

Tazobactam/Piperacillinの嫌気性菌に対する *in vitro* および *in vivo* 抗菌力およびマウス盲腸内細菌叢への影響

渡辺邦友・田中保知・加藤直樹・田中香おり・加藤はる・上野一恵

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

Tazobactam (TAZ)/piperacillin (PIPC) の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌力を参考菌株および臨床分離株238株を用いて検討した。TAZ/PIPCは β -lactamase産生性でPIPCに耐性の株を含む*Bacteroides fragilis*および*Prevotella bivia*に優れた抗菌力を示し、*Peptostreptococcus* spp. などPIPCに対して本来感性を示す菌種に対しても強い活性を保持していた。*B. fragilis* GAI 0558, 7955, 10150と*P. bivia* ATCC 29303, GAI-4100の β -lactamase活性はTAZにより強く阻害された。

次に β -lactamaseを産生しPIPCに耐性を示す*B. fragilis* 2株とPIPCに感性の*Escherichia coli* または*Enterococcus faecalis*のそれぞれ1株を用いた2種の混合菌による腹腔内膿瘍モデルを用い、TAZ/PIPCの膿瘍形成阻止効果を検討した。*B. fragilis*と*E. faecalis*による膿瘍形成に対し、PIPC単独投与群ではPIPC耐性の*B. fragilis* (MIC: 100 μ g/ml), PIPC感性の*E. faecalis* (MIC: 3.13 μ g/ml)ともに菌数減少効果は見られなかったが、TAZ/PIPC投与群では有意な菌数減少が見られた。さらに*B. fragilis* (MIC: 100 μ g/ml)と*E. coli* (MIC: 1.56 μ g/ml)による膿瘍形成に対して、PIPC単独投与群はPIPC感性の*E. coli*の菌数のみが増加したが、TAZ/PIPC投与群では両菌種ともに菌数の有意な減少が見られた。感染マウスを用いたPIPC単独投与とTAZ/PIPC投与時の膿瘍ホモジネート中のPIPC濃度の推移はTAZ/PIPC投与群でPIPC単独投与の場合より高いレベルを維持して推移した。PIPCとTAZの併用による効果が、マウス膿瘍モデルにおいても確かめられた。

TAZ/PIPCおよびPIPCの1日40mg/kgの5日間の皮下投与は、いずれもマウス盲腸内での*Clostridium difficile*の増殖を誘導した。

Key words : tazobactam/piperacillin, *Bacteroides fragilis*, β -lactamase inhibitor, マウス実験的腹腔内膿瘍モデル, マウス盲腸内細菌叢

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は、piperacillin (PIPC) と新しい β -lactamase阻害剤であるtazobactam (TAZ)を4:1の割合で配合した新しい注射用化学療法薬である。TAZは嫌気性菌、特に*Bacteroides fragilis* groupの産生する β -lactamaseを阻害することがすでに報告されており^{1,2)}、PIPC耐性株を含む*B. fragilis* groupに対する抗菌力の増強が明らかとなっている^{3,4)}。

著者らはTAZ/PIPCの嫌気性菌に対する抗菌力をPIPC単薬と比較するとともに、同じ系統の薬剤であるclavulanic acid/ticarcillin (CVA/TIPC), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) およびcefotiamとの比較検討を行った。また、*B. fragilis*と*Escherichia coli*および*Enterococcus faecalis*の混合接種により作製したマウス腹腔内膿瘍モデルを用いて、本薬剤の有用性を*in vivo*で明らかにするとともにマウス盲腸内細菌叢への影

響、特に*Clostridium difficile*増殖の誘導能についても検討した。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

Table 1に示す研究室保存の代表参考菌株およびAmerican Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Type Culture (NCTC) およびVirginia Polytechnic Institute (VPI)由来の参考菌株と当研究室で臨床材料から昭和58年度以降に分離した嫌気性菌を用いた。臨床分離株の同定は、PRAS II media (Scott, USA)を用いる生化学的性状とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析からVPI manual第4版に従い行った⁵⁾。一部の菌株の同定はRap ID ANA system (IDS, USA)を用いた数値同定とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸

*〒500 岐阜市司町40

の分析結果を基にして行った。これらの菌株は20% スキムミルクを保護剤として-80℃で保存した。

2. 供試薬剤

Piperacillin (PIPC) および tazobactam (TAZ) の原末を用いた。PIPCは富山化学工業株式会社から、TAZおよび tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は大鵬薬品工業株式会社から分与された。In vitro 抗菌力試験の対照薬剤として cefotiam (CTM), CVA/TIPC, SBT/CPZ も用いた。いずれも力価の明らかなものを使用した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

寒天平板希釈法によって測定した^{6,7)}。嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムの検討には感受性測定用培地として5%ウサギ溶血血液添加 Brucella HK 寒天 (極東製薬) を用いた。臨床分離株に対する MIC 測定には GAM 寒天培地 (日水製薬) を用いた。嫌気性培養は anaerobic glove box (平沢製作所 東京) (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%) で2日間行った。

好気性菌の MIC は Mueller Hinton II agar (BBL) を用いる寒天平板希釈法により測定した。

4. 臨床分離株に対する抗菌作用

B. fragilis 66株, *Bacteroides thetaiotaomicron* 21株, *Prevotella bivia* 25株, *Peptostreptococcus magnus* 38株, *Peptostreptococcus anaerobius* 20株, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 27株を用いた。これらは昭和61年度分離株である。

5. PIPC の *B. fragilis* に対する抗菌作用に及ぼす TAZ の濃度の影響

昭和55年分離の *B. fragilis* group 85株を用いて検討した。TAZの濃度を0.25 μ g/ml から5 μ g/ml と変化させて感受性測定用培地に加え、PIPCに対する感受性の変化を検討した。

