

Biapenem の *in vitro* 評価

正田宗生, 森 眞彦, 橋田多美
日本レダリー株式会社生物研究所*

新規カルバペネム系抗生物質 biapenem(BIPM)の *in vitro* 抗菌作用について主に imipenem (IPM), ceftazidime (CAZ)を対照薬剤として比較検討した。BIPMはグラム陽性菌, グラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を示した。グラム陽性臨床分離株に対する抗菌力は他のセフェム剤よりは明らかに優れていたが, IPMには劣る結果であった。しかし, BIPM, IPMにも耐性を示すMRSAにはBIPM/セフェム剤の併用により著しい抗菌力増強が認められた。また, 7属359株のグラム陰性臨床分離株に対するMIC₉₀値は0.2~3.13 µg/mlであり, 供試薬剤中最も優れた抗菌力を示し, 特にブドウ糖非発酵菌の *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* に強い抗菌活性を示した。さらに *Xanthomonas maltophilia*を除く各種β-lactamase産生菌に対しても最も強い抗菌力を示した。また, CAZ, ofloxacinで選択した *P. aeruginosa*の自然耐性変異株のBIPMに対する感受性変化は認められなかった。各増殖期の *P. aeruginosa*に対する殺菌作用を検討したところ, 対数期から定常期初期にかけてのいずれの増殖期においてもBIPMは強い殺菌力を示した。走査電顕による形態変化観察においてもBIPMの強い抗緑膿菌活性を反映した結果が得られた。また, 低温および低栄養培養による菌の発育速度を低下させた条件下でもBIPMの強い抗菌力が認められた。

Key words : Biapenem, carbapenem, MIC, 殺菌作用, 併用効果

カルバペネム系抗生物質はβ-ラクタム系抗生物質の中でも, 特に広範な抗菌スペクトラム, 強い殺菌力および高いβ-lactamase安定性を有し, 臨床的にも極めて有用性の高い抗生剤として認められている。しかし, 従来のカルバペネム系抗生物質^{1,2)}では主に腎に存在する dehydropeptidase - I (DHP - I)によって分解され易く, 酵素阻害剤との合剤での投与を強いられ, かつ中枢神経毒性あるいは腎毒性などの安全性の面でも改善すべき点が残されていた。

Biapenem(BIPM)は日本レダリー株式会社で研究開発された単剤で投与可能な, しかも中枢神経系に対する毒性が極めて低い新しい注射用カルバペネム系抗生物質^{3,4)}である。本剤はカルバペネム骨格の4位にメチル基を, 3位にピラゾロトリアゾリウムチオ基を導入した化学構造を有する。

今回, 我々はBIPMの *in vitro*での細菌学的評価について検討したので報告する。なお, 比較薬剤として主に imipenem (IPM), ceftazidime (CAZ)および aztreonam(AZT)を用いた。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

BIPM, cefuzonam (CZON) および meropenem (MEPM) は日本レダリー製薬製剤研究所で合成したものを使用した。IPMはTienam[®](萬有製薬)より当研究所において分離精製した標品を用いた。また, piperacillin (PIP; 富山化学), cefotiam (CTM; 武田薬品), cefoperazone (CPZ; 富山化学), latamoxef (LMOX; 塩野義製薬), CAZ (日本グラクソ), AZT (エーザイ)および ofloxacin (OFLX; 第一製薬)は市販品で, いずれも力価の明らかなものを使用した。

2. 使用菌株

抗菌スペクトル測定には, 日本化学療法学会にて推奨されたMIC測定用標準菌株を使用した。各種臨床分離株の感受性測定には, 1985年から1991年に本邦における臨床材料より分離された保存株を用いた。また, β-lactamase産生株に対する抗菌力の測定にはエビゾーム研究所より分与された菌株を使用した。

3. 感受性測定

日本化学療法学会標準法⁵⁾に準じた寒天平板希釈法に従った。すなわち, 被検菌の感受性測定用ブイヨン(STB; 日水製薬)37℃, 一夜培養液(10⁸~10⁹ cells/ml)を約10⁶ cells/mlになるようにBuffered saline gelatin (BSG)溶

液で希釈し、マイクロプランター(佐久間製作所)を用い、薬剤含有感性ディスク用培地-N(SDA-N; 日水製薬)寒天培地に約5 μ l接種し、37 $^{\circ}$ C、18時間培養後、被検菌の発育が認められない最小濃度をもって Minimum inhibitory concentration (MIC)とした。

4. *in vitro*併用効果

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 24株に対する BIPM/CTM, BIPM/CZON, IPM/CTM および IPM/CZONの併用効果を checkerboard dilution法⁶⁾により MIC測定と同一条件で検討し、fractional inhibitory concentration (FIC) index を求め、以下の基準で併用効果を判定した。

FICindex \leq 0.500を相乗効果、0.500 < FICindex \leq 1.000を相加効果、1.000 < FICindex \leq 2.000を不関、2.000 < FICindexを拮抗作用とした。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

