

【原著・基礎】

肺炎球菌に対するカルバペネム系薬の抗菌作用の比較

千葉菜穂子¹⁾・小林 玲子¹⁾・長谷川恵子¹⁾・生方 公子²⁾・紺野 昌俊³⁾

¹⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所*

²⁾財団法人微生物化学研究所

³⁾帝京大学医学部

(平成 13 年 2 月 13 日受付・平成 14 年 2 月 28 日受理)

急性期にある呼吸器感染症，急性中耳炎，ならびに髄膜炎由来の検査材料から分離された 200 株の肺炎球菌を対象として biapenem (BIPM)，meropenem (MEPM)，imipenem (IPM) および panipenem (PAPM) のカルバペネム系 4 薬剤と，ampicillin (ABPC)，セフェム系薬 2 薬剤，および vancomycin (VCM) の計 8 薬剤の感受性を寒天平板希釈法により測定した。PCR 法による PBP_s 遺伝子解析にもとづく被験菌の内訳は，PSSP が 51 株，PISP が 71 株，PRSP が 78 株であった。8 薬剤の PRSP に対する MIC₅₀ と MIC₉₀ はそれぞれ次の通りであった：ABPC (2 μg/mL と 4 μg/mL)，cefotaxime (CTX: 1 μg/mL と 1 μg/mL)，cefotiam (CTM: 4 μg/mL と 8 μg/mL)，IPM (0.125 μg/mL と 0.25 μg/mL)，PAPM (0.063 μg/mL と 0.125 μg/mL)，MEPM (0.5 μg/mL と 0.5 μg/mL)，BIPM (0.25 μg/mL と 0.5 μg/mL)，VCM (0.25 μg/mL と 0.5 μg/mL)。2 株の PRSP に 8 薬剤それぞれの MIC を作用させた後の殺菌効果はセフェム系薬に比べカルバペネム系薬が明らかに優れていた。日本化学療法学会によって肺炎症例に対して設定されたカルバペネム系薬のブレイクポイント (1–2 μg/mL) 以下の作用では 4 薬剤の殺菌力に差は認められなかった。BIPM，MEPM および CTX の MIC をそれぞれ 3 時間作用させた後の PRSP ME-19 株 (血清型 19 F) の形態変化は，走査型電子顕微鏡下に観察した。BIPM と MEPM の作用により，長軸方向に伸長する新たな細胞壁合成が阻害され，分裂部位の constriction も阻害された膨化細胞が認められた。そして隔壁付近で物理的に引っ張られた細胞壁部分からの溶菌像が観察された。MIC における CTX の作用では隔壁形成は阻害されフィラメント細胞が観察された。細胞を長軸方向に伸長させる細胞壁合成はほぼ正常と思われ，短時間での溶菌細胞はほとんど認められなかった。これらの成績から，宿主に明らかなリスクファクターが認められない場合の PRSP による肺炎や敗血症例に対しては，カルバペネム系 4 薬剤の臨床効果は同程度に期待できると推論された。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, morphological changes, bactericidal activity, carbapenem antibiotics, biapenem

肺炎球菌は市中にみられる上・下気道感染症，あるいは急性中耳炎の主たる起炎菌であるが，近年，本菌において急速に耐性化が進行している¹⁾。β-ラクタム系薬耐性菌においては，菌の分裂・増殖に必須の酵素で，薬剤の作用標的でもある細胞壁合成酵素 (PBP_s) が変化している。この耐性化には，主に PBP 1A²⁾，PBP 2X^{3,4)}，PBP 2B⁵⁾ 酵素のそれぞれをコードする 3 つの遺伝子の変異が関与している。β-ラクタム系薬に対する耐性レベルは，その変異の組み合わせによって異なっている。すなわち，1 遺伝子の変異では耐性レベルは低いが，3 遺伝子とも変異するとその相乗効果で耐性レベルは高くなる⁶⁾。

われわれは PCR による PBP_s 遺伝子変異の迅速診断法をすでに確立している⁶⁾が，遺伝子変異を認めない株を PSSP とするとそれらの株の PCG の MIC は ≤0.031 μg/mL，3 遺伝子のうちの 1–2 遺伝子の変異した株を PISP とすると，

PCG の MIC は 0.063–0.5 μg/mL，遺伝子が 3 つとも変異した株を PRSP とすると，その PCG の MIC は 0.5–8 μg/mL である。肺炎球菌などによる市中感染症研究会 (1998–2000 年) の成績では，PSSP は 15.6%，PISP は 35.3%，PRSP は 49.0% に達している (Ubukata K, et. al., Abstr. 682, 41st ICAAC, Chicago, 2001)。

一方，2000 年 11 月に組織された「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス」研究班の成績によると，小児のみならず成人においても耐性肺炎球菌による敗血症や化膿性髄膜炎例の増加傾向が指摘されている。このような PRSP に対しては，経口 β-ラクタム系薬のみならず注射用セフェム系薬の抗菌力も明らかに低下しており，ある程度の抗菌力を保持しているのはカルバペネム系薬のみである。

本邦においては，カルバペネム系薬として imipenem (IPM)⁷⁾，panipenem (PAPM)⁸⁾ および meropenem

(MEPM)^{9,10}の3薬剤がすでに上市され使用されているが、それぞれの薬剤には特徴がみられる。すなわち、PRSPに対してはPAPMがもっとも優れ、IPMとMEPMは試験管で1~2本程度劣っている。しかし、緑膿菌に対する抗菌力はその逆にMEPM, IPM, PAPMの順となっている¹¹。

成人肺炎例や敗血症例の起炎菌としては、緑膿菌のみならず肺炎球菌なども重要であり、米国においてはPRSP感染症に対してもMEPMが使用されているが、治療上ほとんど問題がないように見受けられる¹²。本邦でもはたして同様であるのか、その検討は必要であるが、そのための基礎的裏づけとして、カルバペネム系薬のPRSPに対する抗菌力を殺菌性の面から追求した成績は、われわれが報告¹⁶している以外にほとんど見あたらない。

