

Tazobactam/Piperacillinの細菌学的研究

乗原(新井)京子
順天堂大学医学部細菌学教室*

横田 健
順天堂医療短期大学

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) の *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, β -streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R+), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* の 15~50 臨床分離株に対する MIC₈₀ は, それぞれ 12.5, 100, 6.25, 0.05, 0.39, 0.05, 6.25, >100, 12.5, 3.13, 0.78, 0.78, 3.13, 50, 50, 100, 25, 100, 6.25, >100, 25, 0.39 および 12.5 μ g/ml であった。TAZ/PIPC は, sulbactam/cefoperazon (SBT/CPZ) よりも streptococci, *K. pneumoniae*, および *P. cepacia* に対してやや優れた抗菌力を示したが, *A. calcoaceticus* に対する抗菌力は弱かった。TAZ/PIPC は, *S. aureus* の PBPs 2 と 3 に, *E. coli* の PBPs 1a, 1bs および 3 に対して結合親和力が強かった。TAZ は, 各種 β -lactamase に対する Ki 値が低く, SBT よりも Ic 型, III (TEM) 型 および IVb 型 に対して強い不活化力を示した。TAZ/PIPC の血清補体との協力作用は強く, マウス培養 macrophage (M ϕ) は 1/2MIC 以上の TAZ/PIPC 存在下で *E. coli* の生細胞をよく食菌消化した。

Key words : tazobactam/piperacillin PBPs, β -lactamase, 血清補体との協力作用, M ϕ との協力作用

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は penicillin 系抗生物質である PIPC に β -lactamase 阻害剤である TAZ を 4:1 の割合で配合した新しい注射用 penicillin 系抗生物質である。本剤の臨床効果を推定するための基礎資料を得るために, 試験管内抗菌力を測定するとともに, 作用点 PBPs に対する結合親和性, β -lactamase 不活化作用, 血清補体またはマウス培養 M ϕ との協力的殺菌作用等について検討した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

TAZ/PIPC は, 大鵬薬品から供与された。対照薬として, TAZ (大鵬薬品), PIPC (富山化学), ampicillin (ABPC: 萬有), cefuroxime (CXM: 日本グラクソ), sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC: ファイザー製薬), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ: ファイザー製薬), carbenicillin (CBPC: 藤沢薬品) および aztreonam (AZT: スクイブ・エーザイ) の純末を使用した。

2. 使用菌株

順天堂大学付属病院中央検査室および東京都老人研究所付属病院臨床検査室で 1985~1987 年に分離された 49 株の *Staphylococcus aureus*, 48 株の methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), 43 株の coagulase-negative staphylococci (CNS), 50 株の *Streptococcus pyogenes*, 15 株の β -streptococci, 20 株の *Streptococcus pneumoniae*, 39 株の *Enterococcus faecalis*, 42 株の *Enterococcus faecium*, 45 垂株の *Escherichia coli* CS2 (R+), 50 株の *Klebsiella pneumoniae*, 48 株の *Proteus mirabilis*, 35 株の *Proteus vulgaris*, 50 株の *Morganella morganii*, 27 株の *Providencia rettgeri*, 50 株の *Citrobacter freundii*, 50 株の *Serratia marcescens*, 50 株の *Enterobacter cloacae*, 50 株の *Pseudomonas aeruginosa*, 33 株の *Pseudomonas cepacia*, 48 株の *Xanthomonas maltophilia*, 27 株の *Acinetobacter calcoaceticus*, 15 株の ABPC 耐性 *Haemophilus influenzae* および 38 株の *Bacteroides fragilis* を被検菌とした。R 因

*〒113 東京都文京区本郷2-1-1

子保有 *E. coli* は、*E. coli* CS2 に順天堂大学付属病院中央検査室の臨床分離株から得られた45種類のR因子を当教室で接合伝達したものである。

PBPsの検討には教室保存の *S. aureus* 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* 13 および *A. calcoaceticus* 5株を使用した。

3. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定法

日本化学療法学会法¹⁾に準拠した平板希釈法で測定した。すなわちL-broth中で一夜振盪培養した菌体を、グラム陽性菌の場合は100倍に、グラム陰性菌の場合は1000倍に希釈し、これを 10^6 CFU/mlの接種菌液とした。ただし *S. pyogenes* にはHI-broth (Difco) を、*H. influenzae* には5% Fildes extract (Oxoid) 加HI-brothを使用した。*B. fragilis* はGAM broth (日水) で前培養した。*S. pneumoniae* の接種菌液は、血液平板上で一夜培養した集落をかきとり、HI-brothに吸光度0.5 (600nm) になるように懸濁し、これをHI-brothで100倍に希釈し接種菌液とした。2倍希釈系列にした濃度の薬剤を含有するMueller-Hinton (Difco) 寒天に、接種菌液をミクロプランター (佐久間製作所) でスポット接種し、37°C で一夜培養して菌の増殖の有無からMICを求めた。ただし *S. pyogenes* および *S. pneumoniae* には5% ヒツジ血液加HI寒天を、*H. influenzae* には5% Fildes extract加HI寒天を使用した。*B. fragilis* にはGAM寒天を使用し、ガスパック法 (BBL) で37°C 一夜嫌気培養して判定した。

