

Tazobactam/Piperacillinの*in vitro*, *in vivo*抗菌活性

南 新三郎・荒木春美・山田 尚・藤巻一雄・岡本世紀・北山理恵子・茗原由紀・  
松村尚樹・大懸直子・堀井妙子・前花淳子・保田 隆・渡辺泰雄・成田弘和  
富山化学工業株式会社総合研究所\*

Tazobactam (TAZ)の $\beta$ -lactamase阻害作用ならびにTAZとpiperacillin (PIPC)を1:4に配合したtazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)の*in vitro*, *in vivo*抗菌活性について検討し、以下の結果を得た。

1) TAZは各種の $\beta$ -lactamaseに対し、sulbactam (SBT)より強い阻害効果を示し、cephalosporinaseに対しては漸進的阻害作用が認められた。

2) TAZ/PIPCは広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を示した。

3) TAZ/PIPCは、臨床分離のPIPC耐性*Staphylococcus aureus* (methicillin感受性), *Staphylococcus epidermidis* (methicillin感受性), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*および*Bacteroides fragilis*に対し強い抗菌活性を示し、TAZの配合効果が認められた。これらPIPC耐性菌のうち、*P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*および*B. fragilis*に対して、TAZ/PIPCは、cefotiamより3管以上、sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ)では同等ないしは1~2管、ceftazidime (CAZ)では同等ないしは1~6管以上優れた抗菌活性を示した。

4) TAZ/PIPCの $\beta$ -lactamase誘導作用はPIPC同様弱かった。

5) PIPC感受性*E. coli*とpenicillinase産生*S. epidermidis*によるラットポーチ内混合感染、PIPC耐性*E. coli*によるラット子宮内感染およびマウス尿路感染では、TAZ/PIPCはPIPCに比べそれぞれポーチ内、子宮内および腎臓内生菌数を有意( $p < 0.05$ )に減少させた。また、CAZ高度耐性*P. aeruginosa*によるラットポーチ内感染では、治療4時間以後SBT/CPZより有意( $p < 0.05$ )に生菌数を減少させた。

以上、TAZは各種 $\beta$ -lactamaseに対し強い阻害活性を示した。また、TAZ/PIPCは各種PIPC耐性菌に対し優れた*in vitro*, *in vivo*抗菌活性を示し、TAZの配合効果が認められた。

**Key words** : tazobactam/piperacillin, TAZ/PIPC, YP-14, 抗菌活性,  $\beta$ -lactamase阻害活性, tazobactam

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)は、 $\beta$ -lactamase阻害剤であるtazobactam (TAZ)とペニシリン系抗生剤piperacillin (PIPC)を1:4に配合した注射用配合剤であり、現在大鵬薬品工業、富山化学工業の両社で臨床開発されている。TAZ (Fig. 1)はほとんどの菌種に対して弱い抗菌活性しか示さないが、各種細菌が産生する $\beta$ -lactamaseを不可逆的に阻害すると報告されている<sup>1-3)</sup>。また、PIPC (Fig. 1)にTAZを配合するとpenicillinase (PCase)産生菌のみならずcephalosporinase (CEPase)産生菌に対しても相乗効果が認められ、PIPCの抗菌活性が増強されることも知られている<sup>1)</sup>。

今回、TAZの $\beta$ -lactamase阻害作用およびTAZ/PIPCの*in vitro*および*in vivo*抗菌活性について検討したので

報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤

TAZ/PIPC, TAZおよびsulbactam (SBT)は大鵬薬品工業で合成されたものを用いた。PIPC (富山化学工業), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ, ファイザー製薬), clavulanic acid/ticarcillin (CVA-TIPC, スミスクラインビーチャム製薬), cefmetazole (CMZ, 三共), imipenem/cilastatin (IPM/CS, 萬有製薬), cephaloridine (CER, 塩野義製薬)およびpenicillin G (PCG, 萬有製薬)は市販品を用いた。PIPCの代謝物のdesethyl piperacillin (DEt-PIPC, Fig. 1)は富山化学

工業(株)総合研究所で合成されたものを用いた。

## 2. 使用菌株

富山化学工業(株)総合研究所保存の標準菌株および臨床分離株を用いた。

## 3. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に準じ寒天平板希釈法で最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。抗菌活性測定用培地にはMueller-Hinton agar (MHA: Difco)を用いた。*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*および*Moraxella catarrhalis*では5%綿羊血添加MHAを,*Haemophilus influenzae*ではヘミン(Sigma)を10 $\mu$ g/ml,  $\beta$ -NAD(Sigma)を2 $\mu$ g/mlとなるように加えたMHAをそれぞれ用いた。また嫌気性菌ではGAM寒天培地(ニッスイ)を用いた。接種用菌液の培養にはMueller-Hinton broth (MHB: Difco)を用いた。尚,*H. influenzae*ではヘミンを10 $\mu$ g/ml,  $\beta$ -NADを2 $\mu$ g/mlになるように加えたBrain heart infusion broth (BHIB, 栄研)を,*M. catarrhalis*では5%綿羊血添加MHBを, また, 嫌気性菌ではGAMブイヨン(ニッスイ)をそれぞれ用いた。

## 4. $\beta$ -lactamase阻害活性の測定

各 $\beta$ -lactamase溶液と種々の濃度の阻害剤溶液を等量混合し, 37 $^{\circ}$ Cで2.5および10分間インキュベート後,  $\beta$ -lactamase活性をUV法で測定した。尚, CEPase

およびoxyiminocephalosporinase (CXase)の場合はCER (100 $\mu$ M)を, PCaseの場合はPCG (100 $\mu$ M)を基質とした。対照には阻害剤溶液の代わりに0.05M phosphate buffer (pH 7.0)を加え, 対照の活性の50%を阻害する濃度をIC<sub>50</sub>値とした。

経時変化の検討では, *Enterobacter cloacae* H-27由来CEPaseおよび*Proteus vulgaris*由来CXase溶液9容に阻害剤溶液1容を加え, 37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし, 経時的に $\beta$ -lactamase活性を測定した。尚, 対照には阻害剤溶液の代わりに0.05M phosphate buffer (pH 7.0)を加え, 対照の活性を100%とした相対値で活性の変化を表した。

## 5. $\beta$ -lactamaseの調製および $\beta$ -lactamase assay

BHIB中一夜培養した $\beta$ -lactamase産生株を新鮮なBHIBで10倍に希釈し, 37 $^{\circ}$ Cで4時間振盪培養を行った。誘導型酵素の場合は, 2時間培養後誘導剤としてCMZ (10 $\mu$ g/ml)を加えた。菌体を集菌洗浄後, 超音波破碎し粗酵素液を調整し, 既報<sup>5)</sup>にしたがって, CM-Sephadexカラム(C-50)を用いて部分精製酵素を得た。 $\beta$ -lactamase活性は, CER (100 $\mu$ M)又はPCG (100 $\mu$ M)を基質とするUV法<sup>6)</sup>にて測定した。酵素活性はunitで表し, 1 unitは0.05M phosphate buffer (pH 7.0)中37 $^{\circ}$ Cで1分間に1 $\mu$ moleの基質を分解するのに必要な酵素量

