

【原著・基礎】

Pseudomonas aeruginosa 敗血症モデルにおける biapenem , meropenem および ceftazidime 投与時の臓器障害抑制作用

武藤 祐子・高田 利彦・川畑 敏枝・疋田 宗生・渡部 宏臣

明治製菓株式会社感染症研究所*

(平成 16 年 1 月 30 日受付・平成 16 年 3 月 17 日受理)

Pseudomonas aeruginosa 感染によるラット敗血症モデルでのカルバペネム系薬の biapenem (BIPM), meropenem (MEPM) およびセフェム系薬の ceftazidime (CAZ) の治療効果および種々臓器障害への影響を比較した。

敗血症モデルは, cyclophosphamide 処置ラットに 10^8 CFU の *P. aeruginosa* を静脈内投与で感染させて構築した。抗菌薬は感染 2 時間および 8 時間後皮下投与した。血液中生菌数は感染 12 時間後に測定した。生体反応の相対評価として, 臓器障害パラメータの乳酸脱水素酵素 (LDH), BUN, GPT も感染 12 時間後に測定した。

BIPM, MEPM および CAZ はいずれも有意な治療効果を示し, その効果はほぼ同等であった。BIPM は LDH に対しても有意な抑制効果を示したが, MEPM および CAZ は抑制効果を示さなかった。さらに BIPM の LDH 抑制効果は CAZ の効果より有意に強かった。BUN または GPT に対して, BIPM および MEPM は有意な抑制効果を示した。白血球数および血小板数に対し, いずれの抗菌薬も影響を示さなかった。

本研究では, *P. aeruginosa* 感染による敗血症モデルに対し, 治療効果はカルバペネム系薬とセフェム系薬でほぼ同等であるが, 臓器障害抑制効果の面ではカルバペネム系薬 BIPM および MEPM はセフェム系薬 CAZ より優ることが示された。さらに, 臓器障害抑制効果の面では BIPM は MEPM より優る可能性も示唆された。以上より, *P. aeruginosa* 感染による sepsis 治療においてカルバペネム系薬を選択することは予後改善の面でのよいと考えられる。

Key words: sepsis, *Pseudomonas aeruginosa* infection, biapenem, β -lactams, organ dysfunction

Sepsis において, 治療に用いられる抗菌薬の種類によってはサイトカインなどメディエーター産生を介して生体障害を増悪させ, septic shock 誘発の危険性を増大させうると考えられている¹⁻³⁾。このメカニズムの一つとして, 抗菌薬によるエンドトキシン遊離作用があげられる。近年, ceftazidime (CAZ) 処理により *Pseudomonas aeruginosa* から遊離したエンドトキシンがサイトカインなど炎症性メディエーター産生を促すこと, さらには *P. aeruginosa* 感染マウスにおいて imipenem (IPM) は致死改善効果を有するが, CAZ 投与により致死増悪作用がみられることが報告された⁴⁾。すなわち, CAZ は IPM に比べて生体障害性を強く引き起こし, 生体を死にいたらしめる可能性が考えられる。今回われわれは *P. aeruginosa* 感染敗血症モデルを用い, biapenem (BIPM), meropenem (MEPM) および CAZ による臓器障害パラメータへの影響を比較して, 各抗菌薬の生体障害性の違いを評価することを目的とした。

I. 材料と方法

1. 使用動物

7 週齢の雄性 SD-IGS ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を用いた。Cyclophosphamide (Sigma 社) を 50 mg/kg で投与し, 4 日後白血球減少ラットとして使用した。

2. 使用菌株

臨床分離された *P. aeruginosa* TH4665 株を用いた。この株に対する BIPM, MEPM, CAZ の MIC はそれぞれ 1, 0.5, 2 μ g/mL である。

3. 使用抗菌薬

抗菌薬は力価の明らかな以下の製剤を使用した。Biapenem (BIPM, 明治製菓株式会社), meropenem (MEPM, 住友製薬株式会社), および ceftazidime (CAZ, 田辺製薬株式会社) である。

4. *P. aeruginosa* 感染ラット敗血症モデルに対する治療効果および臓器障害への影響

1) 接種菌液の調製

凍結保存されている TH4665 株を Mueller-Hinton agar (MHA, Difco 社) 平板に塗抹し, 37 °C, 18 時間培養後, 新しい MHA 平板に継代培養した菌体を感染用菌株とした。感染当日感染用菌株をエーゼでかき取り, 適宜菌懸濁液を作成し, 分光光度計 (日立 U-2000A) にて 660 nm の OD 値が約 0.3 (約 10^8 CFU/mL) になるよう生理食塩液 (大塚製薬株式会社) で希釈調整したものを接種菌液とした。

