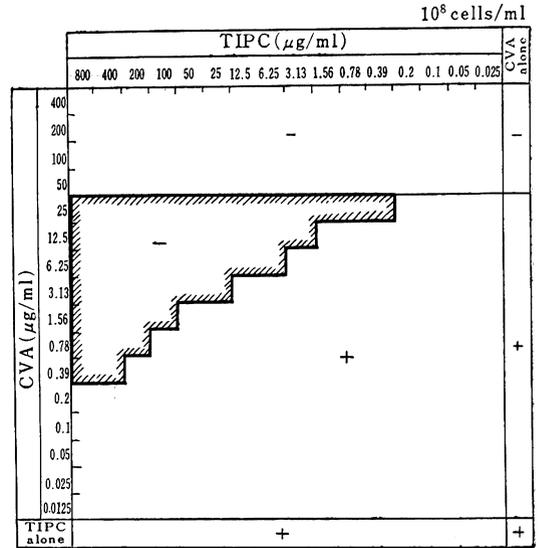


Fig. 11 Combination effect of TIPC and CVA on *K. pneumoniae* NCTC 9632

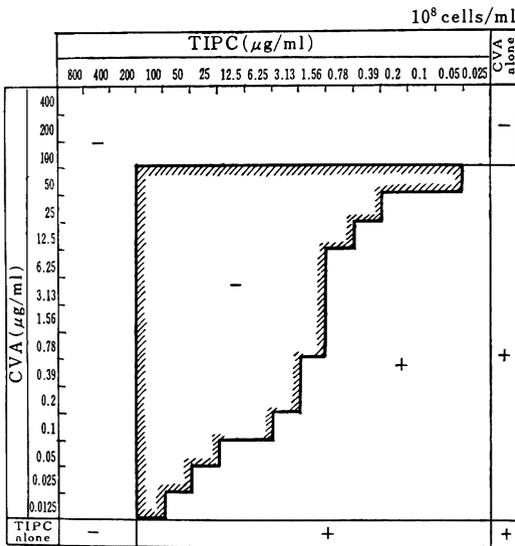


Fig. 12 Combination effect of TIPC and CVA on *K. pneumoniae* No. 200

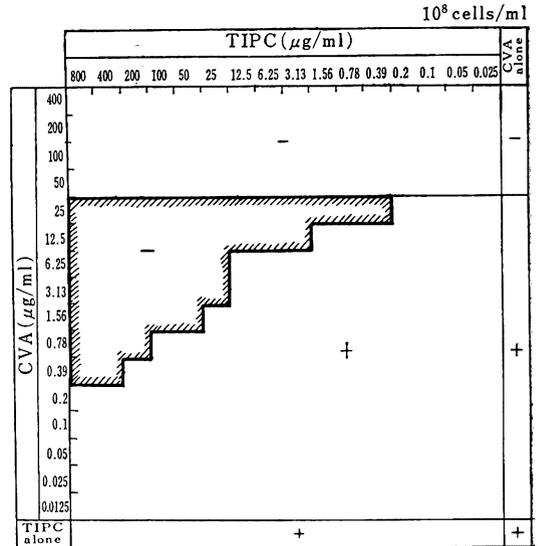


Table 5 Synergistic effects of TIPC and CVA against various bacterial strains

Inoculum size : 10⁸ cells/ml

Organism	MIC(µg/ml)			Min. FIC index (a/a ₀ + b/b ₀)
	TIPC alone (a ₀)	CVA alone (b ₀)	TIPC-CVA combination (a/b)	
<i>S. aureus</i> 209-P JC	1.56	12.5	0.39/3.13	0.50
<i>S. aureus</i> No.86	400	200	12.5/6.25	0.06
<i>E. coli</i> NIH JC-2	6.25	25	0.78/12.5	0.63
<i>E. coli</i> No.33	>800	50	25/3.13	<0.09
<i>K. pneumoniae</i> NCTC9632	200	100	1.56/0.78	0.02
<i>K. pneumoniae</i> No.200	>800	50	50/3.13	<0.13
<i>P. vulgaris</i> No.202	200	100	1.56/0.78	0.02
<i>M. morgannii</i> 120	100	100	25/25	0.50