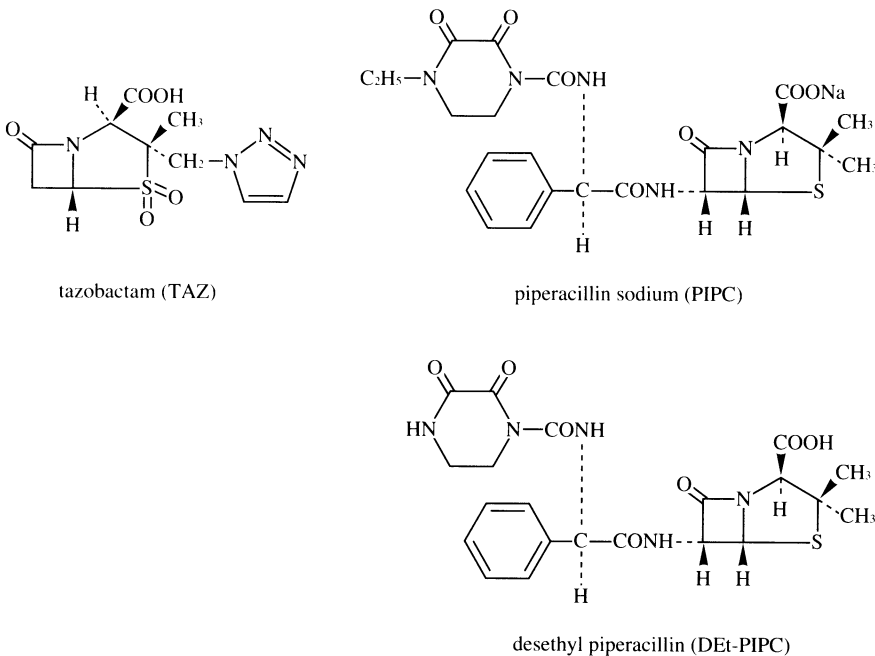


Fig. 1. Chemical structure of tazobactam, piperacillin and desethyl piperacillin.

とした。

#### 6. $\beta$ -lactamase誘導作用

既報<sup>7)</sup>に従って、各薬剤を1, 10および100 $\mu$ g/mlになるように添加し、2時間培養後の菌体中 $\beta$ -lactamase活性を測定した。 $\beta$ -lactamase活性はCER(100 $\mu$ M)を基質とするUV法にて測定した。また、蛋白濃度をBovine serum albumin(Sigma)を標準品としたLowry法<sup>8)</sup>にて測定し、比活性を算出した。実験は原則として3回繰り返し、誘導 $\beta$ -lactamase活性を3回の平均値で表示した。

#### 7. ポーチ内感染実験

Selyeの方法<sup>9)</sup>に従い、Wistar系雄性ラット(体重130g~150g)の背部皮下に浸出性無菌炎症ポーチを作製した。ポーチ作製から10日~15日のラット(体重180g~250g)を実験に使用した。

##### 1) CAZ耐性*Pseudomonas aeruginosa* S-861感染

CAZ耐性*P. aeruginosa* S-861をBHIB中で一夜培養し、生理食塩水で適宜希釈後、その1容を20% gastric mucin(半井化学薬品)9容に加え、約 $1 \times 10^6$  cells/mlとなるよう調整した。この2mlをポーチ内に接種し、2時間後にTAZ/PIPC, CAZ, SBT/CPZおよびPIPCの各200mg/kgを静脈内投与し、2, 4, 6および8時間後にポーチ内浸出液を採取した。採取した浸出液の100倍希釈系列を生理食塩水で作製し、その0.05mlをHIA平板に塗布しポーチ内生菌数を求めた。

##### 2) *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis*混合感染<sup>10)</sup>

*E. coli* TK-16R(rifampicin耐性株)およびPCase産生*S. epidermidis* F-2405のBHIB一夜培養液を、生理食塩水で適宜希釈後、各々1容を20% gastric mucin 8容に加え、それぞれ約 $5 \times 10^6$  cells/mlとなるよう調整し、その2mlをポーチ内に接種した。単独感染の場合は感染菌液1容と生理食塩水1容を20% gastric mucin 8容に加えた。菌接種2時間後にTAZ/PIPCおよびPIPCの各100mg/kgを静脈内投与し、3, 6および9時間後にポーチ内浸出液を採取した。採取した浸出液の100倍希釈系列を生理食塩水で作製し、その0.05mlをrifampicin(100 $\mu$ g/ml)含有HIA平板に塗布し、*E. coli* TK-16Rの生菌数を求めた。また、ポーチ内浸出液中PIPC濃度測定のために、採取した浸出液0.5mlを直ちに冷メタノール0.5mlで希釈し、遠心分離(1000 $\times$ g, 10min, 4 $^{\circ}$ C)後、上清中濃度をbioassay法にて測定した。

#### 8. ラット子宮内感染<sup>11)</sup>

Wistar系雌性ラット(体重180~200g)にprogesterone(半井化学薬品)の1mg/ratを感染2日前から1日1回筋肉内投与した。Progesteroneは16%安息香酸ベン

ジル(半井化学薬品)含有綿実油に10mg/mlになるように溶解した。Progesterone処理したラットを背位に固定後、エーテル麻酔下に開腹し、子宮頸部を動脈を避けて結紮した。2本の子宮角に菌液を各0.1ml注入し、注入口を瞬間接着剤(アロンアルファ<sup>®</sup>)で塞ぎ、開腹部を縫合した。感染菌として、PIPC感受性の*E. coli* TK-16およびPCaseを産生しPIPCに耐性な*E. coli* TK-616を用い、各株のBHIB一夜培養液を5% gastric mucinで1000倍希釈したものを接種菌液とした。

感染1時間後にTAZ/PIPCおよびPIPCの各100mg/kgを皮下投与した。投与3, 6, 24時間後に子宮を無菌的に摘出し、4mlの生理食塩水を加えホモジネート後、生菌数を測定した。

また、投与0.5, 1, 2, 3時間後に血液及び子宮を採取し、PIPC濃度を測定した。血液は遠心分離(1000 $\times$ g, 15min, 4 $^{\circ}$ C)後、bioassay法にて薬剤濃度を測定した。子宮は秤量後、その重さの4倍量の50%メタノール含有phosphate buffer(pH 7.0)を加え、20%ホモジネートを作製し、遠心分離(1000 $\times$ g, 15min, 4 $^{\circ}$ C)後、上清中の薬剤濃度をbioassay法にて測定した。

#### 9. マウス尿路感染<sup>12)</sup>

*E. coli* TK-16および*E. coli* TK-616を生理食塩水にて希釈し、その0.1mlをICR系雌性マウス(4週齢、体重18~22g)の膀胱に、経尿道的に注入した。接種菌量はTK-16株では $4.2 \times 10^5$  cells/mouse, TK-616株では、 $1.2 \times 10^6$  cells/mouseとした。菌液注入後外科用クレメにて4時間尿道を閉塞した。尿道閉塞を解除した時点からTAZ/PIPC, PIPC, SBT/CPZによる2時間間隔3回の皮下投与治療を行なった。TK-16株感染では1回0.5mg/mouseを、TK-616株感染では1回2mg/mouseを皮下投与した。感染24時間後に生存マウスの両方の腎臓を無菌的に摘出し、4mlの生理食塩水を加えホモジネート後、生菌数を測定した。

また、投与5, 15, 30, 60分後に*E. coli* TK-616感染マウスから血液および腎臓を採取した。血液は遠心分離(1000 $\times$ g, 15min, 4 $^{\circ}$ C)後、HPLC法にて薬剤濃度を測定した。腎臓は秤量後、その重さの4倍量のphosphate buffer(pH 7.0)を加え、20%ホモジネートを作製した。ホモジネートに等量の冷メタノールを加え、遠心分離(1000 $\times$ g 15min, 4 $^{\circ}$ C)後、上清中の薬剤濃度をbioassay法にて測定した。更に、投与4時間後までの尿を集め尿中濃度をbioassay法にて測定した。

