

新規経口ペネム剤 ritipenem acoxil の細菌学的検討

井上栄子・三橋 進
エビゾーム研究所*

新規経口ペネム剤 ritipenem acoxil (RIPM-AC) の活性本体である ritipenem (RIPM) の *in vitro* 抗菌力, 殺菌力および β -lactamase に対する安定性について cefaclor (CCL), cefixime (CFIX) および ceftoram (CFTM) を対照薬剤として比較検討した。

1. RIPM は, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Clostridium* spp. および *Bacteroides fragilis* に対して対照薬剤よりも強い抗菌力を示した。 *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* および *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* に対する RIPM の抗菌力は, 対照薬剤同様弱かった。

2. RIPM は, MSSA, *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* 等の臨床分離株に対して強力な殺菌作用 (MIC/MBC) を示した。 *S. aureus* FDA 209P JC-1 および *E. coli* K12 C600 の増殖曲線におよぼす RIPM の影響について検討したところ, 本剤は 1MIC 以上の濃度で強い殺菌作用が認められた。

3. RIPM は, *P. aeruginosa* および *S. (X.) anthomonas · maltophilia* を除く β -lactamase 産生菌に対して CCL よりも強い抗菌力を示した。特に, *C. freundii* および *E. cloacae* の中で CFIX および CFTM に高度耐性を示す株に対して, RIPM は優れた抗菌力を示した。

4. RIPM は, *S. (X.) maltophilia* 産生 oxyiminocephalosporinase (L-1 β -lactamase) 以外の各種 β -lactamase に対して対照薬剤と比較し, 極めて安定であった。RIPM は *C. freundii* GN7391 および *E. cloacae* GN7471 産生 cephalosporinase に対して, 高い親和性ならびに低い V_{max} 値を示した。

Key words : ritipenem acoxil, *in vitro* 抗菌力, β -ラクタマーゼ

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) はイタリアのファルミタリア カルロエルバ社 (現ファルマシア社) において創製された新規経口ペネム系薬剤である (Fig. 1)。本剤の活性体は ritipenem (RIPM) である。RIPM はグラム陽性菌, 陰性菌に広範囲な抗菌スペクトルを有し, 特に好気性グラム陽性菌ならびに嫌気性菌に対して優れた抗菌力を示し, 各種 β -lactamase に安定であることが報告されている¹⁾。今回, RIPM の *in vitro* 抗菌力, 殺菌力ならびに β -lactamase に対する安定性について既存の経口セフェム薬 cefaclor (CCL), cefixime (CFIX) および ceftoram (CFTM) と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

RIPM (ファルミタリア カルロエルバ社, 現ファルマシア社), CCL (塩野義製薬), CFIX (藤沢薬品工業), CFTM (富山化学工業), penicillin G (PCG: 万有製薬), cephaloridine (CER: 日本グラクソ) を用

いた。使用薬剤は, いずれも力価に応じた重量補正を行ない実験に供した。

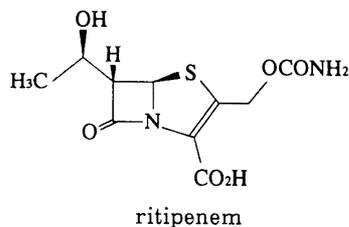
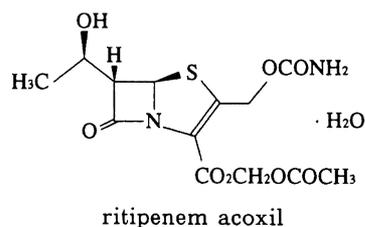


Fig. 1. Chemical structures of ritipenem acoxil and ritipenem

Table 1. Media used for preculture and MIC determination

Media ^a	Organism
For preculture	
STB + 5 % horse blood	Streptococci
STB + 5 % Fildes Enrichment (Difco)	<i>Haemophilus influenzae</i>
GCA + 1 % Hemoglobin (Difco) + 1 % Iso VitaleX (BBL)	<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 + 1 % Hemoglobin (Difco) + 1 % Iso VitaleX (BBL)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
GAMA	Anaerobes
SDA-N	Other organisms

a : STB : sensitivity test broth (Nissui), GCA : GC agar base (Difco),
GAMB : GAM broth (Nissui), SDA-N : sensitivity disk agar-N (Nissui),
GAMA : GAM agar (Nissui)

2. 使用菌株

群馬大学薬剤耐性菌実験施設および当研究所保存（主として1985～1989年にかけて分離された）の臨床分離株、 β -lactamase産生株および日本化学療法学会標準株²⁾を用いた。

3. 使用培地と抗菌力の測定

使用培地は供試菌株によって異なるため、Table 1に一括して表示した。抗菌力の測定は、日本化学療法学会制定の最小発育阻止濃度（MIC）測定法³⁾および嫌気性菌のMIC測定法⁴⁾に準じて実施した。すなわち、前培養菌液を、buffered saline with gelatin液（BSG）を用いて希釈して、約 10^6 CFU/mlの濃度に調整し接種菌液とした。偏性嫌気性菌の希釈には、GAM broth（日水製薬）を用いた。この菌液をマイクロプランター（佐久間製作所）を用いて5 μ lずつ薬剤含有寒天平板上に接種した。37°C、18～24時間培養後、肉眼的に菌の発育が認められない最小薬剤濃度をMICとした。

