

Meropenemの試験管内抗菌力と生物学的安定性

横田 健・鈴木映子・新井京子

順天堂大学医学部細菌学教室*

Meropenem (MEPM) の *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, β -streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* の16~50臨床分離株に対するMIC₉₀はそれぞれ3.13, 25, 100, ≤ 0.013 , 0.05, 0.025, 6.25, >100 , 0.05, ≤ 0.013 , 0.05, 0.1, 3.13, 0.39, 0.39, 6.25, 1.56, 1.56, >100 , 1.56, ≤ 0.013 および 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。MEPMは*X. maltophilia*以外の菌の産生する各種 β -lactamaseに安定なだけでなく、強い一時阻害力(小さなKi値)およびimipenem(IPM)より強い不活化力をPCase型にもCEPase型にも示した。MEPMは*S. aureus*のPBPのすべての画分, *P. vulgaris*のPBP2と3にIPMより強い結合親和性を示したが, *S. marcescens*と*E. coli*のPBP2sにはIPMより結合が弱かった。MEPMと補体との協力的殺菌作用は中等度だが, マウス培養M ϕ は1/4MIC以上のMEPMの存在下で*E. coli*の生細胞を良く食菌, 消化した。MEPMはブタのdehydropeptidase-I に対しIPMよりはるかに安定であった。

Key words : Meropenem(MEPM), PBP, β -lactamase, マウス培養M ϕ , DHP-I

Meropenem(MEPM)は住友製薬株式会社により新たに開発されたカルバペネム系 β -lactam剤であり, 1位に β -methyl基を導入することによりdehydropeptidase-I(DHP-I)に対する安定性を向上させているとされている¹⁾。本剤の臨床効果を推定するための基礎的資料を得るために, 試験管内抗菌力, 作用点PBPへの結合親和性, β -lactamase不活化作用, 補体またはM ϕ との協力作用を検討した。また本剤の特徴の一つとされているDHP-Iに対する安定性を, ブタの腎臓より調製した酵素を用いて検討した。

I. 材料および方法

1. 菌株

順天堂大学附属病院中央検査室および東京都老人研究所附属病院中央検査室から分与された*Staphylococcus aureus* 49株, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 48株, coagulase-negative staphylococci(CNS)42株, *Streptococcus pyogenes* 50株, β -streptococci 16株, *Streptococcus pneumoniae*22株, *Enterococcus faecalis* 39株, *Enterococcus faecium* 42株, *Escherichia coli* CS2 (R⁺)50株, *Klebsiella pneumoniae* 47株, *Proteus mirabilis* 50株, *Proteus vulgaris* 35株, *Providencia rettgeri* 29株, *Serratia marcescens* 50株, *Citrobacter freundii*

50株, *Enterobacter cloacae* 50株, *Pseudomonas aeruginosa* 50株, *Pseudomonas cepacia* 33株, *Xanthomonas maltophilia* 29株, *Acinetobacter calcoaceticus* 27株, ampicillin(ABPC)-resistant *Haemophilus influenzae* 23株および*Bacteroides fragilis* 40株を用いた。R因子保有*E. coli*は*E. coli* CS2に順天堂大学附属病院中央検査室の臨床分離株から得られた50種類のR因子を当教室で接合伝達したものである。

2. 使用薬剤

MEPMは住友製薬株式会社から, imipenem(IPM)は萬有製薬株式会社から, ceftazidime(CAZ)は日本グラクソ株式会社から分与された純末を使用した。

3. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定法

日本化学療法学会法²⁾による平板希釈法で測定した。すなわち被検菌をL-broth中で一夜振盪培養し, グラム陽性菌の場合は100倍に, グラム陰性菌の場合は1,000倍に希釈し, これを10⁶CFU/mlの接種菌液とした。ただし, *H. influenzae* にはHeart infusion (HI) brothにFildes extract(Oxoid)を5%添加した培地を用い, *B. fragilis*はGAM broth(日水製薬)中で前培養した。また*S. pneumoniae*の接種菌液はヒツジ脱繊維血液平板上に増殖した集落をかき取り, HI brothに懸濁し

*〒113 東京都文京区本郷3-1-3

660nmの波長でO.D. 0.5になるように調製し、これを100倍希釈して接種菌液とした。2倍希釈系列にした濃度の薬剤を含むMuellar-Hinton agar (Difco)に、接種菌液をマイクロプランター(佐久間製作所)でスポット接種し、37°Cで一夜培養後の菌増殖の有無からMICを求めた。ただし、*Streptococcus* 属の菌は全て血液寒天を、*H. influenzae*はFildes extract加HI agarで一夜培養し、*B. fragilis*にはGAM agarを使用し、ガスバック法(BBL)で37°C一夜嫌気培養した。

