

新規カルバペネム系抗生物質 biapenem の細菌学的評価

吉田益史・渡邊正人・三橋 進
エビゾーム研究所*

Biapenem(BIPM)の *in vitro*における抗菌活性を imipenem (IPM)と ceftazidime (CAZ)を対照薬として比較検討した。BIPMはグラム陽性菌から *Pseudomonas aeruginosa*を含むグラム陰性菌及び嫌気性菌まで幅広い抗菌スペクトルを示した。

グラム陰性菌に対しては IPM よりも優れた抗菌力を示し、1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で12%の *Proteus mirabilis*, 7%の *Proteus vulgaris*, 8%の *Morganella morganii*及び50%の *Serratia marcescens*を除く供試した全ての *Enterobacteriaceae*の生育を阻止した。また、CAZ耐性 *Citrobacter freundii*及び *Enterobacter cloacae*に対しても優れた抗菌力を示し、0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度でそれらの菌の発育を阻止した。さらに、*P. aeruginosa*に対して BIPMは、IPMの2倍強の抗菌活性を示した。グラム陽性菌に対する BIPMの抗菌力は IPMと比べて1/2~1/4であった。メチシリン耐性 *Staphylococci*, *Enterococcus faecium*及び *Xanthomonas maltophilia*に対しては IPMと同様に本剤の抗菌力は弱いものであった。

標準菌株に対する BIPMの最小発育阻止濃度(MIC)と最小殺菌濃度(MBC)との差がほとんどないこと、及び、BIPMの増殖曲線に及ぼす影響から BIPMの強い殺菌力が示された。

BIPMは、*X. maltophilia*の産生する L-1 酵素には IPMの約1/2の速度で加水分解を受けるものの、その他の各種 β -lactamase に対して極めて安定であった。

Zimmermann と Rosselet の方法で、*P. aeruginosa* PAO4141 株における外膜透過性の測定を行った結果、基質濃度 50 μM における BIPMの透過速度係数は $(2.04 \pm 0.45) \times 10^{-6} \text{cm/s}$ 、100 μM におけるそれは $(1.32 \pm 0.18) \times 10^{-6} \text{cm/s}$ となり(平均 \pm 標準偏差)、IPMと同様、meropenem 及び panipenem と比較して2倍~3倍高い外膜透過性を示した。

Key words : Biapenem, カルバペネム系抗生物質, β -lactamase

Biapenem(BIPM)は日本レダリー株式会社で開発された新規カルバペネム系抗生剤であり、その構造上の特徴は4位に methyl基、3位に triazolium基を有していることである(Fig.1)。BIPMは、グラム陽性菌、グラム陰性菌及び嫌気性菌にまで広域な抗菌スペクトルを有し、特に *Pseudomonas aeruginosa*に対して強い抗菌力を示し、さらに、ブタ及びヒト由来の dehydropeptidase-1に高い安定性を有していることがすでに報告されている¹⁻⁴⁾。

今回、BIPMの有効性を評価する目的で、日本化学療法学会標準菌株、臨床より分離された各種菌株ならびに β -lactamase産生菌株に対する抗菌力、殺菌力、精製した各種 β -lactamase に対する安定性、 β -lactamase誘導産生能及び Zimmermann と Rosselet の方法による *P. aeruginosa*の外膜透過性の測定を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

BIPMは日本レダリー株式会社より提供された原末を用いた。IPMは萬有製薬、CAZは日本グラクソ、meropenem(MEPM)は住友製薬、panipenem(PAPM)は三共より分与されたものを使用した。Penicillin G (PCG)及び ampicillin (ABPC)は明治製薬、cephaloridine (CER)は塩野義製薬、methicillin (DMPPC)は萬有製薬より分与を受けたいずれも力価の明らかなものを使用した。

各薬剤は実験ごとに調製して使用した。

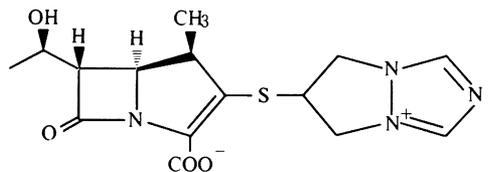


Fig. 1. Chemical structure of biapenem

Table 1. Media used for preculture and MIC determination

Media	Organisms
For preculture	
BHIB	<i>Streptococcus pyogenes</i>
BHIB + 5% horse blood	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
BHIB + 5% Fildes Enrichment (Difco)	<i>Haemophilus influenzae</i>
TMA + 1% Hemoglobin (Nissui)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
GAMB	Anaerobes
STB + 0.4% KNO ₃	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
STB	Other organisms
For MIC determination	
SDA-N + 5% horse blood	Streptococci
SDA-N + 5% Fildes Enrichment (Difco)	<i>Haemophilus influenzae</i>
GCA + 2% Hemoglobin (Nissui)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
GAMA	Anaerobes
SDA-N	Other organisms

Abbreviations: BHIB, Brain heart infusion broth (Difco); TMA, Thayer-Martin Agar Base (Nissui); GCA, GC agar (Difco); GAMB, GAM broth (Nissui); STB, Sensitivity test broth (Nissui); SDA-N, Sensitivity disk agar-N (Nissui); GAMA, GAM agar (Nissui).

2. 使用菌株

当研究所に保存されている日本化学療法学会設定の標準菌株⁵⁾、 β -lactamase産生菌株、及び各種臨床材料より分離された菌株(主に1985年以降に分離された株)を用いた。

*P. aeruginosa*の外膜透過性の測定には、*P. aeruginosa* PAO4141を用いた。

3. 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度(MIC)の測定は、日本化学療法学会制定の感受性測定法⁶⁾及び同学会の嫌気性菌感受性測定法⁷⁾に準拠して行った。Table 1にその使用培地及び培養法を示した。37℃、18~20時間静置培養した培養菌をゼラチン加緩衝生理食塩水(BSG)を用いて希釈し、約 10^6 CFU/mlの濃度の接種菌液を調製した。なお、偏性嫌気性菌の希釈はGAM broth(ニッスイ)を用い調整を行った。調整した菌液をマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて薬剤含有寒天平板上に接種し、37℃、18~20時間培養後、肉眼的に発育の認められない最小薬剤濃度をMICとした。

なお、*Neisseria gonorrhoeae*及び*Haemophilus influenzae*の培養はローソン培養とし、偏性嫌気性菌の培養は嫌気条件下で行った。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

BIPMの抗菌力に及ぼす諸因子として培地の種類、培地のpH、ウマ血清添加及び接種菌量の影響について、グラム陽性菌2株、グラム陰性菌5株を被験菌として調べた。

培地の違いによる抗菌力の変動には、感受性ディスク用培地-N(SDA-N:ニッスイ)、普通寒天培地(NA:ニッスイ)、heart infusion寒天培地(HIA:ニッスイ)及びbrain heart infusion寒天培地(BHIA:ニッスイ)の4種類を使用した。培地pHによる影響はpH5.4、6.4、7.4及び8.4に調整したSDA-Nを用い、血清添加による影響は馬血清をSDA-Nに10、20、40%を添加して抗菌力の測定を行った。接種菌量の影響については、約 10^5 、 10^6 、 10^7 及び 10^8 CFU/mlの菌を接種したときの抗菌力の測定を行った。

5. 殺菌効果

1) 最小殺菌濃度の測定

被験菌を感受性測定用プロス(STB:ニッスイ)を用いて対数増殖期中期まで37℃で振盪培養した。薬剤を含むSTBに最終 $5 \sim 10 \times 10^5$ CFU/mlになるように菌液を接種し、37℃、18~20時間静置培養後肉眼で濁度の認められない最小濃度をMICとした。さらに培養液10 μ lを

