

【原著・基礎】

Doripenem の *in vitro* 抗菌力

藤村 享滋・木村 美司・吉田 勇・東山伊佐夫・地主 豊
宗景 正・黒田 直美・土肥 正善・西川 徹・山野 佳則

塩野義製薬株式会社創薬研究所*

(平成 17 年 2 月 1 日受付・平成 17 年 3 月 16 日受理)

新規カルバペネム系抗菌薬 doripenem(DRPM)の *in vitro* 抗菌活性について検討した。DRPM は好気性グラム陽性菌から陰性菌および嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。また各種細菌の 2002 年臨床分離株を用いた感受性試験において、DRPM は、*Staphylococcus* 属のメチシリン感性株や *Streptococcus* 属に対して 0.016 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC₉₀ を示し、腸内細菌科の各菌種や *Moraxella catarhalis*, *Haemophilus influenzae* に対しても 0.031 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC₉₀ を示し、優れた抗菌力を有していた。他のカルバペネム系抗菌薬の抗菌力と比較すると、おおむね好気性グラム陽性菌では imipenem (IPM) や panipenem に次ぐ優れた活性を有し、好気性グラム陰性菌では meropenem(MEPM) に次ぐ優れた活性を有していた。さらに *Pseudomonas aeruginosa* に対する MIC₅₀, MIC₉₀ はおのおの 0.5, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、試験をした抗菌薬の中で最も強い抗 *P. aeruginosa* 活性を示した。こうした DRPM の抗菌力は培地 pH や接種菌量などの諸因子の影響を受けにくいことも示された。また *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* に対する MBC 測定や time-kill study から、抗菌力に伴った強い殺菌力を備えもつことも示された。DRPM は他のカルバペネム系抗菌薬と同様に metallo- β -lactamase により加水分解を受けたが、基質拡張型 β -lactamase も含めて class A, C, D の β -lactamase に対して安定であった。DRPM の作用機序である penicillin-binding protein(PBP) への結合親和性を検討した結果、DRPM は MEPM と同様に *S. aureus* の PBP1, *P. aeruginosa* の PBP2, PBP3, *E. coli* の PBP2 の活性を主に阻害することにより抗菌力を発揮しているものと考えられた。*S. aureus*, *P. aeruginosa* および *E. coli* の各株を DRPM, MEPM または IPM 薬剤存在下で継代培養して得られた菌株では、いずれの薬剤に対しても MIC の上昇がみられ、互いに交叉耐性を示した。

Key words: doripenem, antibacterial activity, penicillin-binding protein

Doripenem(DRPM) は、塩野義製薬株式会社で合成された 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ニルチオ基を有する新規カルバペネム系抗菌薬である¹⁾(Fig. 1)。好気性および嫌気性のグラム陽性菌および陰性菌に対して、幅広い抗菌スペクトルを示し、特に imipenem (IPM) 耐性株や ceftazidime (CAZ) 耐性株を含む *Pseudomonas aeruginosa* に対して、既存のカルバペネム系抗菌薬よりも強い抗菌力を示す化合物として開発された²⁾。

本研究では、各種細菌の標準株、臨床分離株に対する抗菌力、抗菌力に及ぼす諸因子の影響、殺菌力に関する検討に加え、 β -lactamase 安定性や DRPM の作用機序である penicillin-binding protein(PBP) への結合親和性、試験管内耐性獲得についても検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用抗菌薬

DRPM (塩野義製薬), imipenem (IPM, U. S. Pharmacopeia), meropenem (MEPM, 住友製薬), panipenem

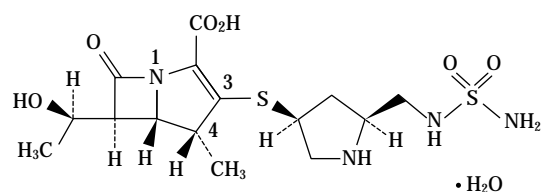


Fig. 1. Chemical structure of doripenem.

(PAPM, 三共), biapenem(BIPM, ワイス), および ceftazidime(CAZ, U. S. Pharmacopeia), penicillin G(PCG, U. S. Pharmacopeia), oxacillin (MPIPC, U. S. Pharmacopeia), ampicillin (ABPC, U. S. Pharmacopeia), vancomycin (塩野義製薬), amikacin (U. S. Pharmacopeia), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ, U. S. Pharmacopeia), cephalothin(CET, 塩野義製薬)の力価が明らかな原末を使用した。SBT/CPZ は 1 : 1 の合剤とし、CPZ の濃度で表記した。

*大阪府豊中市二葉町 3 1 1

Table 1. Antibacterial spectrum of doripenem

Organism		MIC (µg/mL)					
		doripenem	meropenem	imipenem	panipenem	biapenem	ceftazidime
Aerobic bacteria							
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P JC-1	0.016	0.063	0.008	0.008	0.031	8
	ATCC25923	0.016	0.063	0.016	0.016	0.063	8
	SR14 ^{a)}	0.063	0.063	0.016	0.031	0.063	8
	SR3626 ^{b)}	32	64	64	32	64	> 64
	SR3636 ^{b)}	4	8	2	2	16	> 64
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC14990	0.016	0.063	0.016	0.016	0.063	4
	SR19474 ^{c)}	16	32	64	32	64	> 64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC29970	0.063	0.125	0.008	0.008	0.063	8
	SR18868 ^{d)}	64	64	> 64	64	> 64	> 64
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC15305	0.125	0.25	0.063	0.063	0.125	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC10389	0.004	0.008	0.004	0.004	0.004	0.063
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC9925	0.016	0.016	0.008	0.008	0.016	0.25
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TYPE III	0.008	0.008	0.008	0.004	0.008	0.25
	ATCC49619 ^{e)}	0.063	0.063	0.031	0.016	0.063	1
	SR19669 ^{f)}	0.25	0.5	0.125	0.063	0.25	8
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC49456	0.016	0.016	0.016	0.016	0.063	0.25
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC9811	0.063	0.063	0.063	0.063	0.125	0.5
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC10556	0.063	0.125	0.063	0.063	0.125	0.5
<i>Streptococcus parasanguis</i>	ATCC15912	0.004	0.008	0.008	0.016	0.008	0.125
<i>Streptococcus gordonii</i>	ATCC10558	0.016	0.016	0.016	0.008	0.016	0.25
<i>Streptococcus crista</i>	ATCC51100	0.016	0.063	0.031	0.016	0.063	0.25
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC33397	0.031	0.063	0.016	0.008	0.016	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	4	2	1	0.5	2	64
<i>Enterococcus faecium</i>	NCTC7171	8	8	1	1	8	> 64
<i>Enterococcus avium</i>	ATCC14025	4	8	1	0.5	4	> 64
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC9341	0.063	0.063	0.016	0.016	0.063	0.5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	TORONT	0.063	0.063	0.008	0.008	0.063	2
<i>Bacillus anthracis</i>	ATCC14578	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	64
<i>Bacillus cereus</i>	IFO3001	0.016	0.063	0.063	0.031	0.016	32
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	0.016	0.063	0.016	0.016	0.031	4
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2	0.016	0.016	0.125	0.063	0.031	0.125
	ATCC25922	0.031	0.016	0.125	0.125	0.031	0.25
<i>Shigella dysenteriae</i>	SR1007	0.063	0.031	0.25	0.25	0.5	0.125
<i>Shigella flexneri</i>	SR1008	0.031	0.016	0.25	0.125	0.25	0.125
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC11060	0.031	0.031	0.125	0.125	0.063	0.5
<i>Salmonella typhi</i>	901	0.031	0.016	0.125	0.063	0.063	0.125
<i>Salmonella paratyphi</i>	1015	0.063	0.031	0.25	0.25	0.25	0.031
<i>Salmonella enteritidis</i>	G-14	0.063	0.031	0.5	0.25	0.25	0.25
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	0.031	0.016	0.5	0.125	0.063	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883	0.063	0.031	0.5	0.25	0.5	0.125
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182	0.031	0.031	0.125	0.125	0.125	0.125
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	0.063	0.063	0.5	0.25	0.25	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC13048	0.031	0.031	1	0.5	0.125	0.5
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC13880	0.125	0.063	1	0.5	1	0.5
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC29906	0.5	0.063	2	1	2	0.063
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC13315	0.25	0.125	2	1	2	0.063
<i>Providencia rettgeri</i>	ATCC29944	0.125	0.063	0.5	0.5	0.5	0.063
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC29914	0.25	0.031	1	0.5	1	0.25
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC9886	0.063	0.031	0.5	0.5	0.5	0.125
<i>Morganella morganii</i>	ATCC25830	0.125	0.063	2	2	0.5	0.016
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC9610	0.063	0.031	0.5	0.25	0.25	0.063
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC29833	0.031	0.016	0.25	0.125	0.25	0.125
<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC11327	0.5	0.125	1	1	0.5	0.125
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC27562	0.031	0.016	0.063	0.063	0.031	0.25

