

【原著・基礎】

緑膿菌に対する biapenem , meropenem および ceftazidime の抗菌作用の比較

生方 公子¹⁾・千葉菜穂子²⁾・小林 玲子²⁾・長谷川恵子²⁾
日暮 芳巳³⁾・岩井 友美³⁾・奥住 捷子³⁾・紺野 昌俊⁴⁾

¹⁾財団法人微生物化学研究所

²⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所*

³⁾東京大学医学部付属病院検査部

⁴⁾帝京大学

(平成 13 年 11 月 22 日受付・平成 13 年 12 月 13 日受理)

2001 年に分離された緑膿菌に対する biapenem(BIPM), meropenem(MEPM), imipenem(IPM), および panipenem (PAMP) のカルバペネム系薬 4 薬剤を含む計 10 薬剤の抗菌力を寒天平板希釈法によって測定した。カルバペネム系薬の MIC₅₀ と MIC₉₀ は、それぞれ次のようであった。BIPM は 1 µg/mL と 16 µg/mL, MEPM は 0.5 µg/mL と 8 µg/mL, IPM は 2 µg/mL と 32 µg/mL, PAMP は 8 µg/mL と 32 µg/mL であった。BIPM の感受性は IPM との間で他薬剤よりも高い相関が認められた (= 0.9218)。臨床分離の緑膿菌 6 株に対する MIC 以上における BIPM の殺菌効果は、MEPM および ceftazidime (CAZ) のそれよりも優れ、またその殺菌作用は 10% の新鮮ヒト血清添加によってさらに増強された。緑膿菌 # 8 株を BIPM の MIC (1 µg/mL) で 2 時間処理した際の PAE 効果は、10% のヒト血清を添加した BIPM でのみ認められた。緑膿菌 # 8 株からの PBP_s に対する 3 薬剤の結合親和性は、[³H]benzylpenicillin を用いて解析され、MIC における結果は次のようであった。BIPM は PBP 4 (100%) > PBP 1 A/1 B (73.9%) > PBP 3 (69.0%) > PBP 2 (61.2%)、MEPM は PBP 3 (92.5%) > PBP 4 (87.1%) > PBP 1 A/1 B (60.0%) > PBP 2 (58.9%)、CAZ は PBP 3 (100%) > PBP 1 A/1 B (96.0%) > PBP 2 (51.4%) = PBP 4 (51.2%) の順であった。PBP_s に対する親和性の特徴はこれら 3 薬剤を緑膿菌に作用させた後の形態変化ともよく一致していた。BIPM の MIC 以上に晒された後の細胞は桿菌からスフェロプラストあるいはバルジ形成への形態変化を生じ、しかも細胞表面に強い損傷が認められた。溶菌は 10% のヒト新鮮血清を添加すると有意に増強された。MEPM に晒された際にはバルジ形成を伴うフィラメント細胞、および CAZ ではフィラメント細胞のみの形態変化がそれぞれ観察された。両薬剤によって処理された細胞は、細胞表面の損傷はほとんど観察されなかった。BIPM の MIC 以上において短時間で生ずる強い殺菌作用は、PBP 4 に対する高い親和性と、MIC よりも低い濃度からの PBP 1 A/1 B, PBP 3, PBP 2 に対する高い親和性によってもたらされるものと推測された。

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* , PBP_s affinity , morphological changes , bactericidal activity , carbapenem antibiotics , biapenem

カルバペネム系薬の開発は、thienamycin¹⁾をリード化合物として化学構造上の特性研究が行われ、その弱点を克服しつつ今日に至っている²⁾。本邦においては、すでに imipenem (IPM)³⁾、panipenem(PAMP)⁴⁾およびmeropenem(MEPM)^{5,6)} の 3 薬剤が臨床に使用され、重症細菌感染症に対する優れた治療薬としてその評価を確立している。

一方、これらの薬剤は同系統の薬剤ではあるが、それぞれが優位の抗菌力を示す菌種がやや異なるという特徴もみられている。すなわち、PAMP は耐性ブドウ球菌以外のグラム陽性球菌に対して他薬剤に比し優れた抗菌活性を示すが、緑膿菌に対しては抗菌力がやや劣る。それに対し、MEPM は

ほぼその逆の抗菌活性を示し、IPM は両者の中間に位置する。

一方、カルバペネム系薬はヒトの dehydropeptidase-I (DHP-1) に対する不安定性があげられる。このため、IPM は cilastatin (CS) との合剤⁷⁾として、PAMP は betamipron (BP) との合剤⁴⁾として開発されてきた。DHP-1 に対する安定性は必ずしも完璧とはいえないものの、単剤でしかも中枢毒性の軽減されたカルバペネム系薬として、1 -メチル基の導入された MEPM が開発され、世界的に広く使用されている⁸⁾。

Biapenem (BIPM) は 1989 年にワイスレダリー(株)(旧日

* 神奈川県横浜市港北区師岡町 760

本レダリー(株)によって創薬された新規カルバペネム系薬であるが、ヒトのDHP-1に対する高い安定性⁹⁾と緑膿菌に対する強い殺菌力を特徴とした薬剤である^{10,11)}。

この論文においては、BIPMの抗緑膿菌作用に注目し、臨床検査材料より分離された緑膿菌に対するBIPMの感受性、ヒト血清存在下における短時間殺菌力、ヒト血清存在下におけるPAE効果、PBP_sに対する親和性、走査型電子顕微鏡による薬剤作用時の形態変化について、MEPMおよび抗緑膿菌作用を有するセフェム系薬のひとつであるceftazidime (CAZ)のそれと比較し、臨床上的有用性に資する成績が得られたと考えられたので報告する。

I. 検査材料と方法

1. 使用菌株

2001年4月~6月の期間に、東京大学医学部付属病院細菌検査室で扱った各診療科受診症例の臨床検査材料から分離した緑膿菌106株を対象とした。主な検査材料は、喀痰、尿、膿汁、血液であった。被験菌株は1症例1株とし、菌種の同定は定法にしたがった。

2. 薬剤感受性の測定

-ラクタム系薬として、BIPM, MEPM, IPM, PAMP, CAZ, および piperacillin (PIPC) の6薬剤と、その他の薬剤として arbekacin (ABK), gentamicin (GM), levofloxacin (LVFX), および ciprofloxacin (CPF) の緑膿菌に対する抗菌力を寒天平板希釈法で測定した。