SDA-N 10ml に混釈し 37℃、48 時間培養後、初期接種菌量を 99.9% まで減少させる最小濃度を最小殺菌濃度 (MBC) とした。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

STB で 37℃、18~20 時間振盪培養した被験菌を新鮮な同液体培地に希釈し、37℃ で対数増殖期まで振盪培養を行った。薬剤添加後さらに 37℃ で振盪培養し、経時的に培養液中の生菌数測定を行った。

6. β -Lactamase に対する作用

1) β -Lactamase に対する安定性

全ての β -lactamase は当研究所に保存してある精製標品を使用した。各薬剤の加水分解速度は、spectropho-

tometric assay⁸⁾ により測定した。

Penicillinase (PCase) に対しては PCG, cephalosporinase (CSase) 及び oxyiminocephalosporinase (CXase) に対しては CER の加水分解速度を 100 とした時の相対加水分解速度で、 β -lactamase に対する安定性を示した。

2) β -Lactamase 誘導能の測定

方法は以前に報告されている方法⁹⁾ に準拠して行った。酵素活性量は基質として 100 μ M の濃度の CER を用いて spectrophotometric assay 法⁸⁾ で測定した。酵素液の蛋白定量は Lowry らの方法¹⁰⁾ で実施した。各薬剤の β -lactamase 誘導能は、単位蛋白量当りの活性 (units/mg of protein) で表した。

Table 2. Antibacterial spectrum of biapenem

Organisms	MIC (μ g/ml) ^{a)}		
	biapenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	0.10	0.013	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.013	≤ 0.006	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.05	0.013	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	≤ 0.006	≤ 0.006	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.05	0.025	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.05	0.025	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	0.20	1.56	0.10
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.05	0.20	0.20
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0.39	0.78	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0.05	0.10	0.025
<i>Salmonella typhimurium</i> IID971	0.05	0.20	0.10
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.05	0.10	0.10
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	0.78	0.78	0.025
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.20	0.20	0.10
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	0.39	0.20	0.05
<i>Serratia marcescens</i> IAM1184	0.20	0.20	0.05
<i>Morganella morganii</i> IFO3848	0.20	0.39	0.025
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	3.13	6.25	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.39	0.39	0.025
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	0.39	0.78	0.025
<i>Providencia rettgeri</i> IFO3850	0.20	0.39	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3445	0.39	0.39	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	0.20	0.39	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	3.13	6.25	0.78

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10^6 CFU/ml suspension of test bacteria.

7. 外膜透過性の測定

渡邊らが報告した¹¹⁾ *P. aeruginosa*由来の pMS345 プラスミドを導入した *P. aeruginosa* PAO4141 株を使用した。Luria broth (LB) にて一夜培養した菌液 2.5ml を新たに作成した 50ml の LB に接種し、37℃ で 2 時間振盪培養を行った。室温で遠心により菌体を集菌した後、5mM の MgCl₂ を添加した 50mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH 7.0) で一回遠心洗浄を行なった。同緩衝液に懸濁した後、610nm の濁度を 0.9 に調整した。

調整した菌液 10ml を乾燥後、乾燥菌体重量の測定を行った。菌体の超音波破碎液の β -lactamase 活性を測定し、Vmax 値を算出した。*P. aeruginosa* の外膜透過係数 (Pz) は、Zimmermann ら¹²⁾ または Nikaido ら¹³⁾ の方法により算出した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトル

BIPM の標準菌株に対する抗菌力を Table 2 に示した。グラム陽性菌に対する BIPM の抗菌力は IPM の 1/2 ~ 1/8

Table 3-1. Antibacterial activities of biapenem against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> (123)	biapenem	0.05 ~ 100	0.20	50
	imipenem	0.025 ~ 100	0.05	50
	ceftazidime	6.25 ~ >100	25	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin susceptible MIC < 12.5 $\mu\text{g/ml}$)	biapenem	0.05 ~ 3.13	0.10	0.39
	imipenem	0.025 ~ 0.78	0.025	0.10
	ceftazidime	6.25 ~ 100	12.5	25
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin resistant MIC \geq 12.5 $\mu\text{g/ml}$) (53)	biapenem	0.20 ~ 100	6.25	100
	imipenem	0.05 ~ 100	1.56	100
	ceftazidime	25 ~ >100	>100	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (58)	biapenem	0.10 ~ 100	1.56	25
	imipenem	0.013 ~ 100	0.20	25
	ceftazidime	3.13 ~ >100	25	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (methicillin susceptible MIC < 12.5 $\mu\text{g/ml}$)	biapenem	0.10 ~ 6.25	0.20	3.13
	imipenem	0.013 ~ 1.56	0.025	0.20
	ceftazidime	3.13 ~ >100	12.5	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (methicillin resistant MIC \geq 12.5 $\mu\text{g/ml}$) (30)	biapenem	0.20 ~ 100	3.13	50
	imipenem	0.05 ~ 100	0.78	50
	ceftazidime	12.5 ~ >100	25	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (29)	biapenem	\leq 0.006 ~ 0.025	0.013	0.013
	imipenem	\leq 0.006 ~ 0.013	\leq 0.006	0.013
	ceftazidime	0.20 ~ 0.78	0.20	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> (96)	biapenem	\leq 0.006 ~ 0.013	\leq 0.006	0.013
	imipenem	\leq 0.006	\leq 0.006	\leq 0.006
	ceftazidime	0.10 ~ 0.39	0.20	0.20

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10⁶ CFU/ml suspension of test bacteria.

Table 3-2. Antibacterial activities of biapenem against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^{a)}		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Enterococcus faecalis</i> (95)	biapenem	0.78 ~ 25	3.13	3.13
	imipenem	0.39 ~ 6.25	0.78	1.56
	ceftazidime	12.5 ~ >100	100	>100
<i>Enterococcus faecium</i> (29)	biapenem	50 ~ >100	>100	>100
	imipenem	12.5 ~ >100	>100	>100
	ceftazidime	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> (144)	biapenem	0.025 ~ 0.10	0.05	0.10
	imipenem	0.10 ~ 0.20	0.20	0.20
	ceftazidime	0.025 ~ 0.78	0.10	0.20
<i>Shigella</i> spp. (107)	biapenem	0.025 ~ 0.39	0.05	0.10
	imipenem	0.05 ~ 0.39	0.20	0.20
	ceftazidime	0.05 ~ 0.39	0.10	0.20
<i>Salmonella</i> spp. (108)	biapenem	0.025 ~ 0.78	0.10	0.20
	imipenem	0.10 ~ 0.78	0.20	0.20
	ceftazidime	0.10 ~ 0.78	0.20	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (127)	biapenem	0.05 ~ 1.56	0.20	0.78
	imipenem	0.20 ~ 1.56	0.39	0.78
	ceftazidime	0.05 ~ 12.5	0.20	0.39
<i>Klebsiella oxytoca</i> (104)	biapenem	0.10 ~ 1.56	0.39	0.78
	imipenem	0.20 ~ 3.13	0.78	0.78
	ceftazidime	0.013 ~ 0.78	0.05	0.10
<i>Proteus mirabilis</i> (101)	biapenem	0.10 ~ 6.25	0.78	3.13
	imipenem	0.39 ~ 12.5	1.56	6.25
	ceftazidime	0.013 ~ 3.13	0.05	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> (95)	biapenem	0.20 ~ 3.13	1.56	1.56
	imipenem	0.20 ~ 3.13	1.56	3.13
	ceftazidime	0.05 ~ 1.56	0.10	0.20
<i>Morganella morganii</i> (68)	biapenem	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56
	imipenem	0.78 ~ 6.25	3.13	6.25
	ceftazidime	0.10 ~ 25	0.39	12.5
<i>Providencia rettgeri</i> (59)	biapenem	0.10 ~ 1.56	0.39	1.56
	imipenem	0.20 ~ 1.56	0.78	1.56
	ceftazidime	≤ 0.006 ~ 3.13	0.10	0.39