4. 殺菌効果

(1) 最小殺菌濃度（MBC）の測定

薬剤の2倍希釈系列を含むMueller Hinton broth（MHB, Difco）を用い、同培地で前培養した被検菌を約 5×10^5 CFU/mlになるように接種して37°C、18時間培養後、肉眼的に菌の生育が認められない最小薬剤濃度をMICとした。さらに、MIC以上の濃度での培養液100 μ lを薬剤を含まないSensitivity disk agar-N（SDA-N, 日水製薬）10 mlに混釈し、37°C、18時間培養後生育コロニー数を計数し、接種菌量の0.1%以下の生菌数を示す最小薬剤濃度を最小殺菌濃度（MBC）とした。

(2) 増殖曲線におよぼす影響

MHBで前培養した被検菌を同培地で*S. aureus* FDA 209P JC-1は 1×10^5 CFU/ml、*E. coli* K12 C600は約 3×10^5 CFU/mlに希釈し、37°C、2時間振盪培養した。この培養液に指定濃度の薬剤を添加後24時間まで振盪培養を続けた。経時的にサンプリングした200 μ lの培養液およびその希釈液をSDA-N 10 mlに混釈し、生育菌数を測定した。

5. β -lactamaseに対する作用

(1) β -lactamase産生菌に対する抗菌力

酵素学的性質の明らかな各種 β -lactamase産生菌を使用し、前記の感受性測定法に従って抗菌力を検討した。

(2) β -lactamaseに対する安定性および親和性

すべての β -lactamaseは当研究所保存の精製標品⁵⁾を適宜希釈して使用した。各薬剤の加水分解速度を、UV法⁶⁾により30°Cで測定した。 β -lactamaseに対する安定性はpenicillinaseに対してはPCGの、cephalosporinaseおよびoxyminocephalosporinaseに対してはCERの分解速度を100とした相対加水分解速度で表した。

Km値およびVmax値はそれぞれの薬剤濃度で求めた加水分解速度からLineweaver-Burk plot⁷⁾の式により算出した。Ki値は、penicillinaseにはPCG（25, 100 μ M）を、cephalosporinaseおよびoxyminocephalosporinaseにはCER（25, 100 μ M）を基質とし、適当な薬剤濃度の存在下で加水分解を繰り返し測定して、Dixon plot⁸⁾の式より算出した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

RIPMの標準菌株に対する抗菌力をCCL, CFIXお

よび CFTM と比較し、Table 2 に示す。RIPM の MIC 値は、グラム陽性菌に対して 0.05~0.10 $\mu\text{g/ml}$ 、グラム陰性腸内細菌に対して 0.39~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、*P. aeruginosa* に対しては 12.5~>100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床材料より分離した 27 菌種 2067 株に対する RIPM および対照薬剤の抗菌力を MIC range, MIC₅₀ および MIC₉₀ として Table 3 に示す。

MSSA に対する RIPM の MIC₉₀ 値は 0.20 $\mu\text{g/ml}$ であり、対照薬剤より 256~512 倍優れていた。一方、MRSA に対する本剤の MIC₅₀ 値は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であり、対照薬剤より明らかに優れていたが、MIC₉₀ 値は対照薬剤と同様に >100 $\mu\text{g/ml}$ であった。*S. epidermidis* に対する RIPM の MIC₉₀ 値は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり、対照薬剤より 128~256 倍優れていた。RIPM は、0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で *Streptococcus pyogenes* および *Streptococcus pneumoniae* のすべての株の発育を阻止した。*E. faecalis* に対する対照薬剤の抗菌力は弱かったが、RIPM の MIC₉₀ 値は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、比較薬剤の中で最も抗菌力は強かった。*Enterococcus faecium* に対する本剤および対照薬剤の抗菌力は弱かった。

E. coli に対する RIPM の MIC₉₀ 値は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であり CFIX よりやや劣るものの CFTM とほぼ同等、CCL より 8 倍優れた抗菌力を示した。*K. pneumoniae* および *Klebsiella oxytoca* に対する RIPM の MIC₉₀ 値はいずれも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。この値は CFIX より 16 倍劣るものの CFTM とほぼ同等、CCL よりやや優れていた。*C. freundii* および *E. cloacae* に対する RIPM の MIC₅₀ 値は CFIX とほぼ同等、CFTM よりやや劣るものの本剤の MIC₉₀ 値はいずれも 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であったが、CFIX および CFTM の MIC₉₀ 値は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

S. marcescens に対する RIPM の抗菌力は他剤と同様弱かった。*M. morgani* に対する RIPM の MIC₅₀ 値は CFIX および CFTM より 4~32 倍劣るものの、本剤の MIC₉₀ 値は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を示し CFIX および CFTM より 8~16 倍優れていた。*Providencia* spp. および *Proteus* spp. に対する RIPM の抗菌力は、CFIX より 16~128 倍、CFTM より 2~16 倍劣るものの、CCL より明らかに優れていた。*Neisseria gonorrhoeae* および *Haemophilus influenzae* に対する RIPM の MIC₉₀ 値は、いずれも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。この値は CFIX より 16~64 倍、CFTM より 16 倍劣っていた。*Moraxella catarrhalis* に対して RIPM は、CFIX および