Fig. 13 Combination effect of TIPC and CVA on *P. vulgaris* No. 202

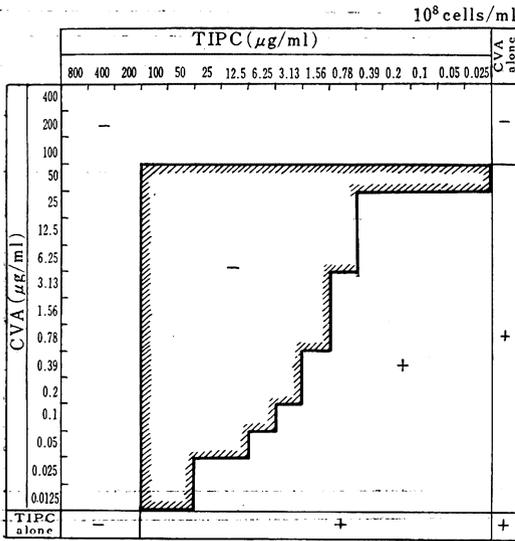


Fig. 14 Combination effect of TIPC and CVA on *M. morgani* No. 120

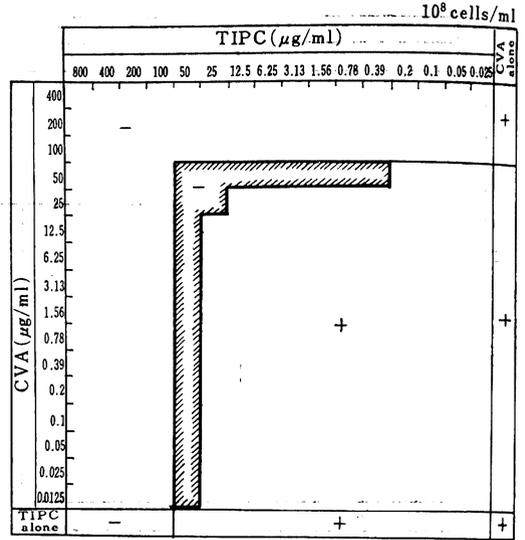
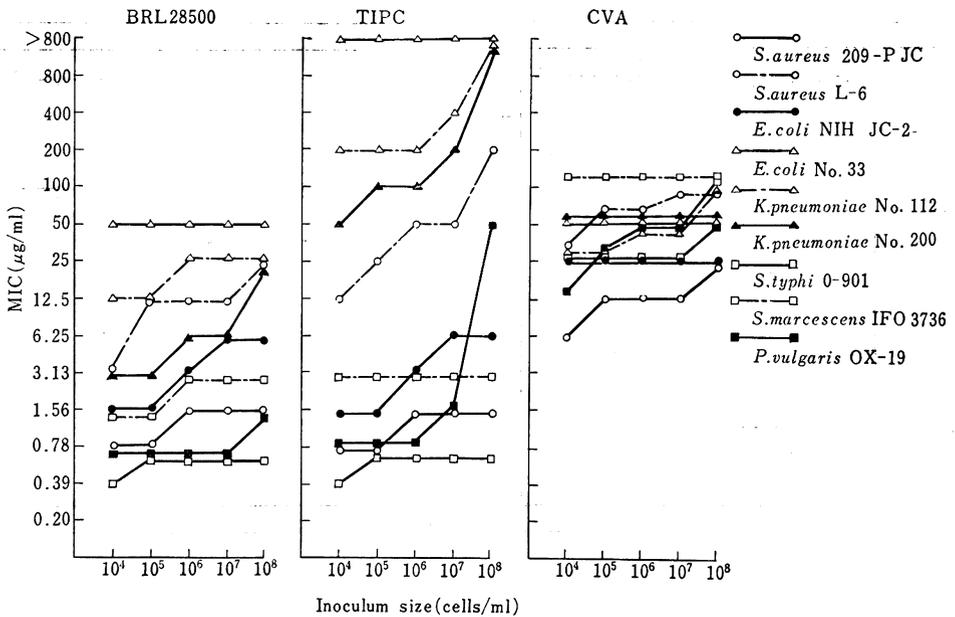


Fig. 15 Influence of inoculum size on the antibacterial activity of BRL 28500



a) *S. aureus* L-6 の場合

本菌株は寒天平板希釈法による MIC が、接種菌量 10^8 cells/ml において BRL 28500 で $25 \mu\text{g/ml}$, TIPC で $800 \mu\text{g/ml}$, PIPC で $800 \mu\text{g/ml}$, CVA で $100 \mu\text{g/ml}$ を示したものである。本菌株を用いて殺菌効果を調べた結果を Fig. 19 に示した。BRL 28500 では $6.25 \mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) を作用させると、2~4 時間で著明な殺菌作用を示した。これに比べ、TIPC では BRL 28500 と同等の殺菌

作用を示すのに、 $200 \mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) の濃度を必要とした。CVA では $6.25 \mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) を作用させた場合、静菌的に作用し、それ以上の濃度では殺菌的に作用した。

b) *E. coli* No. 33 の場合

本菌株は寒天平板希釈法による MIC 値が、接種菌量 10^8 cells/ml において、BRL 28500 で $50 \mu\text{g/ml}$, TIPC で $>800 \mu\text{g/ml}$, PIPC で $200 \mu\text{g/ml}$, CVA で $50 \mu\text{g/ml}$ を