2) 感染実験

白血球減少ラットをケタミン (三共株式会社, 60 mg/kg, i.m.) とキシラジン (バイエル株式会社, 2 mg/kg, i.m.) で麻酔し, 左大腿部静脈を露出させ, 菌液を大腿静脈内に 0.3 mL 接種し感染を惹起させた。感染 12 時間後に麻酔したラットの頸静脈よりヘパリン採血を行った。採取した血液は, 血液中生菌数, 血小板数および白血球数測定用に一部分取した。残りの血液は lactate dehydrogenase (LDH) (全身障害パラメータ), BUN (腎障害パラメータ), GPT (肝障害パラメータ) の測定用として, 4 で 3,000 rpm, 10 分間遠心して得られた血漿を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターでろ過し使用した。

3) 抗菌薬投与

各抗菌薬は用時, 生理食塩液で希釈調製し, 感染 2 時間および 8 時間後に皮下投与した。試験群および投与量は以下の通りである。なお, 投与量は臨床投与量比で設定した。BIPM 投与群は投与量 3.1 mg/kg, MEPM 投与群は投与量 5.2 mg/kg, CAZ 投与群は投与量 10.4 mg/kg, 抗菌薬非投与群では, 生理食塩液 8 mL/kg である。

5. データ処理

血液中生菌数は平均値 \pm 標準偏差 (mean of log CFU \pm S.D.) で, LDH, BUN および GPT は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表した。統計処理は paired 検定を行った。BUN については parametric な Dunnett の多重比較検定を, それら以外は nonparametric な Steel の多重比較検定を, 抗菌薬非投与群を対照として行った。有意水準を 5% とし, 抗菌薬非投与群と有意差があった群に関しては, さらに抗菌薬投与群間比較を行った。BUN については parametric な Tukey-Kramer の多重比較検定を, それら以外は nonparametric な Steel-Dwass の多重比較検定を, 抗菌薬投与群間総当たりで行った。

II. 結果

1. 生菌数および 24 時間生存率に及ぼす各抗菌薬の影響

感染 12 時間後までに抗菌薬非投与群の生菌数は経時的に上昇し, 12~13 時間後に全例死亡した (データ未掲載)。抗菌薬投与群ではいずれの群も, 抗菌薬非投与群に比べ有意な生菌数抑制効果が認められた (Fig. 1)。

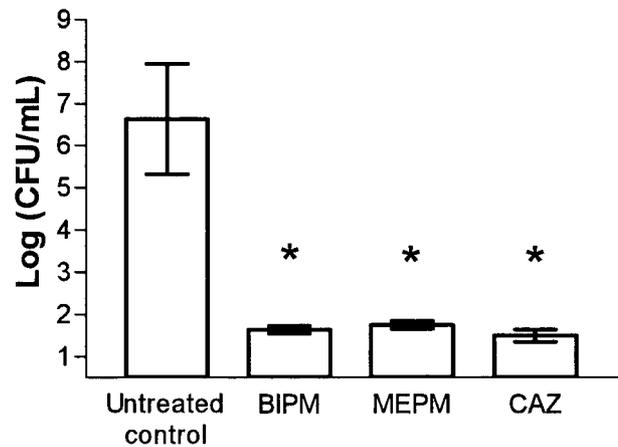


Fig. 1. Effects of biapenem, meropenem, and ceftazidime on the bacterial cell count in the blood of a rat sepsis model caused by *P. aeruginosa*. Biapenem, meropenem, and ceftazidime were injected subcutaneously 2 and 8 hours after infection at the doses of 3.1, 5.2 and 10.4 mg/kg, respectively. The results were evaluated 12 hours after infection. The values are expressed as means \pm S.D. Each group consisted of 6-7 rats.

