

新カルバペネム系抗生物質 panipenem の嫌気性菌に対する抗菌作用

渡辺邦友・武藤吉徳・加藤直樹・板東香お里・田中保知・上野一恵
岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設*

新しいカルバペネム系薬剤である panipenem (PAPM) の嫌気性菌 (411株以上) に対する抗菌作用を寒天平板希釈法により検討した。また, *Bacteroides fragilis* 由来の β -lactamase に対する本薬剤の安定性を検討した。さらに PAPM と N-benzoyl- β -alanine の配合剤 (panipenem/betamipron (PAPM/BP)) 投与のマウス盲腸内 *Clostridium difficile* 異常増殖誘起能をも検討した。

PAPM は, 寒天平板希釈法で測定した場合, 10^6 CFU/ml の接種菌量で *C. difficile* を除くすべての菌種を $0.78\mu\text{g/ml}$ で発育阻止した。*C. difficile* の発育阻止には $6.25\mu\text{g/ml}$ を必要とした。本薬剤は, 特に *Bacteroides*, *Prevotella* の β -lactamase 産生株に強い抗菌作用を示した。

PAPM は β -lactam 薬剤に耐性傾向が強く, 薬剤感受性パターンが異なる *B. fragilis* (GAI-10150, 0558 および 7955) 由来の β -lactamase に対し, すこぶる安定で全く加水分解を受けなかった。しかし, imipenem 高度耐性株である GAI-30144 の産生する metallo- β -lactamase に対しては容易に分解された。

PAPM/BP の 1 日 1 回 5 日間の $100\text{mg}/100\text{mg}$ 皮下投与は, 投薬中止 7 日目の盲腸内容物中に約 $10^2 \sim 10^3$ CFU/g の軽度の *C. difficile* の増殖を引き起こした。

Key words : Panipenem, 嫌気性菌, 抗菌作用, β -Lactamase, *Clostridium difficile*

Panipenem/betamipron (PAPM/BP) は, 三共株式会社で開発された注射用化学療法剤である。カルバペネム系抗生物質である panipenem (PAPM) と N-benzoyl- β -alanine (betamipron (BP)) の 1 : 1 の配合剤である。広い抗菌スペクトラムを示す薬剤として知られている¹⁾。

私共は PAPM の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌力および *Bacteroides fragilis* 由来の β -lactamase に対する安定性について検討した。また, マウスを用いて本薬剤投与とマウス盲腸尿内における *Clostridium difficile* 増殖との関連性についても検討した。

I. 材料および方法

1. 供試菌株

Table 1 に示す研究室保存の代表供試菌株および American Type Culture Collection (ATCC) 由来株および NCTC 由来株と Table 3 に示す当研究室で臨床材料から分離した嫌気性菌を用いた。*B. fragilis* group は, 最近 2 年以内に分離されたものを, その他の菌種は最近 5 年以内に分離されたものを用いた。臨床分離株は原則として Rap ID ANA system (Innovative Diagnostic Systems, Inc.) を用いた数値同

定とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析結果から同定した。一部については, PRAS II media (Scott Laboratories, Inc.) を用いた生化学的性状とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析結果により, VPI manual 第 4 版を参考にして同定した²⁾。これらは 20% スキムミルクを保護剤として -80°C で保存されていた。

2. 供試験薬剤

PAPM を用いた。対照薬剤として imipenem (IPM), flomoxef (FMOX), cefuzonam (CZON), ceftazidime (CAZ) および cefotaxime (CTX) を用いた。いずれも力価の明らかなものを用いた。

3. 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

寒天希釈法によって測定した。寒天希釈法は日本化学療法学会の推奨する方法に準じて行った³⁾。抗菌スペクトラムを検討するためには感受性測定用培地として 5% ウサギ溶血血液添加 Brucella HK 寒天 (極東製薬) を用いた。臨床分離株に対する MIC 測定は, 黒色素生産菌については 5% ウサギ溶血血液添加 Brucella HK 寒天培地を, その他の菌種では GAM 寒天培地 (日水製薬) を用いて測定した。嫌気性培養は,

anaerobic glove box (Forma 社) (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%) で48時間行った。