Fig. 16 Influence of medium pH on the antibacterial activity of BRL 28500

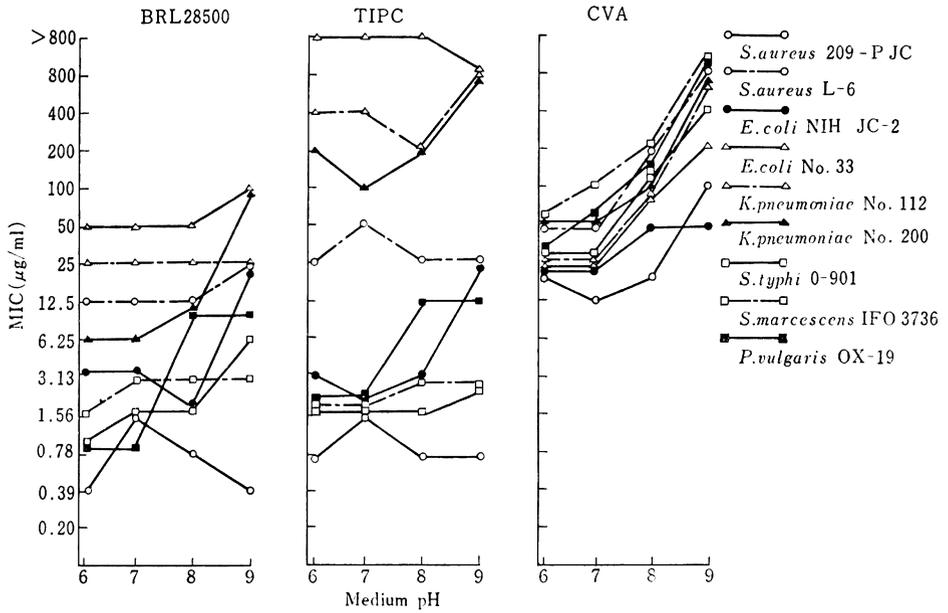


Fig. 17 Influence of various media on the antibacterial activity of BRL 28500

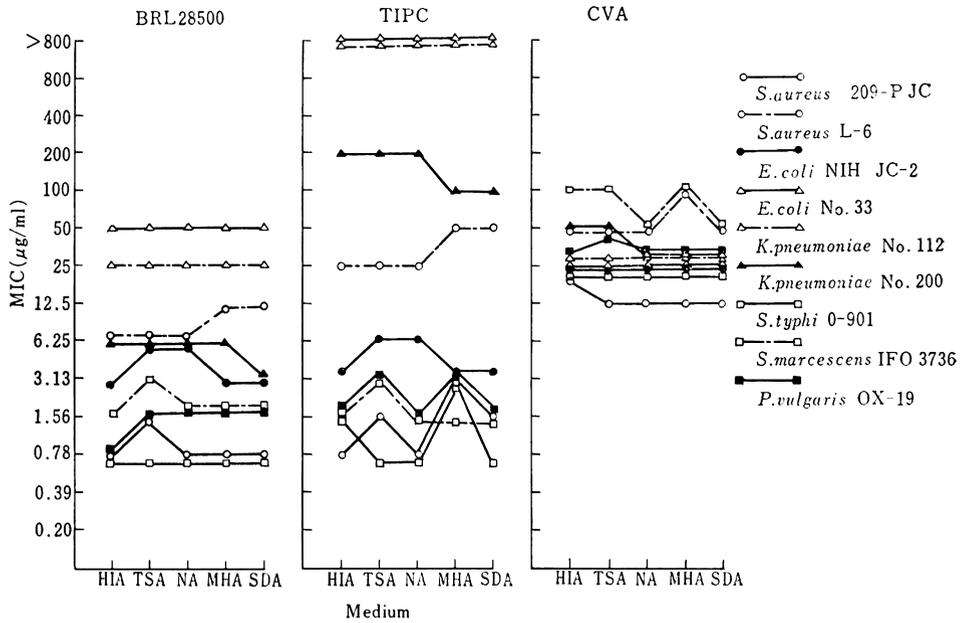


Fig. 18 Influence of horse serum on the antibacterial activity of BRL 28500

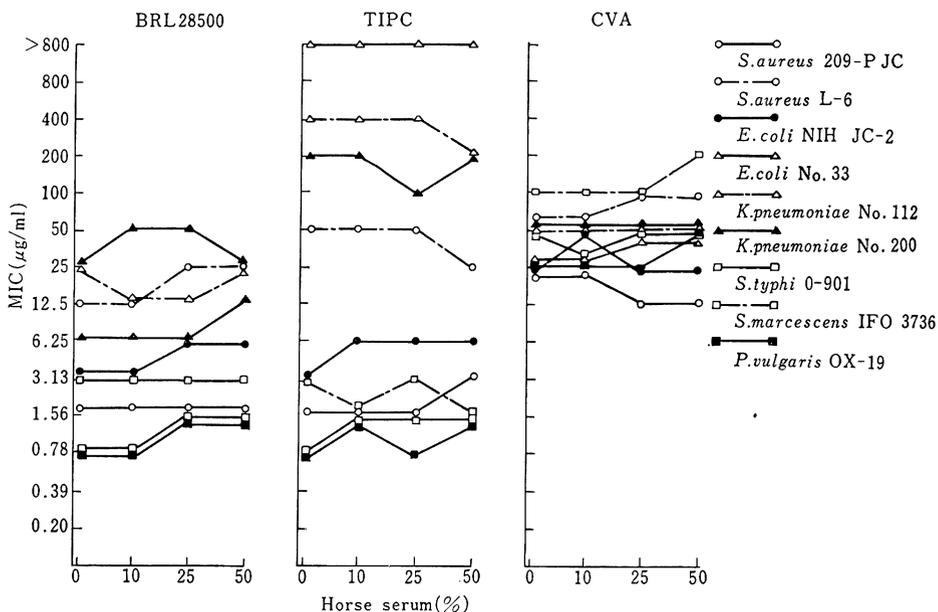


Table 6 Correlation between MICs and MBCs

Organism	BRL28500			TIPC			CVA		
	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0.78	3.13	4	0.78	1.56	2	12.5	25	2
<i>S. aureus</i> L-6	25	100	4	100	>800	>8	25	100	4
<i>S. epidermidis</i>	3.13	3.13	1	3.13	3.13	1	50	100	2
<i>E. coli</i> NIH JC-2	12.5	12.5	1	6.25	12.5	2	25	50	2
<i>E. coli</i> No.33	50	>800	2	>800	>800	—	25	25	1
<i>K. pneumoniae</i> No.112	12.5	25	2	400	>800	>2	50	400	8
<i>K. pneumoniae</i> No.200	25	25	1	>800	>800	—	50	200	4
<i>S. marcescens</i> IFO3736	25	50	2	25	50	2	100	200	2
<i>S. typhi</i> O-901	3.13	3.13	1	25	100	4	100	100	1
<i>P. vulgaris</i> OX-19	3.13	6.25	2	25	100	4	100	100	1

