

カルバペネム系抗生剤 biapenem の *in vitro* における postantibiotic effect の検討

佐々木一尋・新井俊彦
明治薬科大学微生物学教室*

新規カルバペネム系抗生剤 biapenem(BIPM)の *in vitro* における postantibiotic effect (PAE) を 4MIC の薬剤濃度にて 90 分間培養することにより検討した。

Staphylococcus aureus に対して BIPM, imipenem (IPM), ofloxacin (OFLX) および ceftazidime (CAZ) とともに 2~5 時間程度の PAE を示した。methicillin resistant *S. aureus* に対して BIPM, IPM はそれぞれ 6.2 時間, 7.0 時間と長い PAE を示したが, OFLX は 1.8 時間の短いものであった。

Escherichia coli, *Citrobacter freundii* に対して BIPM, IPM はそれぞれ 0~1.0 時間, 0.5~1.3 時間とほとんど PAE を示さないか短時間であり, CAZ は -0.7~0 時間と全く PAE を示さなかったが, OFLX は 2.3~3.7 時間の PAE を示した。

Pseudomonas aeruginosa に対して BIPM, IPM とともに 0.5~3.0 時間の PAE を示し, OFLX は 1.0~2.3 時間の PAE を示した。

PAE における *E. coli* の形態変化を位相差顕微鏡下で観察した。BIPM, IPM とともに桿菌を球形化し, 薬剤除去後も 2~3 時間持続し, 増殖が遅延するのに対して, CAZ ではフィラメント化した菌体は薬剤除去後, 早期に桿菌へ復帰し, 顕著な増殖を認めた。

Key words: Biapenem, PAE, 形態変化

Biapenem(BIPM)はカルバペネム母核の 4 α 位にメチル基を導入することにより, カルバペネム系抗生剤の弱点である dehydropeptidase-I による分解に対して, 極めて安定となるとともに *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対する抗菌力を増強した新規カルバペネム系抗生剤である¹⁾。

臨床にて汎用される β -ラクタム剤は一般にグラム陽性菌に対しては postantibiotic effect (PAE) を示すが, グラム陰性菌に対しては示さない²⁾。このことはグラム陰性菌感染症に対して, β -ラクタム剤は起炎菌の MIC 以上の濃度を維持する時間が治療効果と相関する一因となっている。 β -ラクタム剤の中でもカルバペネム系抗生剤ではグラム陰性菌に対しても PAE を示すことが報告されている³⁻⁵⁾。

今回, 新規カルバペネム系抗生剤 BIPM について *in vitro* における PAE を検討したので報告する。

I. 方 法

1. 使用菌株

標準株として *Staphylococcus aureus* 6538P, *S. aureus* Smith, *Enterococcus faecalis* JCM 5803, *Escherichia coli* K12, *E. coli* NIHJ, *Citrobacter freundii* JCM1657, *Serratia marcescens* JCM1239, *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962 を

使用した。

また, 臨床分離株として教室保存の methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) 7 および *P. aeruginosa* J8, J14, J39, T22 を使用した。

2. 使用薬剤

BIPM (日本レダリー), imipenem (IPM, 萬有製薬), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), ofloxacin (OFLX, 第一製薬) のいずれも力価の明らかなものを使用した。

3. MIC の測定

MIC は化学療法学会標準法⁶⁾ に準じ, 試験培地として薬剤感受性測定用ブイヨン (STB, ニッスイ) を用いて, 液体希釈法による MIC を薬剤濃度 0.016~512 $\mu\text{g/ml}$ にて測定した。接種菌量は 10^5 cfu/ml とした。

4. *In vitro* PAE の測定

STB を用いて一夜培養した菌液を新鮮な STB で適宜希釈し, 対数増殖期まで培養したものを試験菌液とした。これに各薬剤を 4MIC となるように加えて培養した。コントロールおよび薬剤を添加した菌液を 1.5 時間後に新鮮な STB を用いて 1,000 倍に希釈し, 培養を継続した。経時的に菌液を採取し生菌数測定を行った。

