

腸球菌およびメチシリン耐性のブドウ球菌に対する imipenem の抗菌作用

生方公子・山下直子・松下真理・紺野昌俊

帝京大学医学部臨床病理

増田真理子・野々口律子

帝京大学医学部附属溝口病院小児科

(昭和60年10月7日受付)

臨床検査材料より分離された *E. faecalis* 92 株, *E. faecium* 30 株, *E. avium* 18 株の腸球菌と, メチシリン耐性の *S. aureus* 61 株およびコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 130 株に対する imipenem の抗菌作用について他の β -ラクタム系薬剤のそれと比較し, 以下のような成績を得た。

1. *E. faecalis* に対する imipenem の抗菌力は, 薬剤感受性成績および PBP に対する親和性成績の上からも, ampicillin と同等であることが確かめられた。

2. しかしながら, ABPC 耐性の *E. faecium* や *E. avium* に対しては, 他の β -ラクタム系薬剤と同様に imipenem の抗菌力も劣っているという結果であった。

3. メチシリン耐性のブドウ球菌に対しては, 日本化学療法学会の標準法である接種菌量 10^6 CFU/ml, 培養温度 37°C の条件下では imipenem は cefazolin, cefmetazole, ceftizoxime などと比べて明らかに優れた感受性成績を示し, 約半数の菌株は $0.78 \mu\text{g/ml}$ 程度の MIC を示した。しかしながら, MIC 測定時の培養温度を 30°C とした場合, あるいは接種菌量を 10^8 CFU/ml とした場合, MIC は耐性側へ大きく shift し, 大部分の菌株は耐性菌とみなされた。

4. 3. 項のような現象の生ずる原因として, imipenem による PBP-2' の誘導と, その結果として生ずると予測される double zone 形成の有無を観察し, imipenem による PBP-2' の誘導が MIC に大きく影響していることを推定した。

5. 上述の成績から, imipenem はメチシリン耐性菌に対しては抗菌力を有しているようにみえるが, 本質的には耐性であると考えられた。本薬が投与される患者の状態によっては, メチシリン耐性菌であっても本薬は効力を発揮する可能性は有するが, 長期投与によっては耐性を誘導して無効となる可能性のあることが予測された。

MK-0787 (imipenem) は, メルク社で研究開発された thienamycin の N-formimidoyl 誘導体であり, 特異な化学構造を有する β -ラクタム系の抗生物質である。本薬はグラム陰性桿菌からグラム陽性球菌に至る多くの菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有しており, 特に近年開発されつつある第3世代のセフェム系薬剤の多くが, 第1, 第2世代のセフェム系薬剤に比較して球菌に対する抗菌力が劣っているのに比べ, 球菌に対する抗菌力が優れているとされている。

上述したようなことから, 私達は本邦においても臨床問題となりつつある, いわゆる腸球菌とメチシリン・セフェム耐性のブドウ球菌 (MRS) とに対する imipenem の抗菌作用を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

1983年1月から翌年1月までの期間に, 当大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室で扱った検査材料から分離された腸球菌 140 株と, ブドウ球菌 191 株とを対象とした。腸球菌の菌種別内訳は, *E. faecalis* が 92 株, *E. faecium* が 30 株, *E. avium* が 18 株である。ブドウ球菌は, ディスクによる感受性測定で cloxacillin (MCIPC), cefazolin (CEZ) などに明らかに耐性を示した *S. aureus* 61 株およびコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 130 株を用いた。

2. 薬剤感受性の測定

感受性測定に際しては日本化学療法学会の標準法¹⁾に

準じたが、腸球菌の感受性測定のためには感受性測定培地(栄研)に綿羊脱繊維血液を5%の割合に加えて使用した。

被験菌は感受性 broth(栄研)で18時間培養(腸球菌は37°C,ブドウ球菌は30°Cで培養)後,原液と100倍希釈液との両者を接種菌として用いた。MICを測定した薬剤は,腸球菌については imipenem, ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), cephaloridine (CER), cefpiramide (CPM), ceftizoxime (CZX) の計6薬剤,ブドウ球菌については, imipenem, CEZ, cefmetazole (CMZ), CZX の計4薬剤である。感受性測定培地への被験菌接種後の培養温度は,通常37°Cに設定したが,ブドウ球菌の一部については,MICへの温度の影響をみるために30°Cに設定した。

