

【原著・基礎】

Tebipenem の *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対する作用機序

菅野 利恵・山田 恵子・馬場 信吉・板橋 孝壽
 福島 崇恵・井田 孝志・前橋 一紀

明治製薬株式会社医薬総合研究所*

(平成 20 年 10 月 28 日受付・平成 21 年 2 月 6 日受理)

新規経口カルバペネム系抗菌薬 tebipenem pivoxil の活性本体である tebipenem (TBPM) は、臨床分離 *Streptococcus pneumoniae* に対してきわめて強い抗菌力を示し、penicillin-binding protein 遺伝子 (*pbp 1a*, *pbp2x* および *pbp2b*) に変異を有する penicillin 耐性株を含むすべての株の発育を 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で阻止した。TBPM は、*S. pneumoniae* の β -ラクタム系抗菌薬耐性に関与する変異した PBP1A, PBP2X, PBP2B に対しても cefditoren (CDTR), faropenem (FRPM) および amoxicillin (AMPC) より高い結合親和性を示した。また、PBP3 をコードする *ftsI* に変異を有する β -ラクタマーゼ非産生 ampicillin 耐性株を含む *Haemophilus influenzae* に対する TBPM の抗菌力は、FRPM および AMPC より強く、アミノ酸置換の積み重ねによる耐性の影響を受けにくかった。TBPM は、*H. influenzae* ATCC49766 の複数の PBP に対して高い結合親和性を示した。*S. pneumoniae* と *H. influenzae* に対して、TBPM の耐性菌出現頻度は 1~2 \times MIC において $1.7 \times 10^{-5} \sim < 1.8 \times 10^{-9}$ であり、既存の β -ラクタム系抗菌薬と同様に 4 \times MIC 以下の濃度 (*S. pneumoniae*; 0.008~0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *H. influenzae*; 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で耐性菌の出現を抑制した。Sub-MIC 濃度の TBPM 存在下で *S. pneumoniae* と *H. influenzae* を 14 回継代したときの MIC 上昇は、CDTR および FRPM と同様 2~4 倍以内であり、levofloxacin (2~32 倍) に比べて小さかった。

Key words: tebipenem, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, PBP

Tebipenem pivoxil (TBPM-PI, 開発コード: ME1211 または L-084) は、ワイス株式会社 (旧 日本ワイスレグラー株式会社) で発見され、明治製薬株式会社で開発中の経口カルバペネム系抗菌薬である (Fig. 1)¹⁾。TBPM-PI の活性本体である tebipenem (TBPM, 開発コード: L-036 または LJC11,036) は、*Streptococcus pneumoniae* あるいは *Haemophilus influenzae* に対して強い抗菌力を有することが、報告されている^{1,2)}。本報では、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* を penicillin-binding protein 遺伝子 (*pbp*) の genotype により分類し、genotype ごとの TBPM に対する感受性の変化ならびに PBP 結合親和性を検討した。さらに、TBPM の *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対する耐性菌出現頻度を既存の β -ラクタム系ならびにニューキノロン系抗菌薬と比較検討した。

I. 材料および方法

1. 使用抗菌薬

被験薬物として tebipenem (TBPM; 明治製薬 (株)) を使用した。対照薬物として、MIC 測定試験には、経口抗菌薬から各系統ごとに適宜選択し、注射用セフェム系および注射用カルバペネム系抗菌薬を各 1 剤追加した。すなわち、力価の明らかな cefditoren (CDTR; 明治製薬 (株)), cefcapene (CFPN; 明治製薬 (株) 合成品), cef-

dinir (CFDN; Kemprotec Ltd), ceftriaxone (CTRX; Sigma-Aldrich Co.), penicillin G (PCG; Sigma-Aldrich Co.), ampicillin (ABPC; 明治製薬 (株)), amoxicillin (AMPC; Sigma-Aldrich Co.), clavulanic acid (CVA; 和光純薬工業 (株)), faropenem (FRPM; サントリー (株), 市販錠剤からの抽出品), meropenem (MEPM; 大日本住友製薬 (株)), clarithromycin (CAM; 和光純薬工業 (株)), levofloxacin (LVFX; Sequoia Research Products) および tosufloxacin (TFLX; Sequoia Research Products) を使用し、一部の試験で imipenem (IPM; 萬有製薬 (株), 市販注射剤からの抽出品) および azithromycin (AZM; United States Pharmacopeia) を追加した。AMPC/CVA は 2:1 の合剤とし、AMPC の濃度で表記した。PBP 結合親和性試験には経口 β -ラクタム系抗菌薬である CDTR, FRPM および AMPC を、耐性菌選択に関する検討には経口抗菌薬である CDTR, FRPM および LVFX を使用し、MEPM, IPM および norfloxacin (NFLX; Sigma-Aldrich Co.) を適宜追加した。

2. 使用菌株

主として 2002~2004 年臨床分離あるいは American

*神奈川県横浜市港北区師岡町 760

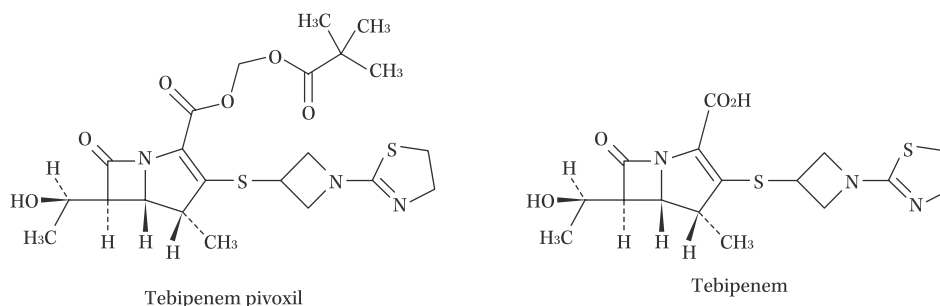


Fig. 1. Chemical structure of tebipenem pivoxil and tebipenem.

Type Culture Collection (ATCC) から入手した *S. pneumoniae* および *H. influenzae* を使用した。また, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の実験的変異株は, 明治製菓(株)にて作製したものを使用した^{3,4)}。MIC 測定には, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁵⁾ 指定の精度管理株を使用した。臨床分離 *S. pneumoniae* および *H. influenzae* については, PCR kit (湧永製菓(株))により耐性遺伝子別に分類した。すなわち, *S. pneumoniae* は, PBP をコードする *pbp1a*, *2x* および *2b* 遺伝子のいずれにも変異を有する penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP), これら3遺伝子の1~2に変異を有する penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae* (gPISP), いずれの遺伝子にも変異のない penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP) に分類した。さらに, マクロライド耐性遺伝子の有無により, 耐性遺伝子を保有しない株 (ML-S), 薬剤排出蛋白質をコードする遺伝子 (*mefA*) 保有株, 標的部位であるリボソームのジメチル化に關与する遺伝子 (*ermB*) 保有株および *mefA* と *ermB* の双方を保有する株に分類した。*H. influenzae* は, β -lactamase (TEM-1) 産生遺伝子および PBP3 をコードする遺伝子 (*ftsI*) 変異の有無により, *ftsI* の KTG 領域変異 (526 番目の asparagine の lysine へのアミノ酸置換: N526K) および SSN 領域変異 (385 番目の serine の threonine へのアミノ酸置換: S385T) を有する β -lactamase-producing ampicillin/clavulanic acid-resistant (gBLPACR), *ftsI* に同変異を有する β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant (gBLNAR), *ftsI* の KTG 領域のみに変異を有する β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant 株 (gLow-BLNAR) とした。また, *ftsI* に変異のない β -lactamase-producing ampicillin-resistant (gBLPAR), *ftsI* に変異のない β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible (gBLNAS) に分類した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC は, CLSI の微量液体希釈法に準じて測定した⁵⁾。

臨床分離 *S. pneumoniae* および *H. influenzae* を耐性遺伝子別に分類した後, *pbp* 変異の有無による TBPM の抗菌力の変化を対照薬物と比較検討した。*S. pneumoniae* については, マクロライド耐性遺伝子保有の有無で分類

し, TBPM と CAM の抗菌力を解析した。

4. PBP s 結合親和性

1) *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の PBP s に対する結合親和性の検討

S. pneumoniae ATCC BAA-255, *S. pneumoniae* KK97 とその実験的 *pbp* 変異株 3 株および *H. influenzae* ATCC 49766 の膜画分を調製し, [³H]-benzylpenicillin (PCG) の結合に対する TBPM, CDTR, FRPM および AMPC の競合結合試験を Spratt の方法を改変して行った⁶⁾。すなわち, 対数増殖期後期の菌を集菌し, 0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。氷冷下, 超音波破碎後, 遠心分離 (12,100 × g, 4°C, 20 分間) し, 上清を超遠心 (147,000 × g, 60 分間) して膜画分を得た (*S. pneumoniae* は 2 mg protein/mL, *H. influenzae* は 4.4 mg protein/mL)。30 μ L の膜画分に薬物溶液 3 μ L を添加し, 30°C で 10 分間反応させた後 [³H]-PCG (111 kBq)/3 μ L を加え, さらに 30°C で 10 分間反応させた。この反応液に 10 w/v % *N*-lauroylsarcosine sodium salt 含有 30 mg/mL PCG 溶液 4 μ L を加え, 室温で 20 分間放置し, 反応を停止させた。遠心分離 (5,900 × g, 30 分間) により不溶画分を除いた後, 上清に等量の 5% 2-mercaptoethanol 添加 Laemmli sample buffer (Bio-rad) を加え, 2 分間水浴中で煮沸し, 泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis により分離し, 電気泳動後, 分離ゲルを酢酸およびメタノール混合液中で固定させた。分離ゲルを脱水, 増感, 乾燥後, X 線フィルムに密着させ, -80°C で 5~14 日間感光させた後, X 線フィルムを現像した。X 線フィルムを GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) で数値化した。