4. 臨床分離株に対する抗菌作用

最近数年間に、当研究室で扱った次の菌株を実験に供した。*B. fragilis* 91株, *Bacteroides vulgatus* 12株, *Bacteroides distasonis* 8株, *Bacteroides thetaiotaomicron* 19株, *Bacteroides ovatus* 23株, *Bacteroides uniformis* 23株, *Prevotella intermedia* 23株, *Prevotella bivia* 28株, *Porphyromonas gingivalis* 20株, *Peptostreptococcus magnus* 41株, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 30株, *Peptostreptococcus anaerobius* 19株, *Clostridium perfringens* 14株および *C. difficile* 25株を用いた。また IPM 耐性 (MIC; 100 μ g/ml) の *B. fragilis* GAI-30144 および GAI-30079 も用いた。

5. *B. fragilis* 産生の β -lactamase に対する安定性

B. fragilis GAI-0558, GAI-7955, GAI-10150 および GAI-30144 の 4 株を用い、本薬剤の安定性を cephaloridine (CER), IPM を比較薬剤として検討した。GAI-0558 は、抗菌スペクトラムの使用菌株から選んだ。また、GAI-7955 は、cefoxitin (CFX) を不活性化する株として⁴⁾、また GAI-10150 は ampicillin に高度耐性の株として⁵⁾、そして GAI-30144 は IPM 耐性株として選択した⁶⁾。粗酵素の調製は以下のように実施した。被験菌株を GAM ブイヨンにて 35°C、6 時間嫌気性培養した。4°C にて遠心分離 (10,000rpm, 10分) して集菌後、10mM リン酸緩衝液 (pH 7) で 2 回洗浄した。同緩衝液に浮遊させ、一旦 -80°C で凍結保存した。適当量の 100mM リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁後、超音波処理にて菌体を破壊した後、遠心 (4°C, 10,000rpm, 10分) した。この上清を粗酵素液として用いた。 β -lactamase 活性は基質濃度を 100 μ M として、spectrophotometric assay にて測定した。CER の分解活性を 100 とする相対加水分解率で表現した。

6. 薬剤投与マウス盲腸内容物中における *C. difficile* の出現

ICI 系マウス雄、5 週齢 (20 \pm 1 g)、1 群 5 匹を用いた。PAPM/BP の 100mg/100mg/kg を 1 日 1 回、5 日間マウス皮下に注射し、投薬中止 1 日目および 7 日目に、盲腸内容物中の *C. difficile* の菌数を定量培養によって求めた。対照薬として imipenem/cilastain (IPM/CS), CTX, cefotetan (CTT) を用い、投与量、投与方法は PAPM/BP と同一にした。マウスをエーテル麻酔下に屠殺後、開腹、盲腸を切り出した。それを滅菌シャーレに移し、速やかに anaerobic glove box 内に搬入した。Glove box 内で内容物を試験管に移し、

10倍量の 0.05% 滅菌酵母エキス水を加え、十分混合したものを原液とした。同酵母エキス水で 10 倍希釈系列を作製し、各希釈系列の 0.1ml を CCMA 生培地 (ニッスイ) に塗布し、2 日培養した。

II. 成績

1. PAPM の抗菌スペクトラム

PAPM の ATCC 由来の標準菌株を含む主要な嫌気性菌に対する 10⁶CFU/ml および 10⁷CFU/ml 接種での MIC 値を Table 1 と Table 2 に示した。10⁶CFU/ml の接種菌液を使用した場合の成績でみると、PAPM は *C. difficile* の 2 株を除く試験したすべての菌種に対し 0.78 μ g/ml の MIC を示し、強い抗菌作用を示した。その抗菌力は IPM と同等で FMOX より優れ、CZON, CAZ, CTX よりはるかに優れる成績であった。なお、*C. difficile* に対する MIC は 6.25 μ g/ml とやや高かったが、IPM, FMOX と同等で、CZON, CAZ, CTX よりはかなり低いものであった。特に β -lactamase 産生菌に対する抗菌作用が優れ、 β -lactamase 産生性でその産生量の異なる *B. fragilis* 2 菌株 (GM-7000 と GAI-0588) の中で、CZON, CAZ, CTX などの薬剤に 100 μ g/ml 以上の MIC を示す β -lactamase 産生量の高い *B. fragilis* GAI-0558 に対して 0.78 μ g/ml と著しく低い MIC を示した。また、CZON, CAZ, CTX, FMOX に対して 12.5 μ g/ml 以上の MIC を示す β -lactamase 産生性の *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* に対しても 0.39 μ g/ml と低い MIC を示した。さらに FMOX, CAZ などに 50 μ g/ml と高い MIC を示す *P. bivia* ATCC29303 に対し 0.78 μ g/ml と低い MIC を示した。また、 β -lactamase 産生性は確認されていないが、各種 β -lactam 薬剤に比較的耐性傾向の強い菌種として知られる *Bacteroides gracilis* GAI-10428, *Eubacterium lentum* ATCC25559 に対しても低い MIC を示した。

