

【原著・基礎】

Pseudomonas aeruginosa に対するカルバペネム系抗菌薬間の抗菌作用の比較島内千恵子¹⁾・兼子 謙一²⁾・佐藤 義則²⁾・佐藤 優子³⁾・岡本 了一^{2,3)}・井上 松久⁴⁾¹⁾北里大学大学院医療系研究科環境感染学 (現 宮崎県立看護大学)²⁾北里大学大学院医療系研究科環境感染学³⁾北里大学医学部微生物学⁴⁾北里大学大学院医療系研究科環境感染学, 北里大学医学部微生物学*

(平成 17 年 10 月 13 日受付・平成 17 年 11 月 9 日受理)

臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* 50 株に対するカルバペネム系抗菌薬 [imipenem/cilastatin (IPM/CS), meropenem (MEPM), biapenem (BIPM) および doripenem (DRPM)] の MIC₅₀ と MIC₉₀ 値は順に (2, 16), (1, 16), (1, 16), (1, 8) μg/mL であった。*P. aeruginosa* pf-18 株に対するヒト新鮮血清存在下での抗菌薬の殺菌力は, IPM/CS と BIPM の場合抗菌薬単独時に比べてさらに増強されたが, MEPM および DRPM は薬剤単独時のそれとほぼ同程度であった。この薬剤処理による経時的殺菌力の違いは, IPM/CS と BIPM の場合は菌体の球形化 (spherical forms) と溶菌像, MEPM と DRPM の場合は菌体の伸長化 (filamentous forms) と一部のコブ状形成等の違いとして確認された。*P. aeruginosa* 由来の penicillin binding proteins (PBPs) に対する結合親和性を調べると, IPM/CS および BIPM では PBP₄, 2, 1A, 3, 1B, MEPM は PBP₄, 3, 2, 1A, 1B, DRPM は PBP₄, 3, 2, 1A, 1B の順に強い結合親和性を示した。クラス C 型 β ラクタマーゼを誘導するための各薬剤の至適濃度は, IPM と BIPM は sub MIC 濃度, MEPM と DRPM においては 3MIC またはそれ以上の濃度であった。以上の結果をまとめると *P. aeruginosa* に対する 4 薬剤のカルバペネム系薬は, 薬剤単独または新鮮血清存在下での短時間殺菌力の動向, PBPs 結合親和性と形態変化の違い, あるいはクラス C 型 β ラクタマーゼを誘導するための至適濃度の違い等から IPM/CS と BIPM の群と MEPM と DRPM の群の 2 群に分けられた。

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem, penicillin binding proteins, class C β-lactamase, inducibility

カルバペネム系抗菌薬は, その化学構造や物性を反映し細菌のもつ penicillin binding proteins (PBPs) に対する結合親和性や外膜透過性, あるいは抗菌スペクトルやヒト由来のデヒドロペプチダーゼ (DHP-I) に対する安定性等の点で若干異なる。グラム陽性菌に対して強い抗菌力を発揮する imipenem (IPM) と panipenem (PAPM), グラム陰性菌に強い抗菌力を示す抗菌薬として meropenem (MEPM) や biapenem (BIPM) にそれぞれ識別できる。また, ヒト DHP-I に対して BIPM および MEPM は安定であるが, IPM の場合は DHP-I によって加水分解されるため cilastatin との合剤として使用されている^{1,2)}。さらに *Pseudomonas aeruginosa* の多剤排出蛋白質 (MexAB-OprM 等) との関係において, IPM や BIPM はその基質とはならないが, MEPM は基質になり容易に菌体外に排出されるため排出蛋白質過剰発現株に対する抗菌力が低下する³⁻⁵⁾。また, 最近, 抗菌薬の短時間殺菌効果は, 除菌効果を発揮する要因の一つとして検討されている。特に *P. aeruginosa* に対するカルバペネム系抗菌薬の短時間殺菌効果の違いが, 臨床効果に反映されている可能性を示唆する報告もあ

る⁶⁻⁹⁾。今回, 新たに新規カルバペネム系抗菌薬の doripenem (DRPM) が上市されたことから, わが国においては 5 薬剤のカルバペネム系抗菌薬の使用が可能となった。そこで, 培地の影響を受ける PAPM を除いた 4 薬剤のカルバペネム系薬の緑膿菌に対する細菌学的な特性を明確にすることを目的として, 抗菌力, 寒天平板を用いたの発育阻止円の経時的な変化, 短時間殺菌効果と形態的な観察, PBPs 結合親和性の動向, およびクラス C 型 β ラクタマーゼの誘導能の強弱についてそれぞれ検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

感受性測定には 2003 年喀痰を中心に検出された臨床分離株 50 株を用いた。また, 殺菌効果, 形態観察および PBPs 結合親和性試験には以前報告した *P. aeruginosa* pf-18 株⁸⁾を用いた。

2. 使用抗菌薬

Imipenem/cilastatin (IPM/CS: 万有製薬株式会社), meropenem (MEPM: 住友製薬株式会社) および

biapenem(BIPM: ワイス株式会社)は、それぞれ力価の明らかな薬剤の分与を受けた。また, doripenem(DRPM)については、化学合成(力価: 949 $\mu\text{g}/\text{mL}$)したものをを用いた。

3. 感受性試験

MIC は日本化学療法学会標準法¹⁰⁾に準じた寒天平板希釈法により測定した。ただし, 抗菌薬の濃度については, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を基準とする希釈系列とした。

測定の結果, IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM のいずれかの MIC が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌株については, メタロ β ラクターゼ SMA⁺ 栄研 (栄研化学) を用いてメタロ β ラクターゼの検出を行った。

4. 寒天平板上での発育阻止円の経時的変化

Mueller-Hinton agar (MHA, 栄研) に発育させた *P. aeruginosa* pf-18 株の単コロニーを 7 mL の 0.4% 硝酸カリウム含有 Mueller-Hinton broth Cation adjusted (MHB, Becton Dickinson) に植菌し, さらに 35 °C で一夜培養した。この菌液をゼラチン加緩衝生理食塩水を用いて 10 倍希釈し, 本希釈菌液 (1.5 mL) を培地表面を乾燥させた MHA の全面に均一滴下接種した後, 余分な菌液をピペットで除去し, 室温にて 5 分間程度放置して培地表面を乾燥させた。その後, 本プレート上に各抗菌薬 20 μg 含有ディスクをそれぞれ載せ, 35 °C で培養後, 経時的 (4, 8, 14, 16 時間) に形成された阻止円を観察した。