2) *S. pneumoniae* 由来の可溶性 PBP2B に対する結合親和性の検討

以下のように調製した *S. pneumoniae* 由来の PBP2B 組換え蛋白質を用い, BOCILLIN FL penicillin の結合に対する TBPM, CDTR, FRPM および AMPC の競合結合試験を Zhao らの方法を改変して行った⁷⁾。すなわち, *Escherichia coli* (Competent high DH5 α ; 東洋紡績(株)) に, pGEX-4T-1 ベクター (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株)) を用いて *S. pneumoniae* MSC07573 由来

PBP2B の可溶性領域を Glutathione S-transferase 融合蛋白質として発現するよう形質転換した。発現される PBP2B はアミノ酸置換のない野生型およびアミノ酸置換した3種類の変異型、すなわち PBP2B のアミノ酸配列 (Accession No. AAL00321) で、451 番目の threonine を alanine に置換した T451A 変異型、これに 431 および 432 番目の threonine および glutamine を lysine および leucine に置換した T431K, Q432 L, T451A 変異型、さらに 624 番目の alanine を glycine に置換した T431K, Q432 L, T451A, A624 G 変異型とした。4 種類の PBP 2B 組換え蛋白質を発現させた *E. coli* 培養菌液を集菌し、Complete (protease inhibitor cocktail tablets) を溶解したリン酸緩衝液に懸濁した。氷冷下で超音波破碎後、遠心分離 (12,100×g, 20 分, 4°C) し、上清をフィルター (Steradisc 25 0.2 μm) に通し、GSTrap HP カラム (5 mL) で精製した。精製蛋白質溶液を 50 mM Tris buffer (pH8.0) で1時間×2回、約15時間×1回透析した (40 μg protein/mL)。得られた可溶性 PBP2B 7.5 μL、薬物溶液 2.5 μL、50 μM BOCILLIN FL penicillin 2.5 μL を混合し、遮光条件で 37°C、30 分間反応させた。この反応液に等量の 10 v/v % 2-mercaptoethanol 添加 Sample-Buffer Solution for SDS-PAGE (ナカライテスク (株)) を加え、遮光条件で 100°C、2 分間加熱後、氷上で 5 分間冷却し、泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを XV PANTERA GEL (5~20%, 12 well ; DRC (株)) により分離し、電気泳動後、ゲルを蒸留水で置換し、フルオロ・イメージアナライザー FLA-3000 (富士写真フィルム (株)) で 473 nm における蛍光強度を検出し、数値化した。

3) IC₅₀ の算出

各バンドを、Quantity One (Bio-Rad) を用いたデンストメトリーで定量し、ロジスティック法により、1) の検討では各 PBP において [³H]-PCG の結合が 50% 阻止される薬物濃度を、2) の検討では各 PBP2B において BOCILLIN FL penicillin の結合が 50% 阻止される薬物濃度を算出した。

5. 耐性菌選択に関する検討

1) 耐性菌出現頻度

6 株の *S. pneumoniae* (0.33~5.4×10⁸CFU) および 2 株の *H. influenzae* (0.78~4.9×10⁷CFU) を各種濃度の薬物含有平板 (それぞれ 5% 馬無菌脱繊維血液加 Mueller-Hinton agar 血液平板および同チョコレート平板) に塗抹し、35°C、5~6% CO₂ 条件下で 42~44 時間培養した。1×MIC 以上の平板において生育したコロニーを釣菌して、同薬物濃度含有平板と薬物非含有平板にそれぞれ塗抹後、35°C、5~6% CO₂ 条件下にて 18~20 時間培養した。培養後、薬物含有平板と薬物非含有平板の双方で明らかに発育が認められたものを耐性変異株とし、その耐性変異株数と 1 平板当たりの塗抹菌量および塗抹平板枚

数から、耐性菌出現頻度を算出した。

2) 継代培養における耐性獲得

各 5 株の *S. pneumoniae* ならびに *H. influenzae* を各種濃度の薬物含有液体培地 (それぞれ 2% 馬溶血液加 cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) ならびに 15 mg/L hematin, 15 mg/L NAD および 5 g/L yeast extract 加 CAMHB) にて 35°C 20~24 時間培養し、MIC を測定した。MIC の 1/2 濃度 (発育しなかった場合は、1/4 または 1/8 濃度) の菌液を新たな薬物含有液体培地に接種して継代培養を行い、これを 14 回繰り返してその MIC 変化について検討した。さらに、TBPM 存在下で 14 回継代して得られた菌を薬剤非含有培地で 2~3 回継代した後、MEPM および IPM を含む各種 β-ラクタム系抗菌薬に対する感受性を測定した。

II. 結 果

1. 実験的変異株および臨床分離株に対する TBPM の抗菌力

1) *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の実験的変異株に対する TBPM の抗菌力

臨床分離 *S. pneumoniae* MSC17011 (gPRSP) の変異した *pbp* 遺伝子を *S. pneumoniae* MSC17007 に形質転換した isogenic な実験的変異株に対する各種抗菌薬の抗菌力を測定し、PBP の変異の影響を検討した (Table 1)。セフェム系抗菌薬は *pbp2x* の変異の影響を受けやすく、親株 (MSC17007) の 1/8~1/64 まで、さらに *pbp1a* あるいは *pbp1a+pbp2b* 変異が加わることにより親株の 1/32~1/128 まで抗菌力の低下が認められた。カルバペネム系抗菌薬である MEPM およびペネム系抗菌薬である FRPM は、*pbp2x* 変異の影響は受けなかったが、*pbp1a* 変異が加わることにより親株の 1/8 まで、さらに *pbp2b* 変異が加わることにより親株の 1/64~1/128 まで抗菌力の低下が認められた。TBPM も MEPM, FRPM と同様に *pbp1a* あるいは *pbp1a+pbp2b* の変異の影響は受けるが、*pbp1a*, *pbp2x* および *pbp2b* のすべて変異した isogenic 株に対しても、TBPM の MIC は 0.25 μg/mL であり、他の β-ラクタム系抗菌薬の 4~64 倍の強い抗菌力を示した。

H. influenzae MSC16737 (Rd) の PBP3 に N526K ならびに N526K, S385T および L389F の点変異を挿入した株 (MSC16774 ならびに MSC16783) に対して、TBPM の抗菌力はそれぞれ親株 (MSC16737) の 1/4 ならびに 1/2, MEPM および IPM の抗菌力はいずれも親株の 1/2, CDTR, CFPN および CTRX の抗菌力はそれぞれ親株の 1/2 ならびに 1/4~1/8, CFDN の抗菌力はそれぞれ親株の 1/4 ならびに 1/16, ABPC および AMPC の抗菌力はそれぞれ親株の 1/2~1/4 ならびに 1/4 に低下した (Table 2)。同様に、臨床分離株から得た種々の変異を有する *ftsI* 遺伝子を *H. influenzae* MSC16737 に形質転換した株に対する各種抗菌薬の抗菌力を検討したとこ

Table 1. Antimicrobial activity of tebipenem against *Streptococcus pneumoniae* with recombinant penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strain

| Strain No. | <i>S. pneumoniae</i> <i>pbp</i> gene mutations | MIC: $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{a)} | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--|--|----------|---------|----------|--------|----------|----------|-----------|-----------|------------------|--------------------|-------|----------|
| | | TBPM | CDTR | CFPN | CFDN | CTRX | PCG | AMPC | FRPM | MEPM | CAM | AZM | LVPX | TFLX |
| Recipient strain | MSC17007 none | 0.004 | 0.03 | 0.015 | 0.12 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.015 | 0.015 | ≤ 0.015 | 0.06 | 1 | 0.12 |
| Isogenic recombinants | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC17008 | <i>pbp2x</i> | 0.004 (1) | 0.5 (16) | 1 (64) | 1 (8) | 1 (32) | 0.06 (2) | 0.06 (2) | 0.015 (1) | 0.015 (1) | 0.03 (-) | 0.06 (1) | 1 (1) | 0.12 (1) |
| MSC17009 | <i>pbp2x, pbp1a</i> | 0.015 (4) | 2 (64) | 2 (128) | 4 (32) | 2 (64) | 0.25 (8) | 0.5 (16) | 0.12 (8) | 0.12 (8) | 0.03 (-) | 0.06 (1) | 1 (1) | 0.12 (1) |
| MSC17010 | <i>pbp2x, pbp1a, pbp2b</i> | 0.25 (64) | 1 (32) | 1 (64) | 16 (128) | 1 (32) | 4 (128) | 8 (256) | 2 (128) | 1 (64) | ≤ 0.015 (-) | 0.06 (1) | 1 (1) | 0.12 (1) |
| Donor strain | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC17011 | <i>pbp2x, pbp1a, pbp2b</i> | 0.25 (64) | 2 (64) | 2 (128) | 16 (128) | 2 (64) | 4 (128) | 8 (256) | 2 (128) | 2 (128) | > 32 (-) | > 32 (> 512) | 1 (1) | 0.12 (1) |

^{a)}Broth microdilution

() : the MIC ratio of (Isogenic recombinants or Donor strain)/Recipient strain

(-) : not calculated

TBPM: tebipenem, CDTR: cefditoren, CFPN: cefcapene, CFDN: cefdinir, CTRX: ceftriaxone, PCG: penicillin G, AMPC: amoxicillin, FRPM: faropenem, MEPM: meropenem, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, LVPX: levofloxacin, TFLX: tosufloxacin

る、点変異株よりも顕著な MIC 変化が認められ、TBPM および MEPM の抗菌力は、N526K のアミノ酸置換を有する MSC16744 に対して親株の 1/4、N526K、S385T および L389F の置換を有する MSC16763 に対して親株の 1/8 に低下したが、セフェム系抗菌薬 (それぞれの株に対して親株の 1/2~1/8 および 1/16~1/256) と異なり、S385T および L389F の積み重ねによる耐性化の影響を受けにくかった。一方、TBPM および IPM は R517H