3. penicillin-binding proteins に対する薬剤の親和性測定

定型的な性状を有する *E. faecalis* TK 34 株, *E. faecium* TK 44 株, および *E. avium* TK 48 株を選び, penicillin-binding proteins (PBPs) に対する薬剤の親和性を検討した。各菌株からの膜画分採取には感受性 broth を用いて菌を培養し,対数増殖期の後期に集菌して, SPRATT の方法²⁾に準じて膜画分を調整した。PBP に対する各薬剤の親和性の検討は,種々の濃度に希釈したそれぞれの被験薬を膜画分に加えて32°Cで10分間反応させ,次いで¹⁴C-benzylpenicillin を最終濃度が0.2 mM になるように加えてさらに10分間インキュベートした後,反応を終了させた。電気泳動を含む以降の操作は,先に述べた方法³⁾に準じて行なった。ブドウ球菌におけるPBP-2'の誘導実験は,既に報告³⁾している条件に準じて行なった。蛋白の分画に用いた最終ゲル濃度はアクリルアミド7.4%,ビスアクリルアミド0.086%になるように調整した。

4. 殺菌効果

β -ラクタム剤によってメチシリン耐性が誘導される MRSA TK 389 株を用いて, imipenem で誘導しない状態および0.2 μ g/ml の imipenem で誘導した後の菌に対する imipenem の殺菌効果を比較検討した。すなわち,被験菌液は imipenem 無添加あるいは0.2 μ g/ml になるようにした状態で一夜培養し,その菌液を新しい培地に 10^4 CFU/ml になるように接種して,菌数がほぼ 10^5 CFU/ml 以上に達した時点で種々の濃度の imipenem を添加した。生菌数は,薬剤添加後3,6,9,および24時間後に測定した。なお,実験中の培養温度はすべて30°Cに設定して行なった。

Fig. 1 Susceptibility distribution of *E. faecalis* 92 strains to various β -lactams

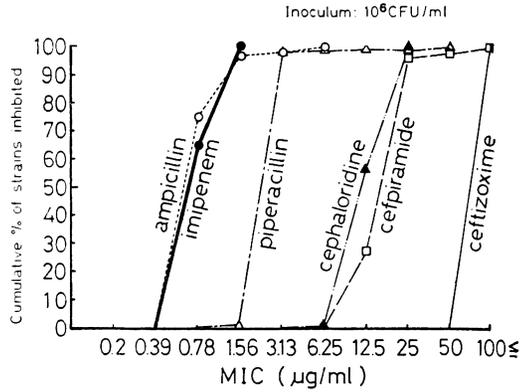


Fig. 2 Susceptibility distribution of *E. faecium* 30 strains to various β -lactams

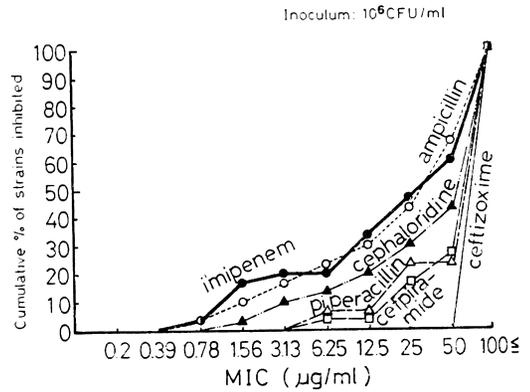


Fig. 3 Susceptibility distribution of *E. avium* 18 strains to various β -lactams

