

## Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) の細菌学的評価

今朝洞忠孝・朝日良成・布施愛索・橋爪照隆

小柏美恵子・小松哲郎・奥本泰裕

日本メルク萬有株式会社 研究所

新規 carbapenem 系抗生物質 imipenem (MK-0787: *N*-formimidoyl thienamycin) および imipenem の分解酵素, dehydropeptidase-I に対する選択的阻害剤である cilastatin sodium (MK-0791) を併用した際の *in vitro* および *in vivo* における抗菌力を cefoperazone, ceftizoxime, latamoxef および piperacillin と比較検討した。

Imipenem は好気性および嫌気性のグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し, 幅広い抗菌スペクトルを示した。特に一般の  $\beta$ -lactam 剤に抵抗性を有する *E. faecalis*, *P. aeruginosa* および *A. calcoaceticus* 等に対しても強い抗菌力を示した。一方, cilastatin sodium は全く抗菌力を示さず, 又, imipenem の抗菌力にも影響を与えなかった。臨床分離株 14 菌種 423 株に対する MIC<sub>90</sub> 値はグラム陽性菌で  $\leq 0.006 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ , *P. maltophilia* を除くグラム陰性菌で  $0.2 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ , 嫌気性菌 (*B. fragilis*) で  $0.2 \mu\text{g/ml}$  と他剤よりはるかに優れていた。

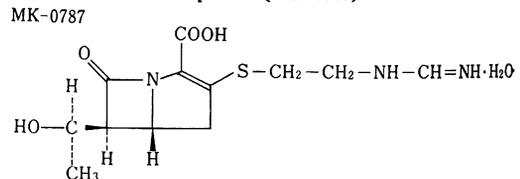
Imipenem の抗菌力は培地の変動および血清の共存の影響は殆ど受けなかったが, グラム陰性菌において接種菌量の影響を, そして pH 8.0 で培地 pH の影響を受けた。耐性獲得試験の結果は他剤とはほぼ同程度であった。*P. maltophilia* を除く他の  $\beta$ -lactamase 生産菌に対しても強い抗菌力を示した。MBC/MIC 比は 2 以内であり, そして増殖曲線に対しても殺菌的に作用した。形態変化の観察においては, フィラメント化した像は認められず, 全て mecillinam と同様の球形化した像のみが認められた。

感染動物実験における ED<sub>50</sub> 値はその MIC 値と良く相関していた。一方, imipenem/cilastatin sodium の ED<sub>50</sub> 値は, 用いたいずれの菌種においても imipenem 単剤より優れていた。

Imipenem (MK-0787: *N*-formimidoyl thienamycin) は 1976 年, 米国 Merck 社の J. S. KAHAN 等により, *Streptomyces cattleya* の培養濾液中より単離された carbapenem 系抗生物質 thienamycin の新しい誘導体である (Fig. 1)<sup>1)</sup>。Imipenem は *P. aeruginosa* を含む幅広い細菌に対し, 強い抗菌力を示すと同時に, 各種の  $\beta$ -lactamase に対し阻害作用を有することがすでに報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら一方では, imipenem は腎に存在する dehydropeptidase-I (DHP-I) により加水分解を受け, 高い尿中回収率が得られないことが判明した<sup>3)</sup>。そこで DHP-I に対する選択的阻害剤, cilastatin sodium (MK-0791) (Fig. 1) が開発され, 現在 imipenem と cilastatin sodium とを 1:1 の割合にて配合した形で開発されている。

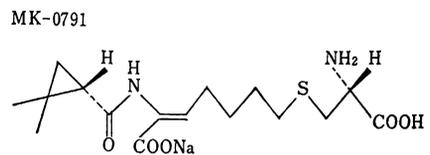
本研究では imipenem 単剤および imipenem/cilastatin sodium (1:1) 配合剤の *in vitro* および *in vivo* での抗菌力を cefoperazone, ceftizoxime, latamoxef および piperacillin と比較検討した。

Fig. 1 Chemical structure  
Imipenem (MK-0787)



(5*R*, 6*S*)-3-[[2-(formimidoylamino)ethyl]thio]-6-[(*R*)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate

Cilastatin sodium (MK-0791)



(*Z*)-7-[[(*R*)-2-amino-2-carboxyethyl]thio]-2-[(*S*)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxamido]-2-heptenoic acid monosodium salt

Table 1 Media used

Organisms	Medium
Seed culture	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mueller-Hinton broth (Difco)
<i>S. pyogenes</i>	+ 5% defibrinated sheep blood
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Mueller-Hinton broth (BBL)
<i>Haemophilus influenzae</i>	+ Fildes enrichment peptic digest of sheep blood (BBL)
The other aerobes	Mueller-Hinton broth (BBL)
anaerobes	GAM broth (Nissui)+Vitamin K <sub>1</sub>
MIC determination	
<i>S. pneumoniae</i>	Mueller-Hinton agar (BBL)
<i>S. pyogenes</i>	+ 5% defibrinated sheep blood
<i>H. influenzae</i>	Chocolate agar : Mueller-Hinton agar (BBL)
	+5% defibrinated sheep blood
<i>N. gonorrhoeae</i>	Proteose No.3 (Difco)
The other aerobes	Mueller-Hinton agar (BBL)
anaerobes	GAM agar (Nissui)+Vitamin K <sub>1</sub>

## I. 実験材料および実験方法

### 1. 使用薬剤

Imipenem (Lot. L-638, 596-01 D 362, 945  $\mu$ g (力価)/mg は米国 Merck 社研究所にて合成されたものを用い、その他は力価の明らかな cefoperazone (CPZ: 富士化学), ceftizoxime (CZX: 藤沢薬品), latamoxef (LMOX: 塩野義製薬), cefsulodin (CFS: 武田薬品) および piperacillin (PIP: 富士化学) を用いた。

### 2. 試験菌株

標準菌株は当社研究所の保存株を用いた。臨床分離株は岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設および(株)相互生物医学研究所より近年分離された株の分与を受け試験に供した。

### 3. 最小発育阻止濃度 (MIC 値) の測定

日本化学療法学会標準法に準じ、寒天平板希釈法にて最小発育阻止濃度 (MIC 値) を測定した<sup>4),5)</sup>。使用培地は菌種により異なるため Table 1 に示した。

### 4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

#### (1) 接種菌量の影響

Mueller-Hinton agar (MHA: BBL) (好気性菌) 又は GAM agar (GAM: 日水) (嫌気性菌) を用い、 $10^4 \sim 10^8$  CFU/ml の菌液を接種して MIC 値を測定した。

#### (2) 培地の影響

好気性菌では、MHA, heart infusion agar (HIA: 日水), brain heart infusion agar (BHIA: BBL), nutrient agar (NA: Difco) および trypto-soy agar (TSA: 日水) を用い、嫌気性菌には GAM agar, Wilkins-Chalgren agar (W-C: Difco), brucella blood agar (Br: 極東) および brain heart infusion blood agar (BHI-B: BBL) を用い、MIC 値を測定した。

#### (3) 培地 pH の影響

10% HCl 又は 10% NaOH で pH 調整した HIA (好気性菌), 又は GAM (嫌気性菌) を用いて MIC 値を測定した。

#### (4) 血清の影響

ウマ血清を 0, 10, 25 および 50% 添加した MHA (好気性菌) 又は GAM (嫌気性菌) を用いて MIC 値を測定した。

#### 5. 試験管内耐性獲得試験

各菌株を heart infusion broth (HIB: 栄研) で 37°C, 1 夜培養後、同新鮮培地で 10 倍希釈液 ( $10^7 \sim 10^8$  cells/ml) とし、その 2 ml を各薬剤の蒸留水溶液添加 HIB および無添加 HIB の 0.5 ml に接種して、37°C, 18 時間培養した。各薬剤の MIC 値は、肉眼的に発育濁度の認められない最小濃度とした。次代接種菌液は、薬剤無添加と同等の発育を示した薬剤添加菌液を HIB で 100 倍希釈したものを用いた。以後同様に 14 代継代を行い、MIC 値の変動から被検菌の耐性獲得性を検討した。

#### 6. $\beta$ -lactamase 活性の測定

Brain heart infusion broth (BHI-B: Difco) (好気性菌) もしくは GAM broth (GAM-B: 日水) で 37°C, 1 夜培養した菌液 3 ml を BHI-B 100 ml に接種し、37°C, 4 時間 30 分培養した後、遠心により集菌した。ただし CPase 産生株では 1/16 MIC 濃度の ceftoxitin (CFX) を *P. maltophilia* では同様に 1/16 MIC 濃度の imipenem を振とう培養時に添加した。菌体は 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) の適当量に懸濁し、20 KHz, 5 分間氷冷下で超音波処理した破砕液を 12,000  $\times$  G, 30 分間遠心し、その上清を酵素液とした。 $\beta$ -lactamase の活性