2. IPM 耐性株に対する PAPM の抗菌作用

IPM 耐性で IPM 分解性の metallo- β -lactamase を産生することが知られている *B. fragilis* の臨床分離株 2 株 GAI-30079 と GAI-30144 を用いて、PAPM の抗菌作用を検討した。PAPM は 10⁶CFU/ml 接種でこれら IPM 耐性株 (MIC: 100 μ g/ml) に対し、いずれも 200 μ g/ml の MIC を示し、全く抗菌作用を示さなかった。

3. 臨床分離株に対する抗菌作用

PAPM と対照薬剤の各菌種に対する MIC range, MIC₅₀ 値, MIC₉₀ 値, を Table 3, Table 4 に示した。*B. fragilis* に対して、MIC₅₀ 値と MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.20, 1.56 μ g/ml であった。これらの値は IPM と全く同等で、対照薬剤の FMOX, CZON, CTX, CAZ よ

Table 1. Antibacterial spectrum of panipenem against anaerobic bacterial species compared with other agents

organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}					
	panipenem	imipenem	flomoxef	cefuzonam	ceftazidime	cefotaxime
<i>Bacteroides</i>						
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI-7000	0.10	0.10	0.39	6.25	25	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI-0558	0.78	0.78	3.13	100	>200	200
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	0.20	0.78	0.78	3.13	12.5	0.39
<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	0.78	0.78	0.78	0.39	6.25	0.10
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	0.39	0.39	25	50	>200	50
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	0.39	0.39	12.5	50	>200	50
<i>Bacteroides uniformis</i> GAI 5466	0.39	0.39	0.39	3.13	50	0.78
<i>Bacteroides eggerthii</i> ATCC 27754	0.20	0.20	0.10	3.13	25	≤ 0.05
<i>Prevotella</i>						
<i>Prevotella oris</i> ATCC 33573	≤ 0.05	≤ 0.05	0.39	1.56	3.13	0.20
<i>Prevotella oralis</i> ATCC 33269	≤ 0.05	≤ 0.05	0.78	1.56	3.13	0.20
<i>Prevotella bivia</i> ATCC 29303	0.78	0.10	50	6.25	50	3.13
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	≤ 0.05	≤ 0.05	0.10	0.39	0.39	0.10
<i>Bacteroides qrailis</i> GAI 10428	0.39	0.78	0.39	12.5	6.25	0.78
<i>Bacteroides ureolyticus</i> NCTC 10941	≤ 0.05	0.10	0.10	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
<i>Fusobacterium</i>						
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	≤ 0.05	≤ 0.05	0.10	0.78	3.13	≤ 0.05
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 8501	0.78	1.56	1.56	6.25	200	1.56
<i>Fusobacterium mortiferum</i> GAI 5576	0.39	0.78	0.78	0.20	1.56	0.10
<i>Veillonella</i>						
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.10	0.10	≤ 0.05	0.39	3.13	0.20
<i>Peptostreptococcus</i>						
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	≤ 0.05	≤ 0.05	0.20	0.20	0.78	0.20
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	≤ 0.05	≤ 0.05	0.10	0.39	3.13	0.39
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> WAL 3218	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.20	0.39	0.10
<i>Streptococcus</i>						
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335	≤ 0.05	≤ 0.05	0.39	0.10	3.13	0.10
<i>Streptococcus parvulus</i> GAI 5542	≤ 0.05	≤ 0.05	0.39	0.78	25	0.10
<i>Staphylococcus</i>						
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> ATCC 14953	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.39	3.13	0.39
<i>Propionibacterium</i>						
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11828	≤ 0.05	≤ 0.05	0.10	0.39	6.25	0.20
<i>Propionibacterium granulosum</i> ATCC 25564	≤ 0.05	≤ 0.05	0.20	0.39	6.25	0.20
<i>Eubacterium</i>						
<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 25559	0.39	0.78	6.25	200	>200	200
<i>Clostridium</i>						
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 19398	0.39	0.39	0.78	12.5	200	25
<i>Clostridium difficile</i> GAI 10029	6.25	6.25	3.13	50	50	100
<i>Clostridium difficile</i> GAI 10038	6.25	6.25	6.25	100	100	100
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	≤ 0.05	0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	≤ 0.05	0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.20	≤ 0.05
<i>Clostridium perfringens</i> GAI 5526	≤ 0.05	0.10	≤ 0.05	0.39	6.25	0.78
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	≤ 0.05	0.05	≤ 0.05	6.25	200	12.5
<i>Clostridium sordellii</i> ATCC 9714	≤ 0.05	0.05	≤ 0.05	0.20	0.78	0.20

