

Imipenem (MK-0787) の試験管内抗菌力,  $\beta$ -lactamase 不活化作用,  
ペニシリン結合蛋白親和性及びマウスの脳と腎ホモジネートに対する安定性

横田 健・丸山映子・鈴木映子・新井京子・加藤尚代  
順天堂大学 医学部 細菌学教室

*S. aureus*, MRSA, *S. pneumoniae*,  $\beta$ -streptococci, *E. coli* (R<sup>+</sup>), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, 及び ABPC 耐性 *H. influenzae*, 24~58 臨床分離株に対する imipenem (MK-0787) の MIC<sub>80</sub> は, それぞれ 0.05, 12.5,  $\leq 0.006$ , 0.006, 0.78, 0.78, 6.25, 6.25, 1.56, 1.56, 0.39, 12.5, 12.5, >100, 0.39 及び 1.56  $\mu\text{g/ml}$  であった。imipenem は Ia, Ib, II, III, IV 及び V 型  $\beta$ -lactamase に Ki 値が小さいのみならず, 比較的低濃度で永久不活化作用を示した。作用点 PBP については, 各種グラム陰性菌の PBP 2, Ia, 及び Ib に強い結合親和性を示すので作用を受けた菌は球状となり殺菌される。imipenem の血清補体との協力は少ないが, マクロファージとは良好な協力的殺菌作用を示した。マウス脳組織には imipenem を破壊する dipeptidase 活性は認められなかった。imipenem は安全性さえ確認されれば, 優れた臨床効果が期待される。

Imipenem (MK-0787) は, thienamycin (TM) の 2 位側鎖を化学的に修飾し, 安定性を増したカルバペネム系抗生物質である (LEANZA ら<sup>1)</sup>)。生体に投与すると腎の dipeptidase で破壊されるため, そのインヒビター, cilastatin sodium (MK-0791) を等量に配合して注射剤とすることが検討されている。本研究は本合剤の抗菌力を評価するため, 各種細菌臨床分離株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定するとともに, imipenem の持つ  $\beta$ -lactamase 不活化作用, 各種細菌ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する結合親和性を検討した。また, cilastatin sodinm の安全性を間接的に推定するため, マウスの脳ホモジネートによる imipenem の分解の有無を調べ, dipeptidase がどの程度脳組織にあるか追及した。さらに imipenem の生体内効果を知る一助として, 血清補体及びマウス培養マクロファージ (M $\phi$ ) と imipenem との協力的殺菌作用も調べた。

### I. 材料及び実験方法

#### 1. 臨床分離株に対する MIC の測定

*S. aureus* 50 株, methicillin 耐性 *S. aureus* (MRSA) 58 株, *S. pneumoniae* 27 株,  $\beta$ -streptococci 24 株, *E. coli* CS 2 (R<sup>+</sup>) 52 株, *K. pneumoniae* 45 株, *P. mirabilis* 50 株, *P. vulgaris* 41 株, *S. marcescens* 50 株, *C. freundii* 48 株, *E. cloacae* 45 株, *P. aeruginosa* 50 株, *P. cepacia* 48 株, *P. maltophilia* 29 株, *A. calcoaceticus* 50 株, 及び ABPC 耐性 *H. influenzae* 25 株, に対する MIC は日本化学療法学会法に準拠した平板希釈法で, L-broth 18 時間培養液を希釈した 10<sup>6</sup> cfu/ml 浮遊液をマイクロプラ

ンターでスポットして 24 時間後の増殖の有無から求めた。

#### 2. 薬剤

Imipenem および cilastatin sodium は日本メルク萬有から, sulbactam (SBT) は台糖ファイザーから, clavulanic acid (CVA) および flucloxacillin (MFIPC) はビーチャーム薬品から, cloxacillin (MCIPC) は明治製菓から, cefazolin (CEZ) は藤沢薬品工業から, cefmetazole (CMZ) は三共から, cefotaxime (CTX) は中外製薬から, cefoperazone (CPZ) は富山化学工業から, ceftazidime (CAZ) は新日本実業から, cefmenoxime (CMX) は武田薬品工業から, そして PS-5 は三楽オーシャンから分与を受けた力価の明らかな薬品を使用した。

#### 3. $\beta$ -Lactamase 一時阻害作用

代表的な各型  $\beta$ -lactamase を産生する菌株を, 200 ml の L-broth 中で 37°C, 4~5 時間振盪培養し対数増殖期後期 (濁度: 150 KLETT 単位) の細胞を集めた。既報<sup>2)</sup>のごとく音波破碎と超遠心で  $\beta$ -lactamase 粗酵素液を調製した。imipenem の一時阻害効果は, PCase 型酵素には ABPC を, CEPase 型酵素に対しては CER を基質とし, 濃度の異なる imipenem を加えて, phenol red を指示薬とする酸滴定法 (acidometry<sup>3),4)</sup>) により Ki 値として算出した。光電比色計はダブルビーム差スペクトル高感度自記分光光度計 (ユニオン SM 401 型) を使用した。

#### 4. $\beta$ -Lactamase 永久不活化作用

Imipenem の各種  $\beta$ -lactamase 不活化作用は、希釈法 (FISHER ら<sup>5)</sup>) 及び等電点電気泳動法 (著者ら<sup>2)</sup>) により検討した。

希釈法は約 100 単位/0.1 ml の  $\beta$ -lactamase 粗酵素液と、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 1~10  $\mu$ g/0.1 ml になるように溶かした imipenem をマイクロチューブ中で混合し、30°C 50 分間保温した後、基質溶液 (Ia と Ic 型  $\beta$ -lactamase には CER, その他の PCase には ABPC) で 200 倍にうすめ、さらに 30°C 30 分間反応させた後、残存酵素活性で破壊された基質量を macroiodo 法で測定した。

等電点電気泳動法は、各種  $\beta$ -lactamase に  $K_i$  値の 10 倍濃度の imipenem を加え、30°C 50 分間処理した後、MATTHEW ら<sup>6)</sup>の方法に準じて pharmlite 加 9.7% acrylamide 平板ゲル上で電気泳動を行ない、ただちに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした nitrocefin を噴霧し、残存  $\beta$ -lactamase 活性によって生ずる赤紫のスポットをポラロイドカメラで撮影した。