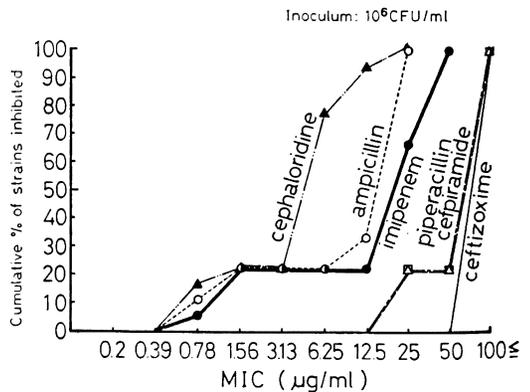
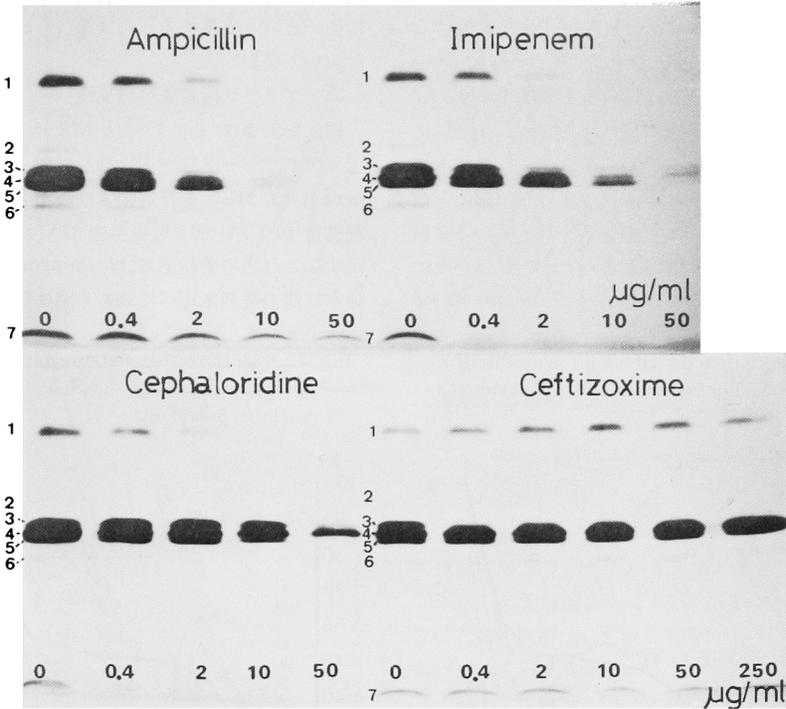


Fig. 4 Binding of β -lactams to PBPs of *E. faecalis* TK 34 strain



MIC : Ampicillin=0.78 μ g/ml, Imipenem=0.78 μ g/ml, Cephaloridine=12.5 μ g/ml, Ceftizoxime=100 μ g/ml

II. 結 果

1. 腸球菌の薬剤感受性

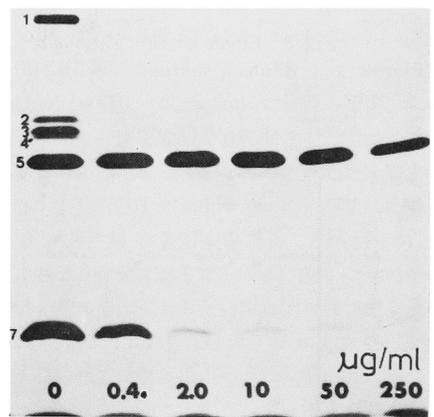
E. faecalis 92 株の imipenem に対する感受性成績を Fig.1 に示す。本菌の imipenem に対する MIC 分布は、0.78 μ g/ml にピークを有する一峰性を示し、その成績は *E. faecalis* に最も抗菌力の優れている ABPC と同等であり、比較検討した他の β -ラクタム系薬剤に比べてはるかに優れた抗菌力を有していた。

E. faecium と *E. avium* の2菌種の imipenem に対する抗菌力は、Fig. 2 と Fig. 3 に示したように、一部の菌株は imipenem に感受性を有していたものの、大部分の菌株においては ABPC と同様に好感受性を示さず、耐性であると判断された。

2. 腸球菌の PBP に対する imipenem の親和性

Fig. 4 に、*E. faecalis* TK 34 株の各 PBP に対する imipenem の親和性を、他の β -ラクタム系薬剤のそれと比較した成績を示す。各 PBP は、分子量の大きい方から順に番号を付してあるが、抗菌力と最も関係のあるとされる PBP-4 と PBP-5 に対しては、imipenem は