(Continue)

Organism		MIC (µg/mL)					
		doripenem	meropenem	imipenem	panipenem	biapenem	ceftazidime
<i>Aeromonas hydrophila</i>	IFO3820	2	0.5	2	1	0.25	0.25
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC49247	0.063	0.031	0.125	0.125	0.063	0.25
	ATCC49766	0.125	0.063	0.5	0.5	1	0.063
	ATCC10211 ^{g)}	0.125	0.063	1	0.25	0.5	0.063
	ATCC33533 ^{h)}	0.125	0.063	1	0.25	0.5	0.063
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC7901	0.063	0.031	0.25	0.125	0.25	0.063
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATCC25238	0.008	0.002	0.008	0.002	0.008	0.016
	ATCC43617 ¹⁾	0.016	0.008	0.063	0.016	0.031	0.063
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC49226	0.031	0.016	0.063	0.031	0.063	0.063
<i>Neisseria meningitidis</i>	IID854	0.063	0.031	0.125	0.063	0.125	0.125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	0.25	0.5	2	8	0.5	2
	ATCC25619	0.063	0.031	0.5	2	0.25	2
	SR10451 ¹⁾	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC12633	1	4	0.5	0.25	0.5	4
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC25416	8	4	8	32	8	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC13637	64	64	> 64	> 64	> 64	32
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606	1	2	0.5	1	0.5	16
Anaerobic bacteria							
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC27337	0.25	0.25	0.063	0.031	0.25	2
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	ATCC14963	0.004	0.002	0.016	0.008	0.008	0.125
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	ATCC29328	0.031	0.031	0.031	0.016	0.063	4
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC33270	0.016	0.016	0.016	0.008	0.031	0.25
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	ATCC9321	0.004	0.002	0.008	0.004	0.031	0.125
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	ATCC14953	0.063	0.125	0.016	0.008	0.063	4
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC11827	0.063	0.125	0.016	0.016	0.125	2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	JCM1250	0.25	0.125	0.063	0.063	0.25	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM1122	0.063	0.031	0.016	0.008	0.125	0.5
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707	0.5	0.25	0.125	0.125	0.5	8
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC25986	0.063	0.125	0.031	0.008	0.063	16
<i>Eubacterium limosum</i>	ATCC8486	0.063	0.063	0.031	0.031	0.125	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IFO3205	4	8	2	1	4	64
<i>Lactobacillus casei</i>	IFO3533	4	8	2	2	8	> 64
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ATCC4797	0.125	0.125	0.031	0.031	0.125	2
<i>Lactobacillus ruminis</i>	ATCC27780	0.063	0.063	0.016	0.016	0.063	> 64
<i>Clostridium difficile</i>	ATCC17857	2	2	4	2	8	> 64
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC13124	0.016	0.008	0.063	0.016	0.063	0.063
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC3584	0.125	0.063	0.125	0.063	0.25	32
<i>Mobiluncus curtisii</i>	ATCC35241	0.063	0.063	0.031	0.016	0.125	8
<i>Mobiluncus holmesii</i>	ATCC35242	0.031	0.031	0.016	0.008	0.063	8
<i>Mobiluncus mulieris</i>	ATCC35243	0.031	0.031	0.016	0.008	0.063	8
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC25285	0.125	0.125	0.063	0.063	0.25	32
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC29741	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	> 64
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC29327	0.125	0.063	0.063	0.125	0.125	4
<i>Bacteroides distasonis</i>	ATCC8503	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25	4
<i>Bacteroides ovatus</i>	ATCC8483	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	> 64
<i>Bacteroides uniformis</i>	ATCC8492	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	32
<i>Prevotella bivia</i>	ATCC29303	0.25	0.125	0.063	0.5	0.125	32
<i>Prevotella melaninogenica</i>	GAI5490	0.016	0.031	0.016	0.016	0.063	0.5
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC25611	0.063	0.031	0.031	0.031	0.063	1
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	ATCC25260	0.016	0.031	0.016	0.016	0.063	0.25
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	ATCC9817	0.25	0.125	0.5	0.5	0.5	4
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC25286	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.031
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC25586	0.016	0.031	0.031	0.031	0.031	4
<i>Fusobacterium varium</i>	ATCC8501	0.25	0.125	0.5	0.5	0.5	> 64
<i>Veillonella parvula</i>	ATCC10790	0.063	0.063	0.063	0.063	0.125	8
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	ATCC33596	0.25	0.063	0.25	0.25	0.5	0.5

MICs were determined by broth microdilution or agar dilution methods as recommended by NCCLS.

^{a)}penicillinase-producing strain, ^{b)}MRSA, ^{c)}MRSE, ^{d)}methicillin, teicoplanin-resistant strain, ^{e)}penicillin-intermediate strain,

^{f)}penicillin-resistant strain, ^{g)}serotype-b, ^{h)}serotype-b, ⁻lactamase-producing strain, ¹⁾-lactamase-producing strain,

^{j)}metallo-⁻lactamase-producing strain

Table 2. Antibacterial activity of doripenem against clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾		
		Range	50%	90%
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (64)	doripenem	0.031-0.125	0.031	0.063
	meropenem	0.063-0.25	0.125	0.125
	imipenem	0.031	0.031	0.031
	panipenem	0.031-0.063	0.031	0.031
	biapenem	0.031-0.125	0.063	0.125
	ceftazidime	8-32	8	16
	vancomycin	0.5-2	1	1
	oxacillin	0.125-2	0.25	0.5
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (88)	doripenem	0.25-32	16	32
	meropenem	1- > 32	32	> 32
	imipenem	0.063- > 32	32	> 32
	panipenem	0.125- > 32	32	> 32
	biapenem	0.5- > 32	32	> 32
	ceftazidime	32- > 32	> 32	> 32
	vancomycin	0.5-2	1	2
	oxacillin	16- > 32	> 32	> 32
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus epidermidis</i> (14)	doripenem	0.031	0.031	0.031
	meropenem	0.031-0.125	0.063	0.125
	imipenem	0.031	0.031	0.031
	panipenem	0.031	0.031	0.031
	biapenem	0.031-0.063	0.063	0.063
	ceftazidime	4-8	4	8
	vancomycin	1-2	1	2
	oxacillin	0.063-0.25	0.125	0.25
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i> (64)	doripenem	0.125-32	2	32
	meropenem	0.5- > 32	4	> 32
	imipenem	0.031- > 32	1	> 32
	panipenem	0.063- > 32	1	32
	biapenem	0.25- > 32	4	> 32
	ceftazidime	8- > 32	32	> 32
	vancomycin	1-2	1	2
	oxacillin	1- > 32	> 32	> 32
Other methicillin-susceptible coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. (17) <i>S. haemolyticus</i> (3), <i>S. lugdunensis</i> (1), <i>S. capitis</i> (3) <i>S. warneri</i> (5), <i>S. caprae</i> (1), <i>S. hominis</i> (3), <i>S. hyicus</i> (1)	doripenem	0.031-0.13	0.031	0.063
	meropenem	0.063-0.25	0.125	0.25
	imipenem	0.031	0.031	0.031
	panipenem	0.031	0.031	0.031
	biapenem	0.031-0.13	0.063	0.125
	ceftazidime	2-16	8	16
	vancomycin	0.5-2	1	2
	oxacillin	0.063-0.25	0.125	0.25
Other methicillin-resistant coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. (61) <i>S. haemolyticus</i> (27), <i>S. saprophyticus</i> (4) <i>S. lugdunensis</i> (18), <i>S. capitis</i> (6), <i>S. caprae</i> (1) <i>S. hominis</i> (4), <i>S. simulans</i> (1)	doripenem	0.031- > 32	1	8
	meropenem	0.125- > 32	2	32
	imipenem	0.031- > 32	0.125	2
	panipenem	0.031- > 32	0.125	16
	biapenem	0.063- > 32	1	32
	ceftazidime	16- > 32	32	> 32
	vancomycin	0.5-2	1	2
	oxacillin	0.5- > 32	> 32	> 32
<i>Streptococcus pyogenes</i> (48)	doripenem	0.016	0.016	0.016
	meropenem	0.016	0.016	0.016
	imipenem	0.016-0.031	0.016	0.016
	panipenem	0.016	0.016	0.016
	biapenem	0.016	0.016	0.016
	ceftazidime	0.063-0.25	0.125	0.125
<i>Streptococcus agalactiae</i> (47)	doripenem	0.016-0.031	0.016	0.016
	meropenem	0.031-0.063	0.031	0.031
	imipenem	0.016-0.031	0.016	0.016
	panipenem	0.016-0.031	0.016	0.016
	biapenem	0.016-0.031	0.031	0.031
	ceftazidime	0.25-1	0.5	0.5
Penicillin-susceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> (37)	doripenem	0.016	0.016	0.016
	meropenem	0.016	0.016	0.016
	imipenem	0.016	0.016	0.016
	panipenem	0.016	0.016	0.016
	biapenem	0.016	0.016	0.016
	ceftazidime	0.063-8	2	8
	penicillin	0.016-0.063	0.063	0.063