であったが、CAZより8～128倍優れた抗菌力を有していた。しかし、グラム陰性菌に対してはIPMの2倍から4倍優れた抗菌力を有し、また、*P. aeruginosa*に対してはCAZと同等、IPMと比較すると2倍優れた抗菌力を有していた。以上のように、BIPMはグラム陽性菌及び陰性菌に対して幅広い抗菌活性を有していた。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床材料より分離された菌株(グラム陽性菌6菌種、グラム陰性菌20菌種、偏性嫌気性菌3菌種、計2400株以上)に対するBIPMの抗菌力の結果をTable 3に示した。

BIPM, IPM に対し *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*は0.025～100 μ g/mlまでの広い感受性

分布を示し、BIPMのMIC₅₀値はそれぞれ0.20 μ g/ml, 1.56 μ g/mlでありIPMのそれと比較して4～8倍高い値を示したが、MIC₉₀値はIPMと同じ値を示し、それぞれ50 μ g/ml, 25 μ g/mlであった。

また、メチシリン耐性*S. aureus*, *S. epidermidis*に対しては、BIPM, IPMとも抗菌力は弱かった。

*Streptococcus pneumoniae*及び*Streptococcus pyogenes*に対してBIPMは、0.025 μ g/mlの濃度で全ての供試菌株の発育を阻止し、IPMと共に強い抗菌力を有していた。

*Enterococcus faecalis*に対するBIPMの抗菌力はIPMの約1/4であった。BIPMは*Enterococcus faecium*に対してIPM, CAZと共に抗菌活性を示さなかった。

Table 3-3. Antibacterial activities of biapenem against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotic	MIC (μ g/ml) ^{a)}		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Citrobacter freundii</i> (95)	biapenem	0.025～0.78	0.10	0.39
	imipenem	0.10～1.56	0.20	0.78
	ceftazidime	0.10～>100	0.39	100
<i>Enterobacter cloacae</i> (105)	biapenem	0.025～1.56	0.10	0.20
	imipenem	0.05～0.78	0.20	0.39
	ceftazidime	0.05～>100	0.39	50
<i>Enterobacter aerogenes</i> (10)	biapenem	0.39	0.39	0.39
	imipenem	0.39～1.56	0.78	0.78
	ceftazidime	0.10～12.5	0.20	0.20
<i>Serratia marcescens</i> (99)	biapenem	0.39～50	3.13	25
	imipenem	0.78～50	3.13	12.5
	ceftazidime	0.10～>100	1.56	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (395)	biapenem	0.05～50	0.78	12.5
	imipenem	0.20～50	1.56	12.5
	ceftazidime	0.39～>100	3.13	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ceftazidime resistant MIC \geq 25 μ g/ml) (117)	biapenem	0.20～50	3.13	12.5
	imipenem	0.78～50	3.13	25
	ceftazidime	25～>100	50	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (imipenem resistant MIC \geq 12.5 μ g/ml) (67)	biapenem	3.13～50	12.5	25
	imipenem	12.5～50	12.5	25
	ceftazidime	0.78～>100	25	50
<i>Pseudomonas cepacia</i> (45)	biapenem	0.39～3.13	1.56	3.13
	imipenem	0.78～6.25	3.13	6.25
	ceftazidime	0.39～3.13	0.78	1.56

Enterobacteriaceae のほとんどの菌種に対して BIPM に MIC 分布は非常に狭く、抗菌力は IPM と比較して 2~4 倍優れていた。12% の *Proteus mirabilis*, 7% の *Proteus vulgaris*, 8% の *Morganella morganii* 及び 50% の *Serratia marcescens* を除くと、BIPM は、0.78 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 90% 以上、1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で全菌株の発育を阻止した。

Escherichia coli, *Shigella* 属, *Salmonella* 属, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* 及び *Enterobacter aerogenes* に対して BIPM は

IPM の 2 倍優れた抗菌力を示し、その感受性分布は鋭い一峰性を示した。

また、CAZ の MIC 値が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した *C. freundii* (31 株) 及び *E. cloacae* (28 株) に対して、BIPM は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でそれら全ての供試菌の発育を阻止した。

P. mirabilis, *P. vulgaris* 及び *M. morganii* に対する BIPM の MIC₉₀ 値はそれぞれ 3.13 $\mu\text{g/ml}$, 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ となり、IPM と比較して 2~4 倍優れた抗菌力を示したが、CAZ の抗菌力の約 1/4 であった。

Table 3-4. Antibacterial activities of biapenem against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (35)	biapenem	0.10~0.20	0.10	0.20
	imipenem	0.10~0.39	0.20	0.20
	ceftazidime	3.13~25	6.25	12.5
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (48)	biapenem	25~>100	>100	>100
	imipenem	25~>100	>100	>100
	ceftazidime	0.78~>100	50	>100
<i>Haemophilus influenzae</i> (ampicillin susceptible MIC < 6.25 $\mu\text{g/ml}$) (75)	biapenem	0.39~3.13	0.78	3.13
	imipenem	0.39~6.25	1.56	3.13
	ceftazidime	0.05~0.39	0.10	0.20
<i>Haemophilus influenzae</i> (ampicillin resistant MIC \geq 6.25 $\mu\text{g/ml}$) (12)	biapenem	0.39~12.5	0.78	3.13
	imipenem	0.39~25	1.56	3.13
	ceftazidime	0.05~0.39	0.10	0.20
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (54)	biapenem	1.56~25	6.25	25
	imipenem	1.56~25	6.25	12.5
	ceftazidime	\leq 0.006~0.39	0.025	0.10
<i>Branhamella catarrhalis</i> (41)	biapenem	0.013~0.10	0.05	0.10
	imipenem	0.013~0.20	0.025	0.10
	ceftazidime	0.013~0.10	0.05	0.10
<i>Clostridium perfringens</i> (16)	biapenem	0.025~0.10	0.05	0.10
	imipenem	0.025~0.20	0.10	0.20
	ceftazidime	0.05~3.13	0.10	3.13
<i>Clostridium difficile</i> (22)	biapenem	3.13~6.25	3.13	6.25
	imipenem	3.13~25	3.13	6.25
	ceftazidime	25~>100	100	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> (27)	biapenem	0.05~1.56	0.39	0.78
	imipenem	0.20~6.25	0.39	3.13
	ceftazidime	0.78~>100	6.25	>100

S. marcescens に対する BIPM の MIC₅₀ 及び MIC₉₀ 値は、それぞれ 3.13 µg/ml, 25 µg/ml となり、IPM と同様広い MIC 分布を示したものの一部の菌株を除き良好な抗菌力を有していた。一方、CAZ の MIC₅₀ 値は 1.56 µg/ml であったが、MIC₉₀ 値は >100 µg/ml となり BIPM よりも弱い抗菌力を示した。