Table 2. Antibacterial spectrum of ritipenem against standard strains

Standard strain ^a	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	ritipenem	cefaclor	cefixime	cefteram
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.10	3.13	25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.05	0.20	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.05	0.78	12.5	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.10	0.20	0.10	≤0.006
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.10	0.10	25	0.39
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.05	0.025	0.78	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.78	1.56	0.20	0.20
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	0.78	1.56	0.20	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	3.13	>100	0.39	0.39
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	6.25	>100	1.56	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0.78	0.78	≤0.006	≤0.006
<i>Salmonella typhimurium</i> IID 971	0.78	0.78	0.20	0.78
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.78	0.78	0.025	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	0.78	1.56	0.012	0.012
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.39	0.39	0.10	0.20
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	0.78	0.78	0.012	0.025
<i>Serratia marcescens</i> IAM 1184	1.56	>100	0.025	0.39
<i>Morganella morgani</i> IFO 3848	3.13	50	≤0.006	≤0.006
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	3.13	3.13	≤0.006	0.05
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.78	12.5	≤0.006	0.012
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	1.56	12.5	≤0.006	≤0.006
<i>Proteus rettgeri</i> IFO 3850	1.56	3.13	≤0.006	≤0.006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	50	>100	50	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	12.5	>100	6.25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1	>100	>100	100	>100

a : The inoculum size was 10⁶ CFU/ml.

Table 3-1. Antibacterial activity of ritipenem against clinical isolates

Test organism* (No. of strains)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	MIC _{6.0}	MIC _{9.0}
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (94)	ritipenem	0.10-0.39	0.10	0.20
	cefaclor	1.56->100	3.13	>100
	cefixime	6.25->100	12.5	100
	cefteram	1.56->100	3.13	50
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (68)	ritipenem	0.10->100	0.78	>100
	cefaclor	12.5->100	>100	>100
	cefixime	25->100	>100	>100
	cefteram	3.13->100	>100	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (106)	ritipenem	0.05->100	0.10	0.39
	cefaclor	0.78->100	6.25	50
	cefixime	1.56->100	50	>100
	cefteram	0.39->100	12.5	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> (100)	ritipenem	0.012-0.10	0.10	0.10
	cefaclor	0.10-0.39	0.20	0.39
	cefixime	0.05-0.10	0.10	0.10
	cefteram	≤ 0.006	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (35)	ritipenem	$\leq 0.006-0.20$	0.025	0.05
	cefaclor	0.20-12.5	0.39	1.56
	cefixime	0.10-0.39	0.10	0.20
	cefteram	$\leq 0.006-0.20$	0.012	0.10
<i>Enterococcus faecalis</i> (102)	ritipenem	1.56-12.5	3.13	3.13
	cefaclor	25->100	50	100
	cefixime	3.13->100	100	>100
	cefteram	1.56->100	12.5	>100
<i>Enterococcus faecium</i> (95)	ritipenem	1.56->100	100	>100
	cefaclor	25->100	>100	>100
	cefixime	>100	>100	>100
	cefteram	100->100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> (89)	ritipenem	0.39-0.78	0.78	0.78
	cefaclor	0.78-100	1.56	6.25
	cefixime	0.025-12.5	0.20	0.39
	cefteram	0.05-3.13	0.39	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (108)	ritipenem	0.39-1.56	0.39	0.78
	cefaclor	0.39-50	0.78	3.13
	cefixime	$\leq 0.006-1.56$	0.025	0.05
	cefteram	0.025-6.25	0.20	0.39
<i>Klebsiella oxytoca</i> (104)	ritipenem	0.39-6.25	0.78	0.78
	cefaclor	0.39->100	0.78	1.56
	cefixime	$\leq 0.006-0.78$	0.025	0.05
	cefteram	0.025-6.25	0.10	0.39
<i>Citrobacter freundii</i> (93)	ritipenem	0.39-50	1.56	6.25
	cefaclor	1.56->100	100	>100
	cefixime	0.10->100	1.56	>100
	cefteram	0.20->100	0.78	100
<i>Enterobacter cloacae</i> (104)	ritipenem	0.39-25	3.13	6.25
	cefaclor	0.78->100	>100	>100
	cefixime	0.025->100	1.56	>100
	cefteram	0.05->100	0.78	>100
<i>Serratia marcescens</i> (108)	ritipenem	1.56->100	6.25	50
	cefaclor	100->100	>100	>100
	cefixime	0.10->100	3.13	>100
	cefteram	0.78->100	12.5	>100
<i>Morganella morganii</i> (68)	ritipenem	1.56-6.25	3.13	3.13
	cefaclor	100->100	>100	>100
	cefixime	0.10->100	0.78	50
	cefteram	0.05-100	0.10	25

