

## 【原著・基礎】

## MexAB-OprM 過剰産生緑膿菌によるマウス肺感染モデルに対する biapenem の治療効果

高田 利彦<sup>1)</sup>・清水 敦之<sup>1)</sup>・疋田 宗生<sup>1)</sup>・後藤 直正<sup>2)</sup>・西野 武志<sup>2)</sup><sup>1)</sup>明治製菓株式会社感染症研究所\*<sup>2)</sup>京都薬科大学微生物学教室

(平成16年4月9日受付・平成16年5月11日受理)

カルバペネム系薬感受性緑膿菌および薬剤排出蛋白質過剰産生緑膿菌を用いてマウス肺感染モデルを構築し, biapenem (BIPM) の治療効果を imipenem/cilastatin (IPM/CS) および meropenem (MEPM) と比較した。

カルバペネム系薬感受性株の感染動物モデルに対する3薬剤の治療効果は同等であり, いずれも高い治療効果を示した。一方, MexAB-OprM 過剰産生株に対するBIPMの治療効果は, IPM/CS およびMEPMに比べて高かった。また, MexAB-OprM 過剰産生かつ MexCD-OprJ 産生株に対するBIPMの治療効果は, MEPMに比べて高く, IPM/CS とほぼ同等であった。

カルバペネム系薬感受性株による感染動物モデルを用いて, 接種菌量の違いによるBIPMの治療効果をIPM/CS およびMEPMと比較した。その結果, 接種菌量が $10^5$  order CFU/lung の場合, BIPM, IPM/CS およびMEPMの治療効果は同等であったが,  $10^8$  order CFU/lung では, BIPMのほうがIPM/CS およびMEPMに比べて高い治療効果を示した。

**Key words:** biapenem, *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-OprM, pneumonia infection model

Biapenem (BIPM) は日本ワイスレダリー社が開発した新規注射用カルバペネム系薬であり, グラム陽性および陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有する<sup>1)</sup>。特に, 緑膿菌に対するBIPMの抗菌力は同系抗菌薬と同等もしくはそれ以上に強く, 殺菌力も ceftazidime 等のセフェム系薬に比べ強いことが報告されている<sup>2,3)</sup>。また, BIPM はヒト由来の dehydropeptidase-I に対する安定性が高く<sup>4)</sup>, meropenem (MEPM) と同様に単剤使用されている。

近年, 緑膿菌の多剤耐性メカニズムとして排出蛋白質産生の関与が注目されている。MexAB-OprM は多剤排出蛋白質の一つであり, この過剰産生が多剤耐性に大きく関与していることが知られている<sup>5-7)</sup>。したがって, MexAB-OprM 過剰産生により多剤耐性を示す緑膿菌感染症に対する抗菌薬の選択については注意を要する。

本研究では, MexAB-OprM 過剰産生緑膿菌に対するBIPMの *in vivo* 有効性を検討する目的で, MexAB-OprM 過剰産生緑膿菌によるマウス肺感染モデルを構築し, BIPMの緑膿菌に対する強い *in vitro* 抗菌力が *in vivo* 有効性に反映されるかどうかを imipenem/cilastatin (IPM/CS) およびMEPMを比較薬として検討した。また, カルバペネム系薬感受性緑膿菌によるマウス肺感染モデルに対するBIPMの治療効果に及ぼす接種菌量の影響についても検討した。

## I. 材料および方法

## 1. 使用抗菌薬

Biapenem (BIPM, Lot No. 200102270029, 980  $\mu$ g 力価/mg) は, 日本ワイスレダリー社より分与された原末を使用した。

Imipenem/cilastatin (IPM/CS, Lot No. 6BA95P, 445 力価/mg, 萬有製薬) および meropenem (MEPM, Lot No. ST017, 769 力価/mg, 住友製薬) は, それぞれ市販品を使用した。

## 2. 使用菌株

1999~2000年に収集された臨床由来(主に喀痰由来)の緑膿菌で, 当研究所保存のTH-4665(カルバペネム系薬感受性株), TH-2768(MexAB-OprM 過剰産生株) および TH-5157 (MexAB-OprM 過剰産生かつ MexCD-OprJ 産生株) の3株を使用した。MexB, OprM および OprJ 産生については, Gotoh らの方法<sup>8)</sup>に準じた抗 MexB, 抗 OprM および抗 OprJ モノクローナル抗体を用いた Western-Blot 法により確認し, Table 1 に示した。

