

Imipenem/cilastatin 耐性緑膿菌に対する cefepime の有効性

蔵園 瑞代¹⁾・川畑 敏枝¹⁾・村瀬えるみ¹⁾・新井田昌志¹⁾・吉田 隆¹⁾・賀来 満夫²⁾¹⁾ 明治製菓(株)薬品総合研究所*²⁾ 聖マリアンナ医科大学微生物学教室

(平成7年8月28日受付・平成7年9月29日受理)

Imipenem/cilastatin (IPM/CS) 耐性緑膿菌に対して、抗緑膿菌活性の強いセフェム系薬剤である cefepime (CFPM), cefpirome (CPR), ceftazidime (CAZ) の有効性を *in vitro* で比較検討した。 *Pseudomonas aeruginosa* の臨床分離株 50 株の MIC を測定したところ CFPM, CPR, CAZ および IPM/CS の MIC₉₀ はそれぞれ 32, 128, 64, および 64 $\mu\text{g/ml}$ であった。50 株中 14 株が IPM/CS に耐性 ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$) を示し、これら 14 株に対する CFPM, CPR, CAZ の MIC₉₀ はそれぞれ 16, 32, 32 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、IPM/CS 耐性株に対しても CFPM は IPM/CS と交差耐性を示さなかった。IPM/CS の耐性株 14 株中、実験に用いた 4 株は透過孔である外膜蛋白 D₂ の欠損が SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis により確認された。このうち 2 株を用いて殺菌作用を検討したところ、MIC, sub MIC 濃度で CFPM は、CPR, CAZ と同等かやや強い殺菌力を示した。一方、 β -lactamase の誘導能を比較すると、CFPM, CAZ は低い誘導能を示したのに対し、CPR はやや高い誘導能を示した。また、IPM/CS 耐性緑膿菌 PRC 316 株の精製セファロスポリナーゼを用いて阻害定数 (Ki) を測定した結果、CFPM の Ki 値は 139 μM で他の2剤より大きく、緑膿菌の産生するセファロスポリナーゼに対して、もっとも結合親和性が低いことが確認された。

Key words: cefepime, imipenem/cilastatin 耐性緑膿菌, β -lactamase

緑膿菌は多くの抗菌物質に対して、自然および獲得耐性を示し、優れた抗菌力を持つ薬剤が次々と開発されているにもかかわらず、臨床材料より耐性菌が検出される。緑膿菌に対し強い抗菌活性を持つ imipenem/cilastatin (IPM/CS) でさえも、その透過孔である外膜蛋白 D₂ の欠損¹⁾ や carbapenemase による耐性²⁾ が報告されている。その著しい増加は見られていないものの、今後の動向は注目すべきことである。今回、このような IPM/CS 耐性緑膿菌に対する cefepime の有効性を、*in vitro* において比較検討した。対照薬剤として、緑膿菌に対して強い抗菌力を有する cefpirome および ceftazidime を用いた。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Cefepime (CFPM, プリストル・マイヤーズスクイブ), cefpirome (CPR, 中外製薬), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), cephalothin (CET, 明治製菓), imipenem/cilastatin (萬有製薬) の力価の明らかな標品を使用した。

2. 使用菌株

1992 年から 1993 年に各種臨床材料より分離された *Pseudomonas aeruginosa* 50 株を用いた。NCCLS³⁾ の判定基準に準じ、IPM/CS に対する MIC が $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ の株を IPM/CS 耐性緑膿菌とした。

3. 薬剤感受性試験

緑膿菌 50 株に対する 4 薬剤の MIC は、日本化学療法学会標準法 (微量液体希釈法)⁴⁾ に従い測定した。測定用培地には、Ca²⁺ 30 mg/l および Mg²⁺ 20 mg/l を添加した Mueller Hinton broth (MHB, Difco) を用いた。約 10⁷ CFU/ml に調整した菌液を接種し、37°C, 18 時間培養後判定した。

