

β ラクタム系抗菌薬の初期殺菌能

松田 耕二¹⁾・井上 松久²⁾

¹⁾万有製薬株式会社臨床医薬研究所*

²⁾北里大学医学部微生物・寄生虫学

(平成 16 年 10 月 7 日受付・平成 16 年 11 月 24 日受理)

初期殺菌能 (Initial bactericidal activity) の定義を菌と抗菌薬が接触して 1 時間における殺菌速度とし、初発菌数から 1 時間後の生存菌数を引いた値の対数值として表した。各薬剤の初期殺菌能を測定するための薬剤濃度は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を用いて検討した。カルバペネム系抗菌薬の初期殺菌能は薬剤濃度 (μM) 依存的であったが、ceftazidime (CAZ) では調べた濃度範囲内 ($0.5 \mu\text{M}$ から $80 \mu\text{M}$ の間) では初期殺菌能は薬剤濃度に比例しなかった。その結果、カルバペネム系抗菌薬の初期殺菌能の評価可能な試験濃度として $20 \mu\text{M}$ という濃度を設定して imipenem (IPM), panipenem (PAPM), biapenem (BIPM), meropenem (MEPM) のカルバペネム系抗菌薬 4 薬剤と ceftazidime (CAZ), cefpirome (CPR), cefepime (CFPM) の初期殺菌能を比較した。IPM が最も強い初期殺菌能をもち、次いで MEPM を除くカルバペネム系抗菌薬が強い初期殺菌能を示した。セフェム系抗菌薬は明らかにカルバペネム系抗菌薬に比べて初期殺菌能が劣ることがわかった。

緑膿菌の臨床分離菌 47 株を用いた初期殺菌能の検討では、強い初期殺菌能 (1 時間に $2 \log$ 以上の殺菌) を示す菌株の割合は、IPM で 68.0%, MEPM で 31.9%, PAPM で 53.2%, BIPM で 36.2%, セフェム系抗菌薬の CAZ で 0%, CPR で 19.1%, CFPM で 23.4% であった。一方、幾何平均 MIC 値は IPM で $1.67 \mu\text{g}/\text{mL}$, MEPM で $0.612 \mu\text{g}/\text{mL}$, PAPM で $5.87 \mu\text{g}/\text{mL}$, BIPM で $1.02 \mu\text{g}/\text{mL}$, CAZ で $4.12 \mu\text{g}/\text{mL}$, CPR で $6.60 \mu\text{g}/\text{mL}$, CEPM で $3.61 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。この結果から、初期殺菌能と MIC 値との間には相関関係は認められず、初期殺菌能は MIC 値とは異なり抗菌薬を評価するうえで重要なひとつのパラメータとなりうることを示している。この研究は初期殺菌能と臨床効果の関係をさらに研究することに論拠を与えるものである。

Key words: Initial bactericidal activity, *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem, cephem antibiotic

抗菌薬を選択する場合、MIC 値は重要な指標のひとつである。抗菌薬の最も重要な作用は、生菌数を減少させ、病原菌を生体から除去するという点に意味がある。そのことから、抗菌薬の殺菌力もひとつの重要な要因といえる。MIC 値は殺菌力を現すものではない。そのために、MIC と臨床効果が一致しないことはよく経験する¹⁾。MIC 値と *in vivo* の感染実験結果が一致しない理由として、Fukuoka らは、PAPM の MIC 値が培地中の塩基性アミノ酸によって高くなることを挙げている²⁾。臨床効果を決める要因は、抗菌薬の MIC 自体が変動することも原因のひとつであるが、根本的には薬物の体内動態や組織移行性、宿主側の要因などが総合的に相互作用した結果として捉えられる。すなわち、MIC 値だけが抗菌力を表すものでない。

殺菌力は、通常 time-killing curve の結果から判断するが、習慣的に MIC を中心に比較する濃度設定が広く用いられることから、臨床使用時の生体内の薬物濃度における薬剤間の殺菌力の比較には無理がある。

Nishida らはセフェム抗菌薬 FR10024 の評価において initial killing rate という概念を取り入れて薬物の殺菌力の評価を行っている³⁾。また山城らはニューキノロンの抗菌力の検討において 4 時間までの殺菌を短時間殺菌力 (short term bactericidal activity) として報告し、薬剤濃度も血清中濃度を基準として採用している⁴⁾。われわれも、3 時間目の抗菌薬の血中濃度を用いて、1 時間の殺菌力を初期殺菌能として報告した⁵⁾。その結果によると MEPM 以外のカルバペネム系抗菌薬 ceftazidime より強い初期殺菌能を示すことを明らかにした。しかし、個々の薬剤で血中濃度が異なるため、薬剤間の正確な比較ができないこと、試験菌が *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 のみであることなどから、今回は薬剤濃度を一定にし、さらに初期殺菌能を普遍化するために臨床株を用いて初期殺菌能の強弱について比較した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