6. *B. fragilis* および *P. bivia* の β -lactamase に対する各種阻害剤の影響

B. fragilis GAI-0558, 7944, 10150, および30144 の β -lactamase および *P. bivia* GAI4100 および ATCC 29303 の培養液を8000rpm 15分間の遠心分離により集菌, 続けて0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で2回洗浄した。この菌体を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0), (GAI-30144の場合はMOPS-KOH緩衝液 (pH7.2)) に懸濁し, 超音波処理した後, 10,000rpm で10分間遠心分離し, その上清を粗酵素液とし用いた。 β -lactamase 活性は, 坂東らの方法により行った⁸⁾。 β -lactamase (約12m unit) をTAZ (2 μ M) で30℃10分間処理した後, cephaloridine の添加により反応を開始させ, 残存活性を測定した。阻害剤として clavulanic acid (CVA) および sulbactam (SBT) も用いた。

7. TAZ/PIPC のマウス腹腔内膿瘍モデルに対する効果

1) 使用菌株

B. fragilis 10-20 および GAI-0558, *Enterococcus faecalis* K-1, *E. coli* 31053 を用いた。*E. coli* 31053 は大鵬薬品工業株式会社より分与された。これらの菌株はスキムミルク中で凍結保存された。

2) マウス

マウスは C57BL/6Jc1, 6~7週齢雄 (体重18~23g) (日本クレア) を用いた。

3) 抗菌薬とその投与方法

投与量は Freireich らの報告を参考にしてヒトの常用量を投与した場合に得られる血清中濃度のピーク値に近い値がマウスで得られるように設定し, 非感染マウスを用いて, その体内動態を確認した⁹⁾。

PIPC 250mg/kg の1回皮下投与および PIPC 250mg/kg + TAZ 62.5mg/kg の正常マウスへの1回皮下投与の際の血清中および膿瘍ホモジネート中の PIPC および TAZ の濃度は以下のごとくであった。即ち PIPC 250mg/kg 投与時の PIPC の Cmax は0.15時間後で 134.3 $\pm$ 27.8 μ g/ml, TAZ/PIPC 312.5mg/kg 投与時の PIPC および TAZ の Cmax はそれぞれ 0.184, 0.166時間後で 128.3 $\pm$ 18.5, 58.5 $\pm$ 6.7 μ g/ml であった。投与ルートは皮下投与, 投与回数は1日4回とした。

Bartlett らの報告を参考にして, 菌接種1時間後直ちに投薬を開始する早期投薬開始と1日以上経過してから投薬を開始する投薬開始遅延群の2群を設定した¹⁰⁾。即ち, *B. fragilis* と *E. faecalis* 接種の場合には, 早期投薬開始群で8回, 投薬開始遅延群で10回の投薬を行った。*B. fragilis* と *E. coli* 接種の場合にはいずれも12回の投薬を行った。

4) マウス腹腔内感染モデル

感染モデルは田中らの方法に準じて実施した¹¹⁾。接種菌液作製に当たっては Autoclaved caecal content (ACC) または Autoclaved bran suspension (ABS) をアジュバントとして用いた。ACC の作製は田中らに従い, ABS は細かく粉碎した200mg の市販の Bran を Anaerobe broth (Difco) 10ml とよく混合し, 二重のガーゼを通した後 121℃15分のオートクレーブ処理を行い作製した。

5) 効果の判定

規定の薬剤投与を行った後, エーテル麻酔下にて屠殺し, 解剖により腹腔内膿瘍の有無を検索した。得られた膿瘍の細菌学的検索を実施した。膿瘍は切開を加えてガラス玉とともに強くボルテックスをかける方法あるいはガラスホモジナイザーを用いて乳状とする方

法のいずれかを採用し、型の如く定量培養法を実施した。これらの方法での検出限界は100 cfu/abscessである。*B. fragilis*と*E. faecalis*の混合感染の場合には、各マウスから回収される膿瘍をそれぞれ1個あたりの細菌数を別個に、*B. fragilis*と*E. coli*の混合感染の場合にはマウス1匹から回収される膿瘍を一塊にして細菌数を算出した。嫌気性菌用にはGAM寒天培地、ゲンタミシン加GAM寒天培地(日水製薬)を好気性菌用には、BHI寒天または5%羊血液寒天培地を用いた。

8. 血清中および膿瘍ホモジネート中のPIPCおよびTAZ濃度の測定

*B. fragilis*と*E. faecalis*の 10^8 cfu/mlの菌液を作成し、必要に応じて希釈した後、1:1で混合し、さらに等量のACCまたはABSと混合、その0.1~0.2mlをマウス(C57BL/6J Male, 6週齢, 体重20g)の腹腔内に接種し、膿瘍形成を促した。膿瘍が完成する時期(菌液接種後5日目)に、TAZ/PIPCおよびPIPCの250 mg/kgを1回皮下投与し、15分, 30分, 60分, 120分後に血清と膿瘍を採取した。薬剤濃度分析まで-70℃の超低温

庫内で保存した。薬剤濃度の測定は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法にて行った。つまり血清0.5mlに蒸留水0.5mlおよび1N HCl 0.5mlを混和し、酢酸エチル5mlを加え10分振盪、遠心分離(3000rpm, 4℃, 10分)した。得られた酢酸エチル層に、内部標準液1.0ml(25 μ g)を添加し、さらに遠心分離を行った後、得られた水層にクロロホルム4mlを添加し、10分振盪後遠心分離し、その上清の25 μ lをHPLCに注入した。

HPLCの条件はカラム: Inertsil ODS-2, 5 μ m, 150×4.6mm i.d., カラム温度: 40℃, 移動相: CH₃CN/10 mM Phosphate buffer solution (pH5.5), 3% CH₃CN (3 min)→1%/min linear GRE for plasma, 流速: 1.5ml/minとした。検出器は、UV-220nm 0.04a.u.f.s.とした。定量限界はTAZで0.2 μ g/ml, PIPCで0.2 μ g/mlであった。これらは、大鵬薬品工業研究室に依頼した。