4. 外膜蛋白の精製と Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による分析

IPM/CS 耐性緑膿菌の外膜蛋白は Fukuoka ら⁵⁾ の方法に準じ、以下のように抽出、精製した。菌体は超音波破碎し遠心分離後、上清を 100,000 \times g, 1 時間遠心分離した。沈渣を 1% ザルコシールで 30°C, 30 分処理後 100,000 \times g, 30 分遠心分離し、不溶画分を外膜蛋白とした。泳動用サンプルは Lowry 法⁶⁾ で蛋白定量し、1% SDS-2% 2-mercaptoethanol で 100°C, 5 分間処理した後、Laemmli⁷⁾ の方法に従って SDS-PAGE を行った。

5. IPM/CS 耐性株に対する殺菌作用

PRC 305 株, PRC 318 株 (いずれも IPM/CS の MIC 32 $\mu\text{g/ml}$) を MHB (BBL) で 18 時間前培養し、各菌液を 660 nm で OD=0.25 に調整した。MHB で 200 倍に希釈した後、振盪培養を行った。2 時間後に各濃度の薬剤を作用させ、2, 4, 6 時間後に生菌数の測

定を行った。

6. β -lactamase 誘導能

粗酵素液の調整: 約 10^7 CFU/ml に調整した PRC 318 株を Antibiotic medium 3 (Difco) で 2 時間振盪培養した後, 至適誘導濃度⁹⁾ の各薬剤を添加し, さらに 3 時間培養した。菌体を 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄した後, 超音波破碎し遠心分離後, 上清を粗酵素サンプルとした。

酵素活性の測定: CET (100 μ M) を基質とした UV 法で測定した。 β -lactamase 活性は 1 分間に 1 μ mole の基質を分解する酵素量を 1 単位とし, Lowry 法により

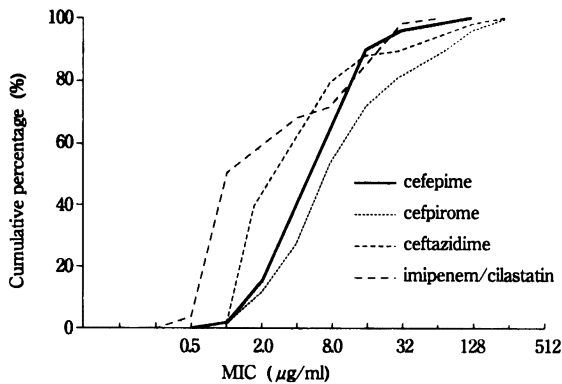


Fig. 1. Sensitivity distribution of *Pseudomonas aeruginosa* (50 strains).

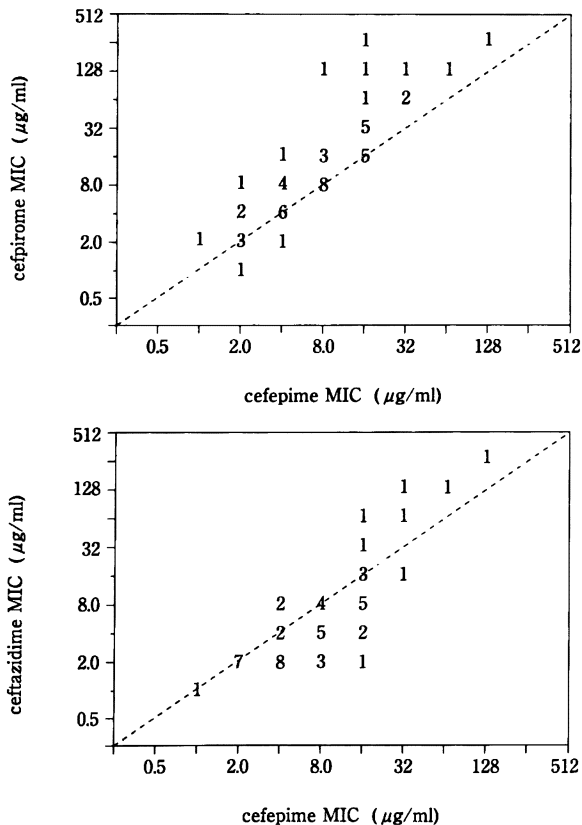


Fig. 2. Correlation of MICs between cefepime and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*.