4. 作用点ペニシリン結合蛋白質(PBPs)に対する結合親和性の検討

Sprattの方法²⁾を改変した著者等の方法で検討した。すなわち *S. aureus* 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* 13 および *A. calcoaceticus* 5の対数増殖期後期の菌を集め、10mM MgCl₂ 加0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁した。Branson sonifier (出力50W, 効率20%, 120秒×10回) で菌体を破碎し3,000xg, 15分間遠心で菌体を除いた後、その上清を100,000xg 30分超遠心して膜画分を集めた。同緩衝液で1回洗浄し10~15mg protein/mlになるように膜画分浮遊液を作製した。30 μ lの膜画分に終末濃度0.1~12.5 μ g/mlになるようにTAZ/PIPC, TAZまたはPIPCを加え、30°C 10分間反応後、3 μ lの¹⁴C-benzylpenicillin (PCG, 373 μ g/1.85 MBq/ml; Amersham)を加え、再度30°C 10分間反応させた。20% Sarkosylと60mg/ml PCGの等量混合液を添加して反応を止め、10,000xg, 30分間遠心して不溶画分を除いた。上清30 μ lにbromophenol blue加SDS緩衝液を15 μ lおよび5 μ lの β -mercaptoethanolを加え、100°C 2分間煮沸した後、その全量を10% acrylamide-

0.06% bis-acrylamideのスラブゲルにのせ、100Vで定電圧電気泳動した。ただし *S. aureus* には8% acrylamide-0.06% bis-acrylamideスラブゲルを使用した。メタノールと酢酸で蛋白を固定した後、dimethyl sulfoxide (DMSO) で脱水し、2,5-diphenyloxazoleをしみ込ませ、減圧下でゲルを乾燥した。乾燥したゲルとKodak X-Omatフィルムを密着し、-70°C 20日間感光させラジオオートグラフィイーを行なった。

5. β -lactamase不活化作用

Ia型およびIc型CEPaseはそれぞれ対数増殖期後期の *E. cloacae* Nek39 および *P. vulgaris* 33をBranson Sonifierで破碎し、100,000xg, 30分間遠心上清を粗酵素液とした。IIb, III (TEM), IVbおよびV型PCaseはそれぞれ *P. mirabilis* JY10, *E. coli* CS2/RK1, *K. pneumoniae* 42 および *E. coli* CS2/RE45の対数増殖期後期の菌体破碎液の超遠心上清を粗酵素液として使用した。

一時阻害作用は、PCase型酵素にはABPCを、CEPase型酵素にはcephaloridineを基質とし、acidometry法³⁾により、その分解を約50%阻害する各薬剤濃度をKi値としてLineweaver-Burk plotから算出した。また β -lactamase永久不活化作用は、Fisher⁴⁾による希釈法により検討した。すなわち約100単位/0.1mlの β -lactamase粗酵素液と0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に0.5~10 μ g/0.1mlになるように溶解した各薬剤を混合し、30°C 30分間反応させた後、残存酵素活性をmacroiodometryで測定した。

6. TAZ/PIPCと血清補体との協力的殺菌作用の検討

E. coli NIHJ JC-2をL-brothで37°C 一夜振盪培養した。新鮮L-broth 5mlに 10^5 CFU/mlになるよう菌液を希釈した。4本を一組みとし、1本を対照に、2本目にはこの菌の増殖に影響を及ぼさない最高量補体 (0.5 units/ml) と20%非働化ヒト血清を加えた。3本目には5時間後の生菌数が接種菌数と変わらないTAZ/PIPC (0.8 μ g/ml)を加え、4本目には補体とヒト血清に前者と同量のTAZ/PIPCを添加した。37°Cで振盪培養を続けながら、その0, 1, 3, 5および24時間後の生菌数を測定した。

7. マウス培養M ϕ との協力的食菌殺菌作用の検討

M ϕ はICR δ マウス腹腔内をSaline Gで洗って採取し、10% fetal calf serum加F12培地 (日水) に 10^5 cells/mlになるように浮遊した。その0.1mlをカバースリップを沈めたCorning multidish (24穴) に接種し著者等の方法で20% L-CM (conditioned medium of L-929)⁵⁾ を使用し活性化した。L-broth中にて一夜振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2をM ϕ の50倍量 (5×10^5 CFU/well)

接種し、終末濃度1~1/16MICになるようTAZ/PIPCを加えて培養した。*E. coli*感染5時間後にカバースリップを取出し、Saline Gで洗浄した後、メタノール固定してGiemsa染色を行い光学顕微鏡で観察した。

II. 成 績

1. TAZ/PIPCの試験管内抗菌力

TAZ/PIPCの試験管内抗菌力を23菌種15~50臨床

分離株に対し、TAZ, PIPC, ABPC, CXM, SBT/ABPC, SBT/CPZ, CBPCおよびAZTのそれと比較検討した(Table 1, 2)。

TAZ/PIPCの*S. aureus* 49株に対するMIC₈₀は12.5 µg/mlで、SBT/ABPCより1管劣ったがSBT/CPZより1管優れていた。MRSA 48株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は100 µg/mlで比較薬剤と同様ほとんど抗菌力