#### 10. 薬剤濃度測定法

##### 1) Bioassay法

PIPCおよびCPZ濃度は、*Micrococcus luteus* ATCC 9341を検定菌とするペーパーディスク法にて測定し

た<sup>13,14)</sup>。

## 2) HPLC法

PIPcおよびCPZの Maus血清中濃度は、HPLC法で測定した。UVD-2(254nm)を装備した島津LC-6A型高速液体クロマトグラフィーを用い、固定相としてはSTR-ODSM(4mmφ×150mm)を使用した。移動相の流速は2.0ml/minとし254nmの波長で検出した。移動相は、アセトニトリル、1M酢酸、1M酢酸ナトリウム、蒸留水で作製し、その割合はPIPcでは250:5:20:725、CPZでは200:5:20:775とした。

## 11. 統計学的検討

統計解析には原則としてStudent t-testを用い、実測値でない値が含まれている場合は、Wilcoxonの順位検定<sup>15)</sup>を用いた。また、3群以上の比較の場合は、Bonferroniの方法<sup>15)</sup>で危険率の補正を行った。

## II. 実験結果

### 1. TAZのβ-lactamase阻害作用

TAZのPCase, CXase, CEPaseに対するIC<sub>50</sub>値(β-lactamase活性を50%阻害する濃度)をSBTと比較した

(Table 1)。TAZはSBTと同様にCEPaseを含む各種β-lactamaseを強く阻害し、*Serratia marcescens* W-24由来CEPase以外はSBTより優れた阻害活性を示した。インキュベーション時間を長くした場合、CEPaseではTAZのIC<sub>50</sub>値が小さくなる傾向がみられたが、PCase, CXaseでは顕著ではなかった。次にCEPaseおよびCXaseに対するTAZの酵素阻害の経時的変化を調べた(Fig. 2)。0.5μg/ml添加後、CXaseでは2分以内にほとんどの活性を阻害され、以後その阻害は持続した。一方、CEPaseでは活性の低下がCXaseに比べ緩徐で、阻害率は60分後に約90%に達しその後も徐々に阻害が進行した。SBTと比較した場合、いずれの酵素に対してもTAZの阻害効果が強く、CXaseでは、活性を阻害する速度はほぼ同じであったが、CEPaseではTAZの方が速かった。

### 2. TAZ/PIPc, TAZおよびDET-PIPcの抗菌スペクトル

TAZ/PIPcの抗菌スペクトルはPIPcとほぼ同じであった(Table 2~4)。また、PIPcの代謝物であるDET-

Table 1. Inhibitory activity of tazobactam against various types of β-lactamase

Type of β-lactamase	Source of β-lactamase	Incubation time (min)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
			TAZ	SBT
PCase	<i>E. coli</i> TK-3	2	0.35	49
		5	0.33	26
		10	0.32	19
PCase	<i>E. coli</i> W3630 Rms212	2	0.003	25
		5	0.002	12
		10	0.002	8.5
CXase	<i>P. vulgaris</i> T-178	2	0.007	0.029
		5	0.006	0.028
		10	0.002	0.029
CEPase	<i>E. coli</i> TK-805	2	7.5	17
		5	4.4	5.5
		10	1.6	5.5
CEPase	<i>E. cloacae</i> H-27	2	2.3	9.0
		5	1.1	7.5
		10	0.6	3.8
CEPase	<i>S. marcescens</i> W-24	2	6.2	4.4
		5	3.3	1.6
		10	2.1	1.0

IC<sub>50</sub>: The concentration inhibited 50% of β-lactamase activity after incubation for 2, 5, and 10 min at 37°C

TAZ: tazobactam SBT: subactam

PCase: penicillinase, CXase: oxyiminocephalosporinase, CEPase: cephalosporinase

PIPCの抗菌力は好気性グラム陽性菌、および嫌気性菌に対してはPIPCとほぼ同等であったが、好気性グラム陰性菌では2管程度劣った。TAZは嫌気性菌のみに若干活性を示した。

### 3. 臨床分離PIPC耐性菌に対するTAZ/PIPCの抗菌活性

臨床分離のPIPC耐性の*S. aureus*(methicillin感受性, 26株), *S. epidermidis*(methicillin感受性, 28株), *E. coli*(24株), *Klebsiella pneumoniae*(24株), *P. aeruginosa*(27株), *H. influenzae*(21株), *M. catarrhalis*(26株), *Bacteroides fragilis*(18株)に対するTAZ/PIPCの抗菌活性をPIPC, SBT/CPZ, CVA/TIPC, CAZ, CTMと比較した。MICの分布範囲およびMIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>をTable 5に示す。いずれのPIPC耐性菌に対してもTAZ/PIPCの抗菌活性はPIPCに比べ強く、そのMIC値はTAZの配合によりPIPCの感受性レベルに近い値にまで低下した。また、

TAZ/PIPCの抗菌活性はいずれの菌種に対してもCVA/TIPCより優れ、*H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *B. fragilis*に対してはSBT/CPZ, CAZ, CTMと同等以上の抗菌活性を示した。さらに、TAZ/PIPCはPIPC耐性*P. aeruginosa*に対しCAZに匹敵する強い抗菌活性を示した(Fig. 3)。

### 4. TAZ/PIPCのβ-lactamase誘導作用

TAZ/PIPCのβ-lactamase誘導作用を誘導型CEPase産生の*E. cloacae* H-27, *Citrobacter freundii* N-69および*P. aeruginosa* S-1278を用いて、PIPC, SBT/CPZ, CVA/TIPC, CAZ, CTM, CMZ, IPMと比較した。1μg/ml, 10μg/mlおよび100μg/mlを2時間作用させた際の菌体内β-lactamase活性をTable 6に示す。

TAZ/PIPCは、PIPCと類似したβ-lactamase誘導作用を示し、その程度はIPM, CMZより明らかに弱かった。

### 5. ポーチ内感染に対する治療効果

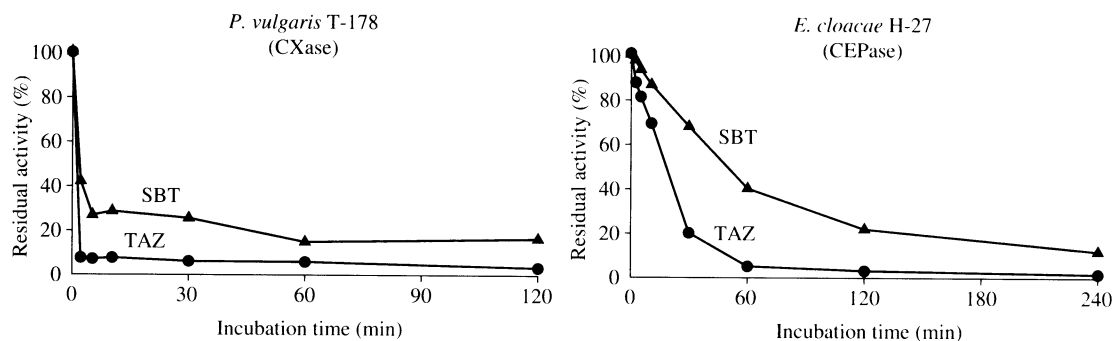


Fig. 2. Kinetics of β-lactamase inhibition by 0.5 μg/ml of tazobactam and sulbactam against the extracted β-lactamases from *Proteus vulgaris* T-178 and *Enterobacter cloacae* H-27.

