

カルバペネム系抗菌薬, biapenem の *in vitro* 抗菌力について

生方公子・杉浦 睦・紺野昌俊
帝京大学医学部臨床病理*

新規カルバペネム系抗菌薬である biapenem(BIPM)の *in vitro* 抗菌活性を imipenem (IPM) および ceftazidime (CAZ)のそれと比較した。BIPMの抗菌力は, methicillin感性の *Staphylococcus aureus* に対しては 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の MIC₉₀ で IPM よりも 2~4 倍劣っていた。methicillin 耐性の *S. aureus* に対しては抗菌力は弱かった。一方, 腸内細菌科の *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* に対する本薬の MIC₉₀ は 0.1~3.13 $\mu\text{g/ml}$ で, IPM とほぼ同等であった。*Pseudomonas aeruginosa* に対する MIC₉₀ は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ で, IPM のそれよりも 2 倍ほど優れていた。

位相差顕微鏡下における観察では *E. coli* と *P. aeruginosa* では, ビーンズ状の形態変化から溶菌していく像が観察された。BIPM の *E. coli* と *P. aeruginosa* に対する殺菌作用では, それぞれの MIC 以上の濃度の 0.05 と 0.39 $\mu\text{g/ml}$ で殺菌作用を示した。*E. coli* と *P. aeruginosa* のペニシリン結合蛋白では PBP-2, -4, および IBs に, *S. aureus* は PBP-1 と PBP-4 へそれぞれ高い親和性を示した。

Key words: 抗菌力, 殺菌作用, PBP's 結合親和性, 形態変化

Biapenem(BIPM)は日本レダリー株式会社研究所において合成された新しいカルバペネム系抗生物質で, 4位に methyl 基, 3位の側鎖に triazol 基が導入された化学構造を有している。本薬の特徴は, dehydropeptidase-I (DHP-I) に対して既存のカルバペネム系薬よりも安定である点にある¹⁾。

この論文においては, BIPM の各種細菌に対する抗菌力, 殺菌力, およびペニシリン結合蛋白に対する親和性, 薬剤作用後の経時的な形態変化について, imipenem (IPM) および ceftazidime(CAZ)のそれと比較した成績について述べる。

1. 材料と方法

使用抗菌薬

被験薬である BIPM は, 日本レダリー研究所から分与をうけた。IPM と CAZ は, 萬有製薬株式会社および日本グラクソ株式会社よりそれぞれ分与をうけた。BIPM と CAZ は, 1/15M phosphate buffer (pH7.2), IPM は 1/10 M 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, monohydrate (pH7.2) にてそれぞれ溶解して使用した。

被験菌株

実験には, 1988年から1989年の間に, 帝京大学医学部付属病院・中央検査部細菌検査室で扱った種々の臨床検査材料から分離された菌株を用いた。

薬剤感受性の測定

薬剤感受性の測定には mueller hinton (MH) agar (Difco) を用いて, 寒天平板希釈法²⁾により測定した。菌接種後の平板は 35°C で 18 時間培養した。Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は 32°C, 48 時間培養後に判定した。また, 感受性測定時には, *Escherichia coli* の NIHJ JC 1 株, *S. aureus* の FDA 209P 株, および *Pseudomonas aeruginosa* の NCTC 10490 株を標準株として加えた。

経時的殺菌作用

BIPM, IPM および CAZ の経時的な殺菌効果は, 臨床分離株の *S. aureus* TK477 株, *E. coli* TK2241 株, および *P. aeruginosa* TK2306 株を用いて比較した。なお, 測定開始時の菌数は, 10⁶/ml のオーダーになるように調整した。生菌数の測定は, 薬剤を添加してから 1, 2, 4, 6 時間

後にそれぞれ検体を採取し, MH broth で希釈した後, MH agar に塗布した。翌日, 発育してきたコロニーを測定した。

形態変化の観察

形態変化の観察には, 一夜培養した 1ml の菌液を 9ml の MH broth へ植え継ぎ, 37°C で 2 時間振盪培養した後, broth で 10 倍に希釈して, その 5 μl を種々の濃度の BIPM, IPM, あるいは CAZ を含有する薄層寒天平板上へ接種した。この培地は, 溶解した MH agar に各薬剤を加えた後, ガラススライド上へ 200 μl ずつ滴下して固化させた。菌