(Continue)

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾		
		Range	50%	90%
Penicillin-intermediate and resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> (31)	doripenem	0.016-0.5	0.125	0.25
	meropenem	0.016-0.5	0.125	0.5
	imipenem	0.016-0.125	0.063	0.125
	panipenem	0.016-0.063	0.031	0.063
	biapenem	0.016-0.25	0.063	0.25
	ceftazidime	0.25- > 16	8	16
	penicillin G	0.125-4	1	2
<i>Streptococcus mitis</i> group & <i>Streptococcus sanguis</i> group (26) <i>S. mitis</i> (10), <i>S. oralis</i> (10), <i>S. sanguis</i> (2), <i>S. gordonii</i> (2), <i>S. parasanguis</i> (2)	doripenem	0.016-1	0.016	1
	meropenem	0.016-2	0.031	1
	imipenem	0.016-1	0.016	0.5
	panipenem	0.016-0.5	0.016	0.25
	biapenem	0.016-1	0.031	1
	ceftazidime	0.063- > 16	1	16
	<i>Streptococcus anginosus</i> group (17) <i>S. anginosus</i> (13), <i>S. constellatus</i> (3), <i>S. intermedius</i> (1)	doripenem	0.016-0.063	0.016
meropenem		0.016-0.25	0.031	0.125
imipenem		0.016-0.063	0.016	0.031
panipenem		0.016-0.031	0.016	0.016
biapenem		0.016-0.125	0.016	0.063
ceftazidime		0.25-8	2	4
<i>Enterococcus faecalis</i> (88)		doripenem	2-32	4
	meropenem	2-64	4	16
	imipenem	0.5-8	1	2
	panipenem	0.5-8	1	4
	biapenem	2-32	4	16
	ceftazidime	32- > 64	> 64	> 64
	<i>Enterococcus faecium</i> (55)	doripenem	0.063- > 64	> 64
meropenem		0.125- > 64	> 64	> 64
imipenem		0.063- > 64	> 64	> 64
panipenem		0.063- > 64	> 64	> 64
biapenem		0.063- > 64	> 64	> 64
ceftazidime		8- > 64	> 64	> 64
<i>Enterococcus avium</i> (24)		doripenem	2- > 64	16
	meropenem	4- > 64	16	> 64
	imipenem	0.25- > 64	2	> 64
	panipenem	0.25- > 64	2	> 64
	biapenem	2- > 64	16	> 64
	ceftazidime	64- > 64	> 64	> 64
	<i>Escherichia coli</i> (117)	doripenem	0.016-0.063	0.031
meropenem		0.016-0.063	0.016	0.016
imipenem		0.063-1	0.125	0.25
panipenem		0.063-0.5	0.125	0.125
biapenem		0.016-0.5	0.031	0.063
ceftazidime		0.063-4	0.125	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (59)		doripenem	0.031-0.25	0.031
	meropenem	0.016-0.063	0.031	0.031
	imipenem	0.125-1	0.25	1
	panipenem	0.063-0.5	0.125	0.5
	biapenem	0.031-2	0.25	0.5
	ceftazidime	0.031-1	0.125	0.25
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (48)	doripenem	0.031-0.125	0.031
meropenem		0.016-0.063	0.031	0.031
imipenem		0.125-1	0.25	0.5
panipenem		0.125-1	0.125	0.25
biapenem		0.063-0.5	0.25	0.5
ceftazidime		0.031-4	0.063	0.25
<i>Morganella morganii</i> (43)		doripenem	0.125-1	0.25
	meropenem	0.031-0.25	0.125	0.25
	imipenem	1-4	2	4
	panipenem	0.5-4	2	2
	biapenem	0.5-2	1	2
	ceftazidime	0.063- > 16	1	16
	<i>Proteus mirabilis</i> (37)	doripenem	0.25-0.5	0.25
meropenem		0.063-0.125	0.063	0.125
imipenem		1-4	2	4
panipenem		0.5-2	1	2
biapenem		0.5-4	2	4
ceftazidime		0.031-0.5	0.063	0.125

(Continue)

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾		
		Range	50%	90%
<i>Proteus vulgaris</i> (28)	doripenem	0.125-0.5	0.25	0.25
	meropenem	0.031-0.125	0.063	0.125
	imipenem	0.5-4	2	4
	panipenem	0.5-4	2	2
	biapenem	0.25-4	2	2
	ceftazidime	0.031-1	0.063	0.5
<i>Providencia</i> spp. (32) <i>P. rettgeri</i> (17), <i>P. stuartii</i> (15)	doripenem	0.063-0.5	0.125	0.25
	meropenem	0.031-1	0.063	0.125
	imipenem	0.5-4	1	2
	panipenem	0.25-4	0.5	1
	biapenem	0.25-4	1	2
	ceftazidime	0.031-4	0.125	4
<i>Citrobacter freundii</i> group (43) <i>C. freundii</i> (31), <i>C. braaki</i> (8), <i>C. youngae</i> (3), <i>C. werkmani</i> (1)	doripenem	0.016-0.5	0.031	0.063
	meropenem	0.016-1	0.031	0.063
	imipenem	0.125-1	1	1
	panipenem	0.125-2	0.5	0.5
	biapenem	0.063-0.5	0.125	0.25
	ceftazidime	0.25- > 16	0.5	> 16
<i>Enterobacter cloacae</i> (65)	doripenem	0.016-0.5	0.063	0.125
	meropenem	0.016-0.5	0.063	0.125
	imipenem	0.25-2	0.5	1
	panipenem	0.125-4	0.25	1
	biapenem	0.031-2	0.125	0.5
	ceftazidime	0.063- > 16	0.5	> 16
<i>Enterobacter aerogenes</i> (32)	doripenem	0.031-2	0.063	0.25
	meropenem	0.016-2	0.031	0.125
	imipenem	0.25-4	1	2
	panipenem	0.25-8	0.5	1
	biapenem	0.125-2	0.5	1
	ceftazidime	0.125- > 16	0.25	> 16
<i>Serratia marcescens</i> (66)	doripenem	0.016-8	0.125	0.25
	meropenem	0.016-16	0.063	0.125
	imipenem	0.016-4	1	2
	panipenem	0.016-8	0.5	1
	biapenem	0.016-8	1	2
	ceftazidime	0.016- > 16	0.25	1
<i>Haemophilus influenzae</i> (70)	doripenem	0.063-4	0.25	1
	meropenem	0.031-1	0.063	0.25
	imipenem	0.25-16	1	4
	panipenem	0.25-8	0.5	4
	biapenem	0.5-16	1	8
	ceftazidime	0.063-1	0.125	0.5
	ampicillin	0.125- > 16	0.5	8
	-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant (BLNAR) strain (23)	doripenem	0.125-4	1
meropenem	0.031-1	0.25	0.5	
imipenem	0.25-16	2	8	
panipenem	0.25-8	2	8	
biapenem	1-16	8	16	
ceftazidime	0.063-1	0.25	0.5	
ampicillin	2- > 16	4	8	
strain other than BLNAR (47)	doripenem	0.063-2	0.125	0.5
	meropenem	0.031-0.25	0.063	0.125
	imipenem	0.25-16	1	2
	panipenem	0.25-8	0.5	2
	biapenem	0.5-16	1	4
	ceftazidime	0.063-0.5	0.125	0.125
	ampicillin	0.125- > 16	0.25	1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (23)	doripenem	0.016-1	0.125	1
	meropenem	0.016-0.5	0.063	0.25
	imipenem	0.063-4	0.5	1
	panipenem	0.063-2	0.25	1
	biapenem	0.016-8	1	2
	ceftazidime	0.031-1	0.063	0.125
	ampicillin	0.125- > 16	0.5	2