って求めた蛋白 (mg) 当たりの比活性 (Unit/mg protein) で示した。

7. β -lactamase に対する結合親和性

セファロスポリナーゼの精製: IPM/CS 耐性株である PRC 316 株のセファロスポリナーゼを CM セファデックス C-50 を用い既報の精製法⁹⁾ により分離, 精製して使用した。精製した酵素は, SDS-PAGE でその精製度を確認した。

阻害定数 (K_i) の測定: CET (12.5~200 μ M) を基質として薬剤の存在下および非存在下で加水分解速度を測定し, Lineweaver-Burk plot から最小 2 乗法により値を算出した。なお, CET の $\Delta\epsilon$ は 7.66 ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) で計算した。

II. 結 果

1. 臨床分離緑膿菌 50 株の薬剤感受性

臨床材料より分離された緑膿菌 50 株の 4 薬剤に対する感受性分布を Fig. 1 に示した。MIC₉₀ は CFPM 16 μ g/ml, CPR 128 μ g/ml, CAZ 32 μ g/ml, IPM/CS 32 μ g/ml であった。CFPM と, CPR および CAZ の MIC 相関を Fig. 2 に示した。CFPM の抗菌力は CPR より良好であったが, CAZ との比較では, CAZ の MIC 値が小さい株では CAZ が, 32 μ g/ml 以上の株では CFPM が, それぞれ優れた値を示していた。

2. IPM/CS 耐性緑膿菌の感受性分布

50 株中 14 株が IPM/CS に耐性を示した。これら 14 株に対する CFPM, CPR, CAZ の MIC₉₀ はそれぞれ 16, 32, 32 μ g/ml であった (Fig. 3)。また, 1 株を除いて, CFPM は IPM/CS と MIC の相関はなく, IPM/CS 耐性株に対しても CFPM の有効性が示唆された (Fig. 4)。

3. IPM/CS 耐性株の外膜蛋白 Profile

SDS-PAGE の結果より, PAO 1 では検出される約 45 Kd の外膜蛋白 D₂ が, IPM/CS 耐性株 14 株中実験に用いた 4 株では欠損していることが確認された (Fig. 5)。

4. 増殖曲線におよぼす影響

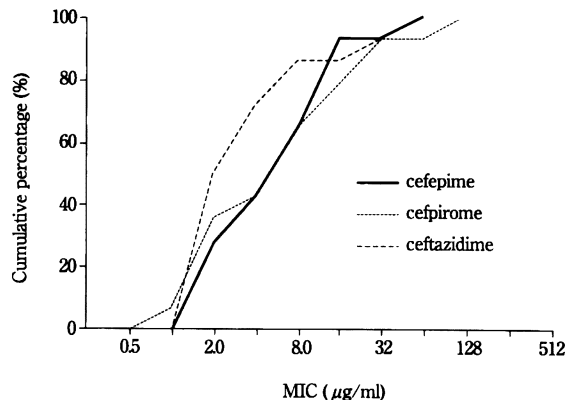


Fig. 3. Sensitivity distribution of imipenem/cilastatin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (14 strains).

