

【原著・基礎】

 β ラクタマーゼ産生菌に対する doripenem の抗菌力

岡本 了一・中野 竜一・佐藤 優子・井上 松久

北里大学医学部微生物学*

(平成 17 年 1 月 31 日受付・平成 17 年 3 月 1 日受理)

Doripenem (DRPM) の各種 β ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力を imipenem, cefotaxime, ceftazidime および cefepime と比較して検討した。 β ラクタマーゼは大きく 4 つのクラスに分類できるが, DRPM は基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) を含むクラス A, グラム陰性菌の染色体性セファロスポリナーゼを含むクラス C およびオキサシリン分解型ペニシリナーゼを含むクラス D β ラクタマーゼ産生菌に強い抗菌力を示した。しかし, IMP 型 β ラクタマーゼに代表されるクラス B に属するカルバペネマーゼ産生菌に対する抗菌力は弱いことが明らかになった。

また, β ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力は, IPM のそれに比べて 2~4 倍強かった。

Key words: doripenem, β -lactamase, antibacterial activity

Doripenem (DRPM) は塩野義製薬株式会社で開発された 4 位にメチル基と 3 位にスルファモイルアミノメチル置換ピロリジリチオ基を有する新規の注射用カルバペネム系抗菌薬で^{1,2)}, 好気性のグラム陽性菌やグラム陰性菌のみならず嫌気性菌に対しても強い抗菌力を有している³⁻⁶⁾。

臨床分離菌が β ラクタム系薬に耐性を示す機序は, 一部の菌種の場合を除いて β ラクタマーゼ産生によることが多い。 β ラクタマーゼは, そのアミノ酸の一次配列の相同性から大きくクラス A, B, C および D の 4 つに分類され, 各クラスはさらに基質特異性などによって細分類されている⁷⁾。今回, DRPM の *in vitro* 抗菌力を評価する目的で, グラム陰性桿菌の β ラクタマーゼ産生株に対する抗菌力を imipenem (IPM), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) および cefepime (CFPM) と比較検討し, DRPM の β ラクタム系薬における位置づけを行った。

I. 材料と方法

1. 使用抗菌薬

被験抗菌薬として DRPM (塩野義製薬) を用いた。主な対照抗菌薬として IPM (万有製薬), CAZ (グラクソスミスクライン), CFPM (プリストルマイヤーズ) を用いた。実験によっては CTX (アベンティスファーマ) も使用した。

2. 使用菌株

各クラスの β ラクタマーゼ産生株に対する抗菌力を測定するために, 当研究室保存の実験株 11 株を用いた。すなわち, KU2013, KU2017, KU2015 および KU2014 は, いずれもクラス A に属するペニシリナーゼ産生株で, それぞれ TEM-1, SHV-1, PSE-3 および OXA-1 産生プラスミドを保有する菌株である。KU1026 はクラス B

に属する IMP 型カルバペネマーゼを産生するプラスミドを保有している。また, KU2008, KU1787, KU1788, KU2004 および KU1467 は, それぞれ *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* および *Serratia marcescens* の染色体性 β ラクタマーゼ産生遺伝子をクローニングしたプラスミドを保有する菌株である。ちなみにクラス A に属する *P. vulgaris* の β ラクタマーゼ以外はすべてクラス C に属する AmpC タイプのセファロスポリナーゼである。これらプラスミドの受容菌として *Escherichia coli* χ 1037 NA 株を用いた。

また, 1992~1996 年に臨床から分離された *E. coli* および *Klebsiella pneumoniae* のうち β ラクタマーゼ産生株を選択して用いた。その内訳は, 臨床分離された *E. coli* 43 株および *K. pneumoniae* 31 株で, β ラクタマーゼ非産生の *E. coli* 14 株も対照として用いた。

さらに, 染色体性 AmpC β ラクタマーゼの抗菌力に及ぼす影響を調べるために, *E. cloacae* KU68 および本菌を親株として CAZ あるいは CTM により選択された AmpC 産生量の異なる変異株 4 株を用いた。

