

## マウス実験的感染症に対する Imipenem (MK-0787) および Cilastatin sodium (MK-0791) 併用剤の治療効果

中村 和則・尾花 芳樹・西野 武志・谷野 輝雄

京都薬科大学微生物学教室

マウス実験的感染症モデルに対する imipenem (MK-0787) と cilastatin sodium (MK-0791) の併用剤の治療効果について, cefotiam (CTM), ceftizoxime (CZX), cefoperazone (CPZ), piperacillin (PIPC), cefsulodin (CFS) および gentamicin (GM) を比較薬剤として検討を行った。

実験的腹腔内感染症に対する併用剤の効果について検討したところ, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* では, それぞれ比較薬剤として用いた CTM, CZX, CPZ, CFS および GM よりも優れた結果が得られた。*Escherichia coli*, *Serratia marcescens* では, CTM とほぼ同等あるいは優れていたが, CZX より劣っていた。また, GM あるいは  $\beta$ -lactam 剤耐性 *P. aeruginosa* に対して併用剤は交叉耐性を示さず, 良好な治療効果を示した。

実験的尿路感染モデルにおいて, *E. coli* では併用剤は CPZ, CZX とほぼ同等の効果を示した。*A. calcoaceticus* では併用剤は CPZ, CZX, PIPC より優れ, CFS と同等であったが, GM より劣っていた。

*Klebsiella pneumoniae* DT-S 株を用いた実験的呼吸器感染症モデルについては, 併用剤の効果は, PIPC および CPZ より優れていたが, CZX より劣っていた。

Imipenem (MK-0787) は, 腎尿細管上皮にある renal dipeptidase (dehydropeptidase-I E. C. 3. 4. 13. 11) により,  $\beta$ -lactam 環が水解され抗菌力を失うことが知られている<sup>1)</sup>。Cilastatin sodium (MK-0791) は, 米国メルク社が, renal dipeptidase を選択的かつ可逆的に阻害する目的で合成された物質であり, 単独での抗菌活性はない。化学名は, Z-S-[6-Carboxy-6-[[ (2, 2-dimethyl-(S)-cyclopropyl) carbonyl] amino]-5-hexenyl]-L-cysteine monosodium salt で, 分子式  $C_{16}H_{25}N_2O_5SNa$  ; 分子量 380. 43 の白色または黄白色の粉末であり, 構造式を Fig. 1 に示した。

Imipenem と cilastatin sodium を重量比 1:1 で

混合することにより, imipenem の尿中回収率を高めたり, 腎毒性を軽減することができると報告されている<sup>2)</sup>。

今回, 我々は, マウス実験的腹腔内感染症および局所感染症に対する imipenem, cilastatin sodium 併用剤の治療効果について, ceftizoxime, cefotiam, cefsulodin, cefoperazone, piperacillin, gentamicin を比較薬剤として検討したので報告する。

### I. 実験材料および実験方法

#### 1. 使用菌株

*Staphylococcus aureus* Smith, *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* DT-S, *Serratia marcescens* T-55, *Pseudomonas aeruginosa* 15846, *P. aeruginosa* TP-5, *P. aeruginosa* K-13, *Acinetobacter calcoaceticus* AC-54 を使用した。

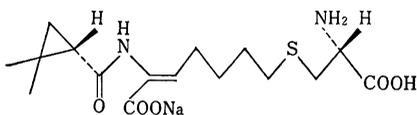
#### 2. 使用薬物

Imipenem (MK-0787), cilastatin sodium (MK-0791), cefoperazone (CPZ), cefsulodin (CFS), cefotiam (CTM), ceftizoxime (CZX), piperacillin (PIPC) および gentamicin (GM) のいずれも力価の明らかな標準品を使用した。

#### 3. 使用動物

腹腔内および呼吸器感染症実験には, Std-ddY 系雄マウス (4 週齢 17~18 g) を, 尿路感染実験には, 同系雌マウス (5 週齢 18~20 g) を使用した。

Fig. 1 Cilastatin sodium (MK-0791)