#### 5. ペニシリン結合蛋白に対する結合親和性

*S. aureus* 209 P, MRSA 108-1, *E. coli* CS 2(R<sup>-</sup>), *E. coli* CS 2(RK 1), *S. marcescens* 13, *P. aeruginosa* PAO-1 の PBP に対する imipenem の結合親和性は SPRATT<sup>7)</sup>の方法に準じた競合結合実験から行った。すなわち前報<sup>2)</sup>に記載した方法で遠心分画した膜画分に 0.1~12.5  $\mu$ g/ml の非放射性 imipenem 又は cefmenoxime (CMX) を加え 30°C 10 分間反応させた後、0.1 mM の <sup>14</sup>C-PCG (AMERSHAM : 373  $\mu$ g/50  $\mu$ Ci/ml) を加えさらに 30°C 10 分間反応させて、8~10% acrylamide 平板ゲル電気泳動を行なった。ゲルに増感剤をしみこませた後乾燥し、KODAK X-Omat レントゲンフィルムに密着し -80°C 20 日間感光させて蛍光オートラジオグラフィを行なった。

#### 6. Imipenem と血清補体との協力的殺菌作用

*E. coli* CS 2(RE 28) を 10 ml の L-broth で 37°C 一夜振盪培養した。これを新鮮 L-broth で 1 万倍に希釈し 5 ml ずつ中試験管に分注した。3 本一組とし、その 1 本に imipenem 50% 増殖阻止濃度を加え、次の 1 本に 20% ヒト血清及び 0.75 units/ml のモルモット補体を、最後の 1 本に上記の濃度の imipenem 及び血清と補体を加えた。37°C で振盪培養を行ない、培養開始後 1, 3, 5 及び 24 時間後の生菌数を測定した。

#### 7. Imipenem と M $\phi$ の協力的食菌殺菌作用

M $\phi$  は、ICR  $\delta$  マウスの腹腔内を 8 ml の 10% fetal calf serum 加 F 12 培地 (日水製薬) で洗って採取し、遠心後同培地 5 ml 中に浮遊した。その 0.1 ml (約 10<sup>4</sup> cells) をカバースリップを沈めた FALCON multidish の

各 well に分注し、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 30 分静置後同培地を 1 ml ずつ追加し一夜培養した。翌日浮遊細胞を含んだ培地を除き、20% L-CM (conditioned medium of L-929)<sup>8)</sup> 加同培地 1 ml と交換した。これを 37°C 2 時間 CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、一夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を M $\phi$  の 50 倍量 (5 $\times$ 10<sup>5</sup> cfu) 接種した。一部の区画には imipenem を 1~1/8 MIC 添加した。薬剤添加後 4 時間目にカバースリップを取り出し、saline G で軽く洗った後ギムザ染色して顕像を調べた。

#### 8. Imipenem のマウス脳及び腎ホモジネートに対する安定性

ICR  $\delta$  マウス (7 週齢) から腎及び脳を摘出し、saline G (pH 7.0) に浮かべてテフロンホモジナイザーを使用し、それぞれ 40% ホモジネートを作った。それぞれのホモジネートに imipenem を 5~250  $\mu$ g/ml になるように加え、37°C 60 分反応させた後、残存 imipenem 量を disk 法で調べた。

## II. 成績

### 1. 臨床分離株に対する imipenem の抗菌力

Imipenem は Fig. 1 に示すとおり、PCase 産生の有無にかかわらず *S. aureus* には強い抗菌力を示し、全株 0.1  $\mu$ g/ml 以下で増殖が阻止された。MRSA に対しても Fig. 2 のとおり、優れた抗菌力を持つがその一部は中等度耐性を示す。*S. pneumoniae* 及び  $\beta$ 型 streptococci に対しても CTX などよりも強い抗菌力を示した (Fig. 3, 4)。種々の R 因子を持つ *E. coli* に対しても Fig. 5 のような抗菌力を示し、すべて 0.78  $\mu$ g/ml 以下で増殖が阻止された。Fig. 6 のとおり *K. pneumoniae* に対する抗菌力も ceftazidime (CAZ) と同程度に強い。*P. mirabilis* 50 株に対しては CTX よりも抗菌力はやや弱く、Fig. 7 のとおりである。Fig. 8 に示すとおり *P. vulgaris* に対する抗菌力もあまり強くない。Fig. 9 のとおり *C. freundii* には感受性株では抗菌力が CTX に劣るが、耐性株が他の薬剤と異なって見られず、全株とも 3.13  $\mu$ g/ml で増殖が阻止された。*E. cloacae* 及び *S. marcescens* に対する抗菌力も良好で 50 株の *S. marcescens* は 0.78  $\mu$ g/ml で、45 株の *E. cloacae* は、3.13  $\mu$ g/ml で全株阻止された (Fig. 10, 11)。*P. aeruginosa* に対しては CPZ と同程度の抗菌力を持ち、Fig. 12 のとおり CAZ には劣った。*P. cepacia* に対しては CTX と同程度であったが (Fig. 13), Fig. 14 のとおり *P. maltophilia* には抗菌力が弱い。*A. calcoaceticus* には他薬剤より強い抗菌力を示し、全株 0.39  $\mu$ g/ml で増殖が阻止された (Fig. 15)。ABPC 耐性 *H. influenzae* にも抗菌力を持つが Fig. 16 のとおり CTX 等よりはかなり劣る。

Fig. 1 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *S. aureus* to imipenem and other cephalosporins

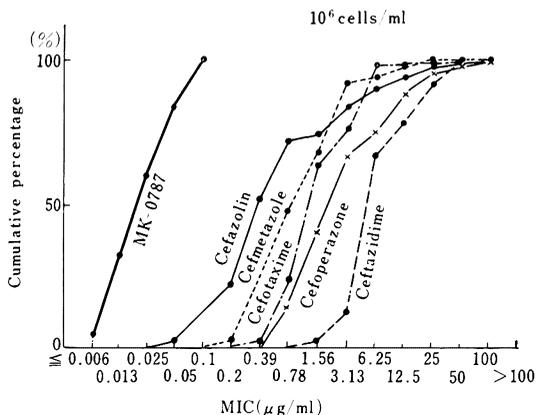


Fig. 2 Cumulative sensitivities of 58 clinical isolates of MRSA to imipenem and other cephalosporins

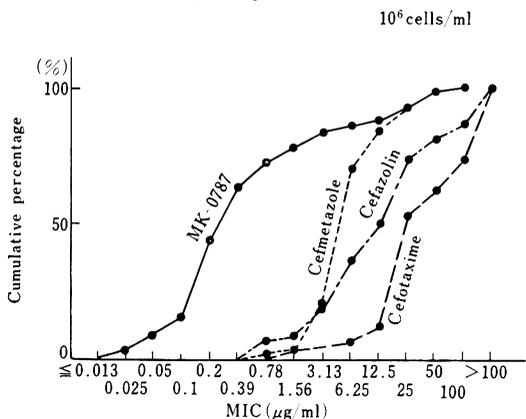


Fig. 3 Cumulative sensitivities of 27 clinical isolates of *S. pneumoniae* to imipenem and other cephalosporins