特に殺菌力に対する菌の growth phaseの影響について

Pseudomonas aeruginosa PAO1をSTBで37 $^{\circ}$ C、4日間培養することにより、菌の growth phaseを揃えた後、再び新鮮STBに接種し、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。菌数が約10⁶ cells/mlに達した時点をも0時間とし、0、2および4時間後に最終濃度が6MICになるように各薬剤を添加した。薬剤の添加時と添加1、2および4時間後における生菌数の測定を行った。

6. 走査型電子顕微鏡による形態変化の観察

P. aeruginosa PAO1について上記と同様にして定常期初期に達するまで振盪培養し、この時点で6MIC相当量の各薬剤を添加し、その1、2および4時間後に、サンプリングし、電顕用試料とした。試料は2.5%グルタルアルデヒドで固定後、アルコール希釈系列で脱水した。次いで、酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥および白金パラジウム蒸着を行い、S-530走査型電子顕微鏡(日立製作所)で観察した。

7. 抗菌力に及ぼす菌の発育速度の影響

Table 1. Antibacterial spectrum of biapenem against standard strains of bacteria

Organism	MIC (μ g/ml)					
	biapenem	imipenem	latamoxef	ceftazidime	aztreonam	cefuzonam
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.1	0.013	3.13	6.25	>100	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.013	\leq 0.006	0.78	1.56	>100	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.025	0.013	1.56	3.13	>100	0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.013	\leq 0.006	1.56	0.2	25	0.013
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.05	0.025	3.13	3.13	>100	0.2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.1	0.013	0.78	0.39	12.5	\leq 0.006
<i>Escherichia coli</i> K-12 C600	0.05	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	1.56	1.56	0.1	0.2	0.1	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.1	0.2	0.1	0.2	0.05	0.2
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	0.78	1.56	0.2	0.39	0.1	0.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0.1	0.2	0.05	0.05	\leq 0.006	\leq 0.006
<i>Salmonella typhimurium</i> II D971	0.1	0.2	0.1	0.1	0.05	0.1
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.05	0.05	0.05	0.05	\leq 0.006	0.05
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	0.78	1.56	6.25	3.13	>100	0.2
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.2	0.39	0.05	0.2	0.05	0.025
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	0.78	1.56	0.1	0.1	0.013	\leq 0.006
<i>Serratia marcescens</i> IAM1184	0.2	0.2	0.1	0.025	\leq 0.006	0.025
<i>Morganella morganii</i> IFO3848	0.2	1.56	0.1	0.013	\leq 0.006	\leq 0.006
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	3.13	3.13	0.1	0.05	\leq 0.006	0.05
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	1.56	1.56	0.2	0.025	\leq 0.006	0.013
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	1.56	1.56	0.2	0.025	\leq 0.006	\leq 0.006
<i>Providencia rettgeri</i> IFO3850	0.05	0.025	6.25	0.2	0.39	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3445	0.39	0.39	12.5	1.56	3.13	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	0.2	0.39	1.56	0.2	0.39	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	3.13	6.25	12.5	1.56	3.13	25

Inoculum size: 10⁶ cells/ml

P. aeruginosa 15株を用いて、菌の発育速度を低下させた状態、すなわち低温培養条件(培養温度を20℃とする)および低栄養条件(培養培地としてSTBをD.W.で1/4, 1/16に希釈した培地を用いる)下での各薬剤のMIC測定を実施した。また、各種最少培地(M9, Davis)およびヒト血清などの低栄養培地を用いた場合における抗菌活性の変動についても合わせて検討した。

8. 自然耐性菌の分離

STB中で一夜振盪培養した*P. aeruginosa* PAO1を3.13 µg/mlのCAZあるいはOFLXを含むSDA-Nにコンラージ棒で塗抹接種し、37℃で24時間培養した。生育したコロニーを再び同培地で純培養して無作為に13株の耐性株を選択した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトラム

BIPMの抗菌スペクトラムをIPM, LMOX, CAZ, AZT, CZONを対照薬剤として比較検討した結果をTable 1に示した。BIPMはグラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを示し、グラム陽性菌に対しては、0.013~0.1 µg/mlのMICを示し、IPMには劣るものの他のセフェム剤よりは優れていた。グラム陰性菌に対してもBIPMは優れた抗菌力を示し、MICは全て3.13 µg/ml以下であり、特に*P. aeruginosa*に対し、対照薬剤中最も優れた抗菌活性を有していた。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離株9属539株に対するBIPMおよび対照薬剤の抗菌力をTable 2に示した。Methicillin感性*S. aureus*に対するBIPMのMIC₉₀は0.39 µg/mlであり、IPMには劣るものの他のセフェム剤よりは明らかに優れていた。セフェム剤がほとんど抗菌力を示さないMRSA、コアグラゼ陰性Staphylococciに対するBIPMのMIC_{50, 90}はそれぞれ(12.5, 50 µg/ml), (1.56, 50 µg/ml)であったがIPMよりは若干劣っていた。*Enterococcus faecium*に対しては他剤と同様に抗菌力は弱かった。*Escherichia coli*に対するBIPMのMIC₉₀は0.39 µg/mlであり、IPM, CAZ, AZTに比べて2倍優れていた。*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*に対するMIC₉₀はそれぞれ0.39, 1.56 µg/mlであり、IPMに比べ2倍優れていたが、他のセフェム剤には劣っていた。特に後者の菌では明らかであった。しかし、*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*に対してはセフェム剤の抗菌力が比較的弱いのにに対し、BIPM, IPMは優れた活性を示し、MIC₉₀は両薬剤ともそれぞれ0.39, 0.78 µg/mlであった。また、ブドウ糖非発酵菌の*P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*に対するBIPMのMIC_{50, 90}はそれぞれ(1.56, 3.13 µg/ml), (0.1, 0.2 µg/ml)であり対照薬剤に比べ最も強い抗菌力を示した。