Inoculum size : 10^5 cells/ml Medium : HI broth (Nissui)

Ratio : MBC/MIC

示したものである。本菌株を用いて殺菌効果を調べた結果を Fig. 20 に示した。BRL 28500 の 50 μ g/ml (MIC) 以上の濃度を作用させると、4 時間までの間に著明な殺菌作用が認められた。TIPC では、800 μ g/ml を作用させても殺菌作用は全く認められず、対照と同様に発育した。CVA 50 μ g/ml (MIC) を作用させると 2 時間まで弱い殺菌作用を示したが、4 時間では再増殖した。100 μ g/ml では著明な殺菌作用を示した。BRL 28500 と CVA の殺菌作用は、濃度に依存して優れた効果を示した。

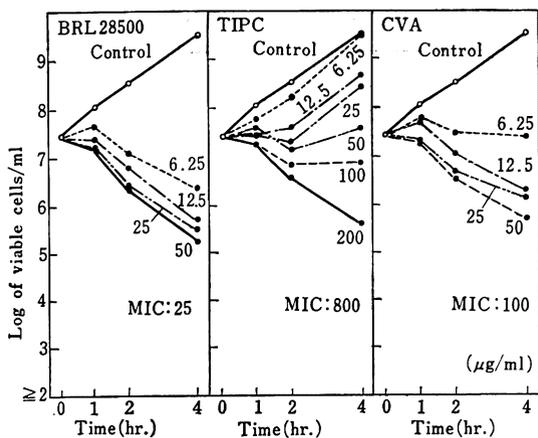
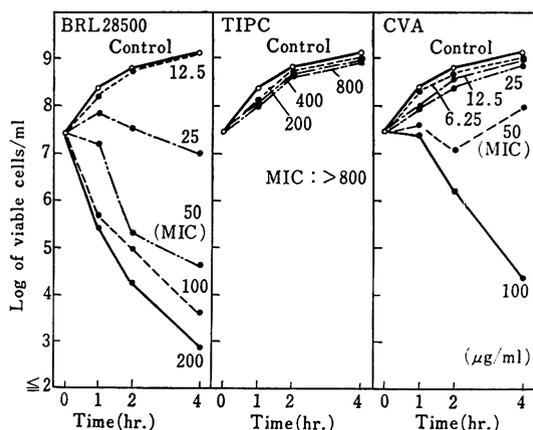
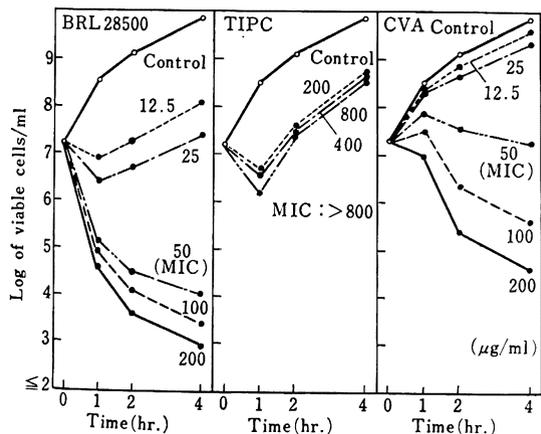
c) *K. pneumoniae* No. 200 の場合

本菌株は寒天平板希釈法による MIC 値が、接種菌量 10^8 cells/ml において BRL 28500 で 50 μ g/ml, TIPC で

>800 μ g/ml, PIPC で >800 μ g/ml, CVA で 50 μ g/ml を示したものである。本菌株を用いて殺菌効果を調べた結果を Fig. 21 に示した。BRL 28500 では 50 μ g/ml (MIC) を作用させると、1~4 時間にかけて著明な殺菌作用を示した。TIPC では、800 μ g/ml を作用させると、1 時間後に一時的な生菌数の減少が認められたが、2 時間後より再増殖し、殺菌作用は認められなかった。CVA では 50 μ g/ml (MIC) を作用させると、1 時間後にやや生菌数が上昇したが、2 時間後より静菌的に作用した。それ以上の濃度では殺菌的に作用した。

6. 形態変化

Fig. 22 に *E. coli* No. 33, Fig. 23 に *K. pneumoniae*

Fig. 19 Effect of BRL 28500, TIPC and CVA on viability of *S. aureus* L-6Fig. 20 Effect of BRL 28500, TIPC and CVA on viability of *E. coli* No. 33Fig. 21 Effect of BRL 28500, TIPC and CVA on viability of *K. pneumoniae* No. 200

No. 200 に BRL 28500, TIPC および CVA の種々の濃度を 3 時間作用させた時の形態学的変化のまとめを示した。

E. coli No. 33 に BRL 28500 を 50 $\mu\text{g/ml}$ 作用させると溶菌した菌と伸長化した菌の中に所々 spheroplast 化した菌が観察された (Fig. 24-b)。伸長化した菌は、25 $\mu\text{g/ml}$ 付近まで認められた。TIPC では 400 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度を作用させても何ら変化は認められなかった (Fig. 24-c)。CVA 50 $\mu\text{g/ml}$ を作用させると卵円形化し (Fig. 24-d)、その作用は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 付近まで認められた。