Fig. 5 Binding of imipenem to PBPs of *E. faecium* TK 44 strain



MIC : Imipenem=>100 μ g/ml

ABPC とほぼ同等の親和性を示しており、この菌種における imipenem の抗菌力の良さと一致していた。Fig. 4 の下段に示した CER や CZX においては、これらの

PBP に対する親和性は、imipenem に比べて明らかに劣っているという結果であった。

Fig.5 には、*E. faecium* TK 44 株の PBP に対する imipenem の親和性の成績を示す。TK 44 株は imipenem に 100 μ g/ml 以上の MIC を示す株であり、*E. faecium* における ABPC 耐性の本質は、Fig.5 に PBP-5 として示した PBP が過剰産生されるためであると推測されているが、imipenem においても PBP-5 に対する親和性は低く、抗菌力の弱さと平行している成績であった。なお、写真には示さなかったが、私達が既に報告したように、ABPC に耐性を示す *E. avium* TK 48

株においては、 β -ラクタム系薬剤によって誘導される PBP に対する imipenem の親和性は、他の薬剤と同様に低いという成績であった(第 14 回国際化学療法学会において発表)。

3. ブドウ球菌の薬剤感受性

Fig.6 および Fig.7 には MRSA の *S. aureus* 61 株とコアグラゼ陰性ブドウ球菌 130 株に対する imipenem の MIC を日本化学療法学会標準法に準じて接種菌量 10^6 CFU/ml、培養温度 37°C にて測定した成績を示す。これらの条件下では、imipenem に対する MIC 分布は他の薬剤に比べて著しく感性側にあり、両菌種に

Fig.6 Susceptibility distribution of methicillin-resistant *S. aureus* 61 strains to various β -lactams

Fig.7 Susceptibility distribution of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci to various β -lactams

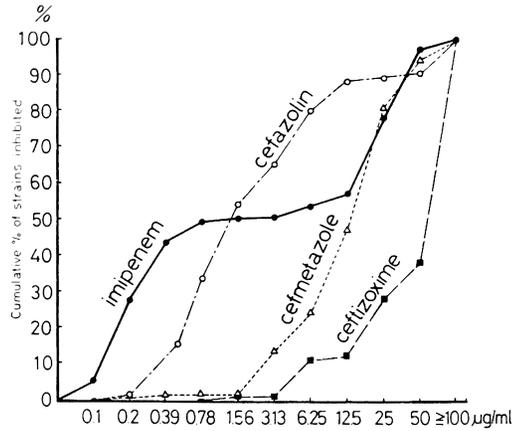
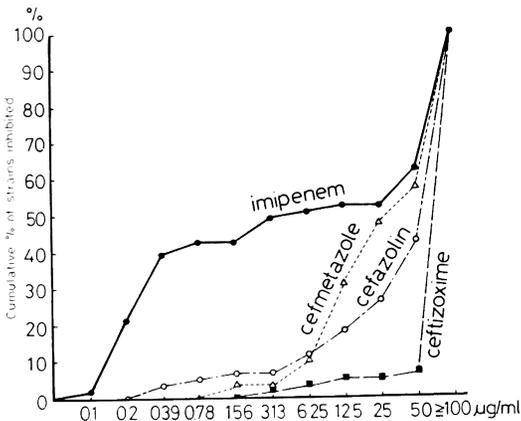


Fig.8 Effect of inoculum size on antibacterial activity of imipenem by agar dilution method

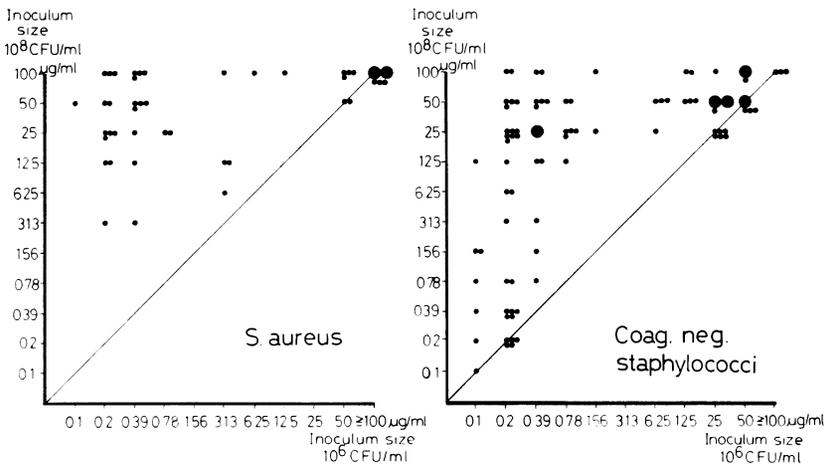


Fig.9 Effect of inoculum size and incubation temperature on antibacterial activity of imipenem. Organism: methicillin-resistant *S. aureus* 27 strains