Table 1-1. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin against gram-positive clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotics	Range	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> (49)	tazobactam/piperacillin	0.78~100	3.13	12.5	25
	tazobactam	100~>100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.39~>100	6.25	100	>100
	ampicillin	0.1~100	1.56	25	50
	cefuroxime	0.78~>100	1.56	6.25	>100
	subactam/ampicillin	0.1~25	1.56	6.25	12.5
	subactam/cefoperazone	1.56~>100	6.25	25	100
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (48)	tazobactam/piperacillin	0.78~>100	25	100	100
	tazobactam	50~>100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.78~>100	100	>100	>100
	ampicillin	0.39~100	25	50	50
	cefuroxime	1.56~>100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	0.39~50	12.5	25	25
	subactam/cefoperazone	3.13~>100	25	100	>100
Coagulase-negative staphylococci (43)	tazobactam/piperacillin	<0.013~>100	1.56	6.25	50
	tazobactam	12.5~>100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.05~>100	3.13	25	>100
	ampicillin	<0.013~50	1.56	12.5	25
	cefuroxime	0.025~>100	3.13	12.5	100
	subactam/ampicillin	0.025~50	1.56	6.25	25
	subactam/cefoperazone	<0.013~>100	3.13	6.25	25
<i>Streptococcus pyogenes</i> (50)	tazobactam/piperacillin	<0.013~0.78	0.05	0.05	0.1
	tazobactam	6.25~100	50	50	50
	piperacillin	<0.013~0.05	0.05	0.05	0.05
	ampicillin	<0.013~0.2	<0.013	<0.013	0.025
	cefuroxime	<0.013~0.1	<0.013	0.025	0.1
	subactam/ampicillin	<0.013~0.39	0.025	0.025	0.025
	subactam/cefoperazone	0.1~1.56	0.2	0.2	0.39
β-streptococci (15)	tazobactam/piperacillin	0.05~0.39	0.2	0.39	0.39
	tazobactam	50~>100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.05~0.39	0.2	0.2	0.2
	ampicillin	<0.013~0.2	0.1	0.1	0.1
	cefuroxime	0.013~0.2	0.05	0.05	0.05
	subactam/ampicillin	0.025~0.2	0.1	0.2	0.2
	subactam/cefoperazone	0.39~1.56	0.39	0.39	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (20)	tazobactam/piperacillin	0.025~0.39	0.05	0.05	0.2
	tazobactam	12.5~100	12.5	25	50
	piperacillin	0.025~0.39	0.05	0.05	0.05
	ampicillin	0.05~0.39	0.05	0.05	0.05
	cefuroxime	0.025~0.2	0.05	0.05	0.1
	subactam/ampicillin	0.05~0.2	0.05	0.05	0.1
	subactam/cefoperazone	0.1~0.78	0.2	0.39	0.39

Table 1-2. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin against gram-positive clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotics	Range	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₉₀
<i>Enterococcus faecalis</i> (39)	tazobactam/piperacillin	3.13 ~ 6.25	3.13	6.25	6.25
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	3.13 ~ 6.25	3.13	3.13	6.25
	ampicillin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56	1.56
	cefuroxime	100 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13	3.13
	subactam/cefoperazone	50 ~ >100	50	100	100
<i>Enterococcus faecium</i> (42)	tazobactam/piperacillin	12.5 ~ >100	>100	>100	>100
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	6.25 ~ >100	>100	>100	>100
	ampicillin	0.78 ~ 100	100	100	100
	cefuroxime	100 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	1.56 ~ >100	100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	25 ~ >100	>100	>100	>100

Table 2-1. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin against gram-negative clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotics	Range	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₉₀
<i>Escherichia coli</i> CS2 (R+) (45)	tazobactam/piperacillin	0.39 ~ >100	3.13	12.5	50
	tazobactam	100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.78 ~ >100	50	>100	>100
	ampicillin	12.5 ~ >100	50	>100	>100
	cefuroxime	0.78 ~ >100	3.13	6.25	12.5
	subactam/ampicillin	3.13 ~ >100	25	100	>100
	subactam/cefoperazone	0.05 ~ >100	1.56	6.25	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (50)	tazobactam/piperacillin	0.78 ~ 25	3.23	3.13	6.25
	tazobactam	100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.39 ~ >100	0.39	50	100
	ampicillin	0.39 ~ >100	25	>100	>100
	cefuroxime	0.2 ~ >100	3.13	12.5	>100
	subactam/ampicillin	0.78 ~ >100	6.25	25	25
	subactam/cefoperazone	0.025 ~ 50	0.39	6.25	6.25
<i>Proteus mirabilis</i> (48)	tazobactam/piperacillin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78	0.78
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.1 ~ 12.5	0.39	0.39	6.25
	ampicillin	0.39 ~ >100	1.56	1.56	>100
	cefuroxime	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56	1.56
	subactam/ampicillin	1.56 ~ 25	1.56	3.13	12.5
	subactam/cefoperazone	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> (35)	tazobactam/piperacillin	0.2 ~ 1.56	0.78	0.78	1.56
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.2 ~ 50	0.78	1.56	3.13
	ampicillin	50 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	3.13 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	3.13 ~ >100	12.5	12.5	25
	subactam/cefoperazone	0.78 ~ 1.56	1.56	3.13	3.13