4. 作用点ペニシリン結合蛋白(PBP)に対する結合親和性の検討

S. aureus 108-1(MRSA), *E. coli* NIHJ JC-2, *P. vulgaris* 33, *S. marcescens* 13および*P. aeruginosa* PAO1を被験菌とし、Spratt³¹の方法に準じ非放射性各薬剤(MEPMおよびIPM)と¹⁴C-penicillin G(¹⁴C-PCG: Amer-sham 50 μ Ci/ μ mole/ml)との競合結合実験から検討した。すなわち被験菌を10mlのL-broth中で一夜振盪培養し、その全量を500ml坂口フラスコ中の200mlのL-brothに接種し、さらに37°C振盪培養を4時間続け、対数増殖期の菌細胞を得た。冷却遠心で細胞を集め、10mM MgCl₂加0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)で1回洗い、同緩衝液8mlに浮遊した。Branson sonifierで10kc, 効率20%で氷冷下超音波破碎した。その3,000 \times g 10分間遠心上清を100,000 \times g 30分超遠心を行ない膜画分を得た。同緩衝液で1回洗浄後、少量の同緩衝液に再浮遊し、Lowry法で蛋白量10~15mg/mlになるよう調製した。膜画分30 μ lに3 μ lの水または1.1, 5.5, 27.5および137.5 μ g/mlの非放射性MEPMまたはIPMを加え、30°C 10分間反応させた。これに3 μ lの¹⁴C-PCG液を加え、さらに30°Cで10分間処理した。氷冷した反応液に3 μ lの20% (w/v) sarkocylと60mg/ml PCGの等量混合液を加え反応を停止した。不溶画分を10,000 \times g 30分遠心で除いた後、その上清30 μ lと15 μ lのSDS緩衝液および5 μ lの β -mercaptoethanolを混合し、沸騰水中で2分間加熱した。その全量を10% polyacrylamide平板ゲル(ただしブドウ球菌には8% acrylamideゲル)にのせ、120Vで等電圧電気泳動を行なった。7%酢酸50%メタノール液で蛋白を固定し、ゲルをよく洗い、2,5-diphenyloxazoleを浸み込ませ、ろ紙上で乾燥してKodak X-Omatフィルムに密着し-80°Cで20日間感光させ、fluorographyを行った。

5. β -lactamase不活化作用

I a型およびI c型cephalosporinase(CEPase)は、それぞれ*E. cloacae* Nek 39および*P. vulgaris* 33を、II b, III (TEM), IV bおよびV型penicillinase(PCase)は、それぞれ*P. mirabilis* JY10, *E. coli* CS2/RK1, *K. pneumo-*

niae 42および*E. coli* CS2/RE45の対数増殖期後期の細胞を集め、超音波破碎液の100,000 \times g, 30分間遠心上清を粗酵素液とした。

一時阻害作用は、PCase型酵素にはABPCをCEPase型酵素にはcephaloridineを基質とし、acidometry³¹により、その分解を約50%阻害する各薬剤の濃度をKi値としてLineweaver-Burk plotから算出した。MEPMの β -lactamase永久不活化作用は、Fisher⁵¹による希釈法により検討した。すなわち約100単位/0.1mlの β -lactamase粗酵素液と0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に0.5~10 μ g/0.1mlになるよう溶かした各薬剤を試験管中で混合し、30°C 50分間保温した後基質溶液で200倍に薄め、さらに30°C 30分間反応させた後、残存酵素活性をmacroiodometryで測定した。

6. MEPMと血清補体またはマウス培養M ϕ との協力的殺菌作用の検討

E. coli NIHJ JC-2を10mlのL-broth中で一夜37°C振盪培養した。これを新鮮なL-brothで約1 \times 10⁵cells/mlになるように希釈し、5mlずつ試験管内に分注した。3本一組とし、1本目にMEPM 50%増殖阻止濃度(ID₅₀: 5時間後に生菌数が接種時の50%近くになるMEPMの濃度)を加え、2本目には0.5units/mlのモルモット補体と20%ヒト非働化血清を添加し、3本目にはMEPMと補体およびヒト非働化血清を加えた。37°Cで振盪培養を続け、1.5, 3, 5および24時間後に生菌数を測定した。

M ϕ はICR δ 5週齢マウスの腹腔を8mlのsaline Gで洗って採取し、遠心後10% fetal calf serum加F12培地(日本製薬)に浮遊し、2.5 \times 10⁵cells/mlとした。その0.1mlをカバースリップを沈めた24穴Cornig cell wellsの各wellに接種し同培地1mlを加え5% CO₂存在下で37°C一夜培養した。翌日上清を除き、20% L-CM (conditioned medium of L-929)⁶¹を加え2時間CO₂培養を行ってM ϕ を活性化した。各wellにL-broth中で一夜振盪培養した*E. coli* NIHJ JC-2菌液をM ϕ の50倍量、1.25 \times 10⁶CFU/wellになるように接種した。一部のwellには1~1/8MICのMEPMを加え培養した。培養5時間後にカバースリップを取り出しsaline Gで洗浄後、メタノール固定しGiemsa染色して顕像を観察した。

7. MEPMのブタ精製DHP-Iに対する安定性

基質液として、MEPMおよびIPMを0.025M Tris-HCl緩衝液(pH7.0)に、1.0mg/mlおよび0.1mg/ml濃度になるように調製した。この薬剤液を0.5mlずつエッペンドルフチューブに入れブタ精製DHP-I (0.02units/1.14 μ g protein/ml)を10 μ l加え、37°Cで0, 30, 60, 90, 120, 150および180分間反応させた。

反応後80℃5分間加熱して酵素を失活させ、残存薬剤量をbioassayにより測定した。なお検定菌として*Micrococcus luteus* ATCC 9341を使用した。

II. 成績

1. 各種細菌臨床分離株に対する試験管内抗菌力
MEPMの試験管内抗菌力を、22菌種の16~50臨床分離株に対し、IPMおよびCAZのそれと比較検討した (Table 1-1, 1-2)。