9. マウス盲腸内細菌叢への影響

1群3~5匹のマウス(ICR系, 雄, 20g)を用いた。薬剤1回投与量は20mg/kgとし、1日2回, 5日間連続皮下投与した。TAZ/PIPCとPIPC投与群で比較した。

Table 1. Antibacterial spectrum of tazobactam/piperacillin against gram-negative anaerobic bacteria compared with other agents

Organism	MIC (μ g/ml)					
	TAZ/PIPC	PIPC	CTM	CVA/TIPC	SBT/CPZ	TAZ
<i>Bacteroides</i>						
<i>B. fragilis</i> GAI 5562	1.56	6.25	25	0.78	3.13	6.25
<i>B. fragilis</i> GAI 0558	6.25	100	>100	6.25	12.5	6.25
<i>B. vulgatus</i> ATCC8482	6.25	6.25	12.5	0.10	6.25	12.5
<i>B. distasonis</i> ATCC 8503	0.39	0.39	6.25	1.56	1.56	25
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	25	50	>100	3.13	25	25
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	25	100	100	3.13	12.5	25
<i>B. uniformis</i> GAI 5466	0.78	3.13	12.5	0.78	3.13	6.25
<i>B. eggerthii</i> ATCC 27754	1.56	3.13	1.56	0.10	6.25	6.25
<i>B. gracilis</i> GAI 10428	50	100	3.13	6.25	6.25	12.5
<i>Prevotella</i>						
<i>P. oris</i> ATCC 33575	3.13	6.25	0.78	0.20	1.56	0.78
<i>P. oralis</i> ATCC 33269	3.13	6.25	1.56	0.10	3.13	0.78
<i>P. bivia</i> ATCC 29303	3.13	100	>100	1.56	3.13	0.78
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	0.78	0.78	0.20	0.10	0.78	3.13
<i>Fusobacterium</i>						
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	0.05	0.05	0.39	0.10	0.10	12.5
<i>F. varium</i> ATCC 8501	12.5	12.5	3.13	1.56	6.25	>100
<i>Desulfomonas</i>						
<i>D. pigra</i> DSA 749	100	100	50	3.13	3.13	25
<i>Veillonella</i>						
<i>V. parvula</i> ATCC 10790	12.5	50	0.39	1.56	3.13	25

* MICs were determined on Brucella HK blood agar containing serially two-fold diluted drugs, with approximately 10^5 cfu per spot.

Plates were read after 36 h incubation at 37°C.

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, PIPC: piperacillin, CTM: cefotiam, CVA/TIPC: clavulanic acid/ticarcillin, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, TAZ: tazobactam

投与終了1日目および7日目にマウス盲腸内の*C. difficile*の菌数を、*C. difficile*の選択培地であるCycloserine-cefoxitin mannitol agar (CCMA)培地を用いる定量培養法で測定した。定量培養の操作はすべて嫌気チェンバー内で行った。

10. 統計的処理
2標本t検定またはMann-Whitney testを用いた。

II. 結 果

1. TAZ/PIPCの抗菌スペクトル
TAZ/PIPCのATCC由来の参考菌株を含む主要嫌気性菌に対する10⁶ cfu/mlおよび10⁸ cfu/ml接種でのMIC値をTable 1および2に示した。10⁶ cfu/mlの接種

菌液を使用した場合、TAZ/PIPCが比較的弱い抗菌力(12.5μg/ml以上)しか示さなかった菌種は、*Bacteroides ovatus* ATCC8483, *B. thetaiotaomicon* ATCC 29741, *Bacteroides gracilis* GAI-10428, *Fusobacterium varium* ATCC8501, *Desulfomonas pigra* DSA749, *Veillonella parvula* ATCC10790, *Eubacterium lentum* ATCC 25559, *C. difficile* GAI10029, *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* JCM1059, *Lactobacillus reuteri* JCM112, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* JCM1231であった。その他の菌種に対しては、TAZ/PIPCは6.25 μg/ml以下の濃度で発育を抑制した。TAZ/PIPCの抗菌力は対照薬剤のPIPCと比較すると*B. fragilis*, *B. the-*

Table 2. Antibacterial spectrum of tazobactam/piperacillin against gram-positive anaerobic bacteria compared with other agents

Organism	MIC (μg/ml)					
	TAZ/PIPC	PIPC	CTM	CVA/TIPC	SBT/CPZ	TAZ
<i>Peptostreptococcus</i>						
<i>P. anaerobius</i> ATCC 27337	0.78	0.39	0.78	1.56	6.25	>100
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.10	0.05	0.78	0.10	0.20	6.25
<i>P. indolicus</i> GAI 0915	≤0.013	≤0.013	0.10	≤0.013	0.10	3.13
<i>P. magnus</i> ATCC 29328	0.39	0.39	3.13	1.56	1.56	>100
<i>Streptococcus</i>						
' <i>S. intermedius</i> ' ATCC 27335	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78	>100
<i>S. parvulus</i> VPI 0546	6.25	3.13	3.13	3.13	1.56	12.5
<i>Staphylococcus</i>						
<i>S. saccharolyticus</i> ATCC 14953	0.39	0.39	0.20	0.05	0.39	25
<i>Propionibacterium</i>						
<i>P. acnes</i> ATCC 11828	6.25	6.25	0.78	0.78	1.56	25
<i>P. granulosum</i> ATCC 25564	0.39	0.39	0.78	0.39	0.20	3.13
<i>Eubacterium</i>						
<i>E. lentum</i> ATCC 25559	50	100	100	25	100	>100
<i>Clostridium</i>						
<i>C. difficile</i> GAI 10029	50	50	>100	50	>100	>100
<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	0.39	0.39	0.78	0.39	0.78	25
<i>Bifidobacterium</i>						
<i>B. bifidum</i> JCM 1255	0.20	0.10	3.13	0.39	0.20	12.5
<i>B. adolescentis</i> JCM 1275	0.39	0.39	3.13	0.78	0.39	6.25
<i>B. breve</i> JCM 1192	1.56	1.56	25	3.13	1.56	25
<i>B. longum</i> JCM 1217	3.13	3.13	25	3.13	0.78	100
<i>B. pseudolongum</i> JCM 1205	0.78	0.78	6.25	1.56	0.20	100
<i>Lactobacillus</i>						
<i>L. acidophilus</i> JCM 1132	3.13	3.13	6.25	3.13	6.25	>100
<i>L. brevis</i> subsp. <i>brevis</i> JCM 1059	25	25	25	100	25	>100
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM 1134	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	>100
<i>L. fermentum</i> JCM 1173	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	>100
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	6.25	6.25	25	25	50	>100
<i>L. reuteri</i> JCM 1112	12.5	6.25	50	25	12.5	>100
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> JCM 1231	12.5	12.5	12.5	12.5	25	>100