3. β ラクタマーゼ産生性の確認

臨床分離菌の β ラクタマーゼ産生の確認には, P/CaseTEST (日水製薬) およびメタロ β ラクタマーゼ SMA '栄研' を用いた。すなわち, 臨床分離 *E. coli* および *K. pneumoniae* を P/CaseTEST を用いてペニシリナーゼおよびセファロスポリナーゼ産生を確認した。ペニシリナーゼ産生性が認められた株については NCCLS の Extended spectrum β -lactamase (ESBL) 産生菌検出法⁸⁾を実施し, ペニシリナーゼ産生菌と ESBL 産生菌を分

Table 1. Antibacterial activity of doripenem against β -lactamase-producing strains of *E. coli*

Strain	β -lactamase origin and type	MIC ($\mu\text{g/mL}$)*			
		DRPM	IPM	CAZ	CFPM
Class A					
KU2013	plasmid, TEM-1	0.25	0.5	0.5	0.5
KU2017	plasmid, SHV-1	0.5	1	4	16
KU2015	plasmid, PSE-3	0.25	0.25	0.5	0.06
KU2008	chromosome, <i>P. vulgaris</i>	0.25	2	8	0.25
Class B					
KU1026	plasmid, IMP	32	16	256	64
Class C					
KU1787	chromosome, <i>C. freundii</i>	0.25	1	32	0.5
KU1788	chromosome, <i>E. cloacae</i>	0.25	2	32	0.5
KU2004	chromosome, <i>M. organii</i>	0.5	1	32	0.12
KU1467	chromosome, <i>S. marcescens</i>	0.12	0.5	16	2
Class D					
KU2014	plasmid, OXA-1	0.25	0.5	0.5	32
1037 **		0.25	1	0.5	0.12

* Inoculum size: 10^8 cfu/mL

** Host strain

類した。セファロスポリナーゼ産生が認められた株については接合伝達性が認められるか否かを確認し、プラスミド性と染色体性に分類した。また、カルバペネマーゼ産生性が疑われる菌株については、メタロ β ラクタマーゼ SMA '栄研' を用いて確認した。

β ラクタマーゼ活性の定量には、基質として cephalothin (CET) を用いた UV 法を用いた。酵素活性は菌体蛋白 1 mg 当たりの活性として表示した。

4. MIC 測定

MIC の測定は、日本化学療法学会の寒天平板希釈法に準じて行った⁹⁾。ただし、試験によっては微量液体希釈法で用いられている $1 \mu\text{g/mL}$ を基準とした薬剤希釈濃度を用いた。菌株の前培養には感受性測定用ブイヨン (日水製薬) を、MIC 測定には感性ディスク用培地 N (日水製薬) を用いた。

II. 結 果

1. 各クラスの β ラクタマーゼ産生株に対する抗菌力

Table 1 に各クラスの β ラクタマーゼ産生株に対する DRPM の MIC を IPM, CAZ および CFPM のそれと比較して示した。各クラスの β ラクタマーゼの抗菌力に対する影響をみるために、接種菌量が 10^8 cfu/mL の場合の MIC を測定した。

CAZ はクラス B, クラス C および一部のクラス A β ラクタマーゼにより抗菌力が大きく影響を受けること、また CFPM はクラス B, クラス D および一部のクラス A β ラクタマーゼにより抗菌力が影響を受けることが明らかになった。一方、DRPM や IPM などのカルバペネム系薬は、クラス B β ラクタマーゼには影響を受けるが、それ以外のクラスの酵素にはほとんど影響を受けな

いことが判明した。

2. 臨床分離の β ラクタマーゼ産生株に対する抗菌力

臨床分離の *E. coli* および *K. pneumoniae* の β ラクタマーゼ産生株に対する DRPM の抗菌力を IPM, CTX, CAZ および CFPM と比較して MIC 測定を行い、その幾何平均を Table 2 に示した。

E. coli は、プラスミド性あるいは染色体性の AmpC 産生株、カルバペネマーゼ産生株、ESBL 産生株、ペニシリナーゼ産生株および β ラクタマーゼ非産生株に分類された。CTX や CAZ はペニシリナーゼ産生株に対しては強い抗菌力を示すものの、AmpC 産生株、ESBL 産生株およびカルバペネマーゼ産生株には抗菌力が弱かった。また、CFPM はペニシリナーゼ産生株や AmpC 産生株に対しては優れた抗菌力を示すが、ESBL 産生菌に対しては抗菌力が低下した。しかしながら、DRPM や IPM は、カルバペネマーゼ産生株を除く β ラクタマーゼ産生株に対して、非産生株に対するのと同等の強い抗菌力を示した。また、DRPM の抗菌力は IPM のそれに比べると少なくとも 4 倍以上優っていた。