MEPMの*S. aureus*に対する抗菌力はMIC₅₀が0.2μg/

ml, MIC₉₀が3.13μg/mlであり、IPMのMIC₅₀, 0.025μg/mlおよびMIC₉₀, 0.39μg/mlと比べて3管程劣る抗菌力を示した。CAZは本菌に対する抗菌活性は低かった。MRSAに対しては、MEPMのMIC₅₀, MIC₉₀は各々3.13μg/mlと25μg/mlであり、IPMのMIC₅₀, MIC₉₀は6.25μg/ml, 50μg/mlでありMEPMの方が共に1管優れた抗菌力を示した。CNS 42株に対する本剤のMIC₅₀は0.78μg/ml, MIC₉₀は100μg/mlであり、IPMのMIC₅₀, 0.1μg/mlおよびMIC₉₀, 100μg/mlと比較してMIC₅₀が

Table 1-1. Antibacterial activities of meropenem and reference drugs against clinical isolates

Test organism (no. of Strains)	Antibiotics	MIC (μg/ml)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>E. coli</i> CS2 (R ⁺) (50)	Meropenem	≦0.013~0.1	0.025	0.05
	Imipenem	0.1~0.39	0.39	0.39
	Ceftazidime	0.05~0.39	0.2	0.39
<i>K. pneumoniae</i> (47)	Meropenem	≦0.013~0.78	0.1	0.2
	Imipenem	0.1~1.56	0.1	0.2
	Ceftazidime	0.025~1.56	0.2	0.78
<i>P. mirabilis</i> (50)	Meropenem	≦0.013~0.05	0.055	0.05
	Imipenem	0.1~1.56	0.39	1.56
	Ceftazidime	0.05~0.1	0.1	0.1
<i>P. vulgaris</i> (35)	Meropenem	0.025~0.1	0.05	0.1
	Imipenem	0.2~6.25	1.56	3.13
	Ceftazidime	0.05~0.78	0.05	0.2
<i>P. rettgeri</i> (29)	Meropenem	0.05~3.13	0.39	3.13
	Imipenem	0.39~6.25	1.56	6.25
	Ceftazidime	0.05~25	3.13	12.5
<i>S. manescens</i> (50)	Meropenem	0.025~25	0.05	6.25
	Imipenem	0.1~12.5	0.39	6.25
	Ceftazidime	0.1~>100	0.2	6.25
<i>E. cloacae</i> (50)	Meropenem	≦0.013~6.25	0.1	0.39
	Imipenem	0.1~3.13	0.39	0.78
	Ceftazidime	0.1~>100	25	>100
<i>C. freundii</i> (50)	Meropenem	≦0.013~0.78	0.025	0.39
	Imipenem	0.2~0.78	0.2	0.39
	Ceftazidime	0.2~>100	3.13	100
<i>A. calcoaceticus</i> (27)	Meropenem	0.2~12.5	0.78	1.56
	Imipenem	0.1~3.13	0.2	0.78
	Ceftazidime	0.1~25	6.25	25
<i>P. aeruginosa</i> (50)	Meropenem	0.1~>100	0.78	1.56
	Imipenem	0.78~25	1.56	3.13
	Ceftazidime	0.78~>100	3.13	50
<i>P. cepacia</i> (33)	Meropenem	0.39~1.56	1.56	1.56
	Imipenem	3.13~6.25	6.25	6.25
	Ceftazidime	0.78~3.13	1.56	3.13
<i>X. maltophilia</i> (29)	Meropenem	12.5~>100	>100	>100
	Imipenem	6.25~>100	>100	>100
	Ceftazidime	0.39~>100	1.56	25

Table 1-2. Antibacterial activities of meropenem and reference drugs against clinical isolates

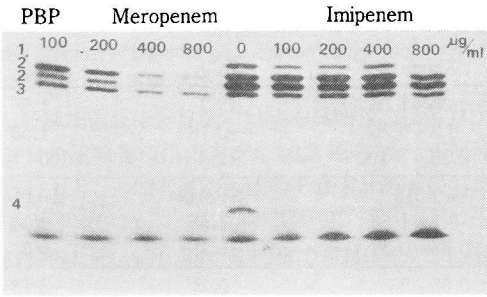
Test organism (no. of Strains)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>B. fragilis</i> (40)	Meropenem	0.05 ~ 1.56	0.2	1.56
	Imipenem	0.2 ~ 6.25	0.78	1.56
	Ceftazidime	6.25 ~ >100	12.5	>100
<i>H. influenzae</i> (ABPC) ^r (23)	Meropenem	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	Imipenem	0.1 ~ 1.56	1.56	1.56
	Ceftazidime	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
<i>S. aureus</i> (49)	Meropenem	0.05 ~ 25	0.2	3.13
	Imipenem	≤ 0.013 ~ 50	0.025	0.39
	Ceftazidime	3.13 ~ >100	25	>100
MRSA (48)	Meropenem	0.2 ~ 50	3.13	25
	Imipenem	0.025 ~ 100	6.25	50
	Ceftazidime	25 ~ >100	>100	>100
Coagulase (—), staphylococci (42)	Meropenem	0.025 ~ >100	0.78	100
	Imipenem	≤ 0.013 ~ >100	0.1	100
	Ceftazidime	3.13 ~ >100	12.5	100
<i>S. pyogenes</i> (50)	Meropenem	≤ 0.013 ~ 0.05	≤ 0.013	≤ 0.013
	Imipenem	≤ 0.013 ~ 0.05	≤ 0.013	≤ 0.013
	Ceftazidime	0.05 ~ 100	0.1	0.2
β -streptococci (16)	Meropenem	≤ 0.013 ~ 0.05	0.05	0.05
	Imipenem	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	Ceftazidime	0.05 ~ 0.39	0.1	0.1
<i>S. pneumoniae</i> (22)	Meropenem	≤ 0.013 ~ 0.1	≤ 0.013	0.025
	Imipenem	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	Ceftazidime	0.1 ~ 12.5	0.2	0.39
<i>E. faecalis</i> (39)	Meropenem	0.39 ~ 12.5	6.25	6.25
	Imipenem	0.05 ~ 1.56	0.78	1.56
	Ceftazidime	3.13 ~ >100	>100	>100
<i>E. faecium</i> (42)	Meropenem	12.5 ~ >100	>100	>100
	Imipenem	0.1 ~ >100	100	>100
	Ceftazidime	>100	>100	>100