感受性測定には Mueller-Hinton (MH) agar (DIFCO Laboratories) を使用した。血液寒天培地で前培養された被験菌は、翌日 MH broth に McFarland が 0.5 (Becton Dickinson and Company) になるように菌量を調整、さらに 100 倍に希釈した後、各薬剤を含有する寒天平板上に接種した。最終的な接種菌量は 10^4 CFU/spot となるが、一部の薬剤については 10^5 CFU/spot の接種菌量についても薬剤感受性を測定した。感受性測定時には、PAO 1 株に対する抗菌力をコントロールとして同時に測定した。なお、被験薬は国立感染症研究所、あるいは当該企業から力価の明らかな純末の分与を受けた。

3. 経時的殺菌効果

臨床分離の緑膿菌 6 株に対する BIPM, MEPM, および CAZ の殺菌作用は、それぞれの薬剤に対する MIC および $2 \times$ MIC を作用させた 1 時間後、2 時間後、および 4 時間後に測定した。

被験菌は血液寒天培地に塗布して一夜前培養し、翌日 10 mL の MH broth に釣菌、McFarland が 0.5 になるまで 37 °C にて前培養した。次いで、あらかじめ各薬剤が加えられた 9.9 mL の MH broth に菌量が 10^6 CFU/mL となるように接種し、上記の時間に菌数を測定した。血清存在下における殺菌効果は、ヒト新鮮血清を 10% の割合に添加した MH broth 培地にて測定した。

4. PAE の測定

BIPM, MEPM, および CAZ を緑膿菌 # 8 株に作用させた際の PAE は、次のような方法によって測定した。すなわち、血液寒天培地にて一夜前培養した被験菌は、翌日 10 mL の MH broth に釣菌、McFarland が 0.5 に達するまで 37 °C にて前培養した。次いで、各薬剤があらかじめ MIC, あるいは $2 \times$ MIC の濃度に加えられた 9.9 mL の MH broth に被験菌を 10^6 CFU/mL となるように接種し、37 °C にて 2 時間培養した。その後、それぞれの菌は薬剤を含有しない 9.9 mL の MH broth に 100 倍に希釈されるように接種し、その時間を 0 時間として 1, 2, 3, 4, 5, および 6 時間後に生菌数を測定した。この実験においても、MH broth のみの場合と 10% の割合にヒト新鮮血清を添加した MH broth の 2 系列について検討した。

5. PBP_s に対する結合親和性

緑膿菌の PBP_s に対する BIPM, MEPM, および CAZ の結合親和性は、定法¹²⁾にしたがって # 8 株から採取した膜画分を用いて測定した。得られた fluorogram の解析方法もまた、すでに報告してある方法にしたがって行った¹²⁾。すなわち、解析薬剤を加えていないコントロールの [³H] benzylpenicillin (PCG) のバンドの濃さを 100% とし、被験薬剤を加えて [³H] PCG の結合が減じた分を被験薬剤が各 PBP_s に結合したものとみなして、[³H] PCG の結合阻止率 (inhibitory ratio of [³H] PCG binding: Ir (%)) として表現し、その Ir をもって各薬剤のそれぞれの濃度における PBP_s への結合親和性と判定した。

6. 走査型電子顕微鏡による形態変化の観察

薬剤作用後の菌の形態変化は走査型電子顕微鏡により観察を行った。緑膿菌 # 8 株を経時的殺菌作用の検討時と同一条件下で培養し、BIPM, MEPM, および CAZ の MIC および $2 \times$ MIC をそれぞれ作用させた後、1 時間、2 時間および 4 時間後に試料を作成した。

試料は 2% glutaraldehyde (pH 7.2 リン酸緩衝液) で 2 時間固定、続いて ethanol 脱水、isoamil alcohol 置換、炭酸ガス置換による臨界点乾燥後、白金-パラジウム蒸着を行い、日本電子 SEM-T 330 で観察と撮影を行った。

II. 結果

1. 緑膿菌に対する抗菌力の比較

Table 1 には緑膿菌 106 株に対する BIPM, MEPM, IPM, および PAMP のカルバペネム系薬 4 薬剤と PIPC, CAZ, ABK, GM, LVFX, および CPF の MIC 分布、ならびに MIC₅₀ と MIC₉₀ の成績を示す。MIC₅₀ と MIC₉₀ 値でその抗菌力を比較すると、もっとも優れているのは CPF で、次いで MEPM, LVFX, BIPM, GM, ABK, CAZ, IPM, PIPC, PAMP の順であった。しかし、これらの薬剤ではいずれもある一定の比率で耐性菌が認められた。「日本化学療法学会抗菌

Table 1. Susceptibility distribution of biapenem and other antimicrobial agents against clinical isolates of 106 *Pseudomonas aeruginosa* strains

| Antibiotic | No. of isolates for which the MIC ($\mu\text{g/mL}$) was: | | | | | | | | | | | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|---------------|---|-------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------|-------------------|
| | 0.063 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | | |
| Biapenem | | 3 | 7 | 35 | 39 | 1 | 2 | 6 | 8 | 3 | 2 | 1 | 16 |
| Meropenem | 7 | 15 | 22 | 30 | 9 | 5 | 7 | 5 | 3 | | 3 | 0.5 | 8 |
| Imipenem | | | | 2 | 12 | 46 | 25 | | 3 | 14 | 4 | 2 | 32 |
| Panipenem | | | | 2 | 1 | 6 | 30 | 20 | 27 | 14 | 6 | 8 | 32 |
| Ceftazidime | | | 1 | 1 | 30 | 49 | 11 | 5 | 3 | 2 | 4 | 2 | 8 |
| Piperacillin | | | 1 | | 4 | 20 | 44 | 19 | 8 | 4 | 6 | 4 | 16 |
| Arbekacin | | | | 2 | 25 | 43 | 19 | 13 | 1 | | 3 | 2 | 8 |
| Gentamicin | | | 2 | 4 | 35 | 42 | 14 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 |
| Levofloxacin | | | 3 | 25 | 46 | 15 | 5 | 5 | 1 | 2 | 4 | 1 | 8 |
| Ciprofloxacin | 4 | 26 | 47 | 11 | 5 | 4 | 3 | | 3 | 1 | 2 | 0.25 | 2 |

薬感受性測定法検討委員会」が1994年に報告した「呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント」の成績²⁰⁾にもとづいてそれぞれの薬剤に対する感性・耐性の識別を行い、BIPMを中心にまとめるとTable 2の成績となった。緑膿菌はさまざまな耐性機構を保持しているため交叉耐性も複雑で、カルバペネム系薬感性であってもPIPCやCAZ、アミノ配糖体系薬、あるいはニューキノロン系薬に耐性、あるいはその逆のパターンを示す菌株も認められた。しかし、今回抗菌活性を測定したすべての薬剤に耐性を示した株はわずかに2株(1.9%)に過ぎなかった。