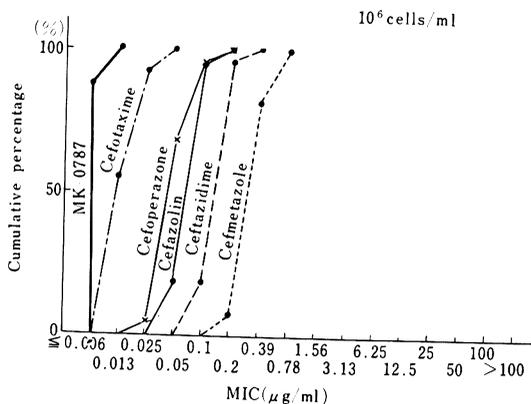


Fig. 4 Cumulative sensitivities of 24 clinical isolates of  $\beta$ -streptococci to imipenem and other cephalosporins

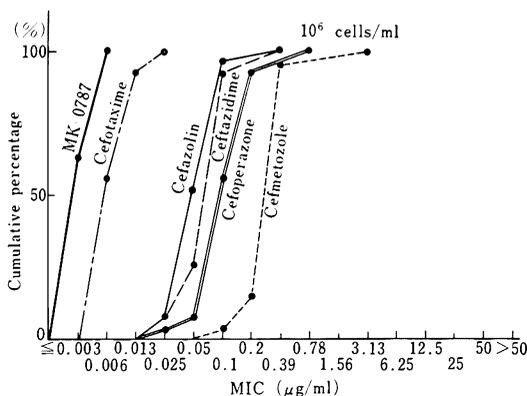


Fig. 5 Cumulative sensitivities of 52 subclones of *E. coli* carrying various R (*bla*) plasmids to imipenem and other cephalosporins

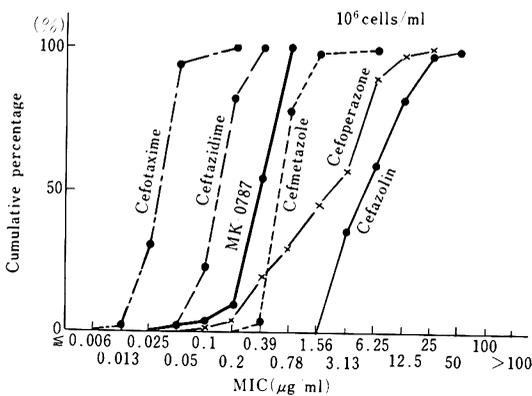


Fig. 6 Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *K. pneumoniae* to imipenem and other cephalosporins

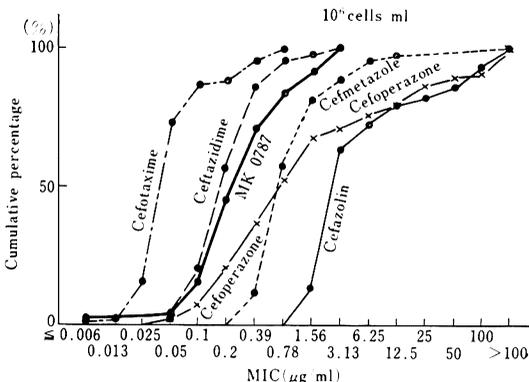


Fig. 7 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. mirabilis* to imipenem and other cephalosporins

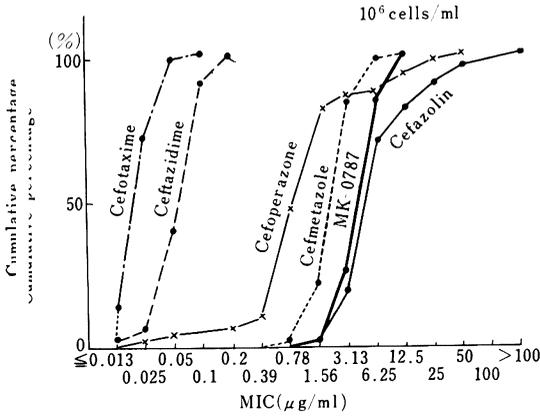


Fig. 8 Cumulative sensitivities of 41 clinical isolates of *P. vulgaris* to imipenem and other cephalosporins

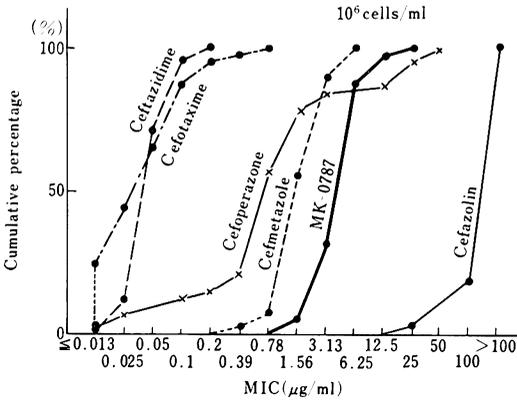


Fig. 9 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *C. freundii* to imipenem and other cephalosporins

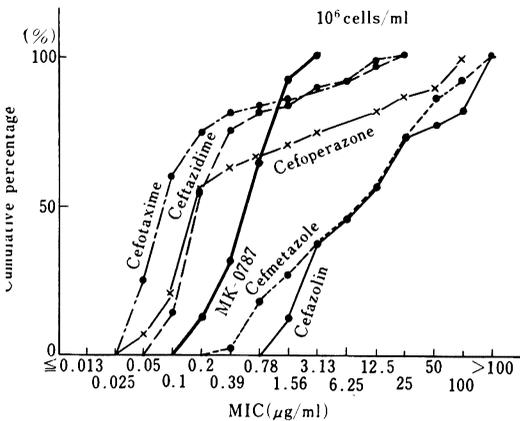


Fig. 10 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *S. marcescens* to imipenem and other cephalosporins