本論文においては、ワイスレダリー(株)(旧日本レダリー(株))によって創薬された新規カルバペネム系薬のbiapenem (BIPM)¹⁵を加えたカルバペネム系薬4薬剤、ampicillin (ABPC)、セフェム系注射薬2薬剤、およびvancomycin (VCM)について、抗菌力と経時的殺菌効果を比較するとともに、一部の薬剤をPRSPに作用させた後の肺炎球菌細胞に与える影響について電子顕微鏡下に観察したので報告する。

I. 材料と方法

1) 使用菌株

2000年11月~2001年10月までの1年間に、当施設に収集された呼吸器感染症由来株 (n=100)、急性中耳炎由来株 (n=50) および化膿性髄膜炎由来 (n=50) の肺炎球菌200株を対象とした。被験菌株は1症例1菌株とし、菌種の同定は「ペニシリン耐性肺炎球菌 PRSP 遺伝子検出試薬 (迅速診断研究試薬[®] 湧永製薬(株))」の中に組み込まれた *lytA* 遺伝子の有無で判定した。菌の分離などに通常用いた培地は、綿羊脱繊維血液5%加血液寒天培地 (Becton Dickinson) で、培養はCO₂ガスパック (三菱ガス化学(株)) を用いて行った。

2) 薬剤感受性の測定

肺炎球菌に対する8薬剤の抗菌力は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) に綿羊脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所) を5%の割合に添加して使用した。血液寒天培地にて前培養された被験菌は、翌日MH brothにMcFarlandが0.5になるように菌量を調整しながら植え継ぎ、綿羊脱繊維血液を5%になるよう加えて37°C、6時間培養したものを接種菌液とした。なお、被験薬剤はIPM, PAPM, MEPM, BIPM, ABPC, cefotaxime (CTX), cefotiam (CTM) およびVCMの8薬剤で、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。

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for *Streptococcus pneumoniae* PCR kit

Name (gene)	Sequence (5' to 3')	Position*	Product length (bp)
Autolysin (<i>lytA</i>)			
ALY 3	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	681-701	
ALY 4	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	999-978	319
PBP 1 A (<i>pbp 1 a</i>)			
PBP 1 A-2037 S	AAACCGCGACTGGGGATCAAC	2037-2058	
PBP 1 A-2275 R	GGTTGAGTCCGACCTTGTTT	2299-2275	263
PBP 2 X (<i>pbp 2 x</i>)			
PBP 2 X-1255 S	CCAGGTTCCACTATGAAAGTG	1255-1275	
PBP 2 X-1431 R	ATCCCAACGTTACTTGAGTGT	1451-1431	197
PBP 2 B (<i>pbp 2 b</i>)			
PBP 2 B-1566 S	CCTATATGGTCCAAACAGCCT	1566-1586	
PBP 2 B-1693 R	GGTCAATTCCTGTGCGAGTA	1712-1693	147
Macrolide efflux (<i>mefA</i>)			
MEF-180 S	GGGACCTGCCATTGGTGTGC	180-199	
MEF-562 R	CCCAGCTTAGGTATACGTAC	581-562	402
Adenine methylase (<i>ermB</i>)			
ERM-721 S	CGTACCTTGGATATTCACCG	721-740	
ERM-922 R	GTAAACAGTTGACGATATTCTCG	944-922	224

*Numbering for 6 genes were based as follow's papers.

Garcia P, et al.: Gene. 1986, 43: 265~272.¹⁷⁾

Martin C, et al.: J. Bacteriol. 1992, 174: 4517~4523.¹⁸⁾

Laible G, et al.: Mol. Microbiol. 1989, 3: 1337~1348.³⁾

Dowson C G, et al.: Nucleic Acids Res. 1989, 17: 7518.¹⁹⁾

Kamradt A, et al.: A.A.C. 1997, 41: 2251~2255.²⁰⁾

Trieu-Cuot P, et al.: Nucleic Acids Res. 1990, 18: 3660.²¹⁾

Accession No.M 13812 (*lytA*), Accession No.M 90527 (*pbp 1 a*), Accession No.X 16367 (*pbp 2 x*), Accession No.X 16022 (*pbp 2 b*), Accession No.U 83667 (*mefE=mefA*), Accession No.X 52632 (*ermAM=ermB*)

3) PCRによる遺伝子検索

肺炎球菌のPBP遺伝子変異および肺炎球菌同定のための *lytA* 遺伝子の検索には Table 1 に示す各 primer を用いた。初期に設計したプライマーから表に示すプライマーへの変更は、日本の分離株のみならず欧米の菌株についても検討した結果、精度をさらに高めるために新たに構築されたものである。

血液寒天培地上に発育した被験菌は、30 μ L の溶菌液が入った 500 μ L のチューブに 1 colony 釣菌し、60 $^{\circ}$ C、10分、94 $^{\circ}$ C、5分の溶菌操作を行った。1 mL あたりの溶菌液には 1 M Tris buffer が 100 μ L、4.5% Nonidet P 40 が 50 μ L、4.5% Tween 20 が 50 μ L、Proteinase K (10 mg/mL) が 20 μ L 含まれる。溶菌終了後の鑄型 DNA 液は、A、B、C の各反応チューブ液中へそれぞれ 2 μ L ずつ加えた。A チューブ中には Table 1 に示した *lytA* と *pbp 1a* の primer、B チューブ中には *pbp 2x* と *pbp 2b*、そして C チューブ中には *mefA* と *ermB* のそれぞれの primer が加えられた。1 mL あたりの PCR 反作用組成液には、10 \times PCR buffer が 100 μ L、dNTP mixture が 80 μ L、各 primer が 2 μ L、*Tth* polymerase (10 U/ μ L) が 4 μ L 含まれる。各チューブにはそれぞれの反応液をあらかじめ 30 μ L ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ C に保存し、用時解凍して使用した。