接種後のガラススライドは、乾燥を防ぐためにカバーガラスで覆った後、37℃に保温して経時的に菌の形態変化を観察した。

ペニシリン結合蛋白 (PBPs) に対する親和性

BIPM, IPM および CAZ の *S. aureus* 209P 株, *E. coli* JE1011 株, および *P. aeruginosa* NCTC 10490 株の各 PBPs に対する親和性は、先に述べられた方法³⁾に従った。*S. aureus* の膜画分は、10mM の potassium phosphate buffer (pH7.0) に浮遊させた細胞をあらかじめ 10 µg/ml の lysostaphin で 32℃, 30min 処理した後、sonicate して採取した。

PBPs に対する親和性を検討するための各抗生物質は、前述した buffer で段階的に希釈し、それぞれの 5 µl を 50

µl の膜画分 (10mg protein/ml) 中へ加え、30℃で 10 分間保温した。次いで、1mM の [¹⁴C]-benzylpenicillin を 5 µl 加え、さらに 10 分間保温した。Benzylpenicillin (120mg/ml) と 20% sarkosyl を各々 2.5 µl ずつ加えて反応を停止させた後、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および fluorography を行った。そして、各 PBPs への [¹⁴C]-benzylpenicillin の結合が 50% 阻止される抗生物質濃度 (ID₅₀) を算出した。

2. 結果

薬剤感受性

BIPM と IPM および CAZ の抗菌力の比較は Table 1 に示す。BIPM は全体的に優れた MIC₉₀ を示した。Methicillin (DMPPC) 感性の *S. aureus* に対する本薬の MIC₉₀ は

Table 1. Comparative *in vitro* activities of biapenem and other antimicrobial agents

Organism (No. of strains)	Antimicrobial agents	MIC (µg/ml)	
		Range	50%
<i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin susceptible (44)	Biapenem	0.02 ~ 0.78	0.05
	Imipenem	0.01 ~ 0.1	0.01
	Ceftazidime	6.25 ~ 50	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin resistant (71)	Biapenem	1.56 ~ 100	25
	Imipenem	0.1 ~ 100	12.5
	Ceftazidime	100 ~ >100	>100
<i>Escherichia coli</i> (110)	Biapenem	0.02 ~ 0.1	0.05
	Imipenem	0.1 ~ 0.2	0.2
	Ceftazidime	0.02 ~ 0.78	0.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (92)	Biapenem	0.05 ~ 0.78	0.2
	Imipenem	0.1 ~ 1.56	0.2
	Ceftazidime	0.02 ~ 0.78	0.2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (28)	Biapenem	0.05 ~ 0.78	0.2
	Imipenem	0.2 ~ 0.78	0.39
	Ceftazidime	0.02 ~ 0.78	0.1
<i>Proteus mirabilis</i> (32)	Biapenem	0.1 ~ 6.25	0.78
	Imipenem	0.39 ~ 12.5	1.56
	Ceftazidime	0.01 ~ 3.13	0.05
<i>Proteus vulgaris</i> (6)	Biapenem	0.2 ~ 3.13	1.56
	Imipenem	0.2 ~ 3.13	1.56
	Ceftazidime	0.05 ~ 1.56	0.1
<i>Morganella morganii</i> (27)	Biapenem	0.39 ~ 3.13	1.56
	Imipenem	0.78 ~ 6.25	3.13
	Ceftazidime	0.1 ~ 25	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (116)	Biapenem	0.2 ~ 25	0.78
	Imipenem	0.39 ~ 50	1.56
	Ceftazidime	0.1 ~ >100	3.13

0.1 $\mu\text{g/ml}$ で、IPM の 0.02 $\mu\text{g/ml}$ の値に比べると 4 倍程劣るものの、CAZ のそれよりも 128 倍以上優れていた。しかしながら、MRSA に対する抗菌力は IPM と同じように劣り、それらの MIC₉₀ はそれぞれ 50 $\mu\text{g/ml}$ であった。CAZ のそれはさらに劣り、すべての株の MIC が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