2. β -ラクタム系薬間の抗菌力の相関性

BIPMとMEPM, IPM, PAMP, およびCAZとのMICの相関をFig. 1に示す。BIPMと他のカルバペネム系薬のMICの間には比較的高い相関性が認められた。なかでもIPMとの相関性がもっとも高く($r = 0.9218$)、次いでMEPM($r = 0.8261$)、PAMP($r = 0.7502$)の順であった。また、これらの図からも明らかのように、あるカルバペネム系薬に対する感受性が低下している際には、他薬剤に対しても感受性は低下していた。

しかし、セフェム系薬のCAZとの間では、菌が保持

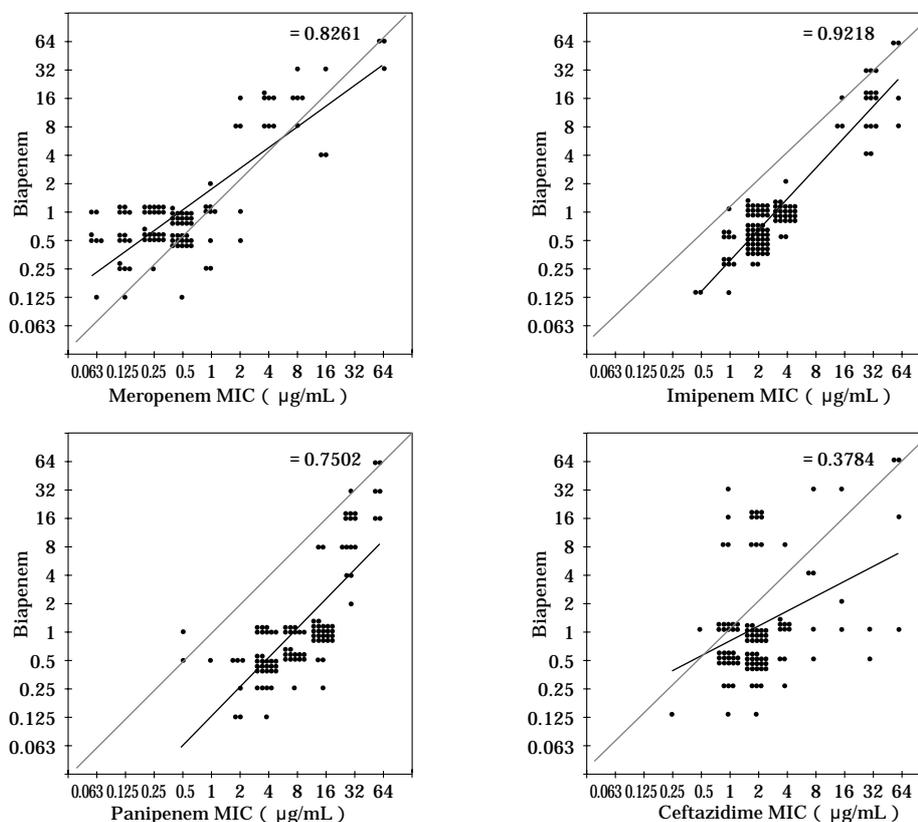


Fig. 1. Correlation of susceptibilities of biapenem and other carbapenem agents to *Pseudomonas aeruginosa*.

Table 2. Resistant pattern of *Pseudomonas aeruginosa* for various antipseudomonal agents

| Biapenem | | Meropenem | | Imipenem | | Piperacillin | | Ceftazidime | | Arbekacin | | Gentamicin | | Ciprofloxacin | | Levofloxacin | |
|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|--------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
| MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains | MIC (µg/mL) | No. of strains |
| 64 | 2 | 64 | 2 | 64 | 2 | 64 | 1 | 64 | 2 | 64 | 2 | 32 | 1 | 64 | 1 | 64 | 1 |
| | | | | | | 32 | 1 | | | | | 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 32 | 3 | 64 | 1 | 32 | 3 | 32 | 1 | 16 | 1 | 8 | 1 | 4 | 1 | 16 | 1 | 32 | 1 |
| | | 16 | 1 | | | 16 | 1 | 8 | 1 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 8 | 1 |
| | | 8 | 1 | | | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | | | 0.25 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 8 | 8 | 3 | 64 | 1 | 64 | 1 | 64 | 1 | 8 | 2 | 4 | 4 | 2 | 1 | 4 | 1 |
| | | 4 | 4 | 32 | 6 | 8 | 1 | 2 | 6 | 4 | 1 | 2 | 3 | 0.25 | 7 | 2 | 2 |
| | | 2 | 1 | 16 | 1 | 4 | 4 | 1 | 1 | 2 | 5 | 1 | 1 | | | 1 | 4 |
| | | | | | | 2 | 2 | | | | | | | | | 0.5 | 1 |
| 8 | 6 | 8 | 1 | 64 | 1 | 8 | 1 | 4 | 1 | 8 | 1 | 8 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| | | 4 | 3 | 32 | 3 | 4 | 2 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 3 | 0.5 | 2 | 2 | 2 |
| | | 2 | 2 | 16 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0.25 | 2 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | 1 | 2 | | | 0.125 | 1 | 0.5 | 2 |
| 4 | 2 | 16 | 2 | 32 | 2 | 16 | 2 | 8 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 16 | 2 | 64 | 2 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 64 | 1 | 16 | 1 | 8 | 1 | 64 | 1 | 0.25 | 1 | 0.5 | 1 |
| 1 | 39 | 2 | 1 | 4 | 22 | 64 | 3 | 64 | 1 | 64 | 1 | 64 | 1 | 64 | 1 | 64 | 1 |
| | | 1 | 5 | 2 | 16 | 32 | 1 | 32 | 1 | 16 | 1 | 32 | 1 | 32 | 1 | 32 | 1 |
| | | 0.5 | 16 | 1 | 1 | 16 | 2 | 16 | 1 | 8 | 2 | 8 | 1 | 1 | 1 | 4 | 2 |
| | | 0.25 | 10 | | | 8 | 11 | 8 | 1 | 4 | 6 | 4 | 1 | 0.5 | 2 | 2 | 2 |
| | | 0.125 | 5 | | | 4 | 13 | 4 | 7 | 2 | 19 | 2 | 21 | 0.25 | 21 | 1 | 22 |
| | | 0.063 | 2 | | | 2 | 9 | 2 | 17 | 1 | 10 | 1 | 13 | 0.125 | 12 | 0.5 | 11 |
| | | | | | | | | 0.5 | 1 | 0.5 | 1 | 0.25 | 1 | 0.063 | 1 | | |
| 0.5 | 36 | 2 | 1 | 4 | 2 | 32 | 1 | 32 | 1 | 8 | 5 | 8 | 2 | 4 | 2 | 16 | 1 |
| | | 1 | 1 | 2 | 29 | 16 | 2 | 8 | 1 | 4 | 4 | 4 | 5 | 2 | 1 | 8 | 2 |
| | | 0.5 | 14 | 1 | 5 | 8 | 3 | 4 | 2 | 2 | 16 | 2 | 10 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| | | 0.25 | 11 | | | 4 | 20 | 2 | 18 | 1 | 10 | 1 | 15 | 0.5 | 5 | 2 | 7 |
| | | 0.125 | 5 | | | 2 | 7 | 1 | 14 | 0.5 | 1 | 0.5 | 3 | 0.25 | 15 | 1 | 17 |
| | | 0.063 | 4 | | | 1 | 3 | | | 0.25 | | 0.25 | 1 | 0.125 | 11 | 0.5 | 8 |
| 0.25 | 8 | 2 | 1 | 16 | 1 | 16 | 1 | 4 | 2 | 8 | 1 | 4 | 3 | 2 | 1 | 8 | 1 |
| | | 1 | 2 | 8 | 2 | 8 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| | | 0.25 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 4 | 0.5 | 1 | 2 | 1 |
| | | 0.125 | 1 | 2 | 1 | | | | | 1 | 3 | | | 0.125 | 2 | 0.5 | 2 |
| | | | | | | | | | | | | | | 0.063 | 3 | 0.25 | 3 |
| 0.125 | 3 | 0.5 | 1 | 1 | 1 | 8 | 1 | 2 | 1 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 1 | 8 | 1 |
| | | 0.125 | 1 | 0.5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 | 1 | 2 | 1 |
| | | 0.063 | 1 | | | 0.25 | 1 | 0.25 | 1 | | | | | 0.125 | 1 | 0.5 | 1 |