a : The inoculum size was 10^6 CFU/ml

b : Anaerobes

Continued on following page

Table 3-2. Antibacterial activity of ritipenem against clinical isolates

Test organism* (No. of strains)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Providencia rettgeri</i> (49)	ritipenem	0.78-3.13	1.56	1.56
	cefaclor	0.20->100	100	>100
	cefixime	$\leq 0.006-3.13$	≤ 0.006	0.05
	cefteram	$\leq 0.006-25$	0.05	0.39
<i>Providencia stuartii</i> (75)	ritipenem	0.39-3.13	0.78	1.56
	cefaclor	0.39->100	25	>100
	cefixime	$\leq 0.006-0.78$	0.012	0.10
	cefteram	0.012-6.25	0.20	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> (102)	ritipenem	0.39-3.13	1.56	1.56
	cefaclor	0.78-25	1.56	3.13
	cefixime	$\leq 0.006-0.025$	0.012	0.012
	cefteram	0.025-0.39	0.05	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> (93)	ritipenem	0.39-3.13	1.56	1.56
	cefaclor	>100	>100	>100
	cefixime	$\leq 0.006-3.13$	0.012	0.05
	cefteram	0.025->100	0.20	0.078
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (47)	ritipenem	0.20-1.56	0.39	0.78
	cefaclor	0.20-12.5	1.56	6.25
	cefixime	$\leq 0.006-0.10$	≤ 0.006	0.012
	cefteram	$\leq 0.006-0.39$	0.025	0.05
<i>Haemophilus influenzae</i> (92)	ritipenem	0.10-6.25	0.78	0.78
	cefaclor	0.39-25	1.56	6.25
	cefixime	$\leq 0.006-0.78$	0.025	0.05
	cefteram	$\leq 0.006-0.78$	0.012	0.05
<i>Moraxella catarrhalis</i> (41)	ritipenem	0.025-0.39	0.20	0.39
	cefaclor	0.20-3.13	0.78	1.56
	cefixime	0.025-0.39	0.10	0.39
	cefteram	0.05-1.56	0.20	0.78
<i>Burkholderia (P) cepacia</i> (43)	ritipenem	0.78-12.5	12.5	12.5
	cefaclor	50->100	>100	>100
	cefixime	0.39-12.5	0.78	1.56
	cefteram	1.56-50	6.25	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (108)	ritipenem	12.5->100	>100	>100
	cefaclor	>100	>100	>100
	cefixime	25->100	>100	>100
	cefteram	50->100	>100	>100
<i>Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia</i> (39)	ritipenem	50->100	>100	>100
	cefaclor	>100	>100	>100
	cefixime	25->100	>100	>100
	cefteram	50->100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (37)	ritipenem	0.39-6.25	1.56	3.13
	cefaclor	6.25->100	100	>100
	cefixime	0.78->100	12.5	100
	cefteram	12.5->100	50	100
<i>Clostridium perfringens</i> ^b (16)	ritipenem	0.20-1.56	0.39	0.39
	cefaclor	1.56->100	1.56	25
	cefixime	1.56->100	6.25	>100
	cefteram	0.78->100	3.13	50
<i>Clostridium difficile</i> ^b (19)	ritipenem	3.13-6.25	3.13	6.25
	cefaclor	25-100	50	100
	cefixime	>100	>100	>100
	cefteram	25-100	50	100
<i>Bacteroides fragilis</i> ^b (32)	ritipenem	$\leq 0.006-12.5$	0.05	0.78
	cefaclor	100->100	>100	>100
	cefixime	3.13->100	25	>100
	cefteram	6.25->100	50	>100

a : The inoculum size was 10⁶ CFU/ml b : Anaerobes

CFTM とほぼ同等の抗菌力 (MIC_{90} : $0.39 \mu\text{g/ml}$) を示した。 *Burkholderia cepacia* に対する抗菌力は、CFIX が最も強く次に CFTM および RIPM であった。 *P. aeruginosa* および *S. (X.) maltophilia* に対する RIPM の抗菌力は対照薬剤同様弱かった。 *A. calcoaceticus* に対する RIPM の MIC_{90} 値は、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ であったが対照薬剤の MIC_{90} 値はいずれも $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ であった。 *Clostridium* spp. に対する RIPM の抗菌力は CCL, CFIX および CFTM より 16~256 倍強かった。 RIPM は、 *B. fragilis* に対して $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全株の発育を阻止したが、本菌に対する対照薬剤の MIC_{90} 値は $> 100 \mu\text{g/ml}$ であった。

3. 殺菌効果

(1) MIC/MBC

MSSA 11 株, *E. faecalis* 10 株, *E. coli* 12 株および *K. pneumoniae* 11 株の臨床分離株に対する RIPM の MIC/MBC を CCL, CFIX および CFTM と比較検討した結果を Table 4 に示す。

MSSA に対する RIPM の MBC_{90} 値は $0.78 \mu\text{g/ml}$ であり、 MIC_{90} 値よりも 4 倍高かった。 *E. coli* および *K. pneumoniae* に対する RIPM の MBC_{90} 値は MIC_{90} 値と一致し、CFIX および CFTM と同様に強い殺菌力を示した。

(2) 増殖曲線におよぼす影響

S. aureus FDA 209P JC-1 および *E. coli* K12 C600 の増殖曲線におよぼす RIPM の影響について検討した結果を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。 *S. aureus* FDA 209P JC-1 に対して RIPM は 1 MIC において、作用後 6 時間目まで殺菌的であったが、24 時間目で菌はやや再増殖した。本剤の 2, 4 MIC 濃度では 24 時間目