E. coli, *Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella oxytoca* に対する BIPM の MIC₉₀ は、いずれも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、IPM や CAZ とほぼ同等であった。*Proteus mirabilis* と *Proteus vulgaris* に対する BIPM の MIC₉₀ はそれぞれ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であって、IPM のそれよりもそれぞれ 2 倍程優れていた。しかしながら、この 2 菌種に対しては、CAZ の MIC₉₀ がそれぞれ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と 0.2 $\mu\text{g/ml}$ と優れていた。*Morganella morganii* に対する MIC₉₀ の比較では、BIPM のそれが最も優れ、IPM よりも 4 倍、CAZ よりも 8 倍優れた 1.56 $\mu\text{g/ml}$ という成績であった。

P. aeruginosa に対する BIPM の MIC₉₀ は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 、

IPM のそれよりも 2 倍、CAZ のそれよりも 4 倍優れていた。特に、CAZ に耐性の *P. aeruginosa* に対しても優れた抗菌力を有していた。

経時的殺菌作用

Fig. 1 には臨床分離株の *E. coli* TK2241 株、Fig. 2 には *P. aeruginosa* TK2306 株に対する BIPM の経時的殺菌効果を IPM および CAZ のそれと比較した成績を示す。これらの 3 薬剤は *E. coli* に対して MIC 以上の濃度で短時間のうちに殺菌的に作用した。BIPM では作用後 1 時間程は静菌的であったが、その後急速に殺菌効果を発揮し、6 時間後には検討したいずれの濃度においても IPM よりも優れた生菌数の減少を認めた。

P. aeruginosa に対しては、BIPM と IPM は CAZ に比べて明らかな殺菌作用を示し、MIC 以上の濃度で短時間のうちに生菌数を減少させた。しかしながら、BIPM と IPM とを比べると、薬剤作用 6 時間後では差はなかったが、1~2 時間では IPM での生菌数の減少がやや優れて

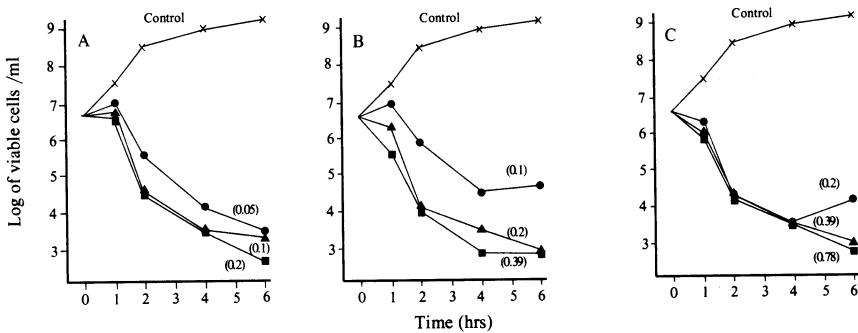


Fig. 1. Bacterial killing kinetics curves of biapenem(A), imipenem(B) and ceftazidime(C) at the MICs (●), 2 × MICs (▲) and 4 × MICs (■) against *Escherichia coli* TK2241. Numbers in parentheses refer to the concentration of antibiotics.

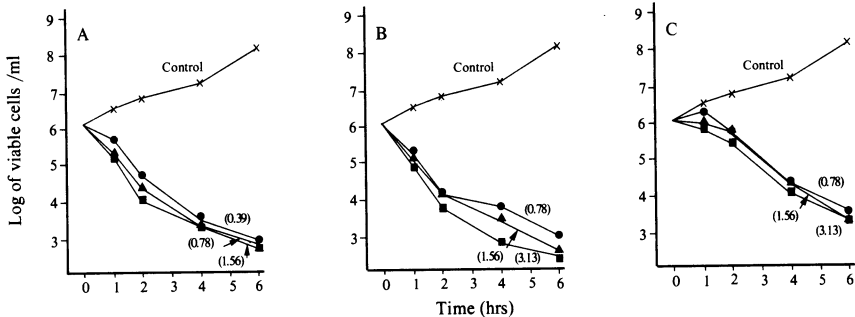


Fig. 2. Bacterial killing kinetics curves of biapenem(A), imipenem(B) and ceftazidime(C) at the MICs (●), 2 × MICs (▲) and 4 × MICs (■) against *Pseudomonas aeruginosa* TK2306. Numbers in parentheses refer to the concentration of antibiotics.