初期殺菌能の測定条件は *P. aeruginosa* PAO1 を用い

* 東京都中央区日本橋茅場町 1 3 12 岡地茅場町ビル 7F

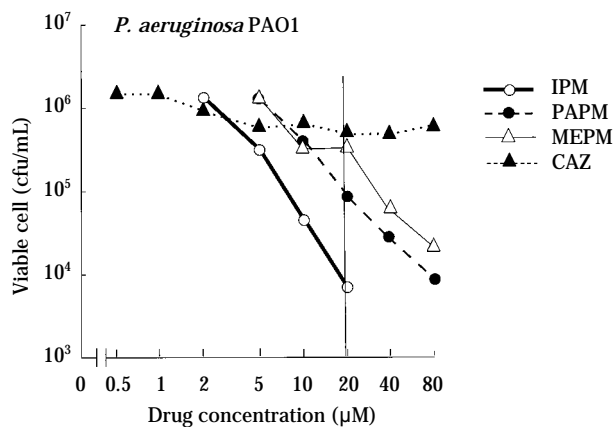


Fig. 1. Effect of drug concentration on initial bacterial killing.

て検討した。臨床分離緑膿菌は万有製薬株式会社つくば研究所で保存してある全国から集められた47株を使用した。

2. 使用薬剤

imipenem (IPM: 万有製薬株式会社), panipenem (PAMP: 三共株式会社), meropenem (MEPM: 住友製薬株式会社), biapenem (BIPM: 明治製菓株式会社), ceftazidime (CAZ: グラクソ・スミスクライン株式会社), cefpirome (CPR: 塩野義製薬株式会社), cefepime (CFPM: ブリストル・マイヤーズ株式会社)を用いた。

3. MIC および初期殺菌能の測定

MICは日本化学療法学会標準法に準じ、微量液体希釈法で測定した⁶⁾。培地はDifco社製のMueller-Hinton broth (MH broth)を使用した。

4. 初期殺菌能の測定

試験菌はMueller-Hinton agar (MH agar)培地に一夜35℃にて発育させ、新鮮なMH brothで初発菌濃度を 10^6 cfu/mLとした。その菌液10 mLをL字管に入れ、所定の濃度になるように薬剤液(カルバペネム系抗菌薬は10 mM MOPS緩衝液(pH7.0)、その他の薬剤は10 mM 磷酸緩衝液(pH7.0)に溶解)0.1 mLを加え、その時間を0時間とした。

初発菌数は薬剤を加える直前の菌液を適宜希釈し、寒天培地に塗抹し、35℃一夜培養後、生菌数をカウントした。35℃で正確に60分培養した後に0.1 mLを各L字管からサンプリングし、氷冷したMH brothで希釈し、同様に寒天希釈法によって菌数を計測した。

薬剤濃度: 使用した薬剤濃度は実験1の結果を踏まえ20 μM (final)とした。

II. 結果

1. 薬剤濃度と初期殺菌能

P. aeruginosa PAO1に対するIPM, PAMP, MEPM, CAZの初期殺菌能を比較するために、薬剤濃度を0.5 μM, 1.0 μM, 2.0 μM, 5.0 μM, 10 μM, 20 μM, 40

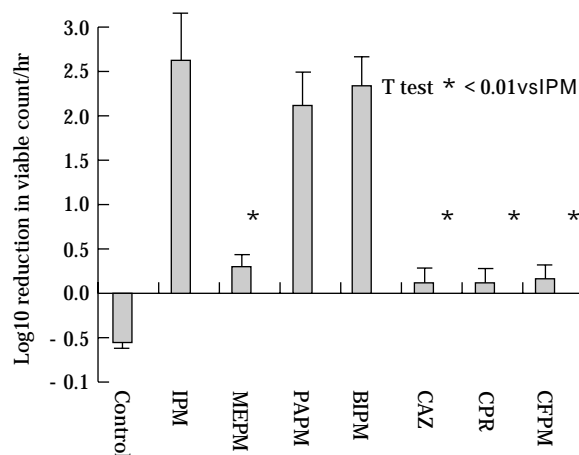


Fig. 2. Initial bactericidal activity of carbapenem and cephem antibiotics against *P. aeruginosa* PAO1.