*: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

BIPM: biapenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime

2. LDH の上昇に及ぼす各抗菌薬の影響

感染 12 時間後における抗菌薬非投与群の LDH は, 非感染ラットの 281 ± 47.8 U/L に比べ, 約 29 倍上昇した (Fig. 2)。BIPM 投与群では感染 12 時間後で有意な抑制効果が認められた。MEPM 投与群では抑制傾向がみられたが有意ではなかった。CAZ 投与群では抑制効果を示さなかった。

3. BUN の上昇に及ぼす各抗菌薬の影響

抗菌薬非投与群の BUN は, 感染 12 時間後で非感染ラットの 24.6 ± 2.83 mg/mL に比べ 2.5 倍上昇した (Fig. 3)。BIPM および MEPM 投与群では, 感染 12 時間後に有意な BUN 上昇の抑制効果が認められたが, CAZ 投与群では有意な抑制効果を示さなかった。

4. GPT の上昇に及ぼす各抗菌薬の影響

抗菌薬非投与群の GPT は, 非感染ラットの 53 ± 1.2 U/L に比べ, 約 24 倍上昇した (Fig. 4)。BIPM および MEPM 投与群では, 感染 12 時間後で有意な抑制効果が認められた。しかし, CAZ 投与群では有意な抑制効果を示さなかった。データは示していないが, GOT および総ビリルビンも GPT とほぼ同様の結果であった。

5. 白血球数および血小板数に及ぼす各抗菌薬の影響

抗菌薬非投与群の白血球数は非感染ラットの $1 \pm 0.0 \times 10^6$ cells/ μL と同じであり, BIPM, MEPM および CAZ 投与による影響はなかった (データ未掲載)。抗菌薬非投与群の血小板数は, 非感染ラットの $9.5 \pm 1.40 \times 10^4$ cells/ μL の約 1/2 であり, BIPM, MEPM および CAZ 投与に

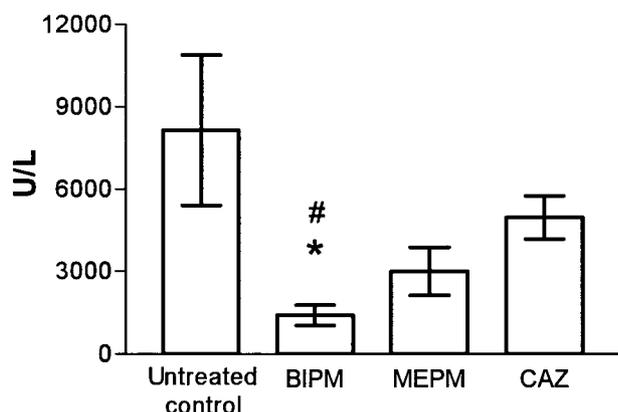


Fig. 2. Effects of biapenem, meropenem, and ceftazidime on the plasma lactate dehydrogenase (LDH) values in the rat sepsis model caused by *P. aeruginosa*. Biapenem, meropenem, and ceftazidime were injected subcutaneously 2 and 8 hours after infection at the doses of 3.1, 5.2 and 10.4 mg/kg, respectively. The results were evaluated 12 hours after infection. The values are expressed as means \pm S.E. Each group consisted of 6-7 rats.

*: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

[#]: $P < 0.05$ versus ceftazidime by Steel-Dwass' multiple comparison test.

BIPM: biapenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime

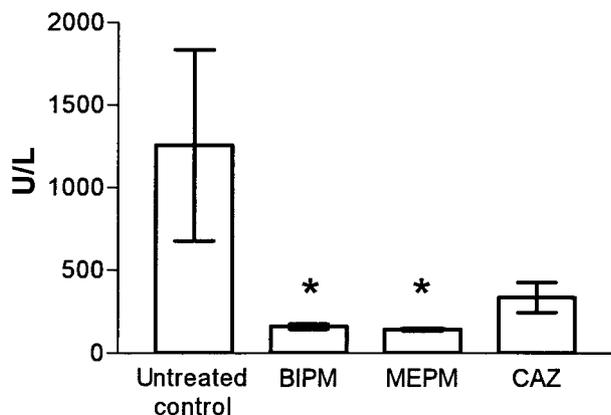


Fig. 4. Effects of biapenem, meropenem, and ceftazidime on the plasma GPT values in the rat sepsis model caused by *P. aeruginosa*. Biapenem, meropenem, and ceftazidime were injected subcutaneously 2 and 8 hours after infection at the doses of 3.1, 5.2 and 10.4 mg/kg, respectively. The results were evaluated 12 hours after infection. The values are expressed as means \pm S.E. Each group consisted of 6-7 rats.