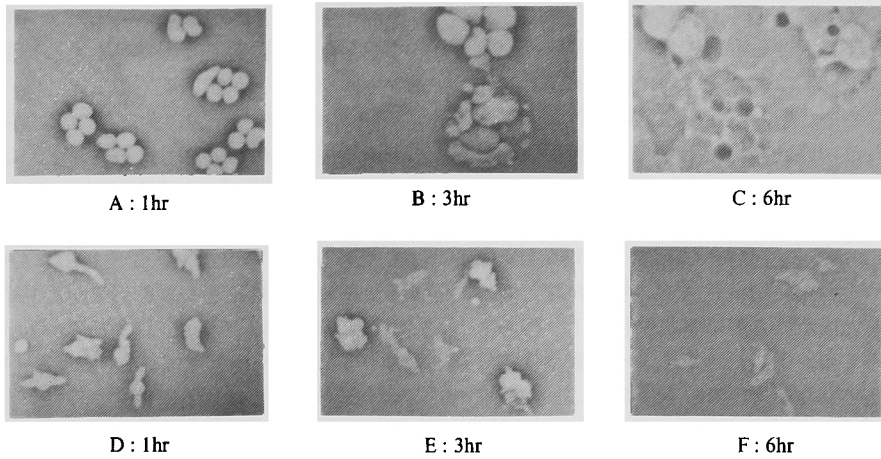


Fig. 3. Morphological changes of cells of *E. coli* TK2241(A through C) and *P. aeruginosa* TK2306 (D through F) when they exposed to the MIC of biapenem. Observation was performed by phase-contrast microscopy.

Table 2. Affinities of biapenem, imipenem and ceftazidime for PBPs from *Escherichia coli* JE 1011 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490

Strain	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) for PBP :				
			1A	1B(s)	2	3	4
<i>Escherichia coli</i> JE1011	Biapenem	0.05	2.7	1.4	<0.1	25	<0.1
	Imipenem	0.1	0.2	0.4	<0.1	21	0.1
	Ceftazidime	0.05	1.7	1.8	>25	<0.1	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	Biapenem	0.2	0.24	0.5	<0.1	0.2	<0.1
	Imipenem	0.78	1.1	0.4	<0.1	0.3	<0.1
	Ceftazidime	0.78	0.2	3.4	>50	<0.1	1.0

Table 3. Affinities of biapenem, imipenem and ceftazidime for PBPs from *Staphylococcus aureus* FDA 209P

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) for PBP :			
		1	2	3	4
Biapenem	0.1	<0.1	2.8	25	<0.1
Imipenem	0.02	<0.1	0.2	0.1	<0.1
Ceftazidime	12.5	1.0	3.1	3.8	>25

いた。

位相差顕微鏡下における形態変化の観察

Fig. 3には、*E. coli* TK2241株と*P. aeruginosa* TK2306株にBIPMを作用させた際の形態変化を示す。*E. coli*にMIC (0.05 $\mu\text{g/ml}$)のBIPMを作用させると、菌は分裂が阻害され、ビーンズ様に大きく膨化した後、次々と溶菌していく像が観察された。

*P. aeruginosa*にMIC (0.2 $\mu\text{g/ml}$)のBIPMを作用させた場合にも同様の形態変化が観察された。すなわち、菌の分裂が停止すると同時に次第に球状化し、それらの変形した細胞から溶菌が生じた。このような形態変化はIPMを作用させた場合と同じであり、CAZによる菌のfilament化とは異なっていた。

ペニシリン結合蛋白への親和性

S. aureus FDA 209P株、*E. coli* JE1011株および*P. aeruginosa* NCTC10490株のPBPに対するBIPM、IPMおよびCAZの結合親和性はTable 2とTable 3に示す。

BIPMは*S. aureus*のPBP-1と-4とに特異的に高い親和性を有し、そのID₅₀はそれぞれ0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。しかしながら、PBP-2と-3に対するID₅₀はIPMの1/10程度であった。