5. 殺菌効果とヒト新鮮血清添加の影響

MHA で増殖させた被験菌を MHB に植菌し, 35 °C で一夜培養した。この培養菌液を新鮮 MHB で適宜希釈し, OD_{600nm} 0.3 に調整 (約 3×10^8 CFU/mL) した後, さらに, 同液体培地で 1,000 倍希釈し, 35 °C で 2 時間振盪培養 (水浴中) したものを接種菌液とした。本接種菌液の 6 mL を L 字管に入れ, 所定の作用濃度の 100 倍濃度液に調製した各薬液をそれぞれ 6 μL 添加 (0 時間) 後, さらに 35 °C で振盪培養を続けた。抗菌薬添加後 0, 1, 2 および 4 時間にそれぞれサンプリングした後, 0.05% 寒天含有滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈系列を作製した。各希釈液の 100 μL を MHA に塗抹し, 35 °C で一夜培養後, 出現したコロニー数と希釈率から生菌数 (CFU/mL) を求めた。この計測後の生菌数の減少から, 単位時間当たりの殺菌力を求め比較した。

また, ヒト新鮮血清添加の有無による抗菌薬の殺菌力の増強を調べる場合, 抗菌薬の作用濃度として MIC 濃度を用い, ヒト新鮮血清の添加濃度は生方らが報告した濃度 10% を用いて検討した¹⁵⁾。

6. 走査型電子顕微鏡による形態観察

対数増殖後期 (約 10^8 CFU/mL) まで増殖させた *P. aeruginosa* pf-18 株を用いて殺菌効果との関連性を検討するため, 各抗菌薬の 3 MIC 濃度を 1 時間作用させた時の形態変化を観察した。抗菌薬作用後の菌体に対してグルタールアルデヒド添加 (最終濃度として 2.5%) による

一次固定, オスミウム添加による二次固定をそれぞれ行った後, アルコール希釈系列で脱水操作を実施した。さらに, 酢酸イソアミルで置換し, 臨界点乾燥および白金パラジウム蒸着を行い, 走査型電子顕微鏡で観察した。

7. Penicillin binding proteins (PBPs) に対する結合親和性

Spratt の方法¹¹⁾に準じて検討した。すなわち, 対数増殖期後期まで増殖させた *P. aeruginosa* pf-18 株を集菌し, 10 mM MgCl₂ 加 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, 菌体を超音波にて破碎後, 4 °C, 8,000 rpm で 15 分間遠心し, その上清を超速心 (4 °C, 40,000 rpm, 30 分間) し, 膜画分を得た。同緩衝液で 3 回洗浄し, 最終的に蛋白濃度が 15 μg protein/mL になるように膜画分浮遊液を作製した。30 μL の膜画分に所定濃度のカルバペネム系抗菌薬を加え, 30 °C で 10 分間反応後, 3 μL の ³H-benzylpenicillin (Amersham 社) を加え, さらに 30 °C で 10 分間反応させた。Sarcosil と非放射性の benzylpenicillin の混合液を加えて反応を停止し, 遠心分離により得られた上清に 2-mercaptoethanol を加え, 100 °C で 2 分間煮沸し, 10% acrylamide-0.06% bis-acrylamide ゲルを用いて電気泳動を行った。その後, 蛋白固定, 増感, ゲル乾燥を行い, 最終的に乾燥ゲルを X 線フィルムに密着させ, -80 °C で 3 週間感光させることにより, フルオログラフィーを行った。各 PBP に対する親和性をデンストメータを用いて測定した。

8. クラス C 型 β ラクターゼの誘導産生

前報の方法^{8,16)}に準じて, 各薬剤のクラス C 型 β ラクターゼを誘導産生するための至適濃度について検討した。まず L-broth を用いてあらかじめ 35 °C 一夜培養した *P. aeruginosa* pf-18 株の培養菌液 4 mL を 150 mL の同新鮮培地に接種し, 対数増殖中期から後期まで振盪培養した。その後, 本培養液を小分けして最終濃度がそれぞれ 1/9, 1/3, 1, 3, 9 MIC 濃度になるように各抗菌薬を添加し, さらに 2 時間振盪培養した。その後遠心集菌した菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, 超音波にて破碎した後, 遠心 (4 °C, 12,000 rpm, 10 分間) 上清を粗酵素として, 100 μM の cephalothin を基質として用い Spectrophotometric 法により酵素量 (U/mg of protein) を測定した。