なお, 緑膿菌 TH-4665 に対するBIPM, IPM/CS およびMEPMのMIC値は, それぞれ1, 2 および0.5  $\mu$ g/mLであった。また, TH-2768 および TH-5157 に対するBIPM, IPM/CS, MEPMのMIC値は, それぞれ2, 4, 8  $\mu$ g/mL および2, 4, 32  $\mu$ g/mLであった。

Table 1. Expression of MexB, OprM, and OprJ in strains

Strain	Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MexB	OprM	OprJ
TH-4665	biapenem	1	0	1.31	-
	imipenem/cilastatin	2			
	meropenem	0.5			
TH-2768	biapenem	2	1.81	1.45-2.58	-
	imipenem/cilastatin	4			
	meropenem	8			
TH-5157	biapenem	2	1.01	2.77	+
	imipenem/cilastatin	4			
	meropenem	32			

MexB: Ratio when signal from PAO-1 (5  $\mu\text{g}$ ) is 1

OprM: Ratio when signal from PAO-1 (5  $\mu\text{g}$ ) is 1

OprJ: Not induction

### 3. 使用動物

4週齢のICR系雄性マウス(日本チャールスリバー)を1群5匹で使用した。なお、前処理として感染4日前にcyclophosphamide (Sigma社)の200 mg/kgを腹腔内に投与した。

### 4. 接種菌液の調製および感染方法

保存菌株をMueller-Hinton agar (MHA, Difco)に植菌し、37°Cで16~18時間培養した。MHA平板上に発育した菌を生理食塩液(大塚製薬)に懸濁し、分光光度計でA660 nmでのoptical density (O.D)が0.03になるように生理食塩液でさらに希釈したものを接種菌液とした。なお、治療効果に及ぼす接種菌量の検討では、O.Dを0.3に調製した菌液も使用した。

Pentobarbital sodium (somnopenyl<sup>®</sup>, Schering-Plough Animal Health)腹腔内投与による麻酔下で、上記接種菌液の20  $\mu\text{L}$ をマウスの鼻腔に滴下して感染を惹起した。

### 5. 抗菌薬の投与方法

各抗菌薬の投与量は、マウスでのAUCおよびヒトでのAUCデータ<sup>4,9-11</sup>から計算して、常用投与量におけるヒトでのAUCをマウスにほぼ反映できるように設定した。すなわち、BIPM、IPM/CSおよびMEPMの1回投与量を30、60および100 mg/kgと設定した。各抗菌薬を感染2時間および8時間後にマウス背部皮下に投与した。

### 6. 感染治療効果の判定

感染24時間後に肺を無菌的に摘出し、1.8 mLの生理食塩液の入ったガラスホモジナイザーでホモジネート液を作製した。それぞれの肺ホモジネート液の10倍希釈系列を作製し、MHA平板に希釈液の100  $\mu\text{L}$ を塗抹した。37°Cで一晩培養後、発育したコロニー数を測定し、希釈率とコロニー数から肺内生菌数(CFU/lung)を算出した。この肺内生菌数の減少から治療効果を判定した。

### 7. データ解析

統計学的解析は薬効データ解析システム(SAS)を使用し、抗菌薬非投与群に対する各抗菌薬投与群の比較には

Steelの多重比較検定を、また抗菌薬投与群同士の比較ではSteel-Dwassの多重比較検定を用いた。

## II. 結 果

### 1. MexAB-OprM過剰産生緑膿菌肺感染動物モデルに対する治療効果

カルバペネム系薬感受性の緑膿菌TH-4665に対するBIPMの治療効果はIPM/CSおよびMEPMと同等であった(Table 2, 上段)。すなわち、感染24時間後における抗菌薬非投与群の肺内生菌数(log CFU/lung  $\pm$  S.D)が $8.63 \pm 0.37$ であるのに対し、BIPM (30 mg/kg  $\times$  2)、IPM/CS (60 mg/kg  $\times$  2)およびMEPM (100 mg/kg  $\times$  2)投与群の肺内生菌数は、いずれも2.5~3 logであり、同等の治療効果を認めた(Table 2, 上段)。