ABPC^r: ampicillin-resistant

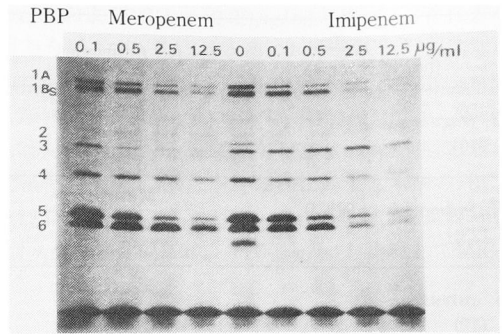
やや劣る抗菌力であった。*S. pyogenes* 50株に対する本剤およびIPMのMIC₉₀は共に0.013 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、強い抗菌力を示した。*S. pneumoniae* 22株、および β -streptococci 16株に対しては本剤はIPMと同様に強い抗菌力を示した。*E. faecalis* 39株に対しては、本剤のMIC₅₀とMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり中程度の抗菌力を示した。一方*E. faecium*に対する本剤、IPM、CAZの抗菌力は弱く、MIC₉₀はすべて100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

MEPMのグラム陰性菌に対する抗菌力は非常に強力であった。*E. coli* CS2(R⁺)50株に対する本剤のMIC₉₀は0.05 $\mu\text{g/ml}$ であり、IPM、CAZより優れていた。*K. pneumoniae* 47株に対しても本剤のMIC₉₀は0.2 $\mu\text{g/ml}$ であり強い抗菌力を示した。*P. mirabilis* 50株、*P. vulgaris* 35株、*P. rettgeri* 29株に対する本剤のMIC₉₀はそ

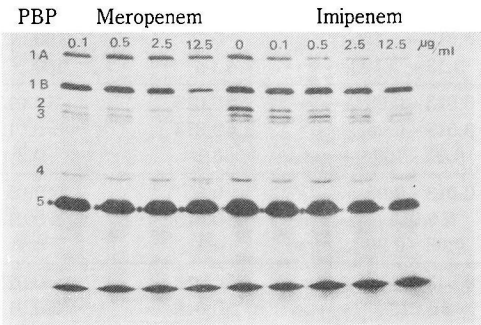
れぞれ0.05、0.1、3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり比較薬剤であるIPM、CAZより優れていた。*S. marcescens* 50株に対する本剤のMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、IPM、CAZと同様に中等度の抗菌力を示した。*E. cloacae* 50株、*C. freundii* 50株に対する本剤のMIC₉₀は、両菌種とも0.39 $\mu\text{g/ml}$ で被験薬剤中最も優れていた。*A. calcoaceticus* 27株に対する本剤のMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ でIPMより1管劣るが、CAZよりはかなり優れた成績だった。*P. aeruginosa* 50株に対する本剤のMIC₅₀は0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、MIC₉₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ でありIPMより1管優れ、CAZよりはかなり強い抗菌力を示した。*P. cecapacia* 33株に対しても同様で本剤は被験薬剤中最も優れた抗菌力を示した。*X. maltophilia* 29株に対しては本剤はIPM同様抗菌力は弱かった。*B. fragilis* 40株に対する本剤の



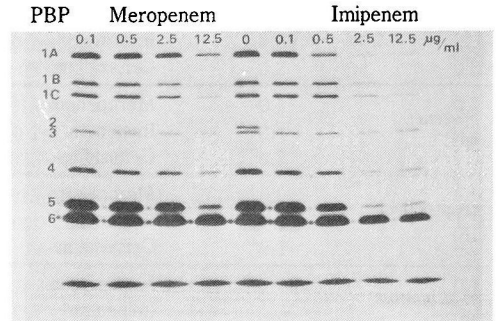
1-a. *S. aureus* 108-1 (MRSA)



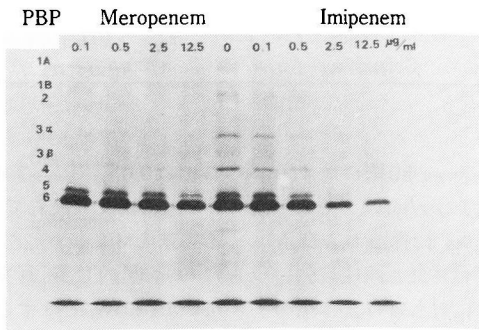
1-b. *E. coli* NIHJ JC 2



1-c. *P. vulgaris* 33



1-d. *S. marcescens* 13



1-e. *P. aeruginosa* PAO1

Fig. 1. Competition of meropenem and imipenem for penicillin-binding proteins.