Molecular formula :  $C_{16}H_{25}N_2O_5SNa$

Molecular weight : 380.43

## 4. 感受性測定法

感染実験に使用した5菌種8菌株の各薬物に対する感受性は、日本化学療法学会感受性測定法<sup>3)</sup>に準じて測定した。

## 5. 実験的腹腔内感染症

*S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14, *S. marcescens* T-55, *P. aeruginosa* 15846, *P. aeruginosa* TP-5, *P. aeruginosa* K-13, *A. calcoaceticus* AC-54 を nutrient broth (NB: Nissui) で 37°C 18 時間培養後、同培地で希釈し 6% hog gastric mucin (Orthana Kemisk Fabrik A/S) と等量混合した。この菌液を1群10匹のマウスの腹腔内に接種し、感染2時間後に薬物を皮下投与した。判定は、7日間生死観察を行ない、LITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>4)</sup>により ED<sub>50</sub> 値を算出した。

## 6. 実験的上行性尿路感染症

*E. coli* KC-14, *P. aeruginosa* 15846 および *A. calcoaceticus* AC-54 を NB で 37°C 18 時間培養後、同培地で希釈し、既報<sup>5)</sup>のごとく経尿道的に接種し、腎盂腎炎を惹起させた。なお一群5匹とした。菌接種4時間後に、各薬物を皮下投与し、菌接種24時間後に腎臓を無菌的に摘出し、homogenize 後、生菌数を測定した。

## 7. 実験的呼吸器感染症

*K. pneumoniae* DT-S を、nutrient agar (NA: Nissui) で 37°C 18 時間表面培養後、NB に浮遊させ nebulizer を用いた松本らの方法<sup>6)</sup>により噴霧感染させた。噴

霧終了後 2, 5, 8 時間目あるいは 15, 18, 21 時間目のそれぞれ3回薬物を投与し、5日間生死観察を行い、LITCHFIELD-WILCOXON 法により、ED<sub>50</sub> 値を算出した。また噴霧終了15時間後に薬物を1回投与し、3, 6, 24 時間後に肺を無菌的に摘出し、homogenize 後、生菌数測定を行った。なお、生死観察は1群8匹、肺内菌数測定は、1群4匹とした。

## II. 実験結果

## 1. 感受性測定

Table 1 に使用菌株の MIC 値を示した。Cilastatin sodium は、抗菌力を示さず imipenem の抗菌力にも影響を与えなかった。

## 2. 実験的腹腔内感染症に対する治療効果

Table 2 に結果を示した。すなわち *S. aureus* Smith では、imipenem 単独、imipenem, cilastatin sodium 併用剤ともに、ED<sub>50</sub> 値は 0.004 mg/mouse であった。他薬剤との比較では、CZX より約 100 倍、CTM より約 20 倍優れており、MIC 値とほぼ相関していた。*E. coli* KC-14 では、imipenem 単独の ED<sub>50</sub> 値は、0.051 mg/mouse であり、併用により 0.017 mg/mouse となり、治療効果は上昇し、CTM とほぼ同量であったが CZX よりは劣っていた。*S. marcescens* T-55 では、併用剤の ED<sub>50</sub> 値は 0.24 mg/mouse であり、CZX の 0.016 mg/mouse より劣っていたが、CTM の 2.75 mg/mouse よりは優れていた。この結果は、MIC 値と良く

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of imipenem and various antibiotics