K. pneumoniae No. 200 の場合は、TIPC 25~400 $\mu\text{g/ml}$ 作用の広範囲にわたり伸長化に spheroplast を伴った形態を示す細胞が認められた (Fig. 24-g)。CVA 25~100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では、卵円形化した細胞が (Fig. 24-h)、6.25~125 $\mu\text{g/ml}$ では球形化した細胞が認められた (Fig. 24-i)。これに比べ、BRL 28500 の作用では、伸長化した細胞は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ までの広範囲にわたり認められ、12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では、溶菌像と spheroplast を伴った伸長化した細胞が認められた (Fig. 24-f)。*K. pneumoniae* No. 200 は *E. coli* No. 33 に比べ、薬剤作用で形態変化を起こす濃度域が広がった。

7. 培養菌液中での安定性

S. aureus L-5 の培養菌液 (約 10^7 cells/ml) に BRL 28500, TIPC および CVA 25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ別の試験管に加え、経時的に TIPC と CVA の残存活性を調べたのが、Fig. 25 である。残存活性は、添加時を 100% として示した。TIPC 添加では、1 時間以内に完全に不活化されたが、BRL 28500 では 6 時間作用しても TIPC は約 70% の活性が残っていた。Fig. 26 は *E. coli* No. 33 株を用い同様の方法で、BRL 28500, TIPC および CVA を 50 $\mu\text{g/ml}$ 加えて実施した場合である。TIPC は添加後 4 時間で完全に不活化されたが、BRL 28500 では 6 時間作用しても TIPC は 60% の活性が残っていた。Fig. 27 は *K. pneumoniae* No. 200 に薬剤を 50 $\mu\text{g/ml}$ 加えて実施した場合である。TIPC は 6 時間で完全に不活化されたが、BRL 28500 の TIPC はほとんど不活化されなかった。*S. aureus*, *E. coli* においては BRL 28500 中の CVA は TIPC の不活化に伴いやや不活化されたが、*K. pneumoniae* ではほとんど不活化されなかった。CVA は *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* 培養液中ではきわめて安定であった。

8. CVA の β -lactamase 不活化作用

Table 7 に各種菌株より抽出した β -lactamase に対する CVA の I_{50} 値を示した。CVA の *S. aureus* L-5 由来 β -lactamase に対する I_{50} 値は、0.023 $\mu\text{g/ml}$ で、他の菌種由来の β -lactamase に比べ最も低い濃度で阻害した。*E. coli* No. 33, *K. pneumoniae* No. 102, *P.*

Fig. 22 Morphological effects of BRL 28500, TIPC and CVA on *E. coli* No. 33 after 3 hours exposure

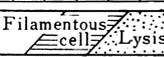
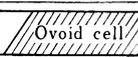
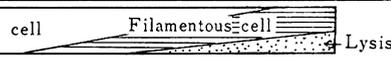
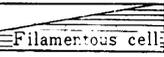
Antibiotic	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400
BRL28500	Normal cell 								
TIPC	Normal cell								
CVA	Normal cell 								

Fig. 23 Morphological effects of BRL 28500, TIPC and CVA on *K. pneumoniae* No. 200 after 3 hours exposure

Antibiotic	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400
BRL28500	Normal cell 								
TIPC	Normal cell 								
CVA	Normal cell 								

mirabilis No. 105, *P. aeruginosa* TP-5, *H. influenzae* D₂-2 由来の β -lactamase に対する CVA の I₅₀ 値は 0.098~0.29 $\mu\text{g/ml}$ で、阻害濃度は極めて低かった。

9. マウス血中濃度

Fig. 28 に BRL 28500 の 2 mg/mouse を皮下投与した場合の TIPC と CVA の血中濃度の推移を示した。両薬剤とも 15 分以降より漸次減少した。TIPC と CVA の減衰パターンは極めて類似していた。TIPC と CVA を BRL 28500 の配合比の単独投与した場合も、BRL 28500 投与の減衰パターンと極めて類似していた。

10. 実験的マウス腹腔内感染症に対する防禦効果

S. aureus, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* の 6 菌種 7 株に対する BRL 28500, TIPC および CVA の ED₅₀ 値と MIC の関係を Table 8, 9 に示した。使用した株は、表からも明らかのように、全て TIPC 耐性で、TIPC に対しても耐性を示したものである。*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* に対する BRL 28500 の ED₅₀ 値は 2.0~10.0 mg/mouse の値で治療効果が認められたが、TIPC, CVA の ED₅₀ 値は 16 mg/mouse 以上を示し、治療効果は認められなかった。BRL 28500 と TIPC の MIC 値と ED₅₀ 値はよく相関していた。*P. vulgaris* No. 120 では BRL 28500 と TIPC の両薬剤で治療効果が認められたが、ED₅₀ 値は BRL 28500 の