MIC₅₀は0.2 μ g/ml, MIC₉₀は1.56 μ g/mlであり, IPMよりやや優れた抗菌力を示した。ABPC耐性*H. influenzae* 23株に対して, 本剤のMIC₅₀, MIC₉₀共に0.013 μ g/ml以下であり被験薬剤中最も強い抗菌力を示した。

2. MEPMの作用点PBP_sに対する結合親和性

S. aureus 108-1(MRSA)のPBP_sに対するMEPMの結合親和性を, IPMのそれと比較すると, すべてのPBP画分に対してMEPMの方が結合親和性が強く, 特にMRSA特有のPBP2'に対して顕著であった(Fig. 1-a)。*E. coli* NIHJ JC-2のPBP_sに対しては, MEPMはPBP2に最も高い親和性を示し, 次いでPBP3, 1A, 1Bsの順であった(Fig. 1-b)。IPMのそれと比較するとPBP2に対する親和性は両者とも高かったが, PBP3に対してはMEPMの方が高く, PBP1BsにはIPMの方が高かった。*P. vulgaris* 33のPBP_sに対してはMEPMはPBP3に対し最も強く結合し, 次いでPBP2に対して強い親和性を示した。一方IPMはPBP2, 1Aに対する結合親和力が強かった(Fig. 1-c)。*S. marcescens* 13のPBP_sに対してMEPMは, PBP2に最も強く, 次いで3および1Bに結合し, IPMが2に最も強く次いで1A, 1Bおよび1Cに結合するのと, 結合親和性の特徴がやや異なっていた(Fig. 1-d)。*P. aeruginosa* PAO1のPBP_sに対しては, MEPMは2, 3 α , 3 β , 4に最も強く結合し, 次いで1A, 1Bに結合親和性を示した。一方IPMは2および1Aに対する結合親和性は高いが, 1B, 3 α , 3 β に対する親和性はMEPMに劣った(Fig. 1-e)。

3. β -lactamase不活性化作用

MEPMの各種 β -lactamaseに対する一時阻害力を, Ki値としてsulbactam(SBT), clavulanic acid(CVA)およびIPMと比較するとTable 2のごとく, MEPMはType II bの β -lactamaseを除き平均して小さなKi値を示した。IPMはType II bの β -lactamaseに対するKi値も小さかった。一方SBTとCVAはType I a β -lactamaseに対するKi値が大きく, またType V aの β -lactamaseに対するKi値も比較的高かった。

MEPMの β -lactamaseに対する永久~半永久不活化作用をFisherの方法でSBT, CVA, IPMおよびflucloxacilin(MFIPC)と比較すると, Fig. 2-aのごとく, SBTとともに極めて強い不活化作用を示した。MFIPCも不活化作用が強いように見えるが, この薬剤のType I a β -lactamaseに対するKi値が 0.7×10^{-4} μ Mと小さいのでこの方法では最終的な β -lactamase残存活性測定時にKi値以下にならず見かけ上の成績である。一方IPMとCVAのType I a β -lactamaseに対する不活化作用は中等度であった。

Type I c β -lactamaseに対しては, Fig. 2-bのごとくMEPMおよびCVAが最も強い不活化作用を示し, 次いでIPMおよびSBTであったが, この酵素に対してはすべての β -lactamase阻害剤の不活化作用は強かった。しかしMFIPCは全く永久不活化作用を示さなかった。

Type II b β -lactamaseに対しても, MEPM, IPM, CVAおよびSBTがFig. 2-cのごとく強い不活化作用を示したが, 低濃度における不活化力はCVAとSBTがMEPMおよびIPMより強かった。この酵素に対してもMFIPCは全く不活化力を持たない。

多くのR plasmidが産生するType IIIの β -lactamaseに対しては, Fig. 2-dのごとくMEPMとCVAの不活化力が最も強く, 次いでIPMとSBTであった。MFIPCは不活化力を示さなかった。

*K. pneumoniae*が染色体性に産生するType IV b β -lactamaseに対しては, Fig. 2-eのごとくCVAが最も強い不活化力を示し, 次いでMEPM, IPM, SBTの順であった。MFIPCはこの酵素にも不活化作用はない。

一部のR plasmidの産生するType V aの β -lactamaseにはFig. 2-fのごとくMEPMが最も強い不活化力を示し, 次いでIPMであった。この酵素に対してはSBTとCVAは低濃度における不活化力が弱かった。この酵素にもMFIPCの不活化作用はない。

4. 血清補体との協力作用

E. coli NIHJ JC-2の5時間後の生菌数が接種時の

Table 2. Ki values of meropenem and others against various β -lactamases

β -lactamase		Ki (μ M)			
Richmond	Source	Sulbactam	Clavulanic acid	Imipenem	Meropenem
Ia	<i>E. cloacae</i> NeK 39	78.3	496	0.14	0.048
Ic	<i>P. vulgaris</i> 33	1.52	0.53	0.16	0.13
IIb	<i>P. mirabillis</i> Jyio	0.41	0.089	8.47	76.9
III=TEM	<i>E. coli</i> CS 2/RK 1	0.69	0.30	2.30	1.20
IVb	<i>K. pneumoniae</i> 42	0.96	0.26	1.38	1.04
Va	<i>E. coli</i> CS 2/RE 45	32.8	12.5	4.13	0.58