を示さなかった。CNS 43株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は6.25 μ g/mlでSBT/ABPCおよびSBT/CPZと同等であった。S. pyogenes50株に対するTAZ/PIPCの抗菌力は強く、そのMIC₈₀は0.05 μ g/mlでSBT/CPZより優れていたが、SBT/ABPC、CXMおよびABPCより劣

っていた。 β -streptococci 15株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は0.39 μ g/mlでPIPC、ABPC、CXMおよびSBT/ABPCより劣ったがSBT/CPZと同等であった。S. pneumoniae20株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は0.05 μ g/mlでSBT/CPZより優れていたが、PIPC、ABPC、CXM

Table 2-2. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin against gram-negative clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotics	Range	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₉₀
<i>Morganella morganii</i> (50)	tazobactam/piperacillin	0.2 ~ 12.5	0.78	3.13	12.5
	tazobactam	100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.2 ~ >100	1.56	25	50
	ampicillin	12.5 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	3.13 ~ >100	50	100	100
	subactam/ampicillin	3.13 ~ 100	25	50	50
	subactam/cefoperazone	0.39 ~ 25	1.56	6.25	12.5
<i>Providencia rettgeri</i> (27)	tazobactam/piperacillin	0.39 ~ 50	3.13	50	50
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.2 ~ >100	12.5	>100	>100
	ampicillin	0.78 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	<0.013 ~ 100	50	50	100
	subactam/ampicillin	1.56 ~ >100	100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	0.39 ~ 50	12.5	25	25
<i>Citrobacter freundii</i> (50)	tazobactam/piperacillin	1.56 ~ >100	12.5	50	100
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.78 ~ >100	12.5	100	>100
	ampicillin	12.5 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	1.56 ~ >100	50	>100	>100
	subactam/ampicillin	3.13 ~ >100	50	>100	>100
	subactam/cefoperazone	0.39 ~ >100	25	50	100
<i>Enterobacter cloacae</i> (50)	tazobactam/piperacillin	1.56 ~ 100	25	100	100
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	25 ~ >100	50	>100	>100
	ampicillin	25 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	3.13 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	25 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	0.2 ~ >100	25	100	100
<i>Serratia marcescens</i> (50)	tazobactam/piperacillin	0.78 ~ >100	3.13	25	100
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.78 ~ >100	3.13	100	>100
	ampicillin	6.25 ~ >100	100	>100	>100
	cefuroxime	12.5 ~ >100	100	>100	>100
	subactam/ampicillin	6.25 ~ >100	50	>100	>100
	subactam/cefoperazone	0.78 ~ >100	3.13	>50	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (50)	tazobactam/piperacillin	3.13 ~ >100	12.5	100	100
	tazobactam	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	3.13 ~ >100	6.25	100	>100
	ampicillin	100 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	100 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	100 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	6.25 ~ >100	25	50	100
	carbenicillin	6.25 ~ >100	100	>100	>100
	aztreonam	1.56 ~ 50	6.25	12.5	25

およびSBT/ABPCと同等であった。*E. faecalis* 39株に対する MIC₈₀はABPCが1.56 μ g/mlと最も優れ、TAZ/PIPCのMIC₈₀は6.25 μ g/mlでPIPCおよびSBT/ABPCの次に良かった。*E. faecium* 42株に対するTAZ/PIPCの抗菌力は他の比較薬剤と同様にほとんど抗菌力を示さなかった。

R (bla) plasmidを保有する*E. coli* CS2 45亜株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は、12.5 μ g/mlでSBT/ABPCより優れていたがCXMおよびSBT/CPZより1管劣った。*K. pneumoniae* 50株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は3.13 μ g/mlで、比較薬剤中最も優れていた。*P. mirabilis* 48株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は0.78 μ g/mlでPIPCに次いで優れていた。*P. vulgaris* 35株および*M. morga-*

nii 50株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は0.78 μ g/mlおよび3.13 μ g/mlで比較薬剤中最も優れていた。*P. rettgeri* 27株および*C. freundii* 50株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は、50 μ g/mlで他の比較薬剤と変わらなかった。*E. cloacae*に対するMIC₈₀も100 μ g/mlで他の比較薬剤と同様に抗菌力は弱かった。*S. marcescens* 50株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は比較薬剤中最も良かったが25 μ g/mlとその抗菌力は強くなかった。*P. aeruginosa* 50株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は100 μ g/mlで他の比較薬剤同様抗菌力は弱かった。*P. cepacia* 33株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は6.25 μ g/mlで比較薬剤中最も優れ、PIPCと同等であった。*X. maltophilia* 48株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は>100 μ g/mlで、比較薬剤と同