3. β-lactamase産生株に対する抗菌力

β-lactamase産生株に対する抗菌力をTable 3に示した。

Table 2-1. Antibacterial activity of biapenem against clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC (µg/ml)		
		Range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin susceptible (53) (≤ 6.25 µg/ml)	biapenem	0.05 ~ 0.78	0.1	0.39
	imipenem	0.013 ~ 0.1	0.025	0.05
	latamoxef	3.13 ~ 25	6.25	12.5
	ceftazidime	3.13 ~ 50	12.5	25
	aztreonam	>100 ~ >100	>100	>100
	cefuzonam	0.2 ~ 6.25	0.78	1.56
	<i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin resistant (69) (≤ 12.5 µg/ml)	biapenem	0.05 ~ 100	12.5
imipenem		0.1 ~ 100	6.25	50
latamoxef		12.5 ~ >100	50	>100
ceftazidime		25 ~ >100	>100	>100
aztreonam		>100 ~ >100	>100	>100
cefuzonam		3.13 ~ >100	100	>100
coagulase-negative Staphylococci (30)		biapenem	0.1 ~ 100	1.56
	imipenem	0.05 ~ 100	0.1	50
	latamoxef	6.25 ~ >100	50	100
	ceftazidime	6.25 ~ >100	25	100
	aztreonam	>100 ~ >100	>100	>100
	cefuzonam	0.39 ~ 100	3.13	50

MIC determination: Two-fold serial agar plate dilution method
Inoculum size: 10⁶ cells/ml

Table 2-2. Antibacterial activity of biapenem against clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
<i>Enterococcus faecium</i> (28)	biapenem	0.1 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.1 ~ >100	50	>100
	latamoxef	25 ~ >100	>100	>100
	ceftazidime	3.13 ~ >100	>100	>100
	aztreonam	>100 ~ >100	>100	>100
	cefuzonam	0.2 ~ >100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> (42)	biapenem	0.025 ~ 1.56	0.1	0.39
	imipenem	0.05 ~ 1.56	0.39	0.78
	latamoxef	0.05 ~ 6.25	0.1	0.39
	ceftazidime	0.025 ~ 3.13	0.1	0.78
	aztreonam	\leq 0.006 ~ 6.25	0.05	0.78
	cefuzonam	0.025 ~ 3.13	0.1	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (30)	biapenem	0.05 ~ 1.56	0.05	0.39
	imipenem	0.1 ~ 3.13	0.2	0.78
	latamoxef	0.05 ~ 6.25	0.1	0.2
	ceftazidime	0.025 ~ 0.78	0.1	0.2
	aztreonam	0.013 ~ 0.39	0.025	0.05
	cefuzonam	0.025 ~ 1.56	0.1	0.2
<i>Enterobacter cloacae</i> (36)	biapenem	0.05 ~ 0.78	0.2	0.78
	imipenem	0.1 ~ 0.78	0.2	0.78
	latamoxef	0.1 ~ 100	0.2	25
	ceftazidime	0.1 ~ >100	0.2	>100
	aztreonam	0.025 ~ 100	0.1	25
	cefuzonam	0.1 ~ >100	0.2	100
<i>Citrobacter freundii</i> (48)	biapenem	0.05 ~ 0.78	0.1	0.39
	imipenem	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
	latamoxef	0.05 ~ >100	1.56	25
	ceftazidime	0.05 ~ >100	6.25	50
	aztreonam	0.025 ~ 50	1.56	25
	cefuzonam	0.05 ~ 50	1.56	12.5
<i>Proteus mirabilis</i> (39)	biapenem	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56
	imipenem	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	latamoxef	0.05 ~ 0.39	0.1	0.1
	ceftazidime	0.025 ~ 0.1	0.05	0.05
	aztreonam	\leq 0.006 ~ 0.025	\leq 0.006	0.013
	cefuzonam	0.05 ~ 0.39	0.05	0.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (51)	biapenem	0.05 ~ 0.78	0.1	0.2
	imipenem	0.1 ~ 1.56	0.2	0.2
	latamoxef	3.13 ~ 100	25	100
	ceftazidime	0.78 ~ 25	3.13	12.5
	aztreonam	6.25 ~ 100	25	100
	cefuzonam	6.25 ~ 100	25	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (113)	biapenem	0.05 ~ 25	1.56	3.13
	imipenem	0.2 ~ 25	3.13	6.25
	latamoxef	0.78 ~ >100	50	>100
	ceftazidime	0.39 ~ 100	6.25	50
	aztreonam	0.1 ~ >100	12.5	50
	cefuzonam	1.56 ~ >100	100	>100