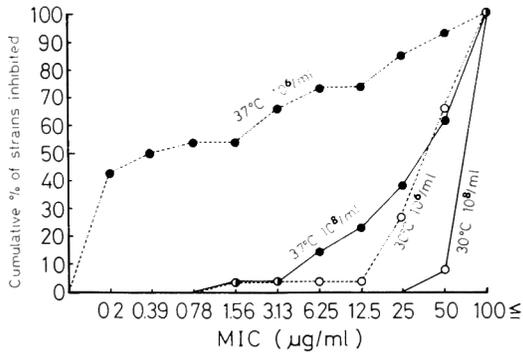
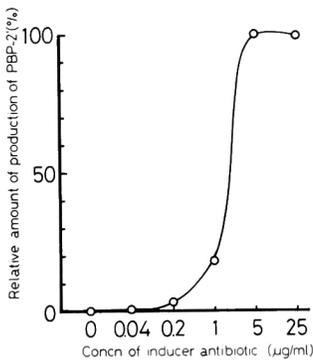


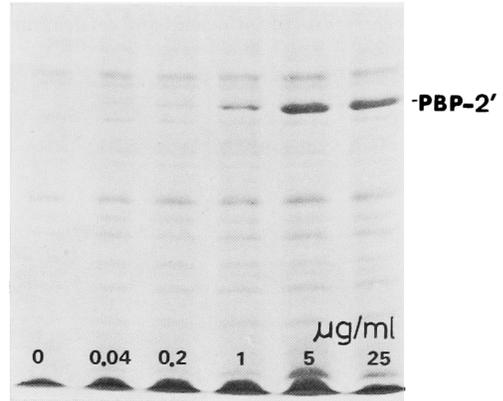
Fig.10 Inducibility of PBP-2' by imipenem in *S. epidermidis* TK 497 strain



おける約 40~50% の菌が 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$ という良好な MIC を示し、残りの約半数の菌株が 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示すという二峰性の分布が示された。つまり、この成績からは約半数の MRSA が imipenem に感性であると判定される結果となった。しかしながら、接種菌量を原液接種とした時の MIC 値の変動を検討すると (Fig. 8), 特に 10^6 CFU/ml の菌接種時に感性とみえた菌株の MIC 値が耐性側へ大きく shift し、大部分の菌株が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示すようになり、この条件下では耐性と判定される成績となった。

MRS においては、培養温度によってその MIC 値が変動することが知られている⁵⁻⁷⁾が、Fig. 9 には、*S. aureus* 27 株について培養温度を変えた場合における MIC の変動を累積分布曲線で示した。MIC 測定時の培養温度を変えるだけで、imipenem においても MIC 値

Fig.11 Inducibility of PBP-2' by imipenem in *S. epidermidis* TK 497 strain



Gel was stained by coomassie brilliant blue G-250

が極端に変動することが明らかである。ちなみに 10^6 CFU/ml の接種菌量時に 37°C から 30°C に培養温度を下げた時の成績は、原液接種時の 37°C における成績とほぼ一致する成績であった。

上述した成績からは、ある感受性測定条件下では一見 imipenem に対しては感性であると判定される MRSA も、本質的には imipenem に対しても耐性であると考えられた。このような MIC の変動要因として、imipenem による PBP-2' の誘導を考え、imipenem の至適誘導濃度の検討と、その結果として生ずると思われる “double zone” 形成の有無を検索した。