Table 2-3. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin against gram-negative clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotics	Range	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₉₀
<i>Pseudomonas cepacia</i> (33)	tazobactam/piperacillin	1.56 ~ 50	6.25	6.25	12.5
	tazobactam	12.5 ~ >100	25	50	50
	piperacillin	3.13 ~ 100	3.13	6.25	12.5
	ampicillin	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	12.5 ~ >100	12.5	25	50
	subactam/ampicillin	>100 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	12.5 ~ 100	25	50	50
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (48)	tazobactam/piperacillin	1.56 ~ >100	25	>100	>100
	tazobactam	100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	1.56 ~ >100	100	>100	>100
	ampicillin	25 ~ >100	>100	>100	>100
	cefuroxime	50 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/ampicillin	12.5 ~ >100	>100	>100	>100
	subactam/cefoperazone	1.56 ~ >100	25	50	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (27)	tazobactam/piperacillin	<0.013 ~ >100	12.5	25	50
	tazobactam	0.39 ~ >100	6.25	12.5	25
	piperacillin	0.2 ~ >100	12.5	>100	>100
	ampicillin	0.78 ~ >100	50	>100	>100
	cefuroxime	6.25 ~ >100	25	>100	>100
	subactam/ampicillin	0.05 ~ 50	6.25	6.25	12.5
	subactam/cefoperazone	0.1 ~ 6.25	1.56	3.13	3.13
Ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> (15)	tazobactam/piperacillin	0.1 ~ 0.39	0.39	0.39	0.39
	tazobactam	100 ~ >100	>100	>100	>100
	piperacillin	0.78 ~ 100	6.25	6.25	6.25
	ampicillin	3.13 ~ 50	6.25	12.5	12.5
	cefuroxime	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56	1.56
	subactam/ampicillin	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56	1.56
	subactam/cefoperazone	0.05 ~ 0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Bacteroides fragilis</i> (38)	tazobactam/piperacillin	0.78 ~ 25	1.56	12.5	12.5
	tazobactam	3.13 ~ 25	6.25	12.5	12.5
	piperacillin	0.78 ~ >100	3.13	50	>100
	ampicillin	3.13 ~ >100	12.5	>100	>100
	cefuroxime	3.13 ~ >100	6.25	>100	>100
	subactam/ampicillin	0.78 ~ 25	1.56	6.25	12.5
	subactam/cefoperazone	1.56 ~ 50	6.25	6.25	12.5

様抗菌力は弱かった。*A. calcoaceticus* 27株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は25 μ g/mlでPIPC, ABPCおよびCXMより優れていたがTAZ, SBT/ABPCおよびSBT/CPZより劣った。ABPC耐性*H. influenzae* 15株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は0.39 μ g/mlと強く, SBT/CPZに次いで優れていた。

嫌気性菌の*B. fragilis* 38株に対するTAZ/PIPCのMIC₈₀は12.5 μ g/mlでSBT/ABPCおよびSBT/CPZより1管劣った。

2. TAZ/PIPCの作用点ペニシリン結合蛋白に対する親和性

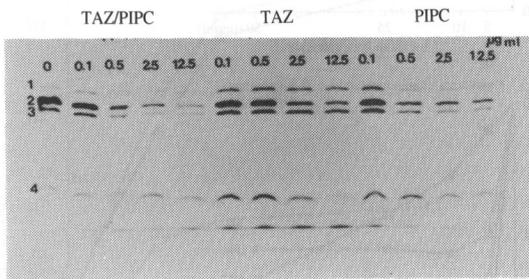
S. aureus 209Pの主要PBPsに対するTAZ/PIPCの結合親和性をTAZおよびPIPCのそれと比較するとFig. 1aのとおりTAZ/PIPCはPBP2, 3に対する結合親和性が強く, その強さはPIPCと同等であった。*E. coli* NIHJ JC-2のPBPに対してはPIPCと同様に1a, 1bsおよび3に強い親和性を示した。(Fig. 1b)。*S. marcescens* 13に対するTAZ/PIPCの結合親和性はPBP3, 2, 1a, 1b

の順に強く, その強さはPIPCと変わらなかった(Fig. 1c)。*A. calcoaceticus* 5に対するTAZ/PIPCの結合親和性はFig. 1dのごとくPBP2, 3および1aに強く結合し, その強さはPIPCと同程度であった。またTAZもTAZ/PIPCより若干弱いPBP2, 3および1aに結合親和性がみられた。

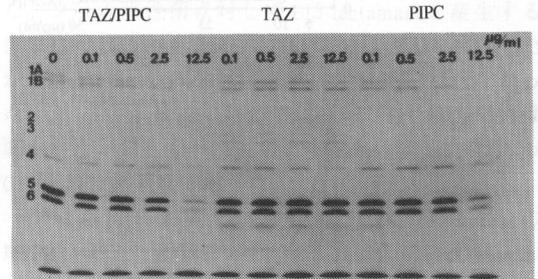
3. 各種 β -lactamaseに対するTAZの不活化作用

TAZの各種 β -lactamaseに対する一時阻害力を, Ki値としてSBT, clavulanic acid (CVA)およびimipenem (IPM)と比較するとTable 3のごとく, TAZはRichmond分類のIIbおよびVa型に対してはCVAと同程度のKi値を示したがそれ以外の β -lactamaseに対するTAZのKi値はSBTおよびCVAよりはるかに小さかった。