で菌の著しい増殖は阻止されていた。 *E. coli* K12 C600 に対して RIPM は 1 MIC 濃度で 6 時間目まで殺菌的であったが、24 時間目で菌の再増殖が認められた。2, 4 MIC では作用後 4 時間目で菌の成育は認められなかった。両菌株に対する RIPM の作用は、対照薬剤とほぼ同様に薬剤濃度に応じた殺菌作用が認められた。

4. β -lactamase に対する作用

(1) β -lactamase 産生菌に対する抗菌力

プラスミド由来 penicillinase 産生 12 株, 染色体性 penicillinase 産生 1 株, cephalosporinase 産生 20 株, oxyiminocephalosporinase 産生 6 株に対する RIPM および対照薬剤の抗菌力を Table 5 に示す。

RIPM は、 *S. aureus* MS15009 または *E. coli* ML 4901 を宿主とした各種プラスミド保有株に対して親株とほぼ同等の MIC を示した。また、本剤は、 *P. aeruginosa* および *S. (X.) maltophilia* を除く cephalosporinase, oxyiminocephalosporinase 産生株に対して、明らかに CCL よりも強い抗菌力を示した。中でも本剤は、CFIX および CFTM に耐性を示した *C. freundii* および *E. cloacae* に対して優れた抗菌力を示した。しかし、 *Providencia rettgeri* に対する RIPM の抗菌力は、CFIX より 64~128 倍、CFTM より 4~16 倍劣っていた。

(2) β -lactamase 産生脱抑制変異株に対する抗菌力

C. freundii 由来の β -lactamase 産生脱抑制変異株 (Derepressed mutant, Der mutant) 3 株とそれらの親株および *E. cloacae* 由来の Der mutant 2 株とそれらの親株に対する RIPM および対照薬剤の抗菌力を Table 6 に示す。

Cephalosporinase を高度に産生する *C. freundii*

Table 4. Bactericidal activity (MIC/MBC) of ritipenem against clinical isolates

Test organism (No. of strains)	Antibiotics	MIC_{50}/MBC_{50}	MIC_{90}/MBC_{90}
<i>Staphylococcus aureus</i> (11)	ritipenem	0.20/0.39	0.20/0.78
	cefaclor	6.25/ ≥ 100	12.5/ ≥ 100
	cefteram	25/50	25/100
<i>Enterococcus faecalis</i> (10)	ritipenem	6.25/ ≥ 100	6.25/ ≥ 100
	cefaclor	100/ > 100	100/ > 100
	cefteram	> 100 / > 100	> 100 / > 100
<i>Escherichia coli</i> (12)	ritipenem	1.56/1.56	1.56/1.56
	cefaclor	25/25	50/ ≥ 100
	cefixime	0.39/0.39	0.78/0.78
	cefteram	1.56/1.56	3.13/3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (11)	ritipenem	1.56/1.56	1.56/1.56
	cefaclor	6.25/12.5	25/ ≥ 100
	cefixime	0.20/0.39	0.39/0.39
	cefteram	0.78/0.78	0.78/1.56

Broth dilution method

($\mu\text{g/ml}$)

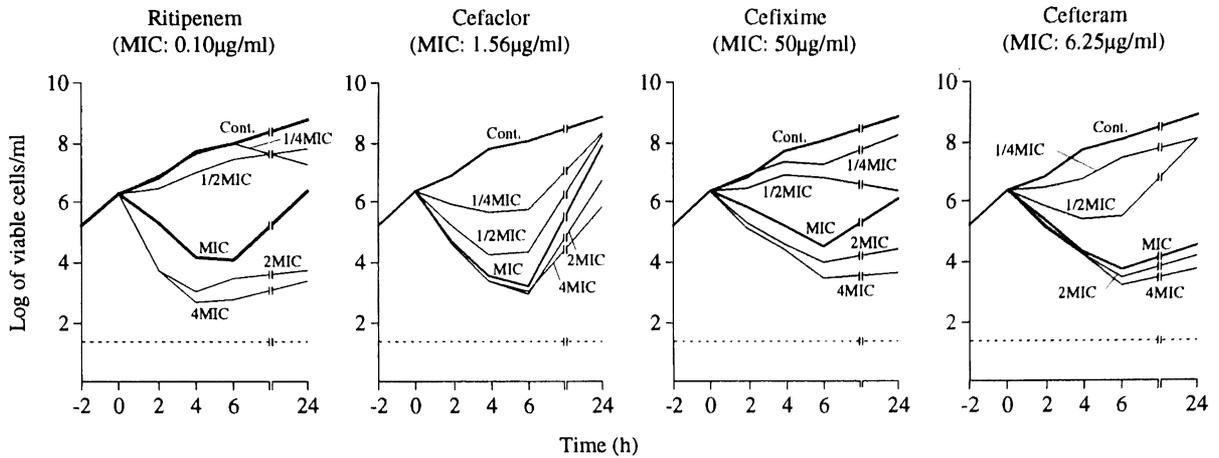


Fig. 2 Bactericidal activity of ritipenem against *Staphylococcus aureus* FDA 209P JC-1