a) MICs were determined with serial twofold dilutions of the agents in sensitivity test agar. Bacteria cultured for 2 days were inoculated onto agar plates at 10^5 CFU per spot and incubated for 48 hours at 35°C.

Table 2. Antibacterial spectrum of panipenem against anaerobic bacterial species compared with other agents

organism	M I C ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}					
	panipenem	imipenem	flomoxef	cefuzonam	ceftazidime	cefotaxime
<i>Bacteroides</i>						
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI-7000	0.20	0.20	0.78	25	50	25
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI-0558	1.56	1.56	6.25	>200	>200	>200
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	1.56	1.56	1.56	6.25	25	3.13
<i>Bacteroides distasonis</i> ATCC 8503	1.56	1.56	1.56	0.39	6.25	0.39
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	0.39	0.78	50	100	>200	100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	0.78	0.78	50	50	>200	100
<i>Bacteroides uniformis</i> GAI-5466	0.39	0.39	0.78	6.25	200	6.25
<i>Bacteroides eggerthii</i> ATCC 27754	0.39	0.39	0.78	6.25	25	0.39
<i>Prevotella</i>						
<i>Prevotella oris</i> ATCC 33573	≤ 0.05	≤ 0.05	0.78	1.56	3.13	0.39
<i>Prevotella oralis</i> ATCC 33269	≤ 0.05	≤ 0.05	1.56	3.13	6.25	0.39
<i>Prevotella bivia</i> ATCC 29303	0.78	0.20	100	12.5	100	12.5
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	≤ 0.05	0.10	0.10	0.39	0.78	0.20
<i>Bacteroides qrailis</i> GAI-10428	0.78	1.56	1.56	12.5	12.5	1.56
<i>Bacteroides ureolyticus</i> NCTC 10941	0.10	0.39	0.10	≤ 0.05	0.10	≤ 0.05
<i>Fusobacterium</i>						
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	0.10	0.20	0.10	1.56	12.5	≤ 0.05
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 8501	1.56	3.13	1.56	25	>200	12.5
<i>Fusobacterium mortiferum</i> GAI 5576	1.56	1.56	0.78	0.39	6.25	0.39
<i>Veillonella</i>						
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.10	0.20	0.20	0.39	6.25	0.39
<i>Peptostreptococcus</i>						
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	≤ 0.05	0.10	0.20	0.20	0.78	0.20
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	0.10	0.10	0.20	0.78	6.25	0.78
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.10	≤ 0.05	0.20	0.20	0.78	0.20
<i>Streptococcus</i>						
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335	0.10	0.20	0.78	0.10	3.13	0.20
<i>Streptococcus parvulus</i> GAI-5542	0.10	0.10	0.39	0.78	25	0.10
<i>Staphylococcus</i>						
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> ATCC 14953	≤ 0.05	≤ 0.05	0.10	0.39	3.13	0.78
<i>Propionibacterium</i>						
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11828	0.10	0.10	0.39	0.39	6.25	0.39
<i>Propionibacterium granulosum</i> ATCC 25564	≤ 0.05	≤ 0.05	0.39	0.78	12.5	0.39
<i>Eubacterium</i>						
<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 25559	0.78	1.56	6.25	200	>200	200
<i>Clostridium</i>						
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 19398	1.56	1.56	1.56	25	200	50
<i>Clostridium difficile</i> GAI 10029	6.25	12.5	6.25	100	>200	100
<i>Clostridium difficile</i> GAI 10038	12.5	12.5	6.25	100	>200	100
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	≤ 0.05	0.10	≤ 0.05	0.39	0.39	0.20
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	1.56	0.10
<i>Clostridium perfringens</i> GAI 5526	0.10	0.20	0.20	3.13	6.25	3.13
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0.10	0.10	0.10	6.25	200	12.5
<i>Clostridium sordellii</i> ATCC 9714	0.10	0.10	0.10	0.20	0.78	0.20

a) Bacteria cultured for 2 days were inoculated onto agar plates at 10^7 CFU per spot.