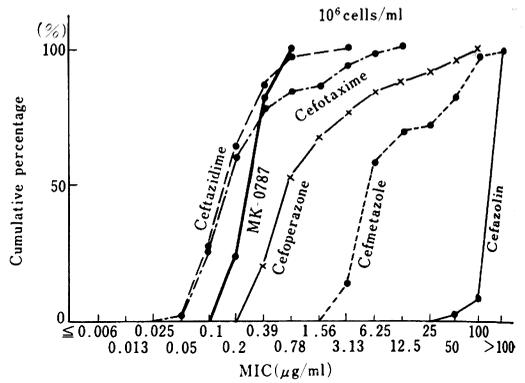


Fig. 11 Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to imipenem and other cephalosporins

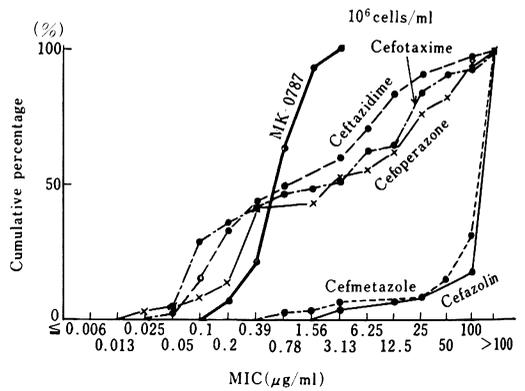


Fig. 12 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to imipenem and other cephalosporins

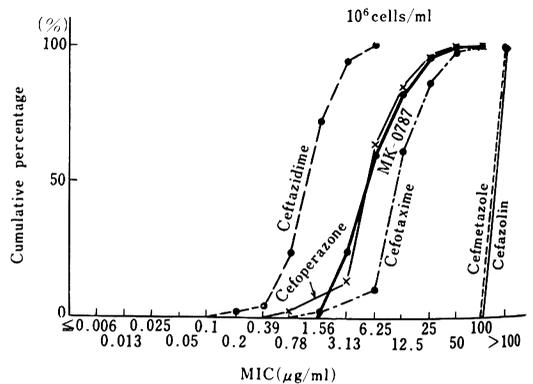


Fig. 13 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *P. cepacia* to imipenem and other cephalosporins

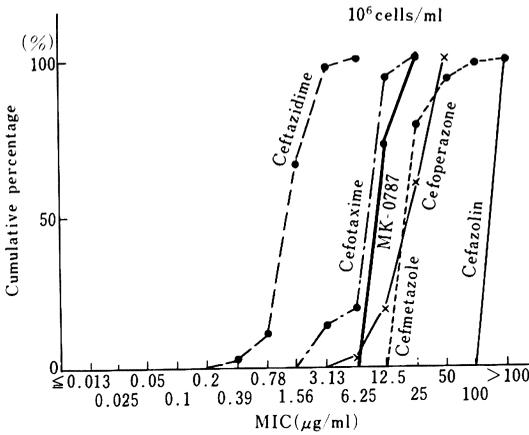


Fig. 14 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *P. maltophilia* to imipenem and other cephalosporins

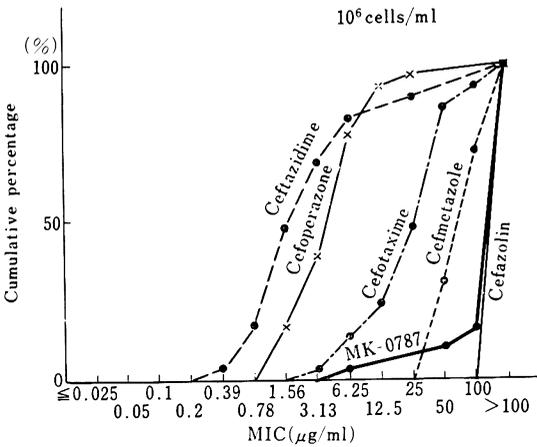


Fig. 15 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to imipenem and other cephalosporins

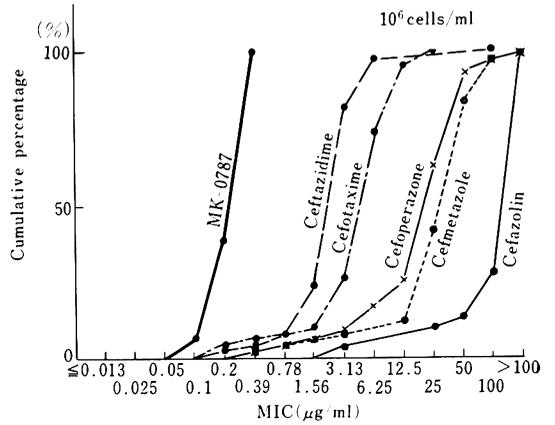


Fig. 16 Cumulative sensitivities of 25 clinical isolates of *H. influenzae* resistant to ABPC to imipenem and other cephalosporins

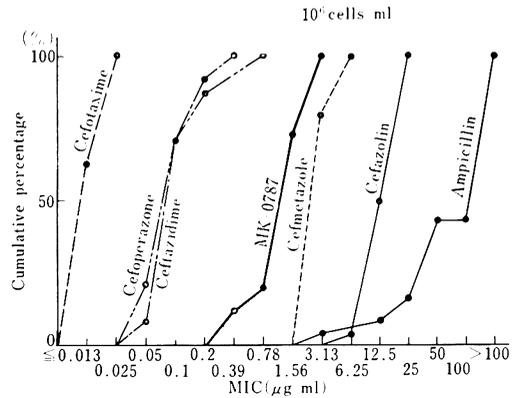


Table 1 Affinities of  $\beta$  lactamase-inhibitors to various  $\beta$  lactamases

$\beta$ -lactamase			Ki ( $\mu$ M)				
RICHMOND	MITSUHASHI & YAMAGISHI	Source	SBT	CVA	MCIPC	MFIPC	MK-0787
I a	CEPase	<i>E. cloacae</i> Nek 39	78.3	496	$0.89 \times 10^{-3}$	$0.70 \times 10^{-3}$	0.14
I c	CEPase	<i>P. vulgaris</i> 33	1.52	0.53	1.21	0.70	0.16
II		<i>P. mirabilis</i> JY10	0.41	0.089	45.8	43.5	8.47
III	PCase I	<i>E. coli</i> CSH2 (RK1)	0.69	0.30	20.8	12.7	2.30
IV		<i>Klebsiella</i> 42	0.96	0.26	17.5	8.53	1.38
V	PCase II	<i>E. coli</i> CSH2 (RE45)	32.8	12.5	ND	ND	4.13

Fig. 17 Isoelectric focusing of the Ia-type cephalosporinase pretreated with  $\beta$ -lactamase inhibitors