P. aeruginosa に対して BIPM は、IPM と同様に極めて強

い抗菌力を示した。両薬剤の MIC₉₀ 値は 12.5 µg/ml であったが、MIC₅₀ 値はそれぞれ 0.78 µg/ml, 1.56 µg/ml となり、BIPM に感受性を示す株が多く存在していた。また、117 株の CAZ 耐性 *P. aeruginosa* に対する BIPM の抗菌力は IPM と同様に非常に優れ、BIPM の MIC₅₀ 及び MIC₉₀ 値は、それぞれ 3.13 µg/ml, 12.5 µg/ml となった。しかし、供試菌の中には IPM と CAZ 両薬剤に耐性を示す株が 41

Table 4. Influence of several media on antibacterial activity

Organism	medium	MIC (µg/ml) ^{a)}		
		biapenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	SDA	0.10	0.025	6.25
	NA	0.05	0.013	12.5
	HIA	0.10	0.025	12.5
	BHIA	0.05	0.025	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	SDA	0.013	≤0.006	1.56
	NA	≤0.006	≤0.006	3.13
	HIA	0.013	≤0.006	1.56
	BHIA	≤0.006	≤0.006	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	SDA	0.05	0.20	0.10
	NA	0.05	0.10	0.20
	HIA	0.05	0.20	0.10
	BHIA	0.10	0.20	0.20
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	SDA	0.39	0.78	0.10
	NA	0.39	0.39	0.20
	HIA	0.78	0.78	0.20
	BHIA	0.39	0.78	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	SDA	0.05	0.20	0.025
	NA	0.025	0.10	0.025
	HIA	0.05	0.20	0.025
	BHIA	0.10	0.39	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	SDA	0.78	1.56	1.56
	NA	0.78	1.56	0.78
	HIA	0.39	1.56	1.56
	BHIA	0.78	1.56	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	SDA	1.56	1.56	3.13
	NA	1.56	1.56	3.13
	HIA	0.78	1.56	3.13
	BHIA	1.56	3.13	6.25

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10⁶ CFU/ml suspension of test bacteria.

Abbreviations: SDA-N, Sensitivity disk agar-N (Nissui); NA, nutrient agar (Nissui); HIA, Heart infusion agar (Nissui); BHIA, Brain heart infusion agar (Nissui).

株(約 35%)存在していた。67株の IPM 耐性 *P. aeruginosa* に対しては IPM と同じく抗菌力は弱く、MIC₉₀ 値は 25 µg/ml を示したが、BIPM に感受性を示す株が 9 株(約 13%) 存在していた。

Pseudomonas cepacia に対して BIPM は CAZ と同等、IPM より 2 倍優れた抗菌力を示した。

Xanthomonas maltophilia に対しては、BIPM、IPM 及び

CAZ 共にほとんど抗菌力を示さなかった。

Acinetobacter calcoaceticus に対して BIPM は IPM と同等、CAZ より 64 倍優れた抗菌力を有していた。

Ampicillin 感受性及び耐性 *H. influenzae* に対する BIPM の MIC₉₀ 値は 3.13 µg/ml、*N. gonorrhoeae* に対する MIC₉₀ 値は 25 µg/ml となりいずれも IPM と同等の抗菌力を示したが、CAZ の抗菌力と比較すると約 1/8 であった。

Table 5. Influence of medium pH on antibacterial activity

Organism	pH	MIC (µg/ml) ^{a)}		
		biapenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	5.4	— *	— *	— *
	6.4	0.05	0.025	6.25
	7.4	0.10	0.025	6.25
	8.4	0.10	0.025	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	5.4	— *	— *	— *
	6.4	≤0.006	≤0.006	0.78
	7.4	0.013	≤0.006	1.56
	8.4	0.025	0.013	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	5.4	0.20	1.56	0.78
	6.4	0.10	0.39	0.20
	7.4	0.05	0.20	0.10
	8.4	0.10	0.20	0.10
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	5.4	0.39	1.56	0.78
	6.4	0.39	0.39	0.20
	7.4	0.39	0.78	0.10
	8.4	0.78	1.56	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	5.4	0.10	1.56	0.10
	6.4	0.05	0.20	0.05
	7.4	0.05	0.20	0.025
	8.4	0.10	0.39	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	5.4	3.13	6.25	1.56
	6.4	1.56	3.13	1.56
	7.4	0.78	1.56	1.56
	8.4	0.78	1.56	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	5.4	3.13	3.13	6.25
	6.4	3.13	3.13	6.25
	7.4	1.56	1.56	6.25
	8.4	0.78	1.56	1.56

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10⁶ CFU/ml suspension of test bacteria.

* No growth

β -Lactamase 産生及び非産生の *Branhamella catarrhalis* に対し BIPM は, IPM, CAZ と同等の抗菌力を示し, MIC₉₀ 値は 0.10 $\mu\text{g/ml}$ であった。

グラム陽性嫌気性菌 *Clostridium difficile* 22株及びグラム陰性嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* 27 株に対して BIPM は, IPM とほぼ同等の抗菌力を示した。CAZ に耐性を示す *C. difficile* 及び *B. fragilis* に対しても IPM と同様優れた抗菌活性を有していた。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

BIPM の抗菌力に及ぼす培地, 培地 pH, 馬血清添加及び接種菌量の影響について検討した結果を Table4~Table7 に示した。

培地の影響として, SDA-N, NA, HIA, BHIA を用いた場合に, ほとんど影響を受けなかった。培地の pH を 5.4~8.4 まで変化させた時の抗菌力を測定した結果 *S. aureus* において, pH6.4 で最も低い MIC 値を示したの

Table 6. Influence of addition with horse serum on antibacterial activity

Organism	Serum conc.	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
		biapenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	0	0.10	0.025	6.25
	10	0.10	0.05	6.25
	20	0.20	0.05	6.25
	40	0.20	0.10	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0	0.013	≤0.006	1.56
	10	0.025	0.013	1.56
	20	0.025	0.013	1.56
	40	0.025	0.025	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0	0.05	0.20	0.10
	10	0.05	0.20	0.10
	20	0.10	0.20	0.10
	40	0.20	0.39	0.10
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	0	0.39	0.78	0.10
	10	0.39	0.78	0.20
	20	0.78	0.78	0.20
	40	1.56	0.78	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0	0.05	0.20	0.025
	10	0.10	0.39	0.025
	20	0.10	0.39	0.025
	40	0.20	0.78	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	0	0.78	1.56	1.56
	10	0.78	1.56	0.78
	20	0.78	1.56	0.78
	40	0.78	1.56	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	0	1.56	1.56	3.13
	10	0.78	1.56	3.13
	20	1.56	1.56	3.13
	40	1.56	1.56	1.56

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10⁶ CFU/ml suspension of test bacteria.