Table 3. Antibacterial activity of biapenem against β -lactamase producing strains

	Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		biapenem	imipenem	latamoxef	ceftazidime	aztreonam	cefuzonam
PCase	<i>Escherichia coli</i> TEM-1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
	<i>Escherichia coli</i> TEM-2	0.2	0.39	0.39	0.78	0.2	0.2
	<i>Escherichia coli</i> OXA-1	0.05	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
	<i>Escherichia coli</i> OXA-2	0.1	0.2	0.39	12.5	0.1	0.2
	<i>Escherichia coli</i> PSE-1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	<i>Escherichia coli</i> PSE-3	0.2	0.78	0.2	0.2	0.1	0.1
	<i>Escherichia coli</i> SHV-1	0.1	0.2	0.2	0.39	0.1	0.2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ML15009	0.025	≤ 0.006	1.56	1.56	>100	0.1
	<i>Staphylococcus aureus</i> ML15009/p1258	0.05	0.013	1.56	3.13	>100	0.39
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> GN69	0.1	0.2	0.1	0.2	0.05	0.05
CSase	<i>Escherichia coli</i> GN5482	0.05	0.2	0.39	0.78	0.39	0.39
	<i>Escherichia coli</i> No. 1501	0.025	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
	<i>Escherichia coli</i> No. 96	0.05	0.1	0.39	0.78	1.56	0.78
	<i>Enterobacter cloacae</i> GN5797	0.1	0.39	3.13	0.39	0.39	0.78
	<i>Enterobacter cloacae</i> GN7467	1.56	1.56	3.13	1.56	1.56	1.56
	<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	0.1	0.2	0.78	3.13	3.13	6.25
	<i>Citrobacter freundii</i> GN346	0.2	0.39	0.2	3.13	0.39	0.39
	<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	0.78	1.56	50	100	50	25
	<i>Serratia marcescens</i> GN10857	3.13	6.25	25	0.78	1.56	3.13
	<i>Serratia marcescens</i> L-65	0.2	0.39	0.39	0.1	0.1	0.05
	<i>Serratia marcescens</i> L-82	0.1	0.39	0.78	0.39	0.2	0.78
	<i>Providencia rettgeri</i> GN4430	0.39	0.39	0.025	0.1	≤ 0.006	0.025
	<i>Providencia rettgeri</i> GN4762	0.2	0.39	0.1	0.2	0.025	0.2
	<i>Providencia rettgeri</i> GN5284	0.2	0.39	0.025	0.1	≤ 0.006	0.05
	<i>Morganella morganii</i> GN5307	0.78	1.56	0.1	0.05	0.013	0.025
	<i>Morganella morganii</i> GN5375	1.56	3.13	0.1	0.05	0.013	0.025
	<i>Morganella morganii</i> GN5407	1.56	3.13	0.2	0.1	0.025	0.05
	<i>Proteus vulgaris</i> GN76	3.13	3.13	0.2	0.025	0.013	0.1
	<i>Proteus vulgaris</i> GN4413	3.13	3.13	0.78	0.1	0.05	0.78
	<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	0.2	0.2	0.39	0.2	0.05	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	1.56	3.13	50	3.13	12.5	50	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	0.78	3.13	12.5	0.78	3.13	12.5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10367	1.56	3.13	50	1.56	3.13	25	
CXase	<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	0.39	0.39	0.1	0.2	6.25	0.39
	<i>Pseudomonas cepacia</i> GN11164	1.56	3.13	12.5	0.39	1.56	3.13
	<i>Xanthomonas maltophilia</i> GN12873	>100	>100	6.25	100	>100	25

Abbreviations : PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase; CXase, oxyimino cephalosporinase

BIPM は penicillinase 産生株, cephalosporinase 産生株, *Xanthomonas maltophilia* を除く oxyimino cephalosporinase 産生株に対し, それぞれ 0.05~0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.025~3.13 $\mu\text{g/ml}$, 0.39~1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で全ての菌株の発育を阻止し, その抗菌力は IPM に比較し, 2~4 倍強い優れたものであった。

4. *in vitro* 併用効果

臨床分離 MRSA 24 株に対する各種薬剤組み合わせによる併用効果を Table 4 に, また, FIC index 分布を Table 5 に示した。

いずれの組み合わせにおいても相乗, 相加効果のみが認められた。相乗効果を示した株は BIPM/CTM, BIPM/CZON, IPM/CTM, IPM/CZON でそれぞれ 23 株 (96%), 23 株 (96%), 23 株 (96%), 22 株 (92%) 存在した。また, 併用時の各薬剤の MIC について調べると, BIPM, IPM, CTM, CZON 単独時の平均 MIC, 20.1, 19.6, 95.8, 75 $\mu\text{g/ml}$ がそれぞれ 2.23~2.32, 2.13~2.81, 14.7~14.8, 11.1~11.2 $\mu\text{g/ml}$ といずれも小さくなり, 併用による著しい抗菌力増強が認められた。