(Continue)

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)}		
		Range	50%	90%
<i>Moraxella catarrhalis</i> (42)	doripenem	0.016-0.031	0.031	0.031
	meropenem	0.016	0.016	0.016
	imipenem	0.016-0.063	0.063	0.063
	panipenem	0.016-0.031	0.016	0.031
	biapenem	0.016-0.125	0.063	0.063
	ceftazidime	0.031-0.25	0.125	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (71)	doripenem	0.063-32	0.5	8
	meropenem	0.063-32	1	16
	imipenem	0.25-32	2	16
	panipenem	1-64	8	32
	biapenem	0.063-32	0.5	16
	ceftazidime	0.5- > 64	4	64
	amikacin	0.25- > 64	4	16
	sulbactam/ cefoperazone	1- > 64	16	64
<i>Burkholderia cepacia</i> (21)	doripenem	4-8	8	8
	meropenem	2-4	4	4
	imipenem	4-32	16	16
	panipenem	16-64	32	32
	biapenem	2-16	8	8
	ceftazidime	2-32	4	16
<i>Acinetobacter</i> spp. (35) <i>A. baumannii</i> (29), <i>A. genospecies</i> 3 (3) <i>A. junii</i> (2) <i>A. lwoffii</i> (1)	doripenem	0.125-32	0.25	1
	meropenem	0.125-32	0.25	2
	imipenem	0.125-16	0.25	0.5
	panipenem	0.063-32	0.125	2
	biapenem	0.063-8	0.125	0.5
	ceftazidime	2- > 64	4	32
	<i>Peptostreptococcus</i> spp. (24) <i>P. magnus</i> (8) <i>P. micros</i> (5) <i>P. asaccharolyticus</i> (5) <i>P. anaerobius</i> (3) <i>P. vaginalis</i> (2) <i>P. tetradius</i> (1)	doripenem	0.004-0.125	0.008
meropenem		0.004-0.125	0.016	0.063
imipenem		0.004-0.063	0.016	0.063
panipenem		0.004-0.063	0.016	0.031
biapenem		0.004-0.125	0.016	0.125
ceftazidime		0.5-16	1	16
<i>Clostridium difficile</i> (21)		doripenem	1-8	2
	meropenem	1-16	2	4
	imipenem	2-32	8	8
	panipenem	2-16	4	8
	biapenem	4-64	8	16
	ceftazidime	64- > 64	> 64	> 64
<i>Bacteroides</i> spp. (36) <i>B. fragilis</i> (17) <i>B. thetaiotaomicron</i> (10) <i>B. eggerti</i> (2) <i>B. uniformis</i> (3) <i>B. vulgatus</i> (2) <i>B. caccae</i> (1) <i>B. distasonis</i> (1)	doripenem	0.125-64	0.5	8
	meropenem	0.063-64	0.5	8
	imipenem	0.125-32	0.25	8
	panipenem	0.063-32	0.25	8
	biapenem	0.063-64	0.25	16
	ceftazidime	16- > 64	> 64	> 64
	<i>Prevotella</i> spp. (21) <i>P. melaninogenica</i> (4) <i>P. intermedia</i> (1) <i>P. buccae</i> (3) <i>P. bivia</i> (13)	doripenem	0.031-0.25	0.063
meropenem		0.063-0.25	0.063	0.125
imipenem		0.031-0.25	0.031	0.125
panipenem		0.031-0.5	0.063	0.125
biapenem		0.063-0.125	0.125	0.125
ceftazidime		2- > 64	32	> 64

^{a)} MICs were determined by broth microdilution or agar dilution methods as recommended by NCCLS.

2. 使用菌株

当研究所で保有する標準菌株および日本の 15 医療施設において 2002 年に臨床分離された菌株を用いた。

3. MIC 測定

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) が推奨する方法に準じ^{3,4)}, 好気性菌は broth microdilution 法で, 嫌気性菌と *Neisseria gonorrhoeae* は agar dilution 法で MIC を測定した。感受性測定用培地として, 好気性菌の場合は cation 調整 Mueller-Hinton broth (CAMHB, Becton Dickinson) を, 嫌気性菌の場合

は 5% 馬溶血液添加 Wilkins-Chalgren agar (Becton Dickinson) を用いた。ただし, *Streptococcus* 属と *Haemophilus* 属の場合は 0.5% yeast extract, 0.0015% NAD, 5% 馬溶血液添加 CAMHB を, *N. gonorrhoeae* の場合は supplement 添加 GC 寒天培地 (Becton Dickinson) を用い, *Staphylococcus* 属における MIPIC の MIC 測定のみ 2% NaCl 添加 CAMHB を用いた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

各菌種の標準株 (13 株) を用い, 上記の方法に準拠して MIC を測定した。培地の種類の検討では CAMHB の他

Table 3. Effects of factors on MIC ($\mu\text{g/mL}$) of doripenem

Organism		Broth medium					Inoculum size (CFU/mL) ^{f)}			Medium pH ^{f)}			Inactivated horse serum (% ^{g)})		
		CAMHB ^{a)}	BHI ^{b)}	HIB ^{c)}	TSB ^{d)}	NB ^{e)}	5×10^4	5×10^5	5×10^6	5.5	7.0	8.5	0	10	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P JC-1	0.016	0.031	0.031	0.016	0.008	0.016	0.016	0.031	0.002	0.031	0.031	0.016	0.016	0.063
	ATCC25923	0.031	0.031	0.031	0.016	0.016	0.016	0.031	0.031	0.016	0.031	0.031	0.031	0.031	0.063
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC14990	0.031	0.063	0.063	0.031	0.016	0.016	0.031	0.031	0.008	0.016	0.031	0.031	0.031	0.063
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19433	2	2	2	2	2	2	2	2	0.5	2	4	2	2	4
	ATCC29212	2	2	2	2	2	1	2	2	0.5	2	2	2	2	4
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2	0.016	0.031	0.031	0.031	0.008	0.016	0.016	0.063	0.063	0.031	0.016	0.016	0.031	0.125
	ATCC25922	0.031	0.031	0.031	0.031	0.008	0.016	0.031	0.063	0.063	0.031	0.016	0.031	0.031	0.063
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	0.031	0.031	0.031	0.031	0.008	0.031	0.031	0.125	0.063	0.031	0.031	0.031	0.031	0.125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883	0.063	0.063	0.125	0.125	0.016	0.031	0.063	0.125	0.25	0.125	0.031	0.063	0.063	0.063
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	0.063	0.125	0.063	0.063	0.031	0.063	0.063	0.25	0.125	0.063	0.063	0.063	0.063	0.063
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC13880	0.125	0.125	0.125	0.125	0.031	0.125	0.125	0.25	0.25	0.125	0.25	0.125	0.25	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	0.5	0.25	0.5	0.25	0.125	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	1
	ATCC25619	0.063	0.063	0.063	0.063	0.031	0.063	0.063	0.063	0.063	0.063	0.031	0.063	0.125	0.125

^{a)}Cation-adjusted Mueller Hinton broth, ^{b)}Brain heart infusion broth, ^{c)}Heart infusion broth, ^{d)}Tryptic soy broth, ^{e)}Nutrient broth, ^{f)}MICs were determined by a broth microdilution method with CAMHB.