Gray color indicates resistance for each antibiotic. Classification of resistance for these antibiotics was based a report on breakpoint for respiratory bacterial infection.²⁰⁾

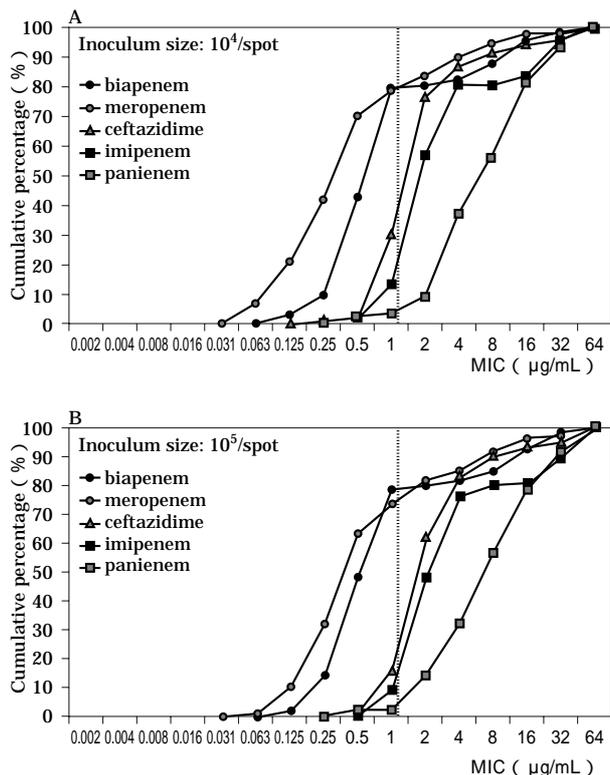


Fig. 2. Influence of inoculum size of *Pseudomonas aeruginosa* on susceptibilities of 5 -lactam agents.

する不活化酵素に対する基質としての違いから相関性 ($r = 0.3784$) は明らかに低く、上述したように BIPM 感性にもかかわらず CAZ 耐性、あるいは BIPM 耐性で CAZ 感性の株がわずかながら認められた。

3. 接種菌量による MIC の変動

接種菌量の違いによる β -ラクタム系薬の MIC の変動を比較した成績を累積分布として Fig. 2 A と 2 B に示す。BIPM、IPM、および PAMP の抗菌力は接種菌量の影響をほとんど受けていないのに対し、MEPM と CAZ のそれは影響を受け、試験管で 0.5 管程度耐性側へシフトしていた。

一方、各薬剤の累積曲線を比較すると、その抗菌力には優劣はあるものの、BIPM と IPM は感性株と何らか

の耐性因子を有していると思われる株に対しては明らかに異なった MIC を示した。すなわち、BIPM は約 80% の菌株に対して 0.5 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の鋭い 1 峰性の MIC 分布、IPM は 2 ~ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC を示し、残りの約 20% の菌株が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MIC を示した。それに対し、MEPM、CAZ、PAMP は、感性菌と耐性菌の識別が明確でなく、耐性側でなだらかなカーブを描く不明瞭な 2 峰性分布であった。

4. 経時的殺菌作用

Table 3 には薬剤作用後の経時的殺菌効果を測定した緑膿菌 6 株のカルバペネム系薬 4 薬と CAZ に対する MIC を示す。このうち、BIPM、MEPM、および CAZ の各 MIC と 2 \times MIC を作用させた後の経時的殺菌効果を Fig. 3 に示した。それぞれの殺菌カーブは薬剤作用 1 時間後、2 時間後、および 4 時間後に得られた 6 菌株の成績からその平均値を算出してプロットしたものである。また、ヒト新鮮血清を 10% の割合に添加した際の成績もあわせて示した。血清非添加時における 3 薬剤の殺菌効果は、MIC と 2 \times MIC のいずれの濃度においても BIPM の殺菌作用が他薬剤に比して明らかに優れていた。また、ヒト新鮮血清を加えると BIPM の殺菌作用はさらに増強され、MIC レベル (MIC の平均は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 1 時間後には 1.9 log の菌数の減少、2 \times MIC レベル (2 \times MIC の平均は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では 2.2 log の生菌数の減少がみられ、MEPM および CAZ に比して短時間殺菌効果の優れていることが推計学的にも有意な値として示された。

5. Post Antibiotic Effect (PAE)

Fig. 4 には緑膿菌の #8 株に対する BIPM、MEPM、および CAZ の血清添加時と非添加時における PAE 効果を示す。図からも明らかなように、BIPM においては MIC と 2 \times MIC のいずれの作用時においても、血清添加によって PAE が有意に増強されることが示された。それに対し、MEPM や CAZ では血清添加時の有無にかかわらず、PAE 効果は認められず、むしろ薬剤除去後にコントロールよりも一時的に菌数が上昇していることが示された。