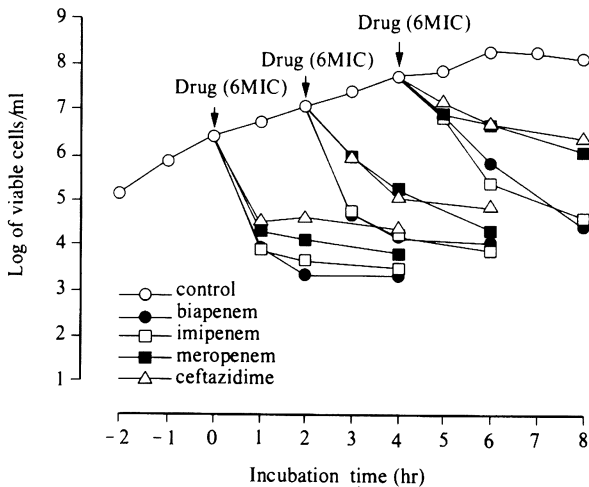
5. 増殖曲線に及ぼす影響

Table 4. Effect of combination of biapenem with cephem antibiotics on 24 MRSA strains

Antibiotic	Geometric mean (range) of MIC ($\mu\text{g/ml}$)				Geometric mean (range) of FIC index
	Alone		Combination		
	carbapenem	the other	carbapenem	the other	
biapenem + cefotiam	20.1 (3.13~100)	95.8 (50~200)	2.32 (0.05~50)	14.7 (3.13~100)	0.170 (0.0705~1)
biapenem + cefuzonam	20.1 (3.13~100)	75 (50~200)	2.23 (0.013~50)	11.2 (3.13~25)	0.208 (0.0665~0.5625)
imipenem + cefotiam	19.6 (0.39~100)	95.8 (50~200)	2.13 (0.013~50)	14.8 (3.13~100)	0.162 (0.0393~1)
imipenem + cefuzonam	19.6 (0.39~100)	75 (50~200)	2.81 (0.025~50)	11.1 (0.78~25)	0.203 (0.0316~0.625)

Table 5. FIC index of biapenem combined with cephem antibiotics against 24 MRSA strains

Range of FIC index	No. of strains tested			
	biapenem + cefotiam	biapenem + cefuzonam	imipenem + cefotiam	imipenem + cefuzonam
≤ 0.125	7	2	3	6
0.126~0.250	16	10	20	7
0.251~0.500		11		9
0.501~1.000	1	1	1	2
Total	24	24	24	24

Fig. 1. Influences of growth phase of *P. aeruginosa* PAO1 on the susceptibility to biapenem

MIC ($\mu\text{g/ml}$): biapenem, 3.13; imipenem, 6.25; meropenem, 3.13; ceftazidime, 1.56.