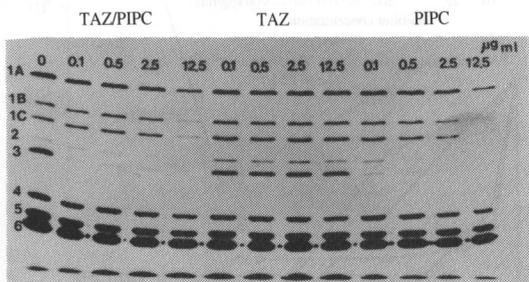
TAZの β -lactamaseに対する永久, 半永久不活化作用をFisherの方法でSBT, CVAおよびIPMと比較するとFig. 2aのごとくIa型に対してはTAZが最も強い不活化作用を示した。Ic型に対する不活化作用も強くCVAの次によかった(Fig. 2b)。IIb型に対する不活化作用



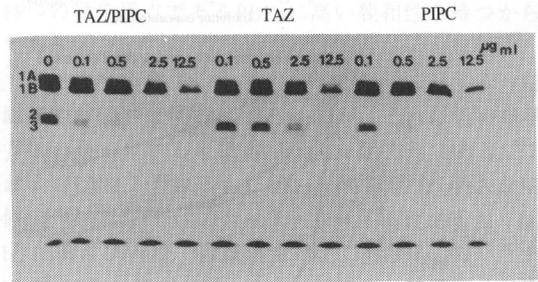
a) *S. aureus* 209P



b) *E. coli* NIHJ JC-2



c) *S. marcescens* 13



d) *A. calcoaceticus* 5

Fig. 1. Competition of tazobactam/piperacillin, tazobactam and piperacillin for penicillin-binding proteins.

TAZ/PIPC : tazobactam/piperacillin, TAZ : tazobactam, PIPC : piperacillin

Table 3. K_i values of tazobactam and other antibiotics against various β -lactamases

β -lactamase			K_i (μ M)			
Richmond	Mitsuhashi & Yamaguchi	Source	TAZ	SBT	CVA	IPM
Ia	CEPase	<i>E. cloacae</i> Nek 39	2.3	496	78.3	0.14
Ic	CEPase	<i>P. vulgaris</i> 33	0.035	0.53	1.52	0.16
IIb		<i>P. mirabilis</i> JY10	0.097	0.089	0.41	8.47
III	PCase I	<i>E. coli</i> CS2 (RK1)	0.044	0.30	0.69	2.30
IVb		<i>Klebsiella</i> 42	0.019	0.26	0.96	1.38
Va	PCase II	<i>E. coli</i> CS2 (RE45)	13.5	12.5	32.8	4.13

TAZ: tazobactam SBT: sulbactam CVA: clavulanic acid IPM: imipenem

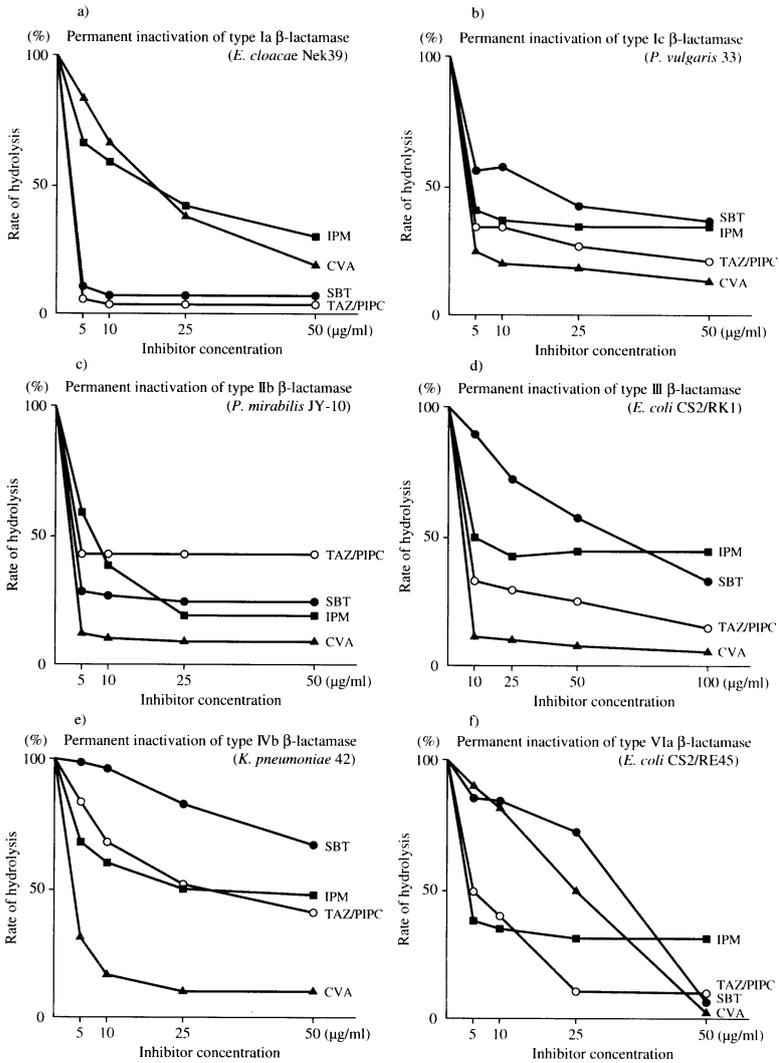


Fig. 2. Permanent inactivation of the various types of β -lactamases by tazobactam and others.