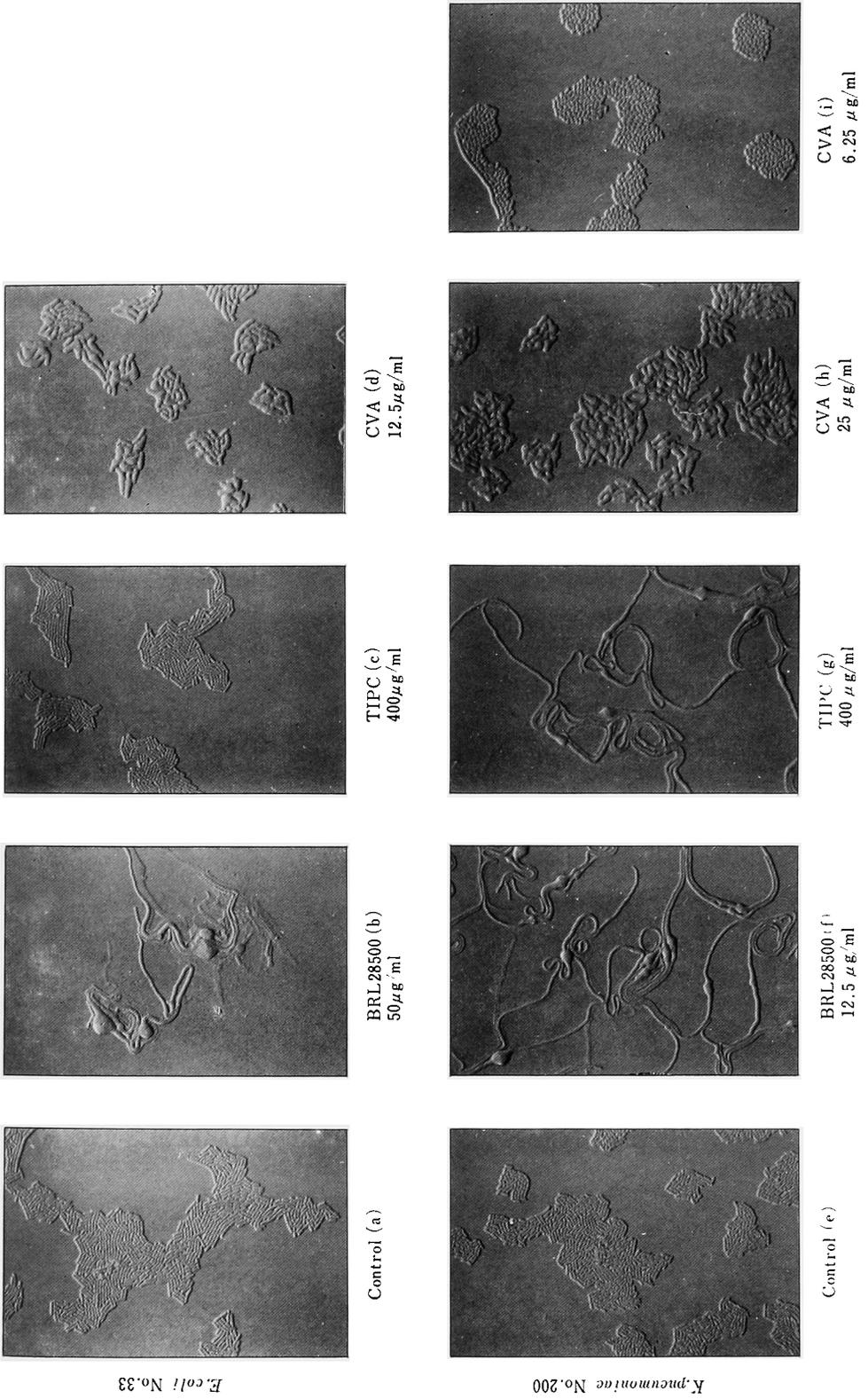
方が TIPC に比べ低く、接種菌量 10⁶ cells/ml の MIC とよく相関していた。CVA は *E. coli* No. 33 に対して BRL 28500 と同じ MIC 値を示したにもかかわらず CVA の治療効果は認められず、CVA の体内での抗菌力が弱いことが確認された。

III. 考 察

一般に R 因子によるグラム陰性桿菌, *S. aureus* および染色体由来する *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* の β -lactamase は penicillinase (PCase) とされている。また, *B. fragilis*, *P. cepacia*, *P. vulgaris* の産生する β -lactamase は penicillin と cefuroxime の両方をよく分解することから, oxyiminocephalosporinase (CXase) と呼ばれている。そして染色体によるグラム陰性桿菌の産生する β -lactamase は, cephalosporinase (CEPase) とされている。これら β -lactamase に対して, CVA は PCase と CXase の活性を強く不可逆的に阻害し, CEPase の活性阻害は弱いとされている⁹⁾。

今回、臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* に対して、BRL 28500 は TIPC に比べ優れた抗菌力を示した。また、*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* より抽出した β -lactamase に対して、CVA は TIPC を基質とした場合、その阻害活性濃度 (I₅₀) は極めて低かった。また、TIPC 耐性菌の培養液中で BRL 28500 は

Fig. 24 Interference phase-contrast micrographs of bacterial cells exposed to BRL 28500, TIPC or CVA for 3 hours



E. coli No. 33

K. pneumoniae No. 200

Fig. 25 Residual activity of BRL 28500, TIPC and CVA in the culture of *S. aureus* L-5