6. PBPs に対する結合親和性

Table 3. MICs of biapenem, meropenem, imipenem, panipenem, and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* strains used in measurement of bacterial killing kinetics

| Strain | MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | |
|--------|---------------------------------|-----------|----------|-----------|-------------|
| | biapenem | meropenem | imipenem | panipenem | ceftazidime |
| #8 | 0.5 | 0.25 | 1 | 2 | 4 |
| #9 | 0.5 | 0.5 | 1 | 2 | 2 |
| #59 | 0.5 | 0.5 | 2 | 8 | 2 |
| #63 | 1 | 0.5 | 2 | 16 | 2 |
| #81 | 1 | 0.5 | 2 | 4 | 1 |
| #103 | 0.25 | 0.5 | 1 | 4 | 1 |

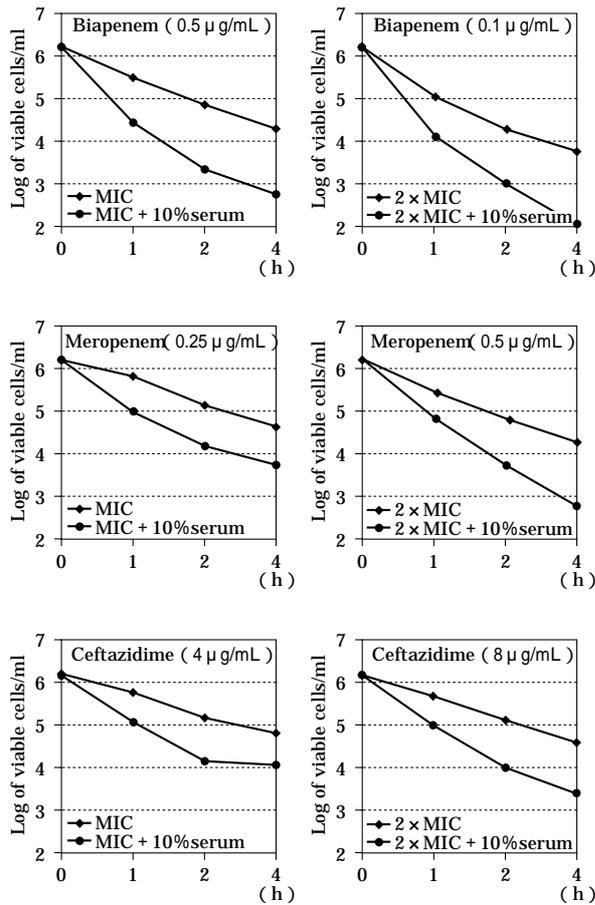


Fig. 3. Bactericidal activity of biapenem, meropenem, and ceftazidime against 6 *Pseudomonas aeruginosa* strains. Each dot and bar represents mean \pm SD.

Fig. 5には、緑膿菌#8株から採取したPBP_sに対するBIPM(A),MEPM(B),およびCAZ(C)の結合を ^3H PCGのIr(%)として示す。図は薬剤無添加時(control)における ^3H PCGの結合を100%とし、添加した被験薬剤の濃度上昇と共に, ^3H PCGの結合を阻止していくIr(%)で表している。また、Table 4には3薬剤がそれぞれのMICにおいて各PBP_sに対

してどの程度結合しているかを比較した成績を示した。

BIPMはPBP4に対してきわめて高い親和性を示した。また,PBP1A/1B,PBP3,PBP2に対してはMICの1/10濃度からほぼ同様な結合阻止曲線を描いていた。そして,MICの時点においては,PBP4に100%,PBP1A/1Bに73.9%,PBP3に69.0%,そしてPBP2に61.2%のIrを示した。

一方,MEPMはPBP3に対してMICの1/8濃度から結合しはじめ,他のPBP_sに対するよりも高い親和性を示した。次いでPBP4に対して親和性を示した。PBP1A/1BとPBP2に対する結合はMICの1/10濃度付近からはじまったが,BIPMに較べるとその結合阻止曲線は緩やかであった。MIC時点における各PBPに対する結合率はPBP3に92.5%,PBP4に87.1%,PBP1A/1Bに60.0%,PBP2に58.9%のIrを示した。

CAZはPBP3に対して特異的な高い親和性を示し,MICの1/64濃度ですでにIrは100%に達していた。その他のPBPに対する親和性では,PBP1A/1Bに対する高い親和性が注目されたが,PBP2やPBP4に対する親和性が他の薬剤に比べ明らかに低かった。MIC時点における各PBP_sへのIrは,PBP3に100%,PBP1A/1Bに96.0%,PBP2に51.4%,PBP4に51.2%であった。

7. 電子顕微鏡(SEM)による形態変化の観察

緑膿菌#8株に対し,2xMIC(1 µg/mL)のBIPM,MEPM(0.5 µg/mL),およびCAZ(8 µg/mL)を2時間あるいは4時間作用させた際の形態変化をFig.6に示す。MIC作用時の形態変化も観察しているが,2xMIC作用時のそれとほぼ同じと判断されたので省略した。

Fig.6Aにコントロールの緑膿菌細胞を示す。Fig.6BにはCAZを4時間作用させた際の細胞像を示したが,隔壁合成のみが阻害され異常にフィラメント化した細胞のみが観察された。細胞表面の損傷や溶菌細胞はほとんど観察されなかった。

一方,2xMIC(1 µg/mL)のBIPMを2時間(Fig.

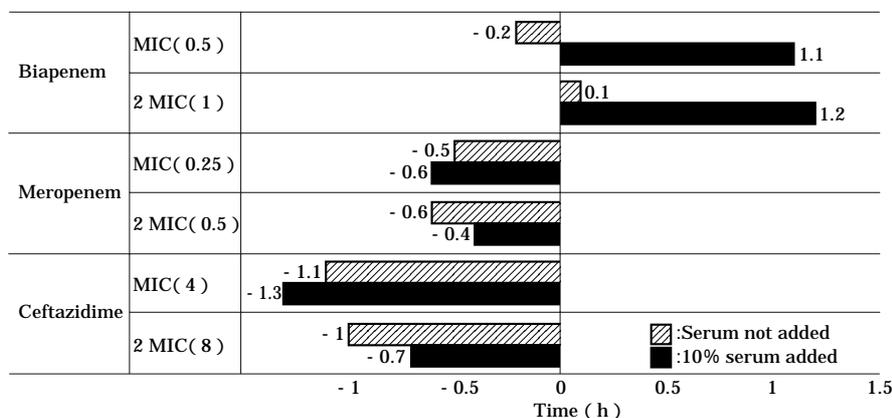


Fig. 4. Postantibiotic effect of biapenem, meropenem, and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* strain #8.