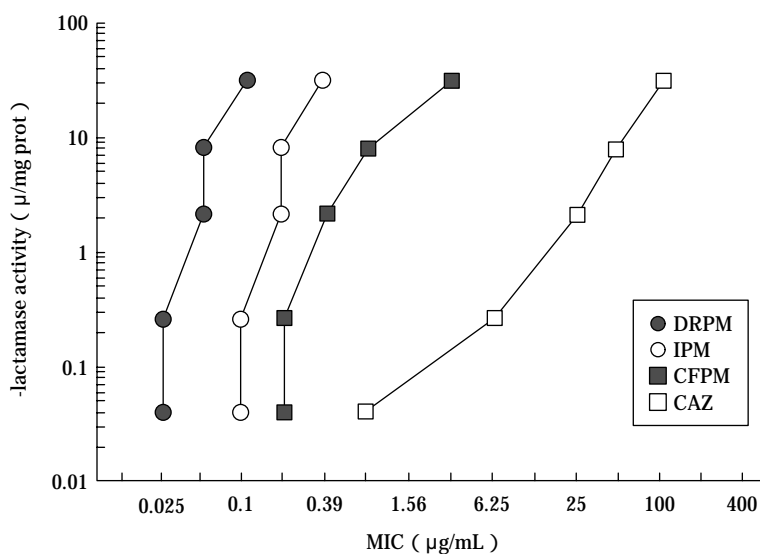
K. pneumoniae は ESBL 産生株とペニシリナーゼ産生株に分類された。CTX, CAZ, CFPM はペニシリナーゼ産生菌には強い抗菌力を示すが、ESBL 産生株に対しては抗菌力が低下した。一方、DRPM は IPM と同様にいずれの産生株に対しても優れた抗菌力を示した。

3. AmpC β ラクタマーゼの MIC に及ぼす影響

E. cloacae KU68 株およびその AmpC 産生量の異なる変異株を用いて、AmpC β ラクタマーゼが抗菌力に及ぼす影響をそれぞれの株に対する MIC で表現して Fig. 1 に示した。CAZ では酵素産生量が増加するに伴い MIC

Table 2. Antibacterial activity of doripenem against β -lactamase-producing clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*

Organism	No. of isolates	Geometric mean of MICs ($\mu\text{g/mL}$)*				
		DRPM	IPM	CTX	CAZ	CFPM
<i>E. coli</i>						
AmpC producer (plasmid-mediated)	5	0.10	0.50	294	42	0.22
AmpC producer (chromosomal)	9	0.04	0.31	1.7	2.2	0.06
Carbapenemase producer	3	1.6	2.0	40	32	0.63
ESBL producer **	16	0.04	0.16	> 206	13	7.6
Penicillinase producer	10	0.04	0.16	0.11	0.19	0.06
Non- β -lactamase producer	14	0.04	0.13	0.099	0.11	0.06
<i>K. pneumoniae</i>						
ESBL producer **	20	0.06	0.20	76	52	7.2
Penicillinase producer	11	0.04	0.19	0.082	0.18	0.08

* Inoculum size: 10^6 cfu/mL** Extended-spectrum β -lactamaseFig. 1. Influence of β -lactamase production on the activities of doripenem and other β -lactams in *E. cloacae* KU68.