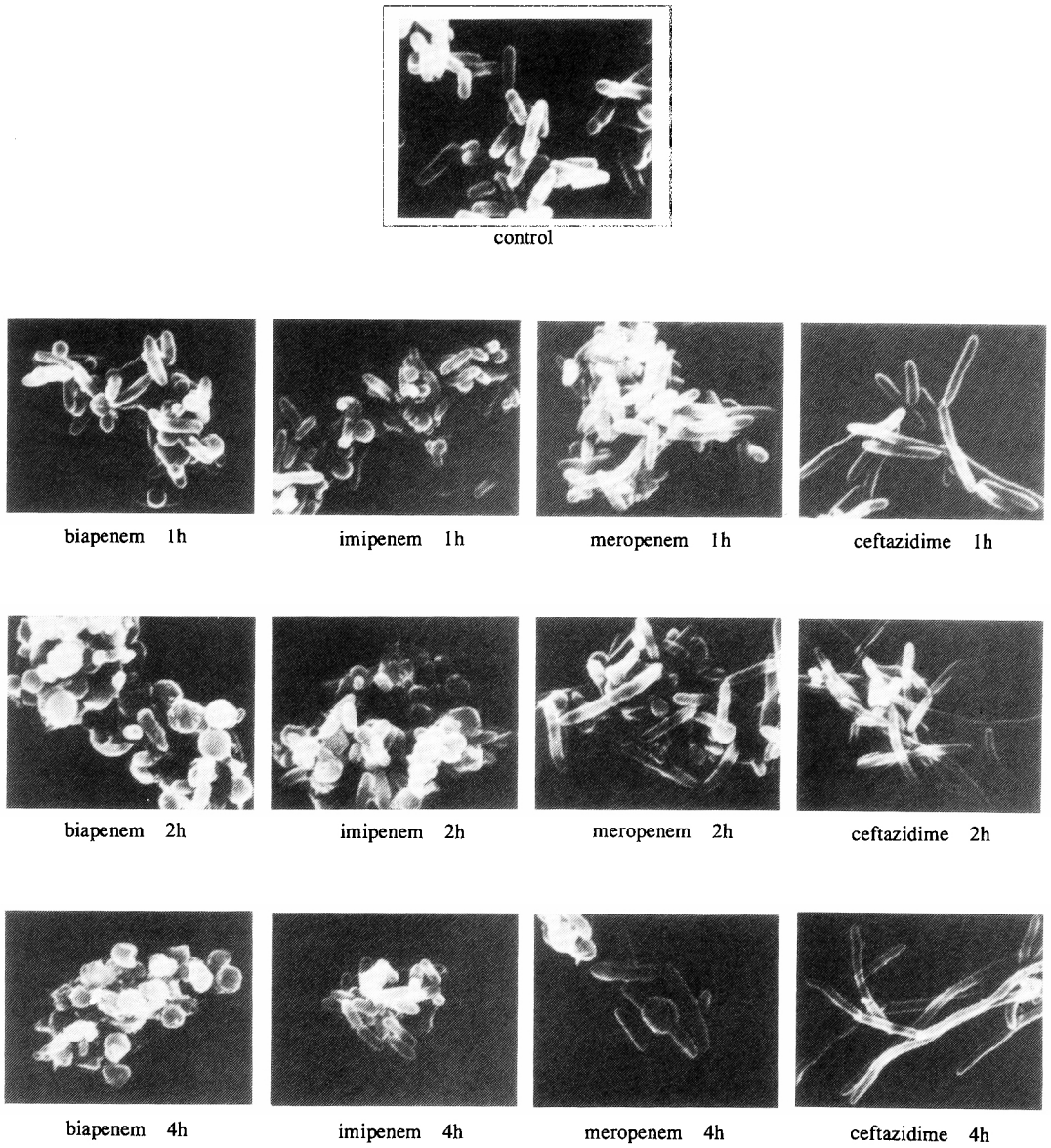


Fig. 2. Morphological changes of *P. aeruginosa* PAO1 at early stationary growth phase exposed to biapenem, imipenem, meropenem and ceftazidime

各増殖期の *P. aeruginosa* PAO1 に対する殺菌作用を検討したところ、Fig. 1 に示すように対数期から定常期初期にかけてのいずれの増殖期においても BIPM は IPM と同様強い殺菌力を示した。すなわち、薬剤添加 4 時間後の生菌数が薬剤添加前に比べ 1/1000 に減少した。しかし、MEPM、CAZ においては対数増殖期後から定常期初期の菌に対し、殺菌力が弱まる傾向がみられ、薬剤添加 4 時間後でも生菌数は添加前の 1/100 以下にはならなかった。

6. 形態変化観察

Fig. 2 に示すように BIPM、IPM に作用させた菌は経時的にスフェロプラスト化し、その後溶菌する像が観察された。しかし、4 時間後の IPM においては一部コントロールと同様の形態を示す菌体もみられた。一方、CAZ では菌のフィラメント化が主に観察された。MEPM を

作用させた菌ではフィラメント化がみられるものの CAZ ほど伸長化せず、次第にスフェロプラスト化し、溶菌する像が観察された。また、薬物作用 4 時間後に菌体中央部が膨化した特徴的な形態像もみられた。

7. 抗菌力に及ぼす菌の発育速度の影響

Fig. 1 でみられた実験結果を確認検討するために低温および低栄養培養による菌の発育速度を低下させた条件下での各薬剤の抗菌力の変動を調べた。Fig. 3 に示したように臨床分離の *P. aeruginosa* 15 株に対し BIPM、IPM では低温下における培地の希釈に伴い、薬剤感受性が高まる傾向がみられた。特に低温培養だけでも BIPM の抗菌力が若干強まった。これに対し CAZ、AZT に対する感受性は逆に低温下での培地希釈により低下した。さらに M9、Davis の最少培地およびヒト血清を用いた低栄養培地による抗菌力の変動についても検討した。Table