のアミノ酸置換の影響をまったく受けなかった。さらに、 β -ラクタマーゼ産生株 (ROB-1 および TEM-1) および排出ポンプ欠損株 (ΔacrB) に対する TBPM の MIC 変化は 1/2~1 倍であり、*H. influenzae* の β -ラクタマーゼおよび排出ポンプが TBPM の抗菌力に及ぼす影響は小さかった。

2) 臨床分離 *S. pneumoniae* に対する抗菌力

Table 3 に示すように、TBPM は試験に供した抗菌薬のなかで最も低い濃度 (0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で gPRSP を含むすべての *S. pneumoniae* の発育を阻止した。gPISP (2x) に対する MIC₉₀ は、TBPM、CFDN、PCG、AMPC、FRPM および MEPM では gPSSP の 1~2 倍であったのに対し、CDTR および CTRX では 8 倍、CFPN では 32 倍高かった。同様に、gPISP (1a+2x) に対する MIC₉₀ は、gPSSP と比べ TBPM、FRPM および MEPM で 4 倍、その他の β -ラクタム系抗菌薬では 8~32 倍、gPISP (2x+2b) に対する MIC₉₀ は、gPSSP と比べ TBPM、FRPM および MEPM で 4~8 倍、その他の β -ラクタム系抗菌薬では 16~32 倍、gPRSP (1a+2x+2b) に対する MIC₉₀ は、TBPM、FRPM および MEPM で 16~32 倍、その他の β -ラクタム系抗菌薬で 64~256 倍高かった。TBPM は *pbp* 変異の積み重ねによる耐性化の影響を受けるものの、ニューキノロン系抗菌薬よりも低い濃度で gPRSP の発育を阻止した。また、本邦での分離頻度が低いため 1 株の検討となったが、TBPM の gPISP (2b) 株に対する MIC は 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と他の β -ラクタム系抗菌薬 (0.06~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べ強い抗菌力を示した。一方、*pbp* 変異を有する株はマクロライド耐性遺伝子の保有率が高く、52 株の gPRSP 中 *mefA* 保有株: 22 株、*ermB* 保有株: 22 株、*mefA* と *ermB* の保有株: 6 株であった (60 株の gPISP 中 *mefA* 保有株は 8 株、*ermB* 保有株は 45 株; 19 株の gPSSP 中マクロライド耐性遺伝子 *mefA* 保有株は 3 株、*ermB* 保有株は 1 株)。TBPM はマクロライド耐性遺伝子を保有する gPRSP に対しても強い抗菌力を示し、0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度で菌の発育を阻止した。

3) 臨床分離 *H. influenzae* に対する抗菌力

Table 4 に示すように、*H. influenzae* において gLow-BLNAR に対する MIC₉₀ を gBLNAS と比較すると、CFPN で 16 倍、CTRX で 32 倍、それ以外の TBPM を含む β -ラクタム系抗菌薬で 4~8 倍高かった。同様に、gBLNAR に対する MIC₉₀ を gBLNAS と比較すると、FRPM および MEPM で 4~8 倍、TBPM、CDTR、CFDN、AMPC および AMPC/CVA で 16 倍、ABPC、CFPN および CTRX で 32~128 倍高かった。 β -ラクタマーゼ産生株 (gBLPAR および gBLPACR) においては、ABPC および AMPC の MIC >32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株が 60% 以上を占め、 β -ラクタマーゼ非産生株 (gBLNAS および gBLNAR) と比べて顕著な MIC 上昇が認められたが、TBPM の MIC 上昇は 2 倍以内であった。

Table 2. Antimicrobial activity of tebipenem against *Haemophilus influenzae* recombinants carrying defined mutations in penicillin-binding protein 3 and recombinants carrying *fsl* genes from β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant strains

| <i>H. influenzae</i> Strain No. | Amino acid substitutions in PBP3 | MIC: $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{a)}$ | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|-----------|-----------|------------|-----------|--------------|--------------|----------|------------|----------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|
| | | TBPM | CDTR | CFPN | CFDN | CTRX | ABPC | AMPC | AMPC/CVA | FRPM | MEPM | IPM | CAM | AZM | LVFX | TFLX |
| Recipient strain | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC16737 (Rd) | none | 0.06 | 0.008 | 0.015 | 0.25 | 0.002 | 0.12 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 | 4 | 1 | 0.015 | 0.004 | |
| Isogenic recombinants | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC08935 | ROB-1 | 0.06 (1) | 0.06 (8) | 0.015 (1) | 0.5 (2) | 0.03 (16) | > 32 (> 256) | > 32 (> 128) | 2 (8) | 0.25 (1) | 0.06 (2) | 0.5 (1) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC08936 | TEM-1 | 0.06 (1) | 0.008 (1) | 0.015 (1) | 0.25 (1) | 0.004 (2) | > 32 (> 256) | > 32 (> 128) | 1 (4) | 0.25 (1) | 0.03 (1) | 0.25 (1/2) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC08937 | Δ <i>acrB</i> | 0.03 (1/2) | 0.008 (1) | 0.015 (1) | 0.12 (1/2) | 0.004 (2) | 0.12 (1) | 0.25 (1) | 0.25 (1) | 0.12 (1/2) | 0.03 (1) | 0.25 (1/2) | 0.12 (1/32) | 0.25 (1/4) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| Recombinants with defined point mutations in PBP3 of Rd | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC16774 | N526K | 0.25 (4) | 0.015 (2) | 0.03 (2) | 1 (4) | 0.004 (2) | 0.5 (4) | 0.5 (2) | 0.5 (2) | 1 (4) | 0.06 (2) | 1 (2) | 8 (2) | 2 (2) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16777 | N526K, S385T | 0.12 (2) | 0.015 (2) | 0.06 (4) | 2 (8) | 0.008 (4) | 0.5 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 0.5 (2) | 0.06 (2) | 1 (2) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16783 | N526K, S385T, L389F | 0.12 (2) | 0.03 (4) | 0.12 (8) | 4 (16) | 0.015 (8) | 0.5 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 0.06 (2) | 1 (2) | 8 (2) | 2 (2) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16781 | R517H, S385T, L389F | 0.03 (1/2) | 0.015 (2) | 0.06 (4) | 2 (8) | 0.008 (8) | 0.25 (2) | 0.5 (2) | 0.5 (2) | 0.5 (2) | 0.03 (1) | 0.25 (1/2) | 8 (2) | 2 (2) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| Recombinants with <i>fsl</i> genes from clinical isolates ^{b)} | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MSC16744 | N526K | 0.25 (4) | 0.015 (2) | 0.06 (4) | 2 (8) | 0.008 (4) | 1 (8) | 1 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 0.12 (4) | 1 (2) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16759 | N526K, S385T | 0.5 (8) | 0.06 (8) | 0.5 (32) | 8 (32) | 0.06 (32) | 2 (16) | 8 (32) | 4 (16) | 2 (8) | 0.25 (8) | 1 (2) | 8 (2) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16763 | N526K, S385T, L389F | 0.5 (8) | 0.12 (16) | 4 (256) | 8 (32) | 0.12 (64) | 2 (16) | 8 (32) | 4 (16) | 4 (16) | 0.25 (8) | 1 (2) | 2 (1/2) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16738 | R517H | 0.06 (1) | 0.008 (1) | 0.06 (4) | 2 (8) | 0.008 (4) | 0.5 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 0.06 (2) | 0.5 (1) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16755 | R517H, S385T | 0.06 (1) | 0.12 (16) | 2 (128) | 8 (32) | 0.12 (64) | 2 (16) | 2 (8) | 1 (4) | 0.5 (2) | 0.12 (4) | 0.25 (1/2) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |
| MSC16758 | R517H, S385T, L389F | 0.06 (1) | 0.06 (8) | 2 (128) | 8 (32) | 0.12 (64) | 2 (16) | 2 (8) | 2 (8) | 1 (4) | 0.06 (2) | 0.25 (1/2) | 4 (1) | 1 (1) | 0.015 (1) | 0.004 (1) |

^{a)} Broth microdilution

() : the MIC ratio of Isogenic recombinants/Recipient strain

^{b)} The deduced amino acid sequences of the PBP 3 from clinical isolates (donors) appear in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database, but the table shows major amino acid substitutions surrounding the conserved KTG and SSN motifs appear to be responsible for β -lactam resistance. The relationship between recombinants, donors and accession numbers are as follows: MSC16744, HI00113, AB186936; MSC16759, HI00121, AB186942; MSC16763, HI00130, AB186951; MSC16738, HI00115, AB186937; MSC16755, HI00139, AB186960; and MSC16758, HI00132, AB186953.