DNA の増幅は 94 $^{\circ}$ C、2分の DNA 変性、94 $^{\circ}$ C 15秒、53 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 15秒の PCR 反応を 30 サイクル行った。増幅後の DNA サンプルは 3% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、写真撮影して判定した。本方法の場合、*pbp 1a* *pbp 2x*、*pbp 2b* の各 primer は、遺伝子変異の多様化に対応するため、遺伝子変異を有しない感性菌側の DNA を増幅するように設計されている。それ以外の *lytA*、*ermB*、*mefA* 遺伝子については、DNA 断片が検出された場合に陽性と判断する。実際の電気泳動写真と判定は Fig. 1 に示したとおりである。

4) 経時的殺菌効果

臨床分離の PRSP、ME-3 株 (血清型: 6 B) と ME-19 株 (血清型: 19 F) に対する IPM、PAPM、MEPM、BIPM、ABPC、CTX、CTM および VCM の経時的殺菌効果は、MIC と 2 \times MIC のそれぞれを作用させた 2 時間後、4 時間後、および 6 時間後に測定した。ただし、ME-19 株に対する CTM の効果は、MIC が 8 μ g/mL と高いため、ヒトでの血中濃度の推移から 1/2 MIC の 4 μ g/mL と MIC 濃度での効果を測定した。

被験菌は血液寒天培地にて 37 $^{\circ}$ C で炭酸ガス培養を行い、翌日綿羊脱繊維血液を添加した 10 mL の MH broth に OD が 0.1 になるよう釣菌し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間の前培養後、各薬剤と綿羊脱繊維血液 0.5 mL をあらかじめ加えた MH broth 9.5 mL に菌量が 10⁶CFU/mL となるように接種した。菌数は 37 $^{\circ}$ C で培養しながら上記の時間に

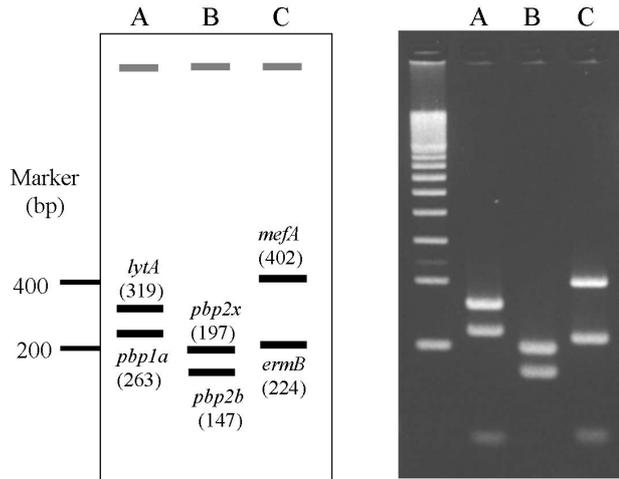


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments of the *lytA* and *pbp1a* genes in column A, *pbp 2x* and *pbp 2b* genes in column B, and *mefA* and *ermB* genes in column C from *Streptococcus pneumoniae*. Three *pbp* genes with the same sequences as penicillin-susceptible R6 strain were amplified.

測定した。

5) 走査型電子顕微鏡による形態変化の観察

薬剤作用後の PRSP の形態変化は走査型電子顕微鏡により観察を行った。ME-19 株を経時的殺菌効果の測定時と同一条件下で培養し、BIPM、MEPM および CTX の各 MIC を添加した培地中で 3 時間作用させた後に試料を作成した。なお、綿羊脱繊維血液は試料を汚すためにこの実験では加えなかった。

試料は 2% glutaraldehyde (pH 7.2 phosphate buffer) で 2 時間固定、続いて 1% の四酸化オスミウムで一晩固定後、ethanol 脱水、t-butyl alcohol 置換、凍結乾燥後、白金-パラジウム蒸着を行い、日立 S-900 LV で観察と撮影を行った。

II. 結 果

1. PBP遺伝子変異によって識別した肺炎球菌の薬剤感受性

Fig. 2 には肺炎球菌 200 株に対するカルバペネム系薬の IPM、PAPM、MEPM および BIPM と、ABPC、CTX、CTM、VCM の感受性成績と PBP 遺伝子変異との関係を示した。遺伝子変異の内訳は、変異のない PSSP が 51 株 (25.5%)、*pbp 2x* 単独変異が 34 株 (17.0%)、*pbp 2b* 変異が 2 株 (1.0%)、*pbp 2x*+*pbp 2b* 変異が 13 株 (6.5%)、*pbp 1a*+*2x* 変異が 22 株 (11.0%)、*pbp 1a*+*2x*+*2b* 変異が 78 株 (39.0%) であった。PRSP に対する ABPC の MIC は 1~8 μ g/mL、CTX は 0.5~4 μ g/mL、CTM は 1~16 μ g/mL であったが、カルバペネム系 4 薬剤の MIC は IPM が 0.063~0.5 μ g/mL、PAPM が 0.031~0.125 μ g/mL、MEPM が 0.125~1 μ g/mL、BIPM が 0.063~1 μ g/mL の成績で、いず