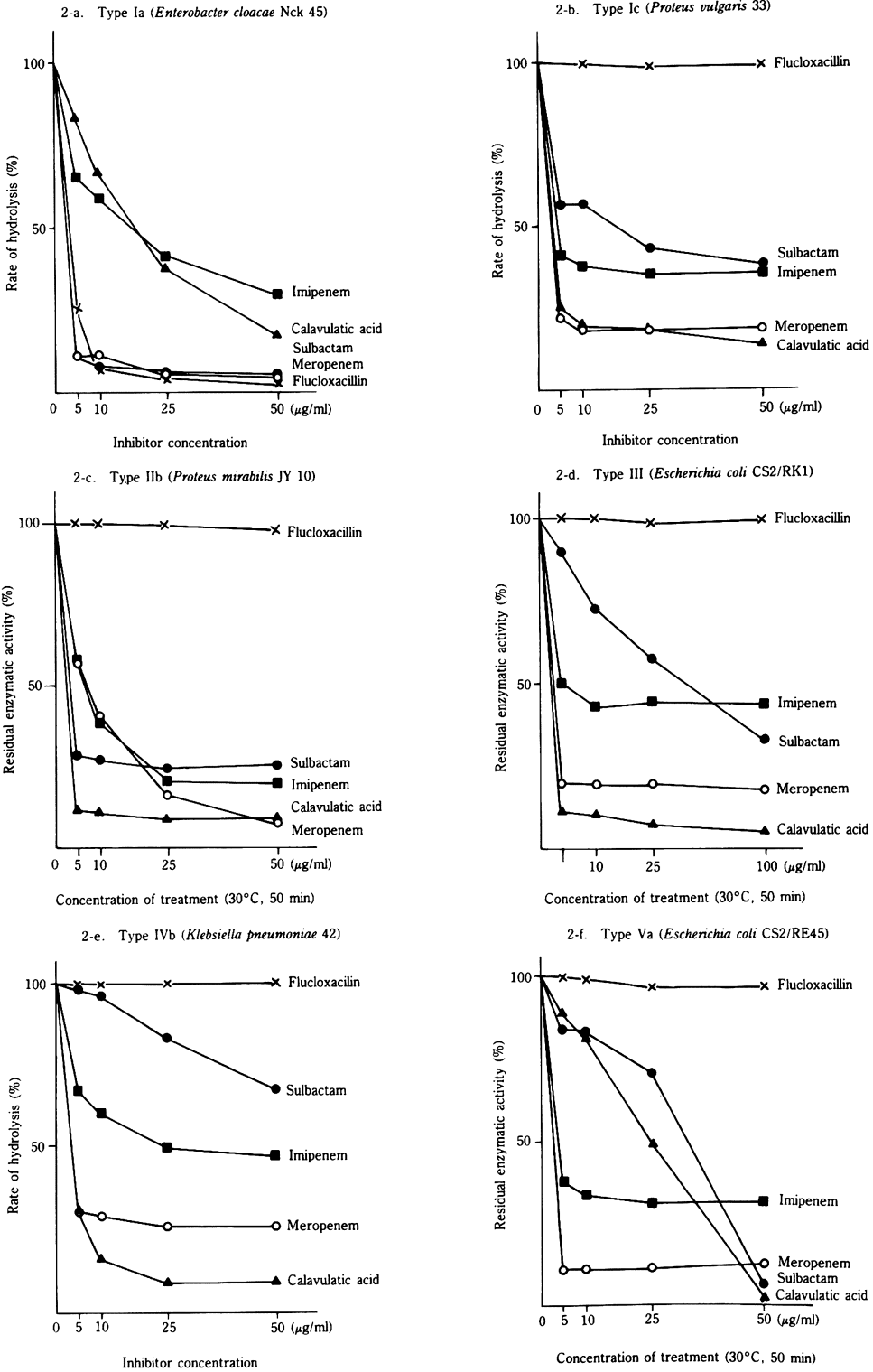


Fig. 2. Permanert inactivation of the various types of β -lactamases by meropenem and others.

50%前後になるようなMEPMの濃度(0.013 μ g/ml)と、この菌の増殖に影響を与えない最高量の補体量(0.5units/ml)を共存させても、両者の協力的殺菌作用は認められなかった(Fig. 3)。

5. マウス培養M ϕ との協力的食菌殺菌作用

マウス培養M ϕ をL-CMで活性化し、それに*E. coli* NIHJ JC-2の生菌を50倍量接種すると、良く食菌するが、5時間後には培養M ϕ が生体内ほどの殺菌力を持たないためか、食菌された*E. coli*が細胞内で分裂し、Fig. 4-aのごとく遊出する。これに1MICのMEPMを共存させるとFig. 4-bのごとく薬の影響で大きな球状になった*E. coli*細胞はよく食菌消化され、消化の終わった明らかな食空胞が見られる。1/2MICおよび1/4MIC存在下でも消化は進み(Fig. 4-c,d), 1/8MIC共存下ではM ϕ の殺菌力と菌の増殖力とがほぼ平行する(Fig. 4-e)。

6. MEPMのブタ精製DHP- I に対する安定性

Fig. 5のごとく、IPMは基質濃度1mg/mlでも0.1mg/mlでもブタ腎から精製された0.02units/mlのDHP- I で急速に破壊されるが、MEPMはかなりこの酵素に安定で、0.02units/mlのDHP- I でも37 $^{\circ}$ C 180分間の処理で約40%活性が残存する。基質濃度を10倍にするとさらに破壊速度は遅くなり、180分間の処理でも活

性が50%残存した。

III. 考 察

DHP- I に安定性が向上したMEPMは、感受性*S. aureus*や、*E. faecalis*にはIPMより若干抗菌力が弱い、MRSA、特にIPMに中等度感受性を示すものにはIPMより抗菌力は強い。

グラム陰性菌にはIPMより抗菌力が強く、特に*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, および嫌気性菌*B. fragilis*にIPMの2~8倍の抗菌力を示すことは特筆に値する。

MEPMはType II b以外の各種 β -lactamaseに強い一時阻害力(小さなKi値)を示す上、永久~半永久不活化力も強く、Type I aおよびI c β -lactamaseにはCVAと同程度、Type IIIおよびIV b β -lactamaseにはCVAに若干劣り、Type II およびVaにはCVAに優る不活化力を示した。すべての β -lactamaseに対しMEPMはIPMやSBTより強い不活化作用があった。

