

【原著・基礎】

緑膿菌に対する biapenem の *in vitro* 殺菌力評価

荒明美奈子・田端麻紀子・清水 正樹・谷 真理子・原 哲郎・渡部 宏臣

明治製菓株式会社薬品総合研究所*

(平成 15 年 2 月 5 日受付・平成 15 年 3 月 11 日受理)

新規カルバペネム系薬 biapenem (BIPM) の *Pseudomonas aeruginosa* に対する短時間殺菌力を imipenem/cilastatin (IPM/CS), meropenem (MEPM) および ceftazidime (CAZ) と、ヒト血漿中濃度推移下での殺菌力について IPM/CS および MEPM と比較した。*P. aeruginosa* に対する BIPM の短時間殺菌力は IPM/CS と同程度であった。BIPM は MEPM および CAZ に比べ、抗菌薬作用後 1~2 時間の初期に強い殺菌力を示した。BIPM および IPM/CS の高接種菌量での殺菌力は、通常接種菌量での殺菌力と変わらなかったが、MEPM および CAZ では殺菌力の減弱が認められた。ヒトに BIPM 300 mg/30 min 投与時と IPM/CS および MEPM の 500 mg/30 min 投与時の血漿中濃度に薬物濃度をシミュレートした *in vitro* pharmacokinetic model における 3 剤の生菌数推移は同程度であった。以上の結果から、BIPM は緑膿菌感染症に優れた治療効果を示すことが期待できると考えられた。

Key words: biapenem, 緑膿菌, 殺菌力, simulation model

カルバペネム系薬は、広域でかつ抗菌力が強い抗生物質である¹⁾。また、ペニシリン系薬やセファロスポリン系薬に比べ短時間殺菌力が強く、*Pseudomonas aeruginosa* に対しても強い抗菌力を示し、重症感染症の第一選択薬として広く使用されている²⁾。

Biapenem (BIPM) は日本ワイスレダリー(株)により開発された新規カルバペネム系薬であり、グラム陽性菌および陰性菌に対して広範囲の抗菌スペクトルを有し、特に *P. aeruginosa* に対して優れた抗菌力を示す^{3,4)}。BIPM は、既存カルバペネム系薬である imipenem, meropenem (MEPM) および panipenem に比べヒト腎 dehydropeptidase-I に対する安定性が高く、臨床的に同酵素阻害薬の併用を必要とせず単剤で使用できる抗菌薬である⁵⁾。また BIPM のヒトにおける常用投与量は、他のカルバペネム系薬の 1 日投与量が 500 mg×2 回であるのに対し、300 mg×2 回である⁶⁾。

本研究では、新規カルバペネム系薬である BIPM の *P. aeruginosa* に対する短時間殺菌力を imipenem/cilastatin (IPM/CS), MEPM および ceftazidime (CAZ) と比較した。また、*in vitro* pharmacokinetic model を用いてヒト血漿中薬物濃度推移にシミュレートし、BIPM の 300 mg/回投与における *P. aeruginosa* に対する殺菌効果を IPM/CS および MEPM の 500 mg/回投与でのそれと比較した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

当社保存の臨床分離株 *P. aeruginosa* TH-4643, TH-4245, CC-704 および実験室株 *P. aeruginosa* PAO 1 株を使用した。

2. 使用薬剤

BIPM は日本ワイスレダリー(株)より分与されたものを使用した。IPM/CS (萬有製薬), MEPM (住友製薬) および CAZ (グラクソ・スミスクライン) は市販品を力価換算して使用した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法⁷⁾に準じた寒天平板希釈法で MIC を測定した。感受性測定用培地として Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) を使用した。使用菌株に対する各薬剤の MIC を Table 1 に示した。

4. 短時間殺菌力試験

Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) にて一夜培養した被験菌液を新鮮 MHB で 10^6 CFU/mL または 10^8 CFU/mL に調整し、さらに 37°C で振盪培養した。培養開始 2 時間後、所定濃度になるように各抗菌薬を添加し、さらに振盪培養を続けた。抗菌薬添加後、経時的にサンプリングし、残存生菌数 (CFU/mL) を測定した。