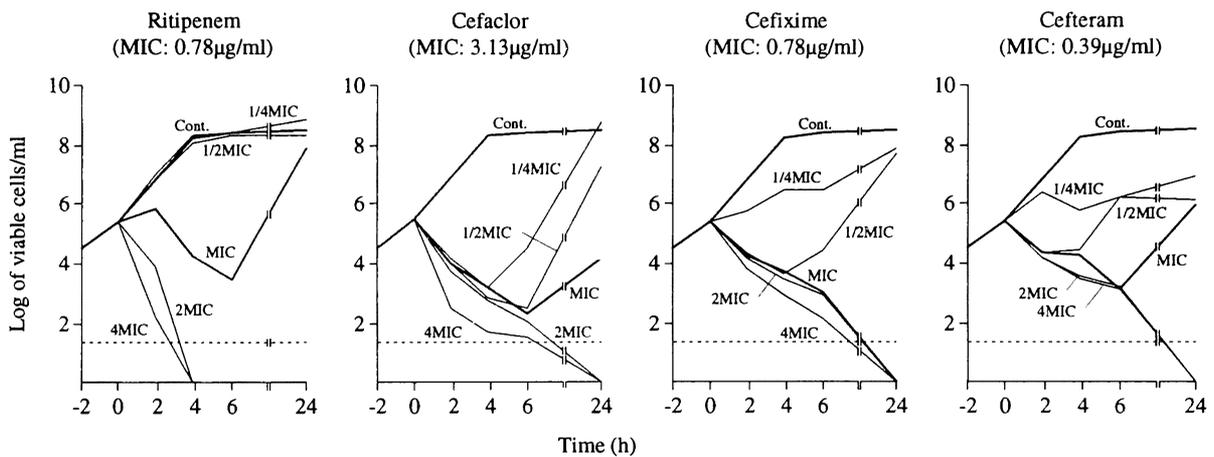


Fig. 3 Bactericidal activity of ritipenem against *Escherichia coli* K12 C600

Table 5 - 1. Antibacterial activity of ritipenem against β -lactamase-producing strains

1) Penicillinase-producing strains

β -lactamase-producing bacteria ^a	MIC (μ g/ml)			
	ritipenem	cefaclor	cefixime	cefteram
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009 ^b	0.025	0.20	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/pI258	0.05	3.13	12.5	3.13
<i>Escherichia coli</i> ML4901 ^b	0.39	1.56	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms212	0.39	3.13	0.78	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms213	0.39	1.56	0.39	0.78
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rte16	0.39	1.56	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms149	0.39	1.56	0.20	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/TEM-1	0.78	1.56	0.20	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/TEM-2	0.78	12.5	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/OXA-1	0.78	1.56	0.39	0.78
<i>Escherichia coli</i> ML4901/OXA-2	0.78	12.5	0.39	0.78
<i>Escherichia coli</i> ML4901/PSE-1	0.39	1.56	0.39	0.20
<i>Escherichia coli</i> ML4901/PSE-3	0.78	1.56	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> ML4901/SHV-1	0.39	6.25	0.39	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GN69	0.78	0.78	0.05	0.20

a : The inoculum size was 10^6 CFU/ml

b : β -Lactamase non-producing strains

Table 5 - 2. Antibacterial activity of ritipenem against β -lactamase-producing strains

2) Cephalosporinase-producing strains

β -lactamase-producing bacteria*	MIC (μ g/ml)			
	ritipenem	cefaclor	cefixime	cefteram
<i>Escherichia coli</i> GN5482	1.56	>100	25	0.78
<i>Escherichia coli</i> GN14929	0.39	6.25	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> GN14930	0.78	100	25	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> GN346	3.13	>100	>100	100
<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	12.5	>100	>100	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> GN5797	3.13	>100	6.25	3.13
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7467	1.56	>100	50	25
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	1.56	>100	50	25
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	6.25	>100	25	50
<i>Serratia marcescens</i> GN14931	6.25	>100	1.56	3.13
<i>Serratia marcescens</i> GN14932	1.56	>100	6.25	3.13
<i>Morganella morganii</i> GN5307	3.13	>100	0.20	0.10
<i>Morganella morganii</i> GN5375	3.13	>100	0.78	0.10
<i>Morganella morganii</i> GN5407	3.13	>100	0.78	0.20
<i>Providencia rettgeri</i> GN4430	0.78	100	\leq 0.006	0.05
<i>Providencia rettgeri</i> GN4762	1.56	>100	0.025	0.39
<i>Providencia rettgeri</i> GN5284	0.78	>100	\leq 0.006	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN918	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10367	>100	>100	>100	>100

a : The inoculum size was 10^6 CFU/mlTable 5 - 3. Antibacterial activity of ritipenem against β -lactamase-producing strains

3) Oxyiminocephalosporinase-producing strains

β -lactamase-producing bacteria*	MIC (μ g/ml)			
	ritipenem	cefaclor	cefixime	cefteram
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	0.78	>100	0.10	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> GN76	3.13	>100	0.012	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> GN4413	0.78	>100	1.56	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	0.20	>100	0.39	25
<i>Burkholderia cepacia</i> GN11164	0.78	>100	0.39	3.13
<i>Stenotrophomonas(X.) maltophilia</i> GN12873	>100	>100	>100	>100

a : The inoculum size was 10^6 CFU/mlTable 6. Antibacterial activity of ritipenem against β -lactamase-derepressed mutants