Table 3. MIC distribution of panipenem against clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group

Organism	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ; 10^6CFU/ml		
		Range	50 %	90 %
<i>Bacteroides fragilis</i> (91 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.20	1.56
	imipenem	0.10 ~ 12.5	0.20	1.56
	flomoxef	0.20 $\sim >200$	0.78	50
	cefuzonam	1.56 ~ 200	3.13	100
	ceftazidime	6.25 $\sim >200$	12.5	> 200
	cefotaxime	1.56 $\sim >200$	6.25	100
	High producer (21 strains)	panipenem	0.20 ~ 3.13	0.78
imipenem		0.20 ~ 3.13	0.78	3.13
flomoxef		1.56 $\sim >200$	3.13	> 200
cefuzonam		3.13 $\sim >200$	50	200
ceftazidime		25 $\sim >200$	> 200	> 200
cefotaxime		6.25 $\sim >200$	100	200
Low producer (70 strains)		panipenem	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.20
	imipenem	0.10 ~ 12.5	0.20	0.39
	flomoxef	0.20 ~ 50	0.39	3.13
	cefuzonam	1.56 ~ 200	3.13	25
	ceftazidime	6.25 $\sim >200$	12.5	200
	cefotaxime	1.56 $\sim >200$	3.13	50
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (19 strains)	panipenem	0.20 ~ 12.5	0.39
imipenem		0.39 ~ 12.5	0.78	1.56
flomoxef		1.56 $\sim >200$	6.25	50
cefuzonam		6.25 $\sim >200$	25	> 200
ceftazidime		100 $\sim >200$	> 200	> 200
cefotaxime		12.5 $\sim >200$	25	> 200
<i>Bacteroides ovatus</i> (23 strains)		panipenem	0.39 ~ 1.56	0.39
	imipenem	0.39 ~ 1.56	0.39	0.78
	flomoxef	1.56 $\sim >200$	12.5	50
	cefuzonam	3.13 ~ 200	25	200
	ceftazidime	25 $\sim >200$	> 200	> 200
	cefotaxime	0.39 ~ 200	50	200
	<i>Bacteroides uniformis</i> (23 strains)	panipenem	0.20 ~ 0.78	0.39
imipenem		0.20 ~ 0.78	0.39	0.78
flomoxef		0.78 ~ 200	3.13	12.5
cefuzonam		3.13 ~ 200	9.25	50
ceftazidime		6.25 $\sim >200$	100	> 200
cefotaxime		0.78 $\sim >200$	6.25	200
<i>Bacteroides vulgatus</i> (12 strains)		panipenem	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.78
	imipenem	0.10 ~ 6.25	0.78	1.56
	flomoxef	0.20 $\sim >200$	1.56	25
	cefuzonam	1.56 ~ 200	25	100
	ceftazidime	3.13 $\sim >200$	100	> 200
	cefotaxime	0.78 ~ 200	12.5	50
	<i>Bacteroides distasonis</i> (8 strains)	panipenem	0.10 ~ 1.56	
imipenem		0.20 ~ 1.56		
flomoxef		0.39 $\sim >200$		
cefuzonam		3.13 ~ 200		
ceftazidime		12.5 $\sim >200$		
cefotaxime		0.78 $\sim >200$		

Table 4. MIC distribution of panipenem against clinical isolates of other selected anaerobic bacterial species