MexAB-OprM過剰産生緑膿菌TH-2768およびMexAB-OprM過剰産生かつMexCD-OprJ産生緑膿菌TH-5157に対するBIPM、IPM/CSおよびMEPMの治療効果をTable 2に示した。TH-2768感染動物モデルでは、感染24時間後における抗菌薬非投与群の肺内生菌数が $8.83 \pm 0.28$ であるのに対し、BIPM投与群の肺内生菌数は、IPM/CSおよびMEPM投与群の肺内生菌数に比較し、それぞれ2および5.5 log低かった(Table 2, 中段)。BIPMのTH-2768に対する治療効果は、IPM/CSおよびMEPMに比べ有意( $P < 0.05$ )に高かった。一方、TH-5157感染動物モデルでは、感染24時間後におけるBIPM投与群の肺内生菌数は、IPM/CSの場合とほぼ同等であり、MEPMに比較し、4.5 log低かった(Table 2, 下段)。

BIPMのTH-5157に対する治療効果は、IPM/CSと同等でMEPMに比べ有意( $P < 0.05$ )に高かった。

### 2. 接種菌量の異なる感染動物モデルに対する治療効果

カルバペネム系薬感受性緑膿菌TH-4665の接種菌量(抗菌薬初投与時の肺内生菌数)を $10^5$  orderおよび $10^6$  order CFU/lungとした場合のBIPMの治療効果をIPM/CSおよびMEPMと比較した(Fig. 1)。 $10^5$  order CFU/lungの接種菌量では、感染24時間後の抗菌薬非投与群

Table 2. Therapeutic efficacies of biapenem, imipenem/cilastatin and meropenem in a mouse model of infection pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	Inoculum size * (Log CFU/lung)	Antibiotics	Dose (mg/kg)	Vaible cell of lung (Log of CFU/lung±S.D)
<i>P. aeruginosa</i> TH-4665 (carbapenem-sensitive strain)	5.79	biapenem	30	2.60±0.26 <sup>1)</sup>
		imipenem/cilastatin	60	3.18±1.71 <sup>1)</sup>
		meropenem	100	2.60±0.48 <sup>1)</sup>
		control		8.71±0.30
<i>P. aeruginosa</i> TH-2768 (MexAB-OprM over-producing strain)	5.67	biapenem	30	2.90±0.46 <sup>2)</sup>
		imipenem/cilastatin	60	4.95±0.85 <sup>3)</sup>
		meropenem	100	8.30±0.36
		control		8.83±0.28
<i>P. aeruginosa</i> TH-5157 (MexAB-OprM over-producing and MexCD-OprJ producing strain)	5.63	biapenem	30	4.48±0.03 <sup>4)</sup>
		imipenem/cilastatin	60	4.85±0.57 <sup>4)</sup>
		meropenem	100	8.91±0.66
		control		8.87±0.50

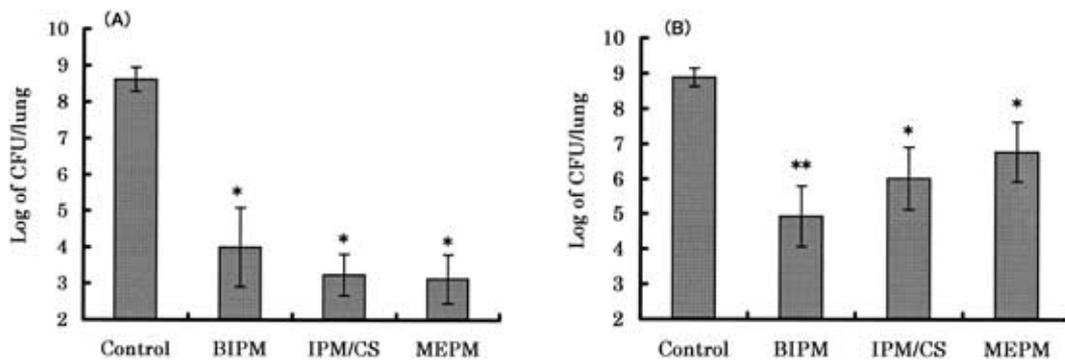
1) : P&lt;0.05 (vs control)

2) : P&lt;0.05 (vs imipenem/cilastatin, meropenem and control)

3) : P&lt;0.05 (vs meropenem and control)

4) : P&lt;0.05 (vs meropenem and control)

\* : Vaible cells of lung of 2 hours after infection (ujst first administration with antibiotics, mean: n=5)

Fig. 1. Influence of inoculum size on therapeutic efficacy of biapenem( BIPM ), imipenem/cilastatin( IPM/CS ) and meropenem ( MEPM ) against carbapenem-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* TH-4665 in a mouse pneumonia model.