*E. coli*のPBPに対しては、BIPMはPBP-2とPBP-4にID₅₀が0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下と極めて高い親和性を有しており、特にPBP-4に対してIPMよりも高い親和性を有していた。しかしながら、1Aと1Bsに対するID₅₀はIPMよりも1/3~1/10程度であった。CAZはPBP-3にのみ高い親和性を有していた。

*P. aeruginosa*のPBPに対するBIPMの親和性はPBP-2と-4に高く、ID₅₀はいずれも0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。また、PBP-1AにもID₅₀が0.24 $\mu\text{g/ml}$ で、IPMよりも高い親和性を有していた。しかしながら、PBP-1Bsへの親和性はわずかながらIPMに劣っていた。CAZはPBP-1AとPBP-3に対してのみ高い親和性を有していた。

3. 考察

カルバペネム系抗菌薬は幅広い抗菌域を有し、殺菌的に作用する点に特徴を有しているが、本系統の既存のカルバペネム系薬は、ヒトのdehydropeptidase-Iによ

り不活化されるという弱点がみられた。BIPMはこのような不活化をされ難くなっている点に特徴を有する新規のカルバペネム系抗菌薬である⁴⁾。

*In vitro*における抗菌力は、結果の項に示したように、グラム陰性桿菌にはIPMと同等、もしくは優れた成績を示していた。*S. aureus*に対しては、MRSAにはほとんど効果は認められなかったが、MSSAにはIPMに比してはやや劣るものの優れた感受性を示していた。特に、各菌種に対する経時的な殺菌効果が優れていると考えられた。*S. aureus*、*E. coli*、および*P. aeruginosa*のPBPに対する親和性ではIPMに比してはPBP-1Bs等に対するID₅₀値は必ずしも優れていなかったが、膜の肥厚化に関係しているPBP-4に対しての親和性が優れているために、脆弱化した細胞が溶菌しやすいものと考えられた。また、PBPの中ではPBP-1Bsや2に対して親和性が高く、PBP-3に対して比較的低位のために、細胞は伸長化せずに溶菌する像が観察された。ここには示さなかったが、優れた抗菌力を発揮する要因として、BIPMの外膜透過性の良さも起因していると考えられた(未発表成績)。

以上の成績からBIPMは臨床における有用性が期待される薬剤と考えられる。

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 and Chemother.* 34: 994~1,000, 1990
- 2) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 3) Ubukata K, Yamashita N and Konno M: Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 851~857, 1985
- 4) 守殿貞夫, 原 耕平: 第41回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム L-627, 神戸, 1993

In vitro activity of biapenem, a new carbapenem antibiotic

Kimiko Ubukata, Mutumi Sugiura and Masatoshi Konno

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine

2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173 Japan

The *in vitro* activity of biapenem(BIPM), a new carbapenem, was compared with those of imipenem(IPM) and ceftazidime(CAZ). BIPM was two- to fourfold less active than IPM against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* at MIC₉₀ of 0.1 µg/ml. However, the activity of this compound exhibited low activities against methicillin-resistant *S. aureus*. The MIC₉₀ of this compound for members of the family Enterobacteriaceae tested, including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii*, ranged from 0.1 to 3.13 µg/ml. BIPM also inhibited *Pseudomonas aeruginosa* at an MIC₉₀ of 3.13 µg/ml; it thus was twofold more active than IPM.

Morphological changes of cells of *E. coli* and *P. aeruginosa* following exposure to BIPM were observed under a phase-contrast microscopy from bacilli to large beans form and lysed easily.

Killing kinetics of this antibiotic for *E. coli* and *P. aeruginosa* showed that bactericidal action occurred at concentrations above the MIC, 0.05 and 0.39 µg/ml, respectively. BIPM had a high affinity for PBP-2, -4, and 1Bs of *E. coli* and *P. aeruginosa* and PBP-1 and -4 of *S. aureus*.