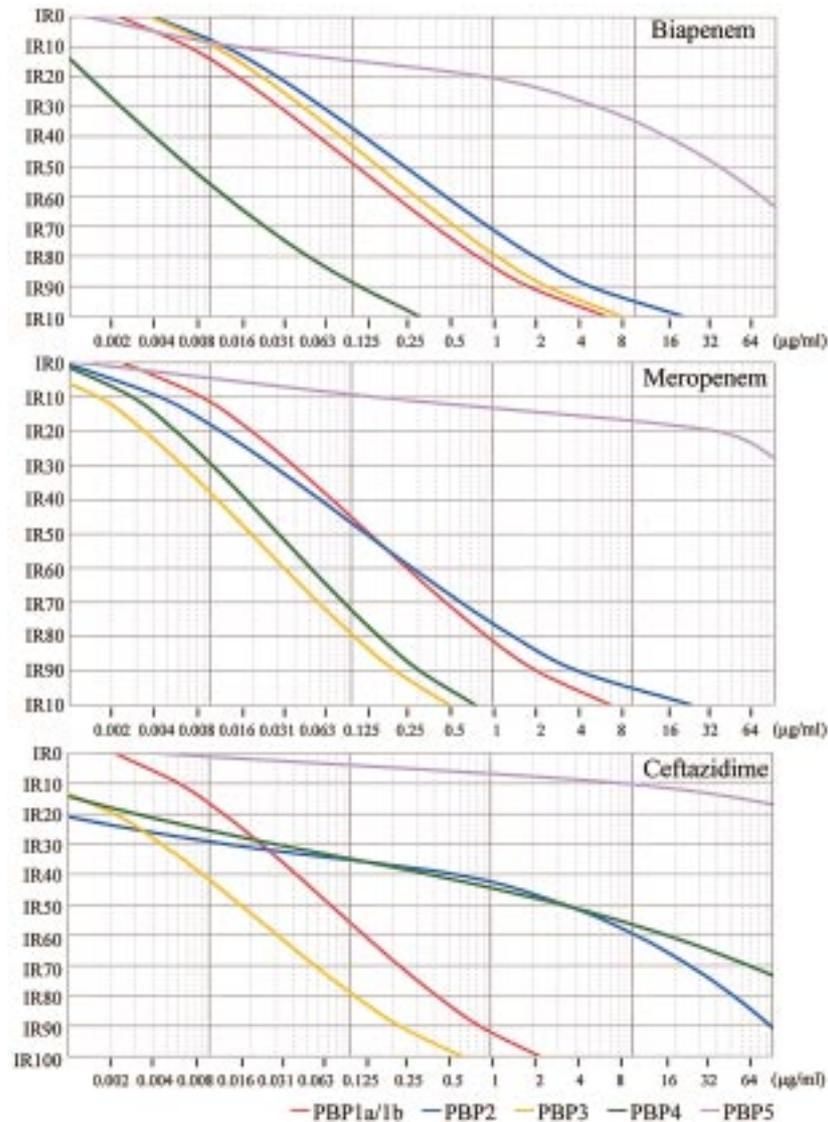


Fig. 5. Affinities of biapenem, meropenem, and ceftazidime to PBPs of *Pseudomonas aeruginosa* strain #8. The inhibitory ratio (Ir) of binding of [^3H]benzylpenicillin to each PBP by agents, obtained by autoradiography analysis, is shown.

6 C),あるいは4時間 (Fig. 6 D) 作用させた際の緑膿菌は、フィラメント化することなく球状 (スフェロプラスト) 化していることが観察された。特に、細胞壁合成がもっとも盛んな分裂部位が突出するバルジ形成が優位に認められ、しかも表面の細胞壁構造の剥離や小さい穴が生じ、細胞壁は強い損傷を受けている像が観察された。なお、ここに示さなかったが、10% のヒト血清存在下においては、スフェロプラスト化した細胞が溶菌し、細胞壁のみとなった残骸像が多数観察された。

2×MIC の MEPM を作用させた際の緑膿菌の2時間後と4時間後の像を Fig. 6 E と Fig. 6 F に示す。菌は隔壁合成が阻害されてフィラメント化すると同時に、隔壁形成部位がやや膨潤した像が観察された。ちょうど CAZ と BIPM でみられる形態変化を合わせたような独特の形態変化であった。また、表面がスムーズであるこ

とから、観察時間内における細胞の損傷は強いものではなかった。ここに示さなかったが、10% の血清添加時でもほぼ同様な形態変化であった。

III. 考 察

カルバペネム系薬は、グラム陽性球菌から緑膿菌を含むグラム陰性桿菌までの広域スペクトラムを有する薬剤として、初期の IPM/CS や PAM/BP といった合剤から、1-メチル基が導入された単剤の MEPM へと開発が進められてきた²⁾。これらの薬剤は、医療の進歩と共に増加している免疫不全状態下や基礎疾患を有するヒトにおける細菌感染症時における薬剤として一定の評価を得てきている。つまり、そのような病態下における起炎菌としては、緑膿菌の比重が高いという背景もあって、本系統の薬剤が抗緑膿菌作用を有するセフェム系薬よりも殺菌作用の点で勝っていることがその評価につなが

Table 4 . Binding affinities of biapenem, meropenem, and ceftazidime at their MICs for penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strains #8

| Antibiotic | MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Binding (%) | | | | | PBPs-binding situation |
|-------------|------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|------------------------|
| | | PBP 1 A/1 B | PBP 2 | PBP 3 | PBP 4 | PBP 5 | |
| Biapenem | 0.5 | 73.9 | 61.2 | 69.0 | 100.0 | 19.2 | 4 > 1 A/1 B > 3 > 2 5 |
| Meropenem | 0.25 | 60.0 | 58.9 | 92.5 | 87.1 | 9.0 | 3 > 4 1 A/1 B > 2 5 |
| Ceftazidime | 4 | 96.0 | 51.4 | 100.0 | 51.2 | 6.3 | 3 > 1 A/1 B > 2 = 4 5 |