TBPM: tebipenem, CDTR: cefditoren, CFPN: cefcapene, CFDN: cefdinir, CTRX: ceftriaxone, ABPC: ampicillin, AMPC: amoxicillin, AMPC/CVA: amoxicillin/clavulanic acid (Ratio of concentration: 2:1. The concentration is shown as amoxicillin.) FRPM: faropenem, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, LVFX: levofloxacin, TFLX: tosusofloxacin

Table 3. Distribution of tebipenem MICs for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* classified into 6 groups based on *pbp* gene alteration

| Organism | $\mu\text{g/mL}^{\text{a)}$ | ≤ 0.001 | 0.002 | 0.004 | 0.008 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | > 32 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|----|----|---|---|----|----|--------|-------------------|-------------------|
| gPSSP (19 strains) | TBPM | | 13 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | 0.002 | 0.004 |
| | CDTR | | | | 1 | 13 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | CFPN | | | | | 14 | 4 | | | 1 | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | CFDN | | | | | | | | 8 | 9 | 1 | 1 | | | | | | | 0.12 | 0.25 |
| | CTRX | | | | | 2 | 13 | 3 | | 1 | | | | | | | | | 0.03 | 0.06 |
| | PCG | | | | | 13 | 6 | | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | AMPC | | | | | 6 | 12 | 1 | | | | | | | | | | | 0.03 | 0.03 |
| | FRPM | | | | 1 | 15 | 3 | | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | MEPM | | | | | | 18 | 1 | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.015 |
| | CAM | | | | | | 5 | 10 | | | 2 | 1 | | | | | | 1 | 0.03 | 0.5 |
| LVFX | | | | | | | | | | | | 17 | 2 | | | | | 1 | 2 | |
| TFLX | | | | | | | | | 2 | 14 | 1 | 2 | | | | | | 0.25 | 1 | |
| gPISP (2x) (23 strains) | TBPM | | 4 | 19 | | | | | | | | | | | | | | | 0.004 | 0.004 |
| | CDTR | | | | | | | | 16 | 6 | 1 | | | | | | | | 0.12 | 0.25 |
| | CFPN | | | | | | | | 2 | 14 | 4 | 3 | | | | | | | 0.25 | 1 |
| | CFDN | | | | | | | | | 3 | 18 | 1 | 1 | | | | | | 0.5 | 0.5 |
| | CTRX | | | | | | | | | 19 | 3 | 1 | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | PCG | | | | | | 8 | 15 | | | | | | | | | | | 0.06 | 0.06 |
| | AMPC | | | | | | 6 | 17 | | | | | | | | | | | 0.06 | 0.06 |
| | FRPM | | | | | 15 | 8 | | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | MEPM | | | | | 10 | 13 | | | | | | | | | | | | 0.03 | 0.03 |
| | CAM | | | | | 1 | 4 | | 1 | | 1 | | | | 1 | | | 15 | > 32 | > 32 |
| LVFX | | | | | | | | | | | | 14 | 9 | | | | | 1 | 2 | |
| TFLX | | | | | | | | | 10 | 3 | 10 | | | | | | | 0.5 | 1 | |
| gPISP (1a + 2x) (20 strains) | TBPM | | | 2 | 15 | 3 | | | | | | | | | | | | | 0.008 | 0.015 |
| | CDTR | | | | | | | | 4 | 2 | 7 | 7 | | | | | | | 0.5 | 1 |
| | CFPN | | | | | | | | 1 | 1 | 8 | 9 | 1 | | | | | | 0.5 | 1 |
| | CFDN | | | | | | | | | 1 | 1 | 5 | 11 | 2 | | | | | 2 | 2 |
| | CTRX | | | | | | | | | 5 | 1 | 10 | 4 | | | | | | 1 | 2 |
| | PCG | | | | | | | 1 | 11 | 8 | | | | | | | | | 0.12 | 0.25 |
| | AMPC | | | | | | | 1 | 11 | 8 | | | | | | | | | 0.12 | 0.25 |
| | FRPM | | | | | 1 | 1 | 13 | 4 | 1 | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | MEPM | | | | | | 5 | 15 | | | | | | | | | | | 0.06 | 0.06 |
| | CAM | | | | | 1 | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | 16 | > 32 | > 32 |
| LVFX | | | | | | | | | | 1 | 19 | | | | | | | 1 | 1 | |
| TFLX | | | | | | | | | 4 | 16 | | | | | | | | 0.25 | 0.25 | |
| gPISP (2x + 2b) (16 strains) | TBPM | | 1 | | 8 | 4 | 3 | | | | | | | | | | | | 0.008 | 0.03 |
| | CDTR | | | | | | | | 3 | 10 | 2 | 1 | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | CFPN | | | | | | | | 2 | 10 | 1 | 2 | 1 | | | | | | 0.25 | 1 |
| | CFDN | | | | | | | | 1 | 1 | 10 | | 2 | 1 | 1 | | | | 0.5 | 4 |
| | CTRX | | | | | | | 1 | | 11 | 2 | 2 | | | | | | | 0.25 | 1 |
| | PCG | | | | | | | 2 | | 7 | 7 | | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | AMPC | | | | | | 1 | | 1 | 10 | 4 | | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | FRPM | | | | | 2 | | 9 | 4 | 1 | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | MEPM | | | | | 1 | 1 | 8 | 5 | 1 | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | CAM | | | | | | 1 | | | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | | 1 | | 4 | 2 | > 32 |
| LVFX | | | | | | | | | | 2 | 14 | | | | | | | 1 | 1 | |
| TFLX | | | | | | | | | 6 | 9 | | 1 | | | | | | 0.25 | 0.25 | |

(Continued)

2. PBP_s 結合親和性

S. pneumoniae ATCC BAA-255 (gPSSP) のPBP_s に対する TBPM の IC₅₀ は 0.01~0.06 $\mu\text{g/mL}$ であり, FRPM および AMPC と同様に高い結合親和性を示した (Fig. 2)。一方, *H. influenzae* ATCC 49766 (gBLNAS) の PBP1B, PBP2, PBP3A, PBP3B, PBP4 および PBP6

に対する TBPM の IC₅₀ は 0.01~0.09 $\mu\text{g/mL}$ であり, β -ラクタム系抗菌薬の抗菌力に関与する⁸⁾とされる PBP3A および PBP3B に対する TBPM の結合親和性は CDTR より弱いものの, AMPC と同程度で FRPM より強かった。また, *H. influenzae* の PBP1B, 2 および 4 に対して, TBPM は CDTR および AMPC よりも高い結合親和性

Table 3. (Continued)

| Organism | $\mu\text{g/mL}^{\text{a}}$ | ≤ 0.001 | 0.002 | 0.004 | 0.008 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | > 32 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|---|-----------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|--------|-------------------|-------------------|
| gPRSP (1a + 2x + 2b) (52 strains) | TBPM | | | | | 2 | 3 | 37 | 10 | | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | CDTR | | | | | | | | | 4 | 12 | 28 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | 1 | 4 |
| | CFPN | | | | | | | | | 3 | 9 | 28 | 5 | 1 | 1 | 3 | 2 | | 1 | 8 |
| | CFDN | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 | 16 | 26 | 1 | 4 | 1 | 8 | 16 |
| | CTRX | | | | | | | | | 2 | 6 | 30 | 7 | 2 | 3 | 2 | | | 1 | 4 |
| | PCG | | | | | | | | | 2 | 1 | 7 | 37 | 3 | 2 | | | | 2 | 2 |
| | AMPC | | | | | | | | | 1 | 2 | 27 | 20 | 1 | 1 | | | | 1 | 2 |
| | FRPM | | | | | | | | 1 | | 4 | 45 | 2 | | | | | | 0.5 | 0.5 |
| | MEPM | | | | | | | | 1 | 1 | 5 | 40 | 5 | | | | | | 0.5 | 0.5 |
| | CAM | | | | | 1 | 1 | | | 2 | 7 | 11 | 2 | 1 | | | 1 | 26 | 16 | > 32 |
| | LVFX | | | | | | | | | | | 11 | 40 | 1 | | | | | 1 | 1 |
| | TFLX | | | | | | | | | 16 | 29 | 4 | 3 | | | | | | 0.25 | 0.5 |

^a)Broth microdilution

S. pneumoniae: 131 strains

gPSSP: Clinical isolates having three normal *pbp* genes,

gPISP (2x): Clinical isolates having altered *pbp2x* gene,

gPISP (2b): Clinical isolates having altered *pbp2b* gene,

gPISP (1a + 2x): Clinical isolates having altered *pbp1a* and *pbp2x* genes,

gPISP (2x + 2b): Clinical isolates having altered *pbp2x* and *pbp2b* genes,

gPRSP (1a + 2x + 2b): Clinical isolates having three altered *pbp* genes, *pbp1a*, *pbp2x* and *pbp2b*.

Only 1 strain was defined as gPISP (2b) and its MIC ($\mu\text{g/mL}$) was followed; TBPM (tebipenem): 0.008, CDTR (cefditoren): 0.12, CFPN (cefcapene): 0.12, CFDN (cefdinir): 0.5, CTRX (ceftriaxone): 0.25, PCG (penicillin G): 0.25, AMPC (amoxicillin): 0.12, FRPM (faropenem): 0.06, MEPM (meropenem): 0.06, CAM (clarithromycin): > 32 , LVFX (levofloxacin): 0.5, TFLX (tosufloxacin): 0.12.

Modifications from Yamada K., et al. (Jpn J Chemother, submitted).

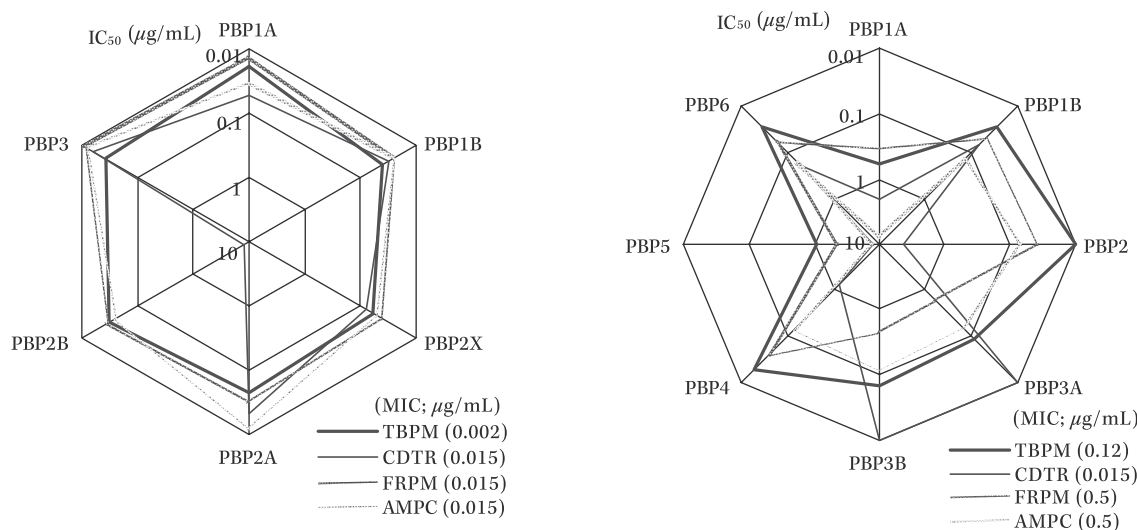


Fig. 2. Affinities of tebipenem and other compounds for PBPs of *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-255 (left) and *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 (right).