μM, 80 μMの各濃度について調べた(Fig. 1)。カルバペネム系抗菌薬はいずれも濃度依存的に初期殺菌能が増強した。一方、CAZの場合は実験した濃度範囲では濃度依存的な初期殺菌能の増強はみられなかった。この結果から、5 μM以下では薬剤濃度が薄すぎて、いずれの薬剤も1時間では殺菌されなかった。一方、80 μM以上では、カルバペネムは1時間で完全に殺菌して、残存生菌数は検出感度以下となった。CAZの濃度をより高濃度とすれば1時間も殺菌が認められるかもしれないが、そうすると、カルバペネム系抗菌薬間の評価ができなくなってしまふ。それで、本研究の主眼であるカルバペネム系抗菌薬の評価ができる濃度として5 μMから80 μMを選び、IPMが完全に殺菌される20 μMを設定した。

2. 20 μM濃度における初期殺菌能

IPM, MEPM, PAMP, BIPM, CAZ, CPR, CFPMの各薬剤濃度を20 μMとした時の*P. aeruginosa* PAO1に対する初期殺菌能をFig. 2に示す。実験は日を改めて5回繰り返した。IPM, PAMP, BIPMはいずれの場合も1時間の反応で2 log以上の菌数の減少を示したのに対し、CAZ, CPR, CFPMのセフェム系抗菌薬の場合は初期殺菌能が軽微であり、菌数の減少もせいぜい0.5 log以下であった。また、MEPMも他のカルバペネム系抗菌薬に比べて、その初期殺菌能は弱かった。

3. 臨床分離緑膿菌における初期殺菌能

臨床分離緑膿菌47株に対するIPM, MEPM, PAMP, BIPM, CAZ, CPR, CFPMの初期殺菌能を調べた(Table 1)。1時間で2 log以上の菌数の減少を示す菌の割合はIPMで68%。次いでPAMPが53.2%であったが、BIPMとMEPMの場合はそれぞれ36.2%と31.9%であった。また、セフェム系抗菌薬のCPRとCFPMの初期殺菌能は、1時間で2 log以上の菌数の減少を示す菌株の割合は、20%前後と少なく、CAZにおいては認められな

Table 1. Isolates(%) showing 2 log₁₀ reduction in viable counts/hour and geometric MIC mean

| | IPM | MEPM | PAPM | BIPM | CAZ | CPR | CFPM |
|---|------|-------|------|------|------|------|------|
| % of isolates Showing 2 log ₁₀ reduction | 68 | 31.9 | 53.2 | 36.2 | 0 | 19.1 | 23.4 |
| G MIC mean | 1.67 | 0.612 | 5.87 | 1.02 | 4.12 | 6.60 | 3.61 |

n = 47 clinical isolates of *P. aeruginosa*

かった。一方、微量液体希釈法で測定した MIC の幾何平均は MEPM が一番小さく、次いで BIPM であった。このことから MIC の低いものが必ずしも初期殺菌能が大きいかとはいえず、MIC と初期殺菌能の間に乖離が認められた。

III. 考 察

細菌が抗菌薬に接触して 1 時間内に認められる殺菌された菌数の対数値を初期殺菌能と定義した。この 1 時間という設定の根拠は、できるだけ薬剤本来の殺菌力を測定するために最短時間を設定すること、緑膿菌の世代時間を 20 分前後とした時ポピュレーション中のすべての菌が 1 回は分裂を経験する時間として 1 時間は十分であること、20 μM という薬剤濃度は time above MIC との関係から多くの注射薬で十分効果が反映できる時間であることから 1 時間という時間を設定した。