TAZ : tazobactam, SBT : sulbactam, CXase : oxyiminocephalosporinase, CEPase : cephalosporinase

Table 2. Antibacterial spectrum of tazobactam/piperacillin against gram-positive bacteria

Organism	MIC (μg/ml) at 10 <sup>6</sup> cells/ml			
	TAZ/PIPC	PIPC	DEt-PIPC	TAZ
<i>S. aureus</i> FDA209P	1.56	0.78	0.78	100
<i>S. aureus</i> Terashima	0.39	0.39	0.39	50
<i>S. aureus</i> Smith	0.78	0.78	0.78	50
<i>S. epidermidis</i> IID886	1.56	1.56	0.78	25
<i>S. pyogenes</i> S-8	0.20	0.10	0.20	>100
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.20	0.10	0.20	>100
<i>S. pneumoniae</i> IID552	0.05	0.05	0.05	25
<i>S. pneumoniae</i> IID553	0.05	0.025	0.05	50
<i>E. faecalis</i> IID682	25	50	12.5	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.20	0.20	0.10	25

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, PIPC: piperacillin, DEt-PIPC: desethyl piperacillin, TAZ: tazobactam

1) CAZ耐性*P. aeruginosa* S-861感染

CAZに高度耐性を示す*P. aeruginosa* S-861株をラットポーチ内に感染させ、感染2時間後にTAZ/PIPC, PIPC, CAZ, およびSBT/CPZの各200mg/kgを静脈内投与し、ポーチ内生菌数を測定した(Fig. 4)。治療8時間後のポーチ内生菌数は、control群 $6.77 \pm 0.22$ , TAZ/PIPC投与群 $3.68 \pm 0.28$ , PIPC投与群 $3.71 \pm 0.22$ , CAZ投与群 $5.32 \pm 0.48$ , SBT/CPZ投与群 $5.98 \pm 0.08$

で、TAZ/PIPC投与群およびPIPC投与群のポーチ内生菌数は、control群より有意( $p < 0.05$ )に少なく治療効果が認められた。また、いずれのポイントにおいてもTAZ/PIPC投与群およびPIPC投与群のポーチ内生菌数には差は認められなかった。薬剤投与群間の比較では、治療4時間以後、TAZ/PIPC投与群のポーチ内生菌数は、SBT/CPZ投与群よりは有意( $p < 0.05$ )に少なかった。また有意差はみられなかったがCAZ投与群よ

Table 3. Antibacterial spectrum of tazobactam/piperacillin against gram-negative bacteria

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) at $10^6$ cells/ml			
	TAZ/PIPC	PIPC	DEt-PIPC	TAZ
<i>E. coli</i> NIHJ	0.025	0.025	0.20	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.78	0.78	3.13	>100
<i>S. paratyphi</i> IID605	1.56	1.56	6.25	>100
<i>S. schottmuelleri</i> IID607	0.20	0.20	0.39	100
<i>S. sonnei</i> EW33	0.39	0.39	1.56	100
<i>S. boydii</i> EW28	0.39	0.39	1.56	>100
<i>S. flexneri</i> IID642	0.78	0.78	3.13	>100
<i>C. freundii</i> IF012681	0.39	0.39	3.13	50
<i>K. pneumoniae</i> IID875	0.10	0.20	0.78	100
<i>K. pneumoniae</i> ATCC10031	0.20	0.39	1.56	50
<i>E. aerogenes</i> IID972	0.10	0.10	0.39	>100
<i>E. cloacae</i> IID977	0.78	0.78	6.25	>100
<i>E. cloacae</i> IID3320	0.20	0.39	0.78	>100
<i>S. marcescens</i> IID620	0.78	0.78	6.25	>100
<i>S. marcescens</i> IID3736	0.78	0.78	3.13	>100
<i>P. mirabilis</i> IF03849	0.39	0.39	0.78	>100
<i>P. vulgaris</i> IID874	0.78	3.13	12.5	>100
<i>P. vulgaris</i> IF03851	<0.00625	0.0125	0.05	100
<i>M. morgani</i> IID602	0.39	0.78	1.56	>100
<i>P. rettgeri</i> IF013501	<0.00625	<0.00625	<0.00625	100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	0.39	0.39	1.56	25
<i>P. aeruginosa</i> IF03445	1.56	3.13	3.13	>100

Table 4. Antibacterial spectrum of tazobactam/piperacillin against anaerobic bacteria

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) at $10^6$ cells/ml			
	TAZ/PIPC	PIPC	DEt-PIPC	TAZ
<i>P. variabilis</i> WAL3502	12.5	12.5	12.5	25
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL3218	0.0125	0.0125	0.025	6.25
<i>P. magnus</i> WAL2508	0.05	0.025	0.05	25
<i>P. prevotii</i> GAI0444	0.05	0.05	0.05	6.25
<i>C. perfringens</i> WAL3503	0.05	0.025	0.025	100
<i>B. fragilis</i> ATCC25285	0.78	3.13	3.13	6.25
<i>B. fragilis</i> GAI0004	0.78	1.56	3.13	6.25
<i>B. vulgatus</i> GN11479	6.25	25	25	25
<i>B. vulgatus</i> WAL1887	0.39	0.39	0.39	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL3304	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>B. thetaiotaomicron</i> WAL2926	12.5	12.5	12.5	25

Table 5. Antibacterial activity of tazobactam/piperacillin against piperacillin-resistant bacteria

Bacterial strains (No. of strains)	Drug	Range ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> (26)	TAZ/PIPC	1.56 ~ 12.5	3.13	12.5
	PIPC	3.13 ~ 50	6.25	12.5
	SBT/CPZ	1.56 ~ 3.13	3.13	3.13
	CVA/TIPC	3.13 ~ 6.25	6.25	6.25
	CAZ	6.25 ~ 25	12.5	12.5
	CTM	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56
Methicillin-susceptible <i>S. epidermidis</i> (28)	TAZ/PIPC	0.78 ~ 200	6.25	100
	PIPC	3.13 ~ >200	25	>200
	SBT/CPZ	1.56 ~ >200	6.25	200
	CVA/TIPC	6.25 ~ >200	25	>200
	CAZ	6.25 ~ >200	3.13	>200
	CTM	1.56 ~ >200	1.56	200
<i>E. coli</i> (24)	TAZ/PIPC	1.56 ~ 12.5	3.13	6.25
	PIPC	12.5 ~ >200	25	>200
	SBT/CPZ	0.2 ~ 3.13	0.78	3.13
	CVA/TIPC	25 ~ 100	25	100
	CAZ	0.05 ~ 12.5	0.2	6.25
	CTM	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>K. pneumoniae</i> (24)	TAZ/PIPC	1.56 ~ >200	6.25	100
	PIPC	12.5 ~ >200	50	>200
	SBT/CPZ	0.39 ~ >200	1.56	100
	CVA/TIPC	6.25 ~ >200	50	100
	CAZ	0.1 ~ 3.13	0.39	1.56
	CTM	0.2 ~ >200	0.39	6.25
<i>P. aeruginosa</i> (27)	TAZ/PIPC	3.13 ~ 100	12.5	50
	PIPC	12.5 ~ >100	25	100
	SBT/CPZ	6.25 ~ >100	25	100
	CAZ	1.56 ~ >100	12.5	50
	CTM	>100 ~ >100	>100	>100
<i>H. influenzae</i> (21)	TAZ/PIPC	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
	PIPC	3.13 ~ >200	25	>200
	SBT/CPZ	0.1 ~ 12.5	0.2	3.13
	CVA/TIPC	0.78 ~ 25	1.56	12.5
	CAZ	0.2 ~ 1.56	0.39	0.78
	CTM	0.78 ~ 50	1.56	12.5
<i>M. catarrhalis</i> (26)	TAZ/PIPC	0.05 ~ 0.1	0.05	0.05
	PIPC	0.1 ~ 0.39	0.2	0.39
	SBT/CPZ	0.05 ~ 0.39	0.2	0.39
	CVA/TIPC	0.1 ~ 0.39	0.2	0.39
	CAZ	0.025 ~ 0.39	0.05	0.2
	CTM	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56
<i>B. fragilis</i> (18)	TAZ/PIPC	1.56 ~ 6.25	3.13	6.25
	PIPC	6.25 ~ >200	50	100
	SBT/CPZ	0.78 ~ 6.25	3.13	3.13
	CVA/TIPC	3.13 ~ 50	6.25	50
	CAZ	50 ~ >200	>200	>200
	CTM	100 ~ >200	>200	>200

SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, CVA/TIPC: clavulanic acid/ticarcillin, CAZ: ceftazidime, CTM: cefotiam

りも少なかった。

2) *E. coli*+*S. epidermidis*混合感染

*E. coli* TK-16R (rifampicin耐性株) およびPCase産生 *S. epidermidis* F-2405をポーチ内に混合感染させ、感染2時間後にTAZ/PIPCおよびPIPCの各100mg/kgを静

脈内投与し、ポーチ内の*E. coli*生菌数を測定した(Fig. 5)。 *E. coli*単独感染ではTAZ/PIPCはPIPCと同等の治療効果を示した。 *S. epidermidis*との混合感染時ではPIPCの治療効果は低下し、治療9時間後のポーチ内生菌数は単独感染時に比べ有意( $p < 0.05$ )に増加した

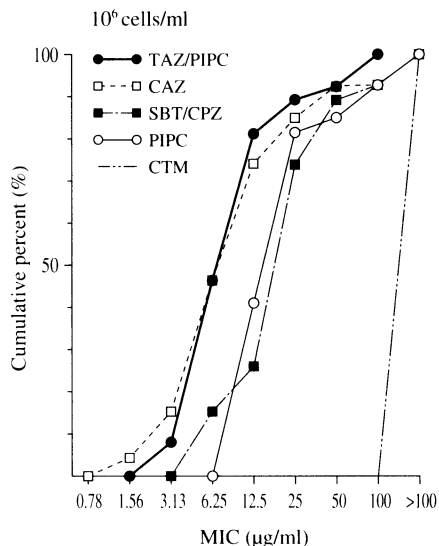


Fig. 3. Antibacterial activity of tazobactam/piperacillin against piperacillin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (27 strains).

TAZ/PIPC : tazobactam/piperacillin, CAZ : ceftazidime, SBT/CPZ : sulbactam/cefoperazone, PIPC : piperacillin, CTM : cefotiam

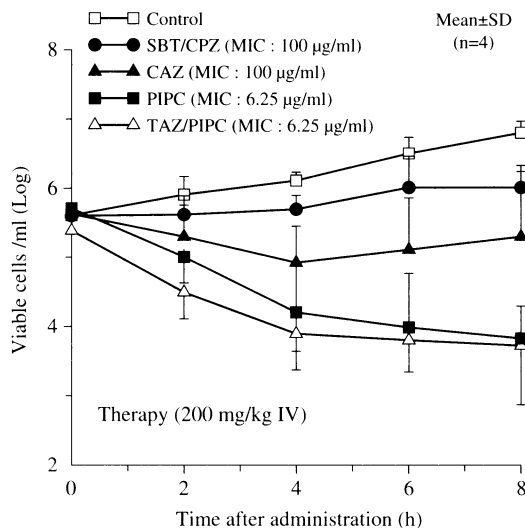


Fig. 4. Therapeutic effect of tazobactam/piperacillin against rat pouch infection caused by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* S-861.

Table 6. Inducer activity of tazobactam/piperacillin in *Enterobacter cloacae* H-27, *Citrobacter freundii* N-69 and *Pseudomonas aeruginosa* S-1278

Strain	Concentration (µg/ml)	β-lactamase activity (unit/mg of protein) after induction by various drugs (n=3)								
		Control	TAZ/PIPC	PIPC	SBT/CPZ	CVA/TIPC	CAZ	CTM	IPM	CMZ
<i>E. cloacae</i> H-27	0	0.02								
	1		0.02	0.03	0.03*	0.04	0.04	0.02	3.35	1.40
	10		0.03	0.03	0.05*	0.48	0.15	0.34	2.27	3.64
	100		0.12	0.10	1.46*	3.11	1.30	1.11	2.39	4.62
<i>C. freundii</i> N-69	0	0.02								
	1		0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.30**	0.10
	10		0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	1.87**	0.82
	100		0.02	0.02	0.05	0.56	0.07	0.20	1.34**	1.52
<i>P. aeruginosa</i> S-1278	0	0.004								
	1		0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.005	0.687	NT
	10		0.002	0.006	0.002	0.008	0.058	0.006	0.315	NT
	100		0.013	0.065	0.178	0.431	0.724	0.093	0.248	NT

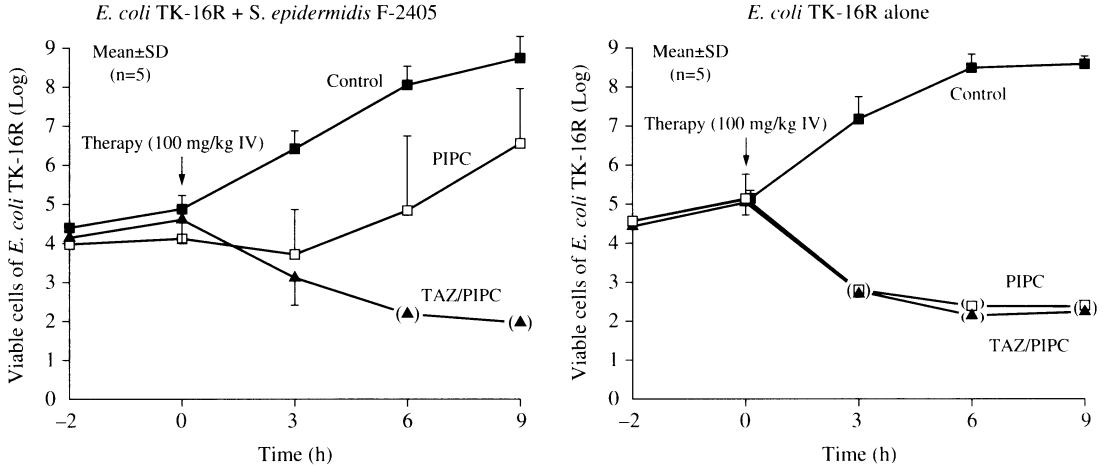
\* : n=2, \*\* : n=1 NT: not tested  
IPM: imipenem, CMZ: cefmetazole



が、TAZ/PIPCは単独感染と同等の治療効果を示した。単独感染および混合感染時のポーチ内PIPC濃度を測定したところ、Fig. 6に示すように、混合感染時のPIPC投与群のポーチ内PIPC濃度はTAZ/PIPC投与群よりも低く推移した。

6. 子宮内感染に対する治療効果

PIPC感受性の *E. coli* TK-16およびPCaseを産生しPIPCに耐性な *E. coli* TK-616をラット子宮内に感染させ、感染1時間後にTAZ/PIPCおよびPIPCの各100mg/kgを皮下投与し、子宮内生菌数を測定した(Fig. 7)。



Drug	MIC (μg/ml) against	
	<i>E. coli</i> TK-16R	<i>S. epidermidis</i> F-2405
Tazobactam/piperacillin	0.2	1.56
Piperacillin	0.2	6.25

Fig. 5. Therapeutic effect of tazobactam/piperacillin and piperacillin against rat pouch infection caused by *Escherichia coli* TK-16R plus *Staphylococcus epidermidis* F-2405 (penicillinase producer) and *Escherichia coli* TK-16R alone.