PAE は希釈後の生菌数が 10 倍に増殖するのに要した時間より, 薬剤無添加培地中の生菌数が 10 倍に増殖す

* 〒154 東京都世田谷区野沢 1-35-23

Table 1. MICs of biapenem, imipenem, ofloxacin and ceftazidime against test organisms

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	biapenem	imipenem	ofloxacin	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P	0.031	≤ 0.016	0.25	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.125	0.031	0.5	16
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> 7	32	32	16	256
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	4.0	1.0	2.0	>512
<i>Escherichia coli</i> K12	1.0	2.0	0.063	1.0
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.5	0.5	0.125	4.0
<i>Citrobacter freundii</i> JCM1657	1.0	1.0	0.25	2.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM5962	1.0	1.0	2.0	2.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J8	4.0	4.0	1.0	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J14	2.0	4.0	1.0	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J39	2.0	4.0	2.0	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T22	4.0	4.0	1.0	32
<i>Serratia marcescens</i> JCM1239	8.0	8.0	4.0	>512

Table 2. *In vitro* postantibiotic effects of biapenem, imipenem, ofloxacin and ceftazidime against test organisms

Organism	PAE (hour)			
	biapenem	imipenem	ofloxacin	ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P	4.8	5.6	5.2	3.4
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	2.2	2.0	1.8	N. T.
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> 7	6.2	7.0	1.8	N. T.
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	1.4	1.6	0.8	N. T.
<i>Escherichia coli</i> K12	1.0	0.8	2.3	-0.2
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.0	0.5	2.5	0.0
<i>Citrobacter freundii</i> JCM1657	0.7	1.3	3.7	-0.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM5962	3.0	3.0	1.0	-0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J8	1.0	1.2	2.1	N. T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J14	0.5	0.5	1.3	N. T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J39	1.5	1.6	2.3	N. T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T22	1.2	1.0	1.7	N. T.
<i>Serratia marcescens</i> JCM1239	-0.4	-0.4	3.8	N. T.

N. T. : not tested

るのに要した時間を差し引いた値で示した。

5. 形態変化

E. coli K12をSTBを用いて一夜培養した菌液を新鮮なSTBで適宜希釈し、対数増殖期初期まで培養した。この菌液にBIPM, IPMまたはCAZを4MICとなるように加えて1.5時間培養した。薬剤を除去するために3,000rpm, 5分間で遠心集菌し、新鮮なSTBを用いて2回洗浄した後、同容量の新鮮なSTBを加えて培養を継続した。コントロールの菌液も同様に洗浄した。薬剤添加後、45分, 90分目および薬剤除去後1, 2, 3時間目に菌液をスライドガラス上にフィルム状に作成した

薬剤感受性測定用寒天培地(ニッスイ)に接種し、位相差顕微鏡(オリンパス, BH-2)にて形態の変化を観察すると共に、同一サンプリング時の生菌数測定を行った。

II. 結 果

1. MICの測定

試験菌株に対するBIPM, IPM, CAZおよびOFLXの液体希釈法によるMICをTable 1に示した。グラム陽性菌に対するBIPMのMICはIPMに比し1管程度高く、グラム陰性菌ではBIPMのMICはIPMに比し1管程度低い成績であった。BIPM, IPMともに臨床分離のMRSA 7を除く全ての株が感受性を示した。OFLXもMRSA 7を除き