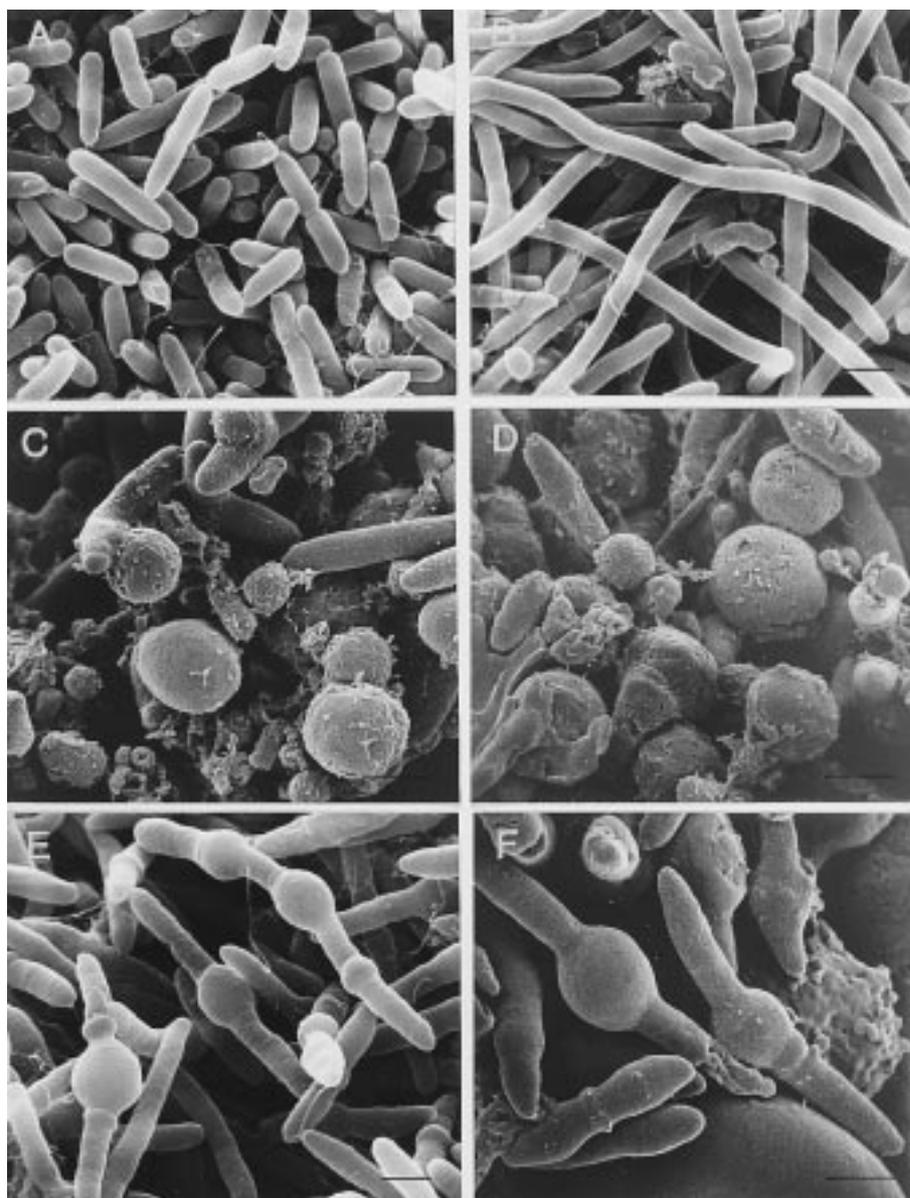


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* strain #8 after exposure to the 2 X MIC of biapenem, meropenem, and ceftazidime. Samples are as follows: A, control; B, ceftazidime 4 h; C, biapenem 2 h; D, biapenem 4 h; E, meropenem 2 h; F, meropenem 4 h. Each bar indicates 1 μm .

ている。なかでも、MEPMはIPM/CSやPAPM/BPに比して緑膿菌に対する抗菌力が優れていること、さらには中枢神経系副作用が低いことなどから、米国においては重症感染症に対する治療薬として推奨されている¹³⁾。

BIPMは、MEPMよりもさらに高いDHP-1安定性⁹⁾と、通常のMIC測定ではMEPMに試験管で1管弱劣るものの¹⁴⁾、接種菌量の影響を受けずに殺菌性が認められ¹⁵⁾、動物実験においてもMEPMよりも優れていると

の報告¹⁴⁾もある。このような相違は、BIPMとMEPMにおける緑膿菌のPBP_sに対する親和性の相違から生じていると推定される。MEPM¹⁶⁾はIPM^{16,17)}やBIPM^{10,11,18)}に比べ、PBP₃に対する親和性が高いことを特徴としている¹⁹⁾が、そのことはMEPMのMICを優れたものにしてはいるが、殺菌性は必ずしも優れていないことを推測させる。

すなわち、紺野ら¹²⁾が大腸菌のPBP_sに対する多くの β -ラクタム系薬の親和性、殺菌性、および形態変化との関係を詳細に解析した報告によれば、MICは〔PBP 1B+PBP 4〕と〔PBP 3〕が有意に関係しているが、殺菌性は〔PBP 4〕に対する親和性が増すほどに増強し、〔PBP 2+PBP 3〕の結合が増すほどに弱いことが有意であったとしている。菌の形態変化においては、〔PBP 3〕に対する親和性が高いほどフィラメント化し、〔PBP 2〕へのそれが高いほどにスフェロプラスト化、バルジ形成は〔PBP 4〕と〔PBP 1B〕に対する親和性が関与しているとしている。つまり、従来重要視されてこなかった低分子の〔PBP 4〕が β -ラクタム系薬の致死的標的として果たしている役割について再認識する必要のあることに言及している。

その理論を緑膿菌のPBP_sが大腸菌のPBP_sと同じ機能を有していると仮定して採用すると、今回われわれの行った実験成績は、ほぼ同じ結果として考えることができる。すなわち、MICは〔PBP 3〕と〔PBP 1B+PBP 4〕により強い親和性を有するMEPMの方がBIPMよりも試験管で半管ほど優れていたが、殺菌性に関しては〔PBP 4〕に対する親和性をもっとも強いBIPMの方が明らかに優れており、〔PBP 3〕に対する親和性が強いCAZ、あるいはMEPMの殺菌性はやや劣るという結果であった。形態変化についても大腸菌の成績で述べられているとおり、〔PBP 2〕、〔PBP 4〕、〔PBP 1B〕に低濃度から結合しているBIPMはスフェロプラスト化とバルジ形成が同時に見られるのに対し、MEPMでは〔PBP 3〕に対する親和性が他のPBP_sに比して高いためにフィラメント形成が勝り、2倍のMICという高濃度のMEPMを作用させることによってはじめて〔PBP 4〕と〔PBP 1B〕への結合によるバルジ形成が認められた。CAZは〔PBP 3〕に対する特異的な親和性を反映し、バルジ形成の認められないフィラメント細胞のみが観察されたと考えられる。

また、BIPMの〔PBP 4〕に対する高い親和性から生じた緑膿菌のスフェロプラスト細胞は、短時間で細胞の表層構造にも強い損傷を受けていることが電子顕微鏡観察によって確認されたが、このような細胞はヒト血清存在下において、リゾチームやそのほかの溶菌系によって容易に溶菌し、死滅していくことが経時的殺菌効果の検討から裏づけられたものと考えている。