(A) Inoculum size ( Log CFU/lung ) 5.83 ( Two hours after infection )

\*P &lt; 0.05 ( vs control )

(B) Inoculum size ( Log CFU/lung ) 6.84 ( Two hours after infection )

\*\*P &lt; 0.05 ( vs IPM/CS, MEPM, control ), \*P &lt; 0.05 ( vs control )

の肺内生菌数が  $8.62 \pm 0.33$  であったのに対し, BIPM, IPM/CS および MEPM 投与群における肺内生菌数は, いずれも 3~4 log であり, BIPM の治療効果は IPM/CS および MEPM と同等であった (Fig. 1A)。一方,  $10^6$  order CFU/lung の場合では, BIPM 投与群の肺内生菌数は, IPM/CS および MEPM に比較し, 1~2 log 程度低く, 接種菌量を増加させた場合の BIPM の治療効果は, IPM/CS および MEPM に比べ有意 ( $P < 0.05$ ) に高かった (Fig. 1B)。

### III. 考 察

緑膿菌の多剤耐性メカニズムの一つとして薬剤排出蛋白質の産生があり, 緑膿菌の排出蛋白質の報告は数多く, その一つである MexAB-OprM の過剰産生株は多剤耐性

となることが知られている<sup>5,6)</sup>。しかし, 同系の抗菌薬の中でも, MexAB-OprM に対して基質となるものとならないものがある。カルバペネム系薬の中では, MEPM は MexAB-OprM の基質となり排出され, 本排出蛋白質を過剰産生する緑膿菌は MEPM に対し軽度耐性となるが<sup>12)</sup> BIPM および IPM に対しては耐性化しないことが知られている<sup>13)</sup>。また, 抗菌薬の緑膿菌に対する *in vivo* 有効性評価において, 排出蛋白質産生の明らかな株を用いた報告はなく, 排出蛋白質産生と治療効果との関連についての検討はない。そこで本研究では, MexAB-OprM 過剰産生株を用い, マウス肺感染モデルに対する BIPM, IPM/CS および MEPM の治療効果を検討した。その結果, カルバペネム系薬感受性株による感染動物モデルに対する

BIPM, IPM/CS および MEPM の治療効果は, 同等であった。一方, MexAB-OprM 過剰産生株に対する BIPM の治療効果は, IPM/CS および MEPM に比べて高く, MexAB-OprM 過剰産生かつ MexCD-OprJ 産生株による感染動物モデルに対する BIPM の治療効果は, MEPM に比べて高く, IPM/CS と同等であった。これら MexAB-OprM 過剰産生株に対する治療効果は, 被験菌株に対する各抗菌薬の MIC をほぼ反映したものであった。すなわち, MexAB-OprM 過剰産生株による感染動物モデルに対する MEPM の治療効果は, カルバペネム系薬感受性株の場合に比べ低下した。MEPM は排出蛋白質の基質となることが知られており<sup>12)</sup>, *in vivo* 治療効果においても影響を受けることが明らかになった。

一般に  $\beta$  ラクタム系薬の抗菌力および殺菌効果は, 接種菌量の違いにより影響を受けることが知られている<sup>14,15)</sup>。そこで今回, カルバペネム系薬感受性緑膿菌を用いて, 接種菌量の違いによる BIPM のマウス肺感染モデルにおける治療効果について, IPM/CS および MEPM と比較した。その結果,  $10^5$  order CFU/lung の感染条件では, BIPM の治療効果は IPM/CS および MEPM と同等であったが,  $10^6$  order CFU/lung の条件下での BIPM の治療効果は, IPM/CS および MEPM に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に高く, BIPM のほうが IPM/CS および MEPM より接種菌量の影響を受けにくいことが明らかになった。荒明ら<sup>16)</sup>は, 接種菌量の違いによる BIPM, IPM/CS および MEPM の *in vitro* 殺菌効果を検討し, 高接種菌量における BIPM の殺菌効果は, IPM/CS および MEPM に比べ強いことを報告している。また, 疋田ら<sup>14)</sup>は, BIPM の殺菌効果は増殖期の違いによる影響を受けないが MEPM は影響を受け, 殺菌効果が低下することを報告している。IPM/CS および MEPM に比べ BIPM の治療効果が, 接種菌量の影響を受けにくいのは, 異なる接種菌量に対する BIPM の *in vitro* 殺菌効果の結果を反映したためと考えられる。