に brain heart infusion broth, heart infusion broth, tryptic soy broth, nutrient broth (いずれも Becton Dickinson) を用いた。接種菌量の検討では、標準法の 5×10^6 CFU/mL と 5×10^7 または 5×10^8 CFU/mL を比較した。培地 pH の検討では、NaOH または HCl で pH を 5.5, 7.0, 8.5 に調整した CAMHB を用いた。血清添加の検討では非動化馬血清が 10 または 50% になるように添加した CAMHB を用いた。

5. MBC 測定

Staphylococcus aureus および *Escherichia coli* の 2002 年の臨床分離株を用いて、NCCIS が推奨する方法に準じた microdilution 法で行った³⁾。すなわち、菌体を薬剤含有 CAMHB 中で 35 時間で培養し、24 時間後に培養液を採取して、brain heart infusion agar (Becton Dickinson) と混合した。37 度で 1~2 日間培養してコロニー数を計測し、生菌数が初菌数の 1/1,000 となる最小殺菌濃度 (MBC) を求めた。

6. Time-kill study

S. aureus Smith および *E. coli* NIHJ JC-2 の対数増殖期にある約 1×10^8 CFU/mL の菌体を CAMHB 中で 37 度振盪培養し、薬剤を添加して 1, 2.5, 4, 6 時間後の培養液中の生菌数を、上記と同様に測定した。

7. PBP 親和性測定

S. aureus Smith, *P. aeruginosa* ATCC25619, *E. coli* NIHJ JC-2 の膜画分を調製し、 $[^14\text{C}]$ PCG の結合に対する各薬剤の競合試験を Spratt の方法⁴⁾に準じて行った。SDS ボリアクテリウムミッドゲル電気泳動により分画された各 PBP の放射活性の測定は、BAS2000 (富士フイルム) で行い、 $[^14\text{C}]$ PCG の PBP への結合を 50% 阻害する薬剤濃度を IC_{50} とし算出した。

8. β -Lactamase 安定性

各種菌体の破砕物または培養上清より粗精製した β -lactamase を試験に用いた⁷⁾。各薬剤を β -lactamase 存在下で 30 分で反応した時に生じる β -ラクタム環の開裂に伴う吸光度の減少を測定した。セリン型 β -lactamase (class A, C, D) の場合は、 $100 \mu\text{mol/L}$ の薬剤存在下での加水分解速度を、ABPC あるいは CET の加水分解速度に対する相対値として算出した⁸⁾。Metallo- β -lactamase では、解離定数 (K_m) と CET に対する相対値としての最大加水分解速度 (V_{max}) を、Michaelis-Menten の公式に基づいて算出した。

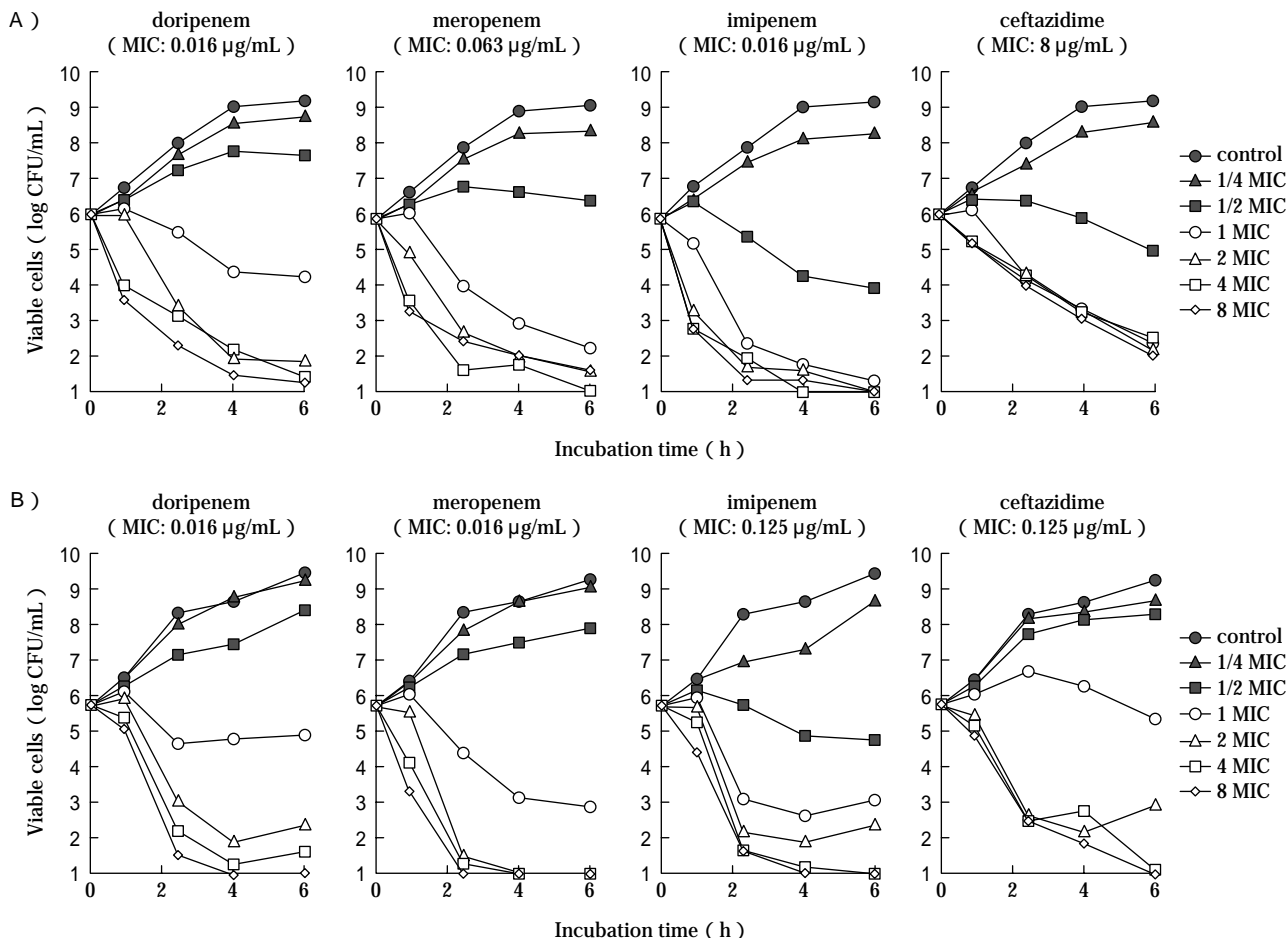
9. 継代培養による耐性獲得試験

S. aureus Smith, *P. aeruginosa* ATCC25619, *E. coli* NIHJ JC-2 の各株を、各種濃度の薬剤含有 CAMHB 中で、35 度で 1 晩培養した。増殖が阻止された薬剤濃度の 1/2~1/4 濃度の培養液を用いて、次の継代培養を行い、これを 13 回繰り返して増殖が阻止された濃度の推移を調べた。また継代培養した培養液より単離した 5 コロニーの MIC を上記の NCCIS 推奨法に準じた broth microdi-

Table 4. Bactericidal activity of doripenem against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Organism (No. of strains)	Mean of MBC/MIC ratios ^{a)} of			
	doripenem	meropenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i>				
-lactamase-producing strain (10)	1.30	1.90	1.30	1.80
-lactamase-nonproducing strain (10)	1.30	1.80	1.10	1.40
<i>Escherichia coli</i> (20)	1.90	1.40	2.05	1.10

^{a)} MICs and MBCs were determined by a broth macrodilution method as recommended by NCCLS, and the mean of MBC/MIC ratios for 10 or 20 strains was calculated.