The value in the parenthesis indicates the tentative mean, in which the detectable limit was tentatively used for the calculation if the value below the detection limit exists.

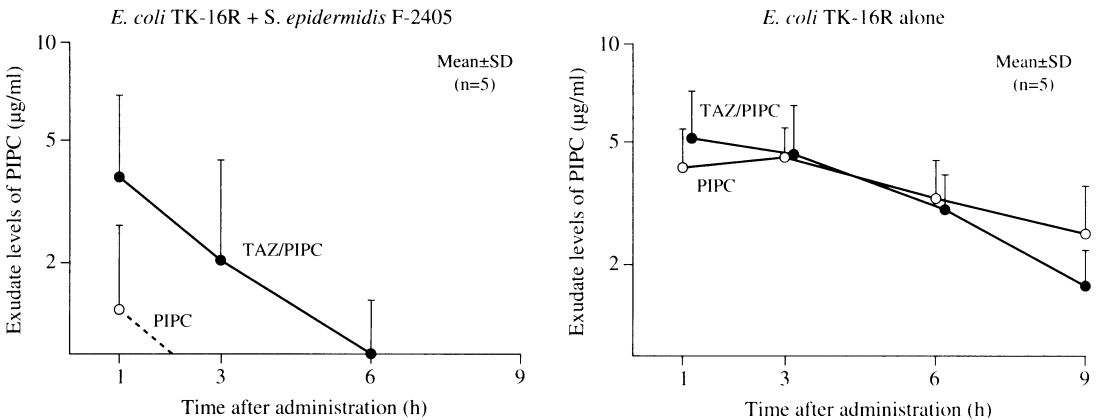


Fig. 6. Exudate levels of piperacillin in the rat pouches infected with *Escherichia coli* TK-16R plus *Staphylococcus epidermidis* F-2405 (penicillinase producer) or *Escherichia coli* TK-16R alone after IV administration of 100 mg/kg of tazobactam/piperacillin and piperacillin.

PIPC感受性の*E. coli* TK-16感染時ではTAZ/PIPCはPIPCと同等の治療効果を示し、治療3時間以降の両群の子宮内生菌数は、control群に比べ有意( $p < 0.05$ )に低下した。一方、*E. coli* TK-616感染時にはPIPCの治療効果が低下しcontrol群とほぼ同じ生菌数推移を示したのに対し、TAZ/PIPC投与群の治療3時間以降の子宮内生菌数は、PIPC投与群に比べ有意( $p < 0.01$ )に

低下した。子宮内PIPC濃度を測定したところ、Fig. 8に示すように、*E. coli* TK-616感染時のPIPC投与群の子宮内PIPC濃度は投与120分以後では、TAZ/PIPC投与群に比べ有意( $p < 0.05$ )に低く推移した。

7. 尿路感染に対する治療効果

PIPC感受性の*E. coli* TK-16またはPCaseを産生しPIPCに耐性な*E. coli* TK-616にて惹起したマウス尿路

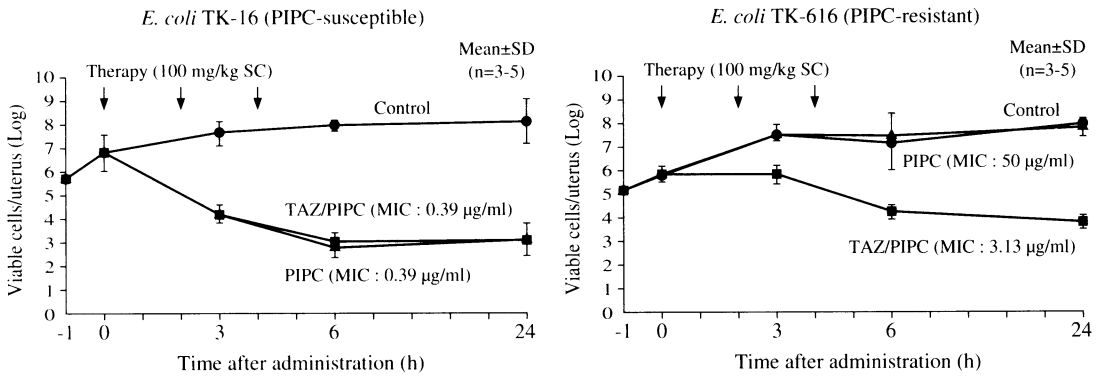


Fig. 7. Therapeutic effect of tazobactam/piperacillin and piperacillin against intrauterine infection caused by piperacillin-susceptible and -resistant *Escherichia coli* in rats.

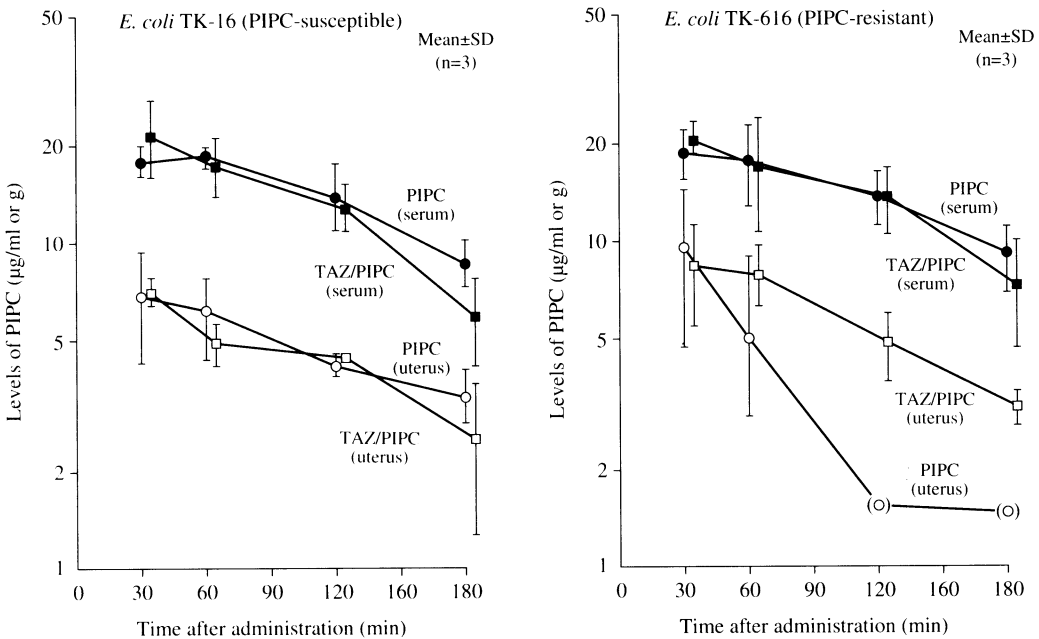


Fig. 8. Levels of piperacillin in uterus and serum after SC administration of 100 mg/kg of tazobactam/piperacillin and piperacillin to rats with intrauterine infection caused by piperacillin-susceptible and resistant *Escherichia coli*.

The value in the parenthesis indicates the tentative mean, in which the detectable limit was tentatively used for the calculation if the value below the detection limit exists.