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MIC (μg/ml)							
		Imipenem	Imipenem/Cilastatin sodium	CTM	CZX	CPZ	PIPC	CFS	GM
<i>S. aureus</i> Smith	10 <sup>8</sup>	0.025	0.025	0.78	6.25	—	—	—	—
	10 <sup>6</sup>	0.013	0.013	0.39	3.13	—	—	—	—
<i>E. coli</i> KC-14	10 <sup>8</sup>	0.20	0.20	0.10	0.05	0.20	—	—	—
	10 <sup>6</sup>	0.10	0.10	0.05	0.025	0.10	—	—	—
<i>S. marcescens</i> T-55	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	12.5	0.20	—	—	—	—
	10 <sup>6</sup>	0.78	0.78	1.56	0.05	—	—	—	—
<i>A. calcoaceticus</i> AC-54	10 <sup>8</sup>	0.05	0.10	50	6.25	>100	>100	—	—
	10 <sup>6</sup>	0.05	0.05	50	3.13	>100	>100	—	—
<i>P. aeruginosa</i> 15846	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	—	—	6.25	—	3.13	3.13
	10 <sup>6</sup>	1.56	1.56	—	—	3.13	—	1.56	1.56
<i>P. aeruginosa</i> TP-5	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	—	—	25	—	50	6.25
	10 <sup>6</sup>	3.13	1.56	—	—	12.5	—	12.5	3.13
<i>P. aeruginosa</i> K-13	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	—	—	6.25	—	3.13	200
	10 <sup>6</sup>	1.56	1.56	—	—	3.13	—	0.78	50
<i>K. pneumoniae</i> DT-S	10 <sup>8</sup>	0.78	0.39	—	0.025	0.10	1.56	—	—
	10 <sup>6</sup>	0.10	0.20	—	0.006	0.05	0.78	—	—

(—): Not done

Table 2 Therapeutic efficacy of imipenem, imipenem/cilastatin sodium, CTM, CZX, CPZ, CFS and GM against experimental infection in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotic	ED <sub>50</sub> (mg/mouse) (95% confidence limits)	
<i>S. aureus</i> Smith	5.9×10 <sup>5</sup> (210 LD <sub>50</sub> )	Imipenem	0.00041	(0.00032-0.00052)
		Imipenem/Cilastatin	0.00040	(0.00024-0.00067)
		C Z X	0.050	(0.032-0.077)
		C T M	0.0078	(0.0048-0.013)
<i>E. coli</i> KC-14	1.3×10 <sup>6</sup> (173 LD <sub>50</sub> )	Imipenem	0.051	(0.036-0.072)
		Imipenem/Cilastatin	0.017	(0.012-0.025)
		C Z X	0.0018	(0.00012-0.0027)
		C T M	0.011	(0.007-0.017)
<i>S. marcescens</i> T-55	9.6×10 <sup>5</sup> (60 LD <sub>50</sub> )	Imipenem/Cilastatin	0.24	(0.16-0.37)
		C Z X	0.016	(0.008-0.031)
		C T M	2.75	(1.57-4.83)
<i>A. calcoaceticus</i> AC-54	1.9×10 <sup>6</sup> (111 LD <sub>50</sub> )	Imipenem/Cilastatin	0.0057	(0.0033-0.0098)
		C Z X	0.40	(0.21-0.77)
		C T M	6.8	
<i>P. aeruginosa</i> 15846	1.9×10 <sup>4</sup> (114 LD <sub>50</sub> )	Imipenem	0.017	(0.011-0.025)
		Imipenem/Cilastatin	0.010	(0.007-0.014)
		C P Z	4.0	(2.64-6.07)
		C F S	0.315	(0.193-0.513)
		G M	0.067	(0.039-0.115)
<i>P. aeruginosa</i> TP-5	1.2×10 <sup>7</sup> (29 LD <sub>50</sub> )	Imipenem/Cilastatin	0.014	(0.010-0.019)
		C P Z	16	
		C F S	16	
		G M	0.12	(0.08-0.18)
<i>P. aeruginosa</i> K-13	5.1×10 <sup>4</sup> (10 LD <sub>50</sub> )	Imipenem/Cilastatin	0.0078	(0.0043-0.0143)
		C P Z	4.2	(2.17-7.76)
		C F S	0.12	(0.07-0.20)
		G M	4	

相関していた。

*A. calcoaceticus* AC-54 では、併用剤の ED<sub>50</sub> 値は、0.0057 mg/mouse であり、CZ X の 0.4 mg/mouse および CTM の 6.8 mg/mouse に比べて明らかに優れた効果が得られ、MIC 値とほぼ相関していた。