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, PIPC: piperacillin, CTM: cefotiam, CVA/TIPC: clavulanic acid/ticarcillin, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, TAZ: tazobactam

taiotaomicron, *P. bivia*などで2管程度の増強がみられた。その他の菌株ではほぼ同等であった。TAZはそれ自体で嫌気性菌に対しある程度の抗菌力を示した。特に*Prevotella* spp. に強い抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌作用

10⁶ cfu/ml接種での成績をTable 3に示した。*B. fragilis* 66株に対し、TAZ/PIPCは3.13μg/ml, 12.5μg/mlのMIC₅₀およびMIC₉₀値を示し、PIPCの12.5μg/ml, 100μg/ml以上より2管程度優れた抗菌力を示した。*B. thetaiotaomicron* 21株に対しても類似的の成績が得られた。*P. bivia* 25株には1.56μg/ml, 3.13μg/mlのMIC₅₀, MIC₉₀値を示しPIPC単独より3~4管程度優れた成績であった。今回使用したいずれの菌種に対しても、TAZ/PIPCの抗菌力はCVA/TIPCとSBT/CPZと同程度

の抗菌力であった。*P. anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *P. magnus*には、TAZの添加による抗菌力の低下は認められず、PIPCと同程度の優れた抗菌力を示した。

3. *B. fragilis*に於けるTAZの併用効果

B. fragilis group 85株を用いて、PIPCに対する抗菌力をTAZの0.25~5μg/ml存在下で測定した。PIPCはTAZ 5μg/ml存在下で最も優れたMIC₅₀およびMIC₉₀値を示した。TAZ:PIPC=1:4のTAZ/PIPCは*B. fragilis* groupに対してTAZを0.5~0.25μg/ml添加した時のPIPCの抗菌力に匹敵した(Table 4)。

4. *B. fragilis*および*P. bivia*のβ-lactamaseに対するTAZの作用

B. fragilis 30144を除く3株のβ-lactamase活性は、2μMのTAZとの30℃10分間のインキュベーション後

Table 3. *In vitro* activity of tazobactam/piperacillin and other drugs against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotics	MIC (μg/ml)		
		range	50%	90%
<i>B. fragilis</i> (66)	tazobactam/piperacillin	1.56 ~ >100	3.13	12.5
	piperacillin	3.13 ~ >100	12.5	>100
	clavulanic acid/ticarcillin	0.39 ~ 100	0.78	12.5
	sulbactam/cefoperazone	1.56 ~ >100	3.13	12.5
	cefotiam	6.25 ~ >100	50	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> (21)	tazobactam/piperacillin	6.25 ~ 25	12.5	12.5
	piperacillin	12.5 ~ >200	25	>200
	clavulanic acid/ticarcillin	1.56 ~ 50	1.56	25
	sulbactam/cefoperazone	6.25 ~ 25	12.5	25
	cefotiam	NT		
<i>P. bivia</i> (25)	tazobactam/piperacillin	0.39 ~ 3.13	1.56	3.13
	piperacillin	0.39 ~ 100	25	50
	clavulanic acid/ticarcillin	0.05 ~ 6.25	1.56	1.56
	sulbactam/cefoperazone	0.20 ~ 1.56	1.56	1.56
	cefotiam	0.20 ~ 1.56	1.56	1.56
<i>P. anaerobius</i> (20)	tazobactam/piperacillin	0.10 ~ 6.25	0.10	0.39
	piperacillin	0.05 ~ 12.5	0.20	0.20
	clavulanic acid/ticarcillin	0.78 ~ 200	1.56	3.13
	sulbactam/cefoperazone	3.13 ~ 200	3.13	3.13
	cefotiam	0.78 ~ 25	0.78	1.56
<i>P. asaccharolyticus</i> (27)	tazobactam/piperacillin	≤0.025 ~ 0.39	≤0.025	0.20
	piperacillin	≤0.025 ~ 0.20	≤0.025	0.20
	clavulanic acid/ticarcillin	≤0.025 ~ 0.39	≤0.025	0.39
	sulbactam/cefoperazone	≤0.025 ~ 0.20	≤0.025	0.20
	cefotiam	≤0.025 ~ 0.78	≤0.025	0.39
<i>P. magnus</i> (38)	tazobactam/piperacillin	≤0.025 ~ 0.10	0.05	0.05
	piperacillin	≤0.025 ~ 0.10	0.05	0.10
	clavulanic acid/ticarcillin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	sulbactam/cefoperazone	0.39 ~ 1.56	1.56	1.56
	cefotiam	0.20 ~ 1.56	1.56	1.56

NT: not tested

に顕著に低下した。また同一条件下で、*P. bivia*のβ-lactamase活性も、同様に顕著に低下した。(Table 5)。

5. *B. fragilis*と*E. faecalis*の混合感染症に対する効果

B. fragilis 10-20の 1.5×10^7 cfu/mouse, *E. faecalis* K-1の 1.5×10^5 cfu/mouseをACCとともにマウス腹腔内に注射し、その1時間後に薬剤の初回投与を開始した。5日目に解剖し、病理学および細菌学的検索を実施した。使用菌株のPIPCおよびTAZ/PIPCに対する感受性はTable 6に、成績をTable 7に示した。早期治療開始の場合TAZ/PIPC投与群の7日目における膿瘍形成率は20%で、生理食塩水を投与した対照群の70%に比し明らかに低率であった。回収された膿瘍数も、対照群の11個に比し、本剤投与群では、わずかに2個の