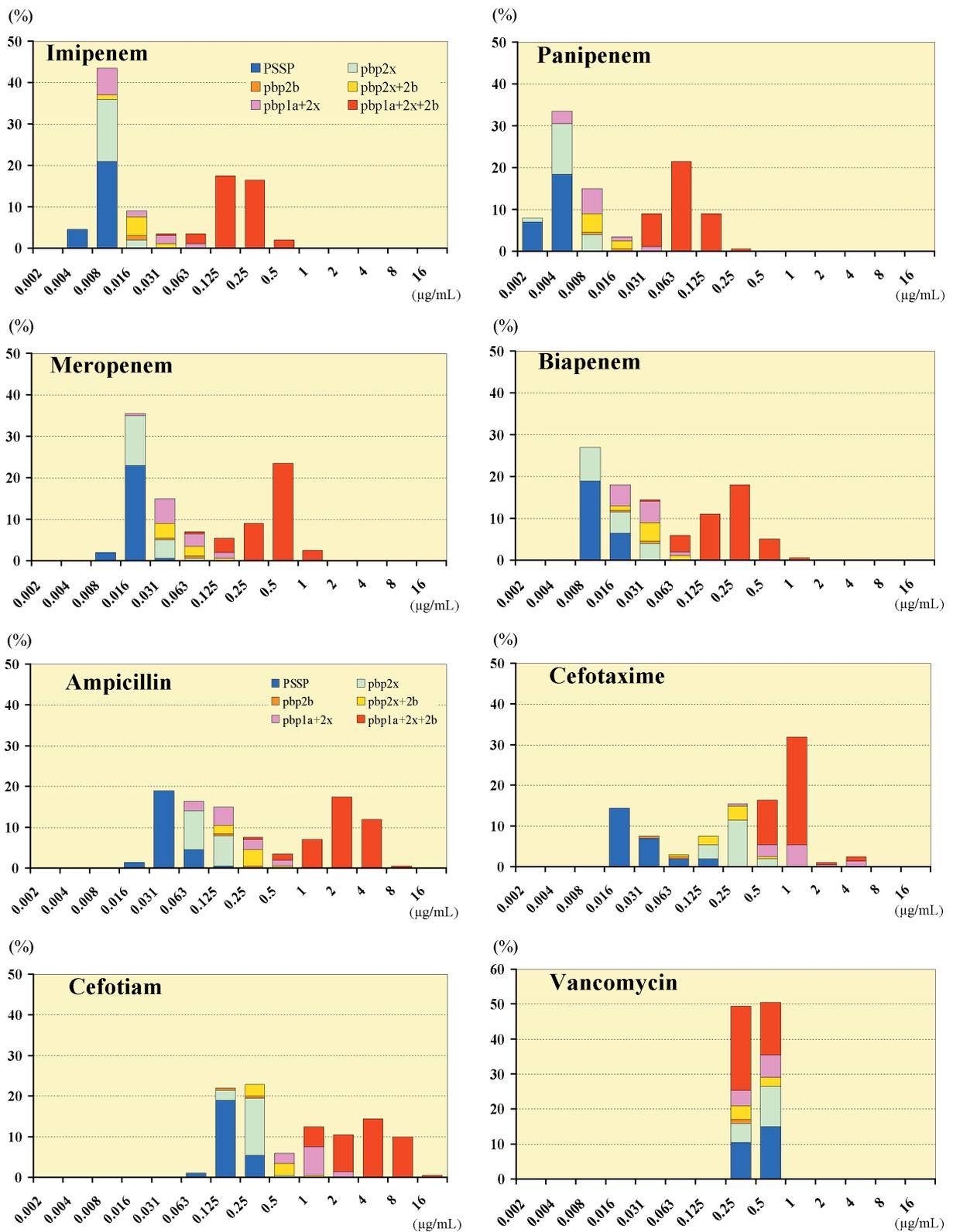


Fig. 2. Correlation between MICs of 7 β -lactam antibiotics and vancomycin, and PBPs gene alterations for a total 200 isolates of *Streptococcus pneumoniae*.

Table 2. Susceptibility distribution of biapenem and other antimicrobial agents against clinical isolates of penicillin-resistant 78 *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) strains

Antibiotic	No. of isolates for which the MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) was:										MIC ₅₀	MIC ₉₀	Breakpoint for pneumonia*
	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16			
Biapenem	1	8	22	36	10	1					0.25	0.5	2
Meropenem		1	7	18	47	5					0.5	0.5	2
Imipenem	1	5	35	33	4						0.125	0.25	1
Panipenem	16	43	18	1							0.063	0.125	2
Ampicillin				1	3	14	35	24	1		2	4	2
Cefotaxime					22	53	1	2			1	1	2
Cefotiam						10	18	29	20	1	4	8	4
Vancomycin				48	30						0.25	0.5	—

*Breakpoint recommended by Japanese Society of Chemotherapy, 1994¹³⁾

れも $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で PRSP の発育を阻止した。VCM はすべての株に対し $0.25\sim 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC を示した。

一方, *pbp 1a+2x*, *pbp 2x+2b*, あるいは *pbp 2x* 変異の PISP に対するカルバペネム系 4 薬剤の MIC は, $0.004\sim 0.125\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度域に分布した。特に, *pbp 2x* 単独変異株に対しては PSSP に対する MIC とほぼ同程度の抗菌力を示し, セフェム系薬の MIC に比べ明らかに優れていた。

Table 2 には PRSP 78 株に対する感受性分布と MIC₅₀, ならびに MIC₉₀ を示した。MIC₉₀ の比較では PAMP ($0.125\mu\text{g}/\text{mL}$) > IPM (0.25) > BIPM (0.5) = VCM (0.5) = MEPM (0.5) > CTX (1) > ABPC (4) > CTM (8) の順であった。カルバペネム 4 薬剤の MIC₉₀ は表中に同時に記した日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会¹³⁾が肺炎および慢性気道感染症に対して推奨している各薬剤のブレイクポイントよりも明らかに優れた値であった。それに対し, CTX の MIC₉₀ は推奨されている $2\mu\text{g}/\text{mL}$ よりも優れていたが, ABPC, CTM のそれはそれぞれのブレイクポイントを上回っていた。

2. 経時的殺菌効果

PRSP の ME-3 株と ME-19 株に対する β -ラクタム 8 薬剤の経時的殺菌効果は Figs. 3, 4 にそれぞれ示した。これらの菌株に対し, カルバペネム系薬 4 薬剤と ABPC, CTX および VCM はそれぞれの MIC と $2\times$ MIC, CTM は $1/2\times$ MIC と MIC を作用させ, 2, 4, 6 時間後の殺菌効果を測定した。カルバペネム系薬剤では作用後 2 時間で 3 log を上回る生菌数の減少が認められ, 6 時間後には測定限界の 1 log オーダーの生菌数まで減じた。それに比べ, ABPC, CTX, CTM の殺菌力は明らかに劣っていた。特に, セフェム系薬の CTX と CTM の殺菌力が劣っていた。VCM では 2 時間後に 3 log の生菌数減少を認めたが, その後の菌数減少は緩慢であった。