Fig. 10 および Fig. 11 には、*S. epidermidis* TK 497 株 (10^6 CFU/ml 接種時の MIC : 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10^8 CFU/ml 接種時の MIC : 25 $\mu\text{g/ml}$) における PBP-2' の誘導状況を示した。誘導時間を 6 時間とした際に、誘導する薬剤濃度の相違による PBP-2' の産生量を比較すると、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の imipenem に菌が触れた場合に、PBP-2' の産生量が著しく高まることが明らかとなった。このような菌に対して、種々の濃度の imipenem を含むディスクを作製してその阻止円を観察すると、Fig. 12 に示したように、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の imipenem を含むディスクの周囲では阻止円の形成のみしか見られないが、5.0 $\mu\text{g/ml}$ の imipenem を含むディスク周囲においては、明らかな菌の発育が認められた。つまり、PBP-2' を誘導する至適薬剤濃度は “double zone” を形成する薬剤濃度と良く一致しており、PBP-2' の量的増加が耐性と関連していることを示唆する成績であった。このような “double zone” は、メチシリン耐性のコアグララーゼ陰

Fig. 12 Double zone phenomenon obtained with methicillin-resistant *S. epidermidis* TK 497 strain tested against disks with various concentrations of imipenem and ceftizoxime

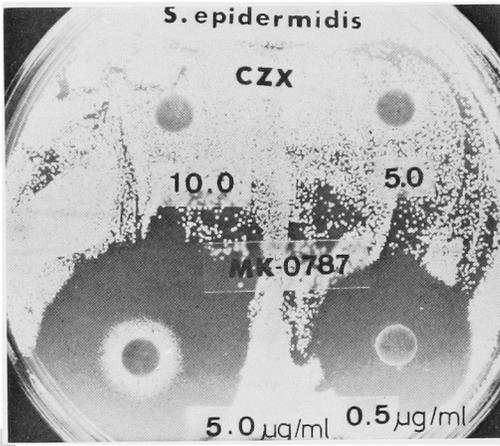


Fig. 13 Time-kill curve of imipenem on methicillin-resistant *S. aureus* TK 389 strain

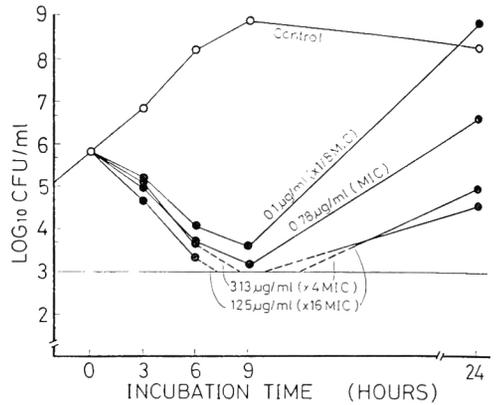
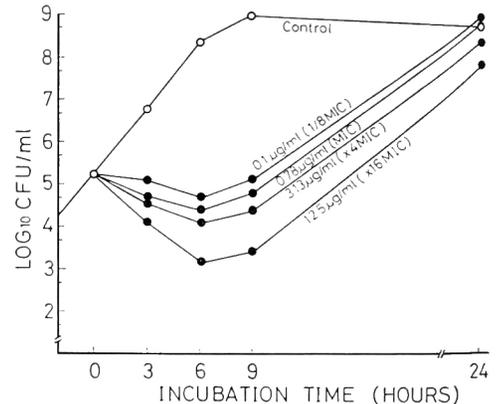


Fig. 14 Time-kill curve of imipenem on methicillin-resistant *S. aureus* TK 389 strain after induction with 0.2 µg/ml of same antibiotic



性ブドウ球菌においてより容易に出現し易いが、メチリン耐性の *S. aureus* においても見られる現象である。
 4. MRSA TK 389 株に対する imipenem の殺菌効果

方法の 4. 項に記した培養条件に従って前培養した *S. aureus* TK 389 株 (10^6 /ml 接種時の MIC : $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$, 10^8 /ml 接種時の MIC : $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) に対して、種々の濃度の imipenem を作用させた際の経時的殺菌効果の成績を Fig. 13 および Fig. 14 に示す。Fig. 13 は前培養時に imipenem を添加していない場合である。この条件下では、MIC 以下の低い濃度の薬剤添加によっても経時的な生菌数の減少が観察され、9 時間後には 10^3 オーダーにまで減少し、一時的にはかなり強い殺菌作用を示すことが明らかにされた。しかしながら、24 時間後には、検討したいずれの薬剤濃度下においても生菌数は増加しており、菌はある一定時間経過後に再び増殖してくるものと推測された。