IPM : imipenem, CVA : clavulanic acid, SBT : sulbactam,
TAZ/PIPC : tazobactam/piperacillin

は比較薬剤中最も弱くその加水分解率は約50%にとどまった(Fig. 2c)。III型に対するTAZの不活化作用はIPMおよびSBTより強かったがCVAより若干弱かった(Fig. 2d)。IVb型に対してはCVAが最も強くTAZはIPMと同程度でSBTよりその不活化作用は強かった(Fig. 2e)。Va型に対しても強い不活化作用を示し、低濃度でSBTおよびCVAよりはるかに強い不活化作用を示した(Fig. 2f)。

4. TAZ/PIPCと血清補体との協力的殺菌作用

E. coli NIHJ JC-2の増殖に影響を与えない最高の補体量(0.5units/ml)とヒト血清に5時間後の生菌数が接種菌数と変わらないTAZ/PIPC(0.8 μ g/ml)を共存させると、Fig. 3のとおり薬剤単独よりその生菌数は、5時間後には約1/1000に減少した。24時間後には再増殖がみられたが 10^3 CFU/mlにとどまり、強い協力作

用がみられた。

5. TAZ/PIPCとマウス培養M ϕ との協力食菌殺菌作用

E. coli NIHJ JC-2を活性化したマウス培養M ϕ に感染させ、5時間後にはFig. 4aのごとく食菌された菌細胞はM ϕ 内で増殖し、M ϕ を破壊して遊出する像が見られた。これに対し1 MIC(1.56 μ g/ml)のTAZ/PIPCが共存するとFig. 4bのとおりフィラメント化した菌体はよく食菌消化され、大きな食空胞が認められた。TAZ/PIPC 1/2MIC存在下でもFig. 4cのごとくフィラメント化した細胞をよく食菌消化していた。

Ⅲ. 考 察

TAZ/PIPCはTAZを配合することにより β -lactamaseを産生する*S. aureus*およびCNSに対してPIPCよりも強い抗菌活性を示すようになり、SBT/ABPCより1管程劣ったがSBT/CPZより優れていた。*Streptococcus*属の菌に対しては強い抗菌活性を示しSBT/CPZより優れていたがPIPC単独と変わらなかった。*E. faecalis*に対してもPIPCと同程度でABPCおよびSBT/ABPCより1~2管劣ったがセフェム系抗生物質よりはるかに優れていた。グラム陰性菌に対しても β -lactamaseを産生する菌株に対し、TAZ/PIPCはPIPCより抗菌力を増強したが、*Pseudomonas*属には特にその差は見いだせなかった。*A. calcoaceticus*に対してはTAZ/PIPCの抗菌力は弱かったがおしなべて見ると本薬剤の抗菌力はSBT/CPZとはほぼ同程度であった。

作用点PBP_sに対してTAZ/PIPCは、*S. aureus*のPBP2および3、*E. coli*のPBP1a、1bsおよび3、*S. marcescens*の1b、1cおよび3、*A. calcoaceticus*のPBP1a、2および3に対して強い親和性があったが、PIPCとの差は特になかった。TAZが*A. calcoaceticus*に対して抗菌力を持つのは作用点であるPBP_sに高い親和性を持つからである。

TAZはIIb型およびVa型の β -lactamaseに対する一時阻害力はCVAと同程度であったが、それ以外の各種 β -lactamaseに対しては β -lactamase阻害剤であるSBTおよびCVAよりはるかに強い一時阻害力(小さなKi値)を示した。TAZの半永久~永久不活化力も強くIa、Ic、IIIおよびVa型では低濃度でよく不活化していたがIIbおよびIVb型では弱かった。このTAZの効果は各種R (bla) plasmidを保有する*E. coli* CS2 (R+)およびABPC耐性*H. influenzae*において顕著に現われた。 β -lactamaseを産生する*K. pneumoniae*、*P. mirabilis*、*P. vulgaris*、*M. morgani*、*A. calcoaceticus*および*B. fragilis*ではPIPC単独では高度耐性株が目立ったが、TAZ/PIPCではそれら耐性部分が感受性側にシフトし、良好な抗菌