*: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

BIPM: biapenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime

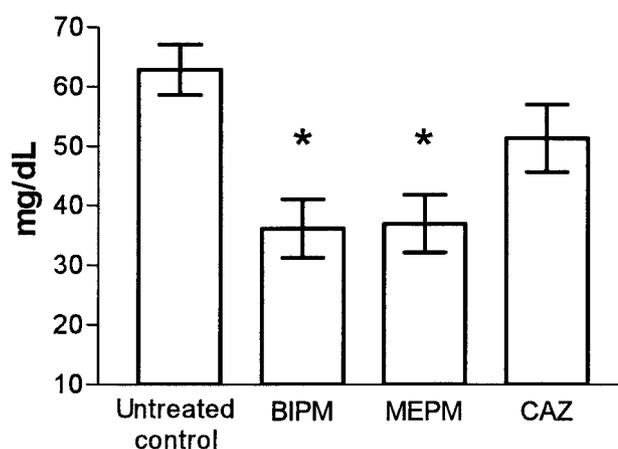


Fig. 3. Effects of biapenem, meropenem, and ceftazidime on the plasma BUN values in the rat sepsis model caused by *P. aeruginosa*. Biapenem, meropenem, and ceftazidime were injected subcutaneously 2 and 8 hours after infection at the doses of 3.1, 5.2 and 10.4 mg/kg, respectively. The results were evaluated 12 hours after infection. The values are expressed as means \pm S.E. Each group consisted of 6-7 rats.

*: $P < 0.05$ versus untreated control by Steel's multiple comparison test.

BIPM: biapenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime

よる影響はなかった（データ未掲載）。

III. 考 察

Sepsis とは、感染に伴って引き起こされる SIRS (全身性炎症症候群) である、と 1992 年米国集中治療学会救急医学会と胸部外科学会の合同会議にて定義された⁵⁾。Sepsis と診断された患者において、比較的順調に基礎疾患が改善され抗菌薬療法も奏功する患者がみられる一方、病態が急速に悪化し死にいたる患者も少なくない。Sepsis の重症化要因の一つ、エンドトキシンは抗菌薬の種類によってその遊離量が異なることが報告されている¹⁻³⁾。また実際、病態の悪化には抗菌薬自体の影響やエンドトキシン以外の物質との相互作用も考えられる。今回われわれは、sepsis における病態の重症化を臓器障害パラメータで評価し、臓器障害抑制効果が大きい抗菌薬が予後改善効果を有すると考えて抗菌薬の比較検討を行った。

今回の検討において、抗菌薬非投与群の生菌数および臓器障害パラメータ値は感染 2 時間、8 時間および 12 時間後において経時的に上昇し、感染 12~13 時間後に抗菌薬非投与群は全例死亡した。よって、抗菌薬投与による評価は生菌数および臓器障害パラメータ値がもっとも高い、すなわち重症度がもっとも大きい時点（感染 12 時間後）において行った。BIPM 3.1 mg/kg、MEPM 5.2 mg/kg および CAZ 10.4 mg/kg を用いたところ、いずれの抗菌薬投与群でも有意な感染治療効果がみられ、その

効果はほぼ同等であった。しかし、BIPM は MEPM と同等以上の臓器障害抑制効果を示し、また CAZ は両者に劣るものであった。Kirikae らの報告によれば、IPM は CAZ よりエンドトキシン遊離量が小さく、*P. aeruginosa* 由来エンドトキシンショックモデルにおいて IPM は明らかな致死抑制効果を示したが、CAZ では致死増悪効果がみられている⁴⁾。この効果の違いは、IPM と CAZ の PBP サブタイプへの結合親和性の違いによることが考えられる。すなわち、*P. aeruginosa* において IPM は PBP2 への親和性が高く、*P. aeruginosa* を球状化させるのに対し、CAZ は PBP3 への結合親和性が高いため *P. aeruginosa* をフィラメント化させる。菌が球状化する場合エンドトキシン遊離は小さく、フィラメント化した場合にはエンドトキシン遊離が大きい^{4,6,7)}。BIPM は IPM と同様には PBP2 への結合親和性が高く、菌を球状化させて溶菌させるのに対し、MEPM は PBP3 への結合親和性も比較的高く、菌に球状化とフィラメント化のどちらも引き起こす^{2,3)}。よって *P. aeruginosa* に対するエンドトキシン遊離作用は、CAZ > MEPM > BIPM、IPM であると想像される。しかし、Kirikae らはエンドトキシン低感受性マウスでも CAZ による致死改善効果が認められなかったことから、生菌や生体成分からの遊離物質による影響も考えられると指摘している。さらに、最近の報告によれば、カルバペネム系抗菌薬と CAZ のエンドトキシン遊離作用について、*in vitro* と *in vivo* 動物モデルでは抗菌薬によるエンドトキシン遊離量に相違がある報告がなされた⁸⁾。以上の報告から、抗菌薬による生体障害性の違いは、エンドトキシンだけでは説明ができないものである。今回われわれは敗血症の病態悪化を臓器障害で評価したが、臓器障害とエンドトキシンについては詳細な検討を行っていないため、今後、サイトカインなどメディエーターの関与も含めた検討が必要であろう。