Organism	β -lactamase activity* (units/mg of protein)	MIC (μ g/ml)			
		ritipenem	cefaclor	cefixime	cefteram
<i>Citrobacter freundii</i> GN14289	0.016	1.56	50	0.78	0.39
<i>Citrobacter freundii</i> GN14289-1 ^b	1.12	3.13	>100	>100	>100
<i>Citrobacter freundii</i> GN14300	0.024	1.56	100	50	3.13
<i>Citrobacter freundii</i> GN14300-1 ^b	0.53	3.13	>100	>100	>100
<i>Citrobacter freundii</i> GN14312	0.17	3.13	50	1.56	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> GN14312-1 ^b	3.9	3.13	>100	>100	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> GN10685	0.098	3.13	>100	>100	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> GN10685-1 ^b	0.92	3.13	>100	>100	50
<i>Enterobacter cloacae</i> GN10675	0.14	1.56	>100	>100	25
<i>Enterobacter cloacae</i> GN10675-1 ^b	18	1.56	>100	>100	>100

a: Enzyme activity was determined by a spectrophotometric assay by using cephalothin (100μ M) as a substrate; 1 unit = 1μ mole/min. Data are from a previous report⁽¹¹⁾b: Derepressed mutants of β -lactamase production.

Der mutant 3 株および *E. cloacae* Der mutant 2 株の MIC 値をそれぞれの親株の MIC と比較すると RIPM はほぼ同等であったが、CFIX および CFTM では Der mutant の MIC が親株の MIC より著しく上昇した。

(3) β -lactamase に対する安定性

RIPM および対照薬剤の β -lactamase による相対加水分解速度を Table 7 に示す。

RIPM は、各種 penicillinase, cephalosporinase および oxyiminocephalosporinase に対して極めて安定であった。ただし、RIPM は、*S. (X.) maltophilia* 産生 (L-1) oxyiminocephalosporinase により対照薬剤と同様に加水分解された。

(4) β -lactamase に対する親和性

各種 β -lactamase に対する RIPM と対照薬剤の

Table 7. Stability of ritipenem to various β -lactamases

Enzyme source	Relative rate of hydrolysis ^a			
	ritipenem	cefactor	cefixime	cefteram
Penicillinase				
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms212 (Type I)	<0.1	4.5	<0.1	<0.1
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms213 (Type II)	0.2	21	0.4	18
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rte16 (Type III)	<0.1	31	0.1	0.1
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms149 (Type IV)	<0.1	0.4	<0.1	<0.1
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/pl258 (Type V)	<0.1	2.8	<0.1	<0.1
Cephalosporinase				
<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	<0.1	84	<0.1	0.1
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	<0.1	90	<0.1	0.2
<i>Morganella morganii</i> GN5407	<0.1	190	1.3	1.2
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	<0.1	45	0.8	1.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	<0.1	95	0.8	1.4
Oxyiminocephalosporinase				
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	<0.1	67	0.1	10
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	<0.1	420	2.1	19
<i>Stenotrophomonas (X.) maltophilia</i> GN12873 (L-2)	<0.1	36	1.2	53
<i>Stenotrophomonas (X.) maltophilia</i> GN12873 (L-1)	440	210	50	330

a : Relative to the hydrolysis rate for cephaloridine (cephalosporinase and oxyiminocephalosporinase) or penicillin G (penicillinase), which was set at 100.

Table 8. Kinetic parameters of ritipenem for β -lactamases

Enzyme source	Antibiotics	Relative Vmax ^a	Km (μ M)
Penicillinase			
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms212 (Type I)	ritipenem	- ^b	>200 ^c
	cefixime	- ^b	>200 ^c
	cefteram	0.095	>200
<i>Escherichia coli</i> ML4901/Rms149 (Type IV)	ritipenem	- ^b	>200 ^c
	cefixime	- ^b	>200 ^c
	cefteram	0.015	>200
Cephalosporinase			
<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	ritipenem	0.013	4.5
	cefixime	- ^b	0.048 ^c
	cefteram	0.031	0.34
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	ritipenem	0.0085	1.7
	cefixime	0.021	0.40
	cefteram	0.052	1.7
Oxyiminocephalosporinase			
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	ritipenem	- ^o	>200 ^c
	cefixime	0.16	>200
	cefteram	14	>200
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	ritipenem	0.0037	6.5
	cefixime	3.5	>200
	cefteram	48	>200

a: Expressed as a percentage of the Vmax for cephaloridine (cephalosporinase and oxyiminocephalosporinase) or penicillin G (penicillinase), which was set at 100.

b: Not determined c: Ki (μ M) value

kinetic parameter を Table 8 に示す。また、Km および Vmax の測定できない薬剤と酵素の場合は、PCG または CER を基質として測定した阻害定数 (Ki) を示す。

RIPM の penicillinase I, IV型および *K. oxytoca* GN10650 産生 oxyiminocephalosporinase に対する親和性は低かった。RIPM の *C. freundii* GN7391 および *E. cloacae* GN7471 産生 cephalosporinase に対する親和性は高く、本剤の相対 Vmax 値は極めて小さかった。さらに、RIPM の Vmax/Km 値を CFIX (*C. freundii* cephalosporinase を除く) および CFTM と比較すると 6~32 倍小さく、CFIX および CFTM より加水分解されにくい傾向を示した。