Table 2 Antibacterial spectra of imipenem, CPZ, CZX, LMOX and PIPC

Organisms	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	Imipenem		CPZ		CZX		LMOX		PIPC	
	$\times 10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.025	0.025	3.13	3.13	25	25	12.5	12.5	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> MS 353	0.013	0.013	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> Terajima	0.006	$\leq 0.006$	0.78	0.78	1.56	1.56	6.25	3.13	0.39	0.39
<i>S. aureus</i> Smith	0.025	0.025	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	6.25	0.78	0.78
<i>S. epidermidis</i> IAM 1296	0.013	0.013	1.56	1.56	12.5	6.25	12.5	12.5	1.56	0.78
<i>S. pneumoniae</i> I	0.006	0.006	0.39	0.1	0.05	0.013	3.13	3.13	0.2	0.1
<i>S. pneumoniae</i> II	0.013	0.013	0.2	0.2	0.05	0.05	3.13	3.13	0.05	0.05
<i>S. pneumoniae</i> III	0.013	0.013	0.1	0.1	0.05	0.05	3.13	3.13	0.05	0.05
<i>S. pneumoniae</i> 14	0.006	0.006	0.1	0.05	0.025	0.025	1.56	1.56	0.025	0.025
<i>S. pyogenes</i> Cook	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.2	0.1	0.05	0.025	3.13	1.56	0.2	0.1
<i>S. salivarius</i> IFO 3350	1.56	1.56	50	50	>100	>100	>100	>100	3.13	3.13
<i>E. faecalis</i> IFO 12580	1.56	1.56	12.5	6.25	>100	>100	>100	>100	12.5	6.25
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	6.25	3.13	0.39	0.2	0.025	$\leq 0.006$	0.1	0.05	0.78	0.2
<i>B. cereus</i> IFO 3001	0.2	0.05	3.13	1.56	50	50	50	12.5	1.56	0.78
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0.025	0.025	6.25	6.25	50	50	12.5	12.5	1.56	1.56
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.025	0.025	0.78	0.78	6.25	3.13	6.25	6.25	3.13	0.39
<i>N. gonorrhoeae</i> 1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.013	$\leq 0.006$	0.05	0.05	1.56	0.013
<i>N. gonorrhoeae</i> 8	0.1	0.05	0.39	0.39	0.2	0.2	6.25	6.25	0.39	0.1
<i>N. gonorrhoeae</i> 32	0.2	0.1	0.78	0.05	0.2	0.2	6.25	1.56	0.39	0.39
<i>B. catarrhalis</i> 8	0.1	0.025	6.25	0.39	0.1	0.025	0.025	0.025	>100	0.1
<i>B. catarrhalis</i> 9	0.05	0.025	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
<i>H. influenzae</i> 5	0.39	0.2	0.39	0.05	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.05	0.05	>100	3.13
<i>H. influenzae</i> 15	0.2	0.1	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.025	0.025	0.05	0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.1	0.39	0.2	0.05	0.025	0.2	0.2	3.13	1.56
<i>E. coli</i> K-12 C 600	0.2	0.2	0.2	0.1	0.025	0.025	0.2	0.2	0.78	0.78
<i>C. freundii</i> IFO 12681	0.78	0.39	1.56	0.78	0.78	0.39	0.78	0.39	3.13	3.13
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.2	0.2	0.2	0.2	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.2	0.1	3.13	1.56
<i>E. cloacae</i> 963	3.13	0.39	0.39	0.39	0.1	0.05	0.2	0.2	3.13	3.13
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	1.56	0.2	6.25	0.39	25	0.1	3.13	0.2	25	3.13
<i>H. alvei</i> IFO 3731	0.39	0.2	0.05	0.05	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.05	0.05	0.1	0.05
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.39	0.2	0.78	0.39	0.05	0.025	0.1	0.1	3.13	3.13
<i>S. typhi</i> 901	0.2	0.1	0.78	0.78	0.1	0.05	0.2	0.1	3.13	1.56
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.2	0.1	0.1	0.1	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S. paratyphi</i> A	0.78	0.39	0.2	0.2	0.013	0.013	0.2	0.2	0.39	0.2
<i>S. paratyphi</i> B	0.2	0.2	0.2	0.2	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.1	0.05	0.78	0.39
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.39	0.39	0.1	0.1	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.1	0.1	0.2	0.2
<i>S. enteritidis</i> G14	0.39	0.39	0.39	0.2	0.025	0.013	0.39	0.1	3.13	1.56
<i>P. vulgaris</i> OX-19	3.13	0.78	0.2	0.2	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.39	0.2	0.2	$\leq 0.006$
<i>P. vulgaris</i> HX-19	1.56	0.39	0.025	0.013	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.39	0.2	0.013	0.006
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	1.56	1.56	0.78	0.78	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.2	0.1	0.39	0.39
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.025	0.013	0.1	0.1	6.25	0.1	1.56	1.56	1.56	0.025
<i>M. morgani</i> IFO 3848	1.56	0.39	0.39	0.1	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	0.2	0.1	0.2	$\leq 0.006$
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.39	0.2	0.78	0.39	12.5	$\leq 0.006$	0.2	0.1	3.13	0.39
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	1.56	0.78	25	12.5	100	25	50	25	25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	0.78	0.39	0.78	0.39	0.39	0.39	3.13	1.56	3.13	3.13
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	12.5	12.5	6.25	6.25	25	25	25	25	6.25	3.13
<i>P. putida</i> IFO 3738	0.2	0.2	6.25	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	3.13	0.78
<i>P. putrifaciens</i> IFO 3908	3.13	0.2	0.78	0.2	0.1	0.025	6.25	1.56	1.56	0.39
<i>P. maltophilia</i> T-7	50	50	>100	50	>100	>100	6.25	6.25	100	>100
<i>A. calcoaceticus</i> IFO 12552	0.1	0.1	>100	>100	25	12.5	>100	100	100	100
<i>A. hydrophila</i> IFO 3820	3.13	0.2	0.78	0.39	0.1	0.05	0.05	0.05	6.25	6.25
<i>A. faecalis</i> IAM 1015	0.025	0.025	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	12.5	0.78	0.78
<i>F. meningosepticum</i> IFO 12535	12.5	12.5	50	50	50	25	>100	50	50	12.5
<i>Y. enterocolitica</i> 2	0.2	0.2	3.13	3.13	0.05	0.013	0.2	0.2	6.25	3.13

\* cells/ml

Table 3 Antibacterial spectra of imipenem, CPZ, CZX, LMOX and PIPC

Organisms	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	Imipenem		CPZ		CZX		LMOX		PIPC	
	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$
<i>P. asaccharolyticus</i> GAI-6048	0.1	0.05	0.2	0.1	0.78	0.39	1.56	1.56	0.2	0.2
<i>P. micros</i> GAI-5354	0.1	0.025	0.39	0.39	25	3.13	0.78	0.39	0.05	0.025
<i>P. anaerobius</i> GAI-3020	0.2	0.1	1.56	0.78	0.1	0.05	3.13	3.13	0.2	0.2
<i>P. magnus</i> GAI-5347	0.78	0.1	1.56	0.78	3.13	0.39	3.13	1.56	0.1	0.1
<i>S. intermedius</i> GAI-7691	0.2	0.2	0.39	0.39	0.39	0.39	25	25	0.2	0.2
<i>P. acnes</i> GAI-8133	0.05	0.013	0.2	0.1	0.2	0.025	1.56	0.39	0.2	0.1
<i>C. perfringens</i> GAI-2122	0.39	0.39	1.56	0.013	3.13	0.39	0.78	0.39	0.39	0.05
<i>C. butyricum</i> GAI-7819	0.2	0.1	0.39	0.39	6.25	6.25	3.13	3.13	0.2	0.2
<i>C. innocuum</i> GAI-7424	12.5	6.25	6.25	6.25	50	50	>100	>100	0.78	0.78
<i>C. difficile</i> GAI-8132	12.5	6.25	25	25	>100	>100	100	100	3.13	1.56
<i>B. fragilis</i> GM-7000	0.78	0.1	25	3.13	6.25	0.39	3.13	0.78	6.25	1.56
<i>B. fragilis</i> GAI-6223	1.56	0.78	>100	>100	>100	50	25	25	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-3462	1.56	1.56	>100	>100	50	50	>100	>100	>100	>100
<i>B. uniformis</i> GAI-7673	0.39	0.1	12.5	6.25	25	0.78	1.56	0.78	6.25	6.25
<i>B. distasonis</i> GAI-7777	0.78	0.1	100	12.5	25	1.56	12.5	0.78	25	3.13
<i>F. nucleatum</i> GAI-5387	0.39	0.1	0.1	0.05	0.2	0.05	1.56	0.39	0.1	0.025
<i>F. varium</i> GAI-2302	1.56	0.78	12.5	12.5	6.25	0.78	12.5	6.25	12.5	6.25
<i>V. parvula</i> GAI-2851	0.78	0.39	3.13	1.56	0.39	0.2	1.56	1.56	6.25	6.25

は PERRENT のヨード法に基づいて測定した<sup>6)</sup>。酵素の蛋白量は Lowry 法により求めた<sup>7)</sup>。

## 7. 殺菌作用

### (1) MBC 値の測定

Mueller-Hinton broth (MHB : BBL) で 1 夜培養した菌液を適宜希釈し、薬剤の倍数希釈濃度を含む同新鮮 MHB に接種し、37°C 18 時間培養後肉眼的に菌の増殖が認められなかった最小濃度を MIC 値とした。MIC 値測定後の各培養液の 1 白金耳を、薬剤を含まない MHA に移植し、37°C 18 時間培養後コロニーを全く認めない濃度を MBC 値とした。

### (2) 増殖曲線におよぼす影響

Antibiotic medium 3 (AM 3 : Difco) で 18 時間培養した菌液を約  $10^8$  cells/ml に希釈し、さらに 37°C で振とう培養後、約  $10^4$  cells/ml に達した際に MIC 前後の各薬剤を加え振とう培養し、経時的に生菌数を測定した。

## 8. 走査電子顕微鏡による細菌像の観察

*S. aureus* 209 P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* IFO 3445 株を変法 Mueller-Hinton broth (変法 MHB : 日水) で振とう培養を行った。その対数期途上の菌液を約 1% の割合で、あらかじめ薬剤を含んだ変法 MHB に接種し、37°C で 2 時間振とう培養後菌体を集菌し、電子顕微鏡の試料とした。試料作成は、は

じめ 1% glutaraldehyde 溶液にて固定を行い、アセトン系列で脱水を行った。次いで酢酸イソアミルで置換した試料を臨界点乾燥装置 (HCP-2, 日立工機) にて乾燥した後、イオンコーター (1 B-3, エイコーエンジニアリング) を用い金を蒸着した。走査電子顕微鏡 (ISIDS 130, 明石製作所) による観察および撮影は加速電圧 15 KV で行った。

