β -lactamase 抵抗性 Penicillin と Ampicillin あるいは Cephaloridine との併用効果について

藤 田 浩

国立ガンセンター病院 (指導: 木村禎代二副院長)
東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室 (指導: 堀川高大教授)

(昭和 46 年 7 月 8 日受付)

Combination effect between β -lactamase resistant
penicillins and ampicillin or cephaloridine

Hiroshi Fujita

National Cancer Center Hospital

(Director: Dr. K. Kimura)

Department of Oral Bacteriology, Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. T. Horikawa)

要約: β -lactamase 抵抗性ペニシリン (methyl chlorophenyl isoxazolyl penicillin あるいは methyl dichlorophenyl isoxazolyl penicillin) と広スペクトルペニシリン (aminobenzyl penicillin) 或はセファロスポリン C (cephaloridine) との間の併用効果について、之らの単剤或は合剤の最小発育阻止濃度, 2-dimensional dilution test, 増殖曲線, 発育阻止帯を検討し, 研究された。その結果, この薬剤の組合せは, 臨床的に分離されたグラム陰性杆菌 (E. coli, Kl. pneumoniae, Enterbacter, Ps. aeruginosa) に対し, 著明的な協同作用を示すことが判明した。而し, グラム陽性球菌 (St. aureus, St. epidermidis, Enterococcus) に対してはその作用は著明ではなかった。これら薬剤の協同作用の作用機転について, 詳細な討論が加えられた。

penicillin や cephalosporin C は bactericidal (殺菌的) に働き, 抗菌作用が強い。その上毒性が弱く乳児やがんの末期の患者の如き, 体力の衰えた人の感染症にも, 大量を副作用なしに投与することができる優れた抗生物質である。

しかし, 臨床的にアレルギーの問題を注意しなければならないし, また, 耐性菌の増加が問題となっている。この耐性の原因として, penicillin G (PC-G), aminobenzyl penicillin (Ampicillin, AB-PC), carbenicillin (CB-PC) 等は細菌の産生する penicillinase のために, cephalothin (CET), cephaloridine (CER), cephalixin (CEX) 等は菌

の産生する cephalosporinase のために分解され, 抗菌作用を失うことが主要なる原因となっている。この penicillinase および cephalosporinase は共に β -lactam 環を加水分解して開環する酵素であり, β -lactamase とも呼ばれている。

近年 PC-G の欠点を克服すべく, 多くの半合成 penicillin が登場してきた。その中, dimethoxyphenyl p. (DMP-PC), methylphenylisoxazolyl p. (MPI-PC), methylchlorophenyl-isoxazolyl p. (MCI-PC), methyl dichlorophenyl-isoxazolyl p. (MDI-PC), methyl fluorophenyl-isoxazolyl p. (MFI-PC) 等は penicillinase により分解され難

表 1 AB-PC 及び MDI-PC の含有培地上における発育状況

E. coli

菌株	AB-PC	MDI-PC	AB-PC+ MDI-PC 1:1	AB-PC+ MDI-PC 1:2	AB-PC+ MDI-PC 2:1
1	7.8*	1000	7.8	11.7	5.85
2	3.9	500	3.9	5.85	5.85
3	7.8	2000	15.6	23.4	11.7
4	7.8	2000	7.8	11.7	5.85
26	1.9	500	3.9	5.85	1.9
27	7.8	1000	7.8	11.7	11.7
平均	5.5	998	6.7	10.2	6.3

* MIC(mcg/ml)

Kl. pneumoniae

菌株	AB-PC	MDI-PC	AB-PC+ MDI-PC 1:1	AB-PC+ MDI-PC 1:2	AB-PC+ MDI-PC 2:1
6	125*	2000	62.5	93.75	46.85
7	31.25	2000	62.5	93.75	46.85
8	31.25	2000	62.5	93.75	46.85
9	15.6	2000	15.6	23.4	23.4
10	125	2000	31.25	46.85	46.85
12	125	>2000	125	187.5	187.5
平均	86.9	>2000	50.6	76.8	54.3

* MIC(mcg/ml)