に対して、*E. coli* 及び *P. aeruginosa* では、pH5.4 で高い MIC 値を示したが、MIC 値の変動は 2 管以内であった。ウマ血清濃度を 10, 20, 40% 添加したときの抗菌力を測定した結果、40% の割合に添加しても MIC の変動は 2 管以内であった。接種菌量 10^5 , 10^6 , 10^7 及び 10^8 CFU/ml における抗菌力を測定した結果、BIPM は、 10^5 CFU/ml から 10^8 CFU/ml にすることにより抗菌力が約 1/4 に低下したが、IPM 及び CAZ よりは菌量の影響を受けにくかった。

4. 殺菌効果

Table 8 に BIPM, IPM 及び CAZ の日本化学療法学会標準菌株 23 株に対する MIC と MBC を示した。供試菌 23 株中 10 株に対する BIPM の MBC 値は MIC 値と同値を示し、残りの 13 株に対しては MBC 値と MIC 値との差はわずかに 1 管以内であり、BIPM は強い殺菌作用を示した。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus FDA209P JC-1, *E. coli* K12 C600 及び *P. aeruginosa* IFO3445 の増殖に及ぼす BIPM の影響を IPM 及び

Table 7. Influence of inoculum size on antibacterial activity

Organism	Inoculum size (CFU/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
		biapenem	imipenem	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	10^5	0.10	0.025	6.25
	10^6	0.10	0.025	6.25
	10^7	0.10	0.025	6.25
	10^8	0.10	0.05	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	10^5	0.013	≤ 0.006	1.56
	10^6	0.013	≤ 0.006	1.56
	10^7	0.025	≤ 0.006	1.56
	10^8	0.025	0.013	3.13
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	10^5	0.025	0.20	0.10
	10^6	0.05	0.20	0.10
	10^7	0.05	0.39	0.10
	10^8	0.10	0.78	0.20
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	10^5	0.20	0.39	0.10
	10^6	0.39	0.78	0.10
	10^7	0.39	1.56	0.10
	10^8	0.78	1.56	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	10^5	0.05	0.10	0.025
	10^6	0.05	0.20	0.025
	10^7	0.10	0.39	0.05
	10^8	0.20	0.78	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	10^5	0.39	0.78	1.56
	10^6	0.78	1.56	1.56
	10^7	0.78	3.13	1.56
	10^8	0.78	3.13	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	10^5	0.78	1.56	3.13
	10^6	1.56	1.56	3.13
	10^7	1.56	3.13	3.13
	10^8	1.56	3.13	6.25

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method.

CAZと比較した。なお、各薬剤のMIC値は液体法で測定した値を用いた。

S. aureus FDA 209P JC-1に対して、BIPMは1/2MIC以上の濃度で4時間まで速やかな殺菌作用を示し、長時間(10時間)にわたり殺菌作用を保っていた。その後菌の再増殖がみられたが、MIC以上の濃度では24時間後でも薬剤添加時の生菌数以下に増殖が抑えられていた。一方IPMにおいては、1/2MIC濃度以上で4時間まで速やかな殺菌作用がみられたが、添加濃度により4~6時間ですでに再増殖が認められた。CAZではMIC以上の濃度で10時間まで殺菌作用がみられたが、その殺菌作用はBIPMと比較すると著しく弱かった(Fig. 2)。*E. coli* K12 C600では、BIPMは、IPMと同様に薬剤濃度依存的に生

菌数の減少が認められた。また、BIPMでは2MIC以上、IPMではMIC以上の濃度において10時間以内に生菌数は検出限界以下になった。CAZにおいてはMIC以上の濃度で4時間まで速やかな殺菌作用がみられたが、6時間以降、MIC濃度では再増殖がみられ、1/2MIC以下の濃度では殺菌作用は認められなかった。4MIC及び8MIC濃度では、24時間後には検出限界以下に減少していた(Fig. 3)。

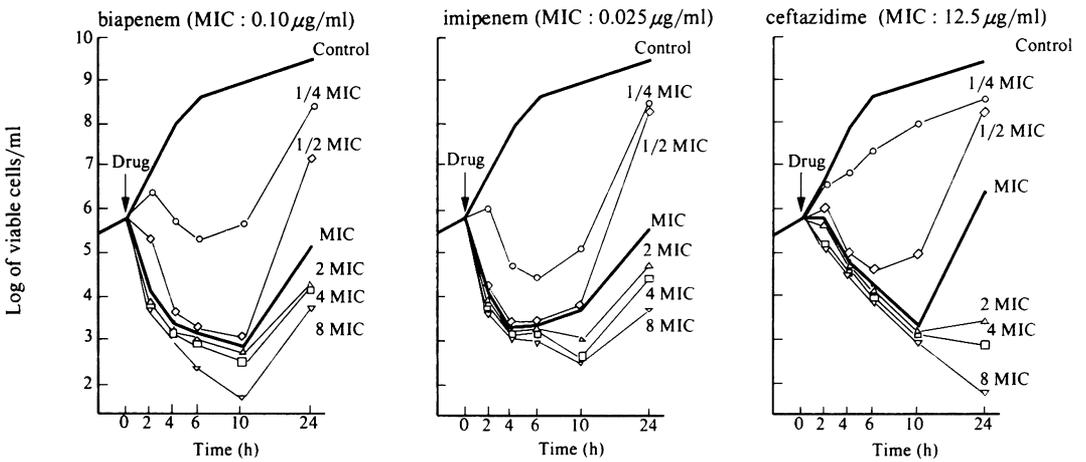
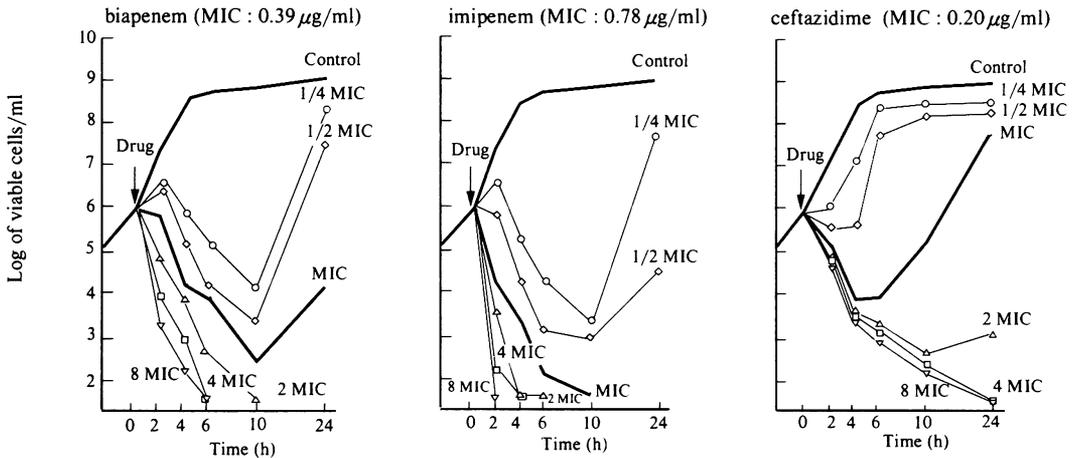
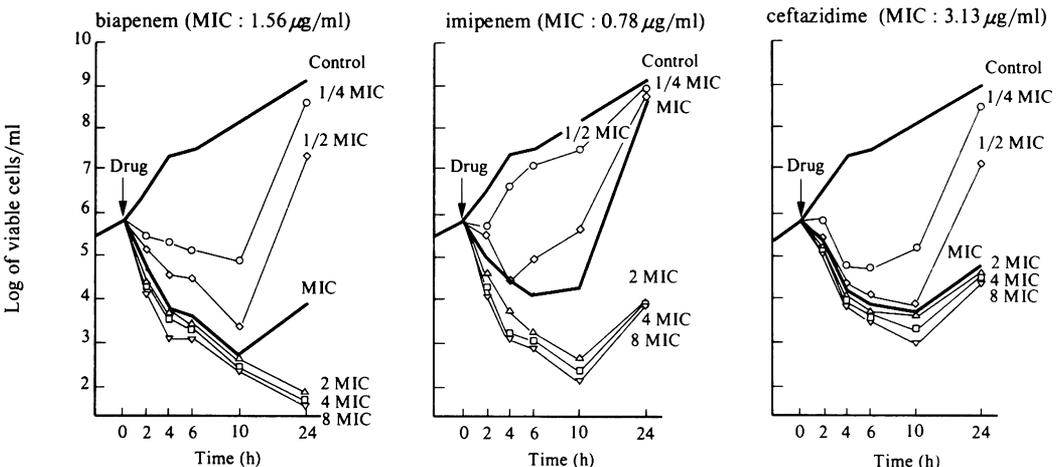
P. aeruginosa IFO3445に対しBIPMは最も強い殺菌作用を示し、生菌数は2MIC以上の濃度で菌の再増殖が認められず、24時間後には検出限界以下となった。IPM及びCAZでは、10時間以降に再増殖が認められた(Fig. 4)。