MIC は細菌と抗菌薬が接触して、十数時間後の菌の生育の有無を肉眼的あるいは濁度を測定したとしてもその差異は 10⁷ cfu/mL 以下の菌の生存については一般に判定できず、殺菌力の比較にはならない。さらに抗菌薬の分解や細菌の変異、培地成分による妨害などの多くの要因が複雑に相互作用するため、*in vitro* の結果が直ちに *in vivo* の効果を推定することにならない⁷⁾。一方、初期殺菌能は抗菌薬と細菌が接触して短時間の殺菌力を表すため、抗菌薬の本来の抗菌力を表しているといえる。*P. aeruginosa* PAO1 を用いた実験で薬剤濃度を 0.5 μM から 80 μM に変動させた場合、カルバペネム系抗菌薬はいずれも濃度依存的な初期殺菌能を示した。一方、セフェム系抗菌薬である CAZ はこの濃度範囲では濃度依存的な初期殺菌能は示さなかった。 β ラクタム系抗菌薬は一般に時間依存的な殺菌を示すといわれているが⁸⁾、今回、カルバペネム系抗菌薬の場合は β ラクタム系抗菌薬であるにもかかわらず濃度依存的な殺菌が起こることが確認された。殺菌曲線は通常 MIC 値を基準にその前後の濃度を設定するが、われわれは初期殺菌能を一濃度で測定することによって薬剤間の殺菌力の比較が可能と考え、*P. aeruginosa* PAO1 を用いた予備実験の結果から、その濃度として 20 μM が適当とした。われわれが前回報告した論文⁵⁾では各薬剤の濃度は、体内動態の点滴終了後 3 時間目の血中濃度を採用した。その濃度は IPM が 8.77 μg/mL で MEPM が 4.12 μg/mL、CAZ が 12 μg/mL であ

た。この値をモルに換算すると、IPM は 29.2 μM、MEPM は 10.7 μM、CAZ は 21.9 μM となり、いずれも 20 μM 近辺の値となる。すなわち、各薬剤が体内動態でとりうる値になっているという意味で体内動態からも妥当と判断した。ただし、この場合は敗血症の場合のみであり、組織移行を考えるとさらに低い濃度での評価も必要であろう。Fig. 1 の濃度を変えた実験結果から IPM の 5 μM から 10 μM の低濃度(重量に換算すると 1.5 μg/mL から 3 μg/mL)でも初期殺菌能は認められているが、緑膿菌を対象に考えた場合にはこのような低濃度では臨床効果に疑問が出る。すなわち、菌種によって最適な濃度の設定が必要と考える。また、最近の臨床分離緑膿菌株サーベイランス¹¹⁾の結果から、20 μM という濃度は各薬剤の MIC₅₀ から MIC₉₀ の間に相当し、臨床分離株がとりうる範囲内にあるという意味で細菌学的にも妥当と判断した。もちろん、測定濃度は菌種が変わればその菌種に応じて最適な濃度を設定することはいうまでもない。Nishida らは大腸菌、肺炎桿菌の初期殺菌能の評価に 10 μg/mL という濃度を用いて調べているが、その根拠については述べていない³⁾。また、肺炎球菌の初期殺菌能を検討した例では脊髄液中濃度を採用している報告もある⁹⁾。われわれも注射用抗菌薬の点滴開始 3 時間目の濃度を基準に初期殺菌能を測り、今回と同様の結果を得ている⁵⁾。今回は予備実験の結果に基づき 20 μM で *P. aeruginosa* PAO1 の初期殺菌能を測定すると、MEPM を除くカルバペネム系抗菌薬ではいずれも 2 log 以上の殺菌を示すのに対し、セフェム系抗菌薬はいずれも 0.5 log 以下の初期殺菌能しか示さなかった。MEPM の初期殺菌能は 0.5 log 以下で化学構造上は同じカルバペネム系抗菌薬でも MEPM と IPM の殺菌力が違う点は注目に値する。肺炎球菌でも初期殺菌能は MEPM よりも IPM のほうが優れている結果が示されている(未発表データ)。石井らはヒト血漿中濃度シミュレートを用いて、薬剤を体内動態に合わせた時の初期殺菌について検討し、MEPM の MIC は優れているものの、PAPM と IPM の短時間殺菌力は MEPM よりも優れているとしている¹⁰⁾。これらの殺菌力の差が臨床効果にどのように反映するかは未知である。例えば薬剤投与後の早い時期(1 日目から 2 日目)にそういう効果の差があるのかも知れないが、現行の臨床効果判定法ではそのような早い時期の効果は反映できない。今後の

課題と考える。今回、臨床分離緑膿菌 47 株を用いた実験結果から、2 log 以上の初期殺菌能を示す菌の割合は IPM が最も多く、次いで PAMP であった。この臨床株を用いた実験から、初期殺菌能と MIC は明らかな相関が認められなかった。IPM の優れた殺菌は臨床でも支持されつつある⁴⁾。今回の実験結果から、明らかにセフェム抗菌薬とカルバペネム抗菌薬では初期殺菌能が異なることもわかった。この初期殺菌能という概念を導入して、抗菌薬を評価した報告は未だない。この点で、この論文は、初期殺菌能と臨床効果の関係を検討する根拠を与えるものと期待している。