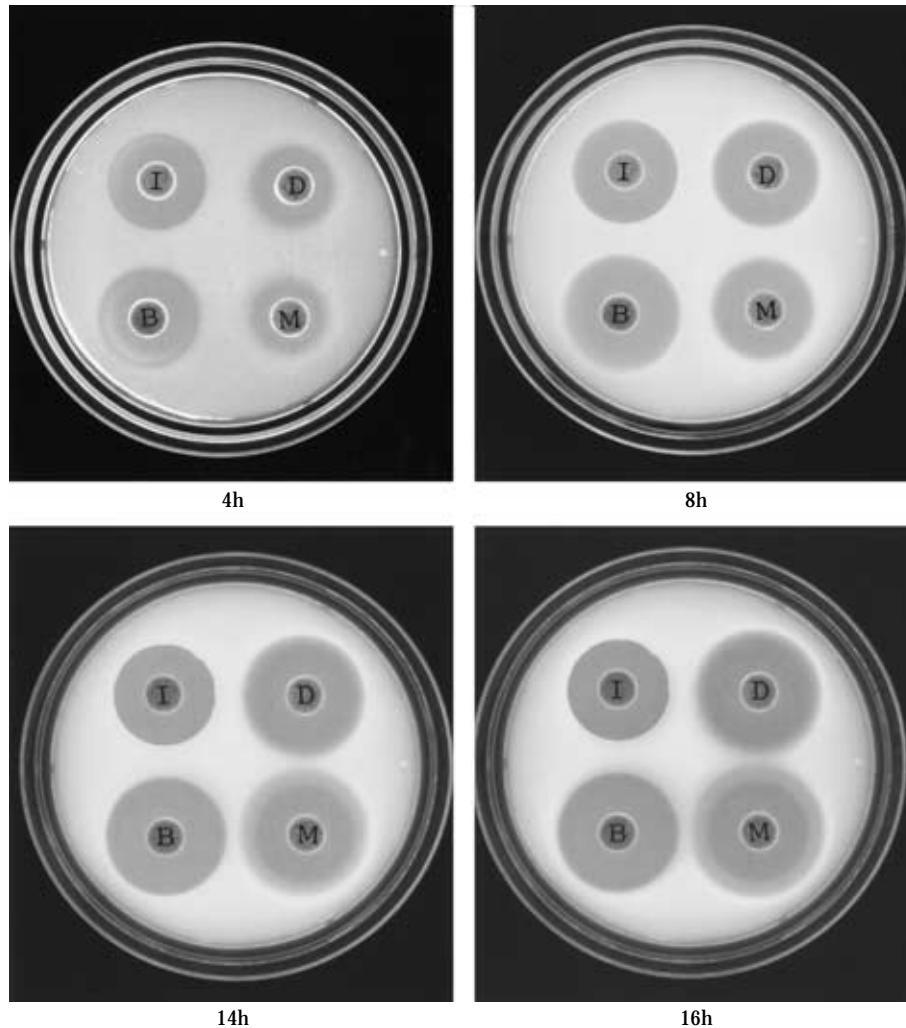
II. 結 果

1. 感受性試験

P. aeruginosa 50 株の IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM に対する感受性分布を Table 1 に示した。今回得られた IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM の MIC₅₀ および MIC₉₀ 値は, それぞれ (2, 16), (1, 16), (1, 16) および (1, 8) $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, この値は先に藤村らが報告した結果とほぼ同じ値であった¹²⁾。また, *P. aeruginosa* pf-18 株に対する IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM の MIC は, それぞれ 1, 1, 0.5 および 0.5

Table 1. Susceptibilities to carbapenems of 50 strains of *P. aeruginosa*

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$)												total	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64			
IPM/CS	0	0	0	1	4	7	20	6	2	7	3	0	50	2	16
MEPM	1	1	7	5	9	7	3	5	5	5	2	0	50	1	16
BIPM	0	0	1	3	15	12	4	2	6	5	2	0	50	1	16
DRPM	0	1	6	8	8	10	5	2	8	1	1	0	50	1	8

Fig. 1. Zones of inhibition in cultures of *P. aeruginosa* pf-18 strain at regular intervals.

I: IPM/CS, M: MEPM, B: BIPM, D: DRPM.

$\mu\text{g/mL}$ であった。

IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM のいずれかの MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ 以上を示した 13 株についてメタロ β ラクタマーゼの産生性を調べたが、産生株は検出されなかった。

2. 発育阻止円の観察

寒天平板と $20 \mu\text{g}$ を含有する感受性ディスクを用いて、*P. aeruginosa* pf-18 株に対する IPM/CS, MEPM,

BIPM および DRPM 各薬剤作用時における阻止円の形成を経時的に観察した。その結果、IPM/CS および BIPM 作用時における抗菌薬の阻止円の大きさ(直径)は、MICの結果を反映して BIPM > IPM であったが、各薬剤の阻止円の大きさは培養時間に関係なく不変であった (Fig. 1)。一方、MEPM と DRPM の場合 4 時間目の阻止円に比べて 8 時間の阻止円の方がやや大きく、14 時間以降さらに阻止円の拡大が認められた。また、MEPM と DRPM

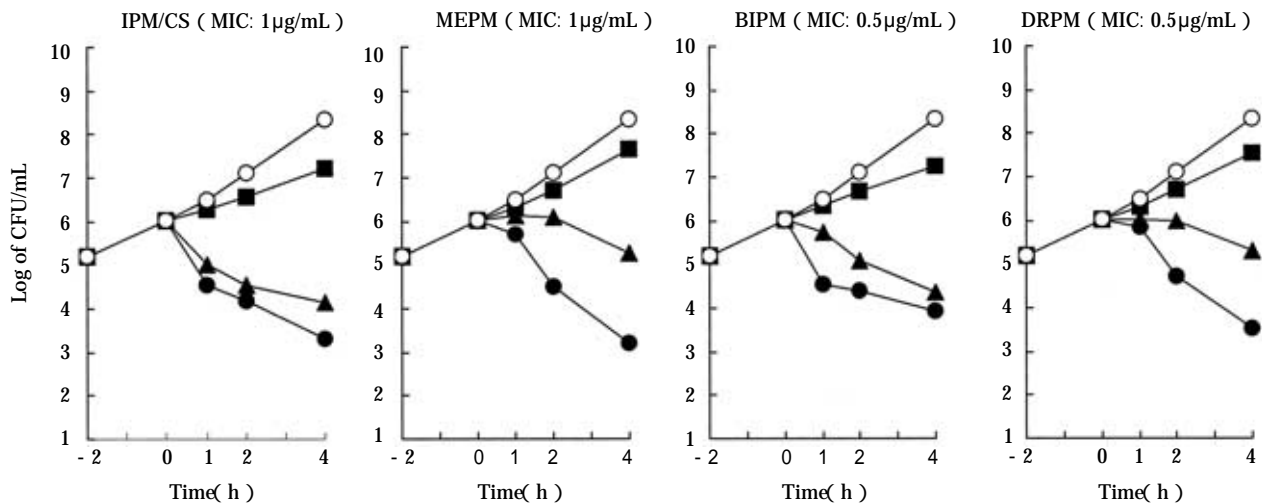


Fig. 2. Time-kill curves for *P. aeruginosa* pf-18 strain.
○: 3 MIC, □: MIC, △: 1/3 MIC, ●: Control.