*P. aeruginosa* 15846 では、MIC 値は比較薬剤とほぼ同等であったが、ED<sub>50</sub> 値は imipenem 単独で 0.017 mg/mouse、併用剤で 0.01 mg/mouse であり、CPZ の 4.0 mg/mouse、CFS の 0.315 mg/mouse および GM の 0.067 mg/mouse に比べて優れていた。

*P. aeruginosa* TP-5 は、β-lactam 剤耐性株であるが、併用剤の ED<sub>50</sub> 値は、0.014 mg/mouse であり、耐性株にも有効であり、その効果は、GM の 0.12 mg/mouse より優れていた。

*P. aeruginosa* K-13 は、GM 耐性株であるが、併用剤の MIC 値は、CPZ や CFS とほぼ同等であり、その ED<sub>50</sub> 値は 0.0078 mg/mouse であり、CPZ の 4.2 mg/

mouse や CFS の 0.12 mg/mouse より優れた結果が得られた。

### 3. 実験的尿路感染症に対する治療効果

*E. coli* KC-14 の結果を Fig. 2 に示した。併用剤、CPZ、CZ X とともに薬物濃度に対する dose dependency は見られたが、各薬物間に有意な差は見られなかった。

*A. calcoaceticus* AC-54 の結果を Fig. 3 に示した。併用剤は溶解度が低いため 10 mg/mouse は投与を行っていないが、比較薬剤の CPZ、CZ X および PIPC に比べて優れていた。しかし、併用剤は、1 および 3 mg/mouse 間で dose dependency はほとんど見られなかった。

*P. aeruginosa* 15846 に対する 1 回投与の治療効果を Fig. 4 に示した。CPZ の 0.3 mg/mouse 投与は効果が期待されないため行っていない。併用剤では、dose dependency が見られなかったが、CPZ よりは良好な治療効果を示し、CFS とほぼ同等であった。GM は、dose dependency が認められ、1.0 mg/mouse 以上の投与量

Fig. 2 Protective effect on experimental urinary tract infection with *E. coli* KC-14 in mice

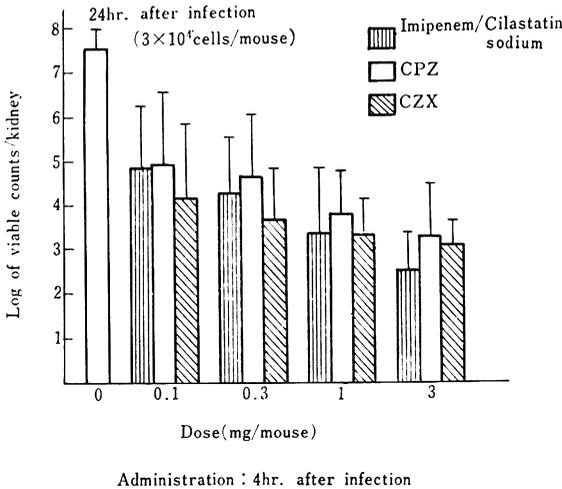
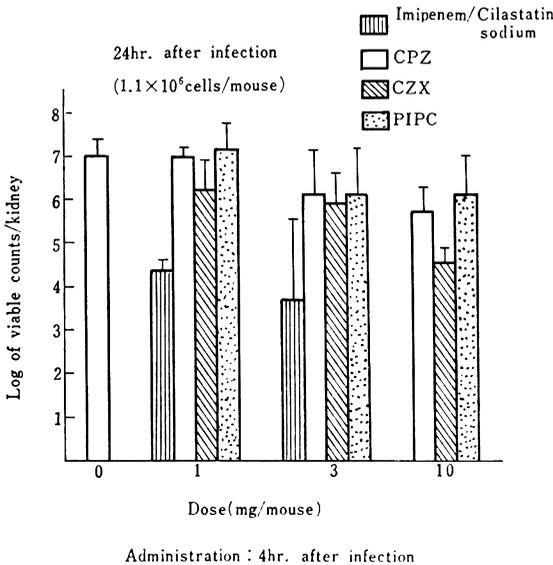