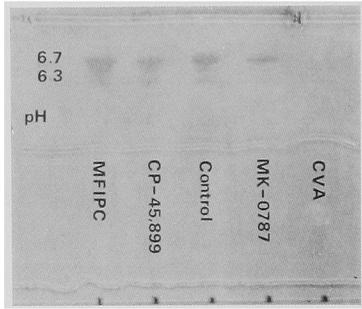


Fig. 18 Percentage inactivation of the type-Ic  $\beta$ -lactamase by  $\beta$ -lactamase inhibitors (dilution method)

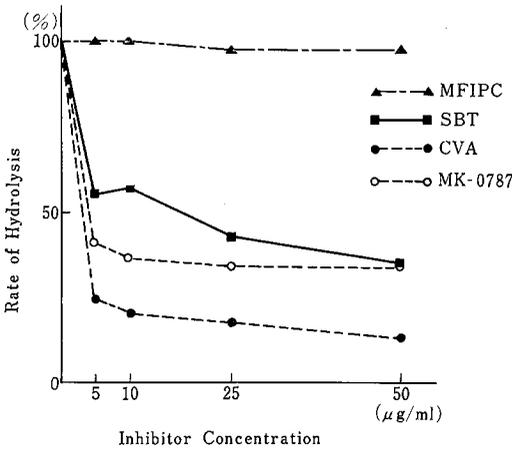


Fig. 19 Isoelectric focusing of the II-type penicillinase pretreated with  $\beta$ -lactamase inhibitors

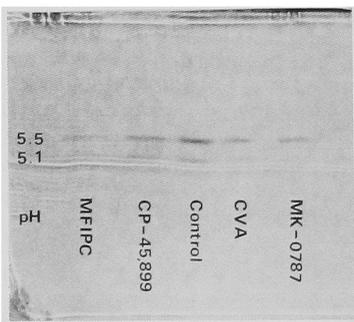


Fig. 20 Percent inactivation of the type-III (TEM)  $\beta$ -lactamase by  $\beta$ -lactamase inhibitors (dilution method)

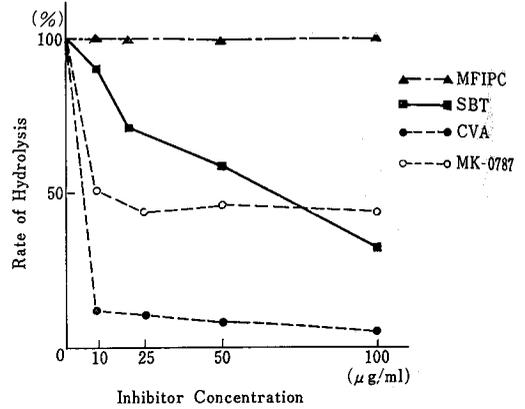


Fig. 21 Isoelectric focusing of the IV-type penicillinase pretreated with  $\beta$ -lactamase inhibitors

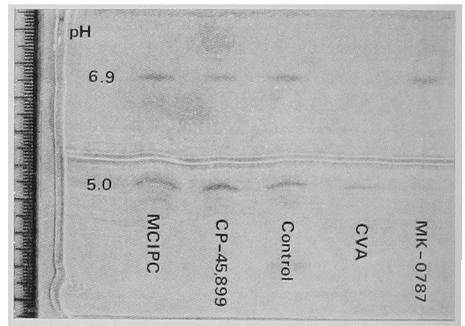
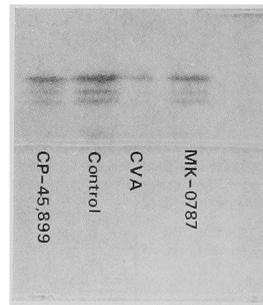


Fig. 22 Isoelectric focusing of the V-type penicillinase pretreated with  $\beta$ -lactamase inhibitors



2  $\beta$ -Lactamase 一時阻害作用

Imipenem は Table 1 のとおり PCase 型にも CEPase 型にも平均して小さい  $K_i$  値を示した。これは clavulanic acid(CVA) や sulbactam(SBT) が Ia 型 CEPase 及び V 型 PCase にかなり大きな  $K_i$  値を示すのと対

Fig. 23 Competition of imipenem (MK-0787) and cefmenoxime (CMX) for penicillin-binding proteins of *S. aureus* 209P (sensitive)

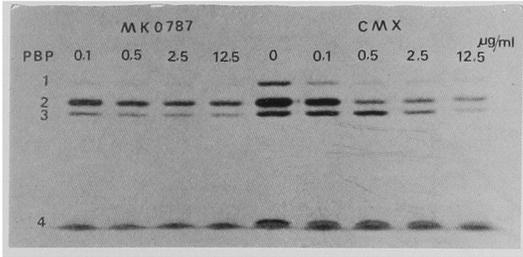


Fig. 27 Competition of imipenem (MK-0787) and cefmenoxime (CMX) for penicillin-binding proteins of *P. vulgaris* 33

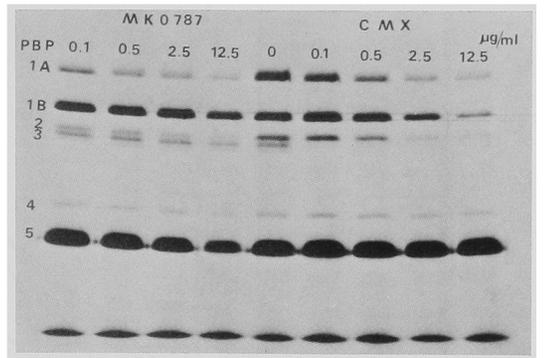


Fig. 24 Competition of imipenem(MK-0787)and cefmenoxime(CMX) for penicillin-binding proteins of *S. aureus* 108-1 (MRSA)

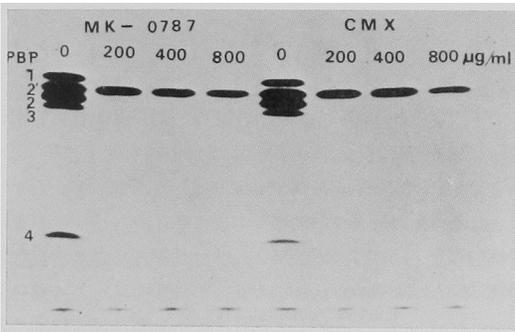


Fig. 28 Competition of imipenem (MK-0787) and cefmenoxime (CMX) for penicillin-binding proteins of *S. marcescens* 13