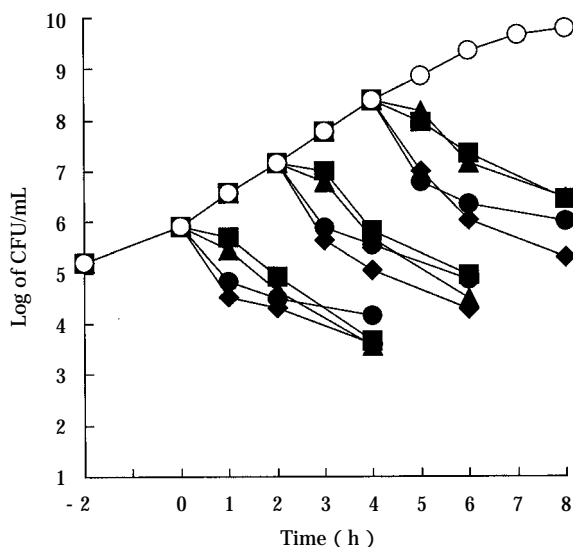


Fig. 3. Effect of growth phase on time-kill curves for *P. aeruginosa* pf-18 strain. ○: IPM/CS (3 MIC), □: MEPM (3 MIC), △: BIPM (3 MIC), ●: DRPM (3 MIC), ●: Control.

は、8時間目から14時間および16時間目にかけての阻止円の形成過程で、明確な阻止円の外側にさらに半透明の阻止円が形成された。16時間目におけるMEPMとDRPMの透明帯および半透明帯の直径はそれぞれ(22.4, 23.8 mm)および(30.3, 29.2 mm)であり、明らかにMEPMの半透明帯の幅が大きかった。

3. 殺菌効果

P. aeruginosa pf-18株に対するIPM/CS, MEPM, BIPMおよびDRPMの殺菌効果を接種菌量を約 10^6 CFU/mLに設定し、比較検討した。その結果、抗菌薬を作用させた後の1時間後の生菌数の減少に違いが認めら

れた(Fig. 2)。すなわち、IPM/CSおよびBIPMをそれぞれ作用(特に3 MIC濃度を作用)させた場合、1時間後の生菌数に顕著な減少が認められた。しかしMEPMおよびDRPMの場合、生菌数の減少の割合が少なかった。しかし、3 MIC濃度の薬剤処理4時間後の殺菌力は、IPM/CS, MEPMおよびDRPMともにBIPMに比べて若干優っていた。また、殺菌効果、特に作用1時間での殺菌効果に及ぼす増殖期の影響を検討したところ、 10^7 および 10^8 CFU/mL以上に菌数が達した各増殖期におけるIPM/CSおよびBIPMの作用1時間後の殺菌力は、 10^6 CFU/mLの菌数の場合とほぼ同等であった(Fig. 3)。しかし、MEPMとDRPMの場合は、いずれの増殖期においても作用1時間後の菌数はほぼ同じでIPM/CS, BIPMに比して生菌数の減少の割合が少なかった。

次に、臨床分離の*P. aeruginosa* 40株に対して4 MIC濃度のIPM/CS, MEPM, BIPMおよびDRPMをそれぞれ1時間作用させた時の生菌数の推移を調べた。その結果、抗菌薬を1時間処理した時の生菌数の推移から、IPM/CSおよびBIPMの殺菌能はMEPMまたはDRPMに比較して強い傾向がみられた(Fig. 4)。また、50株のなかから任意に選んだ40株に対する4 MIC濃度の各抗菌薬を1時間処理した時の殺菌の減少を比較したところ、生菌数で1 log以上の減少がみられた株数は、IPM/CS(36株, 90%), MEPM(8株, 20%), BIPM(30株, 75%), DRPM(14株, 35%)であった。

4. 殺菌効果に及ぼす新鮮血清添加の影響

臨床分離*P. aeruginosa* 40株のなかから任意に選んだ6株を被験菌株とし、各抗菌薬のMIC作用時における殺菌効果に及ぼすヒト新鮮血清添加の影響について検討した6株の生菌数の減少を平均した結果をFig. 5に示した。10%ヒト新鮮血清存在下でのIPM/CSおよびBIPMの殺菌効果は、抗菌薬単独時の生菌数の減少に比べさら