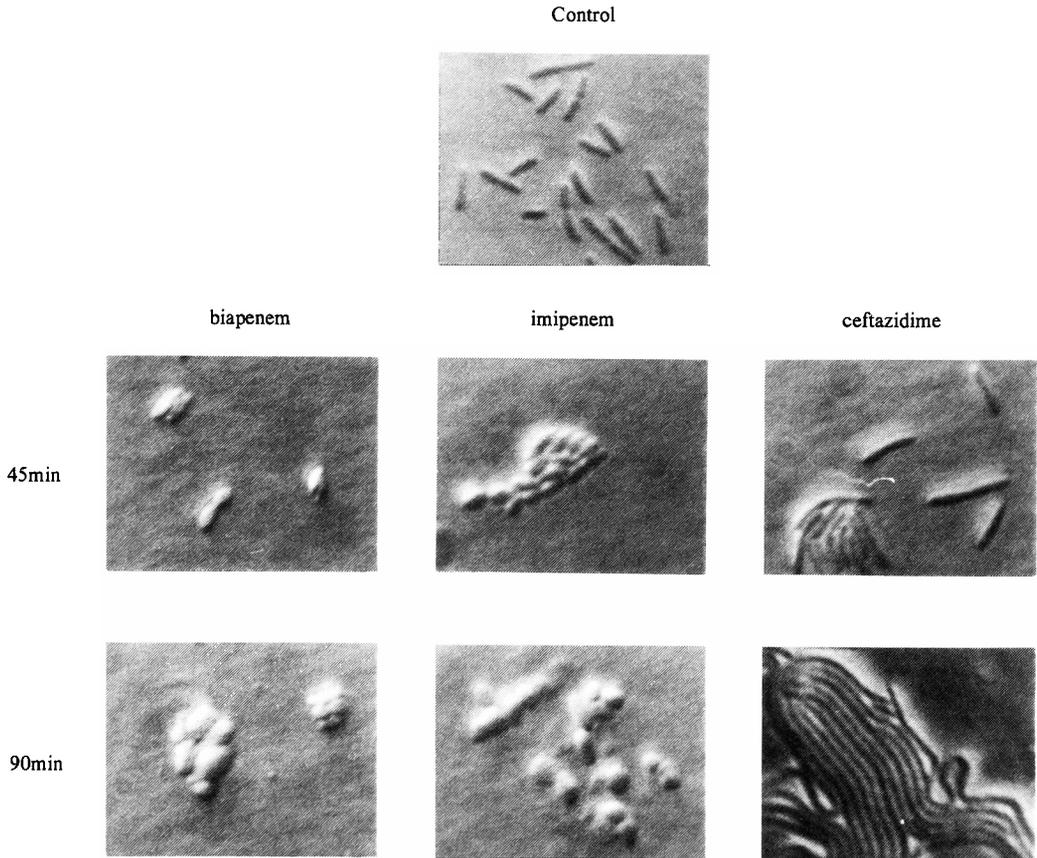


Fig. 1. Phase contrast micrographs of *Escherichia coli* K12 expose to 4-fold MIC of biapenem, imipenem and ceftazidime.

試験菌株に対する MIC が $4.0 \mu\text{g/ml}$ 以下であったが、CAZ に対して感受性を示したのは標準株の *S. aureus* 6538P, *E. coli* NIHJ, *C. freundii* JCM1657, *P. aeruginosa* JCM5962 の 4 株のみであった。

2. *In vitro* PAE の測定

試験菌株に対する BIPM, IPM, CAZ および OFLX の PAE を Table 2 に示した。CAZ の PAE の測定は感受性株のみで実施した。

S. aureus 6538P に対する PAE は BIPM, IPM, CAZ およ

び OFLX とも 3 時間以上を示したが、*S. aureus* Smith では 2 時間程度であった。MRSA 7 に対して、BIPM, IPM ともに薬剤希釈後も菌数減少を認め、増殖再開までに 3~4 時間要したため、6 時間以上の PAE を示したが、OFLX では増殖開始が早く、PAE は 1.8 時間であった。*E. faecalis* JCM5803 に対しては BIPM, IPM および OFLX とも 1 時間程度であった。