## 9. 感染防御効果

マウスは ICR 系, 雄, 体重  $19 \pm 1$  g, 1 群 10 匹を用いた。感染菌は HIB で 37°C 1 夜培養した後 5% gastric mucin (Sigma) に懸濁し、腹腔内に接種した。薬剤は 1 回目を感染直後もしくは 1 時間後に、そして 2 回目を 4 時間後に背部皮下投与した。防御効果は 7 日後の生存匹数から Van der Waerden 法あるいは Probit 法により算出し、ED<sub>50</sub> 値 (1 回投与量) で示した。

## II. 結 果

### 1. Imipenem の抗菌スペクトル

Imipenem の好気性菌に対する抗菌スペクトルを Table 2 に示した。グラム陽性菌にては *M. luteus* ATCC 9341 において他剤より若干高い MIC 値を示した他は、他剤より顕著に優れており、特に CPZ, CZX および LMOX が無効と思われる *E. faecalis* に対して 1.56  $\mu\text{g/ml}$  と低い MIC 値を示した。グラム陰性菌においては、Salmonella 属および Proteus 属に対して CZX よ

Table 4 Effect of cilastatin sodium on the antimicrobial activity of imipenem against various bacteria

Organism	Inoculum (cells/ml)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				Cilastatin sodium
		Imipenem	Ratio of (imipenem : cilastatin)			
			1 : 0.5*	1 : 1*	1 : 2*	
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC 1	10 <sup>6</sup>	0.013	0.006	0.013	0.013	>800
	10 <sup>8</sup>	0.013	0.013	0.013	0.025	>800
<i>S. aureus</i> Terajima	10 <sup>6</sup>	<0.006	<0.006	<0.006	<0.006	>800
	10 <sup>8</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	>800
<i>S. aureus</i> MS 353	10 <sup>6</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	>800
	10 <sup>8</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	>800
<i>S. pyogenes</i> Cook	10 <sup>6</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	>800
	10 <sup>8</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	>800
<i>S. faecalis</i> IFO 3971	10 <sup>6</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>S. faecalis</i> IFO 3989	10 <sup>6</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>S. faecalis</i> IFO 12580	10 <sup>6</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.1	0.2	0.2	>800
<i>E. coli</i> K12 C600	10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.1	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
<i>S. typhimurium</i> IID 971	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
<i>S. typhi</i> 901	10 <sup>6</sup>	0.05	0.025	0.05	0.05	>800
	10 <sup>8</sup>	0.1	0.1	0.1	0.05	>800
<i>S. paratyphi</i> 1015	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
<i>S. schottmulleri</i> 8006	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
<i>S. enteritidis</i> G-14	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.39	0.39	0.39	0.39	>800
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	0.39	0.39	0.39	0.39	>800
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 <sup>6</sup>	0.013	0.013	0.013	0.013	>800
	10 <sup>8</sup>	0.013	0.013	0.013	0.013	>800
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	10 <sup>6</sup>	0.39	0.39	0.39	0.39	>800
	10 <sup>8</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	10 <sup>6</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
	10 <sup>8</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	10 <sup>6</sup>	12.5	6.25	6.25	6.25	>800
	10 <sup>8</sup>	12.5	12.5	12.5	12.5	>800
<i>P. morganii</i> IFO 3848	10 <sup>6</sup>	0.78	0.78	0.78	0.78	>800
	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	3.13	3.13	>800
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	10 <sup>6</sup>	3.13	3.13	1.56	1.56	>800
	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	3.13	3.13	>800
<i>P. vulgaris</i> OX 19	10 <sup>6</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
	10 <sup>8</sup>	3.13	3.13	3.13	3.13	>800
<i>P. vulgaris</i> HX 19	10 <sup>6</sup>	0.78	0.39	0.39	0.39	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	10 <sup>6</sup>	0.39	0.39	0.39	0.39	>800
	10 <sup>8</sup>	0.78	0.78	0.78	3.13	>800
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	10 <sup>6</sup>	0.39	0.39	0.39	0.39	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>E. cloacae</i> 963	10 <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	>800
	10 <sup>8</sup>	1.56	1.56	1.56	1.56	>800
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	10 <sup>6</sup>	0.013	0.013	0.013	0.013	>800
	10 <sup>8</sup>	0.013	0.013	0.013	0.013	>800

\* MIC was expressed as concentrations of imipenem

Table 5-1 Antibacterial activities of imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics against clinical isolates ( $10^8$  cells/ml)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
<i>Staphylococcus aureus</i> (34)	Imipenem	$\leq 0.006$ -0.1	0.025	0.025
	CPZ	3.13-12.5	1.56	3.13
	CZX	0.39->100	1.56	12.5
	LMOX	3.13-50	6.25	12.5
	PIPC	0.39-100	1.56	6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (27)	Imipenem	0.006-1.56	0.025	0.2
	CPZ	0.1-25	1.56	12.5
	CZX	0.05->100	1.56	12.5
	LMOX	1.56->100	6.25	50
	PIPC	0.1->100	0.78	25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (11)	Imipenem	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$
	CPZ	0.025-0.1	0.05	0.05
	CZX	0.05-0.39	0.05	0.1
	LMOX	0.78-1.56	0.78	1.56
	PIPC	0.013-0.05	0.025	0.05
<i>Enterococcus faecalis</i> (27)	Imipenem	0.05-1.56	0.78	1.56
	CPZ	1.56-100	25	50
	CZX	0.39->100	>100	>100
	LMOX	25->100	>100	>100
	PIPC	0.78-50	3.13	3.13
<i>Haemophilus influenzae</i> (17)	Imipenem	0.2-0.78	0.39	0.78
	CPZ	$\leq 0.006$ -0.05	0.013	0.05
	CZX	$\leq 0.006$ -0.025	0.013	0.025
	LMOX	0.05-0.2	0.1	0.1
	PIPC	$\leq 0.006$ -1.56	0.013	0.78
<i>Escherichia coli</i> (40)	Imipenem	0.05-0.78	0.1	0.2
	CPZ	0.05-50	0.39	12.5
	CZX	0.013-100	0.05	0.1
	LMOX	0.05-3.13	0.1	0.39
	PIPC	0.1->100	6.25	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (34)	Imipenem	0.1- 0.78	0.1	0.39
	CPZ	0.05-6.25	0.2	0.39
	CZX	$\leq 0.006$ -0.2	0.025	0.05
	LMOX	0.025-0.78	0.1	0.2
	PIPC	1.56->100	3.13	50
<i>Enterobacter cloacae</i> (40)	Imipenem	0.1-0.39	0.2	0.39
	CPZ	0.05-50	0.39	25
	CZX	0.025-50	0.2	50
	LMOX	0.05-50	0.1	6.25
	PIPC	0.78->100	3.13	>100
<i>Proteus mirabilis</i> (27)	Imipenem	0.2-3.13	0.78	3.13
	CPZ	0.39-1.56	0.78	1.56
	CZX	$\leq 0.006$ -0.1	$\leq 0.006$	0.013
	LMOX	0.05-0.39	0.2	0.2
	PIPC	0.2-1.56	0.39	0.78

Table 5-2 Antibacterial activities of imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics against clinical isolates ( $10^6$  cells/ml)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
Indole (+) <i>Proteus</i> sp. (27)	Imipenem	0.39-3.13	0.78	1.56
	CPZ	0.2-25	1.56	3.13
	CZX	$\leq 0.006$ -50	0.013	1.56
	LMOX	0.05-0.39	0.1	0.39
	PIPC	0.2-50	1.56	50
<i>Serratia marcescens</i> (38)	Imipenem	0.1-6.25	0.39	1.56
	CPZ	0.39->100	50	>100
	CZX	0.05-50	3.13	12.5
	LMOX	0.1->100	6.25	>100
	PIPC	0.78->100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (40)	Imipenem	0.39-3.13	1.56	1.56
	CPZ	1.56-50	3.13	25
	CZX	12.5->100	50	>100
	LMOX	6.25->100	25	>100
	PIPC	0.78-100	6.25	50
<i>Pseudomonas maltophilia</i> (26)	Imipenem	12.5->100	>100	>100
	CPZ	1.56->100	12.5	100
	CZX	12.5->100	>100	>100
	LMOX	3.13-50	6.25	50
	PIPC	12.5->100	50	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> (33)	Imipenem	0.025-0.78	0.05	0.2
	CPZ	3.13->100	6.25	100
	CZX	0.39-12.5	0.78	6.25
	LMOX	0.39->100	0.78	6.25
	PIPC	1.56->100	3.13	25

り劣っていた他は、他剤と同程度もしくは若干優れた抗菌力を示した。そして他剤が比較的高い MIC 値を示す *P. aeruginosa* や *A. calcoaceticus* 等のブドウ糖非発酵菌に対しても強い抗菌力を示した。

嫌気性菌に対する結果は Table 3 に示したごとく、*B. fragilis* を含む用いた全ての菌種に対して強い抗菌力を示した。

## 2. Cilastatin sodium の抗菌スペクトル

Cilastatin sodium および imipenem との配合時の抗菌スペクトルを Table 4 に示したごとく、cilastatin sodium は全く抗菌力を有しないと同時に imipenem の抗菌力にも何ら影響を与えなかった。

## 3. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離株 14 菌種 423 株に対する薬剤感受性試験の結果を Table 5 及び Table 6 に示した。

*S. aureus*, *S. epidermidis* 及び *E. faecalis* に対する他剤の MIC<sub>90</sub> 値が 12.5~>100  $\mu\text{g/ml}$  であったのに対し、imipenem の MIC<sub>90</sub> 値は 0.025~1.56  $\mu\text{g/ml}$  と非

常に低い値であった。*S. pneumoniae* に対しては用いたいずれの薬剤も強い抗菌力を示したが、imipenem は特に優れており、 $10^8$  cells/ml 菌液接種にて PIPC の 4 倍、LMOX の 210 倍の抗菌力を示した。