文 献

- 1) 淵本定儀, 折田薫三, 上田祐造, 他: 外科領域における Cefepime の臨床的効果および血清・胆汁中濃度の検討。Chemother 39 (Suppl 2) 306 ~ 311, 1991
- 2) Fukuoka T, Masuda N, Takenouchi T, et al: Increase in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenem antibiotics in low-amino-acid media. Antimicrob Agents Chemother 35: 529 ~ 532, 1991
- 3) Nishida M, Murakawa T, Kamimura T, et al: Laboratory Evaluation of FR10024, a New cephalosporin derivative. Antimicrob Agents Chemother 11: 51 ~ 63, 1977
- 4) 山城芳子, 高畑正裕, 島倉雅子, 他: Pazufloxacin の短時間殺菌力と in vitro postantibiotic effect に関

- する検討。日化療会誌 43 (Suppl 2) 90 ~ 96, 1995
- 5) 松田耕二, 井上松久: 初期殺菌能による抗菌薬の評価。Jpn J Antibiotics 53: 667 ~ 670, 2000
- 6) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (1993): 微量液体希釈法による MIC 測定法 日本化学療法学会標準法 の一部修正。Chemother 41: 184 ~ 186, 1993
- 7) Amsterdam D: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In Antibiotics in laboratory medicine (Lorian V ed), p. 52 ~ 111, Williams & Wilkins, Baltimore, 1996
- 8) 戸塚恭一: 投与量と投与方法の設定。臨床医 29: 1230 ~ 1233, 2003
- 9) Doit C P, Bonacorsi S P, Fremaux A J, et al: In vitro killing activities of antibiotics at clinically achievable concentrations in cerebrospinal fluid against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with meningitis. Antimicrob Agents Chemother 38: 2655 ~ 2659, 1994
- 10) 石井千加, 角田正代, 阿部友美, 他: ヒト血漿中濃度シミュレート下における緑膿菌に対するカルバペネムの短時間殺菌力。Jpn J Antibiotics 55: 187 ~ 195, 2002
- 11) 吉田 勇, 杉森義一, 東山伊佐夫, 他: 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス ~2000 年分離グラム陰性菌に対する抗菌力。日化療会誌 51: 209 ~ 232, 2003

Initial bactericidal activity of β -lactam antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*

Kouji Matsuda¹⁾ and Matsuhisa Inoue²⁾

¹⁾Clinical Development Institute, Banyu Pharmaceutical CO., Ltd.,

Okachi-Kayabacho Building, 1 3 12 Nihonbashi-Kayabacho, Chuo-ku, Tokyo, Japan

²⁾Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

Initial bactericidal activity was defined as log₁₀ of bacteria killed in 1 hour of exposure to antibiotics. Initial bactericidal activity of carbapenems depended on substrate concentration, whereas the initial bactericidal activity of ceftazidime (a cephem antibiotics) did not depend on concentration within tested concentrations (0.5 μ M to 80 μ M). Initial bactericidal activity of 4 carbapenems (imipenem, meropenem, panipenem, and biapenem) and 3 cephem antibiotics (ceftazidime, cefepime, and ceftipime) against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was measured at 20 μ M of each antibiotic. Carbapenems other than meropenem showed above 2 log reduction in viable count in 1 hour, but cephem antibiotics and meropenem showed under 0.5 log reduction in viable counts in 1 hour. Imipenem showed exceptional initial bactericidal activity. Initial bactericidal activity of carbapenem and cephem antibiotics was assessed using 47 strains of *P. aeruginosa* clinical isolates. The rate of *P. aeruginosa* clinical isolates showing 2 log₁₀ reduction in viable counts per hour was 68.0% for imipenem, 53.2% for panipenem, 36.2% for biapenem, 31.9% for meropenem, 23.4% for cefepime, 19.1% for ceftipime, and 0% for ceftazidime. The geometric MIC mean for 47 strains of *P. aeruginosa* was 0.612 μ g/mL for meropenem, 1.02 μ g/mL for biapenem, 1.67 μ g/mL for imipenem, 3.61 μ g/mL for cefepime, 4.12 μ g/mL for ceftazidime, and 5.87 μ g/mL for panipenem. Initial bactericidal activity did not correlate with MIC. This study thus requires further study of the relationship between initial bactericidal activity and clinical efficacy.