IPM/CS 耐性株 2 株に対する CFPM, CPR, CAZ の殺菌作用を Figs. 6, 7 に示した。CFPM は PRC 305 株に対して CPR と同等, CAZ より強い殺菌力を示した。PRC 318 株に対しては, sub MIC において他の 2 剤より強い殺菌力を示した。

5. β -lactamase 誘導能

セフェム剤の 3 薬剤を 1 MIC, 2 MIC 濃度で作用させたところ, CFPM および CAZ は CPR に比較し β -lactamase の誘導能は低かった (Fig. 8)。

6. β -lactamase 結合親和性

CFPM は CAZ と同様に, セファロスポリナーゼによる加水分解を受けにくい。そこで, 易加水分解性の CET を基質として用いて, 阻害定数 (K_i) を求めた (Table 1)。CFPM の K_i 値は $139 \mu\text{M}$ で, CPR が $58 \mu\text{M}$ および CAZ が $13 \mu\text{M}$ であったのに比較し大きい値を示した。CFPM は, IPM/CS 耐性緑膿菌 PRC 316 株の産生するセファロスポリナーゼに対して他の 2 剤より親和性が低いことが確認された。また, 使用した精製セファロスポリナーゼは SDS-PAGE で単一のバンドを示した。

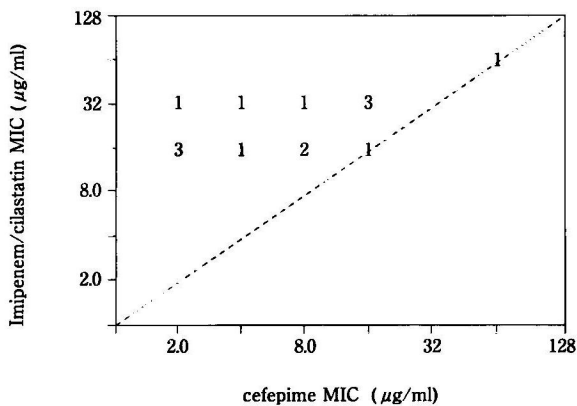


Fig. 4. Correlation of MICs between cefepime and imipenem/cilastatin (IPM/CS) against IPM/CS-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

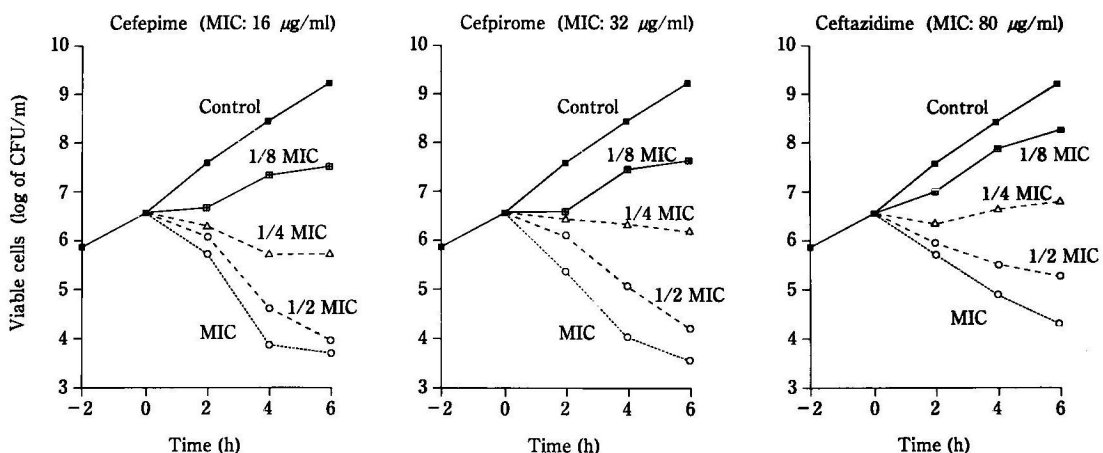


Fig. 6. Bactericidal effects of cefepime, ceftazidime and ceftazidime against imipenem/cilastatin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PRC 305.