Fig. 14 には $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の imipenem を添加して前培養した菌に対する imipenem の殺菌作用の成績を示す。低濃度の薬剤に一度触れさせた菌に対しては、imipenem の殺菌作用は著しく弱まり、MIC 以上の imipenem を作用させても経時的生菌数の減少は緩慢となることが示された。

III. 考 察

imipenem は放線菌より単離された thienamycin の 2 位側鎖を修飾したカルバペネム系抗生物質である。本

薬は、ブドウ球菌を含むグラム陽性球菌から *P. aeruginosa* を含むグラム陰性桿菌にわたる広範囲の細菌に対して極めて強い抗菌力を示すとされ、しかも各種の β -ラクタマーゼに対して安定であり、なおかつその阻害活性を有するとされている。本論文は、そのような特徴を有する薬剤が、既存の β -ラクタム系薬剤に比べて、臨床問題となってきた腸球菌や MRSA に対して、どの程度の抗菌力を有するかを知らうとしたものである。

私達が行なった実験成績からは、腸球菌のうち臨床的に分離頻度の高い *E. faecalis*, *E. faecium* および *E. avium* に対する、imipenem の抗菌力は、従来の β -ラクタム系薬剤の中では最も抗菌力の優れている ABPC

とほぼ同等であることが、MIC 分布や PBP に対する結合成績の上から明らかにされたと考える。すなわち、imipenem は *E. faecalis* には ABPC と同様の効力を有しているが、今後臨床的に増加するであろうと予測される ABPC 耐性の *E. faecium* や *E. avium* に対しては、効力は期待し難いということである。*E. faecium* が imipenem に耐性を示す本質は、PBP-5 が過剰産生されるためであるとされており⁴⁾。私達の実験もそれを裏付けるものであった。一方、*E. avium* の β -ラクタム系薬剤耐性の本質については今までに報告はないが、私達は *E. avium* の場合は *E. faecium* とやや異なり、MRS と同様の β -ラクタム系薬剤によって誘導される PBP が存在し、それに対する β -ラクタム系薬剤の親和性が劣ることがその本質と考えている⁹⁾。その詳細については別に報告する予定であるが、誘導される PBP に対する imipenem の親和性の成績は他の薬剤と同じような結果であった。

一方、メチシリン耐性の *S. aureus* あるいは *S. epidermidis* などの imipenem 感受性は、日本化学療法学会の標準法に従うと、感性菌と耐性菌の各々が約半数ずつ存在するという成績となった。しかしながら、MIC 測定時の培養温度を 30°C に下げた場合、あるいは被験菌を原液のまま接種して MIC を測定した場合には、imipenem に感性和見えた菌株もすべて 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示すようになり、MRS は imipenem に対しても本質的には耐性であろうと判断された。このような MIC の著しい変動は、imipenem によって誘導される PBP-2' によるためであろうと推察され⁹⁾、加えて PBP-2' が本質的に易熱性⁹⁾であり、37°C では容易に失活し易いことも密接に関連していると思われる。私達が行なった MRS における imipenem による PBP-2' の誘導状況、“double zone” 形成の有無および低濃度の本薬に触れさせた後の殺菌効果の推移はそれを裏付ける成績であると考えている。imipenem による “double zone” の形成は既に報告されていることである¹⁰⁾が、その成因はまだ明確ではない。私達はこの現象が発現するには、MRS が β -ラクタム系薬剤に接触することにより PBP-2' が産生され始めるものの、その耐性を誘導するためには至適薬剤濃度があり、それと “double zone” 形成とが関係を有していることを既に述べているが¹¹⁾、今回の実験でも、imipenem によるメチシリン耐性の誘導は 1 $\mu\text{g/ml}$ という低い濃度で始まることを示した。つまり、MRS においては、臨床検査材料から検出された初期の段階における感受性測定では感性和みなされる可能性も充分考えられるのであるが、本質的には耐性と判断されなければならないと思うのであ