3. 薬剤作用後の形態変化

PRSP の ME-19 株に対し, BIPM, MEPM, および CTX それぞれの MIC と $2\times$ MIC を作用させ, 3 時間後の形態変化を走査型顕微鏡で観察した。そのうちの MIC 作用時の成績を Fig. 5 に示す。

Fig. 5-A は薬剤に触れない肺炎球菌の細胞であるが, 先端がやや尖った典型的なランセット型で, 細胞壁構造と思われる表面は凹凸の見られる海綿状を呈していた。矢印で示した分裂直後のもっとも新しい細胞壁構造は, それよりも前に形成された細胞壁に比べると, 薄くて合成直後の状態にあることが明瞭に示された。また, 肺炎球菌ではレンサ球菌と同じように分裂時の隔壁は長軸に対して直角に挿入されるが, 新たに合成される海綿状構造をみると, 隔壁挿入方向と同一方向に同心円状に形成されており, その結果, 細胞は長軸方向へ伸長していくことが示唆された。

Fig. 5-B には $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) の BIPM を作用させた肺炎球菌細胞の形態変化を示した。これらの細胞においては, 表面の海綿状構造の細胞壁は肥厚し, 矢印で示す細胞分裂部位においてはその海綿状構造が長軸方向に引っ張られ, ところどころに隙間が生じていた。この形態変化は, BIPM 作用後の細胞においては長軸方向への新たな細胞壁合成が停止していることを示している。そして, 長軸方向へ著しく引っ張られた細胞壁の脆弱部位から溶菌に至る像が観察された。

Fig. 5-C には $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) の MEPM を作用させた肺炎球菌細胞を示した。表面の細胞壁構造に生じた変化は基本的には BIPM と同じであったが, 細胞分裂の仕上げとなる 2 つの細胞への最後の乖離が生じていない像が多く認められた。

Fig. 5-D には $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) の CTX を作用させた 3 時間後の肺炎球菌細胞を示した。大多数の細胞は隔壁形成が阻害され, その部位はリング状に盛り上がっていることが観察された。また, 菌は分裂が 2 回以上阻止されたフィラメント細胞となったが, 海綿状の細胞壁構造を詳細に観察すると, 隔壁形成は停止しているも

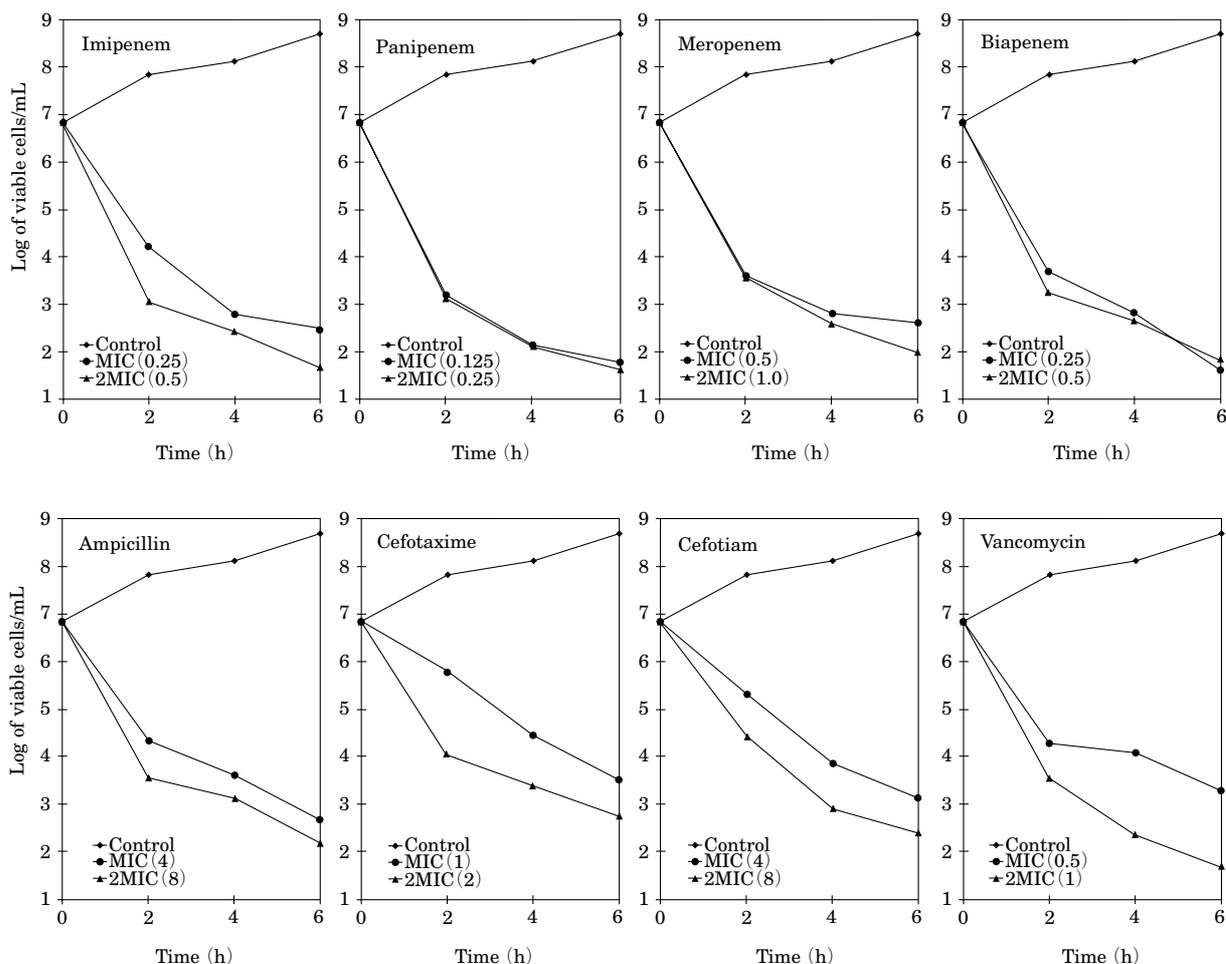


Fig. 3. Bactericidal activity of biapenem and other 7 β -lactam antibiotics against PRSP strain ME-3 (serotype 6 B).