作用点PBP_sに対してはMEPMはMRSA特有のPBP_{2'}にIPMより強い結合親和性を示し、グラム陰性菌では*E. coli*, *P. vulgaris*および*P. aeruginosa*のPBP_sにIPMより結合親和性が高かった。ただし*S. marcescens*ではIPMの方がMEPMより多くのPBP画分に親和性が高かった。

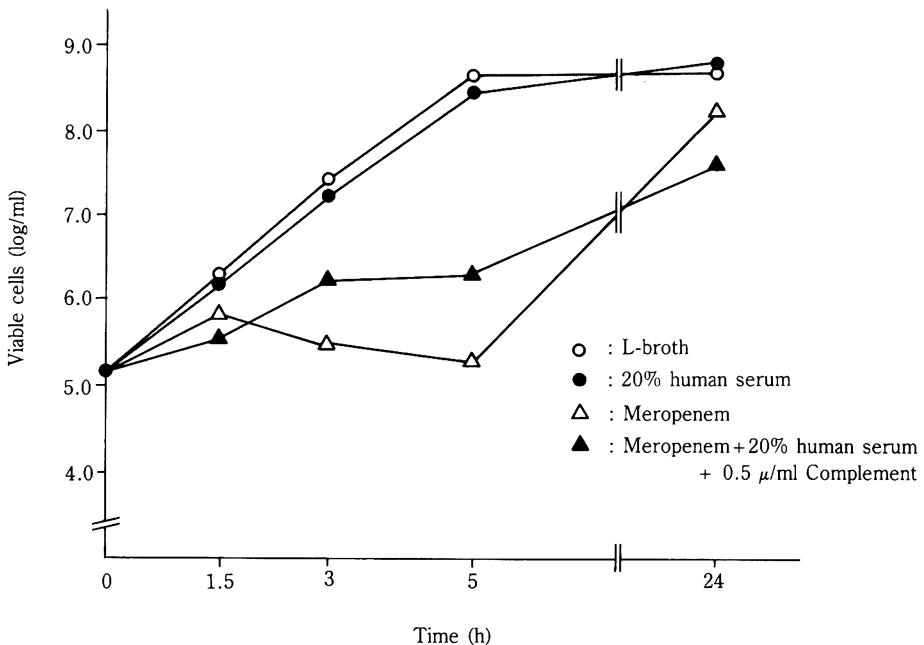


Fig. 3. Influence of ID₅₀ meropenem (0.013 μ g/ml) on the bactericidal effect of serum complement of *Escherichia coli* NIHJ JC2.

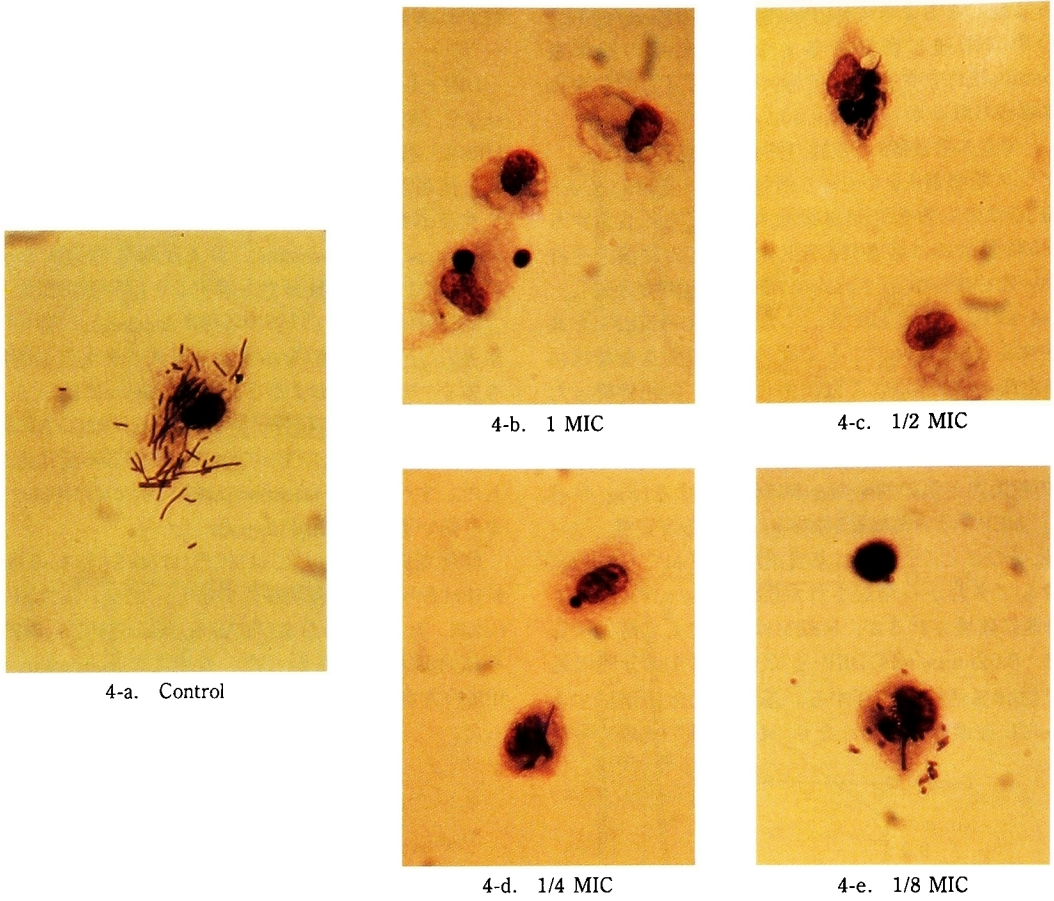


Fig. 4. Phagocytosis of *Escherichia coli* NIHJ JC2 by mouse cultured macrophages in the absence of meropenem or presence of 1 ~ 1/8 MIC of meropenem.