5. *In vitro* pharmacokinetic model による殺菌力試験

1) 実験装置および実験方法

実験装置は希釈型の 3 チャンネル薬物濃度シミュレーションシステムを使用した (Fig. 1)。本システムはコンピュータ (GATEWAY 2000 P 5-90, GATEWAY) でペリスタポンプ (ATTO AC-2120, アトー(株) および EYELA SMP-23 S, 東京理化学機(株)) を制御することにより培養槽内の薬物濃度を 1 分ごとに調節するものである。薬物濃度を上昇させるには高濃度の薬液を培養槽に添加し、低下させるには新鮮 MHB を添加した。

*神奈川県横浜市港北区師岡町 760

Table 1. Antibacterial activity of tested drug against *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	biapenem	imipenem/ cilastatin	meropenem	ceftazidime
<i>P. aeruginosa</i>				
PAO 1	0.5	1	0.5	1
TH-4643	1	2	1	2
TH-4245	4	4	1	1
CC-704	1	1	1	1

The MICs were determined using the agar dilution method.

培養液は増加分を常に排出することにより一定に保った。シミュレーションシステムの作動条件は中川らの報告⁸⁾およびヒト第I相臨床試験^{9,10)}の結果から算出された各薬剤の常用投与量を投与した時の各種薬物動態パラメータを用いた。使用したパラメータを Table 2 に、そのパラメータを使用した場合の各抗菌薬の濃度推移を Fig. 5; D に示した。

2) 殺菌力試験

MHB にて一夜培養した被験菌液を MHB で 100 倍に希釈し、これの 1 mL を培養槽中の MHB 100 mL に添加した。スターラーで攪拌しながら 37°C で 2 時間前培養した後、薬剤液の添加を開始し、経時的にサンプリングし、残存生菌数 (CFU/mL) を測定した。

II. 結 果

1. 短時間殺菌力試験

P. aeruginosa PAO 1 および 2 株の臨床分離 *P. aeruginosa* に対する BIPM の短時間殺菌力を IPM/CS、

MEPM および CAZ と比較した。

P. aeruginosa PAO 1 に対し、BIPM の 0.5, 1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用では 1 時間後に 0.5, 0.9 および 1.2 log の生菌数減少が認められ、IPM/CS の 1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用では 1 時間後に共に 1.2 log の生菌数の減少が認められた。IPM/CS の 0.5 $\mu\text{g/mL}$ では作用 1 時間後に 0.4 log の生菌数の減少が認められたが、作用 6 時間後で再増殖がみられた。1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用で 1 時間後までの生菌数の減少は MEPM は 0.3 および 0.6 log であり、CAZ は共に 0.3 log であった。MEPM の 0.5 $\mu\text{g/mL}$ では作用 1 時間後に 0.1 log、作用 6 時間後に 1.5 log の生菌数減少が認められたが、8 時間以降に再増殖がみられた。CAZ の 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 作用では生菌数減少が認められなかった (Fig. 2)。

また、MIC が PAO 1 株の 2 倍である *P. aeruginosa* TH-4643 に対し、1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用で 1 時間後に、BIPM は 0.9 および 1 log、IPM/CS は 0.8 および 1 log の生菌数の減少が認められた。MEPM の 1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用で 1 および 2 時間作用後には生菌数減少はほとんど認められなかったが、6 時間後に 1.7 および 2.7 log の生菌数減少が認められた (Fig. 3)。また他臨床分離 2 株でも BIPM の殺菌効果は同様の傾向がみられた (データ示さず)。

2. 短時間殺菌力におよぼす接種菌量の影響

BIPM, IPM/CS および MEPM の MIC が同じである *P. aeruginosa* CC-704 を用いて菌量と殺菌力について検討した。10⁶ CFU/mL 接種の場合、BIPM の 1 お

Table 2. Pharmacokinetic parameters of carbapenem in humans

Drug	Dose diffusion time	Model	V 1 (L)	K _{e1} (L/h)	α (L/h)	β (L/h)	C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
Biapenem	300 mg/30 min	ivd-2	10.309	3.046	4.809	0.740	18.56	9)
Imipenem/cilastatin	500 mg/30 min	ivd-2	7.300	1.666	3.935	0.731	37.95	8)
Meropenem	500 mg/30 min	ivd-2	9.668	5.306	8.627	0.972	28.32	10)

ivd: intravenous drip infusion.