の、長軸方向に伸長する細胞壁合成は阻害されていないために、フィラメント細胞を呈すると推察された。このことは分裂部位に脆弱な部位ができにくいことを意味し、形態学的にみても CTX やここには示していない CTM などのセフェム系薬剤の肺炎球菌細胞に与える損傷は、カルバペネム系薬に比して弱いと判断された。

III. 考 察

カルバペネム系抗菌薬は、MRSA を除く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知られ、本邦においては IPM/CS, PAMP/BP, MEPM へと開発が進められてきた。特に 1 β -メチル基が導入された MEPM は、中枢神経系の副作用も少なく、ヒトの DHP-1 にも比較的安定である¹⁴⁾ことから、単剤で使用可能となった薬剤である。このような理由から、医療の進歩と共に増加している免疫不全状態や基礎疾患を有するヒトに発症する重症細菌感染症に対し、欧米では IPM や MEPM が推奨されている¹²⁾。

BIPM は MEPM よりもさらに高い DHP-1 安定性¹⁵⁾と、緑膿菌に対する優れた短時間殺菌力を特徴として開

発された新規カルバペネム系薬¹¹⁾であるが、PRSP に対しても比較的良好な抗菌力を保持しているとされる。

PRSP の増加は世界的な問題でもあるが、本邦においては PRSP による肺炎、敗血症、化膿性髄膜炎例も増加傾向にあることが指摘されている。ちなみに、細菌検査室を中心に組織された「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス (2000 年 11 月～)」研究の成績では、小児のみならず、成人においても肺炎球菌による重症感染症例が相当数存在していることが明らかにされている。小児と成人由来株では莢膜型や耐性度に違いが認められ、成人由来株に病原性や耐性度の低い菌株が多いにも関わらず、後遺症を残した症例や死亡例が有意に高い (Ubukata K, et. al., Abstr. 682, 41 th ICAAC, Chicago, 2001)。成人例の約半数に糖尿病や肝機能障害といった基礎疾患が認められてはいるが、それらを認めない症例も散見され、特に入院後に使用されていた抗菌薬の大半がセフェム系薬であった点が注目された。

そのようなことから、この論文においては抗緑膿菌作用の優れているカルバペネム系薬が、PRSP による感染症に対しても PAMP と同列に使用できるのか否かを基

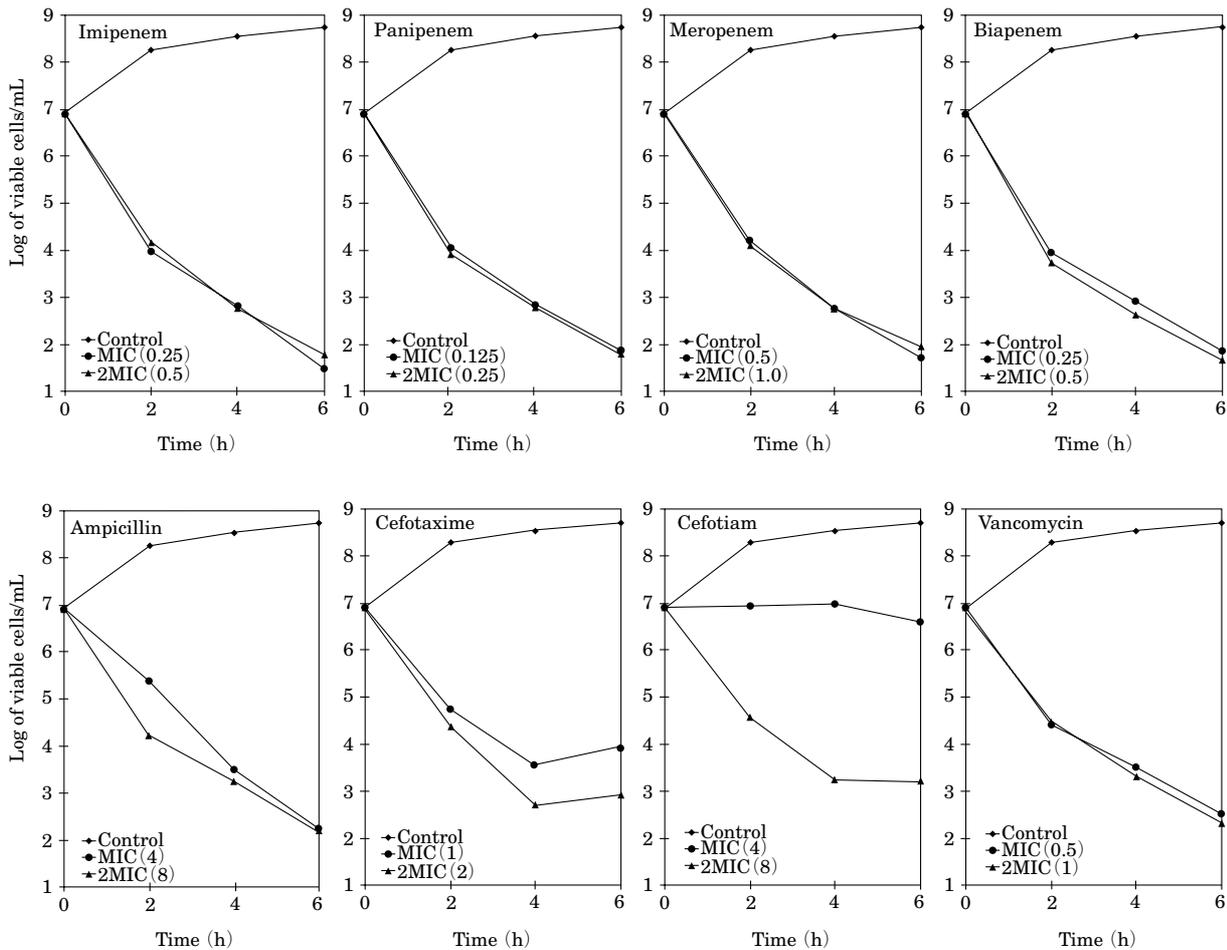


Fig. 4. Bactericidal activity of biapenem and other 7 β -lactam antibiotics against PRSP strain ME-19 (serotype 19 F).