Organism	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ; 10^6 CFU/ml		
		Range	50 %	90 %
<i>Prevotella bivia</i> (28 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.39$	0.10	0.39
	imipenem	$\leq 0.05 \sim 0.20$	≤ 0.05	0.10
	flomoxef	0.39 ~ 100	12.5	50
	cefuzonam	0.39 ~ 25	3.13	12.5
	ceftazidime	0.78 ~ 200	6.25	50
	cefotaxime	$\leq 0.05 \sim 50$	1.56	6.25
<i>Prevotella intermedia</i> (23 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.39$	0.10	0.20
	imipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	0.10
	flomoxef	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.10	3.13
	cefuzonam	0.20 ~ 6.25	0.39	3.13
	ceftazidime	0.20 ~ 25	0.78	6.25
	cefotaxime	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.10	3.13
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (20 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
	imipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	0.10
	flomoxef	$\leq 0.05 \sim 0.39$	0.20	0.39
	cefuzonam	$\leq 0.05 \sim 0.20$	0.10	0.20
	ceftazidime	0.20 ~ 0.78	0.20	0.39
	cefotaxime	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (19 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.20$	≤ 0.05	0.20
	imipenem	$\leq 0.05 \sim 0.20$	≤ 0.05	0.20
	flomoxef	$\leq 0.05 \sim 0.20$	0.20	0.20
	cefuzonam	$\leq 0.05 \sim 0.20$	0.10	0.10
	ceftazidime	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78
	cefotaxime	0.10 ~ 0.20	0.20	0.20
<i>Peptostreptococcus magnus</i> (41 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
	imipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
	flomoxef	$\leq 0.05 \sim 0.20$	≤ 0.05	0.20
	cefuzonam	$\leq 0.05 \sim 0.78$	0.20	0.39
	ceftazidime	0.20 ~ 3.13	1.56	3.13
	cefotaxime	$\leq 0.05 \sim 1.56$	0.39	0.78
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> (30 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
	imipenem	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	flomoxef	$\leq 0.05 \sim 0.20$	≤ 0.05	0.10
	cefuzonam	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.10
	ceftazidime	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.39	6.25
	cefotaxime	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.10
<i>Clostridium difficile</i> (25 strains)	panipenem	1.56 ~ 3.13	3.13	3.13
	imipenem	3.13 ~ 6.25	6.25	6.25
	flomoxef	3.13 ~ 6.25	3.13	6.25
	cefuzonam	25 ~ 100	50	100
	ceftazidime	25 ~ 200	25	200
	cefotaxime	50 ~ 200	100	200
<i>Clostridium perfringens</i> (14 strains)	panipenem	$\leq 0.05 \sim 0.10$	≤ 0.05	≤ 0.05
	imipenem	0.10 ~ 0.20	0.10	0.20
	flomoxef	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	cefuzonam	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	ceftazidime	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	cefotaxime	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05

り優れた抗菌作用を示した。この91株をアシドメトリ法とニトロセフィン法の結果より、両方が陽性の菌株21株とニトロセフィン法のみ陽性の菌株70株とに分けてみると、前者ではMIC₅₀値が0.78μg/mlであったが、後者ではMIC₅₀値が0.20μg/mlであった。

B. fragilis 以外の *B. fragilis* group である *B. ovatus* (23株), *B. uniformis* (23株), *B. thetaiotaomicron* (19株), *B. vulgatus* (12株), *B. distasonis* (8株) に対しても、PAPMはMIC₅₀値が0.39~0.78μg/ml, MIC₉₀値が0.78~3.13μg/mlと優れた抗菌作用を示した。これらの抗菌作用はIPMと同等で、FMOXより優れ、他の対照薬剤より相当優れた。

Prevotella, *Porphyromonas* 属の *P. bivia* (28株), *P. intermedia* (23株), *P. gingivalis* (20株) に対しても、PAPMはMIC₅₀値が0.05~0.10μg/ml, MIC₉₀値が0.05~3.13μg/mlと優れた抗菌作用を示した。IPMとほぼ同等で、他の対照薬剤より優れていた。

Peptostreptococcus 属の *P. magnus* (41株), *P. asaccharolyticus* (30株), *P. anaerobius* (19株) に対して、PAPMはMIC₅₀値が0.05μg/ml以下, MIC₉₀値が0.05~0.20μg/mlとIPM, FMOX, CZON, CTXなどとほぼ同等の優れた抗菌作用を示した。