Fig. 3 Protective effect on experimental urinary tract infection with *A. calcoaceticus* AC-54 in mice



で、併用剤よりも優れていた。また、菌接種後 4, 6, 8 時間後に薬物投与を行った結果を Fig. 5 に示した。GM の 3 mg/mouse 投与は、急性毒性発現のため行っていない。各薬物とも 1 回投与に比べて腎内菌数の減少は見られたが、各薬剤間の関係は、1 回投与の場合と同様の傾向であり、併用剤に、dose dependency はあまり見られず、CPZ より優れ、CFS と同等であり、GM よりは劣っていた。

Fig. 4 Protective effect on experimental urinary tract infection with *P. aeruginosa* 15846 in mice

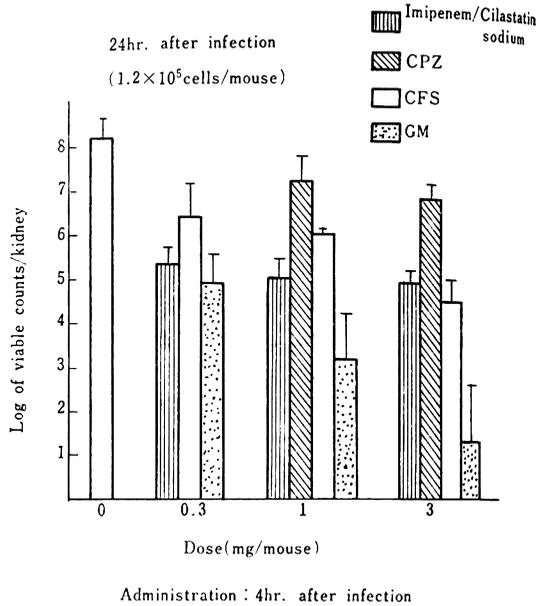
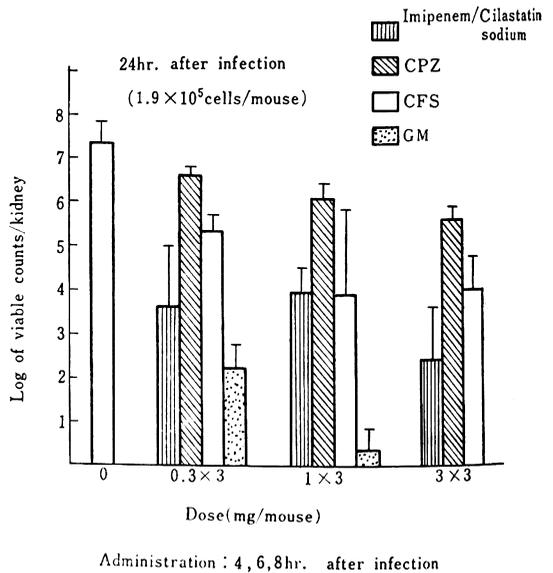


Fig. 5 Protective effect on experimental urinary tract infection with *P. aeruginosa* 15846 in mice