6. β -Lactamase産生菌に対する抗菌力

Table 8. Bactericidal activity (MBC/MIC)^{a)} of biapenem

Organisms	biapenem	imipenem	ceftazidime
	MBC / MIC	MBC / MIC	MBC / MIC
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	0.10 / 0.10	0.025 / 0.025	12.5 / 12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.05 / 0.05	0.013 / 0.013	12.5 / 12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.05 / 0.05	0.05 / 0.025	6.25 / 6.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.10 / 0.10	0.025 / 0.025	1.56 / 1.56
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.10 / 0.10	0.025 / 0.025	25 / 6.25
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.20 / 0.10	0.20 / 0.20	0.20 / 0.20
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	0.39 / 0.39	0.78 / 0.78	0.20 / 0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.78 / 0.39	0.78 / 0.78	0.39 / 0.39
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	1.56 / 1.56	6.25 / 3.13	0.78 / 0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0.39 / 0.20	0.39 / 0.39	0.10 / 0.10
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.39 / 0.20	0.20 / 0.20	0.78 / 0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	1.56 / 0.78	0.78 / 0.78	0.20 / 0.20
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.78 / 0.39	0.78 / 0.78	0.78 / 0.78
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	0.78 / 0.39	0.78 / 0.78	0.20 / 0.20
<i>Serratia marcescens</i> IAM1184	0.39 / 0.20	0.78 / 0.20	0.05 / 0.05
<i>Morganella morganii</i> IFO3848	0.20 / 0.10	0.78 / 0.39	0.05 / 0.05
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	6.25 / 6.25	6.25 / 6.25	0.10 / 0.10
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	6.25 / 3.13	6.25 / 3.13	0.025 / 0.025
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	6.25 / 3.13	6.25 / 6.25	0.10 / 0.10
<i>Providencia rettgeri</i> IFO3850	0.78 / 0.78	1.56 / 1.56	0.10 / 0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3445	1.56 / 1.56	1.56 / 0.78	3.13 / 3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	0.78 / 0.39	0.78 / 0.39	0.78 / 0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	3.13 / 1.56	6.25 / 6.25	3.13 / 3.13

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with STB, and the MBC was determined by loop transfer method onto drug-free agar plate.

Fig. 2 Bactericidal activity of biapenem against *Staphylococcus aureus* FDA209P JC-1Fig. 3 Bactericidal activity of biapenem against *Escherichia coli* K12 C600Fig. 4 Bactericidal activity of biapenem against *Pseudomonas aeruginosa* IFO3445

BIPMの各種 β -lactamase産生株に対する抗菌力を Table 9に示した。

BIPMは *X. maltophilia*を除く全ての β -lactamase産生株に対して0.013~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で菌株の発育を阻止した。

E. coli ML4901株を宿主とし OXA-1, OXA-2プラスミドを導入した株、及び *S. aureus* MS15009株にプラスミド pI258を導入した株に対して、CAZはそれぞれの親株と比較し著しい抗菌力の低下がみられたが、BIPMでは、ほとんどMIC値の変動はみられなかった。また、CAZが抗菌力を有しない *C. freundii* GN7391に対してもBIPMは強い抗菌力を示した。

7. β -Lactamase 安定性

BIPMの各 β -lactamaseに対する安定性を Table 10に示

した。BIPMは *X. maltophilia*の産生するL-1酵素を除く4種のPCase, 4種のCSase及び4種のCXase計12種類のいずれの β -lactamaseに対しても極めて安定であった。L-1酵素によりBIPM, IPMはともに加水分解を受けたが、BIPMの加水分解速度は、IPMの約1/2であった。

8. β -Lactamase 誘導能

E. cloacae GN5797, *P. vulgaris* GN4413及び *P. aeruginosa* GN918を用いて、BIPM, IPM及びCAZにより誘導的に産生される β -lactamase活性量を Fig. 5から Fig. 7に示した。BIPM及びIPMでは、いずれの菌株においてもMIC以下の薬剤濃度を作用させたときに最も高い β -lactamase誘導能が認められ、それ以上の薬剤を作用させると、 β -lactamase誘導能の低下が認められた。さらに、BIPM

Table 9-1. Antibacterial activity of biapenem against β -lactamase-producing strains

β -Lactamase-producing strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
	biapenem	imipenem	ceftazidime
Penicillinase-producing strains			
<i>Escherichia coli</i> ML4901 ^{b)}	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms212	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms213	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rte16	0.05	0.10	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms149	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/TEM-1	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/TEM-2	0.05	0.10	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/OXA-1	0.05	0.10	1.56
<i>Escherichia coli</i> ML4901/OXA-2	0.05	0.10	1.56
<i>Escherichia coli</i> ML4901/PSE-1	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/PSE-3	0.05	0.10	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4901/SHV-1	0.05	0.10	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009 ^{b)}	0.013	≤ 0.006	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/pI258	0.05	≤ 0.006	6.25
Cephalosporinase-producing strains			
<i>Escherichia coli</i> GN5482	0.05	0.20	0.78
<i>Morganella morganii</i> GN5407	0.39	1.56	0.20
<i>Providencia rettgeri</i> GN4430	0.39	0.39	0.10
<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	0.78	0.78	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	0.10	0.20	3.13
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	1.56	0.78	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	0.78	1.56	0.78

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10^6 CFU/ml suspension of test bacteria.

b) Penicillinase non-producing host strain.

Table 9-2. Antibacterial activity of biapenem against β -lactamase-producing strains

β -lactamase-producing strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
	biapenem	imipenem	ceftazidime
Oxyiminocephalosporinase-producing strains			
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	0.39	0.78	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	0.20	0.20	1.56
<i>Pseudomonas cepacia</i> GN11164	3.13	3.13	0.78
<i>Xanthomonas maltophilia</i> GN12873	>100	>100	50

Table 10. Stability of biapenem against various β -lactamases

β -lactamases type/source of enzyme	Relative rate of hydrolysis ^{a,b)}		
	biapenem	imipenem	ceftazidime
Penicillinase ^{a)}			
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms212 (Type I)	0.02	0.02	0.01
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms213 (Type II)	0.24	0.23	0.04
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms149 (Type IV)	<0.01	0.05	<0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/pI258 (Type V)	0.01	0.01	<0.01
Cephalosporinase ^{b)}			
<i>Escherichia coli</i> GN5482	0.02	0.07	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	0.07	0.05	0.02
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	0.23	0.27	0.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	0.63	0.82	0.01
Oxyiminocephalosporinase ^{b)}			
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	<0.01	0.04	<0.01
<i>Pseudomonas cepacia</i> GN11164	<0.01	0.11	0.02
<i>Xanthomonas maltophilia</i> GN12873 (L-1)	266	641	29.8
<i>Xanthomonas maltophilia</i> GN12873 (L-2)	0.13	0.13	2.04

a) Relative rate of hydrolysis is expressed as the percentage of PCG (100 μM) hydrolysis.

b) Relative rate of hydrolysis is expressed as the percentage of CER (100 μM) hydrolysis.