4. PAPMの*B. fragilis*由来β-lactamaseに対する安定性 (Table 5)

PAPMは、*B. fragilis* GAI-0558, GAI-7955およびGAI-10150由来のβ-lactamaseに対し、cefazolinを100とした時の相対加水分解率は、いずれも0%で全く加水分解を受けなかった。しかし、IPM耐性菌であるGAI-30144由来のβ-lactamaseに対しては、CERを

100とした場合131%とかなり強い加水分解を受けた。

Table 5. Stability of panipenem against β-lactamases derived from four representative isolates of *Bacteroides fragilis*

Substrate	Strain GAI No.			
	0558	7955	10150	30144
cephaloridine	0.66*	0.25	0.54	0.06
imipenem	—	—	—	0.04
panipenem	—	—	—	0.08

* Units/mg of protein

5. 薬剤投与マウス盲腸内容物における*C. difficile*の出現 (Table 6)

PAPM/BP 100mg/100mg/kg 1日1回, 5日間投与翌日の盲腸内容物からは*C. difficile*は分離されなかった。中止後7日目の盲腸内容物からは10²~10³CFU/gの*C. difficile*が分離された。本薬剤の盲腸内*C. difficile*増殖誘起パターンはIPM/CSの場合と類似していた。PAPMはIPM/CSより7日目の*C. difficile*の増殖誘起能がやや強いという成績が得られた。

III. 考 察

PAPMは、新しく開発された注射用カルバペネムである。著者らは、PAPMの嫌気性菌に対する*in vitro*抗菌作用を同系統のIPMを中心に、FMOX, CZON, CTXを対照薬剤として選び、*in vitro*抗菌作用および*B. fragilis*由来β-lactamaseに対する安定性を検討した。

Table 6. Appearance of *Clostridium difficile* in murine caecum contents after the 5 days dosing of panipenem/betamipron, imipenem cilastatin, cefotaxime, and cefotetan

Antimicrobial *	Route	Days after finishing the administration	No. of <i>Clostridium difficile</i> (colony forming units/g) in caecum contents						
			<10 ²	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
panipenem/betamipron	S. C.	1 day	5						
		7 days		1	4				
imipenem/cilastatin	S. C.	1 day	4	1					
		7 days	5						
cefotaxime	S. C.	1 day		2	1		1	1	
		7 days		3	2				
cefotetan	S. C.	1 day	5						
		7 days		2			1	2	

* : All of mice (20±2g) received antimicrobials at a dose of 100mg/kg once a day for 5 days.

** : Number of mice

PAPMの嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムは臨床細菌学的に重要な *Bacteroides* 属, *Prevotella* 属, *Peptostreptococcus* 属などの嫌気性菌の幅広い菌種にわたっており, それらに対する抗菌作用は非常に強力であった。すなわち, 自然耐性を示す *C. difficile* と *B. fragilis* のごく少数にみられる IPM 耐性株を除く, 試験したすべての菌株の発育を抑制するに必要な濃度は, 10^6 CFU/ml接種で $12.5\mu\text{g/ml}$ であった。そのほとんどは, $1\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止された。

臨床材料から分離される *B. fragilis* はそのほとんどが oxyimino cephalosporinase を産生し, 各種 β -lactam 薬剤に耐性を示す。この酵素には, セファマイシンやカルバペネムを加水分解する作用はないのが普通である。PAPM はこれらの oxyimino cephalosporinase を代表すると考えられる *B. fragilis* GAI-0558 や GAI-10150 の酵素に極めて安定であり, これらの酵素に対する安定性が PAPM の *B. fragilis* に対する強い抗菌作用を説明する重要な原因の一つと考えられている。

しかし, 最近の *B. fragilis* 臨床分離株の 1~2% に, IPM に $12.5\mu\text{g/ml}$ あるいはそれ以上の MIC を示す株が存在することが知られている⁷⁾。これらの株が産生する酵素はセファマイシンやカルバペネムを含めた β -lactam 薬剤を加水分解する新しい型の EDTA に感受性の oxyimino cephalosporinase である⁸⁾。板東らは *B. fragilis* GAI-30144 から, この酵素を精製している⁹⁾。PAPM は, IPM 同様にこの metallo- β -lactamase には容易に加水分解され, そのような酵素を産生する菌株には高度耐性を示すことが明らかとなった。今後, このような酵素を産生する菌株の出現頻度のモニタリングが必要である。