IC₅₀ is the amount of unlabeled compound required to decrease binding to [³H]-benzylpenicillin by 50%.

TBPM: tebipenem, CDTR: cefditoren, FRPM: faropenem, AMPC: amoxicillin

を示した。

S. pneumoniae の実験的 PBP 遺伝子変異株を用いて PBPs に対する結合親和性を検討した結果、gPISP および gPRSP の変異した PBP1A および 2X/2A に対する TBPM の IC₅₀ は、それぞれ 0.01~0.02 および 0.02~0.04 $\mu\text{g/mL}$ であり、CDTR、FRPM および AMPC より高い

結合親和性を示した (Table 5)。一方、4 種の変異型 PBP 2B 組換え蛋白質を調製し検討した結果、CDTR の IC₅₀ はいずれも $> 200 \mu\text{g/mL}$ であった。TBPM、FRPM および AMPC の IC₅₀ は、wild type PBP2B に対してそれぞれ 0.35、1.39 および 5.50 $\mu\text{g/mL}$ であったのに対し、T 431K、Q 432 L、T 451A、A 624 G 変異型 PBP2B に対し

Table 4. Distribution of tebipenem MICs for clinical isolates of *Haemophilus influenzae* classified into 5 groups based on beta-lactamase-producing and *pbp* gene alteration

| Organism | $\mu\text{g/mL}^{\text{a)}$ | ≤ 0.001 | 0.002 | 0.004 | 0.008 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | ≥ 32 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|--|-----------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|-----------|-------------------|-------------------|
| gBLNAS (39 strains) | TBPM | | | | | | 1 | 16 | 19 | 3 | | | | | | | | | 0.12 | 0.12 |
| | CDTR | | | | 10 | 21 | 8 | | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | CFPN | | | | 2 | 14 | 17 | 6 | | | | | | | | | | | 0.03 | 0.06 |
| | CFDN | | | | | | | | 1 | 17 | 13 | 8 | | | | | | | 0.5 | 1 |
| | CTRX | | 2 | 20 | 14 | 3 | | | | | | | | | | | | | 0.004 | 0.008 |
| | ABPC | | | | | | | | 4 | 27 | 6 | 2 | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | AMPC | | | | | | | | | 5 | 29 | 3 | 2 | | | | | | 0.5 | 1 |
| | AMPC/ CVA | | | | | | | | | 5 | 29 | 3 | 2 | | | | | | 0.5 | 1 |
| | FRPM | | | | | | | | | 10 | 24 | 2 | 3 | | | | | | 0.5 | 1 |
| | MEPM | | | | | | | 5 | 28 | 6 | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | CAM | | | | | | | | | | | | | 4 | 19 | 12 | 4 | | 4 | 16 |
| | AZM | | | | | | | | | | 3 | 14 | 13 | 9 | | | | | 2 | 4 |
| | LVFX | | | | | | 31 | 8 | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | TFLX | | | 4 | 23 | 10 | 2 | | | | | | | | | | | | 0.008 | 0.015 |
| gBLPAR (21 strains) | TBPM | | | | | | 1 | 8 | 10 | 2 | | | | | | | | | 0.12 | 0.12 |
| | CDTR | | | | 2 | 14 | 5 | | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | CFPN | | | | 3 | 10 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | CFDN | | | | | | | | 1 | 9 | 7 | 4 | | | | | | | 0.5 | 1 |
| | CTRX | | | 17 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | 0.004 | 0.008 |
| | ABPC | | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 5 | 14 | > 32 | > 32 |
| | AMPC | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 17 | > 32 | > 32 |
| | AMPC/ CVA | | | | | | | | | 5 | 12 | 4 | | | | | | | 1 | 2 |
| | FRPM | | | | | | | | 1 | 4 | 9 | 5 | 2 | | | | | | 0.5 | 1 |
| | MEPM | | | | | | 6 | 12 | 3 | | | | | | | | | | 0.06 | 0.12 |
| | CAM | | | | | | | | | | | | | | 13 | 6 | 2 | | 4 | 8 |
| | AZM | | | | | | | | | | | 7 | 12 | 2 | | | | | 2 | 2 |
| | LVFX | | | | | | 11 | 10 | | | | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| | TFLX | | | 10 | 4 | 7 | | | | | | | | | | | | | 0.008 | 0.015 |
| gLow- BLNAR (27 strains, 26 strains for CAM) | TBPM | | | | 1 | | 1 | 1 | 4 | 8 | 5 | 7 | | | | | | | 0.25 | 1 |
| | CDTR | | | | 4 | 5 | 10 | 3 | 3 | 2 | | | | | | | | | 0.03 | 0.12 |
| | CFPN | | | | | 1 | 1 | 12 | 7 | 1 | 1 | 2 | 2 | | | | | | 0.06 | 1 |
| | CFDN | | | | | | | | 1 | 1 | 7 | 4 | 8 | 4 | 2 | | | | 2 | 4 |
| | CTRX | | 1 | 2 | 6 | 10 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | | | | | | | | 0.015 | 0.25 |
| | ABPC | | | | | | | | 1 | 1 | 2 | 12 | 8 | 3 | | | | | 1 | 4 |
| | AMPC | | | | | | | | | 2 | | 4 | 6 | 11 | 3 | 1 | | | 4 | 8 |
| | AMPC/ CVA | | | | | | | | | 2 | | 4 | 7 | 10 | 4 | | | | 4 | 8 |
| | FRPM | | | | | | | | 1 | | 2 | 1 | 2 | 11 | 9 | 1 | | | 2 | 4 |
| | MEPM | | | | | | 1 | 1 | 2 | 9 | 9 | 5 | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | CAM | | | | | | | | | | | | | 4 | 4 | 17 | 1 | | 8 | 8 |
| | AZM | | | | | | | | | | | | 8 | 18 | 1 | | | | 2 | 2 |
| | LVFX | | | | | | 9 | 17 | 1 | | | | | | | | | | 0.03 | 0.03 |
| | TFLX | | | 5 | 9 | 10 | 3 | | | | | | | | | | | | 0.008 | 0.03 |

(Continued)

て 2.08, 17.82 および 86.30 $\mu\text{g/mL}$ であり, TBPM は変異型 PBP2B に対しても他薬剤に比べ高い結合親和性を示した (Table 6)。

3. 耐性菌選択に関する検討

1) 耐性菌出現頻度

S. pneumoniae および *H. influenzae* に対する TBPM の耐性菌出現頻度を検討したところ, いずれの菌種に対しても TBPM の耐性菌出現頻度は 1~2×MIC において

$1.7 \times 10^{-5} \sim < 1.8 \times 10^{-9}$ であった。TBPM は *S. pneumoniae* と *H. influenzae* に対して, 既存の β -ラクタム系抗菌薬と同様に 4×MIC 以下の濃度で耐性菌出現を抑制した。本試験条件下では, *S. pneumoniae* 6 株の耐性菌の出現を抑制する TBPM の濃度は 0.008~0.12 $\mu\text{g/mL}$ であり, CDTR (0.06~1 $\mu\text{g/mL}$), FRPM (0.03~1 $\mu\text{g/mL}$) および LVFX (6 株とも 2 $\mu\text{g/mL}$) に比べ低かった。同様に, *H. influenzae* 2 株の耐性菌の出現を抑制する TBPM の濃

Table 4. (Continued)

| Organism | $\mu\text{g/mL}^{\text{a)}$ | ≤ 0.001 | 0.002 | 0.004 | 0.008 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | ≥ 32 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|------------------------|-----------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|-----------|-------------------|-------------------|
| gBLNAR (38 strains) | TBPM | | | | | | 1 | | 1 | 1 | 11 | 20 | 4 | | | | | | 1 | 2 |
| | CDTR | | | | | | | 2 | 4 | 20 | 10 | 2 | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | CFPN | | | | | | | | | | 2 | 4 | 14 | 13 | 4 | 1 | | | 2 | 8 |
| | CFDN | | | | | | | | | | | | 4 | 9 | 13 | 12 | | | 8 | 16 |
| | CTRX | | | | | | 3 | 6 | 24 | 3 | 2 | | | | | | | | 0.25 | 0.5 |
| | ABPC | | | | | | | | | | | 2 | 3 | 17 | 12 | 3 | 1 | | 4 | 16 |
| | AMPC | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 4 | 13 | 17 | 2 | 8 | 16 |
| | AMPC/ CVA | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 6 | 15 | 15 | | 8 | 16 |
| | FRPM | | | | | | | | | | 2 | | | 14 | 20 | 2 | | | 4 | 4 |
| | MEPM | | | | | | 1 | 1 | 1 | 9 | 18 | 8 | | | | | | | 0.5 | 1 |
| | CAM | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | 25 | 6 | 2 | 8 | 16 |
| | AZM | | | | | | | | | | | | 12 | 19 | 7 | | | | 2 | 4 |
| | LVFX | | | | | 19 | 16 | | | 1 | 2 | | | | | | | | 0.015 | 0.03 |
| TFLX | | | 2 | 27 | 6 | 1 | | | 2 | | | | | | | | | 0.008 | 0.015 | |
| gBLPACR (9 strains) | TBPM | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | | | | | — | — |
| | CDTR | | | | | | 1 | | 2 | 4 | 2 | | | | | | | | — | — |
| | CFPN | | | | | | | 2 | | | | 1 | 1 | 5 | | | | | — | — |
| | CFDN | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | | 3 | 3 | | | — | — |
| | CTRX | | | | 1 | 1 | | | 2 | 2 | 3 | | | | | | | | — | — |
| | ABPC | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | | | 7 | — | — |
| | AMPC | | | | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | 7 | — | — |
| | AMPC/ CVA | | | | | | | | | | | | 3 | | 2 | 2 | 2 | | — | — |
| | FRPM | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 5 | | 1 | | | — | — |
| | MEPM | | | | | | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | | | | | | — | — |
| | CAM | | | | | | | | | | | | | 3 | 4 | 1 | 1 | | — | — |
| | AZM | | | | | | | | | | | | 8 | 1 | | | | | — | — |
| | LVFX | | | | | 5 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | — | — |
| TFLX | | | 2 | 5 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | — | — | |

—: not calculated

^{a)}Broth microdilution*H. influenzae*: 134 strainsgBLNAS: β -lactamase-nonproducing clinical isolates having normal *ftsI* gene,gBLPAR: β -lactamase-producing clinical isolates having normal *ftsI* gene,gLow-BLNAR: β -lactamase-nonproducing clinical isolates having altered *ftsI* gene (KTG motif),gBLNAR: β -lactamase-nonproducing clinical isolates having altered *ftsI* gene (KTG and SSN motif),gBLPACR: β -lactamase-producing clinical isolates having altered *ftsI* gene.