によって誘導産生される β -lactamase 活性量は、供試した3菌株共に IPM の約 1/2 であった。上記3菌株に対して CAZ の β -lactamase 誘導産生能は低かった。

9. β -lactamase 誘導産生株に対する抗菌力

臨床分離 CAZ 感受性 *E. cloacae* 及び *C. freundii* 各3株を用い、各菌株の 1/2MIC 濃度の IPM で β -lactamase 誘導後の株及び IPM 誘導前の株に対する各薬剤の MIC 値及び各々の β -lactamase 活性を Table 11 に示した。BIPM 及

び IPM において β -lactamase を誘導後の株の MIC 値と誘導前の MIC 値との間に差は認められなかったが、CAZ では誘導後の株に対する抗菌力が 1/2~1/4 に減少していた。

10. *P. aeruginosa* の外膜透過性

Table 12 に、pMS354 を導入した PAO4141 株における各薬剤の濃度 50 μM と 100 μM の時の外膜透過係数 (Pz) を示した。基質濃度 50 μM における BIPM の透過係数は $(2.04 \pm 0.45) \times 10^{-6}$ cm/s、IPM は $(2.19 \pm 0.14) \times 10^{-6}$ cm/s と

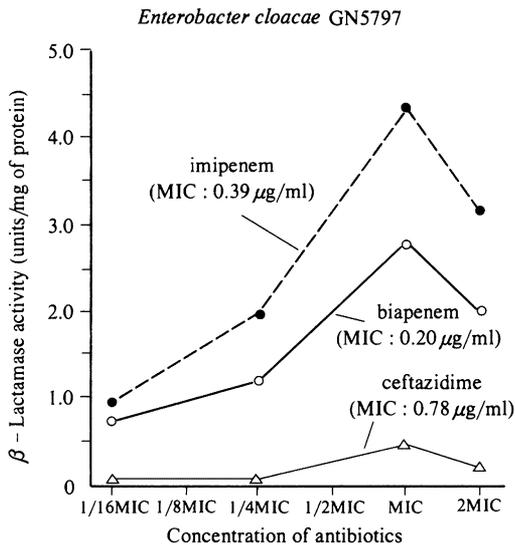


Fig. 5. Induction of β - lactamase production by biapenem in *Enterobacter cloacae* GN5797

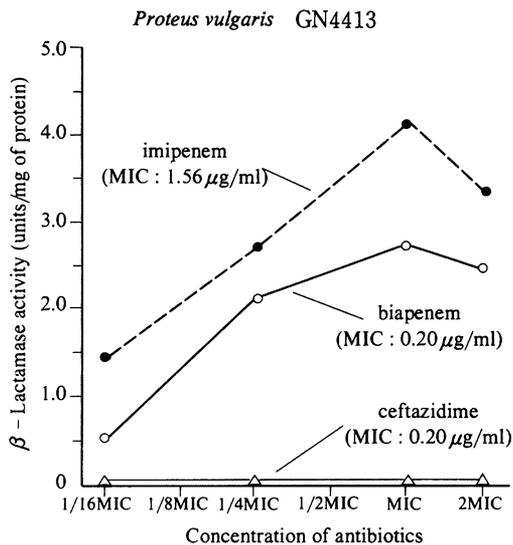


Fig. 6. Induction of β - lactamase production by biapenem in *Proteus vulgaris* GN4413

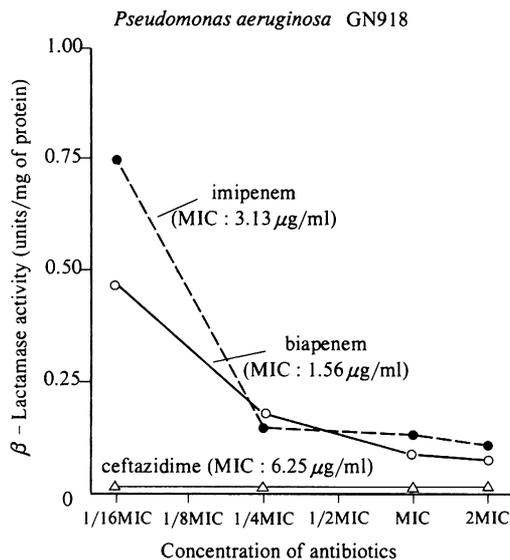


Fig. 7. Induction of β - lactamase production by biapenem in *Pseudomonas aeruginosa* GN918

なった(平均±標準偏差)。また、基質濃度 100 μ M では、BIPM は $(1.32 \pm 0.18) \times 10^{-6}$ cm/s、IPM は $(1.97 \pm 0.57) \times 10^{-6}$ cm/s となり、いずれの測定濃度においても、MEPM 及び PAMP と比較して 2 倍～3 倍高い外膜透過係数を示した。

III. 考 察

BIPM はグラム陽性菌、グラム陰性菌及び嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有していた。この BIPM の抗菌力の強さはメチシリン耐性 staphylococci, *E. faecium*, *S. marcescens* および *X. maltophilia* など一部の菌種を除き、臨床分離株に対する MIC 値が狭い範囲に収束されていることによって示された。BIPM の抗菌力は、*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* 属に対しては IPM と同等ないし 4 倍の優れた抗菌力を有し、グラム陽性菌及び嫌気性菌に対しては 1/2～1/4 の抗菌活性を示した。さらに、CAZ に耐性を示す *C. freundii*, *E. cloacae* 及び *P. aeruginosa* などの臨床分離株に対する BIPM の抗菌力は、CAZ 感受性株に対する抗菌力と同じであった。

BIPM は IPM とともに *P. aeruginosa* に対して強い抗菌力と殺菌力を有していたものの、MIC₉₀ 値は 12.5 μ g/ml となり、Neu らの報告¹⁴⁾ とほぼ一致したが、Catchpole ら¹⁵⁾ の報告と比して低い感受性を示した。この相違は、供試菌 395 株のうち IPM 耐性菌が 67 株、すなわち全体の約 17% を占めていることに起因するものと思われる。

Table 11. Antibacterial activity of biapenem against β -lactamase induced strains

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}						β -Lactamase activity ^{b)}
	biapenem		imipenem		ceftazidime		
	N.I. ^{c)}	I. ^{d)}	N.I. ^{c)}	I. ^{d)}	N.I. ^{c)}	I. ^{d)}	
<i>Enterobacter cloacae</i>							
	107	0.39 / 0.39	0.78 / 0.78	0.39 / 0.78	0.01 / 1.10		
	110	0.10 / 0.10	0.39 / 0.39	0.10 / 0.39	<0.01 / 0.10		
	111	0.10 / 0.10	1.56 / 1.56	0.10 / 0.20	<0.01 / 0.45		
<i>Citrobacter freundii</i>							
	B-2	0.10 / 0.10	0.20 / 0.20	0.20 / 0.39	<0.01 / 0.44		
	B-6	0.10 / 0.10	0.78 / 0.78	0.39 / 0.78	<0.01 / 4.58		
	B-8	0.10 / 0.10	0.20 / 0.20	0.39 / 0.78	<0.01 / 1.88		

a) MIC was determined by two-fold serial agar dilution method with 1 loopful of 10^6 CFU/ml suspension of test bacteria.

b) β -Lactamase activity was determined by the spectrophotometric assay at 30 °C with 100 μM of cephaloridine as the substrate.

c) β -Lactamase not induced strain.

d) β -Lactamase induced strain.