Synergy of bactericidal effect with serum complement

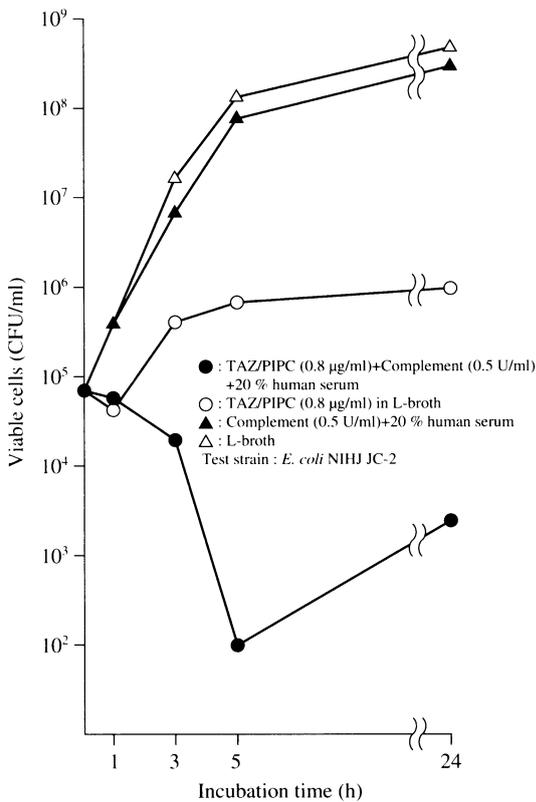
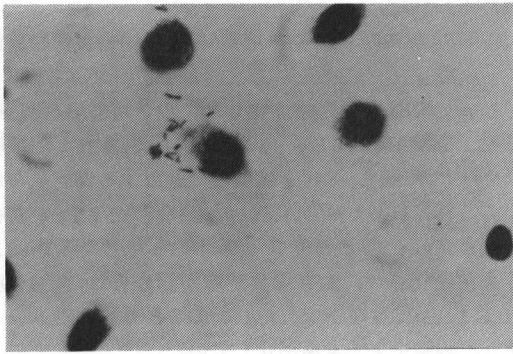
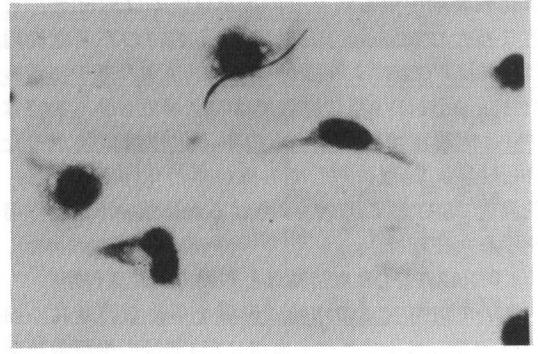


Fig. 3. Influence of ID₅₀ (0.8 μ g/ml) on the bactericidal effect of serum complement of *Escherichia coli* NIHJ JC-2.

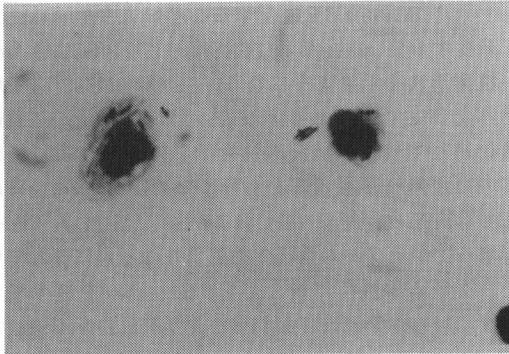
TAZ : tazobactam, PIPC : piperacillin



a) Control



b) 1 MIC



c) 1/2 MIC

Fig. 4. Phagocytosis of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 by mouse cultured macrophages in the absence of tazobactam/piperacillin or presence of 1-1/2 MIC of tazobactam/piperacillin.

力を示した。この効果も TAZ を配合した結果と考えられた。血清補体との協力作用が強いので、その体内動態が良ければ PIPC でカバーできなかった β -lactamase 産生株にも効果の期待できる優れた注射剤となるであろう。

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: 76~79, 1981
- 2) Spratt R G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K12. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2999~3003, 1975
- 3) Rubin F, Smith A and Smith D F: Characteriza-

tion of R factor β -lactamase by the acidometric method. Antimicrob Agents Chemother 3: 68~73, 1973

- 4) Fisher J, Charnas R C, Knowles J R: Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* R TEM β -lactamase by clavulanic acid. Biochemistry 17: 2180~2184, 1978
- 5) Nozawa R T and Yokota T: Inhibition by glucocorticoids and choeragen of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of newborn hamster liver and lung (Hormonal control of macrophage growth). Cell Physiol 100: 351~364, 1979

Tazobactam/piperacillin, its *in vitro* antibacterial activity

Kyoko Kuwahara (Arai)

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University,
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113, Japan

Takeshi Yokota

Juntendo Medical College of Nursing

The 80% minimum inhibitory concentrations (MIC₈₀) of tazobactam/ piperacillin (TAZ/PIPC) against 15 to 50 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, β -streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 carrying various R (bla) plasmids, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and *Bacteroides fragilis* were 12.5, 100, 6.25, 0.05, 0.39, 0.05, 6.25, >100, 12.5, 3.13, 0.78, 0.78, 3.13, 50, 50, 100, 25, 100, 6.25, >100, 25, 0.39 and 12.5 μ g/ml, respectively. TAZ/PIPC manifested slightly stronger activity against streptococci, *K. pneumoniae* and *P. cepacia* than sulbactam/cefoperazone, but was weaker against *Acinetobacter* and *B. fragilis*. TAZ/PIPC showed good binding affinities to PBPs 2 and 3 of *S. aureus*, PBPs 1a, 1b, and 3 of *E. coli*, and PBPs 1a, 2 and 3 of *A. calcoaceticus*. TAZ showed smaller Ki values to all types of β -lactamase, and slightly stronger inactivation for type Ic, III (TEM) and IVb β -lactamase than sulbactam. Mouse cultured macrophages readily engulfed *E. coli* living cells and digested them rapidly in the presence of more than 1/2 MIC of TAZ/PIPC.