以上の結果から, BIPM は, MexAB-OprM 過剰産生緑膿菌感染に対して IPM/CS および MEPM より高い治療効果を示すことおよび IPM/CS や MEPM に比べ接種菌量の影響を受けにくいことが明らかとなった。したがって, BIPM は, 薬剤排出蛋白質産生緑膿菌感染症に対しても第一選択薬剤として使用できる可能性をもったカルバペネム系薬である。

謝 辞

本研究に当たりご尽力をいただきました新里鉄太郎氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 吉田益史, 渡邊正人, 三橋 進: 新規カルバペネム系抗生物質 biapenem の細菌学的評価。Chemotherapy 42 (S-4) 1 ~ 19, 1994
- 2) 疋田宗生, 寺島清香, 佐藤優子, 他: カルバペネム系薬に対する緑膿菌の薬剤感受性比較 (1)。Jpn J Antibiot 54: 571 ~ 579, 2001
- 3) 平石 徹, 宮田愛子, 高田利彦, 他: 緑膿菌の抗菌薬排出システム変異株に対する Biapenem の短時間殺菌作用。Jpn J Antibiot 55: 67 ~ 76, 2002
- 4) 山下憲昭, 河島浩輔, 野村和外, 他: Biapenem の各種実験動物における体内動態。Chemotherapy 42 (S-4) 243 ~ 250, 1994
- 5) 後藤直正: *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム。日治療会誌 47: 319 ~ 328, 1999
- 6) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al: Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 44: 3322 ~ 3327, 2000
- 7) Wong K K Y, Poole K, Hancock R E: Influence of OprM expression on multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 41: 2009 ~ 2012, 1997
- 8) Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, et al: Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in  $\Delta mexA-mexB-oprM$  mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 42: 1938 ~ 1943, 1998
- 9) 斎藤 玲, 三浦敏明, 多羅尾史明: Biapenem の体内動態に関する研究。Chemotherapy 42 (S-4) 277 ~ 284, 1994
- 10) 住田能弘, 納田浩司, 多田央子, 他: Meropenem の各種実験動物における体内動態。Chemotherapy 40 (S-1) 123 ~ 131, 1992
- 11) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆: Meropenem の第 I 相臨床試験。Chemotherapy 40 (S-1) 258 ~ 275, 1992
- 12) Masuda N, Ohya S: Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 36: 1847 ~ 1851, 1992
- 13) Shibata K, Adachi Y, Kato E, et al: *In vitro* and *in vivo* evaluation of BO-2727 against imipenem-and/or meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Antibiot 50: 135 ~ 138, 1997
- 14) 疋田宗生, 森 眞彦, 橋田多美: Biapenem の *in vitro* 評価。Chemotherapy 42 (S-4) 91 ~ 101, 1994
- 15) 西野武志, 福岡 隆, 本村琢哉, 他: Panipenem/betamipron の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について。Chemotherapy 39 (S-3) 55 ~ 74, 1991
- 16) 荒明美奈子, 田端麻紀子, 清水正樹, 他: 緑膿菌に対する biapenem の *in vitro* 殺菌力評価。日治療会誌 51: 173 ~ 178, 2003

***In vivo* efficacy of biapenem against mouse pneumonia infection caused by MexAB-OprM overproducing *Pseudomonas aeruginosa***

Toshihiko Takata<sup>1)</sup>, Atsuyuki Shimizu<sup>1)</sup>, Muneo Hikida<sup>1)</sup>, Naomasa Gotoh<sup>2)</sup> and Takeshi Nishino<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Infectious Disease Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,

760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

*In vivo* efficacy of biapenem (BIPM) against mouse pseudomonal pneumonia infection was compared to that of imipenem/cilastatin (IPM/CS) and meropenem (MEPM). All carbapenems showed high therapeutic efficacy against sensitive *P. aeruginosa*. BIPM efficacy against the MexAB-OprM overproducing strain was superior to IPM/CS and MEPM. Therapeutic response of BIPM against MexAB-OprM overproducing and MexCD-OprJ producing strain was superior to MEPM and similar to IPM/CS. BIPM effectiveness was compared to IPM/CS and MEPM using a mouse model infection with different inoculum size. In 10<sup>5</sup> order CFU/lung, therapeutic efficacy of BIPM, IPM/CS, and MEPM was comparable, but in 10<sup>6</sup> order CFU/lung, BIPM showed higher efficacy than IPM/CS or MEPM.