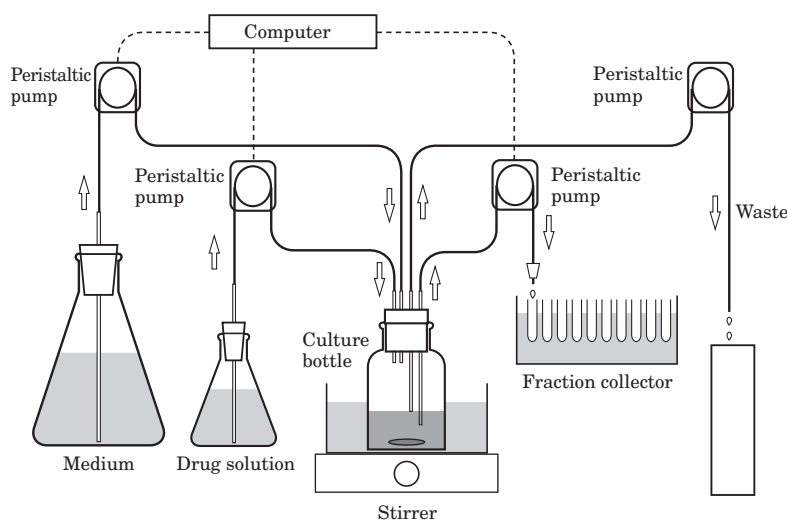


Fig. 1. Apparatus for simulating the plasma concentrations of drugs after diffuse administration.

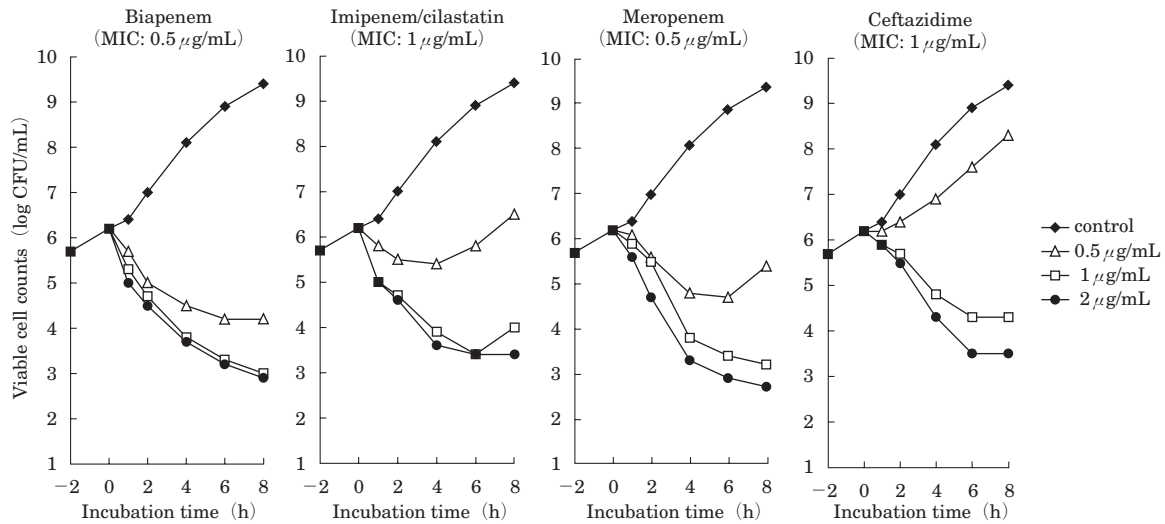


Fig. 2. Bactericidal activity of biapenem, imipenem/cilastatin, meropenem and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1.