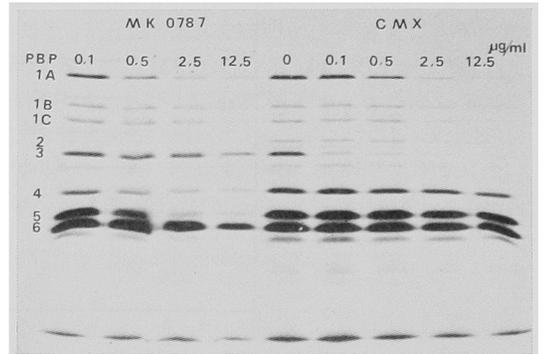


Fig. 25 Competition of imipenem (MK-0787 and PS-5 for penicillin-binding proteins of *E. coli* NIHJ-JC2

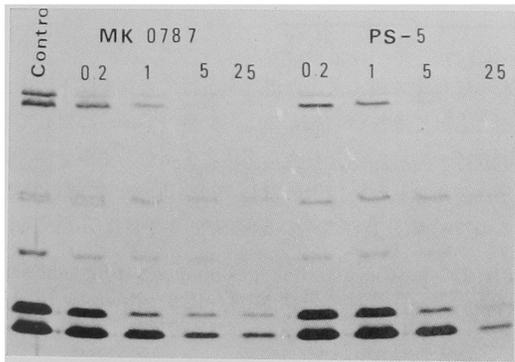


Fig. 29. Competition of imipenem (MK-0787) and cefmenoxime (CMX) for penicillin-binding-proteins of *P. aeruginosa* PAO-1

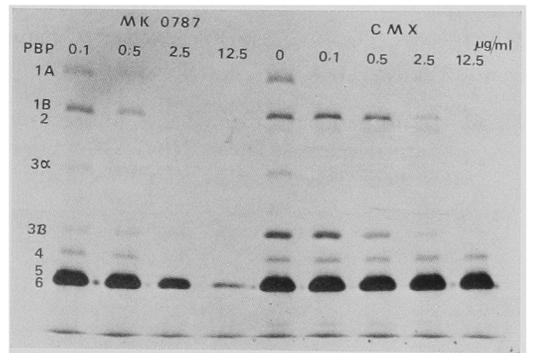
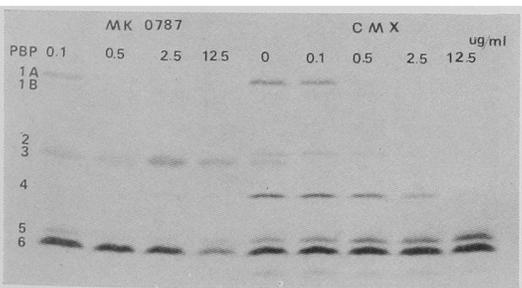


Fig. 26 Competition of imipenem (MK-0787) and cefmenoxime (CMX) for penicillin-binding-proteins of *E. coil* CS2 carrying RK1 (*bla*) plasmid

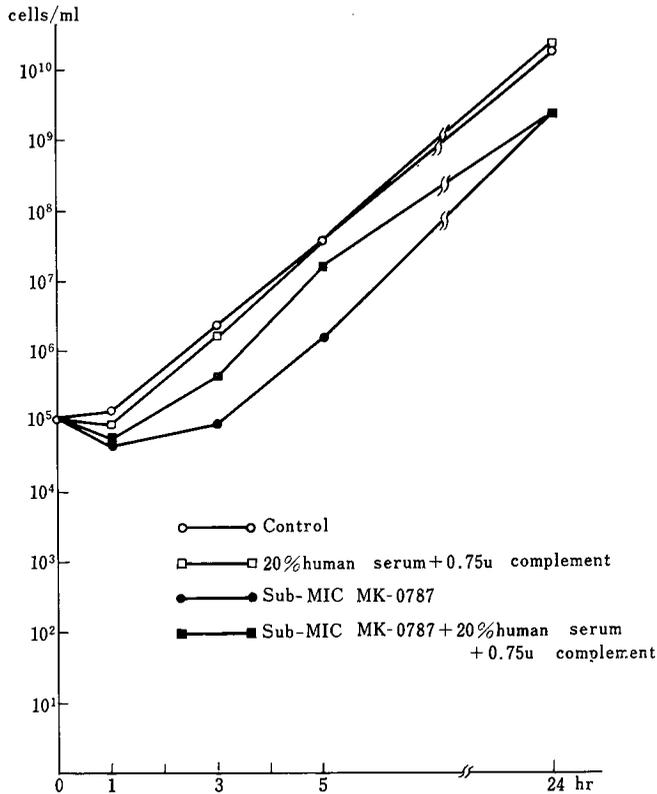


照的である。

### 3. Imipenem の $\beta$ -lactamase 永久不活化作用

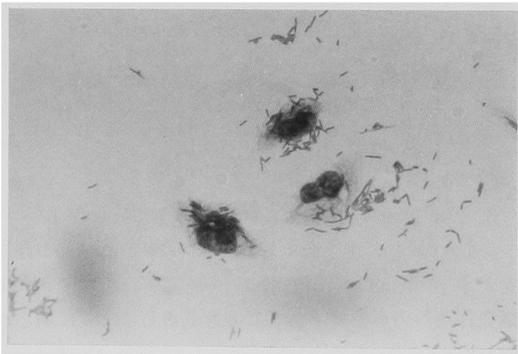
$\beta$ -Lactamase 産生菌に対し ABPC 等と強い協力作用を示す  $\beta$ -lactamase 阻害剤は、一時阻害作用より永久不活化作用の方が重要であることを著者らはすでに明らかにした<sup>2)</sup>。

Fig. 30 Influence of subMIC imipenem (MK-0787 : 0.14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* CS2 (RE 28)



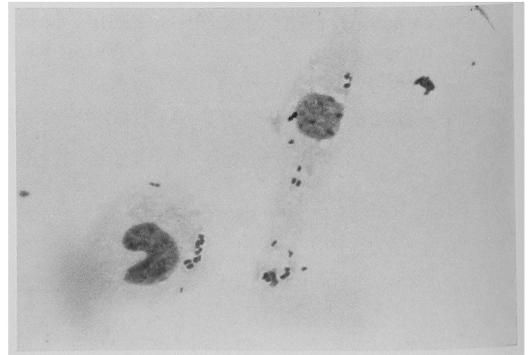
Imipenem は Fig. 17 のとおり, Ia 型酵素の副画分をほぼ完全に不活化する。Ic 型に対する不活化力は CVA より若干劣るものの, Fig. 18 のとおり SBT より強い。II 型酵素に対しては, imipenem は CVA と同程度の不活化力を示す (Fig. 19)。III 型 PCase に対する imipenem の不活化力は特徴的で, 低濃度で酵素活性の 50%