る。ただし、MRS が検出された患者の条件によっては、imipenem が臨床的に効力を発揮する場合もあり得ると考えられる。その条件とは、感染の場が imipenem による PBP-2' の至適誘導濃度よりも著しく高濃度に本薬が達し得る病巣であること、あるいは対象となる患者の免疫機能がほぼ正常であることなどである。そのような場合には、現在用いられている β -ラクタム剤に比べて imipenem が臨床的に有効である可能性は存在すると考えられる。

文 献

- 1) MIC 測定法改訂委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 2) SPRATT, B. G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. Eur. J. Biochem. 72 : 341~352, 1977
- 3) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA & M. KONNO : Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 27 : 851~857, 1985
- 4) WILLIAMSON, R.; C. LE. BOUGUÉNEC, L. GUTMANN & T. HORAUD : One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. J. Gen. Microbiol. 131 : 1933~1940, 1985
- 5) ANNEAR, D. I. The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics. Med. J. Aust. 1 : 444~446, 1968
- 6) CANAWATI, H. N.; J. L. WITTE & F. L. SAPICO : Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to four different cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 21 : 173~175, 1982
- 7) 山下直子, 生方公子, 松下真理, 増田真理子, 野々口律子, 紺野昌俊:メチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌に対する β -ラクタム系薬剤の抗菌力測定時における培養温度の影響。Chemotherapy 33 : 743~752, 1985
- 8) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA & M. KONNO : Studies of the intrinsic resistance to β -lactams in staphylococci and enterococci. 14th International Congress of Chemotherapy, Abst. No. S-47-2, 1985
- 9) 横田 健:メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌。感染・炎症・免疫 14 : 87~97, 1934
- 10) BLUMENTHAL, R. M.; R. RAEDER, C. D. TAKEMOTO & E. H. FREIMER.: Occurrence and expression of imipemide (N-formimidoyl thienamycin) resistance in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents

Chemother. 24 : 61~69, 1983

質から化学療法の領域 1 : 30~35, 1985

11) 生方公子：ブドウ球菌における薬剤耐性。抗生物

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF IMPENEM FOR ENTEROCOCCI AND METHICILLIN- RESISTANT STAPHYLOCOCCI

KIMIKO UBUKATA, NAOKO YAMASHITA, MARI MATSUSHITA
and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pathology, Teikyo University, School of Medicine

MARIKO MASUDA and RITSUKO NONOGUCHI

Department of Pediatrics, Teikyo University, Mizonokuchi Hospital

The antibacterial activity of imipenem for clinical isolates, which comprised enterococci such as 92 strains of *E. faecalis*, 30 strains of *E. faecium* and 18 strains of *E. avium*, 61 strains of methicillin-resistant *S. aureus* and 130 strains of coagulase-negative staphylococci (MRS), was compared with those of other β -lactam antibiotics. The results were as follows :

1. The effect of imipenem for *E. faecalis* was confirmed to equal that of ampicillin by both susceptibility and affinity for PBPs.

2. Like other β -lactam antibiotics, imipenem responded only a poor to ampicillin-resistant *E. faecium* and *E. avium*.

3. MRS clearly responded better to imipenem than to cefazolin, cefmetazole or ceftizoxime under the conditions of inoculum size 10^8 CFU/ml and incubation temperature at 37°C , which are the standard method, with the MIC value of imipenem at $0.78 \mu\text{g/ml}$ for approximately half of the strains. However, when MIC was determined with the incubation temperature lowered to 30°C or the inoculum size increased to 10^8 CFU/ml, a remarkable shift of MIC towards the resistant side occurred and the majority of strains were regarded as resistant to imipenem.

4. To clarify why the phenomenon described under 3. occurred, the presence of absence of PBP-2' induction by imipenem with the resulting formation of double zone was observed. The results suggested that the induction of PBP-2' by imipenem greatly affected MIC.

5. From the above findings, MRS were considered essentially resistant to imipenem, though imipenem appeared to be active for them. This means that imipenem could be effective for MRS depending on the patient's condition, but is likely to lose its efficacy later through the induction of methicillin resistance if it is administered over a long period.