E. coli 2 株に対する PAE は BIPM で 0~1 時間、IPM で 0.5~0.8 時間、OFLX で 2.3~2.5 時間、CAZ で -0.2~0 時

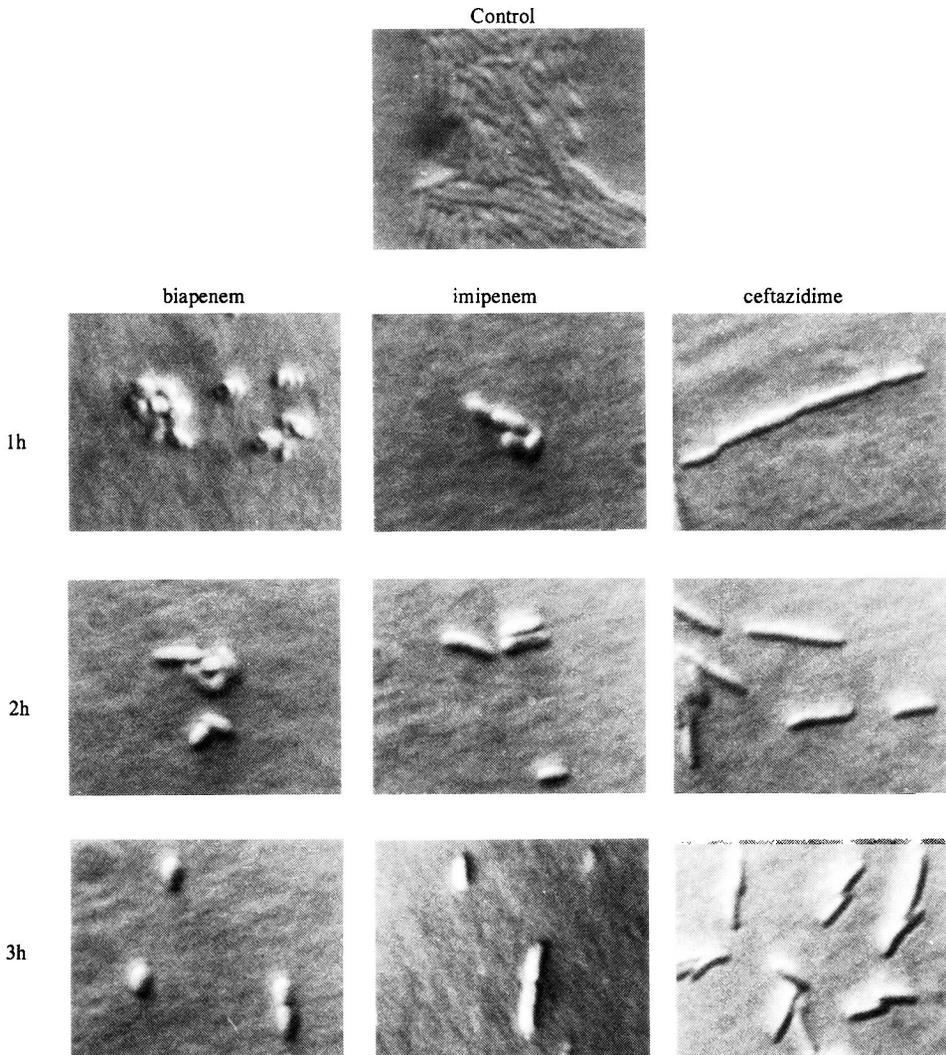


Fig. 2. Phase contrast micrographs of *Escherichia coli* K12 after exposure to 4-fold MIC of biapenem, imipenem and ceftazidime for 1.5 hours.