感染に対するTAZ/PIPCの治療効果をPIPCおよびSBT/CPZと比較した。Fig. 9に示すように*E. coli* TK-16感染時のTAZ/PIPCの治療効果はSBT/CPZより劣った( $P < 0.01$ )が、PIPCとほぼ同等であった。*E. coli* TK-616感染時にはTAZ/PIPCの治療効果はPIPCより優れ( $P < 0.05$ )、SBT/CPZとほぼ同等であった。*E. coli* TK-616感染マウスにおいてTAZ/PIPCおよびSBT/CPZ投与時の血清中、腎臓中および尿中のPIPCおよびCPZ濃度を測定した(Fig. 10)。その結果、血清中濃度はほぼ同等であったが、腎臓中PIPC濃度はCPZ濃度の2~8倍高く推移した。また、PIPCの尿中濃度(0~4時間)は $293.1 \pm 37.0 \mu\text{g/ml}$ であり、CPZ濃度( $132.9 \pm 47.0$ )の約2倍高い値を示した。

III. 考 察

今回、TAZの $\beta$ -lactamase阻害作用およびTAZ/PIPCの*in vitro*, *in vivo*抗菌活性について検討した。TAZの $\beta$ -lactamase阻害作用を、ほぼ類似した阻害スペクトルを有するSBTと比較したところ、既に報告されている結果<sup>1)</sup>とほぼ一致し、TAZはほとんどのCEPase, CXase, PCaseに対してSBTより強い阻害活性を示した。SBTで一部阻害作用が不十分であったCEPaseに対しても、TAZは $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ の濃度での10分間作用でその活性を50%阻害した。TAZの $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ の濃度レベルは実際の感染巣においても到達可能な濃度であり、又、CEPase産生菌の菌体を用いた阻害作用の検討でも十分な阻害作用の認められる濃度であることから<sup>16)</sup> CEPaseを産生しPIPCに耐性な菌による感染症に対してもTAZの配合効果が期待されるものと考えられる。

PIPC耐性のmethicillin感受性*S. aureus*, methicillin感受性*S. epidermidis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. fragilis*に対するTAZ/PIPCの*in vitro*抗菌活性をPIPCなどと比較した結果、TAZ/PIPCはこれらのPIPC耐性菌に対し強い抗菌活性

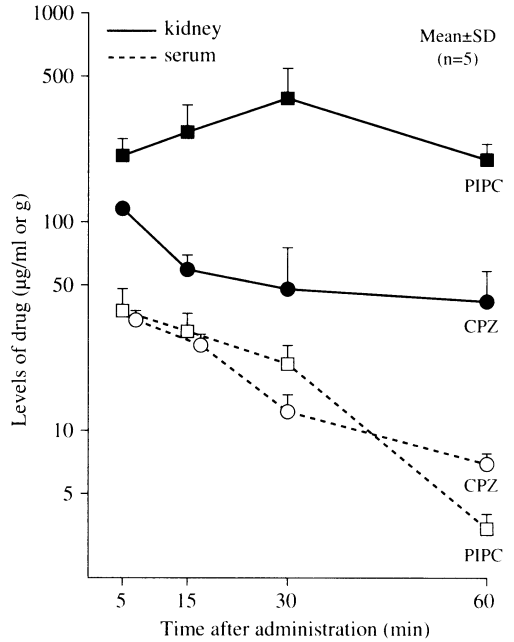


Fig. 10. Levels of piperacillin and cefoperazone in kidney and serum after SC administration of 100 mg/kg of tazobactam/piperacillin and sulbactam/cefoperazone to mice infected with *Escherichia coli* TK-616.

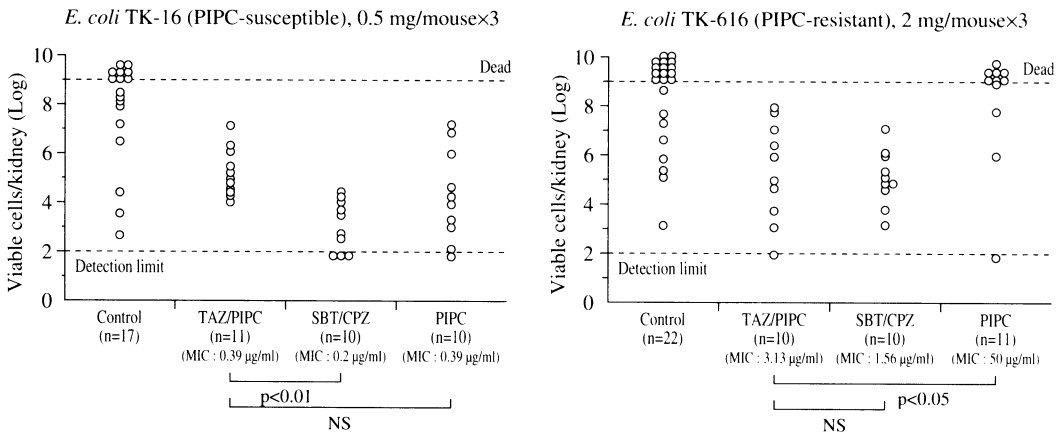


Fig. 9. Protective effect of tazobactam/piperacillin against urinary tract infection caused by piperacillin-susceptible and -resistant *Escherichia coli* in mice.

を示し、既に報告されているように<sup>1-3)</sup>、TAZの配合効果が確認された。これらPIPC耐性菌に対するTAZ/PIPCの抗菌活性はSBT/CPZ, CAZ, CTMと比較した場合、同等以上であった。抗菌活性の面からはPIPCにTAZを配合することによって、PIPCの持つペニシリンの弱点が克服され、セフェム剤に近い特性が付与されたものと考えられる。

PIPCは誘導型CEPase産生グラム陰性菌に対して弱いCEPase誘導作用しか示さないが、TAZを配合したTAZ/PIPCもほとんど誘導作用を示さなかった。PIPCはこれら誘導型CEPaseに対して比較的安定で、しかもほとんどCEPaseを誘導しないため、通常誘導型CEPase産生グラム陰性菌に対しては強い抗菌活性を示す<sup>1)</sup>。このためTable 3に示した如く*E. cloacae*, *S. marcescens*, *Morganella morganii*などの代表的誘導型CEPase産生菌では、抗菌活性はPIPCとほぼ同等であった。しかし、今回データを示さなかったが、接種菌量が多くなった場合には、これら誘導型CEPase産生菌でもTAZの配合効果がみられた。即ち、 $10^8$  cells/ml接種時の*M. morganii* IID602に対するPIPCのMICは25  $\mu$ g/mlであったが、TAZ/PIPCは3.13  $\mu$ g/mlであった。したがって、これらPIPC感受性の誘導型CEPase産生菌による感染症であっても感染菌量が多い場合にはTAZの配合効果が現れる場合があるものと考えられた。

TAZの強い $\beta$ -lactamase阻害活性に基づくTAZ/PIPCの優れた*in vitro*抗菌活性が確認されたので、各種実験感染モデルを用いて、TAZ/PIPCの治療効果についても検討した。*E. coli*のPCase産生および非産生株によるラット子宮内感染およびマウス尿路感染に対するTAZ/PIPCの治療効果は、PCase非産生株ではPIPCと同等であった。しかし、PCase産生株ではTAZ/PIPCの治療効果はPIPCよりも明らかに優れていた。これは*in vitro*抗菌力とよく相関した結果であった。また、PIPC投与群においてはPCase産生株の感染巣内(子宮内)では、PIPC濃度が非産生菌感染時に比べ低下したが、TAZ/PIPC投与時にはその低下が抑制されることが明らかとなった。この様な $\beta$ -lactamase産生菌感染時における感染巣内薬剤濃度の低下は、複数菌感染の場合に“Indirect pathogenicity”をもたらすとして問題視されている<sup>18)</sup>。*E. coli* TK-16RおよびPCase産生*S. epidermidis* F-2405のポーチ内混合感染に対する治療効果の検討から、実際にTAZ/PIPCが $\beta$ -lactamase産生の弱毒菌を含む複数菌感染に対しても有効であることが確認された。起炎菌がPIPC感受性菌であっても、Indirect pathogenとなりうる弱毒の $\beta$ -lactamase産生菌