III. 考 察

IPM/CS は従来緑膿菌に対して強い抗菌活性を持つが, 近年, 透過孔である D_2 蛋白の欠損や carbapenemase による耐性が報告されている。今回我々は IPM/CS 耐性緑膿菌に対して, 強い抗緑膿菌活性を持つセフェム系薬剤の有効性を比較検討した。

各種臨床材料より分離された緑膿菌 50 株の薬剤感受性を調べた結果, 14 株 (28%) が IPM/CS 耐性菌であった。この数値は, これまで報告されている耐性率より多少高い結果であるが, ある特定の施設より高頻度

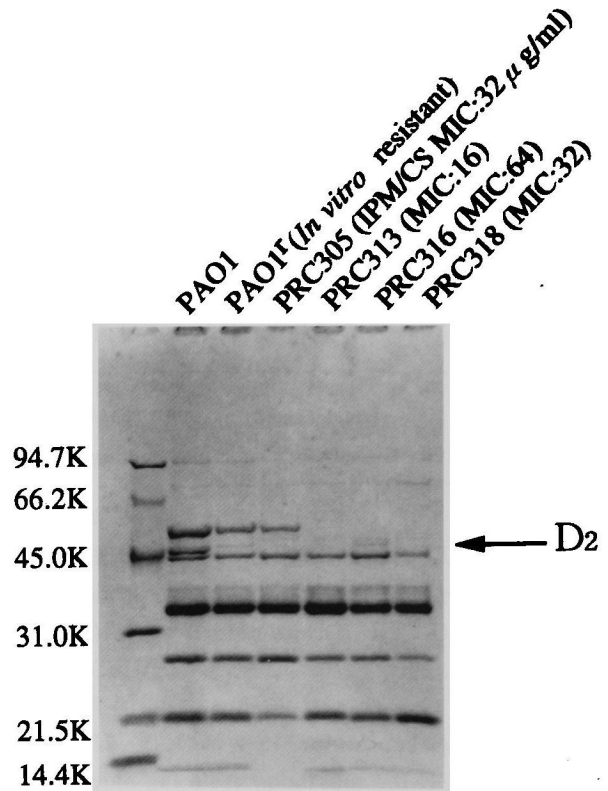


Fig. 5. Profile of outer membrane proteins of imipenem/cilastatin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by SDS-PAGE.

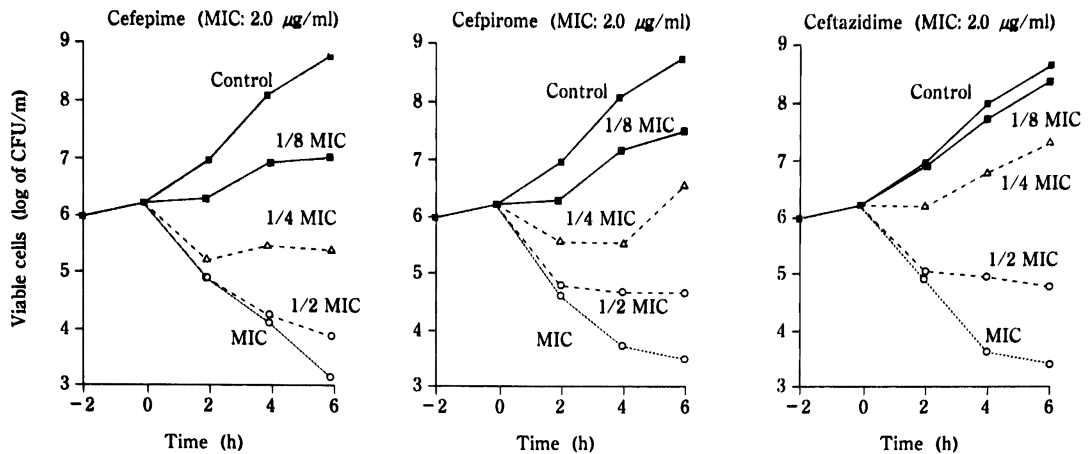


Fig. 7. Bactericidal effects of cefepime, ceftazidime and ceftazidime against imipenem/cilastatin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PRC 318.