間であった。*C. freundii*は*E. coli*と同程度であった。

P. aeruginosa JCM5962に対するPAEはBIPMで3.0時間、IPMで3.0時間、OFLXで1.0時間、CAZで-0.2時間であった。また、臨床分離の*P. aeruginosa* 4株に対するPAEはBIPMで0.5~1.5時間、IPMで0.5~1.6時間、OFLXで1.3~2.3時間であった。

S. marcescens JCM1239に対してOFLXは3.8時間のPAEを示したが、BIPM、IPMともPAEを示さなかった。

3. 形態変化

各薬剤添加後45分、90分目における*E. coli*の形態変化をFig.1に示した。45分目にはBIPMおよびIPMでは卵形化した菌体を認め、CAZでは桿菌の長軸方向へ伸長した菌体を認めた。90分目にはBIPM、IPMともに球形化した菌体を、CAZではフィラメント化した菌体を認めた。

薬剤除去後1、2、3時間目における*E. coli*形態変化をFig.2に示した。1時間目にはBIPMおよびIPMでは球形化した菌体のままであるものおよび卵形の菌体を認めたが、CAZではフィラメントの短縮およびフィラメントから桿状の菌体の分裂を認めた。2時間目にはBIPM、IPMでは卵形および球形の菌体を認めたが、CAZではフィラメントは認めず、正常な桿菌の約2倍長の菌体が多数増殖しているのを認めた。また、3時間目には

BIPM、IPMでは卵形および球形の菌体の増殖を認めたが、CAZでは桿状の菌体の増殖を認めた。

同一サンプリング時における生菌数の変化をFig.3に示した。

III. 考 察

抗生剤の投与設計において抗生剤のPAEを考慮して、計画することが薦められている。 β -ラクタム系抗生剤はグラム陽性菌にはPAEを示すが、グラム陰性菌にはPAEを示さない。したがって、compromised hostなど生体の免疫系による殺菌を十分に期待できない症例のグラム陰性菌感染症に対して、 β -ラクタム系抗生剤を投与する場合は細菌の再増殖を抑制するために、投与間隔を短く設定する必要が生じる。

カルバペネム系抗生剤は幅広い抗菌スペクトル並びに強力な殺菌力を有しており、一部のグラム陰性菌に対してもPAEを示すことが報告されている³⁻⁵⁾。今回、*in vitro*の検討のみであったが、新しいカルバペネム系抗生剤のBIPMにおいてもグラム陽性菌のみならず一部のグラム陰性菌に対してもPAEを示した。

BIPM並びにIPMともに一部のグラム陰性菌に対してPAEを示したが、グラム陽性菌に比しPAEは短時間であり、菌株によってPAEを示すものと示さないものがあった。ニューキノロン剤のOFLXはグラム陽性菌、

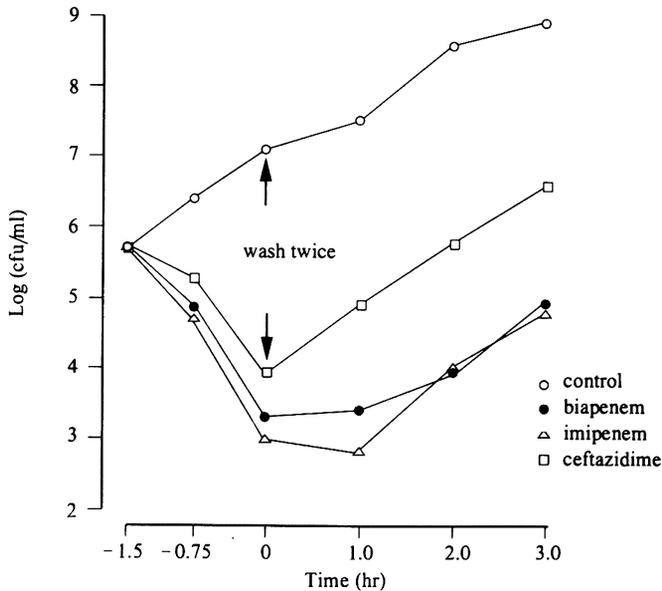


Fig. 3. Growth curves for *Escherichia coli* K12 following 1.5 hours exposures at 4-fold MIC of biapenem, imipenem and ceftazidime.