*H. influenzae* に対する MIC<sub>90</sub> 値は  $10^8$  cells/ml 菌液接種で 1.56  $\mu\text{g/ml}$  と PIPC(MIC<sub>90</sub> 値: 3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) よりは優れていたものの、他剤より劣っていた。

*E. coli*, *K. pneumoniae* および Indole (+) *Proteus* spp. に対する抗菌力は CPZ, CZX, LMOX と同程度で PIPC より優れていた。

*P. mirabilis* に対しては、他剤特に CZX より劣っていた。

*S. marcescens*, *P. aeruginosa* および *B. fragilis* に対する imipenem の MIC<sub>90</sub> 値は  $10^8$  cells/ml 菌液接種で 0.78~3.13  $\mu\text{g/ml}$  であったのに対し、LMOX が *B. fragilis* で 6.25  $\mu\text{g/ml}$  であったのを除き、全て 50  $\mu\text{g/ml}$  以上の MIC<sub>90</sub> 値を示した。

*P. maltophilia* に対しては、他剤と同様 MIC<sub>90</sub> 値で

Table 6-1 Antibacterial activities of imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics against clinical isolates ( $10^8$  cells/ml)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
<i>Staphylococcus aureus</i> (34)	Imipenem	$\leq 0.006$ -1.56	0.025	0.05
	CPZ	0.78-50	1.56	6.25
	CZX	1.56->100	3.13	25
	LMOX	3.13-100	12.5	25
	PIPC	0.39->100	12.5	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (27)	Imipenem	0.013-25	0.025	0.78
	CPZ	0.78->100	3.13	12.5
	CZX	0.39->100	6.25	100
	LMOX	3.13->100	12.5	>100
	PIPC	0.2->100	6.25	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (11)	Imipenem	$\leq 0.006$ -0.013	$\leq 0.006$	0.013
	CPZ	0.05-0.1	0.05	0.1
	CZX	0.05-0.39	0.05	0.1
	LMOX	1.56-3.13	1.56	3.13
	PIPC	$\leq 0.006$ -0.05	0.025	0.05
<i>Enterococcus faecalis</i> (27)	Imipenem	0.05-3.13	1.56	1.56
	CPZ	1.56->100	25	50
	CZX	0.78->100	>100	>100
	LMOX	25->100	>100	>100
	PIPC	1.56-100	3.13	3.13
<i>Haemophilus influenzae</i> (17)	Imipenem	0.2-1.56	0.78	1.56
	CPZ	$\leq 0.006$ -0.2	0.013	0.1
	CZX	0.013-0.025	0.013	0.025
	LMOX	0.05-0.2	0.1	0.1
	PIPC	$\leq 0.006$ -6.25	0.013	3.13
<i>Escherichia coli</i> (40)	Imipenem	0.1-1.56	0.39	0.78
	CPZ	0.1->100	0.39	>100
	CZX	0.05->100	0.1	0.2
	LMOX	0.1-3.13	0.2	0.39
	PIPC	0.39->100	25	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (34)	Imipenem	0.1-1.56	0.39	0.78
	CPZ	0.1-50	0.39	1.56
	CZX	0.013-0.39	0.025	0.1
	LMOX	0.05-1.56	0.2	0.39
	PIPC	3.13->100	12.5	100
<i>Enterobacter cloacae</i> (40)	Imipenem	0.1-1.56	0.78	1.56
	CPZ	0.1->100	1.56	>100
	CZX	0.05->100	0.78	>100
	LMOX	0.1->100	0.39	50
	PIPC	1.56->100	6.25	>100
<i>Proteus mirabilis</i> (27)	Imipenem	0.78-3.13	1.56	3.13
	CPZ	0.39-3.13	1.56	3.13
	CZX	$\leq 0.006$ -1.56	0.013	0.025
	LMOX	0.2-1.56	0.2	0.39
	PIPC	0.39-12.5	0.78	3.13

Table 6-2 Antibacterial activities of imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics against clinical isolates ( $10^8$  cells/ml)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
Indole (+) <i>Protocus</i> sp. (27)	Imipenem	0.39-6.25	1.56	3.13
	CPZ	0.39-100	3.13	25
	CZX	$\leq 0.006$ -100	0.025	3.13
	LMOX	0.05-0.78	0.1	0.39
	PIPC	0.78->100	3.13	>100
<i>Serratia marcescens</i> (38)	Imipenem	0.2-6.25	0.78	3.13
	CPZ	0.78->100	>100	>100
	CZX	0.1->100	12.5	50
	LMOX	0.39->100	12.5	>100
	PIPC	1.56->100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (40)	Imipenem	0.39-12.5	1.56	3.13
	CPZ	3.13-100	6.25	50
	CZX	12.5->100	50	>100
	LMOX	12.5->100	25	>100
	PIPC	1.56->100	6.25	>100
<i>Pseudomonas maltophilia</i> (26)	Imipenem	12.5->100	>100	>100
	CPZ	50->100	>100	>100
	CZX	50->100	>100	>100
	LMOX	3.13->100	12.5	50
	PIPC	100->100	>100	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> (33)	Imipenem	0.2-0.78	0.78	0.78
	CPZ	12.5->100	100	>100
	CZX	25->100	100	>100
	LMOX	0.78->100	3.13	6.25
	PIPC	3.13->100	25	>100

100  $\mu\text{g/ml}$  以上であった。

#### 4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

*S. aureus* Smith, *E. coli* GAI-392, *P. aeruginosa* IFO 3445 及び *B. fragilis* GAI 558 を用いて imipenem の抗菌力に及ぼす諸因子の影響を検討した。

##### (1) 接種菌量の影響

Table 7 に示したごとく, *S. aureus* Smith では全く接種菌量の影響を受けなかったが,  $10^4$  cells/ml 菌液接種と  $10^8$  cells/ml 菌液接種との間で, *E. coli* GAI-392 で 8 倍, *P. aeruginosa* IFO 3445 で 4 倍, そして *B. fragilis* GAI 558 で 8 倍の MIC 値の上昇が認められた。一方, 他剤もほぼ同程度の MIC 値の上昇が認められた。

##### (2) 培地の影響

薬剤感受性試験に用いられる培地の種類による影響を検討し, Table 8 に示した。

菌種は異なるものの imipenem を含む試験したいずれの薬剤も, 用いた培地にて最大 16 倍の範囲内で MIC 値に変動が認められた。

##### (3) 培地 pH の影響

培地 pH の抗菌力に及ぼす影響を Table 9 に示した。Imipenem の MIC 値は pH 6.0 と pH 7.0 では殆ど差は認められなかったが, pH 8.0 にて明らかに MIC 値の上昇が認められた。そしてこの傾向は PIPC にても同様に認められた。

##### (4) 血清の影響

抗菌力に及ぼすウマ血清添加の影響を検討し, Table 10 に示した。

*P. aeruginosa* IFO 3445 において, imipenem 及び CPZ の MIC 値が低くなる傾向が見られたが, その他の菌種においては他剤とも抗菌力に変動は認められなかった。

##### 5. 耐性獲得試験

*S. aureus* 209 P, *E. coli* NIHJ JC-2 及び *P. aeruginosa* IFO 3445 を用い, 薬剤含有培地に継代培養を行い耐性の上昇を検討し, 成績を Fig. 2 に示した。

*S. aureus* 209 P は imipenem, LMOX, PIPC, CZX

Table 7 Effect of inoculum size on antibacterial activity of imipenem

Organisms	Inoculum size *	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
		Imipenem	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>S. aureus</i> Smith	$3.0 \times 10^8$	0.025	3.13	6.25	12.5	1.56
	$3.0 \times 10^7$	0.025	3.13	6.25	12.5	1.56
	$3.0 \times 10^6$	0.025	1.56	6.25	6.25	0.78
	$3.0 \times 10^5$	0.025	1.56	3.13	6.25	0.78
	$3.0 \times 10^4$	0.025	1.56	3.13	6.25	0.78
<i>E. coli</i> GAI-392	$5.0 \times 10^8$	0.78	0.1	0.39	0.2	3.13
	$5.0 \times 10^7$	0.2	0.1	0.1	0.1	0.78
	$5.0 \times 10^6$	0.1	0.05	0.05	0.1	0.78
	$5.0 \times 10^5$	0.1	0.05	0.05	0.1	0.78
	$5.0 \times 10^4$	0.1	0.05	0.05	0.1	0.78
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	$7.3 \times 10^8$	1.56	12.5	100	25	12.5
	$7.3 \times 10^7$	0.78	12.5	100	25	12.5
	$7.3 \times 10^6$	0.39	6.25	50	12.5	6.25
	$7.3 \times 10^5$	0.39	6.25	25	12.5	6.25
	$7.3 \times 10^4$	0.39	3.13	25	12.5	3.13
<i>B. fragilis</i> GAI-558	$2.2 \times 10^8$	1.56	>100	>100	25	>100
	$2.2 \times 10^7$	0.39	>100	50	25	>100
	$2.2 \times 10^6$	0.2	>100	50	12.5	50
	$2.2 \times 10^5$	0.2	100	50	12.5	50
	$2.2 \times 10^4$	0.2	100	50	12.5	12.5

\* cells/ml

および CPZ に対し、初代では MIC 値: 0.003, 6.25, 0.1, 12.5 及び 3.13  $\mu\text{g/ml}$  を示したが、14 代の薬剤増量継代によってその MIC 値は、imipenem: 0.39, LMOX: 25, PIPC: 100, CZX: 200 そして CPZ: 1,600  $\mu\text{g/ml}$  へ上昇した。