Fig. 2. Killing kinetic curves of doripenem against *Staphylococcus aureus* Smith (A) and *Escherichia coli* NIHJ JC-2 (B)

lution 法で測定した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトル

標準菌株を中心に好気性菌および嫌気性菌の各株 (94 種, 109 株) に対する DRPM および MEPM, IPM, PAPM, BIPM, CAZ の MIC を Table 1 に示した。DRPM は好気性グラム陽性菌および陰性菌のほとんどの菌株に対して 0.004 ~ 0.5 µg/mL の MIC を示し, 他のカルバペネム系抗菌薬と同様に強い抗菌力と幅広い抗菌スペクトルを有していた。またペニシリン耐性 *Streptococcus pneumoniae*

(PRSP) や *Haemophilus influenzae* の β-lactamase 産生株にも DRPM は強い抗菌力を示した。しかし *Staphylococcus* 属のメチシリン耐性株, *P. aeruginosa* の metallo-β-lactamase 産生株や *Stenotrophomonas maltophilia* に対する抗菌力は, 他薬剤と同様に弱かった。一方, 嫌気性菌のほとんどの株に対して, DRPM は 0.002 ~ 0.5 µg/mL の MIC を示し, 他のカルバペネム系抗菌薬と同様に強い抗菌力を有していた。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

各種臨床分離株に対する DRPM の抗菌力を Table 2 に

Table 5. Binding affinity of doripenem to penicillin-binding proteins

Source of bacterial membrane	PBP	IC ₅₀ (μg/mL) ^{a)}		
		doripenem	meropenem	imipenem
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	1	0.078	0.089	0.061
	2	1.5	0.53	0.10
	3	> 4	> 4	0.10
	4	0.11	0.10	0.026
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC25619	1A	0.40	0.42	0.49
	1B	0.67	0.41	0.75
	2	0.13	0.091	0.29
	3	0.088	0.055	0.72
	4	< 0.016	0.018	< 0.016
	5	> 4	> 4	1.9
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	6	> 4	> 4	1.8
	1A	> 4	0.26	0.24
	1B	1.2	0.36	0.90
	2	< 0.016	< 0.016	0.055
	3	1.8	0.15	> 4
	4	1.6	0.025	0.56
	5	> 4	0.55	0.28
	6	> 4	> 4	0.94

^a Binding affinity was expressed as the concentration (IC₅₀) at which binding of [¹⁴C] benzylpenicillin toward each PBP was inhibited by 50% of that in the control without the addition of antibiotics.

示した。好気性グラム陽性菌に対する DRPM の抗菌力をみると、*Staphylococcus* 属のうち、メチシリン耐性株に対する DRPM の MIC₉₀ は 8~32 μg/mL を示し、一部の株を除いて DRPM の抗菌力は弱かったものの、メチシリン感性 *S. aureus*、メチシリン感性 *Staphylococcus epidermidis* および他の coagulase 陰性 *Staphylococcus* 属のメチシリン感性株に対しては 0.031~0.063 μg/mL の MIC₉₀ を示し、強い抗菌力を有していた。また DRPM は *Streptococcus* 属のうち、ペニシリン感性 *S. pneumoniae* に対して 0.016 μg/mL の MIC₉₀、ペニシリン低感受性 *S. pneumoniae* および PRSP に対して 0.25 μg/mL の MIC₉₀ を示し、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus anginosus* group に対しても 0.063 μg/mL の MIC₉₀ を示し、これらの菌種に対しても強い抗菌力を有していた。*Enterococcus* 属では、*Enterococcus faecalis* に対する DRPM の MIC₅₀ および MIC₉₀ がおのおの 4、8 μg/mL であったが、*Enterococcus faecium* には、DRPM を含めてすべての抗菌薬の抗菌力は弱かった。好気性グラム陽性菌に対する抗菌力を他のカルバペネム系抗菌薬と MIC₉₀ で比較すると、DRPM はおおむね IPM および PAMP よりやや弱く、MEPM および BIPM よりもやや強い抗菌活性を示した。

好気性グラム陰性菌のうち、腸内細菌科の各菌種および *Moraxella catarrhalis* に対して DRPM は 0.031~0.5 μg/mL の MIC₉₀ を示し、強い抗菌力を有していた。他の抗菌薬と比較すると、DRPM はおおむね IPM、PAMP、

BIPM、CAZ よりも強く、MEPM よりもやや弱い抗菌力を示した。DRPM は *H. influenzae* のうち、β-lactamase 非産生 ABPC 耐性 (BLNAR) 株に対する MIC₉₀ は 2 μg/mL を示したが、β-lactamase 産生株 (3 株) を含む BLNAR 以外の株に対する MIC₉₀ は 0.5 μg/mL を示し、強い抗菌力を有していた。*H. influenzae* に対する抗菌力を他の抗菌薬と比較すると、DRPM は MEPM、CAZ に次いで優れた抗菌力を有していた。

各種抗菌薬に対して幅広い MIC 分布を示す *P. aeruginosa* に対して、DRPM は MIC₅₀ で 0.5 μg/mL、MIC₉₀ で 8 μg/mL を示し、試験した抗菌薬の中で最も強い抗菌力を有していた。*Acinetobacter* 属に対しても DRPM は 1 μg/mL の MIC₉₀ を示し、良好な抗菌力を有していた。一方、*Burkholderia cepacia* に対しては MIC₅₀、MIC₉₀ ともに 8 μg/mL を示し、抗菌力はやや弱かった。

嫌気性菌のうち、*Peptostreptococcus* 属と *Prevotella* 属に対して、DRPM はおのおの 0.063 μg/mL、0.125 μg/mL の MIC₉₀ を示し、他のカルバペネム系抗菌薬と同様に強い抗菌力を有していた。一方、*Clostridium difficile* および *Bacteroides* 属に対する DRPM の MIC₉₀ はおのおの 4 および 8 μg/mL を示していた。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

MIC に及ぼす培地の種類の検討を標準株 13 株で行ったところ、CAMHB と比較して nutrient broth (NB) では MIC が 1/4 に低下した株がグラム陰性菌で 5 株みられたが、それ以外での MIC の変動は 1/2~2 倍であった

Table 6. Stability of doripenem against hydrolysis by class A, C, and D β -lactamases

Source of enzyme	class	Relative hydrolysis rate ^{a)}					MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{b)} for source strain					
		doripenem	meropenem	imipenem	cephalothin	ampicillin	doripenem	meropenem	imipenem	doripenem	meropenem	imipenem
<i>S. aureus</i> SR5644	A	< 0.2	< 0.2	< 0.2	^{d)}	100	0.063	0.125	0.016	0.063	0.125	0.016
<i>K. pneumoniae</i> GN69	A	< 0.1	< 0.1	< 0.1		100	0.031	0.031	0.125	0.031	0.031	0.125
<i>E. coli</i> W3110/RTM ^{c)}	A	< 0.1	< 0.1	< 0.1		100	0.063	0.031	0.25	0.063	0.031	0.25
<i>P. vulgaris</i> SR31	A	< 0.002	< 0.002	< 0.002	100		0.125	0.031	0.5	0.125	0.031	0.5
<i>E. coli</i> SHMR/pKP14915	A (ESBL ^{e)})	< 0.01	< 0.01	< 0.01	100		0.031	0.016	0.125	0.031	0.016	0.125
<i>E. cloacae</i> SR4321	C	< 0.002	< 0.002	< 0.002	100		0.063	0.125	0.25	0.063	0.125	0.25
<i>C. freundii</i> SR19	C	< 0.02	< 0.02	< 0.02	100		0.063	0.063	0.5	0.063	0.063	0.5
<i>P. aeruginosa</i> SR24-12	C	< 0.001	< 0.001	< 0.002	100		0.25	0.125	1	0.25	0.125	1
<i>E. coli</i> ML1410/RGN238 ^{d)}	D	< 0.7	< 0.7	< 0.7	100		0.063	0.031	0.25	0.063	0.031	0.25

^{a)}Expressed relative to arbitrary 100 for cephalothin or ampicillin at a concentration of 100 mM, ^{b)}MICs were determined by a broth microdilution method as recommended by NCCLS, ^{c)}TEM-1 type, ^{d)}OXA-1 type, ^{e)}extended spectrum β -lactamase (Toho-1 like type), ^{f)}not tested