が大きく変化し、その抗菌力が AmpC 産生量の影響を強く受けることが判明した。一方、DRPM や IPM では酵素産生量が増加しても MIC の変動は 4 倍以内であり、その抗菌力が AmpC 産生量の影響を受けにくいことが判明した。CFPM の MIC の変化は、この両者の中間を示した。

III. 考 察

1980 年代に第三世代セフェム系薬が開発され、臨床現場で汎用されるようになって以来、過去にはなかった新たな β ラクタマーゼ産生菌が出現するなどして臨床問題となっている。臨床現場で問題となりうる主な β ラクタマーゼ産生菌として① *E. coli* や *K. pneumoniae* から多く検出される ESBL 産生菌、②グラム陰性桿菌の AmpC 産生菌、および③主に *S. marcescens* や *Pseudomonas aeruginosa* などから検出されるカルバペネマーゼ産生菌などが挙げられる^{7,10-12)}。

ESBL 産生菌は、抗菌スペクトルの広い第三世代セ

フェム系薬にも耐性を示すことから世界的に問題となっている。わが国でも確実に増加傾向にあり、最近の調査によると全国平均で *E. coli* で 0.5%、*K. pneumoniae* で 1.2% であるが¹³⁾、川上らの病院単位の調査では、*E. coli* で 2.1%、*K. pneumoniae* で 7.2% と全国調査の結果よりも高く¹⁴⁾、ESBL 産生菌が院内感染菌として広がりつつあることを物語っている。これら ESBL 産生菌に対して、CTX や CAZ などの第三世代セフェム系薬に加えて CFPM など第四世代セフェム系薬は抗菌力が弱い、DRPM を含むカルバペネム系薬は強い抗菌力を有していることが判明した。

AmpC β ラクタマーゼ産生菌には染色体性とプラスミド性の 2 つがある。プラスミド性 AmpC は欧米で比較的高率に検出され、例えば、米国の調査ではその検出率は *E. coli* で 4%、*K. pneumoniae* で 8.5% であるが¹⁵⁾、わが国においては低い頻度で検出はされているもの

の¹⁶⁾、その実態については明らかになっていないのが現状である。一方、ほとんどの腸内細菌科の菌種や *P. aeruginosa* などでは、すべての菌株が染色体上に AmpC 産生遺伝子をもっており、その産生は誘導産生調節機構によって巧妙に調節されている。しかし、近年、 β ラクタム系薬の汎用に伴い、誘導産生調節機構に破綻を来した脱抑制型の多量産生株がこれらのグラム陰性桿菌に認められるようになってきた。 β ラクタマーゼ研究会(代表世話人:橋本一)の全国調査によると、*E. cloacae* で 32.6%、*P. aeruginosa* で 19.4% が CAZ 耐性菌であり、その多くが AmpC β ラクタマーゼ産生によるものであると結論している¹³⁾。染色体性あるいはプラスミド性にかかわらず AmpC β ラクタマーゼ多量産生菌に対して第三世代セフェム系薬は抗菌力が弱い。CFPM など AmpC に対する親和性が弱く AmpC に対して安定とされる第四世代セフェム系薬も酵素産生量が低い菌株に対しては強い抗菌力を示すが、多量産生菌になると抗菌力が低下することが明らかとなった。しかし、DRPM は AmpC 多量産生菌に対しても強い抗菌力を有していることが判明した (Fig. 1)。

カルバペネマーゼ産生菌はわが国で初めて分離されたが¹⁷⁾、最近では海外でも報告されるようになってきた。わが国で分離されるカルバペネマーゼは IMP 型に分類されるものが多く、主に *S. marcescens* や *P. aeruginosa* から検出されることが多い。最近の調査でも、*S. marcescens* で 0.5%、*P. aeruginosa* で 0.3% とその検出率は未だ低いが確実に分離されている¹³⁾。また、最近では *E. coli*、*K. pneumoniae*、*E. cloacae* あるいは *Acinetobacter* spp. などからの報告例もある。カルバペネマーゼ産生菌に対しては piperacillin (PIPC) や aztreonam (AZT) が抗菌力を有するものの、第三世代・第四世代セフェム系薬をはじめカルバペネム系薬は加水分解されるために抗菌力が弱い。DRPM の抗菌力を検討したところ、IPM と同様に抗菌力が弱いことが判明した。

わが国における β ラクタマーゼ産生菌の現状をみると、グラム陰性桿菌の染色体性 AmpC β ラクタマーゼ多量産生株の分離率は高いものの、それ以外の注意を要する β ラクタマーゼ産生菌の分離率はさほど高くない。しかしながら、 β ラクタム系薬が最も多く使用される現状を考えると、今後これらの β ラクタマーゼ産生菌が増加することは必至である。加えて、臨床ではクラスの異なる複数の β ラクタマーゼを産生している菌株も分離されており、今後は β ラクタム系薬耐性機構が複雑化する傾向にある。