*E. coli* NIHJ JC-2 はいずれの薬剤に対しても著明な耐性獲得を示さなかった。

一方、*P. aeruginosa* IFO 3445 はいずれの薬剤に対しても著明に耐性を獲得し、14 代の薬剤増量継代で imipenem の MIC 値は、0.2  $\mu\text{g/ml}$  から 200  $\mu\text{g/ml}$  へ、LMOX では 50  $\mu\text{g/ml}$  から 12,800  $\mu\text{g/ml}$  へ、PIPC では 12.5  $\mu\text{g/ml}$  から 51200  $\mu\text{g/ml}$  へ、CZX では 100  $\mu\text{g/ml}$  から 102,400  $\mu\text{g/ml}$  へ、そして CPZ では 25  $\mu\text{g/ml}$  から 6,400  $\mu\text{g/ml}$  へ上昇した。

#### 6. $\beta$ -lactamase 生産菌に対する抗菌力

各種の  $\beta$ -lactamase 生産株を用い、 $\beta$ -lactamase 活性と MIC 値との関係を検討し、Table 11 に示した。

Imipenem は CXase を産生する *P. maltophilia* 100-1 を除く用いた他の  $\beta$ -lactamase 生産株に対し強い抗菌力を示した。

#### 7. 殺菌作用

Imipenem の殺菌作用について MIC 値と MBC 値の

関係及び菌の増殖に及ぼす影響について検討した。

#### (1) MIC 値と MBC 値の関係

*S. aureus* Smith, *E. coli* GAI-392, *P. aeruginosa* IFO 3445 及び *B. fragilis* GAI 558 の 4 株を用い各薬剤の MIC 値及び MBC 値を比較し、その結果を Table 12 に示した。

Imipenem は他剤と同様、MIC 値と MBC 値がよく一致し、殺菌的に作用した。

#### (2) 増殖曲線に及ぼす影響

*E. coli* NIHJ JC-2 及び *P. aeruginosa* IFO 3445 の対数増殖期途上の菌に薬剤を作用させ、生菌数の変化を 8 時間まで観察し、その結果を Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。

*E. coli* NIHJ JC-2 に対して imipenem は 1MIC (0.78  $\mu\text{g/ml}$ ) で殺菌的に作用したが、CPZ および CZX は 1MIC (0.78, 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) では 4 時間目より再増殖が認められた。

*P. aeruginosa* IFO 3445 に対してはいずれの薬剤も 1MIC (Imipenem: 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , CPZ: 1.56  $\mu\text{g/ml}$ , CZX: 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ) で殺菌的に作用したが、薬剤添加後 2~4 時間目より徐々に再増殖が認められた。

#### 8. 走査電子顕微鏡による観察

Table 8 Effect of various media on antibacterial activity of imipenem

Organisms	Medium	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )											
		Imipenem		CIZ		CZX		LMOX		PIPC			
		$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$		
<i>S. aureus</i> Smith	MHA	0.025	0.025	3.13	1.56	6.25	6.25	12.5	6.25	1.56	0.78		
	HIA	0.013	0.013	1.56	1.56	3.13	1.56	6.25	6.25	0.78	0.78		
	BHIA	0.013	$\leq 0.006$	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25	0.78	0.78		
	NA	$\leq 0.006$	$\leq 0.006$	1.56	1.56	1.56	1.56	12.5	12.5	0.78	0.78		
	TSA	0.013	$\leq 0.006$	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25	0.78	0.39		
<i>E. coli</i> GAI 392	MHA	0.78	0.1	0.1	0.05	0.39	0.1	6.25	0.1	3.13	0.78		
	HIA	0.39	0.1	0.1	0.05	0.2	0.05	0.2	0.1	1.56	0.78		
	BHIA	0.39	0.1	0.39	0.2	0.78	0.05	3.13	0.39	1.56	0.78		
	NA	0.05	0.025	0.1	0.05	0.1	0.1	0.2	0.2	1.56	1.56		
	TSA	0.39	0.05	0.2	0.1	0.2	0.05	0.2	0.1	3.13	1.56		
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	MHA	1.56	0.39	12.5	6.25	100	50	25	12.5	12.5	6.25		
	HIA	0.78	0.39	12.5	6.25	100	25	50	12.5	12.5	3.13		
	BHIA	0.39	0.39	6.25	3.13	50	25	25	12.5	6.25	3.13		
	NA	0.39	0.39	>100	6.25	100	100	50	25	25	6.25		
	TSA	1.56	0.39	25	12.5	100	50	50	25	12.5	6.25		
<i>B. fragilis</i> GAI-558	GAM	1.56	0.2	>100	>100	>100	50	25	12.5	>100	50		
	W-C	0.2	0.1	>100	>100	>100	50	12.5	6.25	>100	100		
	Br	0.78	0.39	>100	>100	>100	>100	12.5	6.25	>100	>100		
	BHI-B	0.39	0.39	>100	>100	>100	>100	12.5	6.25	>100	>100		

Medium : MHA ; Mueller-Hinton agar (BBL)

HIA ; Heart infusion agar (Nissui)

BHIA ; Brain heart infusion agar (BBL)

NA ; Nutrient agar (Difco)

TSA ; Tryptone-Soy agar (Nissui)

GAM ; GAM agar (Nissui)

W-C ; Wilkins-Chalgren agar (Difco)

Br ; Brucella blood agar (Kyokuto)

BHI-B ; Brain heart infusion blood agar (BBL)

\* cells/ml

Table 9 Effect of medium pH on antibacterial activity of imipenem

Organisms	pH	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )											
		Imipenem		CPZ		CZX		LMOX		PIPC			
		$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$		
<i>S. aureus</i> Smith	6.0	0.025	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	12.5	12.5	12.5	0.78	0.78	
	7.0	0.025	1.56	1.56	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	0.78	0.78	0.78	
	8.0	0.05	6.25	6.25	6.25	3.13	50	25	25	3.13	3.13	3.13	
<i>E. coli</i> GAI-392	6.0	0.39	0.39	0.2	0.39	0.2	0.2	0.2	0.1	1.56	1.56	1.56	
	7.0	0.39	0.1	0.1	0.39	0.1	0.2	0.2	0.2	1.56	1.56	0.78	
	8.0	1.56	0.39	0.39	0.39	0.2	>100	25	25	6.25	6.25	6.25	
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	6.0	1.56	6.25	6.25	6.25	100	>100	100	12.5	12.5	12.5	6.25	
	7.0	1.56	12.5	12.5	100	50	100	50	25	12.5	12.5	6.25	
	8.0	12.5	6.25	6.25	100	50	100	50	25	12.5	100	25	
<i>B. fragilis</i> GAI 558	6.0	0.78	>100	>100	>100	>100	>100	50	12.5	>100	>100	50	
	7.0	0.78	>100	>100	>100	>100	>100	50	25	>100	>100	50	
	8.0	12.5	>100	>100	>100	>100	>100	25	25	>100	>100	100	

\* cells/ml

正常な *S. aureus* 209 P JC-1 の走査電顕像を Fig. 5 に示した。表面構造は smooth であり、ブドウ状の配列を観察することができた。Imipenem の 0.013 及び 0.05  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させた際、菌の膨化像及び溶菌像を観察することができた。一方、LMOX では 25  $\mu\text{g/ml}$  を作用させた際、溶菌像を認めた (Fig. 6)。

Fig. 7 は正常な *E. coli* NIHJ JC-2 の電顕像で、桿状形態を示し分裂時の細胞も認められた。Fig. 8 は imipenem 及び LMOX をそれぞれ 0.025, 0.1 及び 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させた際の電顕像である。Imipenem を 0.1 及び 0.39  $\mu\text{g/ml}$  作用させた際、菌体は spheroplast 様構造を形成した。LMOX では 0.1 及び 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を作用させた際、filament 状細胞を形成し、中央部が膨化した bulge form 像が認められた。

正常な *P. aeruginosa* IFO 3445 の走査電顕像を Fig. 9 に示した。表面構造は smooth であり桿状形態を示した。MK-0787 を 0.39 及び 1.56  $\mu\text{g/ml}$  作用させた際、菌体は球形化し、spheroplast 様構造を観察することができた。一方、LMOX では菌体は伸長化し、薬剤の上昇に伴い伸長化は更に顕著となり細胞は filament 化した (Fig. 10)。

9. 感染防御効果

*S. aureus* Smith, *E. coli* GAI 392, *K. pneumoniae* IFO 13541, *K. oxytoca* 230-1, *E. cloacae* IFO 13535, *P. mirabilis* IFO 3849, *M. morgani* IFO 3848, *S. marcescens* IFO 3736 及び *P. aeruginosa* IFO 3445 を用いたマウス感染防御実験の結果を Table 13 に示した。

*S. aureus* Smith 感染マウスにおいて imipenem は他剤より約 67~670 倍優れた ED<sub>50</sub> 値を示したが、imipenem 単剤と imipenem/cilastatin sodium 配合剤の間では、その ED<sub>50</sub> 値に差は殆ど認められなかった。

*E. coli* GAI 392 感染マウスにおいては、LMOX, CPZ, imipenem/cilastatin sodium 配合剤, imipenem 単剤の順で優れた効果を示した。

*K. pneumoniae* IFO 13541 感染マウスにおいては、CZX より劣るものの、LMOX, CPZ 及び PIPC より優れた効果を示した。

*K. oxytoca* 230-1 感染マウスにおいては、LMOX, CZX, imipenem/cilastatin sodium 配合剤, imipenem 単剤の順で優れており、CPZ 及び PIPC は無効であった。

*E. cloacae* IFO 13535 感染マウスにおいては、LMOX, imipenem/cilastatin sodium 配合剤, imipenem 単剤, CZX の順で優れており、CPZ 及び PIPC は無効であった。