Table 12. Permeation rate of biapenem through outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 4141 harboring pMS 354

Antibiotic	Mol wt ^{a)}	Permeability coefficients P_z ^{b)}	
		($\times 10^{-6}$ cm/s) at	
		50 μM	100 μM
biapenem	350	2.04 \pm 0.45	1.32 \pm 0.18
imipenem	299	2.19 \pm 0.14	1.97 \pm 0.57
meropenem	384	0.67 \pm 0.10	0.62 \pm 0.08
panipenem	339	0.81 \pm 0.20	0.63 \pm 0.17

a) The molecular weight of compounds with free form.

b) Permeability coefficients of antibiotics measured at 50 μM or 100 μM of the substrates were calculated from formula (1) of reference 13, and the mean \pm standard deviations of the coefficients of independent.

そこで、IPM 耐性 *P. aeruginosa* に対する感受性の相関を検討したところ、BIPM に対する感受性分布と IPM に対する感受性分布との間には強い相関が認められた。これは、Catchpole らが推察¹²⁾ しているように、BIPM が IPM と同じ外膜蛋白 (D2 蛋白) を介して菌体に透過しているために、D2 蛋白の欠損した IPM 耐性 *P. aeruginosa* に対し BIPM は IPM と同じ感受性パターンを示すと考えられる。

また、Zimmermann と Rosselet の方法で測定した BIPM の *P. aeruginosa* における外膜透過係数は、IPM と同等の値を示し、PAPM 及び MEPM と比較すると 2 倍～3 倍高い値を示した。この優れた外膜透過性と、染色体性 β -lactamase に対する高い安定性により、 β -lactamase 産生の *P. aeruginosa* に対しても BIPM は強い抗菌活性を示す

と考えられる。*S. aureus* FDA 209P JC-1 を用いた殺菌曲線の結果で、BIPM は薬剤を添加してから菌の再増殖が起こるまでの時間が IPM の場合よりも 1～2 時間長く、1/2MIC 以上の濃度で最も菌数が減少した時点では、IPM を作用した場合の生菌数の約 2/3 以下であったこと、*P. aeruginosa* IFO3445 を用いた殺菌曲線の結果で、菌の再増殖が認められなかったこと、さらに、MIC/MBC の結果から、BIPM は強い殺菌作用を有していることが判明した。

BIPM は *X. maltophilia* GN12873 の産生する L-1 酵素に加水分解された以外は今回供試した 11 種類の β -lactamase に対して極めて安定であった。

BIPM は IPM と同様に β -lactamase 誘導産生能が CAZ と比較して高かったが、調べた 3 株では、 β -lactamase

を最大に誘導する薬剤濃度は BIPM, IPM とともに MIC 以下の濃度であった。また、その時の BIPM によって誘導された β -lactamase 活性量は IPM で誘導したときの β -lactamase 活性量の約 1/2 と低かった。

臨床分離 *E. cloacae* 及び *C. freundii* を用い、IPM による β -lactamase 誘導時と非誘導時とで薬剤の MIC 値に変動がみられるか否かを検討したところ、CAZ ではその抗菌力が約 1/2 に低下したが、BIPM においては MIC 値の変動が認められなかった。CAZ の抗菌力の低下は、IPM により誘導産生された多量の β -lactamase により CAZ が加水分解等の影響をうけたものと考えられる。しかし、BIPM では、多量の β -lactamase 存在下でも極めて安定であり、また、 β -lactamase 阻害活性が高いことからその抗菌力には影響がなかったと考えられる。さらに、BIPM では IPM よりも β -lactamase 誘導能が約 1/2 と低いことから、CAZ などの他の薬剤の抗菌力に与える影響も IPM の場合よりも少ないと考えられる。

このように、BIPM に *in vitro* での優れた抗菌力と強い殺菌力、それに加えヒト由来の dehydropeptidase-I に極めて安定であるという特徴から、臨床において、BIPM は IPM のような cilastatin sodium 等の dehydropeptidase-I 阻害剤との配合剤としてではなく単剤で臨床効果が十分期待できる薬剤であると考えられる。

文 献

- 1) Ubukata K, Hikida M, Yoshida M, Nishiki K, Furukawa Y, Tashiro K, Konno M and Mitsuhashi S: *In vitro* activity of LJC 10,627, a new carbapenem antibiotic with high stability to dehydropeptidase - I. *Antimicrob Agents Chemther* 34: 994~1000, 1990
- 2) Yoshida M and Mitsuhashi S: *In vitro* antibacterial activity and beta-lactamase stability of new carbapenem LJC 10,627. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 625 ~ 629, 1990
- 3) Petersen P J, Jacobus N V, Weiss W J and Testa R T: *In vitro* and *in vivo* activities of LJC 10,627, a new carbapenem with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 203~207, 1991
- 4) Hikida M, Kawashima K, Yoshida M and Mitsuhashi S: Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase I from porcine and human renal cortex. *J Antimicrob Chemther* 30: 129~134, 1992
- 5) 三橋 進, 井上松久: MIC 測定用標準菌株。Chemo-therapy 27: 561, 1979
- 6) 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。Chemo-therapy 29: 76~79, 1981
- 7) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemo-therapy 27: 559~560, 1979
- 8) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139: 780~789, 1974
- 9) Mimami S, Yotsuji A, Inoue M and Mitsuhashi S: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 382~385, 1980
- 10) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 11) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 147~151, 1991
- 12) Zimmermann W and Rosselet A: Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 12: 368~372, 1977
- 13) Liu W and Nikaido H: Contribution of the cell-surface-associated enzyme in the Zimmermann-Rosselet assay of outer membrane permeability to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 177~179, 1991
- 14) Neu H C, Gu J W, Fang W and Chin N X: *In vitro* activity and β -lactamase stability of LJC 10,627. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1418~1423, 1992
- 15) Catchpole C R, Wise R, Thornber D and Andrews J M: *In vitro* activity of L-627, a new carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1928~1934, 1992

In vitro antibacterial activity of biapenem, a new carbapenem antibiotic

Masuhito Yoshida, Masato Watanabe and Susumu Mitsuhashi
Episome Institute

2220 Kogure, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan

The *in vitro* activity of new carbapenem, biapenem(BIPM) was studied in comparison with imipenem (IPM) and ceftazidime (CAZ). BIPM showed good activity against a broad antibacterial spectrum of gram-positive, gram-negative clinical isolates including *Pseudomonas aeruginosa*, and anaerobes.

BIPM was two- to fourfold less active than IPM against gram-positive cocci. BIPM was more active than IPM against gram-negative bacteria, inhibiting all *Enterobacteriaceae*, except for 12% of *Proteus mirabilis*, 7% of *Proteus vulgaris*, 8% of *Morganella morganii*, and 50% of *Serratia marcescens* isolates, at a concentration of $\leq 1.56 \mu\text{g/ml}$. BIPM inhibited CAZ-resistant the genera *Citrobacter* and *Enterobacter* at $\leq 0.39 \mu\text{g/ml}$. BIPM also showed a high activity against *Pseudomonas aeruginosa*, its activity was two-fold higher than that of IPM. BIPM did not inhibit most methicillin-resistant staphylococci, *Enterococcus faecium*, and *Xanthomonas maltophilia* strains, as did not IPM and CAZ. Bactericidal activity of BIPM against gram-positive and gram-negative bacteria was confirmed though counting viable cells and determining the minimum bactericidal concentrations.

BIPM was not hydrolyzed by various types of β -lactamase. *Xanthomonas maltophilia* L-1 type β -lactamase hydrolyzed BIPM, albeit at approximately one half the rate than IPM was hydrolyzed.

Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* to BIPM was determined by Zimmermann and Rosselet method. The permeability coefficients of BIPM at $50 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$, were 2.04×10^{-6} and 1.32×10^{-6} cm/s, respectively.