礎的に明らかにしようとしたものである。

結果に示したように、4薬剤はPRSPやPISPに対し、いずれも0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のMIC₉₀を示し、日本化学療法学会の薬剤感受性測定委員会¹³⁾が推奨する1–2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のブレイクポイントよりも明らかに優れていた。特に、これらの薬剤をPRSPに作用させると、4薬剤とも2時間後には3 logオーダーの生菌数を減少させたことが注目され、殺菌作用に関しては薬剤間にほとんど差はないものと結論された。

一方、比較の対象としたセフェム系薬のなかでMICの優れていたのはCTXで、そのMIC₉₀は推奨されている濃度以下であったが、カルバペネム系薬に比べその殺菌効果は明らかに劣っていた。CTMの殺菌力は明らかに低下していた。

このような薬剤の種類による殺菌力の違いは、その標的であるPBP_sに対する親和性の違いに起因していると考えられる。すなわち、われわれが行ったPBP_s解析と位相差顕微鏡による形態変化の観察¹⁶⁾からは、PBP 1Aにはカルバペネム系薬やペネム系薬の親和性が高く、菌は卵形に膨潤して溶菌することから、PBP 1Aは細胞

壁を長軸方向へ伸長させるトランスペプチダーゼ活性を有する酵素で、細胞壁合成におけるもっとも重要な酵素と推察してきた。PBP 2A/2Xにはセフェム系薬の親和性が特異的に高いが、それらの薬剤存在下では隔壁形成が阻害され、フィラメント細胞が形成された。そして、PBP 2Bにはカルバペネム系薬が高い親和性を有しているが、本菌特有のランセット型形成において、細胞壁に徐々に締め込みを入れる (constriction) 際に重要な役割を果たしている酵素ではないかと考えてきた。PBP 2A/2XとPBP 2BもPBP 1A同様に高分子量のPBPであり、いずれもトランスペプチダーゼ活性を有する酵素と推定されている。

β -ラクタム系薬の肺炎球菌PBP_sに対する親和性と形態変化との解析から推定してきたような薬剤間にみられる殺菌作用の違いは、本論文で述べた殺菌性と電子顕微鏡観察によって裏づけることができたと考えている。すなわち、セフェム系薬の作用では隔壁形成は阻害されても、同心円上に新たに合成され長軸方向へ伸長する細胞壁合成は阻害されておらず、そのため細胞はフィラメント状を呈するものの、脆弱化した部位はできにくく、

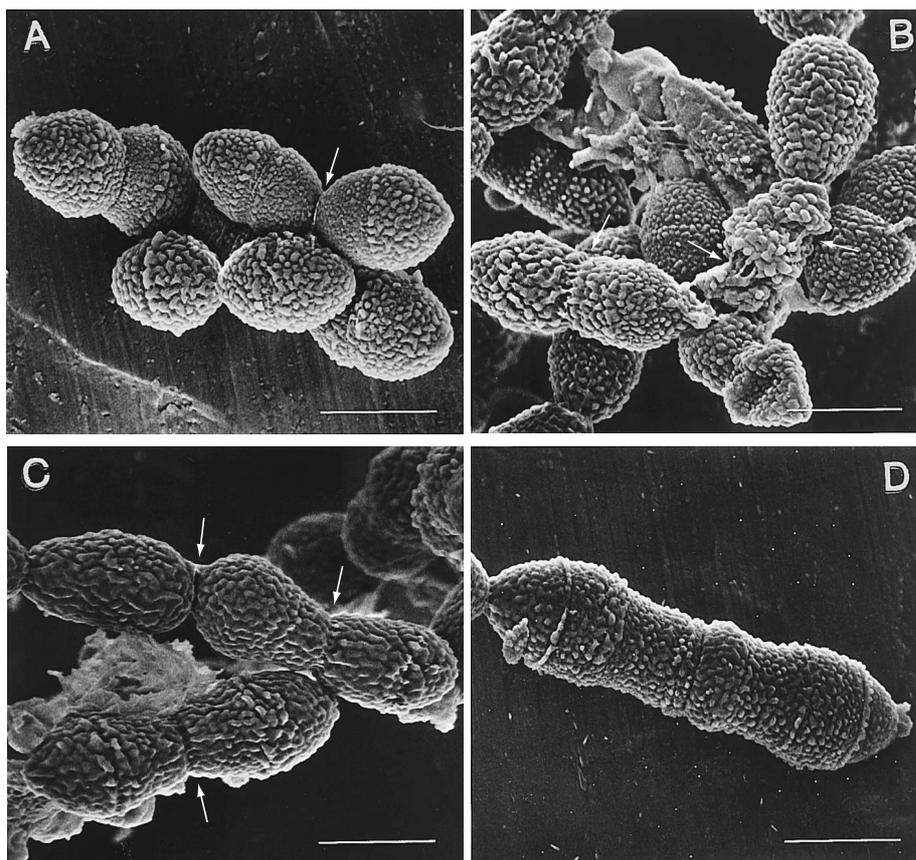


Fig. 5. Scanning electron micrographs of PRSP strain ME-19 after exposure to the MIC of biapenem, meropenem, and cefotaxime. Samples are as follows: A, control; B, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biapenem 3 h; C, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ meropenem 3 h; D, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cefotaxime 3 h. Each bar indicates 1 μm .