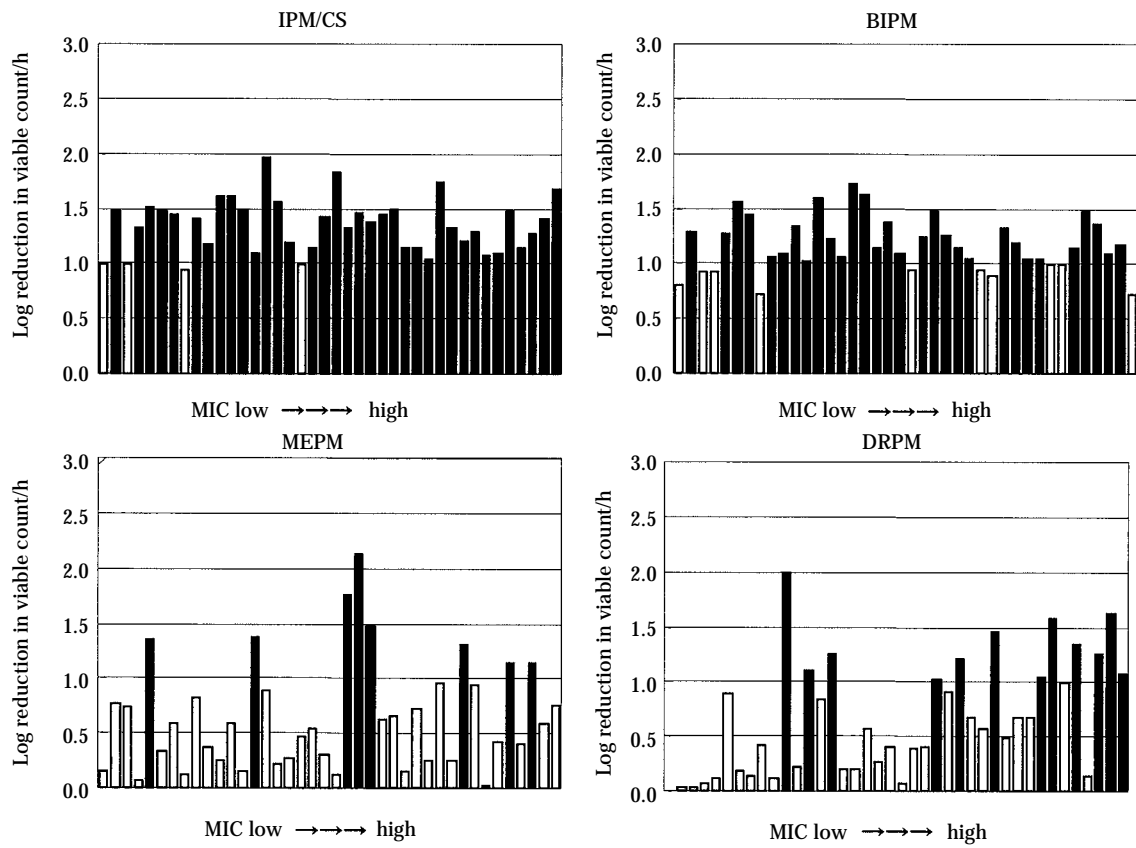


Fig. 4. Time-kill activities in 40 strains of *P. aeruginosa* after one hour of drug exposure at 4 MIC. Black bar: Log reduction in viable count/h ≥ 1 , White bar: Log reduction in viable count/h < 1 .

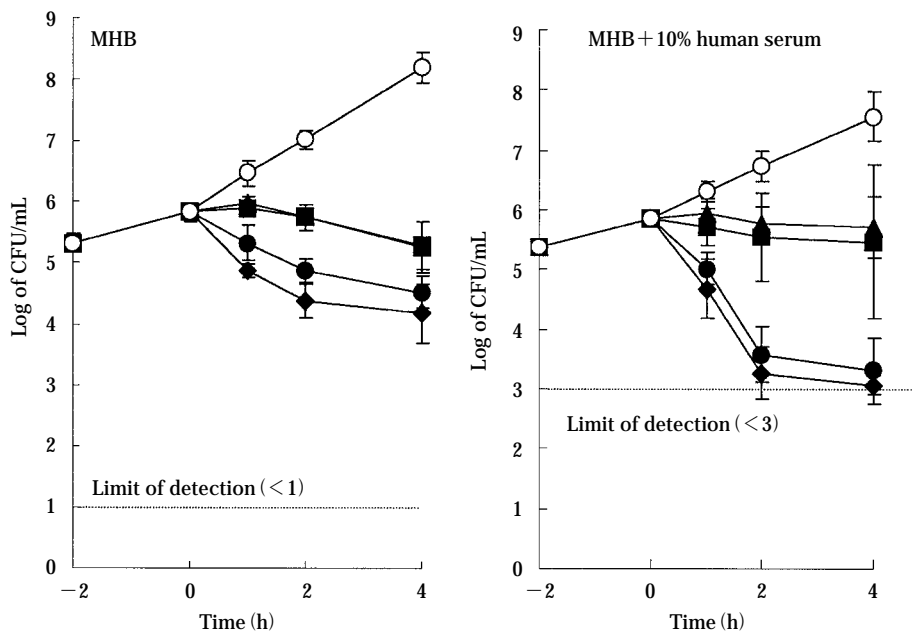


Fig. 5. Time-kill curves for 6 strains of *P. aeruginosa* in the presence of human serum. : IPM/CS (MIC) : MEPM (MIC) : BIPM (MIC) : DRPM (MIC) : Control. Data points are the mean \pm S.D.

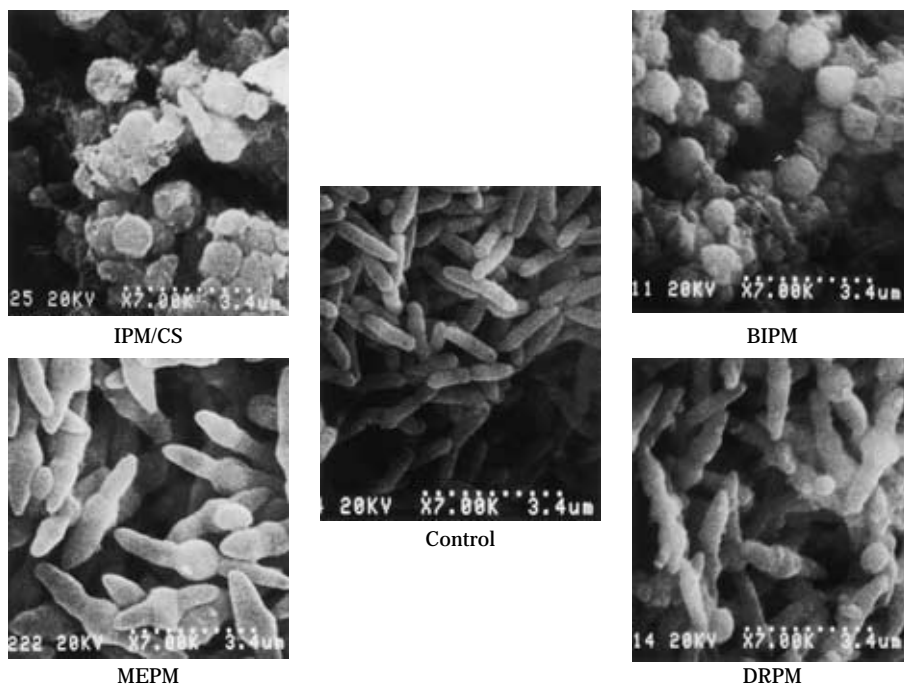


Fig. 6. Morphological changes in *P. aeruginosa* pf-18 strain after drug exposure(at 3 MIC) for 2 hours.