Enterobacter

菌株	AB-PC	MDI-PC	AB-PC+ MDI-PC 1:1	AB-PC+ MDI-PC 1:2	AB-PC+ MDI-PC 2:1
14	125*	2000	31.25	46.85	23.4
15	62.5	2000	31.25	46.85	23.4
平均	87.98	2000	31.25	46.85	23.4

* MIC(mcg/ml)

Ps. aeruginosa

菌株	AB-PC	MDI-PC	AB-PC+ MDI-PC 1:1	AB-PC+ MDI-PC 1:2	AB-PC+ MDI-PC 2:1
20	2000*	>2000	500	375	750
21	>2000	>2000	500	750	750
22	>2000	>2000	500	750	750
23	2000	>2000	500	375	375
24	>2000	>2000	500	750	750
28	2000	>2000	500	750	375
平均	>2000	>2000	500	614	614

* MIC(mcg/ml)

く、PC-G 耐性ブドウ球菌にも有効である。

一方、AB-PC, CB-PC, CER, CET, CEX など
はグラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌にも奏
効する広スペクトルを示すが、これらは penici-
llinase や cephalosporinase に分解され易い欠点
がある。

そこで、前者の β -lactamase 抵抗性薬剤と後者
の広スペクトル薬剤とを併用することにより、互
の欠点が補足され、相乗効果を示すことが数年前
より知られてきた。

われわれは国立がんセンター病院にて分離した
各種のグラム陽性および陰性菌について、MCI-
PC あるいは MDI-PC と AB-PC あるいは CER
との間の協同作用を検討した。その結果、主とし
てグラム陰性桿菌 (E. coli, Enterobacter, Kleb-
siella, Proteus, Pseudomonas) に、両薬剤併用に

よる協同作用がみられたので、ここに報告する。

結 果

1. 単剤および合剤の MIC(最小発育阻止濃度)

各種濃度の AB-PC あるいは MDI-PC を単独
に含む Müller-Hinton 寒天平板および、AB-PC
と MDI-PC を 1:1, 2:1, 1:2 の割合に各種の
濃度を含む平板培地上に菌を劃線接種し、37°C 1
夜培養後、菌の発育の有無により、それぞれの菌
株に対する最小発育阻止濃度を判定した。その結
果、表 1 に示す如く、E. coli, Kl. pneumoniae,
Enterobacter, Ps. aeruginosa 等のグラム陰性桿
菌において、単剤の MIC に比して、合剤の MIC
が同じかあるいは小であつた。即ち、これらの菌
に中等度感受性を示す AB-PC に対して、非感受
性の MDI-PC を混合することにより、もし両者
が無関係で、協同作用がなければ、1:1 合剤 (=

表 2 CER 及び MCI-PC の含有培地上における発育状況

		E. coli						
MCI-PC	CER	0	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	
0	7*	7	5	1	0	0		
0.97	7	7	5	0	0	0		
1.95	7	7	5	0	0	0		
3.9	7	7	4	0	0	0		
7.8	7	7	4	0	0	0		
15.6	7	7	4	0	0	0		
31.2	7	7	1	0	0	0		
62.5	7	4	0	0	0	0		
125	7	4	0	0	0	0		
250	3	1	0	0	0	0		
500	1	0	0	0	0	0		
1000	0	0	0	0	0	0		

* 発育株数

Enterobacter													
CER	0	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250	500		
MCI-PC													
0	2*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	
0.97	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	
1.95	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	0	
3.9	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	
7.8	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	
15.6	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	
31.2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
62.5	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
125	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
250	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* 発育株数

		Kl. pneumoniae									
MCI-PC	CER	0	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5	125	
0	6*	6	5	2	1	1	1	1	0	0	
0.97	6	6	4	2	1	1	1	1	0	0	
1.95	6	6	4	2	1	1	1	1	0	0	
3.9	6	6	4	2	1	1	0	0	0	0	
7.8	6	6	3	2	1	0	0	0	0	0	
15.6	6	6	3	2	1	0	0	0	0	0	
31.2	6	6	2	2	0	0	0	0	0	0	
62.5	6	6	2	2	0	0	0	0	0	0	
125	6	4	2	1	0	0	0	0	0	0	
250	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	
500	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
1000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* 発育株数