Fig. 31 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ-JC 2 grown without drugs, at 5 hr after infection



を不活化するが, あとは濃度を上げてても完全に不活化することはできない (Fig. 20)。IV 型 PCase に対しても imipenem は副画分を強く不活化するが, 主画分の不活化は認められない (Fig. 21)。V 型 PCase に対しては, 1 つの主画分及び 2 つの副画分を中等度に不活化し,

Fig. 32 Mouse macrophages phagocytizing spherical cells of *E. coli* NIHJ-JC 2 grown with 1/2 MIC of imipenem (MK-0787), at 5 hr after infection



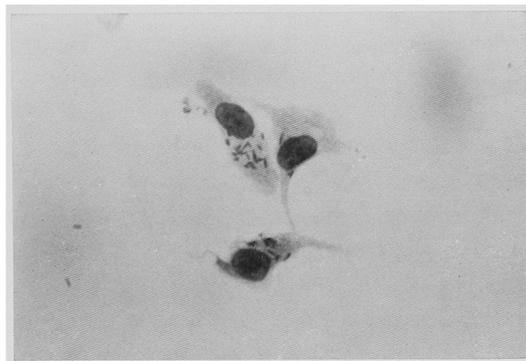
SBT と同程度の力で、CVA にはかなり劣る (Fig. 22)。

4. ペニシリン結合蛋白に対する親和性

Fig. 23 のとおり imipenem は、*S. aureus* 209 P の PBP 3 に強く、続いて 2 に結合親和性を示す。CMX が 2 に強く続いて 3 に強い結合親和性を示すのと対照的である。Fig. 24 にあげたとおり、imipenem は MRSA 特有の PBP 2' に対する親和性はあまり強くない。MRSA にも相当程度の抗菌力を残す  $\beta$ -lactam 薬剤は PBP 2' への結合親和性は他のものより強いことが多いが、imipenem は MRSA に相当程度の抗菌力を示すにもかかわらず、PBP 2' への結合親和性がそれほど高くないのは、どのような理由によるのか今後の検討が必要であろう。

*E. coli* の PBP に対しては Fig. 25 のとおり、2, 1a, 3 の順に結合親和性が高い。R 因子を持つ *E. coli* CS 2 (RK 1) の PBP は、膜画分に残る  $\beta$ -lactamase で  $^{14}\text{C}$ -PCG が若干壊されるため、薬剤無添加時にも放射性バンドはうすくなるが、imipenem 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で PBP 3 を除きほぼ完全に飽和される (Fig. 26)。PBP 4 が 3 より低濃度で飽和されることは、CMX が PBP 4 との親和性が低いことから考えて、imipenem の  $\beta$ -lactamase 不活化作用と何か関係があるかもしれない。*S. marcescens*

Fig. 33 Mouse macrophages phagocytizing short cells of *E. coli* NIHJ-JC2 grown with 1/8 MIC of imipenem (MK-0787), at 5 hr after infection



の PBP に対しては、各画分に対して CMX の若干強い結合親和性を示した (Fig. 27)。この菌でも PBP 4 に対する結合親和性が CMX に比べ著明に高い。*P. vulgaris* の結合親和性は、PBP 1b, 2 及び 3 において CMX に劣り、この薬剤が CMX 等より *Proteus* 属の菌に対する抗菌力の弱いことを反映している (Fig. 28)。Fig. 29 のとおり *P. aeruginosa* の PBP に対しては、CMX より強い親和性を示し、この薬剤の持つ抗緑膿菌

Table 2 Destruction of imipenem(MK-0787) by tissue homogenates of the kidney and the brain of mice.

Conc. of MK-0787	Tissues	% of homogenate*	Residual % of MK-0787	
250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kidney	30	6.44	
	Brain	30	99.2	
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kidney	30	5.08	
		20	7.40	
		10	26.2	
		5	48.6	
	Brain	30	103.0	
		20	96.2	
		10	114.0	
		5	107.0	
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kidney	20	2.24	
		10	10.4	
		5	27.2	
	Brain	20	83.8	
		10	89.8	
		5	92.8	
		Control	BSA**	4
	Saline G		—	92.8

\* 40% homogenate of the kidney : 54.4 mg protein/ml ; 40% homogenate of the brain : 37mg protein/ml.

\*\*BSA : bovine serum albumin.

作用は、作用点における働きが CMX より優るためであることがわかる。

#### 5. Imipenem と血清補体との協力的作用

R 因子を保有する *E. coli* CS 2(RE 28) について補体と imipenem の協力的殺菌作用を検討した。Fig. 30 に示すとおり菌の増殖に影響しない最高濃度の補体, 0.75 units/ml と 50% 増殖阻止濃度の imipenem, 0.14  $\mu$ g/ml とを共存させると、血清及び補体の存在がむしろ拮抗的に働いた。

#### 6. マウス培養 M $\phi$ と imipenem の協力的食菌作用

Imipenem は PBP 2, 1a, 1b の順に強く抑えるので、cephem の場合と異なり菌体はフィラメント化せずむしろ球形に変わる。培養した M $\phi$  に *E. coli* を感染させると Fig. 31 のとおり、感染後 5 時間目には食菌された菌は細胞内で増殖し、細胞を破壊して外に遊出する。Imipenem 1~1/8 MIC 存在下では球形化した菌は、Fig. 32 及び 33 のごとくよく食菌され細胞内で消化されて、M $\phi$  は健康のままとどまる。

#### 7. Imipenem のマウス脳及び腎ホモジネートに対する安定性

Imipenem は Table 2 に示すとおり 5~30% マウス腎ホモジネートと接触させると、37°C 60 分の保温で 51.4~97.3% が破壊され、残存率はわずかになる。これに対し 5~30% の脳ホモジネートではほとんど水解されず、薬剤を生理食塩水又は 4% bovine serum albumine 中に保温した場合と大差がない。これは少なくともマウスの脳組織には dipeptidase 活性はほとんど認められないことを示している。