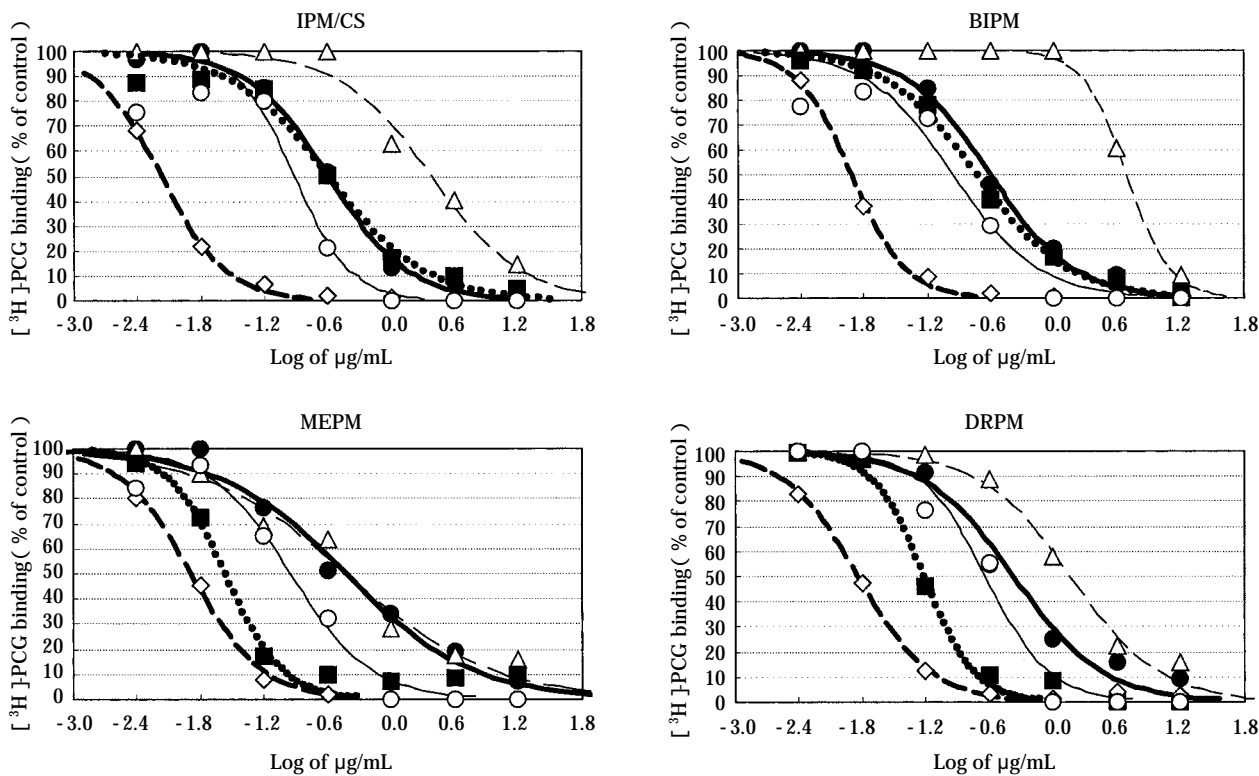


Fig. 7. Binding affinities of *P. aeruginosa* pf-18 strain to penicillin-binding proteins. \blacktriangle : PBP1A, \bullet : PBP1B, \circ : PBP2, \square : PBP3, \diamond : PBP4.

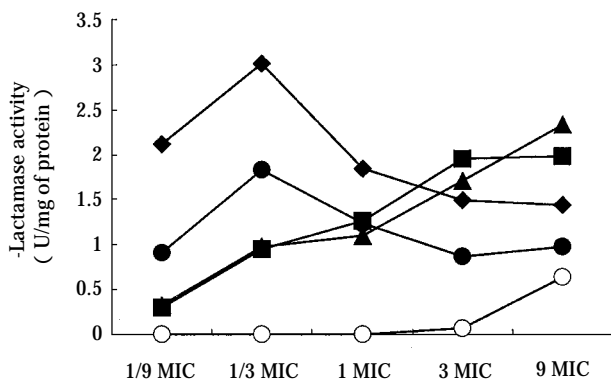


Fig. 8. Inducibility of AmpC β -lactamase in *P. aeruginosa* pf-18 strain by carbapenems and CAZ. ●: IPM/CS (MIC: 1 μ g/mL), ○: MEPM (MIC: 1 μ g/mL), ▲: BIPM (MIC: 0.5 μ g/mL), ■: DRPM (MIC: 0.5 μ g/mL), ◇: CAZ (MIC: 8 μ g/mL)

に増強された。一方, MEPM および DRPM の場合は, 新鮮血清添加による殺菌力の増強はほとんど認められなかった。

5. 走査型電子顕微鏡による形態観察

抗菌薬間の殺菌能の違いを形態変化との関係から検討した。IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM をそれぞれ 3 MIC 濃度を 1 時間対数期の *P. aeruginosa* pf-18 株に作用させ, その時の形態変化を走査型電子顕微鏡により観察した (Fig. 6)。その結果, IPM/CS および BIPM の場合は抗菌薬作用による菌体の球形化と溶菌像が数多く観察された。これに対して MEPM と DRPM の場合, ともに抗菌薬作用によりほとんどの菌体はフィラメント化またはバルジ形成, あるいは若干のスフェロプラスト様形態が確認されたものの溶菌像がほとんど確認できなかった。これらの形態変化観察からも各抗菌薬間に認められた殺菌力の違いが裏づけされた。

6. Penicillin-binding proteins (PBPs) に対する結合親和性

P. aeruginosa pf-18 株由来の PBPs に対する IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM の結合親和性を調べた。IPM/CS および BIPM の PBPs に対する結合パターンはほぼ同等で, PBP4 > PBP2 > PBP1A > PBP3 > PBP1B の順で強い結合親和性が確認された。一方, MEPM では PBP4 > PBP3 > PBP2 > PBP1A > PBP1B の順, DRPM では PBP4 > PBP3 > PBP2 > PBP1A > PBP1B の順で PBP に対する結合親和性が強く, とりわけ両薬剤ともに PBP 3 に対する結合親和性が強いことが明らかとなった (Fig. 7)。今回の DRPM の *P. aeruginosa* pf-18 株由来の PBPs に対する結合親和性の傾向は, 藤村らが *P. aeruginosa* ATCC25619 株について報告した結果とほぼ同等であった¹²⁾。