(Table 3)。また接種菌量による MIC の変動は、標準接種菌量である 5×10^5 CFU/mL と比較すると、 5×10^4 CFU/mL での MIC の低下はいずれの株においても 1/2 以内であり、 5×10^6 CFU/mL での MIC の上昇は 3 株で 4 倍、それ以外では 2 倍以内にとどまった。培地 pH による MIC の変動は中性に比べて、*S. aureus* の 1 株および *E. faecalis* の 2 株において酸性側でおおの 1/16, 1/4 の MIC の低下がみられたものの、それ以外では 1/2 ~ 2 倍の変動であった。培地への馬非働化血清添加による MIC の変動は、*E. coli* の 1 株および *S. aureus* と *Citrobacter freundii* の各 1 株で 50% 添加の場合におおの 8 倍、4 倍の MIC の上昇がみられたものの、それ以外での MIC の上昇は 2 倍以内であった。

4. 殺菌力

β -lactamase 産生株を含む *S. aureus* および *E. coli* の 2002 年臨床分離株の各 20 株に対する MBC を測定し、Table 4 に平均 MBC/MIC 比として示した。*S. aureus* では、 β -lactamase 産生にかかわらず、DRPM の平均 MBC/MIC は 2 以下となった。また *E. coli* に対しても DRPM は同様の結果を示した。なお DRPM, MEPM, CAZ では試験した *E. coli* 株すべてで MBC/MIC 比が 2 以下であったが、IPM では 3 株が 4 を示した。

S. aureus Smith および *E. coli* NIHJ JC-2 の増殖に及ぼす DRPM の影響を Fig. 2 に示した。DRPM は他薬剤と同様に時間依存的な殺菌作用を示し、DRPM を 2MIC 以上で 4 時間作用後の両菌種の生菌数は 1/1,000 以下にまで減少しており、強い殺菌力を示していた。

5. PBP 親和性

S. aureus Smith, *P. aeruginosa* ATCC25619, *E. coli* NIHJ JC-2 の各 PBP に対する DRPM の結合親和性を Table 5 に示した。*S. aureus* の PBP の中で、DRPM は PBP 1 および PBP4 に対して高い結合親和性を有していた。*P. aeruginosa* では DRPM は PBP2, 3 および 4 に特に強い親和性を示し、次いで PBP1A, 1B に親和性を示した。また *E. coli* では、DRPM は PBP2 に強い親和性を示し、次いで PBP1B, 3, 4 に親和性を示した。*S. aureus* と *P. aeruginosa* の各 PBP に対する結合親和性において DRPM は MEPM と類似していた。

6. β -Lactamase 安定性

DRPM は基質拡張型 β -lactamase (extended-spectrum β -lactamase, ESBL) を含む class A, C, D のセリン型 β -lactamase に対しても加水分解は認められず、安定であった (Table 6)。また DRPM は各酵素の由来株に対しても良好な抗菌力を示した。MEPM も同様にこれらの酵素に対して安定であったが、IPM は *P. aeruginosa* の class C 型 β -lactamase に対して微弱な加水分解が認められた。一方、DRPM は他のカルバペネム系抗菌薬と同様に、relative V_{max}/K_m から metallo- β -lactamase により加水分解を受けると考えられた (Table 7)。

Table 7. Stability of doripenem against hydrolysis by metallo- β -lactamases

Source of enzyme	Parameter	doripenem	meropenem	imipenem	cephalothin
<i>Escherichia coli</i> SHMR/pKP14946 ^{a)}	Km ($\mu\text{mol/L}$)	35	3.7	14	2.5
	Relative Vmax ^{b)}	120	23	110	100
	Relative Vmax/Km ^{c)}	8.3	15	20	100
	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{d)}	4	4	2	^{e)}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SR7422	Km ($\mu\text{mol/L}$)	4.1	11	7.5	11
	Relative Vmax	26	92	40	100
	Relative Vmax/Km	71	92	59	100
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	> 64	> 64	> 64	

^{a)}IMP-1 type, ^{b)}Expressed relative to arbitrary 100 for Vmax of cephalothin. ^{c)}Expressed relative to arbitrary 100 for Vmax/Km of cephalothin. ^{d)}MICs were determined by a broth microdilution method as recommended by NCCLS, ^{e)}not tested

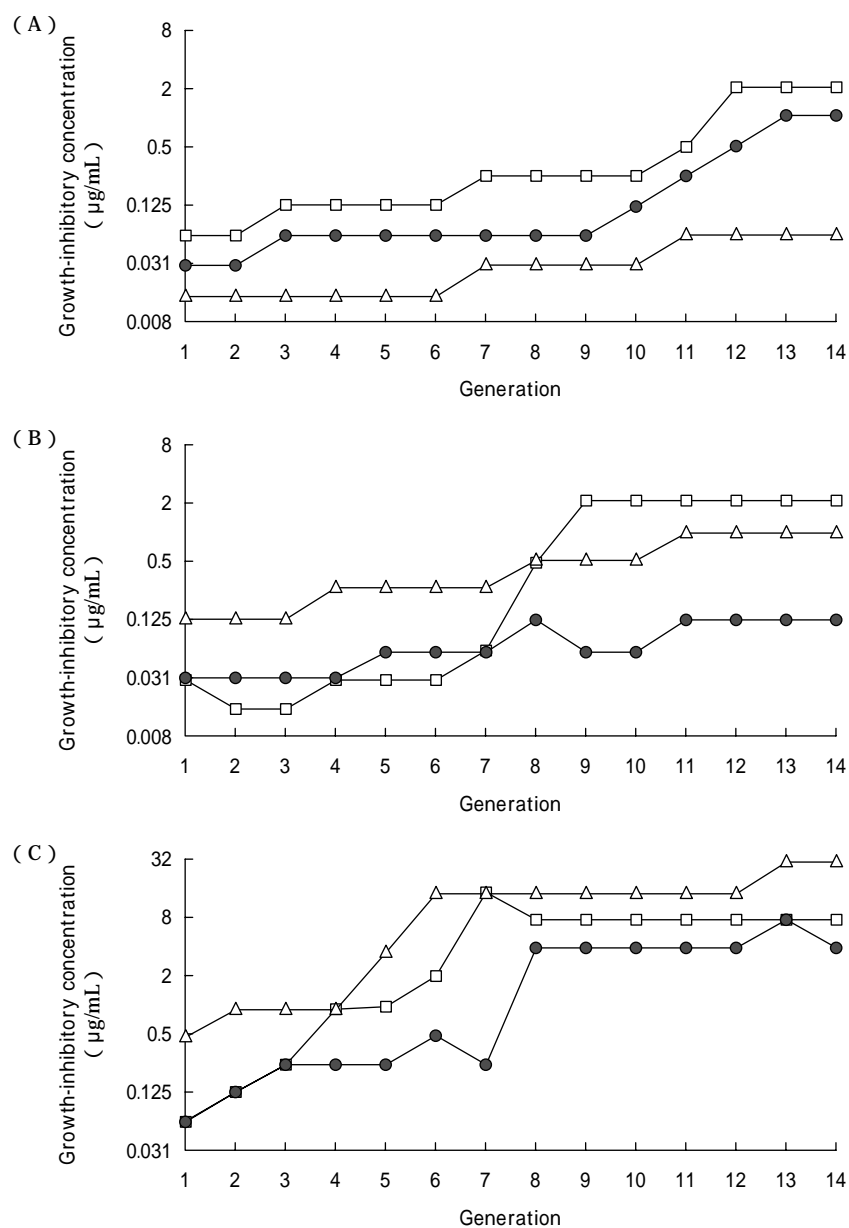


Fig. 3. Acquired resistance of *Staphylococcus aureus* Smith (A), *Escherichia coli* NIHJ JC-2 (B) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619 (C) when subcultured repeatedly in media containing doripenem(□), meropenem(●) or imipenem(△)

7. 継代培養における耐性獲得

S. aureus Smith, *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* ATCC25619 の各株を DRPM または MEPM, IPM 存在下で継代培養を 13 回行い, 親株 (1 代目) から継代終了後の 14 代目までの, 増殖を阻止した濃度の推移を調べた (Fig. 3)。増殖阻止濃度の上昇の程度は, *S. aureus* では IPM 存在下での継代培養が最も小さく, DRPM と MEPM は同程度であり, *E. coli* では DRPM と IPM 存在下での継代培養が MEPM に比べて小さかった。一方, *P. aeruginosa* では, いずれのカルバペネム系抗菌薬存在下においても同様の上昇であった。14 代目の培養液から得られた株の MIC を測定したところ, いずれの菌種についても, 継代培養時の選択薬剤以外の他の 2 薬剤に対する感受性も含めて低下しており, 3 薬剤間での交叉耐性が観察された。