		Ps. aeruginosa								
MCI-PC	CER	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	2000	
15.6	7*	7	7	7	7	7	7	7	7	
31.2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
62.5	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
125	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
250	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
500	7	7	7	7	7	7	7	6	4	
1000	7	7	7	7	5	1	1	0	0	
2000	7	7	7	6	1	0	0	0	0	

* 発育株数

$1/2 + 1/2$ 合剤) に対する感受性は当然 MIC が 2 倍になり、悪化するはずである。●印は協同作用(相加あるいは相乗作用)のみられた菌株を示している。

このような MIC からみた協同作用は AB-PC : MCI-PC, CER : MCI-PC の合剤においても認め

られた。これら合剤の協同作用はグラム陰性桿菌で著明であったが、Staphylococcus aureus, St. epidermidis, Enterococcus 等のグラム陽性球菌には殆どみられなかった。

2. 両剤の各種濃度含有培地上の菌の発育状況
CER および MCI-PC の 2000mcg/ml~0.97mcg/

ml までの 2 倍階段稀釈の各種濃度をすべて組合せた培地を作成し、上記菌種別に劃線接種し、培養後、その発育の有無の図表を box 状に作成し、両剤の協力作用について検討した (2-dimensional dilution test)。

表 2 はグラム陰性桿菌の CER および MCI-PC 含有培地上における発育状況を示している。その結果、MCI-PC 単独では殆ど無効であるが、CER の濃度が上昇するにつれ、MCI-PC の添加効果を生じ、両剤の協力現象が明かに認められた。この縦軸と横軸に 2 薬剤を plot した場合、O (発育なし) が内側へくい込む所見は協同作用のあらわれである。

このような O の内側へのくい込む現象は、AB-PC: MCI-PC あるいは AB-PC: MDI-PC の間でも主にグラム陰性桿菌で認められた。

3. 単独および合剤含有培地中での菌の増殖曲線

液体培地中に AB-PC および MCI-PC の単剤、あるいはその $1/2:1/2$, $1/3:2/3$, $2/3:1/3$ の量の合剤を含有せしめ、菌を接種後、 37°C の incubator に培養し、菌の発育を optical density により測定し増殖曲線を作成した。

その結果は図 1 にみられる如く、単剤あるいは合剤を各々 3.9mcg/ml 含む培地中での大腸菌の

図 1 E. coli (No. 27株) の増殖曲線に及ぼす AB-PC と MCI-PC の併用効果
薬剤 3.9mcg/ml 培養直後投与

増殖は、(1), (2) の単剤の場合 control (薬剤なし) の場合と殆ど同様に強い増殖がみられたのに対し、(4) の $1/3:2/3$ 合剤では中等度の増殖の抑制、(3), (5) の $1/2:1/2$ あるいは $2/3:1/3$ 合剤では高度の増殖抑制が観察された。こうように濁度即ち総菌数に於いても、合剤の協同作用が著明に生ずることが判明した。

4. 両剤の菌の発育阻止帯の近接効果

AB-PC および MCI-PC の 1 濃度ディスク (30 mcg) あるいはカップを菌と混釈した薄層平板上に近接して配置し、それぞれの発育阻止帯の拡大 (協同作用) あるいは縮小 (拮抗作用) の有無について検査し、写真撮影を行なった。このための予備実験として、Müller-Hinton 薄層平板上に、それぞれのディスクあるいはカップを単独に配置して、阻止円を測定し、次にこの値を参考として、2 剤の阻止円がほぼ相接するように、2 種のディスクあるいはカップを配置した。

図 2 は中心に AB-PC のディスク、周辺に MCI-PC のディスクを配置した写真で、MCI-PC 単独では阻止帯は生じないが、之を AB-PC の阻止帯

図 2

の周辺に置くと、図の如き著明な阻止帯の増強、拡大が生ずることが観察された。

このような阻止帯の拡大増強は AB-PC : MDI-PC あるいは CER : MCI-PC の間でも主にグラム陰性桿菌に対して観察された。

討 論

AB-PC : MCI-PC, AB-PC : MDI-PC, CER : MCI-PC の併用によりグラム陰性桿菌に対して著明な協同作用を呈することを抗菌力 (MIC), 2-dimensional dilution test, 増殖曲線, 発育阻止帯にて証明した。