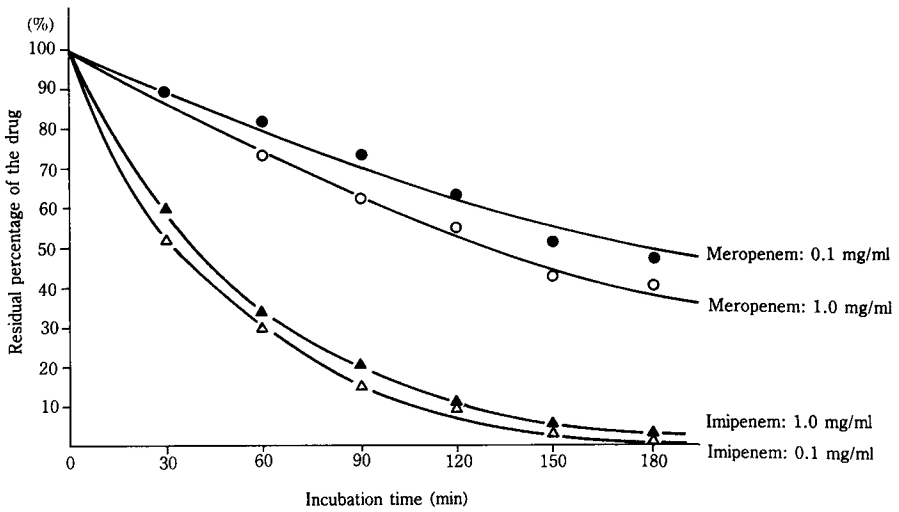


Fig. 5. Stabilities of meropenem and imipenem against swine DHP-I.

MRSA以外の多くの菌に対する抗菌力は外膜透過性の良否(グラム陰性菌), PBPsに対する結合親和性の強弱, および β -lactamase不活化力の強弱の総和である。グラム陰性菌にMEPMがIPMより抗菌力が強いのは, β -lactamase不活化力がIPMより強く, 作用点への親和性が高いためと考えられる。*S. marcescens*の場合には, 外膜透過性の良好性が加わってIPMより強い抗菌力を示すのであろう。MEPMの大きな特徴は, 多くの菌の細胞壁合成開始司令酵素にIPM同様親和性が高いとともに, IPMと異なり隔壁合成酵素にも親和性を示すことである。その結果MEPMの存在下で増殖した菌は, IPM存在下で増殖したものより大型のスフェロプラスト状細胞となる。

MEPMは補体との協力作用は顕著ではないが, マウス培養M ϕ とは強い協力的食菌作用を示し, その1/4 MIC存在下まで協力作用が認められた。抗菌剤の生体内効果に影響する宿主感染防御機構の中で最も重要なのは白血球との協力の良否なので, 広範囲の細菌に抗菌力を示し β -lactamaseを不活化するため耐性株の少ないMEPMはその体内動態が良好であれば多くの感染症に優れた臨床効果を示すことが期待される。

文 献

1) 横田 健, 小林宏行: 第39回日本化学療法学

会総会 新薬シンポジウム I。Meropenem (SM-7338) 浦安, 1991

- 2) 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
- 3) Spratt R G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K12. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 72: 2999~3003, 1975
- 4) Rubin F, Smith A, Smith D F: Characterization of R factor β -lactamase by the acidometric method. Antimicrob Agents Chemother 3: 68~73, 1973
- 5) Fisher J, Charnas R C, Knowles J R: Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* R TEM β -lactamase by clavulanic acid. Biochemistry 17: 2180~2184, 1978
- 6) Nozawa R T and Yokota T: Inhibition by glucocorticoids and choeragen of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (Hormonal control of macrophage growth) Cell Physiol 100: 351~364, 1979

MEROPENEM, ITS *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND BIOLOGICAL STABILITY

Takeshi Yokota, Eiko Suzuki and Kyoko Arai

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

2-2-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Fifty percent minimum inhibitory concentrations (MIC_{50}) of meropenem (MEPM) were 3.13, 25, 100, ≤ 0.013 , 0.05, 0.025, 6.25, >100 , 0.05, ≤ 0.013 , 0.05, 0.1, 3.13, 0.39, 0.39, 6.25, 1.56, 1.56, >100 , 1.56, ≤ 0.013 , and 1.56 $\mu\text{g/ml}$ against 16 to 50 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, MRSA, CNS, *Streptococcus pyogenes*, β -streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and *Bacteroides fragilis*, respectively.

MEPM was very stable against all β -lactamases tested except for that of *X. maltophilia* and also showed potent first-order inhibitory activities (i.e. small K_i values), which were stronger than those of imipenem (IPM) against both PCase and CEPase.

MEPM manifested stronger binding affinities to all penicillin-binding proteins (PBPs) of *S. aureus* and PBPs2 and 3 of *P. vulgaris* than IPM but showed weaker affinities to PBP2s of *S. marcescens* and *E. coli* than IPM.

MEPM showed moderate synergy in bactericidal effect with the complement, but manifested good synergy with mouse cultured macrophages in live *E. coli* phagocytosis at concentrations of more than 1/4 the MIC of MEPM.

MEPM was far more stable against swine DHP- I than IPM.