みであった。また、PIPC単独投与群の膿瘍形成率は50%、回収膿瘍数は5個であった。TAZ/PIPC投与群から回収された膿瘍中の*B. fragilis*菌数は、生理食塩水およびPIPC単独投与群に比し有意に低かった。また*E. faecalis*菌数も生理食塩水投与群に比し有意に低かった。*B. fragilis*10-20の 1×10^7 cfu/mouse, *E. faecalis* K-1の 1.7×10^5 cfu/mouseをACCとともに腹腔内接種後、4日目より薬剤投与を開始した投与開始遅延の場合にはTAZ/PIPC投与、PIPC投与のいずれにおいても、膿瘍形成率(回収膿瘍数)は60% (9個)、40% (5個)と非投薬群の60% (6個)と有意な差は認められなかった。ところが腹腔内膿瘍検索時、肉眼での所見ではあったが肝膿瘍形成に差が認められた。対照群とPIPC投与群においては肝臓中に肉眼的に観察可能な膿瘍が

Table 4. Effect of tazobactam on MICs of piperacillin in 85 *Bacteroides fragilis* group isolates

Drug	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)
Tazobactam/Piperacillin	3.13	12.5
Piperacillin		
+5 μg/ml Tazobactam	0.20	6.25
+2.5 μg/ml "	0.39	12.5
+1 μg/ml "	1.56	25
+0.5 μg/ml "	3.13	25
+0.25 μg/ml "	3.13	25
+0 μg/ml "	25	200

Inoculum size: 10⁶ cfu/ml

Table 5. Effect of β-lactamase inhibitors on β-lactamase from *Bacteroides fragilis* and *Prevotella bivia* strains

Inhibitors (2 μM)	Residual activity (%)					
	<i>B. fragilis</i>				<i>P. bivia</i>	
	GAI0558 ¹⁾	GAI7955 ²⁾	GAI10150 ³⁾	GAI30144 ⁴⁾	ATCC29303	GAI4100
Tazobactam	8.8	22.5	6.6	95.3	21.3	28.3
Clavulanic acid	2.3	35.1	17.3	95.5	28.7	35.9
Sulbactam	8.6	39.9	30.2	93.1	30.2	59.1

1) ~ 3) oxyiminocephalosporinase type I producer 4) oxyiminocephalosporinase type II producer

Table 6. *In vitro* susceptibility of the organisms used in animal studies

Organism	Inoculum: 10 ⁶ cfu/ml		Inoculum: 10 ⁸ cfu/ml	
	tazobactam/piperacillin	piperacillin	tazobactam/piperacillin	piperacillin
<i>B. fragilis</i> 10-20	12.5	> 100	25	> 100
<i>E. faecalis</i> K-1	1.56	1.56	3.13	3.13
<i>B. fragilis</i> GAI 0558	6.25	100	50	> 100
<i>E. coli</i> 31053	1.56	1.56	3.13	3.13

それぞれ7匹, 4匹に見られたに比し, TAZ/PIPC投与群ではわずかに1匹に見られたのみであった。なお本実験では肝膿瘍中の細菌数の検索は実施しなかった。

6. *B. fragilis*と*E. coli*混合感染症に対する効果

*B. fragilis*と*E. coli*の混合液をABSとともに腹腔内に接種した。接種後1時間に薬剤の初回投与を実施し, その後, 1日4回4日間(合計12回)接種した。その成績をTable 8に示した。

7日目での膿瘍形成率は, TAZ/PIPCおよびPIPCの治療群でいずれも70%~80%であった。一方, 対照群は80%であった。1匹のマウスから回収した膿瘍数および総膿瘍重量の平均値は, 各群間で差はなかった。1匹のマウスから回収された膿瘍中の平均細菌数をみると, まず*B. fragilis*ではTAZ/PIPCの治療群で, 対照およびPIPC単独投与群に比し有意に低い値を示した($p < 0.05$)。 *E. coli*では, TAZ/PIPCの投与群とPIPCの投与群は, いずれも生理食塩水を投与した対照群に比

し, 有意に低い菌数を示した($p < 0.05$)。しかもTAZ/PIPC投与群はPIPC投与群に対しても有意に低い菌数を示した($p < 0.05$)。

また遅延投与開始群についての検討では, TAZ/PIPCおよびPIPC投与群ともに遅延投与開始群では早期投与開始群で見られた膿瘍中菌数減少は見られなかった。

7. 血清および膿瘍ホモジネート中の薬剤濃度

感染動物におけるTAZ/PIPCの成分PIPCおよびTAZの血清中動態および腹腔内膿瘍ホモジネート中の移行について検討した(Fig. 1, 2)。TAZ/PIPCの皮下注射後の膿瘍ホモジネート中のPIPC濃度は, 30, 60分ともPIPC単独皮下注射後の膿瘍ホモジネート中のPIPC濃度より明らかに高値を示していた。

8. マウス盲腸内細菌叢に対する影響

生理食塩水投与の対照群では, 3匹中3匹とも盲腸内の*C. difficile*菌数は, 検出限界以下(200cfu/g未満)

Table 7. *In vivo* efficacy of tazobactam/piperacillin for treatment of infections induced by *Bacteroides fragilis* 10-20 and *Enterococcus faecalis* K-1

Treatment group	% of mice bearing abscesses (n = 10)	No. of organisms recovered from abscess (log ₁₀ CFU ^a)	
		<i>B. fragilis</i>	<i>E. faecalis</i>
Tazobactam/Piperacillin	20	2.00 ^{b),c)}	2.75 ± 0.07 ^{b)}
Piperacillin	50	5.14 ± 0.92	3.78 ± 0.89
Saline treated	70	4.74 ± 1.37	4.93 ± 0.76