III. 考 察

DRPM は Table 1 の結果からも好気性のグラム陽性菌からグラム陰性菌および嫌気性菌にわたり幅広い抗菌スペクトルを有するカルバペネム系抗菌薬であることが確認された。また臨床分離株に対する抗菌力測定からも, DRPM はこうした菌種に優れた抗菌力を示した。他のカルバペネム系抗菌薬の抗菌力と比較すると, おおむね好気性グラム陽性菌では IPM や PAPM に次ぐ優れた活性を有し, 好気性グラム陰性菌では MEPM に次ぐ優れた活性を有しており, 特に抗 *P. aeruginosa* 活性は試験した抗菌薬の中で最も強かった。さらに嫌気性菌の臨床分離株に対しても IPM や MEPM と同程度の活性を有していた。DRPM の臨床分離株に対する抗菌力については, Tsuji ら²⁾や Nomura ら⁹⁾が報告しているが, その結果とおおむね一致している。また海外の臨床分離株に対する抗菌力については Ge ら¹⁰⁾や Jones ら¹¹⁾の報告があり, 他のカルバペネム系抗菌薬との抗菌力の強弱についてはほぼ同様の結果である。

こうした DRPM の抗菌力に対する培地の種類, 培地 pH などの諸因子の影響は, 他のカルバペネム系抗菌薬と同様に小さく, 生体内での多様な状況下でも強い抗菌力が発揮されるものと期待される。さらに MBC や time-kill study の結果から, IPM や MEPM と同様に殺菌作用にも優れており, 抗菌力に殺菌力が伴っていることが示された。

DRPM は他のカルバペネム系抗菌薬と同様に metallo- β -lactamase 以外の class A, C, D のセリン型 β -lactamase および Toho-1 様型の ESBL に安定であり, それらの酵素を産生する菌株に対しても良好な抗菌力を示した。Mushtaq らは AmpC 誘導型や脱抑制型を示す腸内細菌科の各種菌株や ESBL 産生株に対して DRPM は IPM や MEPM と同様に優れた抗菌力を示し, AmpC 高産生の影響も少ないことを報告しており¹²⁾, 今回確認された安定性と合致する結果である。多くの株が β -lactamase を

産生する好気性グラム陰性菌の中でも, 特に腸内細菌科の臨床分離株に対する DRPM の抗菌力は, Table 2 に示したようにすべて MIC₉₀ が 0.5 μ g/mL 以下を示しており, こうした β -lactamase 産生菌にも有効であると考えられる。

作用機序として検討した PBP 結合親和性試験の結果から, DRPM は *S. aureus* の PBP のうち, 特に細胞壁合成に必須である PBP1 の活性を主に阻害することにより, 抗菌力を発揮しているものと考えられる。同様に, *P. aeruginosa* では PBP2 と PBP3 が形態維持や隔壁合成に関与する特に重要な酵素であり, *E. coli* では PBP2 が形態維持に関与する重要な酵素であることから, DRPM はこれらの活性阻害により抗菌力を発揮していると思われる。これらの PBP に対する DRPM の阻害能は, IC₅₀ 値から MEPM と同程度と考えられる。特にグラム陰性菌では, こうした細胞壁合成能の阻害に加え, 外膜透過性や排出ポンプなどの影響も関与し, 抗菌力が発揮されていると考えられる。

以上のことから, DRPM は優れた *in vitro* 抗菌活性を有するカルバペネム系抗菌薬と考えられる。DRPM はマウスやラットでの *in vivo* 治療効果が確認されており^{2,13)}, ヒト腎 dehydropeptidase-I に対しても安定であることが示されていること¹⁴⁾, さらに第 I 相臨床試験におけるヒトでの体内動態パラメータは MEPM の成績とほぼ同程度であることから¹⁵⁾, 臨床での有効性が期待される。

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 Antibiot* 49: 199 ~ 209, 1996
- 2) 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
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-fifth edition, M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2000
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard-fifth edition, M11-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2001
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline, M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 1999
- 6) Spratt B G: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 72: 341 ~ 352, 1977
- 7) Murakami K, Yoshida T: Covalent binding of moxalac-

- tam to cephalosporinase of *Citrobacter freundii*. Antimicrob Agents Chemother 27: 727 ~ 732, 1985
- 8) Jasson J A T: A direct spectrometric assay for penicillin β -lactamase(penicillinase) Biochim Biophys Acta 99: 171 ~ 172, 1965
 - 9) 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
 - 10) Ge Y, Wikler M A, Sahm D F, et al: *In vitro* antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem. Antimicrob Agents Chemother 48: 1384 ~ 1396, 2004
 - 11) Jones R N, Huynh H K, Biedenbach D J, et al: Doripenem(S-4661) a novel carbapenem: comparative activity against contemporary pathogens including bacterial action and preliminary *in vitro* methods evaluation. J Antimicrob Chemother 54: 144 ~ 154, 2004
 - 12) Mushtaq S, Ge Y, Livermore D M: Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 48: 1313 ~ 1319, 2004
 - 13) 佐藤剛章, 辻 雅克, 岡崎健一, 他: Doripenem の *in vivo* 抗菌力. 日化療会誌 53 (Suppl 1) 71 ~ 79, 2005
 - 14) 山野佳則, 川井悠唯, 湯通堂隆: Doripenem のヒト dehydropeptidase-I に対する安定性. 日化療会誌 53 (Suppl 1) 92 ~ 95, 2005
 - 15) 中島光好 尾熊隆嘉: Doripenem の健康成人における第 I 相臨床試験. 日化療会誌 53(Suppl 1): 104 ~ 123, 2005

In vitro antibacterial activity of doripenem, a novel parenteral carbapenem

Takaji Fujimura, Yoshiji Kimura, Isamu Yoshida, Isao Higashiyama,
Yutaka Jinushi, Tadashi Munekage, Naomi Kuroda,
Masayoshi Doi, Toru Nishikawa and Yoshinori Yamano

Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 3 1 1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka, Japan

We studied the *in vitro* antibacterial activity of doripenem(DRPM) a novel parenteral carbapenem. DRPM showed a broad antibacterial spectrum against aerobic gram-positive and negative bacteria and anaerobic bacteria. In a susceptibility test for clinical strains isolated in 2002, MIC₉₀s of DRPM were 0.016-1 μ g/mL for *Streptococcus* spp. and methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus* spp., and 0.031-1 μ g/mL for *Enterobacteriaceae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Haemophilus influenzae*, suggesting that DRPM has potent antibacterial activity. Of the 5 carbapenems tested, DRPM was most potent against aerobic gram-positive bacteria, following imipenem(IPM) and panipenem, and is most potent against aerobic gram-negative bacteria, following meropenem(MEPM). MIC₅₀ and MIC₉₀ of DRPM against *Pseudomonas aeruginosa* were 0.5 and 8 μ g/mL, indicating that DRPM has the most potent antipseudomonal activity among antibiotics tested. The antibacterial activity of DRPM was not affected by factors such as medium pH or inoculum size. Results from MBC determination and a time-kill study suggested that DRPM has strong bactericidal activity corresponding to its antibacterial activity. Although DRPM was hydrolyzed by metallo- β -lactamases as well as other carbapenems, it was stable to hydrolysis by class A, C, and D β -lactamases, including extended-spectrum β -lactamase. A study on the affinity of DRPM to penicillin-binding proteins as its mode of action suggested that DRPM probably exhibits antibacterial activity by inhibiting the activity of PBP1 for *S. aureus*, PBP2 and PBP3 for *P. aeruginosa*, and PBP2 for *E. coli* as well as MEPM. When subcultured repeatedly in media containing DRPM, MEPM, or IPM, bacterial strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* showed decreased susceptibility to all of these antibiotics, and cross-resistance among tested carbapenems was observed.