7. クラス C 型 β ラクタマーゼの誘導産生

P. aeruginosa pf-18 株の産生するクラス C 型 β ラクタマーゼを誘導するための薬剤濃度を各カルバペネム系薬間で比較した。その結果, sub-MIC 濃度では, IPM > BIPM > MEPM > DRPM > ceftazidime (CAZ) の順に強い誘導能が認められ, MIC 濃度以上では MEPM > DRPM > IPM > BIPM > CAZ の順であった (Fig. 8)。1/9 MIC ~ 9 MIC 濃度処理によるクラス C 型酵素活性は, IPM および BIPM においては 1/3 MIC 濃度でそれぞれ 3, 2 U/mg of protein の酵素活性 (ピーク値) を示した。また, MEPM, DRPM では濃度依存的に高い酵素活性を示し, 酵素活性ピーク値がみられる抗菌薬濃度は 3 MIC ないしは 9 MIC 以上であったが, その時の酵素量は IPM のそれより少なかった。一方, CAZ による酵素誘導は, Fig. 8 に示すようにカルバペネム系抗菌薬とは異なり, 3 MIC 以上の高い濃度が必要であったが, その量はカルバペネム系薬に比べて少なかった。

III. 考 察

カルバペネム系抗菌薬は *P. aeruginosa* をはじめとする種々の細菌に対して幅広い抗菌スペクトルを発揮することや¹³⁾, その殺菌効果の強さ¹⁴⁾により重症感染症の治療に用いられることが多い。カルバペネム系抗菌薬を治療薬として選択する場合, MIC に加えて, 短時間殺菌効果, 特に生体内での菌と抗菌薬の接触した場合の初期殺菌を含む短時間殺菌能の強弱が重要な指標となることが報告されている¹⁵⁾。このたび DRPM が上市されたことにより, わが国で使用可能なカルバペネム系抗菌薬は合計 5 薬剤となった。抗緑膿菌作用を大きな特長とする 4 種類のカルバペネム系抗菌薬 (PAPM は培地の影響を受けるため, 今回除いた) の抗菌力と感受性ディスクを用いた場合の発育阻止円形成の経時的変化, 増殖期の細菌に対する殺菌効果¹⁴⁾ およびヒト新鮮血清添加での抗菌薬の殺菌能の比較, あるいは薬剤処理による形態学的検討や PBPs に対する結合親和性の検討, さらにクラス C 型 β ラクタマーゼ産生の誘導能についても検討を加えた。

臨床分離の *P. aeruginosa* に対する IPM/CS, MEPM, BIPM および DRPM の抗菌力には若干の違いがみられた。これらの抗菌薬のいずれかに 8 μ g/mL 以上の MIC を示した 13 株については, メタロ β ラクタマーゼが検出されなかったことから, D2 ポーリンの欠損あるいはエフラックスポンプの機能亢進した菌株であると考えられる¹⁶⁾。

カルバペネム系薬 4 薬剤の殺菌力の強さを液体培地と寒天平板法による感受性ディスクを用いた発育阻止円の時間的形狀変化から比較した結果, IPM/CS と BIPM タイプと MEPM および DRPM タイプの 2 群に分類することができた。この違いは, 抗菌薬処理後の菌数の減少動向においても認められ, 薬剤処理後の早い時間に殺菌能を発揮する IPM/CS と BIPM と, 殺菌力発揮までに時間

を要する MEPM と DRPM の 2 タイプとしても分けられた。また、IPM/CS および BIPM の殺菌能は、増殖期の影響もほとんど受けず、 10^8 CFU/mL および 10^6 CFU/mL の菌数を用いた場合でもほぼ同等の殺菌力を示した。さらに、各抗菌薬の MIC 作用時殺菌効果に対するヒト新鮮血清添加による増強効果は、IPM/CS および BIPM ともに顕著に認められた。これに対して MEPM または DRPM の場合は、薬剤処理による殺菌力に対するヒト新鮮血清添加の効果は明確に認められなかった。しかし、MEPM および DRPM の場合、たとえば 3 MIC 等の高濃度作用時にはヒト血清添加による殺菌力の増強が認められた。このことは抗菌薬濃度が十分な場合、いずれのカルバペネム系抗菌薬の殺菌力も血清添加により増強されることを示しており¹⁵⁾、この背景には細菌の形態学的変化、フィラメント化に比べてスフェロプラスト化のほうがヒト血清添加の影響を受けやすいことを示しているものと推察される。さらに、カルバペネム系薬間の殺菌能の違いについては、各抗菌薬の処理 (3 MIC, 1 時間作用) 後の形態変化からも裏づけされた。すなわち、IPM/CS または BIPM では、菌体の球形化と溶菌像が数多く観察されるのに対し、MEPM または DRPM の場合は菌体のフィラメント化が顕著で、若干のスフェロプラスト様形態が認められるものの溶菌像はきわめてまれであった。この薬剤間の形態学的な違いは、PBPs に対するカルバペネム系薬 4 薬剤の結合親和性の強さにも反映していた。短時間殺菌能の違いによりタイプ分けした IPM/CS と BIPM の群、および MEPM と DRPM の群は、それぞれ PBPs への結合親和性パターンの面からも明らかに異なることが判明した。IPM/CS および BIPM は PBP2 に対する結合親和性が強く^{14,15)}、次いで PBP1A と PBP3 にほぼ同等の親和性を示した。一方、MEPM および DRPM は、PBP3 に対する親和性が強いが¹²⁾、高濃度の薬剤処理条件下では PBP1A や PBP2 に対しても結合親和性を発揮し、それに伴って形態変化もフィラメント化からスフェロプラスト化するものと考えられた。この PBPs に対する結合親和性パターンの違いは、MIC 近辺の各カルバペネム系抗菌薬を細菌に処理した時の形態変化や殺菌能の違いとして認識されるものと考えられる。4 薬剤のカルバペネム系薬間のクラス C 型 β ラクタマーゼを誘導産生させる効率を比較した結果、4 抗菌薬が 2 群 (誘導能が強い IPM と BIPM 群と弱い MEPM と DRPM 群) に分けられた。この誘導能の濃度的な違いは、菌体の溶菌力の違いとこれを反映した細胞壁ペプチドグリカンから遊離する断片である μ ロペプチドの構造上の違い等を反映したものか否かが等、今後より詳細な検討が必要である¹⁷⁻¹⁹⁾。