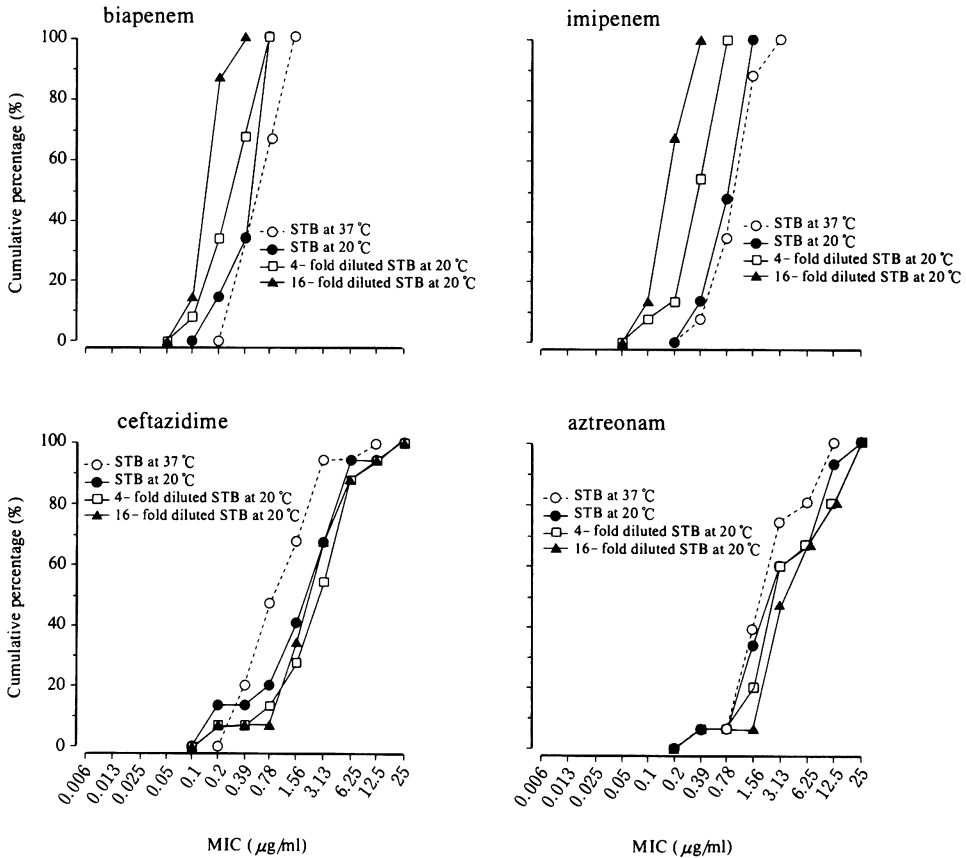


Fig. 3. Influences of incubation temperature and diluted sensitivity test broth on the susceptibility of 15 strains of *P. aeruginosa* to biapenem

Table 6. Influences of various media on the susceptibility of *P. aeruginosa* PAO1

Medium	biapenem		imipenem		meropenem		ceftazidime		aztreonam	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
STB	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	3.13	0.78	0.78	3.13	3.13
M9	0.2	0.39	0.39	1.56	0.1	0.78	0.39	1.56	1.56	6.25
Davis	0.2	0.39	0.39	0.78	0.1	0.39	0.39	0.78	1.56	3.13
Inactivated human serum	*	0.78	*	0.78	*	3.13	*	>100	*	>100

Each value represents μ g/ml.

Inoculum size : 10^5 cells/ml.

Abbreviations : STB, Sensitivity Test Broth (Nissui) ; MIC, Minimal Inhibitory Concentration; MBC, Minimal Bactericidal Concentration.

*: It is not possible to determine the MIC because of very poor bacterial growth even in the inactivated human serum without drugs.

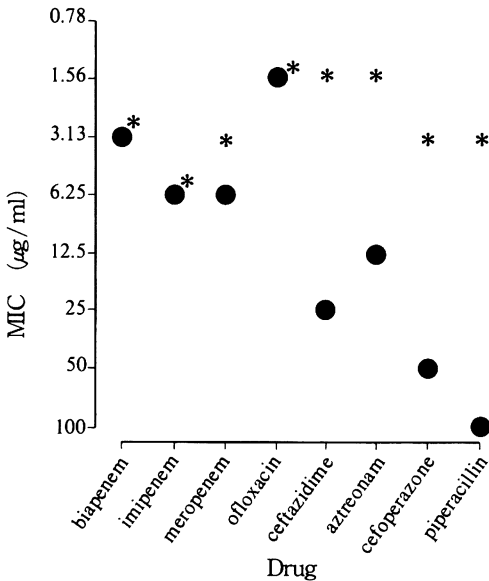


Fig. 4. Antibacterial activity of biapenem against 13 mutants of *P. aeruginosa* PAO1 selected by ceftazidime

*: MIC of each drug for parent strain of *P. aeruginosa* PAO1

●: 13 strains

6に示すごとく，BIPMを含むいずれのカルバペネム系薬剤に対する *P. aeruginosa* PAO1株の感受性が最少培地においてSTBに比べて8~16倍高まった。しかし，他のセフェム剤においてはほとんど変化しなかった。特に非働化ヒト血清中でのカルバペネム剤と他セフェム剤とのMBC値比較による差は64~256倍と非常に著明であった。

8. 自然耐性変異株に対する抗菌力

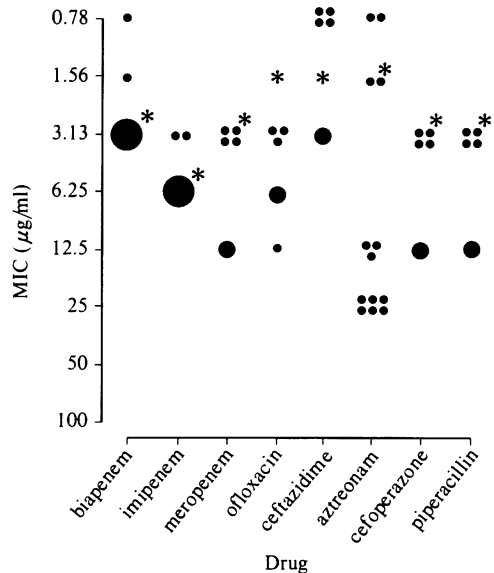


Fig. 5. Antibacterial activity of biapenem against 13 mutants of *P. aeruginosa* PAO1 selected by ofloxacin

*: MIC of each drug for parent strain of *P. aeruginosa* PAO1

●: 1 strain ●: 9 strains ●: 11 strains

CAZで選択された *P. aeruginosa* PAO1の自然耐性変異株13株の各種薬剤に対する感受性変化を調べたところ，BIPM, IPM, OFLXでは不変，CAZ, MEPM, AZT, CPZ, PIPCでそれぞれ16, 2, 8, 16, 32倍MICの上昇が認められた (Fig. 4)。また，同様にOFLXで選択された自然耐性変異株13株の感受性変化を検討したところ，BIPM, IPMではいずれも耐性株は認められず，OFLX, MEPM, CAZ, AZT, CPZ, PIPCでそれぞれ2~8, 4, 2,