### III. 考 察

Imipenem はブドウ球菌を含むグラム陽性菌から緑膿菌を含むグラム陰性菌にわたり、広い抗菌域を持つのみならず、*S. aureus*, *S. pneumoniae* 及び  $\beta$ -streptococci では既存の cephem よりはもちろんのこと、PC に優るとも劣らぬ強い抗菌力を示す。又グラム陰性菌では、CTX 等いわゆる第三世代 cephem 系抗生物質よりは感受性株に対して抗菌力が劣るものの、ほとんど耐性菌が見られず、その特徴は第三世代 cephem 系抗生物質にも耐性菌の多い *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* 等で顕著である。しかし *Proteus* 属の菌に対する imipenem の抗菌力は中等度にとどまる。*P. aeruginosa* と *P. cepacia* に対しては、CPZ と同程度の抗菌力で CAZ に劣る。しかし *P. maltophilia* には抗菌力が極めて弱い。*A. calcoaceticus* に対する imipenem の抗菌力は、SBT と並んで既知の  $\beta$ -lactam 薬剤の中では最も強い。

各種細菌に imipenem に対する耐性株が認められないのは、各種  $\beta$ -lactamase を PCase 型、CESase 型を

問わず本薬剤が不活化するためである。Imipenem の  $\beta$ -lactamase 不活化作用は、各種  $\beta$ -lactamase のすべてのアイソザイムを不活化するわけではないので、Ia 型、III 型等では本薬剤の作用を受けても酵素活性の 50% 程度は残存する。しかし各種細菌において耐性株が少なくなことは事実である。

グラム陰性桿菌の PBP のうち imipenem は菌の形態に関係する PBP 2, 細胞伸長時のムレイン架橋に必要な PBP 1a 及び 1b を強く抑えるので、桿菌は球形化し一部バルジを形成して破裂殺菌される。隔壁合成を強く抑え菌体をフィラメント化する cephem 系抗生物質と対照的である。Imipenem が *Proteus* 属の菌に抗菌力が弱いのは、その PBP に対する親和性が低いためであることがわかった。

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌の PBP に対しては、その必須の画分 PBP 2 及び 3 のうち PBP 3 に対する親和性がより強い。この点も PBP 2 をより強く抑えるものの多い cephem 系抗生物質と異なる特徴である。しかしブドウ球菌でどちらの PBP をより強く抑える方が殺菌力が強いのかはわからない。Imipenem は MRSA 特有の PBP 2' への結合親和性がそれほど高くないのに、MRSA になお相当程度の抗菌力を示す。なぜこのような現象が見られるかは明らかでない。

Imipenem と補体の協力的殺菌効果は認められないが、M $\phi$  とは著明な協力的作用を示し 1/8 MIC の imipenem 存在下でも M $\phi$  は *E. coli* をよく食菌消化する。以上の現象が、この薬剤の臨床効果とどのように結びつくか興味深い。

Imipenem の臨床適用にあたっては、dipeptidase 阻害剤の cilastatin sodium が併用される。人体の酵素活性を抑制する点が安全性の面から検討されるべきであるが、我々の実験から少なくともマウス脳組織には dipeptidase 活性がほとんど認められないことがわかった。したがって cilastatin sodium の中枢神経に対する影響は、dihydropeptidase の面から見る限りそれほど強くないであろう。

本研究から imipenem は超広域スペクトルを持つ殺菌性の優れた  $\beta$ -lactam 系抗生物質であることが確認された。しかも各種  $\beta$ -lactamase を不活化する力を併せ持つので耐性株が少ない。この薬剤の安全性が確立されたなら、優れた広域化学療法剤となるであろう。

### 文 献

- 1) LEANZA, W. J.; K. J. WILDONGER, T. W. MILLER & B. G. CHRISTENZEN: *N*-Acetimidoyl-and *N*-formimidoyl thienamycin derivatives: Antipseudomonal antibiotics. *J. Med. Chem.* 22: 1435~1436, 1979

- 2) 横田 健, 関口玲子, 東 映子, 鈴木映子: Sulbactam の各種  $\beta$ -lactamase 不活化作用とペニシリン結合蛋白に対する親和性。Chemotherapy 23 (S-4):11~19, 1984
- 3) RUBIN, F. A. & D. F. SMITH: Characterization of R factor  $\beta$ -lactamase by the acidometric method. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 68~73, 1973
- 4) 横田 健:  $\beta$ -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。モダンメディア 24: 360~377, 1978
- 5) FISHER, J.; R. C. CHARNAS & J. R. KNOWLES: Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* R TEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. Biochemistry 17: 2180~2184, 1978
- 6) MATTHEN, M. & A. M. HARRIS: The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. J. Gen. Microbiol. 88: 169~198, 1978
- 7) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 2999~3003, 1975
- 8) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA: Inhibition by glucocorticoids and choeragen of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (Hormonal control of macrophage growth). Cell. Physiol. 100: 351~364, 1979

## IMIPENEM: ITS IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY, INACTIVATION OF $\beta$ -LACTAMASES, AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS (PBP) OF BACTERIA. AND ITS STABILITY TO HOMOGENATES OF THE KIDNEY AND THE BRAIN OF MICE.

TAKESHI YOKOTA, EIKO MARUYAMA, EIKO SUZUKI, KYOKO ARAI and NAOYO KATO  
Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo 113

Eithy percent minimum growth inhibitory concentrations(MIC<sub>50</sub>) of imipenem (MK-0787) for 24-58 clinical isolates of *S. aureus*, *S. aureus*(MRSA), *S. pneumoniae*,  $\beta$ -streptococci, *E. coli*(R<sup>+</sup>), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, and ABPC-resistant *H. influenzae* were 0.05, 12.5,  $\geq$ 0.006, 0.006, 0.78, 0.78, 6.25, 6.25, 1.56, 0.39, 12.5, 12.5, 100., 0.39, and 1.56  $\mu$ g/ml, respectively. Imipenem not only possessed small Ki values against types Ia, Ic, II, III(TEM), IV, and V  $\beta$ -lactamases, but also inactivated those  $\beta$ -lactamases with relatively low concentrations. Imipenem showed strong binding affinity to penicillin-binding proteins(PBPs), site of action of  $\beta$ -lactam antibiotics, fractions 2, 1a, and 1b, resulting in a morphological change of bacilli to spherical cells in the presence of this antibiotic. Synergy of imipenem and the serum complement for bactericidal effect was not prominent, although this antibiotic manifested a good synergy of bactericidal effect with cultured mouse macrophages against *E. coli*. Since imipenem was not destroyed by the tissue homogenate of the mouse brain homogenate under the condition where the antibiotic was destructed by the kidney homogenate, the activity of dipeptidase in the brain is negligible, suggesting that the influence of cilastatin on the brain may not be strong.