が共存する複数菌感染の場合には、PIPCよりもTAZ/PIPCの有用性が勝る可能性が示唆された。

*E. coli*によるマウス尿路感染系を用い、TAZ/PIPCとSBT/CPZの治療効果も比較した。*In vitro*抗菌活性はSBT/CPZが優れていたが、PCase産生株感染時の治療効果はほぼ同等であった。TAZ/PIPCおよびSBT/CPZ投与時の腎臓中および尿中のPIPCおよびCPZ濃度を測定した結果、腎臓中および尿中PIPC濃度はCPZ濃度の2倍以上であり、両剤の尿中排泄の違いが治療効果に反映したのと考えられた。ヒトでもPIPCの尿中排泄がCPZに比べ多い<sup>16,19)</sup>ことから、PCase産生*E. coli*による尿路感染に対しては、SBT/CPZに匹敵する効果が期待されよう。

最近、我々はIPM分解性 $\beta$ -lactamaseを産生し、CAZ, SBT/CPZ等に高度耐性でPIPCに感受性の*P. aeruginosa*を分離した<sup>20,21)</sup>。この $\beta$ -lactamaseに対して、TAZは阻害活性を示さないが、TAZ/PIPCはPIPC同様感受性のままである<sup>20)</sup>。今回、このIPM分解性 $\beta$ -lactamase産生株(S-861株)によるポーチ内感染を惹起し、TAZ/PIPCの治療効果をCAZ, SBT/CPZと比較したところ、CAZ, SBT/CPZよりも優れた治療効果を認めた。この様なセフェム耐性*P. aeruginosa*に対し強い*in vitro*, *in vivo*抗菌活性を発揮することは、本剤の優れた特性の一つであろう。

以上、TAZ/PIPCはPIPC耐性菌にも有効で、その活性はセフェム剤に匹敵することが明らかとなった。

## 文 献

- 1) Higashidani F, Hyodo A, Ishida N, Inoue M, Mitsunashi S: Inhibition of  $\beta$ -lactamases by tazobactam and in-vitro antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. J Antimicrob Chemother 25: 567~574, 1990
- 2) Gutmann L, Kitzis M D, Yamabe S, Acar J F: Comparative evaluation of a new  $\beta$ -lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different  $\beta$ -lactam antibiotics against bacteria harboring known  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 29: 955~957, 1988
- 3) Jacobs M R, Aronoff S C, Johanning S, Shlaes D M, Yamabe S: Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR830, clavulanate, and sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined  $\beta$ -lactamase-producing aerobic gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 29: 980~985, 1986

- 4) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 853~857, 1980
- 6) Waley S G: A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. Biochem J 139: 780~781, 1974
- 7) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S: Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 382~385, 1980
- 8) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265~275, 1951
- 9) Selye H: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. Proc Soc Exp Biol Med 82: 328~333, 1953
- 10) 荒木春美, 大懸直子, 南 新三郎, 保田 隆, 渡辺泰雄: 誘導型  $\beta$ -lactamase産生菌共存時におけるcephem系薬剤の大腸菌に対する殺菌効果について。Chemotherapy 41: 755~764, 1993
- 11) 館野政也, 西田 亨子, 黒津幸雄, 保田 隆, 才川 勇: 実験的子宮内感染症ラットの作製とセファロsporin系薬剤による治療効果について。Chemotherapy 29: 68~75, 1981
- 12) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島瑳智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研究。Chemotherapy 30: 1237~1249, 1982
- 13) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀夫, 渡辺泰雄, 松原信之, 中川三千子, 金川心子: T-1220の吸収・排泄および体内分布。Chemotherapy 25: 801~809, 1977
- 14) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 渡辺泰雄, 清水喜八郎: cefoperazone (T-1551)の体液内濃度測定法について。Chemotherapy 28 (S-6): 157~162, 1980
- 15) 佐久間 昭: 薬効評価I。東大出版会, 東京, 1977
- 16) 工藤 肇, 武部和夫, 松本慶蔵: 第42回日本感染症学会東日本地方総会・第40回日本化学療法学会東日本地方総会合同学会。新薬シンポジウム。Tazobactam/Piperacillin (YP-14), 青森, 1993
- 17) Minami S, Matsubara N, Yotsuji A, Araki H, Watanabe Y, Yasuda T, Saikawa I, Mitsuhashi S: Induction of cephalosporinase production by various penicillins in *Enterobacteriaceae*. J Antibiotics 36: 1387~1395, 1983
- 18) Ellis C J: Indirect pathogenicity. J Antimicrob Chemother 6: 307~309, 1980
- 19) 上田 泰, 横田 健: 第30回日本化学療法学会総会。新薬シンポジウム。Sulbactam/cefoperazone, 東京, 1982
- 20) Minami S, Araki H, Yasuda T, Akama M, Iyobe S, Mitsuhashi S: High-level imipenem resistance associated with imipenem-hydrolyzing beta-lactamase production and outer membrane alteration in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Inter J Exp Clin Chemother 6: 21~28, 1993
- 21) 南 新三郎, 三橋 進: 同一病棟内より継続的に分離されたイミペネム分解性緑膿菌について。緑膿菌感染症の基礎と臨床(三橋 進, 熊本悦明, 島田 馨編)。ライフサイエンス・メディカ, 東京, 1993

*In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of tazobactam/piperacillin

Shinzaburo Minami, Harumi Araki, Hisashi Yamada, Kazuo Fujimaki, Seiki Okamoto, Rieko Kitayama, Yuki Myohara, Naoki Matsumura, Naoko Ogake, Taeko Horii, Junko Maehana, Takashi Yasuda, Yasuo Watanabe and Hirokazu Narita  
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.  
2-4-1 Shimo-okui Toyama-city, Toyama 930, Japan

We studied the  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of tazobactam (TAZ) and the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC). The following results were obtained.

1) TAZ inhibited various  $\beta$ -lactamases more effectively than sulbactam. A progressive inhibition of TAZ against cephalosporinases was observed.

2) TAZ/PIPC exhibited a broad spectrum of antibacterial activity and potent activity against aerobic and anaerobic bacteria.

3) TAZ enhanced the activity of PIPC against PIPC-resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* (methicillin-susceptible), *Staphylococcus epidermidis* (methicillin-susceptible), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Bacteroides fragilis*, and TAZ/PIPC was equally or more active than sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ), cefotiam and ceftazidime (CAZ) against *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* and *B. fragilis* resistant to PIPC.

4) The inducer activity of TAZ/PIPC for  $\beta$ -lactamase production was as low as that of PIPC.

5) TAZ/PIPC was more active than PIPC against rat pouch mixed infection caused by *E. coli* and penicillinase-producing *S. epidermidis*, rat intrauterine infection and mouse urinary tract infection caused by PIPC-resistant *E. coli*. TAZ/PIPC was more active than SBT/CPZ against rat pouch infection caused by *P. aeruginosa* highly resistant to CAZ.