現在, これらの薬剤の併用による相乗効果について, 次の如く説明されている。

β -lactamase の Induction

PC-G や CER は β -lactamase の rich inducer であり, MCI-PC や DMP-PC は poor inducer である。これは菌の induction active center への薬剤の到達の難易や, center との親和性の強弱に関係がある。両剤の併用により, poor inducer が rich inducer の β -lactamase の誘出に影響するや否やは大切な問題であるが, 誘出にはあまり影響しないと言う報告がある。即ち, 両剤の協同作用は β -lactamase の induction の抑制によるものではないと考えられる。

誘出された β -lactamase は菌により性質が異なる。例えば, 緑膿菌のそれは cephalosporinase の活性が強く, 黄色ブ菌は penicillinase の活性が強い。

β -lactamase に対する competitive inhibition DMP-PC や MCI-PC は β -lactamase により分解され難い。その理由として分解され難い PC には酵素により分解され難い side chain (例えば dimethoxybenzoyl group など) があり, 分解され易い PC には分解され易い side chain (carbonyl group など) があると考えられている。

大腸菌や緑膿菌の産生する β -lactamase の酵素作用の active center に対する親和性は PC-G や CER よりも, DMP-PC や MCI-PC の方が遙に強い。併用により, 酵素への親和性が強く, 且つ,

加水分解され難い DMP-PC や MCI-PC の方が, 先に酵素に吸着され, その作用を block するため, 加水分解され易い PC-G や CER が酵素作用を受け難くなるのである。即ち前者が後者の分解に対して competitive inhibitor となるために併用による協力作用が生ずるのである。

しかるに黄色ブ菌の β -lactamase active center への親和性は, 2 群の薬剤の間で, グラム陰性桿菌に観察された如き著明な差がない。そのため, この協力作用もあまり強くあらわれない。

結 論

β -lactamase 抵抗性ペニシリン (methyl chlorophenyl isoxazolyl penicillin あるいは methyl dichlorophenyl isoxazolyl penicillin) と広スペクトルペニシリン (aminobenzyl penicillin) あるいはセファロスポリン C (cephaloridine) との間の併用効果について, 之らの単剤あるいは合剤の最小発育阻止濃度, 2-dimensional dilution test, 増殖曲線, 発育阻止帯を検討し, 研究された。その結果, この薬剤の組合せは, 臨床的に分離されたグラム陰性桿菌 (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Ps. aeruginosa*) に対し, 著明な協同作用を示すことが判明した。しかし, グラム陽性球菌 (*St. aureus*, *St. epidermidis*, *Enterococcus*) に対してはその作用は著明ではなかった。これら薬剤の協同作用の作用機転について, 詳細な討論が加えられた。

文 献

- 1) 藤田浩 : Aminobenzyl penicillin と Methyl-chlorophenylisoxazolyl penicillin との併用効果に関する実験的研究, 新薬と臨床, 17 : 1281, 1968.
- 2) 藤田浩ほか : 日本化学療法学会東日本支部総会発表, 昭和43年11月, 東京.
- 3) Sabath, L. D., etc. : Cephalosporinase and Penicillinase Activities of a β -Lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*, *Biochemical J.*, 96 : 739, 1965.
- 4) Hamilton-Miller, J. M.T. et al. : Inhibition of Penicillinase from Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Substrate Analogs

- gues, Nature, 201 : 999, 1964.
- 5) Hamilton-Miller, J. M. T. et al. : Potentiation of Penicillin Action by Inhibition of Penicillinase, Nature, 201 : 867, 1964.
- 6) Hamilton-Miller, J. M. T. et al. : Interaction of Cephaloridine with Penicillinase-Producing Gram-Negative Bacteria, Nature, 208 : 235, 1965.