BIPMの内科系治験成績の集計によると、投与後短時

日での臨床効果に優れているとされているが、それにはおそらくここで述べた短時間殺菌効果の相違が反映されているものと考えられた。

謝 辞

PBP_sの解析ならびにデータ処理に協力いただいた明治製薬(株)薬品総合研究所の小野暁子氏に感謝します。

文 献

- 1) Kahan J S, Kahan F M, Goegelman R, et al.: Thienamycin, a new β -lactam antibiotic. I. Discovery and isolation. *J Antibiotics* 32: 1~12, 1979
- 2) 砂川 洵, 金澤勝則, 納田浩司: カルバペネム系抗生物質の抗緑膿菌活性. *J Antibiotics*, 53: 479~511, 2000
- 3) Leanza W J, Windonger K J, Miller T W, et al.: *N*-Acetimidoyl- and *N*-formimidoyl thienamycin derivatives: antipseudomonal β -lactam antibiotics. *J Med Chem* 22: 1435~1436, 1979
- 4) 安田 紘: パニペネム. カルバペネム系抗生物質(原耕平 編), p.35~42, 医薬ジャーナル社, 1995
- 5) Sunagawa M, Matsumura H, Inoue T, et al.: A novel carbapenem antibiotic, SM-7338: Structure-activity relationships. *J Antibiotics* 43: 519~532, 1990
- 6) Kitzis M D, Acar J F, Gutmann L: Antimicrobial activity of meropenem against Gram-negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. *J Antimicrobial Chemother* 24 (S-A): 125~132, 1989
- 7) Kahan F M, Kropp H, Sundelof J G, et al.: Thienamycin, development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother* 12 (S-D): 1~35, 1983
- 8) Edwards J R, Turner P J, Wannop C, et al.: In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 215~222, 1989
- 9) 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
- 10) Ubukata K, Hikida M, Yoshida M, et al.: In vitro activity of LJC 10 627, a new carbapenem antibiotic with high stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 994~1000, 1990
- 11) 生方公子, 杉浦 睦, 紺野昌俊: カルバペネム系抗菌薬, biapenemのin vivo抗菌力について. *Chemotherapy* 42 (S-4): 20~25, 1994
- 12) 紺野昌俊, 旭 泰子, 生方公子: 大腸菌のペニシリン結合蛋白に対する β -ラクタム薬の親和性がMIC, 殺菌効果, ならびに形態変化におよぼす影響について. *日化療会誌* 47: 271~286, 1999
- 13) Gilbert D N, Moellering R C, Sande M A: *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* 2000. Antimicrobial Therapy, Inc, 2000
- 14) 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. *日化療会誌* 42 (S-4): 37~54, 1994
- 15) 西木克信, 疋田宗生: ピアペネム. カルバペネム系抗生物質(原 耕平 編), p.54~63, 医薬ジャーナル社, 1995

- 16) Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T: Comparison of two carbapenems, SM-7338 and imipenem: Affinities for penicillin-binding proteins and morphological changes. *J Antibiotics* 41: 314 ~ 320, 1990
- 17) Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, et al.: Studies of the mechanism of action of imipenem in vitro: Binding to the penicillin-binding proteins (PBP) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiotics* 37: 394 ~ 400, 1984
- 18) 西野武志, 大槻雅子, 尾花芳樹: biapenem の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について. *Chemotherapy* 42(S-4) 64 ~ 81, 1994
- 19) Yang Y, Bhachech N, Bush K: Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β -lactamases. *J Antimicrobial Chemother* 35: 75 ~ 84, 1995
- 20) 斎藤 厚, 稲松孝思, 岡田 淳, 他: 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント。42: 906 ~ 914, 1994

Comparison of *in vitro* activity of biapenem with other antimicrobial agents against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Kimiko Ubukata^{1,2)}, Naoko Chiba²⁾, Reiko Kobayashi²⁾, Keiko Hasegawa²⁾,
Yoshimi Higurashi³⁾, Tomomi Iwai³⁾, Katsuko Okuzumi³⁾
and Masatoshi Konno⁴⁾

¹⁾Institute of Microbial Chemistry

²⁾Center for Epidemiology & Clinical Microbiology, Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, 760 Morooka-machi, Kohoku-ku, Yokohama, Japan

³⁾Department of Clinical Laboratory, The Tokyo University Hospital

⁴⁾Emeritus Professor, Teikyo University, School of Medicine

The *in vitro* activity of 10 antimicrobial agents including carbapenem antibiotics biapenem (BIPM), meropenem (MEPM), imipenem (IPM) and panipenem (PAPM), was determined by the agar dilution method against *Pseudomonas aeruginosa* isolated nationwide in Japan in 2001. MIC_{50S} and MIC_{90S} of carbapenem antibiotics were as follows: BIPM, 1 and 16 μ g/mL; MEPM, 0.5 and 8 μ g/mL; IPM, 2 and 32 μ g/mL; PAPM, 8 and 32 μ g/mL. BIPM susceptibility was correlated more with IPM than those of other carbapenem agents. The bactericidal effect of BIPM at concentrations above the MIC, against clinical isolates of 6 *P. aeruginosa* strains, was excellent compared to that of MEPM and ceftazidime (CAZ), and was enhanced in the presence of 10% human fresh serum. The postantibiotic effect (PAE) was demonstrated only when *P. aeruginosa* strain #8 was treated with BIPM at concentrations above the MIC (1 μ g/mL) and in the presence of 10% human fresh serum for 2 hours. The binding affinity of 3 agents for penicillin-binding proteins (PBPs) of *P. aeruginosa* strain #8 was analysed using [³H] benzylpenicillin, with the following results: BIPM, PBP 4 (100%) > PBP 1 A/1 B (73.9%) > PBP 3 (69.0%) > PBP 2 (61.2%), MEPM, PBP 3 (92.5%) > PBP 4 (87.1%) > PBP 1 A/1 B (60.0%) > PBP 2 (58.9%), CAZ, PBP 3 (100%) > PBP 1 A/1 B (96.0%) > PBP 2 (51.4%) = PBP 4 (51.2%). PBP binding agreed with morphological changes in *P. aeruginosa* strain #8 after exposure to the above 3 agents. Following exposure to BIPM at above the MIC, cells lost their rod-like shape, becoming spheroplasts or bulge forms, indicating marked damage to the cell surface. Cell lysis was significantly enhanced in the presence of 10% human fresh serum. Exposure to MEPM induced morphological changes in filament cells in bulge formation and, in CAZ, only filament cells were observed. Cells treated with either MEPM or CAZ showed little surface damaged. The potent bactericidal effect of BIPM observed at concentrations above the MIC in a short time was assumed to be due to its highest affinity for PBP 4 and its high affinity for PBP 1 A/1 B, PBP 3, and PBP 2 at concentrations lower than the MIC.