4. 実験的呼吸器感染症に対する治療効果

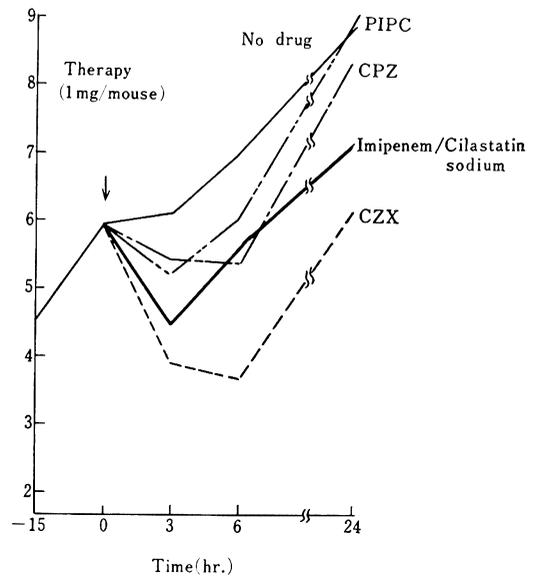
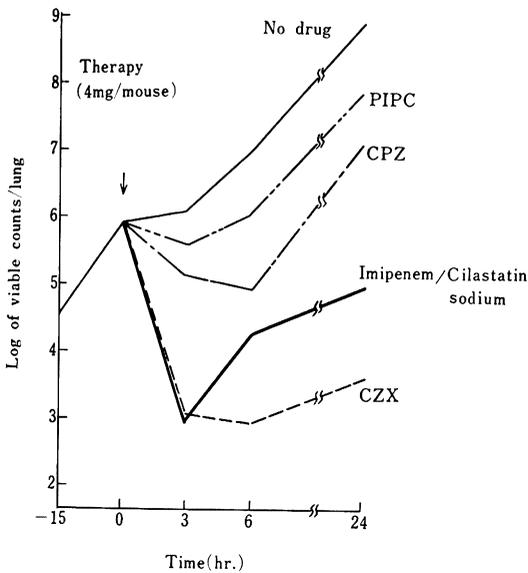
Table 3 に治療効果におよぼす投薬時期について検討した結果を示した。なお、それぞれの ED<sub>50</sub> 値は総投与量で示している。菌接種後、2 時間目から投与を開始し

Table 3 Protective effect of imipenem/cilastatin sodium, CPZ, PIPC and CZX infected with *K. pneumoniae* DT-S by aerosol method in mice

Antibiotic	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		ED <sub>50</sub> (mg/mouse) (95% confidence limits)	
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	after 2, 5, 8 hours*	after 15, 18, 21 hours*
Imipenem/ Cilastatin sodium	0.39	0.20	0.28 (0.15-0.53)	2.50 (1.13-5.55)
CPZ	0.10	0.05	4.90 (2.43-9.90)	16.0
PIPC	1.56	0.78	27.0	>27.0
CZX	0.025	$\leq 0.006$	0.088 (0.03-0.26)	0.18 (0.07-0.46)

\*: Administration after inhalation  
Observation: 5 days

Fig. 6 Effect of imipenem/cilastatin sodium, CPZ, PIPC and CZX administration on number of bacteria in the lung of mice infected with *K. pneumoniae* DT-S by the aerosol method



た時、併用剤の ED<sub>50</sub> 値は、0.28 mg/mouse であり、CZX の 0.088 mg/mouse より劣っていた。また MIC 値では imipenem より優れている CPZ の ED<sub>50</sub> 値は、4.9 mg/mouse であり、併用剤は、より良好な結果が得られた。投薬時間を遅らせた場合でも、同様な結果であったが、併用剤は、比較薬剤に比べて ED<sub>50</sub> 値の上昇率が約 10 倍と CPZ の約 3 倍、CZX の約 2 倍に比べて大きかった。

Fig. 6 に薬物投与後肺内菌数をグラフに示した。併用剤は、PIPC、CPZ よりも優れ CZX よりも劣っていた。この結果は、Table 3 の実験と同じ結果であった。併用

剤は、3 時間後までは殺菌的に働いているが、3 時間後から菌の増加が見られ、CZX や CPZ より再増殖の開始が若干早いことが認められた。しかしその後の 24 時間目までの菌数の増加傾向はほぼ CZX と同様で、CPZ、PIPC よりも低かった。

### III. 総括および考察

Imipenem, cilastatin sodium 併用剤の効果は、imipenem 単剤に比べて、*E. coli* KC-14、*P. aeruginosa* 15846 においてそれぞれ 3 倍、1.5 倍と ED<sub>50</sub> 値が低くなっており、協力作用が認められた。*S. aureus* Smith では、ED<sub>50</sub> 値が低すぎるためか、単独と併用剤の差が

見られなかった。*P. aeruginosa* 15846において、併用剤は、比較薬剤とMIC値は同等であったが、ED<sub>50</sub>値は優れた結果が得られた。また、他の菌種では、併用剤と比較薬剤は、MIC値を反映したED<sub>50</sub>値が得られていた。