陰性菌を問わず PAE を示したが、カルバペネム系抗生剤に比しグラム陽性菌には短く、グラム陰性菌には長い PAE を示した。CAZ は感受性株のみの検討であったが、*S. aureus* 6538P のみに PAE を示し、グラム陰性菌には示さなかった。

E. coli の形態変化は既に報告した電子顕微鏡像⁷⁾と同様、抗生剤と接触後 90 分目には BIPM 並びに IPM では球形化した菌体を認めた。また、CAZ では長大なフィラメント化を認めた。抗生剤除去後、PAE を示さない CAZ は早期にフィラメントから桿菌への復帰並びに顕著な増殖を認めたのに対して、カルバペネム 2 剤は抗生剤除去後 3 時間目まで卵形および球形化した菌体を認め、増殖も CAZ に比し緩徐であった。

培養液より薬剤を除去した後も抗生剤が菌体内に残存してその増殖を抑制することより、グラム陰性桿菌の penicillin binding protein (PBP) に対してカルバペネム剤の結合親和性が強いことが示唆される。また、このことが一部のグラム陰性菌に対しても PAE を示す原因の一つであろうと推察される。

In vivo での検討は行っていないが、グラム陽性菌および陰性菌に対して PAE を示す BIPM は臨床における有効性が期待される薬剤である。

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 Chemother 34: 994~1000, 1990
- 2) Bodey G P and Pan T: Effect of cephalothin on growth patterns of microorganisms. J Antibiotics 29: 1092 ~ 1095, 1976
 - 3) Bustamante C I, Drusano G L, Tatem B A and Standiford H C: Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 26: 678~682, 1984
 - 4) Nadler H I, Pitkin D H and Sheikh W: The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. J Antimicrob Chemother 24: 225~231, 1989
 - 5) 戸塚恭一、菊地 賢、柴田雄介、長谷川裕美、片平潤一、清水喜八郎: カルバペネム系薬 panipenem/betamipron の postantibiotic effect についての検討 Chemotherapy 39(S-3): 78~82, 1991
 - 6) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 7) Sasaki K, Obana Y, Otsuki M, Kesado T and Nishino T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of L-627 with high stability to dehydropeptidase - I. Abstract of ICAAC 31st (Chicago), 1989

In vitro postantibiotic effect of biapenem, a new carbapenem antibiotic

Kazuhiro Sasaki and Toshihiko Arai

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy

1-35-23, Nozawa, Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan

In vitro postantibiotic effect (PAE) of biapenem (BIPM), a new carbapenem antibiotic, was investigated.

The test organisms were exposed to 4-fold MIC of BIPM, imipenem (IPM), ofloxacin (OFLX) or ceftazidime (CAZ) for 1.5 hours.

All the test antibiotics showed PAEs of 2 to 5 hours against *Staphylococcus aureus*. BIPM and IPM showed long PAEs of 6.2 hours and 7.0 hours respectively, however, OFLX showed short PAE of 1.8 hours against methicillin resistant *S. aureus*.

Against *Escherichia coli* or *Citrobacter freundii*, BIPM and IPM showed short PAEs of 0 to 1.0 hour and 0.5 to 1.3 hours respectively, and CAZ showed negative PAEs of -0.7 to 0 hour, however, OFLX showed PAEs of 2.3 to 3.7 hours.

BIPM as well as IPM showed PAEs of 0.5 to 3.0 hours, and OFLX showed PAEs of 1.0 to 2.3 hours against *Pseudomonas aeruginosa*.

Morphological changes of *E. coli* in the duration of PAE were investigated. Exposure to BIPM or IPM at 4-fold MIC for 1.5 hours induced round cell formation, whereas exposure to CAZ induced filamentous cell formation. After antibiotics removal, round cell formation of *E. coli* by BIPM or IPM was sustained for 2 to 3 hours and slight growth of cell was observed. On the other hand, after CAZ removal, filamentous cell of *E. coli* returned to rod cell and significant growth of cell was observed.