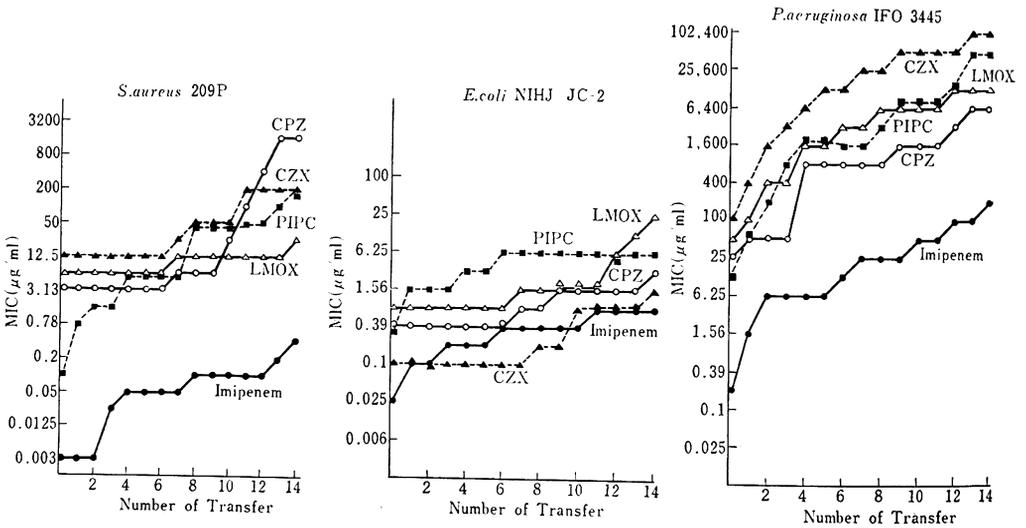
*P. mirabilis* IFO 3849 感染マウスにおいては、imipe-

Table 10 Effect of horse serum on antibacterial activity of imipenem

Organisms	Horse serum	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
		Imipenem		CPZ		CZX		LMOX		PIPC	
		$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$	$10^8$	$10^6$
<i>S. aureus</i> Smith	0%	0.025	0.013	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	12.5	0.78	0.78
	10	0.025	0.013	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	6.25	1.56	1.56
	25	0.025	0.025	1.56	1.56	3.13	3.13	12.5	12.5	1.56	0.78
	50	0.025	0.025	1.56	1.56	6.25	6.25	25	12.5	0.78	0.78
<i>E. coli</i> GAI-392	0%	0.39	0.1	0.1	0.1	0.39	0.1	0.2	0.2	1.56	0.78
	10	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	1.56	1.56
	25	0.39	0.2	0.1	0.1	0.39	0.1	0.2	0.1	1.56	0.78
	50	0.78	0.2	0.1	0.1	0.39	0.2	0.39	0.2	1.56	0.78
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	0%	1.56	0.78	12.5	12.5	>100	50	25	12.5	12.5	6.25
	10	0.39	0.39	6.25	6.25	100	100	25	12.5	12.5	6.25
	25	0.78	0.39	3.13	1.56	100	50	25	12.5	12.5	3.13
	50	0.2	0.1	0.05	0.025	100	25	12.5	6.25	12.5	3.13
<i>B. fragilis</i> GAI-558	0%	0.78	0.39	>100	>100	>100	50	12.5	12.5	>100	50
	10	0.78	0.39	>100	>100	>100	50	12.5	12.5	>100	50
	25	0.78	0.39	>100	>100	>100	50	12.5	12.5	>100	50
	50	0.78	0.39	>100	>100	>100	50	12.5	6.25	>100	50

\* cells/ml

Fig. 2 Patterns of development of resistance of *S. aureus* 209p, *E. coli* NIHJ JC-2 and *P. aeruginosa* IFO 3445 to imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics



nem は CZX, CPZ, PIPC そして LMOX より劣っていた。imipenem/cilastatin sodium 配合剤の ED<sub>50</sub> 値は imipenem 単剤の値より約 5 倍優れていた。

*M. morgani* IFO 3848 感染マウスにおいても、imipenem は PIPC より優れていたものの、CZX, CPZ そして LMOX より劣っていた。

*S. marcescens* IFO 3736 感染マウスにおいても、imipenem は PIPC より優れていたものの、CZX, LMOX そして CPZ より劣っていた。

*P. aeruginosa* IFO 3445 感染マウスにおいては、抗緑膿菌剤である CFS より imipenem 単剤で 13 倍、imipenem/cilastatin sodium 配合剤で 42 倍優れていた。

Table 11 Antimicrobial activity of imipenem against  $\beta$ -lactamase producing strains

Organisms	$\beta$ -Lactamase activity (U/mg of protein)		*MIC ( $\mu$ g/ml)		
	PCase	CSase	PCG	CER	Imipenem
<i>E. coli</i> GN255		0.46		100	0.2
<i>E. cloacae</i> GN7446		1.03		>100	0.78
<i>C. freundii</i> GN346		4.92		>100	0.39
<i>S. marcescens</i> GN629		0.03		>100	0.78
<i>P. aeruginosa</i> 75		0.97		>100	1.56
<i>P. vulgaris</i> GN76		0.71		>100	6.25
<i>P. maltophilia</i> 100-1		0.08		>100	>100
<i>B. fragilis</i> GAI-7533		3.97		>100	6.25
<i>K. pneumoniae</i> GN5547	1.01		>100		0.05
<i>E. coli</i> ML1410 GN238	0.002		50		0.05
<i>A. hydrophila</i> IF03820	0.08		>100		3.13
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	8.0		>100		0.39

\*MIC :  $10^8$  cells/ml

Table 12 Correlation between MICs and MBCs of imipenem (MBC/MIC)

Organisms	Inoculum size*	MIC ( $\mu$ g/ml)				
		Imipenem	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>S. aureus</i> Smith	$9.2 \times 10^3$	0.013/0.013	1.56/0.78	6.25/3.13	6.25/3.13	0.78/0.39
	$9.2 \times 10^5$	0.025/0.013	3.13/3.13	6.25/3.13	12.5/6.25	1.56/1.56
<i>E. coli</i> GAI-392	$1.7 \times 10^4$	0.1/0.1	0.1/0.05	0.05/0.05	0.1/0.1	1.56/0.78
	$1.7 \times 10^6$	0.39/0.2	0.2/0.2	0.39/0.39	0.2/0.2	3.13/1.56
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	$1.0 \times 10^3$	0.39/0.2	12.5/6.25	50/25	25/12.5	6.25/3.13
	$1.0 \times 10^5$	1.56/0.78	25/6.25	100/50	50/25	12.5/6.25
<i>B. fragilis</i> GAI-558	$2.2 \times 10^4$	0.78/0.78	>100/>100	>100/50	6.25/6.25	>100/100
	$2.2 \times 10^6$	1.56/1.56	>100/>100	>100/>100	12.5/6.25	>100/>100

\* cells/ml

Fig. 3 Bactericidal effect of imipenem, CPZ and CZX on *E. coli* NIHJ JC-2

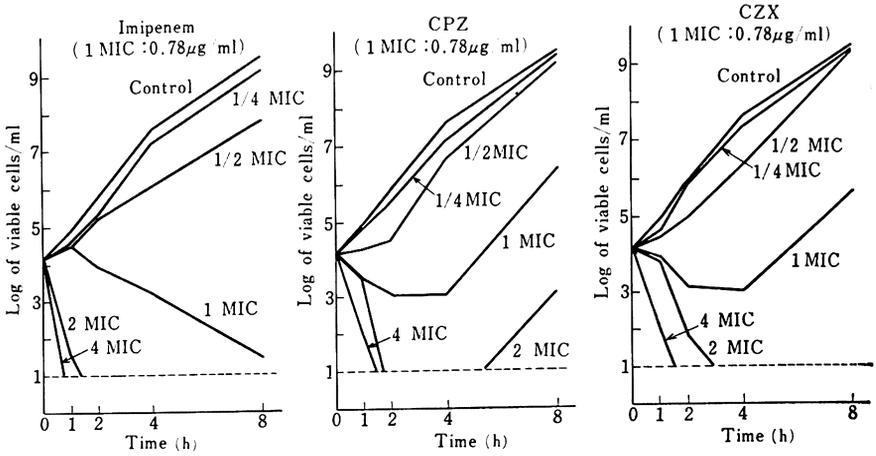


Fig. 4 Bactericidal effect of imipenem, CPZ and CZX on *P. aeruginosa* IFO 3445

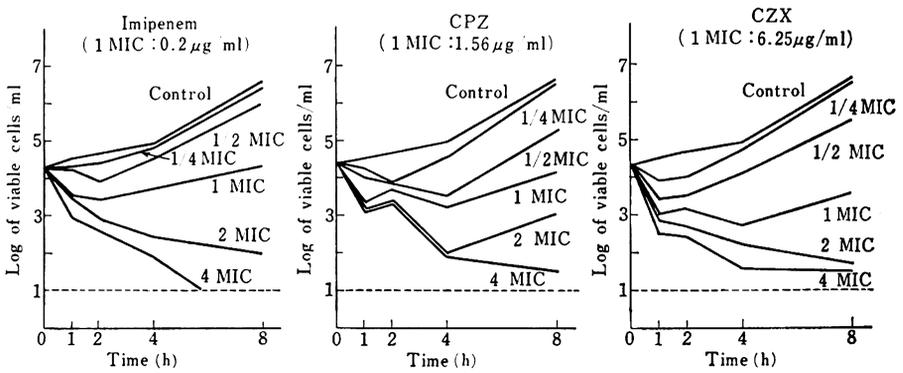


Fig. 5 Scanning electron micrograph of control cells of *S. aureus* 209 P JC-1 (bar : 1  $\mu\text{m}$ )

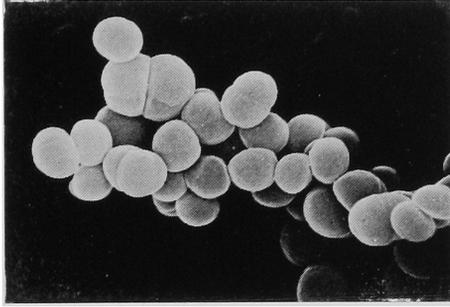


Fig. 6 Scanning electron micrographs of *S. aureus* 209 P JC-1 exposed to imipenem and LMOX for 2 hours (bar : 1  $\mu\text{m}$ )