以上より、BIPM、MEPM および CAZ は *P. aeruginosa* 感染による敗血症モデルにおいて、ほぼ同等の感染治療効果を示すものの臓器障害としては BIPM がもっとも大きな抑制効果を示し、以降 MEPM、CAZ の順に作用が弱かった。これらの結果は、予後改善効果の面でカルバペ

ネム系抗菌薬がセフェム系抗菌薬より優る可能性を示唆したものである。臨床でのカルバペネム系薬の有用性の差異に関しては種々の議論がある^{5,8)}が、さらなる臨床データの蓄積および解析が大いに期待される。

謝 辞

本報告に際し、実験にご協力いただきました明治製薬(株)感染症研究所 榭原四郎氏、山上陽子氏、生体障害パラメータに関して測定および議論いただきました明治製薬(株)動態安全性研究所 伊藤富美氏に対し深謝いたします。

文 献

- 1) Holzemer R G: Antibiotic induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. J Chemother 13: 159 ~ 172, 2001
- 2) Periti P, Mazzei T: Antibiotic-induced release of bacterial cell wall components in the pathogenesis of sepsis and septic shock: a review. J Chemother 10: 427 ~ 448, 1998
- 3) Lepper P M, Held T K, Schneider E M, et al: Clinical implications of antibiotics-induced endotoxin release in septic shock. Intensive Care Med 28: 824 ~ 833, 2002
- 4) Kirikae T, Kirikae F, Saito S, et al: Biological characterization of endotoxin released from antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 42: 1015 ~ 1021, 1998
- 5) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 20: 864 ~ 874, 1992
- 6) 生方公子, 杉浦 睦, 紺野昌俊, 他: カルバペネム系抗菌薬, biapenem の *in vitro* 抗菌力について。Chemotherapy 42 (S-4) 20 ~ 25, 1994
- 7) 西野武志, 多田央子, 大槻雅子, 他: Meropenem の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 40 (S-1) 50 ~ 66, 1992
- 8) Tsuji M, Matsuda H, Miwa H, et al: Antimicrobial-induced release of endotoxin from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of *in vitro* and animal models. J Antimicrob Chemother 51: 353 ~ 359, 2003

Efficacy of biapenem, meropenem, and ceftazidime in improvement of organ dysfunction in an experimental sepsis model caused by *Pseudomonas aeruginosa*

Yuko Muto, Toshihiko Takata, Toshie Kawabata,
Muneo Hikida and Hiroomi Watabe

Infectious Disease Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

We studied the effects of biapenem (BIPM), meropenem (MEPM), and ceftazidime (CAZ) on the bacterial cell count and organ dysfunction in a rat sepsis model caused by *Pseudomonas aeruginosa*.

The sepsis model was established by infecting cyclophosphamide-treated rats with 10^8 CFU of *P. aeruginosa* via intravenous injection. Each of the antibiotics was injected subcutaneously 2 and 8 hours after infection. The bacterial cell count in the blood was determined 12 hours after infection. In order to evaluate of vital reaction in the infected animals, the parameters of organ dysfunction such as plasma lactate dehydrogenase (LDH), BUN, and GPT values were measured 12 hours after infection.

BIPM, MEPM, and CAZ had a significant therapeutic effect almost at the same level. BIPM showed a significant decrease in LDH as well, but MEPM and CAZ did not. Moreover, the effect of BIPM on elevated LDH values was significantly greater than that of CAZ. BIPM and MEPM showed a significant effect on the increases in GPT and BUN. None of these antibiotics had an effect on decreased WBC or platelet counts.

The results of this study showed that the therapeutic effects of carbapenems and cepheems are almost equal with respect to improvement of organ dysfunction in the rat sepsis model caused by *P. aeruginosa*, and that carbapenems are superior to cepheems. Moreover, the results suggested that the effect of BIPM on organ dysfunction is stronger than that of MEPM. In conclusion, the prognosis of sepsis caused by *P. aeruginosa* infection is better when carbapenems are chosen for treatment.