Treatment was started one hour after inoculation of *B. fragilis* 10-20 (1.5×10^6 cfu/mouse) and *E. faecalis* K-1 (1.7×10^5 cfu/mouse). Drugs (a total of 12 doses) were injected subcutaneously 4 times a day at a 6 hour-interval for 3 days.

a) Values are means ± standard deviation b) $P < 0.05$ compared with values for saline-treated mice

c) $P < 0.05$ compared with values for piperacillin-treated mice

Table 8. *In vivo* efficacy of tazobactam/piperacillin for treatment of infections induced by *Bacteroides fragilis* GAI 0558 and *Escherichia coli* 31053 in mice

Treatment group	% of mice bearing abscesses (n = 10)	No. of organisms recovered from abscess (log ₁₀ CFU ^a)	
		<i>B. fragilis</i>	<i>E. coli</i>
Tazobactam/Piperacillin	70	4.93 ± 1.55 ^{b),c)}	3.17 ± 1.14 ^{b)}
Piperacillin	80	6.98 ± 0.69	4.33 ± 0.91 ^{b)}
Saline treated	80	5.97 ± 1.62	5.10 ± 1.70

Treatment was started one hour after inoculation of *B. fragilis* GAI 0558 (1.5×10^7 cfu/mouse) and *E. coli* 31053 (1×10^6 cfu/mouse). Drugs (a total of 8 doses) were injected subcutaneously 4 times a day at a 6 hour-interval for 2 days.

a) Values are means ± standard deviation b) $P < 0.05$ compared with values for saline-treated mice

c) $P < 0.05$ compared with values for piperacillin-treated mice

であった。

一方、薬剤投与群では、投薬中止翌日および7日目の盲腸内の*C. difficile*の検出状況は、TAZ/PIPC投与群では、いずれも5匹中5匹が陽性で、その菌数は翌日で 10^3 cfu/g、7日目でその100倍の菌数であった。一方、PIPC単独投与群では、いずれも5匹中2匹が陽性で、残りの3匹は陰性であった。PIPC中止翌日の、*C. difficile*陽性の2匹の菌数は $10^4 \sim 10^7$ cfu/gであった。*C. difficile*分離陽性の盲腸内容物の性状はPIPC投与群では著しく水様であり、TAZ/PIPC投与群では軟で両者に相違が見られた(Table 9)。

Ⅲ. 考 察

*B. fragilis*は腹腔内膿瘍から*E. coli*や*E. faecalis*などとともによりしばしば分離される偏性嫌気性菌である¹²⁾。またPIPCは*B. fragilis*に比較的優れた抗菌力を示すウレイド型ペニシリンとして知られている。さて*B. fragilis*のほとんどが産生するoxyiminocephalosporinaseは、PIPCを含めたペニシリンを基質とすることができる¹³⁾。従ってこの酵素を大量産生する*B. fragilis*の菌株は、PIPCに高度耐性となる。著者らの研究によるとこのような株がわが国の臨床分離株の10%以上に認められている¹⁴⁾。さて、TAZはoxyiminocephalosporinaseの酵素活性を阻害する作用があり¹⁾、PIPC耐

性の*B. fragilis*にも、優れた抗菌力を示すことが、すでに*in vitro*で明らかにされている^{3,4)}。本研究でもそれらの事実を確認した。

TAZ/PIPCの*in vivo*における評価報告は、*in vitro*における評価報告に比べてあまりにも少ない^{15,16)}。特にこの薬剤が適応となる可能性の高い疾患と考えられる*B. fragilis*と通性嫌気性菌が関与する実験的腹腔内膿瘍に対するこの薬剤の評価成績は見当たらない。本報では、oxyiminocephalosporinaseを産生し、PIPCに耐性の*B. fragilis*と β -lactamaseを産生しないPIPCに感性の*E. faecalis*および*E. coli*を用いて作製した膿瘍モデルを用いて、PIPC単独治療を実施した場合およびTAZ/PIPC治療を実施した場合の結果を比較検討することにより、この種の混合感染症に対するTAZ/PIPCの有用性を明らかにしようとした。*B. fragilis*と*E. faecalis*あるいは*E. coli*を腹腔内に接種すると、3日ごろから腹腔内に膿瘍が形成され、5～7日目に膿瘍の大きさおよび膿瘍内菌数はピークとなり、1週間はその状態を維持し、多くの場合は徐々に消退していくことがわかっていく。また菌液接種後に適切な化学療法を行うと5～7日目の膿瘍の形成率あるいは膿瘍中の細菌数を低下し、膿瘍の消退が早められることが報告されている¹¹⁾。

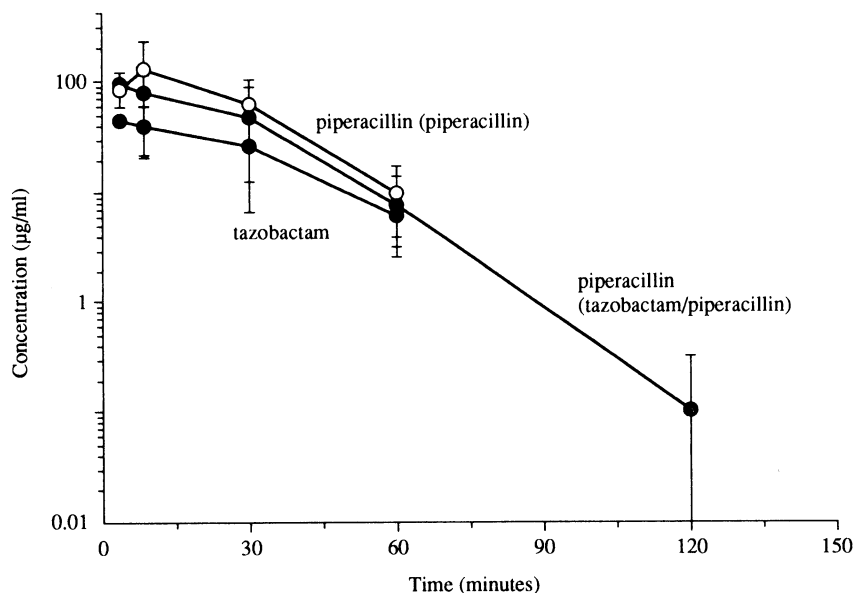


Fig. 1. Serum concentration of piperacillin or tazobactam after subcutaneous administration of 250 mg/kg piperacillin or 312.5 mg/kg tazobactam/piperacillin to C57BL-6J mouse.