TBPM: tebipenem, CDTR: cefditoren, CFPN: cefcapene, CFDN: cefdinir, CTRX: ceftriaxone, ABPC: ampicillin, AMPC: amoxicillin, AMPC/CVA: amoxicillin/clavulanic acid (Ratio of concentration: 2:1. The concentration is shown as amoxicillin.) FRPM: faropenem, MEPM: meropenem, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, LVFX: levofloxacin, TFLX: tosufloxacin

Modifications from Yamada K., et al. (Jpn J Chemother, submitted).

度は、0.5 および 2 $\mu\text{g/mL}$ であり、LVFX (2 株とも 0.03 $\mu\text{g/mL}$) より高いものの、CDTR (0.5 および 2 $\mu\text{g/mL}$) および MEPM (0.5 および 1 $\mu\text{g/mL}$) と同程度、FRPM (4 および 8 $\mu\text{g/mL}$) および IPM (2 および 16 $\mu\text{g/mL}$) に比べ低かった (Table 7 および Table 8)。

2) 継代培養における耐性獲得

S. pneumoniae および *H. influenzae* を sub-MIC 濃度の TBPM 存在下で 14 回継代したときの MIC 上昇は、CDTR および FRPM と同様に 2~4 倍以内であった (Table 9 および Table 10)。一方、LVFX および NFLX では、*S. pneumoniae* でそれぞれ 2~8 および 4~32 倍以上、*H. influenzae* でそれぞれ 4~32 および 2~16 倍の

MIC 上昇が認められた。TBPM 存在下で 14 回継代後に得られた *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対する MEPM および IPM を含む各種 β -ラクタム系抗菌薬の MIC の変動は、TBPM とほぼ同様であり、*S. pneumoniae* において親株の 2 倍以内、*H. influenzae* において親株の 4 倍以内であった (Table 11)。

III. 考 察

S. pneumoniae の PBP1A, PBP2X および PBP2B ならびに *H. influenzae* の PBP3 は、 β -ラクタム系抗菌薬の耐性に関与することが知られている^{8,9)}。アミノ酸置換の積み重ねによる耐性化とはある 1 種類の PBP 内に複数個のアミノ酸置換が生じることによる耐性化であり、この

Table 5. Affinity of tebipenem and other compounds for PBPs of *Streptococcus pneumoniae* MSC17007 and its isogenic recombinants

| Strain No. ^{a)} | | Tebipenem | Cefditoren | Faropenem | Amoxicillin | |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------|------------------|--------------|--------------|--------------|
| MSC17007 | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | 0.004 | 0.03 | 0.015 | 0.03 | |
| | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | PBP1A | 0.011 | 0.030 | 0.007 | 0.020 |
| | | PBP1B | 0.016 | 0.018 | 0.013 | 0.013 |
| | | PBP2X/2A | 0.016 | 0.014 | 0.015 | 0.007 |
| | | PBP2B | 0.014 | > 8 | 0.014 | 0.019 |
| | | PBP3 | 0.010 | 0.011 | 0.007 | 0.010 |
| MSC17008 | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | 0.004 | 0.5 | 0.015 | 0.06 | |
| | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | PBP1A | 0.010 | 0.040 | 0.010 | 0.029 |
| | | PBP1B | 0.031 | 0.019 | 0.022 | 0.030 |
| | | PBP2X/2A | 0.034 | 0.088 | 0.029 | 0.046 |
| | | PBP2B | 0.014 | > 8 | 0.017 | 0.027 |
| | | PBP3 | 0.015 | 0.009 | 0.010 | 0.010 |
| MSC17009 | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | 0.015 | 2 | 0.12 | 0.5 | |
| | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | PBP1A | 0.021 | 0.190 | 0.141 | 1.123 |
| | | PBP1B | 0.014 | 0.012 | 0.015 | 0.024 |
| | | PBP2X/2A | 0.036 | 0.053 | 0.406 | 0.069 |
| | | PBP2B | 0.006 | > 8 | \leq 0.008 | 0.017 |
| | | PBP3 | \leq 0.004 | \leq 0.008 | \leq 0.008 | \leq 0.008 |
| MSC17010 | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | 0.25 | 1 | 2 | 8 | |
| | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | PBP1A | 0.011 | 0.123 | 0.060 | 0.922 |
| | | PBP1B | 0.011 | 0.011 | 0.009 | 0.021 |
| | | PBP2X/2A | 0.022 | 0.053 | 0.311 | 0.138 |
| | | PBP2B | ND ^{b)} | ND | ND | ND |
| | | PBP3 | \leq 0.004 | \leq 0.008 | \leq 0.008 | \leq 0.008 |

^{a)}MSC17007: parent gPSSP strain, MSC17008, MSC17009 and MSC17010: isogenic recombinants that *pbp2x*, *pbp2x/1a* and *pbp2x/1a/2b* gene, respectively, from gPRSP MSC17011 were transformed.

^{b)}ND: not detected.

Table 6. Affinity of tebipenem and other compounds for PBP2Bs of *Streptococcus pneumoniae*

| PBP2B | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------|-----------|-------------|
| | Tebipenem | Cefditoren | Faropenem | Amoxicillin |
| Wild type | 0.35 | > 200 | 1.39 | 5.50 |
| T451A type | 0.16 | > 200 | 1.04 | 8.45 |
| T431K, Q432L, T451A type | 0.23 | > 200 | 1.45 | 15.04 |
| T431K, Q432L, T451A, A624G type | 2.08 | > 200 | 17.82 | 86.30 |

PBP2Bs: wild type and amino acid substitution type of *Streptococcus pneumoniae* MSC07573.

現象が異なる PBP で同時に生じることが *pbp* 変異の積み重ねによる耐性化である。 *S. pneumoniae* では両者が⁸, *H. influenzae* では主に前者が β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性化に関与すると考えられている^{8,9)}。 *S. pneumoniae* では、 *pbp2x*, *1a*, *2b* の順に変異を導入することによってそれぞれの PBP に対する薬剤の親和性が低下し、この低下と MIC の上昇は密接に関連する。一方、 *H. influenzae* の β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性化については、 PBP3 のアミノ酸置換の積み重ねによる耐性化機構が報告されている¹⁾。これら耐性菌の出現は、現在、特に薬剤選択の幅の小さい小児感染症における大きな脅威となっている。また、本邦では、マクロライド系抗菌薬に対し中等度～高度に耐性を示す *S. pneumoniae* の分離

頻度が 70~80% と高く^{10,11)}、その多くは同時に β -ラクタム系抗菌薬に対しても耐性を示すことから、多剤耐性 *S. pneumoniae* が問題となっている。今回、 *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の PBP 変異に焦点を当て、 genotype ごとの TBPM に対する感受性変化を実験的変異株ならびに臨床分離株で検討し、 PBP に対する親和性との関連を解析した。さらに、 TBPM の耐性獲得に関して既存の β -ラクタム系ならびにニューキノロン系抗菌薬と比較検討した。

S. pneumoniae では、 *pbp2x* 変異に伴いセフェム系抗菌薬の抗菌力低下がみられ、 *pbp2x* 変異に *pbp1a* 変異あるいは *pbp1a+pbp2b* 変異が加わることによりカルバペネム系を含むすべての β -ラクタム系抗菌薬の抗菌力低下

Table 7. Frequency of single-step mutation for *Streptococcus pneumoniae*

| Antimicrobial agent | Concentration ^{a)} | Frequency of single-step mutation for <i>S. pneumoniae</i> | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | ATCC BAA-255 | ATCC 49619 | SP00214 | SP00218 | SP00324 | SP00337 |
| Tebipenem | 4 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | 1.7 × 10 ⁻⁸ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | 5.4 × 10 ⁻⁷ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | 1.4 × 10 ⁻⁵ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | 1.7 × 10 ⁻⁵ | NC ^{b)} | NC | 4.8 × 10 ⁻⁶ |
| Cefditoren | 4 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | 2.4 × 10 ⁻⁸ | 1.3 × 10 ⁻⁸ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | NC | NC | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| Faropenem | 4 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | 3.8 × 10 ⁻⁸ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | 3.3 × 10 ⁻⁶ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | 3.0 × 10 ⁻⁷ |
| Levofloxacin | 4 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 2.4 × 10 ⁻⁹ | < 1.8 × 10 ⁻⁹ | < 1.9 × 10 ⁻⁸ | < 8.6 × 10 ⁻⁹ | < 1.6 × 10 ⁻⁸ | < 3.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | 1.4 × 10 ⁻⁶ | 1.3 × 10 ⁻⁶ | 1.1 × 10 ⁻⁴ | 2.6 × 10 ⁻⁸ | 6.4 × 10 ⁻⁷ | 4.5 × 10 ⁻⁵ |

^{a)}MIC (μg/mL) against ATCC BAA-255, ATCC49619, SP00214, SP00218, SP00324 and SP00337 determined by agar dilution was followed; tebipenem (0.002, 0.015, 0.06, 0.03, 0.03, 0.06), cefditoren (0.015, 0.06, 1, 0.5, 0.5, 1), faropenem (0.015, 0.12, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5), levofloxacin (1, 1, 1, 1, 1, 1).