すべての β ラクタム系薬を加水分解しうる β ラクタマーゼはないのと同様、いかなる β ラクタマーゼにも加水分解されない β ラクタム系薬もない。そんな中であって DRPM は IPM と同様にクラス B に属するカルバペネマーゼ産生株に対しては抗菌力が弱いものの、ESBLs

を含むクラス A や AmpC と呼ばれるクラス C およびクラス D に属する β ラクタマーゼ産生菌に対しては強い抗菌力を有しており、その抗菌力は IPM のそれよりも強く、DRPM の感受性菌に対する強い抗菌力を反映していた。したがって、今回の検討で得た結果を総合的に判断すると、DRPM は β ラクタマーゼ産生菌に対して IPM と同程度もしくはそれ以上に有効な β ラクタム系薬であると位置づけられる。

文 献

- 1) Iso Y, Irie T, Nishino Y, et al: A novel 1 β -methylcarbapenem antibiotic, S-4661: synthesis and structure-activity relationships of 2-(5-substituted pyrrolidin-3-ylthio)-1 β -methylcarbapenems. *J Antibiotics* 49: 199 ~ 209, 1996
- 2) Iso Y, Irie T, Iwaki T, et al: synthesis and modification of a novel 1 β -methyl carbapenem antibiotic, S-4661. *J antibiotics* 49: 478 ~ 484, 1996
- 3) Tsuji M, Ishii Y, Ohno A, et al: In vitro and in vivo antibacterial activities of S-4661, a new carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 94 ~ 99, 1998
- 4) Watanabe A, Takahashi H, Kikuchi T, et al: comparative in vitro activity of s-4661, a new parenteral carbapenem, and other antimicrobial agents against respiratory pathogens. *Chemotherapy* 46: 184 ~ 187, 2000
- 5) Mikamo H, Izumi K, Xiang Hua Y, et al: In vitro and in vivo antibacterial activities of a new injectable carbapenem, S-4661, against gynaecological pathogens. *J Antimicrob Chemother* 46: 471 ~ 474, 2000
- 6) Nomura S, Nagayama A: In vitro antibacterial activity of S-4661, a new parenteral carbapenem, against urological pathogens isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J Chemother* 14: 155 ~ 160, 2002
- 7) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme of β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211 ~ 1233, 1995
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standards-6th ed. M7-A6, Wayne, USA, 2003
- 9) 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
- 10) Philippon A, Arlet G, Jacoby G A: Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1 ~ 11, 2002
- 11) Nordmann P, Poirel L: Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321 ~ 331, 2002
- 12) Bonnet R: growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1 ~ 14, 2004
- 13) 小栗豊子, 猪狩 淳, 平松啓一, 他: 主要な臨床分離細菌の β ラクタマーゼ産生性と抗菌薬感受性 全国 104 施設の成績. *Jpn J Antibiotics* 55 (Suppl A) 1 ~ 27, 2002
- 14) 川上小夜子, 斧 康雄, 山本美和, 他: 帝京大学医学部附属病院における cefotaxime 耐性の *Escherichia*

- coli* と *Klebsiella pneumoniae* の検出状況。感染症学雑誌 73: 1110 ~ 1115, 1999
- 15) Alvarez M, Tran J H, Chow N, et al: Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. Antimicrob Agents Chemother 48: 533 ~ 537, 2004
- 16) Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, et al: CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -lactamase with *anpR* gene originating from *Citrobacter freundii*. Antimicrob Agents Chemother 48: 1151 ~ 1158, 2004
- 17) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 35: 147 ~ 151, 1991

Antibacterial activity of doripenem against β -lactamase-producing strains

Ryoichi Okamoto, Ryuichi Nakano, Yuko Sato and Matsuhisa Inoue

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine,
1 15 1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa, Japan

We studied the *in vitro* antibacterial activity of doripenem (DRPM), a novel carbapenem, compared to imipenem, cefotaxime, ceftazidime, and cefepime, against β -lactamase-producing bacteria. DRPM was active against class A strains, including extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and against class C and D producers, but not against class B. DRPM activity against β -lactamase producers was 2-4 times stronger than that of IPM.