今回、カルバペネム系抗菌薬 4 薬剤の *P. aeruginosa* に対する基礎的抗菌作用を多面的に調べた。その結果、カルバペネム系薬 4 薬剤は同系統の抗菌薬であるにもかかわらず、*P. aeruginosa* に対する種々の細菌学的な検討

結果から種々の点で異なることが明らかとなり、現状では IPM/CS と BIPM の群と MEPM と DRPM の群にそれぞれ分けられた。

謝 辞

最後に、本研究を実施するにあたり、PBP の実験に対する技術指導を賜った明治製菓株式会社の板橋孝壽氏および本大学 RI センターの青木勝己氏、DRPM の合成に携わった富士アミドケミカル株式会社のスタッフ一同に深謝いたします。

文 献

- 1) 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 (Suppl 4) 243 ~ 250, 1994
- 2) 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
- 3) 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。日化療会誌 47: 319 ~ 328, 1999
- 4) 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
- 5) Wong K K Y, Poole K, Gotoh N, et al: Influence of OprM expression on multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 41: 2009 ~ 2012, 1997
- 6) 淵本定儀, 折田薫三, 上田祐造, 他: 外科領域における Cefepime の臨床の効果および血清・胆汁中濃度の検討。Chemotherapy 39 (Suppl 2) 306 ~ 311, 1991
- 7) 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。日化療会誌 51: 173 ~ 178, 2003
- 8) 疋田宗生, 寺島清香, 板橋孝壽, 他: カルバペネム系薬に対する緑膿菌の薬剤感受性比較 (2)。Jpn J Antibiot 56: 674 ~ 680, 2003
- 9) 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
- 10) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76 ~ 79, 1981
- 11) Spratt B G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2999 ~ 3003, 1975
- 12) 藤村享滋, 木村美司, 吉田 勇, 他: Doripenem の in vitro 抗菌力。日化療会誌 53 (Suppl 1) : 57 ~ 70, 2005
- 13) 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
- 14) 松田耕二, 井上松久: β - ラクタム系抗菌薬の初期殺菌能。日化療会誌 53: 1 ~ 4, 2005
- 15) 生方公子, 杉浦 睦, 紺野昌俊: カルバペネム系抗菌薬, biapenem の in vitro 抗菌力。Chemotherapy 42 (Suppl 4) 20 ~ 25, 1994
- 16) 三和秀明, 木村美司, 地主 豊, 他: Doripenem の抗緑膿菌活性。日化療会誌 53 (Suppl 1) 80 ~ 91, 2005
- 17) Kuga A, Okamoto R, Inoue M: *ampR* gene mutations

- that greatly increase class C β -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 44: 561 ~ 567, 2000
- 18) Jones R N, Baquero F, Privitera G, et al: Inducible β -lactamases mediated resistance to third generation cephalosporins. Clin Microbiol Infect 3: 7 ~ 20, 1997
- 19) Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, et al: Gene mutations responsible for overproduction of AmpC β -lactamase in some *Enterobacter cloacae* clinical isolates. J Clin Microbiol 43, 2005 (in press)

Comparative basic study of carbapenems antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*

Chieko Shimauchi¹⁾, Kenichi Kaneko²⁾, Yoshinori Sato²⁾, Yuko Sato³⁾,
Ryoichi Okamoto^{2,3)} and Matsuhisa Inoue⁴⁾

¹⁾Department of Environmental Infectious Diseases, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University (Present: Miyazaki Prefectural Nursing University)

²⁾Department of Environmental Infectious Diseases, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University,

³⁾Department of Microbiology, School of Medicine, Kitasato University

⁴⁾Department of Environmental Infectious Diseases, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, Department of Microbiology, School of Medicine, Kitasato University,

1 15 1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa, Japan

Carbapenems antibiotics [imipenem/cilastatin(IPM/CS), meropenem(MEPM), biapenem(BIPM) and doripenem(DRPM)] were compared in terms of their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, their growth inhibition ring during incubation, their bactericidal effect in the presence or absence of serum, morphological changes, their binding affinity to penicillin-binding proteins(PBPs) and the influence of human serum and the inducibility of AmpC β -lactamase. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values of IPM/CS, MEPM, BIPM and DRPM against 50 strains of *P. aeruginosa* clinically isolated in 2003 were 2 and 16, 1 and 16, 1 and 16 and 1 and 8 μ g/mL, respectively. The 1-hour bactericidal activity of carbapenem antibiotics that did not induce the formation of a double inhibition ring (IPM/CS and BIPM) was stronger than that of the drugs that induced a double ring formation (MEPM and DRPM). At the MIC of each drug, the bactericidal effect of IPM/CS and BIPM increased in the presence of human serum, but no increase was observed for MEPM or DRPM. This bactericidal activity was well reflected in the microbial conglomeration(spherical forms)and bacteriolytic images observed in association with IPM/CS and BIPM. On the other hand, numerous microbes became filamentous after treatment with DRPM and MEPM, but no bacteriolytic images were seen. IPM/CS and BIPM exhibited the strongest binding affinity for PBP4, followed by 2, 1A 3 and 1B. MEPM exhibited the strongest binding affinity for PBP4, followed by 3, 2, and 1A 1B, and DRPM showed the strongest affinity for PBP4, followed by 3, 2, 1A and 1B. From the aspect of enzyme inducibility strong activity was observed for IPM/CS and BIPM, compared with MEPM and DRPM. These findings suggested that carbapenem antibiotics can be divided into two types: those with a strong bactericidal activity (IPM/CS, BIPM and perhaps panipenem) and those with a weak bactericidal activity (MEPM and DRPM)