今回の実験で見られたように、PIPC単独投与は、膿瘍中のPIPC高度耐性の*B. fragilis*の菌数を減少できないこと、またPIPC単独投与ではPIPC耐性の*B. fragilis*と共存していたPIPC感性の*E. coli*の菌数さえ減少できない事実を確認することができた。一方PIPC単独投与では膿瘍ホモジネート中のPIPC濃度はTAZ/PIPC投与の場合に比し、より早期に減少する傾向が認められた。PIPC単独治療の場合には腹腔内あるいは病巣内でPIPC耐性の*B. fragilis*が産生するoxyiminocephalosporinaseによりPIPCを不活化した結果と考えられる。感染初期の病巣付近ではPIPCに感性の*E. coli*および*E. faecalis*を減少に導くに十分な薬剤濃度が得られない可能性が推察される。一方、TAZ/PIPC投与では、膿瘍中のPIPC感性の*E. coli*の菌数はもとより、PIPC耐性の*B. fragilis*の菌数をも減少させることができた。TAZが*B. fragilis*の β -lactamaseを阻害した結果、感染初期の病巣付近のPIPC濃度は*B. fragilis*の菌数を減少できるレベルに維持されていたものと考えられる。

しかし、TAZ/PIPCの効果は腹腔への菌の接種から初回の薬剤投与までの間隔が1時間であった場合にのみ認められ、*B. fragilis*と*E. faecalis*の混合感染の場合のように4日後からの投与開始では勿論のこと、*B. fragilis*と*E. coli*の混合感染の場合のように1日ずらして治療を開始しただけで薬効は全く観察されない結果となった。

*B. fragilis*と通性嫌気性菌が関与する腹腔内感染症に対する治療を効果的にするには、*E. coli*など腸内細菌科の細菌と*B. fragilis*を主とする嫌気性菌に対して抗菌力を有する薬剤の選択が重要とされている。欧米では、clindamycinやmetronidazoleとアミノ配糖体の併用による治療がよく用いられており、また最近ではカルバペネムの単剤による治療が行われている¹⁷。わが国では、セファマイシン、SBT/CPZまたはカルバペネムが、その重症度に併せて選択されているようである¹⁸。

PIPCとTAZとの合剤は、PIPC耐性*B. fragilis*と感性の*E. faecalis*またはPIPC耐性の*B. fragilis*と感性の*E. coli*との腹腔内混合接種に引き続きおこる膿瘍形成を抑制する効果を示したことから、嫌気性菌と好気性菌の多菌種の関与することが多いヒト腹腔内感染症の治療薬として臨床的有用性が期待できる。

またTAZ/PIPCとPIPCのマウス盲腸内細菌叢への影響を*C. difficile*の出現を指標として検討した。他のほとんどの薬剤で見られるように、両薬剤共に*C. difficile*の出現を見た。しかし、両者の*C. difficile*出現に対する影響に少し異なった点があった。この原因については特に検討しなかったが、TAZはそれのみでも*Prevotella* spp. などある種の細菌に対する抗菌作用を示したこと、TAZ添加によるPIPCの体内動態の変化が関与している可能性が十分考えられる。このマウスで

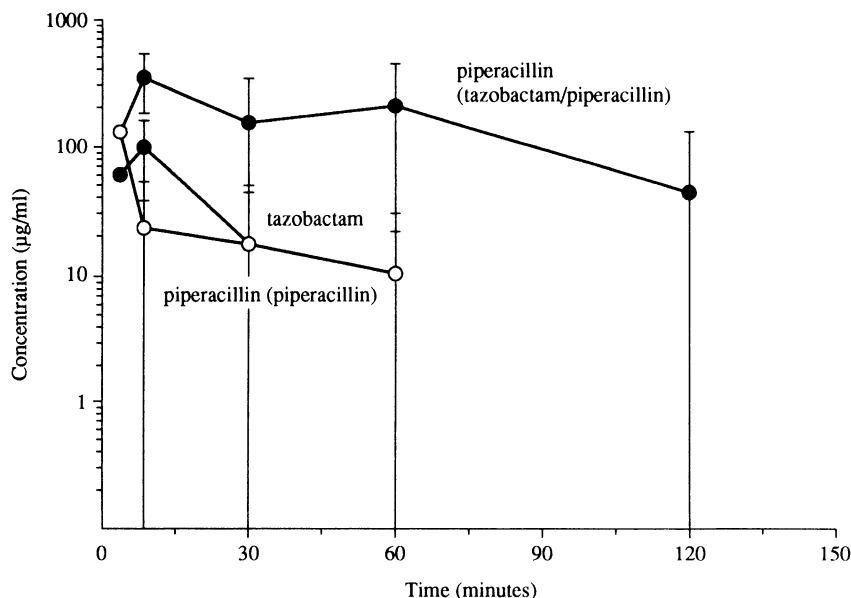


Fig. 2. Concentration of piperacillin or tazobactam in abscess homogenates after subcutaneous administration of 250 mg/kg piperacillin or 312.5 mg/kg tazobactam/piperacillin to C57BL/6J mouse.