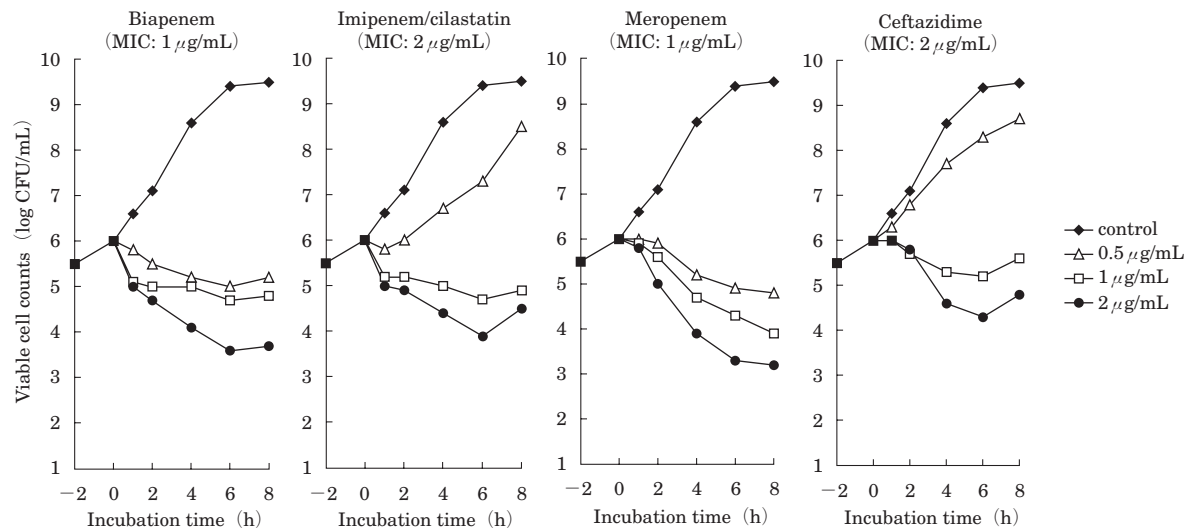


Fig. 3. Bactericidal activity of biapenem, imipenem/cilastatin, meropenem and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* TH-4643.

よび $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で 1 時間後に 0.5 および 0.8 log, 6 時間後に 1.8 および 2.7 log の生菌数減少が認められた。一方, IPM/CS では $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で 1 時間後に 1.0 log, 6 時間後に 2.4 log の生菌数減少を示した。しかし, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では BIPM と異なり, 8 時間以降に再増殖がみられた。MEPM の $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では 1 時間後に 0.2 log の生菌数減少であったが, 6 時間後に 3 log の減少が認められ, BIPM より大きかった。しかし, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で 1 時間後に生菌数減少が認められず, 6 時間後においても 1.2 log の生菌数減少であり BIPM と比べ小さかった。CAZ の $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では 1 時間後で 0.3 log の生菌数減少であったものの, その後に減少が認められ, 作用 6 時間後に 2.0 log の生菌数減少が認められた。 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ では生菌数の減少は認められなかった (Fig. 4)。接種菌量を 10^8 CFU/mL とした場合でも, 10^6 CFU/mL

接種時と同様に BIPM の 1 および $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で 1 時間後に 0.4 および 0.8 log, 6 時間後に 1.9 および 2.4 log の生菌数減少が認められた。IPM/CS および MEPM の $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で 1 時間後に 0.7 および 0.9 log, 6 時間後に 2.2 および 2.2 log の生菌数減少が認められたが, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では, BIPM と異なり作用 1 時間後に若干 (0.5 log) の生菌数減少が認められるものの, 2~4 時間後以降に再増殖がみられた。CAZ の $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ でも生菌数の減少が認められず, 抗菌薬無添加と同様に生菌数が推移した。

3. *In vitro* pharmacokinetic model での殺菌力試験

BIPM, IPM/CS および MEPM に対して感受性を示す *P. aeruginosa* PAO 1, および 2 株の臨床分離 *P. aeruginosa* を用いて BIPM, IPM/CS および MEPM のヒト常用投与量投与時の血漿中濃度をシミュレートし