溶菌に至るまでに時間を要することが示唆された。

それに対し、BIPMやMEPMを作用させると、同心円上に合成され長軸方向へ伸長させる細胞壁合成が薬剤の作用直後に阻害され、菌はそれ以前に形成された細胞壁が物理的に引っ張られた状態で膨潤すると推定された。その結果、合成直後の分裂部位に脆弱箇所が多く生ずると、短時間で溶菌すると推察される。

ただし、カルバペネム系薬のようにPBP 1AやPBP 2Bに親和性の高い薬剤は、それらに結合することによって自己融解酵素の産生をも促進し、結果的に殺菌力を高めている可能性も否定できず、それらについては今後さらに詳細に検討していく必要がある。

化膿性髄膜炎に対する治療に際しては、髄液への移行性の良否や適応症などの問題があってこの限りではないが、カルバペネム系薬4薬剤の殺菌性はそれぞれのMIC以上では優劣はみられず、肺炎や敗血症例に対してはほぼ同列に考えて差し支えないと結論された。

謝辞

走査型電子顕微鏡による写真撮影にご協力いただきました日本女子大学理学部・電子顕微鏡研究室の許斐麻美先生、佐藤真美子先生、ならびに理学部長・大隅正子教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 市中感染症研究会: 再検討が迫られる市中感染症—PRSP, BLNARを中心に—。第2報 (代表世話人: 紺野昌俊), *J J Antibiotics* 54: Suppl. B, 2001
- 2) Asahi Y, Ubukata K: Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2267~2273, 1998
- 3) Laible G, Hakenbeck R, Sicard M A, et al.: Nucleotide sequences of the pbpX genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from *Streptococcus pneumoniae* R 6 and a cefotaxime-resistant mutant, C 506. *Mol Microbiol* 3: 1337~1348, 1989
- 4) Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K: Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1252~1255, 1999
- 5) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, et al.: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1257~1259, 1996

- 6) Ubukata K, Muraki T, Igarasi A, et al.: Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 3: 190~197, 1997
- 7) Kahan F M, Kropp H, Sundelof J G, et al.: Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother*. Dec: 12 Suppl D: 1~35, 1983
- 8) 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
- 9) Sunagawa M, Matsumura H, Inoue T, et al.: A novel carbapenem antibiotic, SM-7338: Structure-activity relationships. *J Antibiotics* 43: 519~532, 1990
- 10) 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
- 11) 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: 1~10, 2002
- 12) Gilbert D N, Moellering R C, Sande M A: The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2000. Antimicrobial Therapy, Inc, 2000
- 13) 斎藤 厚, 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—。Chemotherapy 42: 906~914, 1994
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 紺野昌俊, 生方公子: 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画通信, 東京, 1999
- 17) Garcia P, Garcia J L, Garcia E, et al.: Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 43: 265~272, 1986
- 18) Martin C, Briese T, Hakenbeck R: Nucleotide sequences of genes encoding penicillin-binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* with high homology to *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 1 A and 1 B. *J Bacteriol* 174: 4517~4523, 1992
- 19) Dowson C G, Hutchison A, Spratt B G: Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2 B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R 6. *Nucleic Acids Res* 17: 7518, 1989
- 20) Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al.: *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2251~2255, 1997
- 21) Trieu-Cuot P, Poyart-Salmeron C, Carlier C, et al.: Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn 1545. *Nucleic Acids Res* 18: 3660, 1990

Activity of biapenem and 7 other antimicrobial agents against *Streptococcus pneumoniae*

Naoko Chiba¹⁾, Reiko Kobayashi¹⁾, Keiko Hasegawa¹⁾,
Kimiko Ubukata^{1,2)} and Masatoshi Konno³⁾

¹⁾Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Japan

²⁾Institute of Microbial Chemistry

³⁾Teikyo University School of Medicine

The *in vitro* activity of 4 carbapenem antibiotics, i.e., biapenem (BIPM), meropenem (MEPM), imipenem (IPM), and panipenem (PAPM), ampicillin, 2 cephalosporins, and vancomycin (VCM), was determined by the agar dilution method against 200 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with respiratory tract infections, acute otitis media, and purulent meningitis. Based on penicillin-binding proteins (PBPs) gene analysis by polymerase chain reaction, the prevalence of PSSP (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*), PISP (penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae*), and PRSP (penicillin-resistant *S. pneumoniae*) was 51, 71 and 78 strains. MIC_{S50} and MIC_{S90} were as follows: 2 and 4 µg/mL ampicillin, 1 and 1 µg/mL cefotaxime (CTX), 4 and 8 µg/mL cefotiam, 0.125 and 0.25 µg/mL IPM, 0.063 and 0.125 µg/mL PAPM, 0.5 and 0.5 µg/mL MEPM, 0.25 and 0.5 µg/mL BIPM, and 0.25 and 0.5 µg/mL VCM. The bactericidal activity of carbapenems against 2 PRSP strains was significantly higher than that of cephalosporins. There was little difference among the activities of 4 carbapenems at concentrations lower than the breakpoint (1–2 µg/mL) recommended by the Japanese Society of Chemotherapy. PRSP strain ME-19 (serotype 19 F) was examined under a scanning electron microscope after exposure to BIPM, MEPM, or CTX at the MIC for 3 h. Peptidoglycan synthesis in the direction of the long axis and constriction in the septal region were inhibited by BIPM and MEPM. Cell lysis was observed near the septum as if a part of the cell wall was pulled apart. CTX inhibited septal synthesis and, as a result, filamentous cells were formed. Peptidoglycan synthesis in the long axis was almost normal, and only a few cells were lysed by short-term observation. From these results, we speculate that the clinical effect of the 4 carbapenems against pneumonia and sepsis cases caused by PRSP can be expected at the same level of activity when a host does not have a risk factor.