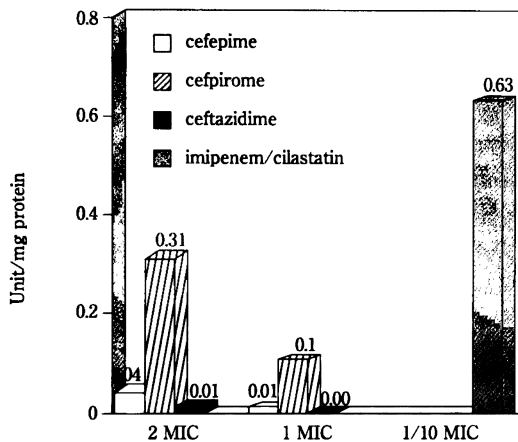


Fig. 8. Inducer activity for β -lactamase of *Pseudomonas aeruginosa* PRC 318.

Table 1. Inhibition kinetic parameters against cephalosporinase from *Pseudomonas aeruginosa* PRC 316

	Ki (μ M)
Cefepime	139
Ceftazidime	58
Ceftazidime	13

に IPM/CS 耐性株が分離されていることが、全体の耐性率を上げている原因と考えられた。おそらくこの施設では IPM/CS の使用頻度が高く、IPM/CS 耐性緑膿菌が選択されたと考えられる。

実験に供した IPM/CS 耐性株は外膜蛋白 D₂ の欠損が確認されたが、セフェム系薬剤は透過経路が異なるため、D₂ 蛋白欠損の影響を受けずに抗菌力を示す。しかし、高度に β -lactamase を産生し、他の β -ラクタム薬と交差耐性を示す株もあることが報告されている⁹⁾。緑膿菌の産生する染色体性の β -lactamase は、多くは誘導型の酵素であり、 β -ラクタム薬に接触すると著しく酵素量が増える。非誘導時の酵素産生量は株により異なるが、誘導により脱抑制型といわれるような大量の

β -lactamase を産生するようになったり、ベースの産生レベルが上がり構成的に β -lactamase を産生ようになるものも見られる^{10, 11)}。誘導する至適濃度は薬剤によっても異なるが、IPM/CS は 1/10 MIC で高い誘導能を示した。セフェム系薬剤は 1 MIC, 2 MIC 濃度で β -lactamase を誘導したが、CPR が中等度の誘導能を示したものの、IPM/CS より明らかに低い値であった。 β -lactamase 産生菌に対する抗菌力には、 β -lactamase への親和性も関与する。緑膿菌の産生するセファロsporinase に対して、CFPM の結合親和性はきわめて低く、この低親和性が、CPR および CAZ の MIC 値の大きい株において、他の薬剤より良好な値を示す理由の1つであると考えられた。また、CFPM の β -lactamase に対する低親和性と安定性から、CAZ 耐性緑膿菌に対しても有効であるとの報告がある¹²⁾。IPM/CS の使用によって脱抑制的に β -lactamase を産生ようになった緑膿菌に対しても、その抗菌力は期待できるものと思われる。

緑膿菌に対する抗菌力には、薬剤の透過性や PBP_s に対する親和性などの因子も関与している。CFPM は双極イオン構造を有することから、第 3 世代セフェムよりも速やかにグラム陰性菌の外膜を透過する¹³⁾。また、緑膿菌の PBP 1 B に対する親和性は CAZ より若干強いことが報告されている¹⁴⁾。CFPM はこのように優れた抗緑膿菌活性を有し、今回の実験成績から、CPR および CAZ に比較し、IPM/CS 耐性緑膿菌に対して有効であると考えられた。

文 献

- 1) Buscher K H, Cullman W, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob Agent Chemother* 31: 703~708, 1987
- 2) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S:

- Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agent Chemother* 35: 147~151, 1991
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M 7-A 2 (M 100-S 4). Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 12, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova. Pa., 1992
 - 4) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (委員長: 齊藤 厚): 微量液体希釈法による MIC 測定法 (日本化学療法学会標準法) の一部修正. *Chemotherapy* 41: 183~189, 1993
 - 5) Fukuoka T, Masuda N, Takenouchi T, Sekine N, Iijima M, Ohya S: Increase in Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenem Antibiotics in Low-Amino-Acid Media. *Antimicrob Agent Chemother* 35: 529~532, 1991
 - 6) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R L: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
 - 7) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680~685, 1970
 - 8) 井上松久, 野々山勝人, 井田孝志, 岡本了一: カルバペネム剤の細菌学的特徴. *臨床と微生物* 21: 391~397, 1994
 - 9) Tajima M, Takenouchi Y, Sugawara S, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and Properties of Chromosomally Mediated β -Lactamase from *Citrobacter freundii* GN 7391. *J Gen Microbiol* 121: 449~456, 1980
 - 10) Watanabe M, Mitsuhashi S: Imipenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. 1. Relationship of resistance between imipenem and other β -Lactam antibiotics. *Chemotherapy* 39: 1014~1019, 1991
 - 11) 前島哲郎, 渡邊正人, 三橋 進: β -ラクタム剤と緑膿菌. 緑膿菌感染症の基礎と臨床 (三橋 進, 熊本悦明, 島田 馨編), P.19~29, ライフサイエンスメディカ, 1993
 - 12) Johnson C C, Livornese L, Gold M J, Pitsakis P G, Taylor S, Levison M E: Activity of cefepime against ceftazidime-resistant Gram-negative bacilli using low and high inocula. *J Antimicrob Chemother* 35: 765~773, 1995
 - 13) Nikaido H, Liu W, Rosenberg E Y: Outer membrane Permeability and β -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrob Agent Chemother* 34: 337~342, 1990
 - 14) 横田 健, 神智恵子, 新井京子: Cefepime の試験管内抗菌力, 作用点 PBP₃ に対する結合親和性および血清補体とマウス培養マクロファージとの協力的殺菌作用. *Chemotherapy* 39 (S-2) : 20~27, 1991

Activity of cefepime against imipenem/cilastatin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Mizuyo Kurasono¹⁾, Toshie Kawabata¹⁾, Erumi Murase¹⁾, Masashi Niida¹⁾,
Takashi Yoshida¹⁾ and Mitsuo Kaku²⁾

¹⁾ Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

²⁾ Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine

The *in vitro* antibactericidal activity of cefepime (CFPM) was compared with that of cefpirome (CPR) and ceftazidime (CAZ) against imipenem/cilastatin (IPM/CS)-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC₉₀ of CFPM, CPR, CAZ and IPM/CS was 32, 128, 64 and 64 $\mu\text{g/ml}$ respectively against 50 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Fourteen of the 50 strains were IPM/CS-resistant. The MIC₉₀ of CFPM, CPR and CAZ was 16, 32 and 32 $\mu\text{g/ml}$ respectively against IPM/CS-resistant *P. aeruginosa*. The IPM/CS-resistant strains showed no cross-resistance between IPM/CS and CFPM. We observed a lack of the outer membrane protein D₂ in the IPM/CS resistant strains using SDS-PAGE. The time courses of CFPM, CPR and CAZ bactericidal activities against 2 strains of IPM/CS-resistant strains were determined. The bactericidal activity of CFPM was equal to or somewhat superior to those of CPR and CAZ at concentration of MIC or subMIC. On the other hand, inducer activities of CFPM and CAZ for β -lactamase were lower than that of CPR. In an inhibition study, CFPM showed a much higher Ki value for cephalosporinase of *P. aeruginosa* PRC 316 than did CPR and CAZ. An extremely lower affinity of CFPM was demonstrated.