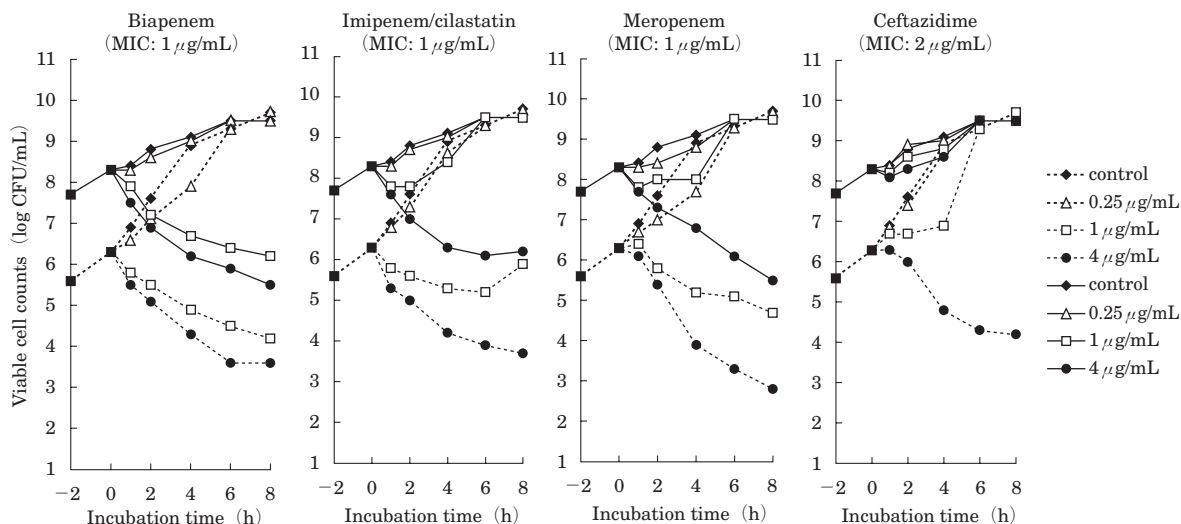


Fig. 4. Bactericidal activity of biapenem, imipenem/cilastatin, meropenem and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* CC-704.

た場合の生菌数推移を検討した (Fig. 5)。 *P. aeruginosa* PAO 1 では、生菌数の推移は BIPM, IPM/CS および MEPM と同様であり、抗菌薬添加後 3 時間でそれぞれ 2.5, 2.6 および 2.7 log の生菌数減少が認められた。BIPM の場合、抗菌薬を添加した時点の生菌数まで菌が再増殖する時間 (effective regrowth time, ERT)¹¹⁾ は、12.4 時間であり、IPM/CS および MEPM のそれは 11.3 および 11.0 時間であった (Fig. 5; A)。

BIPM, IPM/CS および MEPM の ERT は、 *P. aeruginosa* TH-4643 では、それぞれ 11.6, 11.8 および 10.0 時間であり (Fig. 5; B), *P. aeruginosa* TH-4245 でも同様の生菌数推移を示し、それぞれ 11.8, 12.0 および 10.5 時間であった (Fig. 5; C)。

III. 考 察

カルバペネム系薬はグラム陽性菌からグラム陰性菌、特に緑膿菌にまで強い殺菌力をもつことが知られており、米国において重症感染症に対する治療薬として推奨されている¹²⁾。今回、新規カルバペネム系薬である BIPM の *P. aeruginosa* に対する短時間殺菌力を IPM/CS, MEPM および CAZ のそれと比較検討した。 *P. aeruginosa* PAO 1 に対しては、BIPM の 1 µg/mL 以上の作用で IPM/CS と同程度の生菌数減少が認められた。また、MEPM および CAZ は作用 1 時間以内では生菌数の減少は少なく、BIPM および IPM/CS より遅れて殺菌作用を示した。臨床分離株である TH-4643 および CC-704 に対する殺菌作用も同様であった。松田らは、 *P. aeruginosa* に対して抗菌薬作用後 1 時間以内におこる殺菌 (初期殺菌能) は MEPM および CAZ に比べ、IPM および PAMP の方が強いとしている¹³⁾。この殺菌力の違いについて、生方らは緑膿菌の penicillin binding proteins (PBPs) に対する各抗菌薬の親和性

の違いにより考察している¹⁴⁾。すなわち BIPM は殺菌性に関与していると考えられている PBP 4 に親和性が強く、PBP 3 に親和性が強い MEPM および CAZ よりも結果として優れた殺菌力を示すものと推察している¹⁴⁾。今回の検討でも、BIPM の初期殺菌能が IPM/CS と同程度であり、MEPM および CAZ に比べ強く、生方らの報告¹⁴⁾と同様の結果が得られた。また、接種菌量を 10⁸ CFU/mL と高とした実験条件下において、BIPM は 10⁶ CFU/mL 接種の場合と同様に 1 µg/mL 作用でも強い殺菌力を示した。しかし、IPM/CS, MEPM および CAZ は同じ条件では殺菌力を示さなかった。すなわち、高接種菌量とした場合、BIPM の短時間殺菌力は IPM/CS, MEPM および CAZ に比べ強いことが考えられた。すでに BIPM の殺菌効果は、IPM/CS と同程度に接種菌量の影響を受け、MEPM および CAZ より受けにくいとの報告¹⁵⁾もある。今回の検討でも BIPM の短時間殺菌力は、接種菌量の影響を受けにくいことが明らかになった。