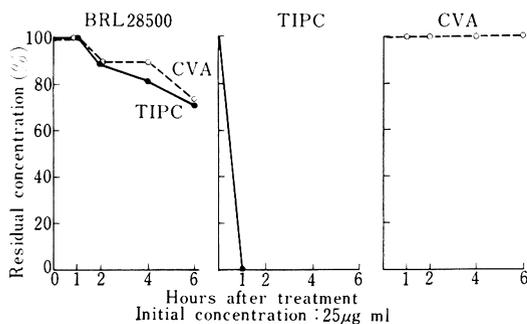


Fig. 26 Residual activity of BRL 28500, TIPC and CVA in the culture of *E. coli* No. 33

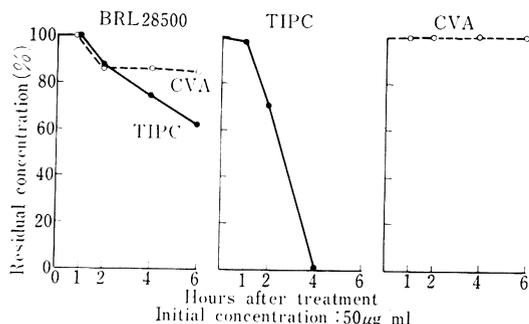
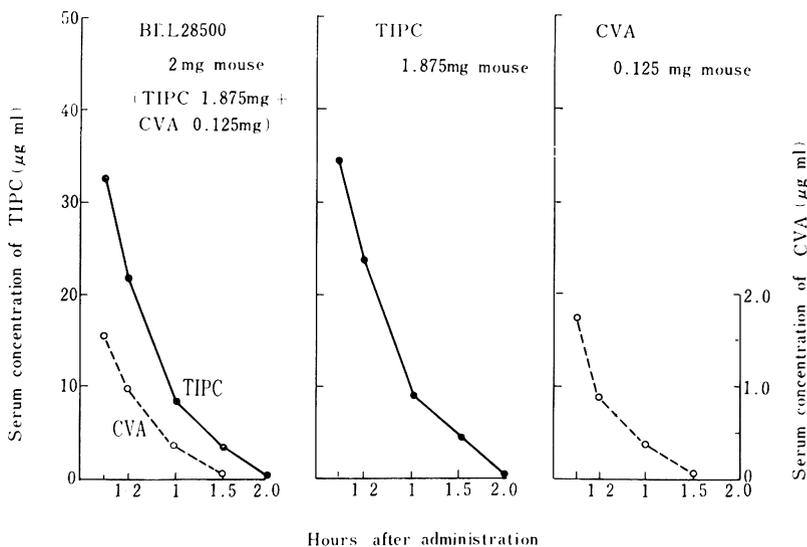


Fig. 28 Serum concentration of TIPC and CVA after subcutaneous administration in mice



TIPC 単剤に比べ TIPC の抗菌活性を長期間保持した。これらの結果より、CVA は β -lactamase による TIPC の加水分解を阻害することで TIPC の抗菌活性を維持するため、TIPC が抗菌力を発揮したものと解される。マウスを用いた感染防禦実験においても、*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *H. influenzae* 等

Fig. 27 Residual activity of BRL 28500, TIPC and CVA in the culture of *K. pneumoniae* No. 200

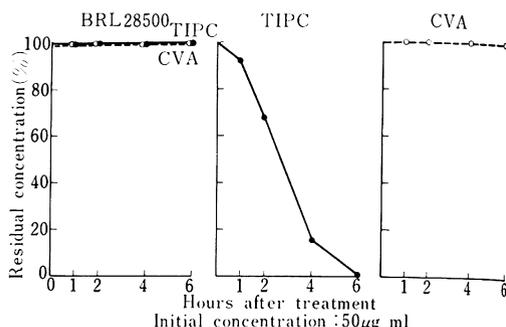


Table 7 Inhibitory effect of CVA on the β -lactamase hydrolysis of TIPC

β -lactamase source	β -lactamase type (Richmond)	I_{50} (μ g/ml)
<i>E. coli</i> No.33	III	0.22
<i>K. pneumoniae</i> No.102	IV	0.098
<i>P. mirabilis</i> No.105	II	0.29
<i>P. aeruginosa</i> TP-5	III	0.26
<i>H. influenzae</i> D2-2	III	0.16
<i>S. aureus</i> L-5	other PCase	0.023

TIPC and CVA were incubated simultaneously for 30 min. at 30°C

の TIPC 耐性菌に対して BRL 28500 は TIPC 単剤投与に比べて優れた治療効果を示した。これは、BRL 28500 が TIPC 単剤に比べ、殺菌力が優れていること、形態変化を低濃度で惹起すること、そして BRL 28500 を投与した場合、TIPC と CVA の血中での減衰が極めて類似していることから、CVA の作用が TIPC に長時間作

Table 8 Protective effect of BRL28500, TIPC and CVA against experimental mouse infection

Organism	Challenge dose (Cells/mouse)	Antibiotic	ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)	
				10 ⁸	10 ⁶
<i>S. aureus</i> L-5	3.9×10 ⁷ (39 LD ₅₀)	BRL28500	10.0(6.2-16.2)	25	12.5
		TIPC	>16	200	25
		CVA	>16	50	50
<i>E. coli</i> No.33	1.4×10 ⁵ (11 LD ₅₀)	BRL28500	8.0(5.0-12.8)	50	25
		TIPC	>16	>800	>800
		CVA	>16	50	25
<i>K. pneumoniae</i> No.102	1.8×10 ⁸ (9 LD ₅₀)	BRL28500	2.0(1.2-3.3)	12.5	6.25
		TIPC	>16	800	200
		CVA	>16	50	25
<i>K. pneumoniae</i> No.123	2.1×10 ⁸ (30 LD ₅₀)	BRL28500	7.0(4.7-10.5)	12.5	6.25
		TIPC	>16	800	200
		CVA	>16	50	25