Table 9. Emergence of *Clostridium difficile* in murine caecum contents after 5 days' subcutaneous dosing with tazobactam/piperacillin and piperacillin

Treatment group	Days after completing administration	No. of <i>Clostridium difficile</i> colony forming units/g of cecal contents						
		<10 ²	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ <
Tazobactam/Piperacillin	1			5				
	7					5		
Piperacillin	1	3			1			1
	7	1	2		2			
Saline treated	1	3						
	7	3						

Five mice received the antimicrobial agents at a dose of 40 mg/kg/day. Three control mice received the same volume of physiological saline.

の成績および成績の違いがヒト臨床での副作用としての下痢症の出現とどのように係わってくるかは、現在不明である。今後の臨床応用での下痢症発生頻度との対比により、このモデルが抗菌剤によるヒトの下痢症の発生の程度を予言するモデルとして意味をもつかどうか明らかになるであろう。

文 献

1) Gutmann L, Kitzis M D, Yamabe S and Acar J F: Comparative evaluation of a new β -lactamase inhibitor, YTR-830, combined with different β -lactam antibiotics against bacterial harboring known β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 29: 955~957, 1986

2) 板東香お里, 武藤吉徳, 田中保知, 伊藤正志, 渡辺邦友, 上野一恵: 嫌気性菌の β -ラクタマーゼに対するTazobactamの影響。嫌気性菌感染症研究 21: 75~81, 1991

3) Appelbaum P C, Jacobs M R, Spangler S A and Yamabe S: Comparative activity of β -lactamase inhibitors YTR-830, Clavulanate, and Sulbactam combined with β -lactams against β -lactamase producing anaerobes. Antimicrob Agents Chemother 30(5): 789~791, 1986

4) Wexler H M, Molitoris E and Finegold S M: Effect of β -lactamase inhibitors on the activities of various β -lactam agents against anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 35(6): 1219~1224, 1991

5) Holdeman L V, Cato E P and Moore W E C: Anaerobe laboratory Manual 4th Edition, The Virginia Polytechnic Institute and State Uni-

versity Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Virginia 1972

6) MIC測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度(MIC)測定法。Chemotherapy 27(3): 559~560, 1979

7) 日本化学療法学会MIC測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981

8) 板東香お里, 武藤吉徳, 加藤直樹, 渡辺邦友, 上野一恵: *Bacteroides fragilis*のZn要求性 β -lactamaseについて。嫌気性菌感染症研究 19: 97~104, 1989

9) Freireich E J, Edmund A, Rall D P, Schemidt L H and Skipper H E: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. Cancer Chemotherapy Reports 50(4): 219~243, 1966

10) Bartlett J B: Experimental Aspects of Intraabdominal Abscess. The American Journal of Medicine May 15: 9198, 1984

11) 田中保知, 渡辺邦友, 島倉康彦, 板東香お里, 武藤吉徳, 加藤直樹, 上野一恵: 化学療法剤評価法としての実験的マウス腹腔内膿瘍モデルの検討。Chemotherapy 40(10): 1224~1230, 1992

12) Weinstein W M, Onderdonk A B, Bartlett J G, Gorbach S L: Experimental intraabdominal abscess in rats: development of an experimental model. Infection and Immunity 10: 1250~1255, 1974

13) Sato K, Matsuura Y, Miyata K, Inoue M and

- Mitsuhashi S: Characterization of cephalosporinases from *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides vulgatus*. J Antibiotic 36, 76~85, 1983
- 14) Watanabe K, *et al.*: *In vitro* Susceptibility of Clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in Japan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11: 1069~1073, 1992
- 15) Kuck N A, Jacobus N V, Peterson P J, Weiss W J, Testa R T: Comparative *in vitro* and *in vivo* activities of piperacillin combined with beta-lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam. Antimicrob Agents Chemother 33(11): 1964~1969, 1989
- 16) Kuck N A, Peterson P J, Weiss W J, Testa R T: *In vitro* and *in vivo* efficacy of YTR-830H and Piperacillin combinations versus β -lactamase-producing bacteria. J. Chemother 1 (3): 155 ~ 161, 1989
- 17) Solomkin, J S, Fant W K, Rivera J O, Alexander J W: Randomized trial of imipenem/cilastatin versus gentamicin and clindamycin in mixed-flora infections. Am J Med. Educ 78 (Supple. 6A): 85~91, 1985
- 18) 岩井重富: 腹膜炎, 抗菌薬の使い方。日常診療のガイドライン (清水喜八郎編) 第4版: 93 ~ 108, 三共, 1993

In vitro and *in vivo* activities of tazobactam/piperacillin against anaerobes and effects on murine cecal flora

Kunitomo Watanabe, Yasunori Tanaka, Naoki Kato, Kaori Tanaka, Haru Kato and Kazue Ueno

Institute of Anaerobic Bacteriology Gifu University School of Medicine
40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

The *in vitro* activity of tazobactam/piperacillin was evaluated by using a total of 238 strains of anaerobic bacteria, including reference strains. Tazobactam/piperacillin, when compared with piperacillin, showed good activity against a wide range of anaerobic bacterial species, especially β -lactamase-producing *Bacteroides fragilis* and *Prevotella bivia*. The activities of three representative β -lactamase preparations from *B. fragilis* (GAI-0558, 7955 and 10150) and two preparations from *P. bivia* were inhibited efficiently by tazobactam.

In intraabdominal infections in mice with a combination of a piperacillin-resistant *B. fragilis* isolate and a sensitive *Escherichia coli* strain or a sensitive *Enterococcus faecalis* strain, the efficacy of tazobactam/piperacillin, when judging from the viable counts in abscesses, was greater than that of piperacillin. The level of piperacillin in abscess homogenates decreased more gradually when tazobactam was given along with piperacillin.

Tazobactam/piperacillin slightly increased the number of *Clostridium difficile* in the caecum of mice given a subcutaneous daily dose of 40 mg/kg for 5 days.