Ⅲ. 考 察

RIPM-AC は、新規経口ペネム系抗生物質である。今回、本薬の活性本体である RIPM の *in vitro* 抗菌力、殺菌力および β -lactamase に対する安定性について CCL, CFIX および CFTM と比較検討した。RIPM は、グラム陽性菌および *P. aeruginosa* を除くグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。RIPM は、グラム陽性菌のうち MSSA, *S. epidermidis* および *E. faecalis*, 嫌気性菌では *Clostridium* spp. および *B. fragilis* 等の菌種に対して CCL, CFIX および CFTM より明らかに強い抗菌力を示した。また、RIPM はグラム陰性菌のうち染色体性に β -lactamase を産生する菌 (*P. aeruginosa* および *S. (X.) maltophilia* を除く) に対して良好な抗菌力を示した。その要因の一つとして、本剤の各種 β -lactamase (*S. (X.) maltophilia* 産生 L-1 β -lactamase を除く) に対する安定性が極めて優れていることによると考えられた。特に、*C. freundii* および *E. cloacae* は cephalosporinase を多量に産生することにより CFIX や CFTM に高度耐性を示すが、それらの菌に対する RIPM の抗菌力は優れていた。RIPM, CFIX および CFTM は *C. freundii* GN7391 および *E. cloacae* GN7471 産生 cephalosporinase に対して親和性が高く、相対 Vmax は小さかった。RIPM の Vmax/Km 値を CFIX および CFTM のそれらと比較すると RIPM の値が最も小さくなり、CFIX および CFTM より加水分解されにくい傾向を示した。このことから RIPM は、cephalosporinase に対して不活化作用を有することが推察された。このことは館田等の報告から明らかになった⁹⁾。

RIPM の cephalosporinase 高産生菌に対する抗菌力、および cephalosporinase に対する特徴はすでに報告されている CP-70,429 および fropenem (SY5555) の結果とよく一致した^{10) 11)}。

RIPM は、MIC/MBC および菌の増殖曲線におよぼ

す本剤の影響等の結果から、優れた殺菌作用を有すると考えられた。

RIPM は嫌気性菌を含むグラム陽性菌、グラム陰性菌に対して優れた抗菌力、殺菌力を有し、さらに各種 β -lactamase に対して安定であることから臨床上的有用性が期待される。

文 献

- 1) Mitsuhashi S, Takagi S : *In vitro* antibacterial activity of FCE22101 and its stability to β -lactamases. p.13~39. In S. Mitsuhashi and G. Franceschi (ed.), Penem antibiotics, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and Springer-Verlag, Heidelberg, 1991
- 2) 三橋 進, 井上松久 : MIC 測定用標準菌株. *Chemotherapy* 27 : 561, 1979
- 3) 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
- 4) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会 : 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27 : 559~560, 1979
- 5) Mitsuhashi S, Inoue M : Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. β -lactam antibiotics (Mitsuhashi S., ed), p.41~56, Japan Sci Soc Press, 1981
- 6) Waley S G : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139 : 780~789, 1974
- 7) Lineweaver H, Burk D : The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56 : 658~663, 1934
- 8) Dixon M : The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55 : 170~171, 1953
- 9) 館田映子, 浅田和美, 平松啓一, 横田 健 : Ritipenem の細菌学的検討, 日本化学療法学会雑誌 43 (S-3) : 21~32, 1995
- 10) Minamimura M, Taniyama Y, Inoue E, Mitsuhashi S : *In vitro* antibacterial activity and β -lactamase stability of CP-70, 429, a new penem antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 37 : 1547~1551, 1993
- 11) Inoue E, Mitsuhashi S : *In vitro* antibacterial activity and β -lactamase stability of SY5555, a new oral penem antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 38 : 1974~1979, 1994

In vitro antibacterial activities of ritipenem acoxil,
a novel oral penem antibiotic

Eiko Inoue and Susumu Mitsuhashi
Episome Institute

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

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) is a new orally active penem antibiotic. The *in vitro* antibacterial activities of its active form, ritipenem (RIPM), were compared with those of cefaclor (CCL), cefixime (CFIX), and ceftamandole (CFTM). The results were as follows.

1. RIPM had a broad spectrum of antibacterial activity and was active against both aerobic and anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria. RIPM showed more potent activity than CCL, CFIX, and CFTM against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Clostridium* spp., and *Bacteroides fragilis*.

2. RIPM showed potent bactericidal activity (MIC/MBC) against gram-positive and gram-negative clinical isolates. Time-kill studies against *S. aureus* and *E. coli* showed potent bactericidal activity of RIPM at concentrations above the MIC level.

3. RIPM was found to possess stronger activity than CCL against β -lactamase-producing strains except *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas(Xanthomonas)maltophilia*. In particular, RIPM was more active than CFIX and CFTM against cephalosporinase-producing strains of *C. freundii* and *E. cloacae*.

4. RIPM was stable to various types of β -lactamases except for L-1 enzyme from *S.(X.) maltophilia*. The enzymes from *C. freundii* GN7391 and *E. cloacae* GN7471 strains showed a high affinity for and slow hydrolysis of RIPM.