Animals : 4 weeks-aged male (ddy) mice, 18g

Infection : Intraperitoneal injection with 3 or 9% of gastric mucin

Administration : Subcutaneously 2 hours after the infection

Table 9 Protective effect of BRL28500, TIPC and CVA against experimental mouse infection

Organism	Challenge dose (Cells/mouse)	Antibiotic	ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC(μg/ml)	
				10 ⁸	10 ⁶
<i>P. vulgaris</i> No.120	5.4×10 ⁸ (8 LD ₅₀)	BRL28500	8.0(4.7-12.0)	6.25	1.56
		TIPC	15.0(8.8-26.3)	400	6.25
		CVA	>16	100	50
<i>P. mirabilis</i> No.105	4.8×10 ⁶ (6 LD ₅₀)	BRL28500	2.5(1.8-3.4)	25	12.5
		TIPC	>16	>800	400
		CVA	>16	100	50
<i>H. influenzae</i> D2-2	1.3×10 ⁷ (45 LD ₅₀)	BRL28500	3.6(2.3-5.7)	1.56	0.78
		TIPC	>8	100	1.56
		CVA	>8	100	25

Animals : 4 weeks-aged male (ddy) mice, 18g

Infection : Intraperitoneal injection with 3 or 9% of gastric mucin

Administration : Subcutaneously 2 hours after the injection

用した事等により *in vivo* 効果が強く発現したものであることが今回の実験から明らかにされた。

また、TIPC と CVA を併用した場合、その併用効果は BRL 28500 の TIPC と CVA の配合比である 15 : 1 の比率以外の広範囲でも抗菌力を示すことが checker-board dilution method で示された。一般に β-lactam 系抗物質相互の併用の場合、PBP に対する親和性の異なるものが併用効果を現わすものと思われる。CVA は PBP 2 に強い親和性を有し⁵⁾、TIPC は PBP 3 に親和性を有し⁶⁾、それぞれ作用が異なることが知られている。以上のことより、BRL 28500 を投与した場合、生体内で TIPC の不活化を阻害する以外に CVA と TIPC との併用効果で治療効果が現われてきたことも考えられる。このことについては、更に究明の必要があると思われる。

文 献

- 1) READING, C. & M. COLE : Clavulanic acid : a β-lactamase-inhibiting β-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 11(5) : 852~857, 1977
- 2) 西野武志, 大瀬満寿代, 佐治弓子, 谷野輝雄 : Clavulanic acid と amoxicillin の併用による *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 30(S-2) : 42~75, 1982
- 3) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 4) NEU, H. C. & K. P. FU : Clavulanic acid, a novel inhibitor of β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 14(5) : 650~655, 1978
- 5) SPRATT, B. G. ; V. JOBANPUTRA & W. ZIMMERMAN : Binding of thienamycin and clavulanic

- acid to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 12(3) : 406~409, 1977
- 6) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding pro-

teins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72 : 2999~3003, 1975

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

TAKESHI NISHINO, TAKAO KASAI, MASAKO OTSUKI, MUTSUKO MORISHITA
CHIYOKO FUJIMOTO and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

Studies on the antibacterial activity of BRL 28500, a formulation of clavulanic acid (CVA) and ticarcillin (TIPC), have been performed and showed the following :

1) BRL 28500 had a similar antibacterial spectrum to TIPC against both Gram-positive and gram-negative bacteria although the antibacterial activity of BRL 28500 against clinical isolates was superior to TIPC and PIPC against strains of *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae*, superior to TIPC against *P. vulgaris* and nearly equal to TIPC against *H. influenzae* and *P. rettgeri*.

2) A synergic action of CVA on the antibacterial activity of TIPC was observed by the checker-board dilution method over a wide range of drug concentrations against both TIPC-sensitive and TIPC-resistant bacteria.

3) Against certain strains, the antibacterial activity of BRL 28500, like TIPC, decreased as the inoculum size was increased. Also as for TIPC, the antibacterial activity of BRL 28500 against certain strains decreased at alkaline pH, although to a lesser extent. The antibacterial activity of BRL 28500 was unaffected by the type of medium and horse serum used.

4) In a culture solution of TIPC-resistant bacteria, TIPC alone was rapidly decomposed whereas TIPC in BRL 28500 was quite stable under such conditions. This β -lactamase inhibitory activity of CVA was similarly recognized in the test with the extracted β -lactamase.

5) The blood concentration profiles of TIPC and CVA following administration of BRL 28500 to rats were quite similar.

6) When BRL 28500 acted against TIPC-resistant strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* at a drug concentration around the MIC, spheroplasts in the elongated filament forms of the bacteria were seen here and there.

7) In treatment of experimental intraperitoneal infections in mice due to TIPC-resistant strains of *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* and *H. influenzae*. BRL 28500 exerted a beneficial therapeutic effect and at the site of such infections it was confirmed that in BRL 28500 substantial hydrolysis of the TIPC component did not occur.