^{b)}NC: not calculated.

Table 8. Frequency of single-step mutation for BLNAR *Haemophilus influenzae*

| Antimicrobial agent | Concentration ^{a)} | Frequency of single-step mutation for <i>H. influenzae</i> | |
|---------------------|-----------------------------|--|--------------------------|
| | | ATCC49247 | HI00542 |
| Tebipenem | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | 4.1 × 10 ⁻⁷ |
| | 1 × MIC | 1.3 × 10 ⁻⁶ | 1.4 × 10 ⁻⁶ |
| Cefditoren | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | 1.3 × 10 ⁻⁷ | 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | NC ^{b)} | 2.0 × 10 ⁻⁷ |
| Faropenem | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | NC | NC |
| Meropenem | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | 2.2 × 10 ⁻⁶ |
| Imipenem | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁶ |
| | 1 × MIC | NC | NC |
| Levofloxacin | 4 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 2 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |
| | 1 × MIC | < 1.3 × 10 ⁻⁷ | < 2.0 × 10 ⁻⁸ |

^{a)}MIC (μg/mL) against ATCC49247 and HI00542 determined by agar dilution was followed; tebipenem (0.25, 0.5), cefditoren (0.12, 0.5), faropenem (2, 4), meropenem (0.5, 0.5), imipenem (1, 8), levofloxacin (0.03, 0.03).

^{b)}NC: not calculated.

が認められた。本検討から、TBPM も他の β-ラクタム系抗菌薬と同様にこのような *pbp* 変異の積み重ねによる耐性化の影響を受けるものの、*S. pneumoniae* に対する抗菌力は試験に供した 6 系統 12 薬物中最も強く、gPRSP (96% がマクロライド耐性遺伝子の *mefA* あるいは *ermB* の保有株) を含むすべての株の発育を 0.12 μg/mL で阻止することが明らかとなった。また、欧米で比較的分離

されるが本邦での分離頻度の低い gPISP (2b) は、本検討でも 1 株のみの検討となったが、TBPM の gPISP (2b) 株に対する MIC は 0.008 μg/mL で、他の β-ラクタム系抗菌薬の 1/8~1/64 であった。TBPM の強い抗菌活性は、*S. pneumoniae* のこれら複数の PBPs に対する結合親和性が、他の β-ラクタム系抗菌薬に比べて高いことに起因すると推察される。*S. pneumoniae* の実験的変異株を用

Table 9. Multistep resistance selection by tebipenem, ceftidoren, faropenem, levofloxacin and norfloxacin on *Streptococcus pneumoniae*

| Strain No. | No. of passages | MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)} | | | | |
|------------|-----------------|--|------------------|-----------|--------------|-------------|
| | | Tebipenem | Ceftidoren | Faropenem | Levofloxacin | Norfloxacin |
| ATCC49619 | 0 | 0.008 | 0.06 | 0.12 | 1 | 4 |
| | 7 | 0.008 | 0.06 | 0.06 | 2 | 128 |
| | 14 | 0.008 | 0.06 | 0.12 | 4 | > 128 |
| SP00214 | 0 | 0.06 | 1 | 0.5 | 1 | 8 |
| | 7 | 0.06 | ND ^{b)} | 0.25 | 2 | 32 |
| | 14 | 0.06 | ND | 1 | 2 | 32 |
| SP00218 | 0 | 0.06 | 1 | 0.5 | 0.5 | 4 |
| | 7 | 0.06 | 1 | ND | 1 | 64 |
| | 14 | 0.06 | ND | ND | 1 | 128 |
| SP00324 | 0 | 0.06 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 4 |
| | 7 | 0.12 | 0.5 | 1 | 1 | 8 |
| | 14 | 0.12 | 1 | 1 | 1 | 32 |
| SP00337 | 0 | 0.06 | 1 | 0.5 | 1 | 4 |
| | 7 | 0.06 | 1 | 0.5 | 4 | 64 |
| | 14 | 0.06 | 1 | ND | 8 | 128 |

^{a)}MIC at passage 0; initial MIC, MIC at passage 7 and 14; MIC after 7 and 14 serial subcultures with sub-MIC.

^{b)}ND: not done because of no growth during 1–14 serial subcultures with sub-MIC.

Table 10. Multistep resistance selection by tebipenem, ceftidoren, faropenem, levofloxacin and norfloxacin on *Haemophilus influenzae*

| Strain No. | No. of passages | MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)} | | | | |
|------------|-----------------|--|------------|-----------|--------------|-------------|
| | | Tebipenem | Ceftidoren | Faropenem | Levofloxacin | Norfloxacin |
| ATCC49766 | 0 | 0.12 | 0.008 | 0.5 | 0.03 | 0.06 |
| | 7 | 0.25 | 0.03 | 2 | 0.06 | 0.06 |
| | 14 | 0.5 | 0.03 | 1 | 0.12 | 0.12 |
| ATCC49247 | 0 | 1 | 0.12 | 2 | 0.03 | 0.06 |
| | 7 | 0.5 | 0.25 | 2 | 0.12 | 0.12 |
| | 14 | 0.5 | 0.25 | 1 | 0.25 | 0.12 |
| HI00542 | 0 | 0.5 | 0.25 | 2 | 0.03 | 0.12 |
| | 7 | 2 | 0.5 | 4 | 0.25 | 0.12 |
| | 14 | 2 | 1 | 4 | 0.5 | 0.25 |
| HI00547 | 0 | 0.5 | 0.12 | 2 | 0.015 | 0.06 |
| | 7 | 1 | 0.25 | 4 | 0.03 | 0.12 |
| | 14 | 1 | 0.25 | 4 | 0.12 | 0.12 |
| HI00676 | 0 | 1 | 0.06 | 2 | 0.015 | 0.06 |
| | 7 | 2 | 0.12 | 4 | 0.06 | 0.25 |
| | 14 | 2 | 0.25 | 4 | 0.5 | 1 |

^{a)}MIC at passage 0; initial MIC, MIC at passage 7 and 14; MIC after 7 and 14 serial subcultures with sub-MIC.

いた PBP 結合親和性の検討から, CDTR, FRPM および AMPC の IC_{50} は, 変異した PBP1A (MSC17009, MSC17010) に対してそれぞれ TBPM の 9~11 倍, 5~7 倍および 50 倍以上, 変異した PBP2X (MSC17008, MSC17009, MSC17010) に対してそれぞれ TBPM の 1.5~2.6 倍, 0.9~14 倍および 1.4~6.3 倍であった。これらの菌株は, PBP1A の STMK, SRN および KTG 領域近傍 (T371A, P432T, T574N, S575T, Q576G および F577Y), PBP2X の STMK 領域 (T338A) にアミノ酸置換を有する株である³⁾。セフェム系抗菌薬では, PBP2X

に加えて PBP1A に変異が生じた結果, それぞれの PBP 結合親和性は低下し, TBPM をはじめとするカルバペネム系抗菌薬以上に MIC が上昇したと考えられた。一方, gPRSP では PBP2B の SSN および KTG 領域近傍 (T431K, Q432L, T451A および A624G) の変異が耐性化に重要であるが, 通常の実験条件下では PBP2B の変異により [³H]-PCG が十分量結合しなかったため, 各薬剤の結合親和性が算出できなかった (Table 5)。そこで, 変異を有さない PBP2B の遺伝子に 1~4 個のアミノ酸置換を導入し, これを *E. coli* に形質転換し, 変異した

Table 11. Retested MIC against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* after multistep resistance selection by tebipenem

| Strain | Selected by | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|--------------------------|------------|----------|-------------|-------------|-----------------|-----------|-----------|----------|--------------|-------------|
| | | Tebipenem | Cefditoren | Cefdinir | Ceftriaxone | Amoxicillin | Clavulanic acid | Faropenem | Meropenem | Imipenem | Levofloxacin | Norfloxacin |
| <i>S.pneumoniae</i> | | | | | | | | | | | | |
| ATCC49619 | — | 0.015 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 1 | 4 |
| | Tebipenem | 0.015 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.06 | 0.12 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 1 | 4 |
| SP00214 | — | 0.06 | 1 | 8 | 1 | 2 | 0.5 | 1 | 2 | 1 | 0.25 | 8 |
| | Tebipenem | 0.12 | 1 | 16 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 0.5 | 8 |
| SP00218 | — | 0.06 | 1 | 8 | 2 | 1 | 0.5 | 1 | 1 | 0.5 | 0.25 | 4 |
| | Tebipenem | 0.12 | 1 | 8 | 2 | 1 | 0.5 | 1 | 1 | 0.5 | 0.25 | 4 |
| SP00324 | — | 0.06 | 1 | 8 | 1 | 1 | 0.5 | 1 | 1 | 0.5 | 0.25 | 4 |
| | Tebipenem | 0.12 | 2 | 16 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0.5 | 0.5 | 4 |
| SP00337 | — | 0.06 | 1 | 8 | 2 | 2 | 0.5 | 2 | 2 | 0.5 | 1 | 8 |
| | Tebipenem | 0.12 | 1 | 16 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0.5 | 4 |
| <i>H.influenzae</i> | | | | | | | | | | | | |
| ATCC49766 | — | 0.12 | 0.008 | 0.25 | 0.004 | 0.5 | 0.5 | 0.06 | 1 | 0.03 | 0.06 | 0.06 |
| | Tebipenem | 0.5 | 0.03 | 0.5 | 0.015 | 1 | 2 | 0.25 | 1 | 0.03 | 0.03 | 0.06 |
| ATCC49247 | — | 1 | 0.25 | 2 | 0.12 | 8 | 4 | 0.25 | 0.5 | 0.03 | 0.12 | 0.12 |
| | Tebipenem | 1 | 0.12 | 4 | 0.12 | 8 | 4 | 0.5 | 0.5 | 0.03 | 0.12 | 0.12 |
| HI00542 | — | 0.5 | 0.5 | 4 | 0.25 | 8 | 4 | 0.5 | 2 | 0.03 | 0.12 | 0.12 |
| | Tebipenem | 2 | 1 | 16 | 0.5 | 32 | 8 | 2 | 8 | 0.03 | 0.12 | 0.12 |
| HI00547 | — | 0.5 | 0.12 | 8 | 0.25 | 8 | 4 | 0.25 | 4 | 0.015 | 0.06 | 0.06 |
| | Tebipenem | 1 | 0.25 | 4 | 0.25 | 8 | 4 | 0.5 | 4 | 0.015 | 0.03 | 0.03 |
| HI00676 | — | 1 | 0.06 | 2 | 0.06 | 8 | 2 | 1 | 4 | 0.03 | 0.06 | 0.06 |
| | Tebipenem | 1 | 0.06 | 2 | 0.06 | 8 | 4 | 1 | 8 | 0.03 | 0.03 | 0.06 |

amoxicillin/clavulanic acid (Ratio of concentration: 2 : 1. The concentration is shown as amoxicillin.)