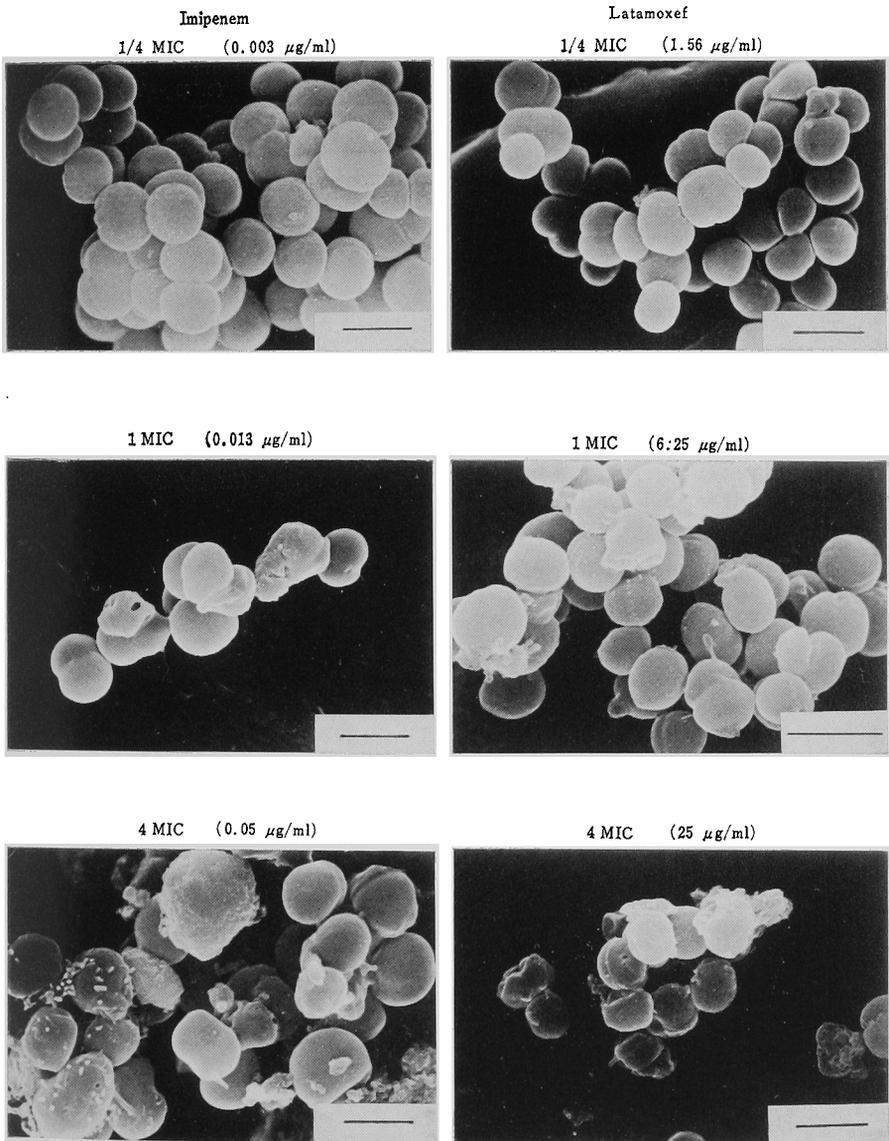


Fig. 7 Scanning electron micrograph of control cells of *E. coli* NIHJ JC-2 (bar : 1  $\mu$ m)

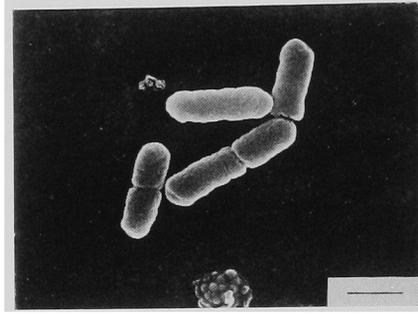


Fig. 8 Scanning electron micrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 exposed to imipenem and LMOX for 2 hours (bar : 1  $\mu$ m)

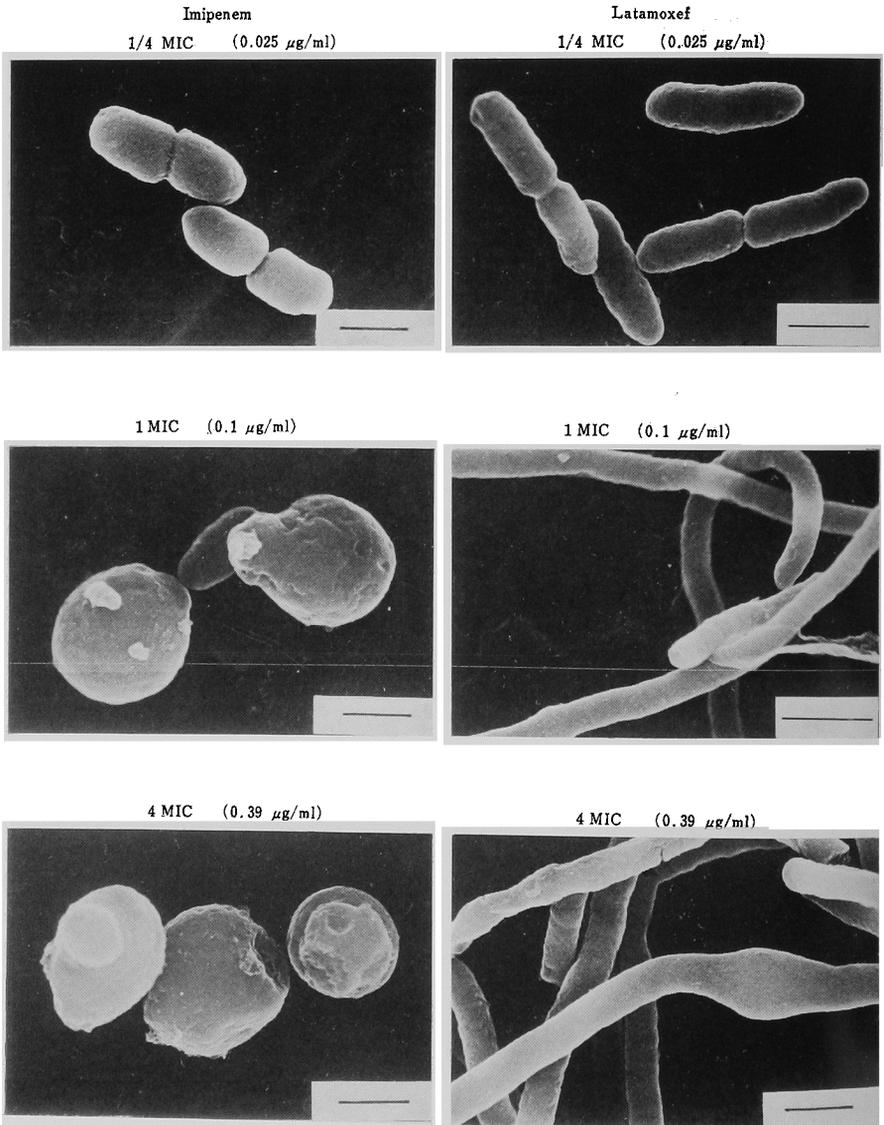


Fig. 9 Scanning electron micrograph of control cells of *P. aeruginosa* IFO 3445 (bar : 1  $\mu\text{m}$ )

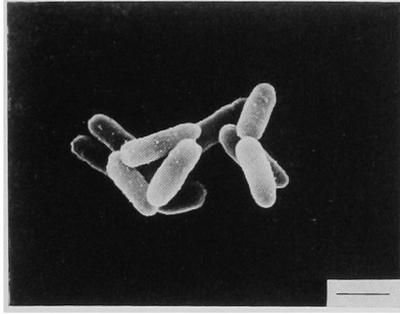


Fig. 10 Scanning electron micrographs of *P. aeruginosa* IFO 3445 exposed to imipenem and LMOX for 2 hours (bar : 1  $\mu\text{m}$ )