8~16, 4, 4倍のMIC上昇を示す株(69~100%)が存在した(Fig. 5)。

III. 考 察

BIPMはDHP-Iに極めて安定⁷⁾であり、かつ中枢神経に対する毒性が極めて低い新しいタイプのカルバペネム系抗生物質であり、単剤投与での臨床的検討が実施された。BIPMはグラム陽性菌、グラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトルと優れた抗菌力を示した。この抗菌力の強さは各種臨床分離株に対する感受性測定によっても確認された。また、*X. maltophilia*を除く各種 β -lactamase産生菌に対し、良好な抗菌力を示した点から、本剤の高い β -lactamase安定性が推察される。BIPMの抗菌力の特徴の一つとしてブドウ糖非発酵菌、特に緑膿菌に優れた抗菌活性を示すことがあげられる。CAZ, AZTの抗緑膿菌セフェム剤に耐性を示す株を含む*P. aeruginosa* 113株に対する本剤のMIC_{50,90}値はそれぞれ1.56, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、この強い抗菌力は恐らく優れた外膜透過性および高い β -lactamase安定性に起因するものと考えられる。CAZ, OFLXで選択した緑膿菌の自然耐性変異株に対するBIPMの感受性成績より本剤はD2等の透過孔からの透過性が高いものと思われる。また、BIPMは対数期から定常期初期のいずれの増殖期の緑膿菌に対しても強力な殺菌作用を示した。低温および低栄養培養による菌の発育速度を低下させた条件下においても優れた抗菌活性が認められ、特に低栄養培養条件下で顕著な抗菌力の増強がみられた。この現象はTrias and Nikaido⁸⁾が指摘しているように薬剤のD2ポーリン透過に対する塩基性アミノ酸による拮抗作用により説明し得るものと思われる。

さらにMRSAに対し、CTM, CZONのセフェム剤との組み合わせにより強い相乗併用効果が得られたことから、*in vivo*における検討の余地は十分あると思われる。

以上のことから、BIPMは優れた*in vitro*抗菌作用、特に抗緑膿菌活性および併用ではあるが抗MRSA活性を

有した新しいカルバペネム剤であり、DHP-Iに対する極めて高い安定性を示す点からも臨床試験における優れた有効性が大いに期待される薬剤であろう。

文 献

- 1) 日本化学療法学会: 第32回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウムII. MK-0787/MK-0791, 岡山, 1984
- 2) 日本化学療法学会: 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(I). CS-976, 岐阜, 1990
- 3) 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
- 4) Hikida M, Masukawa Y, Nishiki K and Inomata N: Low neurotoxicity of LJC 10,627, a novel 1 β -methyl carbapenem antibiotic: inhibition of γ aminobutyric acidA, benzodiazepine, and glycine receptor binding in relation to lack of central nervous system toxicity in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 199~202, 1993
- 5) 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
- 6) Elion GB, Singer S and Hitchings GH: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* 208: 477~488, 1954
- 7) Hikida M, Yoshida M and Mitsuhashi S: Comparative stability of carbapenem and penem antibiotics to renal dehydropeptidase-I. *Drug Res* 43(1): 71~73, 1993
- 8) Trias J and Nikaido H: Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* 265: 15680~15684, 1990

In vitro evaluation of biapenem, a new carbapenem antibiotic

Muneo Hikida, Masahiko Mori and Tami Kitta
Biological Research Laboratories, Lederle (Japan), Ltd.
1-6-34, Kashiwa-cho, Shiki, Saitama 353, Japan

The *in vitro* antibacterial activity of biapenem (BIPM), a new carbapenem antibiotic, was compared with those of imipenem (IPM) and ceftazidime (CAZ).

BIPM had broad-spectrum activity against gram-positive and gram-negative aerobes. Antibacterial activity of BIPM against gram-positive bacteria of clinical isolates was much superior to those of the cephalosporins tested but inferior to that of IPM. However, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* characterized by resistance to carbapenems, such as IPM or BIPM, in combination with cefotiam and cefuzonam, showed strong synergistic activity *in vitro*. The MIC₉₀ of BIPM against 359 gram-negative clinically isolated strains ranged from 0.2 to 3.13 µg/ml, and its activity was the most potent among the antibiotics tested. Especially, BIPM showed excellent activity against glucose non-fermenting bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter calcoaceticus*. Moreover, this compound had the most potent activity against various β-lactamase producing strains except *Xanthomonas maltophilia*. Besides, there was no change in a susceptibility of this compound against mutants of *P. aeruginosa* PAO 1 selected by CAZ or ofloxacin. The bactericidal activity of BIPM was not affected by any growth phase of *P. aeruginosa*. However, in a case of CAZ there is a tendency for the potency to become reduced at early stationary growth phase in comparison with at log phase.

The results obtained in morphological observation by the scanning electron microscope - that is, the formation of spherical cells - reflected the potent antipseudomonal activity of BIPM. Besides, we recognized its activity even against slow growing bacteria under low temperature and low nutrient conditions.