臨床でのヒトへの BIPM の通常投与量は 300 mg/回であり、IPM/CS および MEPM は 500 mg/回である。 *In vitro* pharmacokinetic model を用いてこの投与量での BIPM, IPM/CS および MEPM 投与後のヒト血漿中濃度推移をシミュレートした場合の *P. aeruginosa* の生菌数推移の違いを ERT にて比較した。 *P. aeruginosa* の 3 株に対する BIPM の ERT は、IPM/CS および MEPM と同程度であった。殺菌作用の優れている β-ラクタム系薬の菌再増殖抑制効果を検討するには殺菌作用がよく反映する ERT の方が比較しやすいこと¹¹⁾から本検討を実施した。BIPM の 300 mg/回投与は、IPM/CS および MEPM の 500 mg/回と同等以上の殺菌効果を示した。

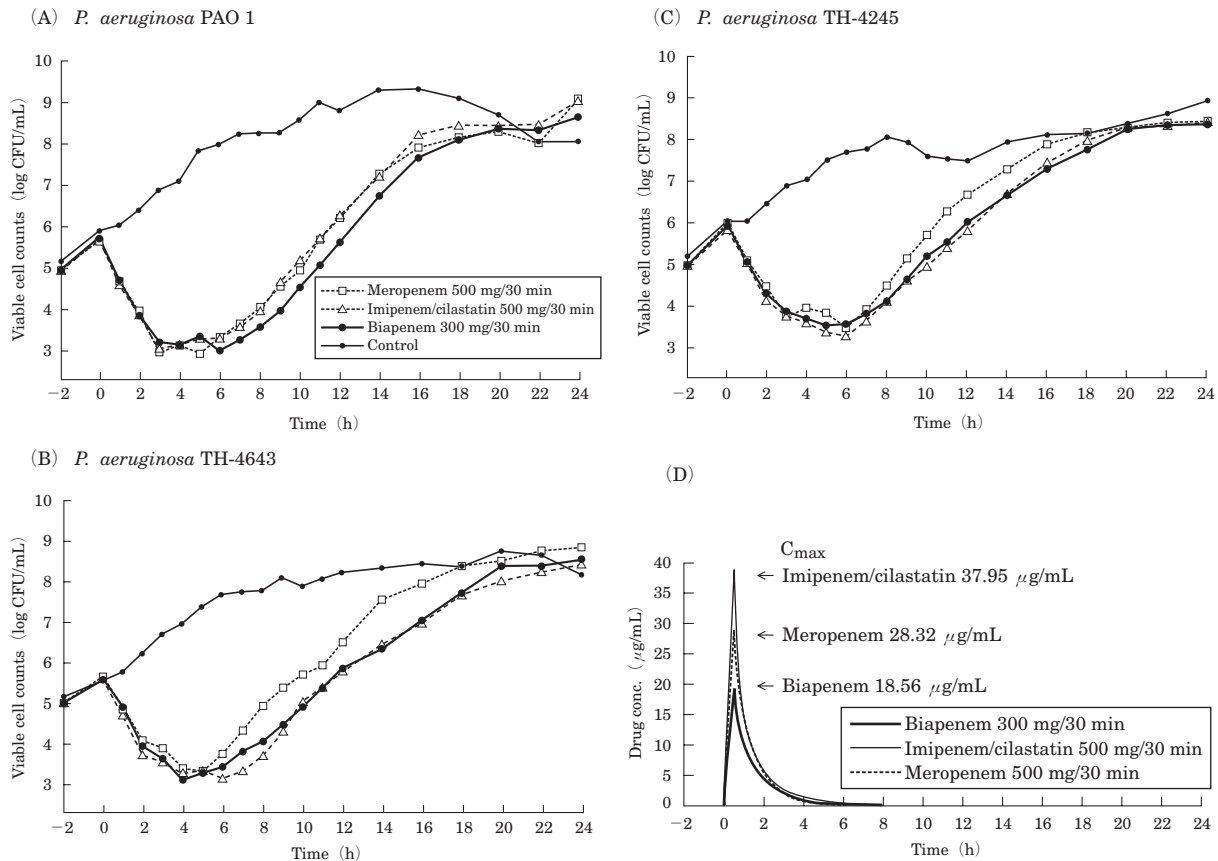


Fig. 5. Bactericidal activity of biapenem, imipenem/cilastatin and meropenem against 3 strains of *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model; (A) *P. aeruginosa* PAO 1, (B) *P. aeruginosa* TH-4643, (C) *P. aeruginosa* TH-4245, (D) Time concentration curves simulating the plasma level of carbapenems after a single diffuse administration of the clinical dosage.