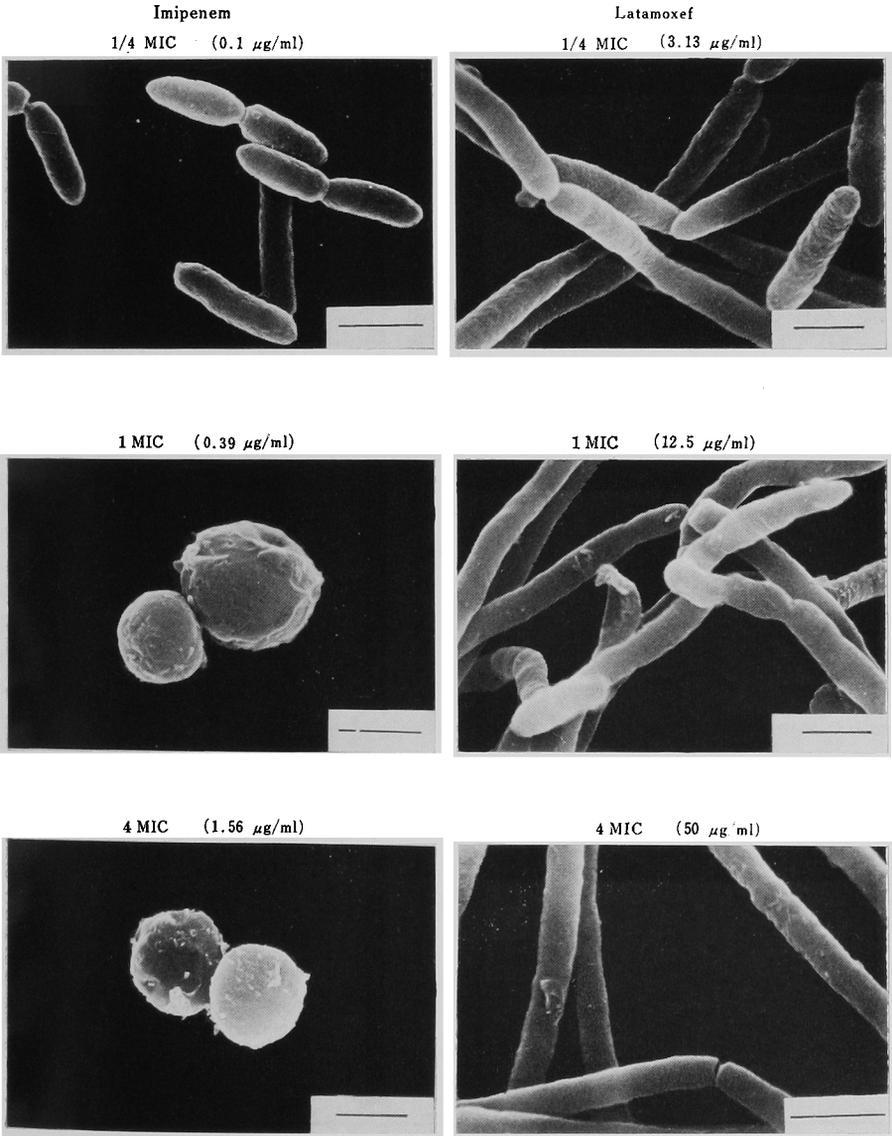


Table 13 *In vivo* antibacterial activity of imipenem against systemic infections

Organisms	Challenge dose (cells/mouse)	Therapy		Drug	MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) $10^6$ cells/ml	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)
		times	hrs.			
<i>S. aureus</i> Smith	$1.9 \times 10^5$	2	0, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ LMOX	0.006 0.013 0.78 3.13	0.0005 0.0096 0.04 0.4
<i>E. coli</i> GAI-392	$2.1 \times 10^2$	2	0, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ LMOX	0.1 0.1 0.05 0.05	0.0078 0.018 0.0063 0.0035
<i>K. pneumoniae</i> IFO13541	$2.1 \times 10^7$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	0.2 0.2 0.05 0.006 0.1 0.78	0.04 0.057 0.57 0.0047 0.19 >10
<i>K. oxytoca</i> 230-1	$6.1 \times 10^6$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	0.2 0.2 >100 0.05 0.1 >100	0.035 0.089 >10 0.032 0.019 >10
<i>E. cloacae</i> IFO 13535	$1.5 \times 10^7$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	0.2 0.2 1.56 3.13 3.13 6.25	0.047 0.050 >10 0.41 0.072 >10
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	$3.8 \times 10^7$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	3.13 3.13 0.78 0.013 0.2 0.2	0.36 1.87 0.022 0.012 0.12 0.099
<i>M. morgani</i> IFO 3848	$1.2 \times 10^7$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	0.39 0.39 0.013 0.006 0.05 0.006	0.051 0.10 0.016 0.0076 0.035 0.80
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	$1.0 \times 10^4$	2	1, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ CZX LMOX PIPC	0.39 0.39 0.78 0.05 0.2 0.78	0.16 0.18 0.047 0.0062 0.010 0.40
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	$5.3 \times 10^6$	2	0, 4	Imipenem/Cilastatin sodium Imipenem CPZ LMOX CFS	0.39 0.39 6.25 12.5 1.56	0.019 0.063 >20 6.41 0.80

## III. 考 察

Imipenem は desthiocarbapenem を母核とする新規  $\beta$ -lactam 剤である。本剤は *P. aeruginosa* を含むグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対し、強い抗菌力を有すると同時に、細菌の産生する各種の  $\beta$ -lactamase に対し非常に安定であるといわれている。しかしながら一方では、生体内酵素、dehydropeptidase-I (DHP-I) により加水分解を受けることが判明している<sup>9)</sup>。そのため現在、本剤は DHP-I に対する選択的阻害剤である cilastatin sodium との配合剤として開発が検討されている。

Imipenem の *in vitro* 抗菌力を CPZ, CZX, LMOX 及び PIPC と比較したところ、グラム陽性菌群に対しては、用いたいずれの薬剤より顕著に優れた抗菌力を示した。特に従来の cephalosporin 剤が無効とされている *E. faecalis* に対しても優れた抗菌力を示した。Enterobacteriaceae 群に対しては、PIPC よりは優れているものの、CPZ, CZX そして LMOX と同等もしくは僅かに優れている程度であった。ブドウ糖非発酵グラム陰性菌に対しては *P. aeruginosa* において抗 *Pseudomonas* 製剤である CPZ の 16 倍の MIC<sub>90</sub> 値 (10<sup>6</sup> cells/ml 菌液接種) を示した。また、*P. maltophilia* を除く他の菌種に対しても用いたいずれの薬剤よりも優れた抗菌力を示した。偏性嫌気性菌に対しては、*B. fragilis* において CPZ の 512 倍、CZX, LMOX の 32 倍、そして PIPC の 128 倍の MIC<sub>90</sub> 値 (10<sup>6</sup> cells/ml 菌液接種) を示した。Imipenem の広範囲の菌種に対する強い抗菌力に加えて、いずれの菌種においても耐性菌が存在せず、感受性の分布がきわめて狭い範囲に分布していることも大きな特徴の一つである。Imipenem は第3世代の cephalosporin 剤である CZX 及び LMOX と同様、強い殺菌作用と  $\beta$ -lactamase に対する安定性を有していた。しかし、*P. aeruginosa* における耐性獲得試験において用いた他剤と同様、高い耐性獲得率を示した事は今後、耐性菌の出現に注意を要するものと考えられる。一方、cilastatin sodium は全く抗菌力を示さず、そして *in vitro* には imipenem の抗菌力にも影響を与えなかった。

Imipenem の感染防御効果を *in vitro* での抗菌力と同様、CPZ, CZX, LMOX 及び PIPC と、そして *P. aeruginosa* においては CFS を加え比較した。各薬剤の感染防御効果 (ED<sub>50</sub> 値) はその MIC 値とよく相関していた。Imipenem はグラム陽性菌 (*S. aureus* Smith) に

対しては他剤より顕著に優れていたが、Enterobacteriaceae 群においては PIPC より優れていたものの、CPZ 及び LMOX と同程度で、CZX よりは劣っていた。そして、ブドウ糖非発酵グラム陰性菌 (*P. aeruginosa* IFO 3445) に対しては抗 *Pseudomonas* 製剤である CFS 及び CPZ より優れていた。一方、菌種において程度の差はあるものの、imipenem/cilastatin sodium 配合剤の ED<sub>50</sub> 値は、imipenem 単剤の値より優れていた。このことはすでに報告されている血中及び組織内濃度の差と一致する<sup>9)</sup>。

*In vitro* 及び *in vivo* におけるこれらの結果より imipenem は優れた臨床効果が期待される薬剤であると思われる。

## 文 献

- 1) KAHAN, J. S.; F. M. KAHAN, R. GOEGELMAN, S. A. CURRIE, M. JACKSON, E. O. STAPLEY, T. W. MILLER, A. K. MILLER, P. HENDLIN, S. MOCHALES, S. HERNANDEZ, H. B. WOODRUFF & J. BIRNBAUM: Thienamycin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic, I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot.* 32: 1~12, 1979
- 2) 横田 健, 丸山映子, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代: 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。 *Chemotherapy* 33 (S-4): 43~53, 1985
- 3) KROPP, H.; J. G. SUNDELOF, R. HAJDU & F. M. KAHAN: Metabolism thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase-I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 62~70, 1982
- 4) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 5) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 27: 559~560, 1979
- 6) NOVICK, R. P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962
- 7) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & B. J. RANDALL. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 8) 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

## IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF IMPENEM/CILASTATIN SODIUM

TADATAKA KESADO, YOSHINARI ASAHI, AISAKU FUSE, TERUTAKA HASHIZUME  
MIEKO OGASHIWA, TETSURO KOMATSU and YASUHIRO OKUMOTO  
Research Laboratories, Nippon Merck Banyu Co., Ltd.

Imipenem (MK-0787 : *N*-formimidoyl thienamycin) is a new carbapenem antibiotic with an antibacterial spectrum covering most gram-positive and gram-negative aerobic and anaerobic bacterial species, including *P. aeruginosa* and *E. faecalis*. However, imipenem is metabolised by breakage of the  $\beta$ -lactam bond by a dipeptidase, dehydraseptidase-I in the kidney. Cilastatin sodium (MK-0791) is a selective inhibitor of the dehydropeptidase. The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of MK-0787/MK-0791 were compared with those of CPZ, CZX, LMOX, PIPC and CFS. The following results were obtained.

- 1) MK-0787 had a broad spectrum with potent activity against gram-positive and gram-negative bacteria including obligate anaerobes. On the other hand, MK-0791 did not have an antimicrobial activity.
- 2) The antibacterial activity of MK-0787 was bactericidal at the MIC, and was changed by pH 8.0 of medium.
- 3) MK-0787 had the same stability as LMOX against penicillinase and cephalorporinase.
- 4) Microorganisms such as *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* aquired resistance to MK-0787, as the same as CPZ, CZX LMOX and PIPC, *in vitro*.
- 5) The morphological change in *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* was observed by an electron microscope. MK-0787 made the mecillinam like bacteria.
- 6) The therapeutic effect of MK-0787 on experimental infection in mice against gram-positive and glucose non-fermentative gram-negative bacteria was remarkably superior to those of CPZ, CZX, LMOX, PIPC and CSF. However, the effect of MK-0787 against Enterobacteriaceae was the same or slightly superior to those of reference antibiotics.