β-lactam, GM耐性株である*P. aeruginosa* TP-5およびK-13において、併用剤が良いED<sub>50</sub>値を示し、交叉耐性を示さなかったことは、本剤の大きな特徴であると思われる。

尿路感染実験では、*E. coli* KC-14における腎内生菌数が、併用剤とCZXによる治療でほぼ同等の結果が得られた。この結果は、腹腔内感染で併用剤とCZXのED<sub>50</sub>値の差が10倍あったことと比較すると、cilastatin sodiumの効果が腎でより良く反映していると考えられる。*P. aeruginosa*や*A. calcoaceticus*で併用剤は、治療薬物濃度でdose dependencyが見られなかった。このことは*in vitro*での抗菌作用形式においても、*S. aureus*や*P. aeruginosa*の菌株でみられた。

呼吸器感染実験の*K. pneumoniae*の場合、併用剤とCZXのED<sub>50</sub>値は、MICとほぼ相関していた。しかし、治療開始時間を遅らせることで、併用剤のED<sub>50</sub>値の上昇が対照薬剤より大きかったことは、併用剤は、菌数による影響を受け易いようである。また、併用剤は、投与

後3時間から6時間後の間で菌数の増殖速度が早かったことから、併用剤のより効果的な投与間隔の検討もやりたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) KROPP, H.; J. G. SUNDELÖF, R. HAJDU & F. M. KAHAN: Metabolism of Thienamycin and Related Carbapenem Antibiotics by the Renal Dipeptidase, Dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 22: 62~70, 1982
- 2) 第32回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウムII. MK-0787/MK-0791, 岡山, 1984
- 3) 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
- 4) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99~113, 1949
- 5) 尾花芳樹, 石黒啓司, 星合真紀子, 平田収正, 山村宣弘, 西野武志, 谷野輝雄: マウス実験的局所感染症に対するCeftazidime(SN 401)の効果。 *Chemotherapy* 31(S-3): 102~102~110, 1983
- 6) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武毅, 宍戸春美, 鈴木寛, 野口行雄, 玉置公俊, 羅士易, 井手政利: 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。 *日本胸部疾患学会誌* 16: 581~587, 1978

EFFECT OF IMPENEM IN COMBINATION WITH  
CILASTATIN SODIUM COMBINATION  
ON EXPERIMENTAL INFECTIONS IN MICE

KAZUNORI NAKAMURA, YOSHIKI OBANA, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO  
Department of Microbiology, Kyoto Phamaceutical University

The therapeutic efficacies of the combination of imipenem and cilastatin sodium (1 : 1) on experimental infections in mice were compared with cefotiam, ceftizoxime, cefoperazone, piperacillin, cefsulodin and gentamicin.

Against experimental intraperitoneal infections caused by *S. aureus*, *A. calcoaceticus* and *P. aeruginosa*, the therapeutic efficacies of the imipenem in combination with cilastatin sodium were superior to those of cefotiam, ceftizoxime, cefoperazone, cefsulodin and gentamicin. Against *E. coli* and *S. marcescens*, the efficacies of imipenem in combination with cilastatin sodium were inferior to those of ceftizoxime. Against gentamicin-or  $\beta$ -lactam-resistant *P. aeruginosa* combined therapy with imipenem and cilastatin sodium showed good therapeutic efficacies that did not show the cross resistance.

The effect of the combination of imipenem plus cilastatin sodium on experimental urinary tract infection induced by *E. coli* was equivalent to that of cefoperazone and ceftizoxime. In the case of *A. calcoaceticus*, it was superior to that of cefoperazone, ceftizoxime and piperacillin. In the case of *P. aeruginosa*, it was more effective than cefoperazone and equivalent to that of cefsulodin and less effective than gentamicin.

Our studies using experimental pneumonia induced by *K. pneumoniae* DT-S in mice revealed that the effect of the combination of imipenem plus cilastatin sodium were superior to cefoperazone and piperacillin but inferior to ceftizoxime.