以上、BIPMは*P. aeruginosa*に対して強い殺菌力をもつこと、特に初期殺菌力が強くかつその殺菌力は菌数の影響を受けにくいことなどから、緑膿菌感染症に優れた治療効果を示すことが期待できる抗菌薬と考えられた。

文 献

- 井上松久, 野々山勝人, 井田孝志, 他: カルバペネム剤の細菌学的特徴。臨床と微生物 21: 391~397, 1994
- 井上松久, 笹原武志: 抗菌力について。カルバペネム系抗生物質 (原 耕平 編), p. 73~80, 医薬ジャーナル社, 東京, 1995
- Hikida M, Kawashima K, Nishiki K, et al.: Renal dehydropeptidase-I stability of LJC 10,627, a new carbapenem antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 481~483, 1992
- 吉田益史, 渡辺正人, 三橋 進: 新規カルバペネム系抗生物質 biapenem の細菌学的評価。日化療会誌 42 (S-4): 1~19, 1994
- 村上研一郎, 宮崎修一, 金子康子, 他: 新 carbapenem 系抗生物質 Biapenem の細菌学的研究。Chemotherapy 42 (S-4): 37~54, 1994
- 原 耕平, 松本文夫, 河田幸道, 他: 各種感染症に対する biapenem の臨床的検討。Jpn. J. Antibiot. 52: 629~660, 1999
- 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
- 中川圭一, 小山 優, 早瀬 清, 他: Imipenem (MK-0787), cilastatin sodium (MK-0791), MK-0787/MK 0791 臨床第一相試験。Chemotherapy 33 (S-4): 357~378, 1985
- 齋藤 玲, 三浦敏明, 多羅尾史明: Biapenem の体内動態に関する研究。Chemotherapy 42 (S-4): 277~284, 1994
- 新薬シンポジウム: Meropenem。第 39 回日本化学療法学会総会, 東京, 1991
- 石井孝弘, 菅野利恵, 原 哲郎, 他: Cefminox (CMNX) の菌再増殖抑制効果。新薬と臨床 39: 1612~1623, 1990
- Gilbert D N, Moellering R C, Sande M A: The Stanford Guide to Antimicrobial Therapy 2000. Antimicrobial Therapy, Inc, 2000
- 松田耕二, 井上松久: 初期殺菌能による抗菌薬の評価。Jpn. J. Antibiot. 53: 667~671, 2000
- 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他: 緑膿菌に対する biapenem, meropenem および ceftazidime の抗菌作用の比較。日化療会誌 50: 1~9, 2002
- 疋田宗生, 森 真彦, 橋田多美: Biapenem の *in vitro* 評価。Chemotherapy 42 (S-4): 91~101, 1994

Evaluation of *in vitro* bactericidal activity of biapenem against
Pseudomonas aeruginosa

Minako Araake, Makiko Tabata, Masaki Shimizu, Mariko Tani,
Tetsuro Hara and Hiroomi Watabe

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 760 Morooka-cho,
Kouhoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

The bactericidal activity of biapenem (BIPM) against *Pseudomonas aeruginosa* was compared with that of imipenem/cilastatin (IPM/CS), meropenem (MEPM) and ceftazidime (CAZ) in a short-term *in vitro* pharmacokinetic model simulating the typical plasma levels of these drugs in human. The short-term bactericidal activity of BIPM against *P. aeruginosa* was similar to that of IPM/CS. The initial bactericidal activity of BIPM against *P. aeruginosa* was stronger than those of MEPM or CAZ. The short-term bactericidal activity of BIPM and IPM/CS against *P. aeruginosa* was not affected by the inoculum size. The bactericidal activity against *P. aeruginosa* in a model simulating the plasma level after a drip infusion of BIPM (300 mg/30 min) in humans was equal to those of IPM/CS (500 mg/30 min) and MEPM (500 mg/30 min). These results suggest that BIPM is useful for the treatment of infectious disease caused by *P. aeruginosa*.