化学療法剤投与に関連して起こる下痢症および Pseudomembranous colitis には, *C. difficile* が関連している。青木らはマウスの盲腸内での *C. difficile* の異常増殖を指標にして, 各種化学療法剤を評価し, *C. difficile* 腸炎および下痢症の治療薬として推奨されている vancomycin, metronidazole 以外は, 程度の差はあれすべて *C. difficile* の異常増殖を起こすことを報告した⁹⁾。青木が試みたマウスを用いるモデルは, その薬剤と *C. difficile* とその拮抗微生物との関連をみるモデルとして受け入れられている¹⁰⁾。今回の結果から PAPM/BP は CTX や CTT などと比較して盲腸内での *C. difficile* の増殖を起こしにくい薬剤と考えてよいと思われる。

以上のことから, PAPM は嫌気性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムを有し, 特に *Bacteroides*, *Prevotella*,

Porphyromonas などのグラム陰性桿菌や *Peptostreptococcus* などのグラム陽性球菌に強い抗菌作用を示す薬剤であることが明らかとなった。PAPM は β -lactamase 産生菌である *B. fragilis* を含めた嫌気性菌の関与する複数菌感染症に優れた力を発揮すると考えられる。

文 献

- 1) 上野一恵, 島田 馨: 第38回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム(1). CS-976, 岐阜, 1990
- 2) Holdeman L V, Cato E P, and Moore W E C: Anaerobe laboratory Manual 4th Edition, The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Virginia, 1972
- 3) 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(3): 559~560, 1979
- 4) 武内美登利, 宮内正幸, 渡辺邦友, 上野一恵: *Bacteroides fragilis* group の Cefoxitin 耐性とその伝達について. 岐阜大学医学部紀要 35(3): 499~520, 1987
- 5) Yamaoka K, Watanabe K, Muto Y, Katoh N, Ueno K, and Tally F P: R-plasmid mediated transfer of β -lactam resistance in *Bacteroides fragilis*. J Antibiotics 43: 1302~1306, 1990
- 6) Bandoh K, Muto Y, Watanabe K, Katoh N, Ueno K: Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 35: 371~372, 1991
- 7) Tally F P, Cuhural G J Jr, Jacobus NV, Gorbach S L, Aldridge K, Cleary T, Finegold S M, Hill G, Iannini P, O'Keefe J P, and Pierson C: Nationwide study of the susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group in the United States. Antimicrob Agents Chemother 28: 675~677, 1985
- 8) Thompson J F, and Malamy M H: Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase II. J Bacteriol 172(5): 2584~2593, 1990
- 9) 青木 誠, 小林とよ子, 渡辺邦友, 上野一恵: 化学療法剤投与によるマウス盲腸内 *Clostridium difficile* の変動について. Chemotherapy 33(7): 617~623, 1985
- 10) Onderdonk A B: Animal Models of *Clostridium difficile*-associated intestinal diseases. In *Clostridium difficile*: Its Role in Intestinal Disease (Rolfe R D, and Finegold S M ed.), p.115~141, Academic Press Inc., San Diego, California, 1988

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A NEW CARBAPENEM,
PANIPENEM, AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

Kunitomo Watanabe, Yoshinori Muto, Naoki Katoh, Kaori Bandoh,
Yasunori Tanaka, and Kazue Ueno
Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine
40 Tsukasa-cho, Gifu 500, Japan

Antibacterial activity of panipenem (PAPM), a new carbapenem, against more than 411 anaerobic bacteria of reference and clinical isolates was determined by agar dilution method. The stability of this compound against representative β -lactamases derived from 4 strains of *Bacteroides fragilis* was also determined using a spectrophotometric assay.

PAPM inhibited the growth of almost all anaerobic bacterial species tested with the concentration of $0.78\mu\text{g/ml}$, except *Clostridium difficile*. Especially, it was very active to the β -lactamase producing strains of *Bacteroides*, *Prevotella*. This compound was not hydrolyzed by the β -lactamases from 3 strains of *B. fragilis*, but readily hydrolyzed by a metallo- β -lactamase from GAI-30144.

When panipenem/betamipron was given subcutaneously to mice at a dose of $100\text{mg}/100\text{mg/kg}$ for 5 days, growth of *C. difficile* was observed on 7 days after withdrawal of the drug with a concentration of $10^2\sim 10^3\text{CFU/g}$.