PBP2Bを大量に発現させ、得られた変異PBP2Bを用いて結合親和性試験を実施した(Table 6)。そのため、変異を有しないPBP2B (Table 6, wild type) に対する IC_{50} は、*S. pneumoniae* MSC17007のそれと大きく乖離し、TBPMと他薬剤との IC_{50} の関係も異なっていた。これ

は、前者 (Table 5) は全膜画分を用いた検討であるのに対し、後者 (Table 6) は *E. coli* で大量発現させたPBP2Bを用いた検討であること、評価に用いた基質の違いや蛋白質(PBP)量に対する基質量の違いに起因すると考えられた。変異したPBP2Bに対する薬剤の結合親和性と

MIC の関係については、この T431K, Q432L, T451A および A624G 変異を有する PBP2B を用いた結果 (Table 6) からの推定となるが、TBPM はアミノ酸置換の積み重ねの影響を受けにくく、FRPM, AMPC より強い抗菌力を示す点との矛盾はないと考えられる。一方、CDTR などのセフェム系抗菌薬は PBP2X の変異の影響を受けることから *pbp2x* 変異株において MIC が低下するが、元来 PBP2B への結合親和性は低いため、*pbp2b* 変異株では MIC の変化が小さいものと推察された。TBPM は *S. pneumoniae* のいずれの PBP に変異が生じても他薬剤に比べて高い結合親和性を有しており、これが本薬の強い抗菌力に反映しているものと考えられた。

一方、*H. influenzae* の β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性化については、 β -ラクタマーゼと PBP3 変異以外の耐性化に関与する因子の存在を示唆する報告もあるが¹²⁾、現在のところその寄与の程度は明確となっていない。*H. influenzae* の β -ラクタム系抗菌薬耐性は、 β -ラクタマーゼを除くと PBP3 の関与が大きいことが報告されていることから⁸⁾、今回 PCR によって検出される PBP3 のアミノ酸置換と MIC の関係に着目し種々の試験を実施した。本検討において、CDTR を除くセフェム系抗菌薬ではアミノ酸置換の積み重ねによる MIC の上昇は、PBP3 の点変異株でも臨床分離株の *ftsI* を形質転換した株でも認められたが、TBPM の MIC の上昇は、PBP3 の点変異株では小さかった。PBP3 の点変異株と臨床分離株の *ftsI* を形質転換した株の MIC の変化に程度の差が認められた原因として、臨床分離株の *ftsI* 遺伝子内に存在する、Rd 株に導入した点変異以外の変異の影響なども考えられるが、詳細は現在のところ明らかとなっていない。今回、PBP3 における SSN および KTG 領域近傍のアミノ酸置換と MIC の関係について検討した結果、TBPM を含むカルバペネム系抗菌薬は、N526K のアミノ酸置換の影響を受けるが、セフェム系抗菌薬と異なり、R517H のアミノ酸置換の影響を受けにくいこと、SSN 領域のアミノ酸置換による変異の積み重ねの影響を受けにくいことが示唆された。TBPM は、*H. influenzae* の PBP1B, PBP2 および PBP4 に対しても高い結合親和性を有するが、これらの PBP とカルバペネム系抗菌薬の抗菌力との関係はまだ十分解明されておらず、PBP3 以外の PBP 変異と抗菌力の関係については、今後の検討が必要と考える。なお、本研究において CDTR のように *H. influenzae* ATCC49766 の PBP3 への結合親和性が高い抗菌薬が強い抗菌力を示したことは、Ubukata ら⁸⁾の報告と一致した。

TBPM の耐性化に関しては、複数の *S. pneumoniae* および *H. influenzae* を用いて評価した。TBPM は、*S. pneumoniae* に対して CDTR, FRPM および LVFX と同様に、*H. influenzae* に対しては既存の β -ラクタム系抗菌薬と同様に 1~4 \times MIC の濃度で耐性菌出現を抑制した。し

かし、TBPM は両菌種に対する抗菌力が強いことから、耐性菌出現を抑制する濃度は、*S. pneumoniae* において CDTR, FRPM および LVFX に比べて低く (0.008~0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、*H. influenzae* において LVFX には劣るものの、CDTR および MEPM とほぼ同程度で、FRPM および IPM より低かった (0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。また、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* を sub-MIC 濃度の TBPM 存在下で 14 回継代したときの MIC 上昇は、CDTR および FRPM と同様に 2~4 倍以内であった。一方、*H. influenzae* の耐性菌出現メカニズムについては、耐性菌の変異した *ftsI* 遺伝子が感性菌に形質転換され、モザイク型遺伝子を有する新たな耐性菌が出現するという、前述の突然変異による耐性化とは異なる耐性獲得が報告されている¹³⁾。Takahata らは、TBPM は 0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でこの形質転換による耐性菌の出現を阻止することを報告しており、モザイク型遺伝子を有する耐性菌の選択の可能性も同様に低いと推定している¹⁴⁾。以上の結果、TBPM が耐性菌を選択する性質 (その頻度および MIC 上昇の程度) は既存の経口 β -ラクタム系抗菌薬と同程度以下であると考えられた。

以上のとおり、TBPM は *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の複数の PBP に対して高い結合親和性を示し、アミノ酸置換の積み重ねによる耐性への影響を受けにくかった。PBP に対するこれらの特長により、TBPM は、耐性菌に対しても強い抗菌力を示すものと推察された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、明治製菓株式会社 大崎有美氏に、多大な協力をいただいたことを深謝いたします。

文 献

- 1) Hikida M, Itahashi K, Igarashi A, Shiba T, Kitamura M: In vitro antibacterial activity of LJC11,036, an active metabolite of L-084, a new oral carbapenem antibiotic with potent antipneumococcal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2010-6
- 2) Miyazaki S, Hosoyama T, Furuya N, Ishii Y, Matsu-moto T, Ohno A, et al: In vitro and in vivo antibacterial activities of L-084, a novel oral carbapenem, against causative organisms of respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 203-7
- 3) Maeda K, Ida T, Sanbongi Y, Suzuki T, Fukushima T, Kurazono M, et al: Comparison of activities of β -lactam antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* with recombinant penicillin-binding protein genes from a penicillin-resistant strain. *J Infect Chemother* 2005; 11: 107-11
- 4) Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Kataoka H, Suzuki T, Maeda K, et al: Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* β -lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2834-9

- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2006
- 6) Spratt B G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc Nat Acad Sci USA 1975; 72: 2999-3003
- 7) Zhao G, Meier T I, Kahl S D, Gee K R, Blaszcak L C: BOCILLIN F L, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1124-8
- 8) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1693-9
- 9) Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, Osaki Y, Kataoka H, Suzuki T, et al: Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2244-50
- 10) Sunakawa K, Farrell D J: Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. Annals Clin Microbiology Antimicrob 2007; 6: 7-14
- 11) Farrell D J, Couturier C, Hryniewicz W: Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003-2004). Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 245-9
- 12) Kaczmarek F S, Gootz T D, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M: Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1630-9
- 13) Takahata S, Ida T, Senju N, Sanbongi Y, Miyata A, Maebashi K, et al: Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1589-95
- 14) Takahata S, Kato Y, Sanbongi Y, Maebashi K, Ida T: Comparison of the efficacies of oral β -lactams in selection of *Haemophilus influenzae* transformants with mutated *ftsI* genes. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 1880-3

Mechanism for tebipenem antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

Toshie Sugano, Keiko Yamada, Nobuyoshi Baba, Koju Itahashi,
Takayoshi Fukushima, Takashi Ida and Kazunori Maebashi

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

Tebipenem (TBPM), an active form of the oral carbapenem tebipenem pivoxil, showed strong antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*, and inhibited the growth of all *S. pneumoniae* strains including penicillin-resistant strains with altered penicillin-binding protein gene (*pbp1a*, *pbp2x* and *pbp2b*) at 0.12 μ g/mL or less. TBPM showed higher binding affinity even for mutated PBP1A, PBP2X and PBP2B of *S. pneumoniae* than cefditoren (CDTR), faropenem (FRPM) or amoxicillin (AMPC). *In vitro* activity of TBPM against *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant strains with altered *ftsI* gene encoding PBP3, was stronger than that of FRPM or AMPC, and such activity was not so much affected by additional substitutions of amino acid. TBPM showed the high binding affinity for PBPs of *H. influenzae* ATCC 49766. Frequencies of single-step mutation of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* caused by TBPM were from 1.7×10^{-5} to $< 1.8 \times 10^{-9}$ at 1 to 2 times the MIC. As in the case of other β -lactam antibiotics, TBPM prevented the emergence of resistant *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strains at 4 times the MIC or less (0.008 to 0.12 μ g/mL and 0.5 to 2 μ g/mL, respectively). The susceptibilities of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* to TBPM, CDTR or FRPM were decreased by 1/2–1/4 after 14-time repeated subcultures in the presence of TBPM, CDTR or FRPM, respectively, at sub-MIC, whereas that to levofloxacin (LVFX) was decreased by 1/2–1/32 in the presence of LVFX.