

新ペネム系経口化学療法剤 ritipenem acoxil の抗嫌気性菌作用 およびマウス盲腸内細菌叢への影響

渡辺邦友・加藤直樹・田中香お里

加藤はる・上野一恵

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

経口化学療法剤である ritipenem acoxil (RIPM-AC) の活性体である ritipenem (RIPM) の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌力を参考菌株 59 菌種 66 株および臨床分離株 294 株を用いて検討した。

RIPM は β -lactamase 産生株を多く含む *Bacteroides fragilis* および *Prevotella bivia* など臨床細菌学的に重要な嫌気性グラム陰性桿菌に優れた抗菌力を示した。また, *Peptostreptococcus* spp. に対しても強い活性を有し, 特に *Peptostreptococcus anaerobius* に対して優れていた。

本剤の *B. fragilis* GAI 5562 に対する抗菌作用は 1/2 MIC 以上の濃度で殺菌的であった。この濃度で *B. fragilis* はフィラメント形成をきたした。本剤は *B. fragilis* GAI 10150 由来の β -lactamase に極めて安定であった。しかし, carbapenem に耐性を示す *B. fragilis* GAI 30144 の β -lactamase には容易に加水分解された。教室で全国レベルで収集した imipenem 耐性菌 (MIC ; 6.25 μ g/ml 以上) に対する抗菌作用は弱かった。

RIPM の *Clostridium difficile* GAI 10029 に対する MIC は 6.25 μ g/ml であった。また RIPM-AC の 1 日 1 回 100 mg/kg の 5 日間の経口投与により, 投与終了翌日の検査で, 100% のマウスの盲腸内に *C. difficile* の増殖 ($10^5 \sim 10^7$ CFU/g) が観察され, 終了後 7 日目の観察でも 100% のマウスで *C. difficile* が $10^2 \sim 10^3$ CFU/g 程度に分離された。

Key words : ritipenem acoxil, ritipenem, 嫌気性菌, β -lactamase, マウス盲腸内細菌叢

Ritipenem acoxil (RIPM-AC, FC/TA-891) は 1982 年に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) で創製された経口用ペネム系の化学療法剤である。本剤の活性体は ritipenem (RIPM) で, その 3 位カルボン酸に, アセトキシメチル基をエステル結合することにより経口投与が可能になったものである^{1) 2)}。

活性本体の RIPM は各種 β -lactamase に極めて安定とされ, 嫌気性菌を含めたグラム陽性, 陰性菌に優れた抗菌作用を示すことが報告されている¹⁻³⁾。

本研究では施設保存の偏性嫌気性菌の参考菌株および臨床分離株を用いて本薬剤の嫌気性菌に対する抗菌作用を検討するとともに, 嫌気性菌の β -lactamase に対する安定性および本剤のマウス盲腸内細菌叢に対する影響を検討した。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

Table 1 に示す研究室保存の代表参考菌株 (GAI) および Japan Culture Collection (JCC), American Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Type Culture (NCTC), Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen (DSM), Wadsworth Anaerobe Laboratory (WAL) および Virginia Polytechnic Institute (VPI) 由来の参考菌株と当研究室で臨床材料から 1992 年度以降に分離した嫌気性菌を用いた。臨床分離株の同定は, PRASII media (Scott, USA) をもちいる生化学的性状とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析から VPI manual 第 4 版に準じて行った⁴⁾。一部の菌株の同定は Rap ID ANA system (IDS, USA) を用いた数値同定とガスクロマトグラフィーによる代謝産物中の低級脂肪酸の分析結果を基にして行った。これらの菌株は 20% スキムミルクを保護剤として -80°C で保存した。

2. 供試験薬剤

RIPM (ファルミタリア カルロエルバ (現 ファルマシア)) の原末を用いた。対照薬剤として ceftoram pivoxil の活性体 (CFTM, 富山化学), cefixime (CFIX, 藤沢薬品), cefotiam hexetil の活性体 (CTM, 武田薬品), cefaclor (CCL, 塩野義製薬) も用いた。いずれも力価の明らかなものである。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

寒天平板希釈法によって測定した^{5) 6)}。嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムの検討には感受性測定用培地とし

*岐阜県岐阜市司町 40

で5%ヒツジ溶血血液添加 Brucella HK 寒天(極東製薬)を用いた。接種菌液は 10^8 CFU/mlを使用し、その10 μ lを薬剤含有培地にマイクロプランター(佐久間製作所)にて接種した。臨床分離株に対するMIC測定にはGAM寒天培地(日水製薬)を用いた。嫌気性培養はanaerobic glove box(平沢製作所)(N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%)で2日間行った。

4. 臨床分離株に対する抗菌作用

嫌気性グラム陰性桿菌として *Bacteroides fragilis* 78株, imipenem 耐性 *B. fragilis* group 20株, *Bacteroides thetaiotaomicron* 34株, その他の *Bacteroides* spp. 20株, *Prevotella bivia* 41株を用いた。 *Peptostreptococcus magnus* 46株, *Peptostreptococcus anaerobius* 26株, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 18株, *Peptostreptococcus micros* 18株, *Veillonella* spp. 11株を用いた。これらはいずれも1992年以降の分離株である。

5. *B. fragilis* の増殖曲線に及ぼす影響

B. fragilis GAI 5562の18時間培養菌をMICの1/2, 1, 2および4倍の薬剤を含有するGAMブイオンに接種し, 2, 4, 6および24時間培養後の菌数の変動を定量培養方法によって検討した。対照薬剤として, cefixime (CFIX)を用いた。この試験に先立ち, 接種菌量はGAMブイオン1mlあたり 10^5 CFUとなるように設定しGAMブイオンを用いて液体希釈法によりMIC測定を行った。

6. 形態変化

スライドガラス上に薬剤を含むフィルム寒天を準備し, 37°Cで6時間静置培養した *B. fragilis* GAI 5562の菌液の1白金耳量をカバーガラスに塗抹し, これを準備した寒天上にかぶせて検鏡用のプレパラートとした。この寒天を嫌気性グローブボックス内で培養しながら位相差顕微鏡(Nikon)により観察した後, グラム染色標本作製した。対照薬にimipenem (IPM, 万有製薬)を用いた。

7. *B. fragilis* の β -lactamaseに対する安定性

B. fragilis (GAI 10150, および 30144)の β -lactamaseの培養液を8,000 rpm, 15分間の遠心分離により集菌, 続けて0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2回洗浄した。この菌体を0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.0), (GAI 30144の場合はMOPS-KOH緩衝液(pH7.2))に懸濁し, 超音波処理した後, 10,000 rpmで10分間遠心分離し, その上清を粗酵素液とし用いた。 β -lactamase活性は, 板東らの方法により行った⁷⁾。cephaloridine (CER, 塩野義製薬), penicillin-G (PC-G, 明治製薬), cefotaxime (CTX, ヘキスト), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品), cefoxitin (CFX, 万有製薬), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), および

IPMを対照薬剤とした。

8. マウス盲腸内細菌叢への影響

1群5匹のマウス(ICR系, 雄, 20g)を用いた。RIPM-ACの1回投与量は100 mg/kgとし, 1日1回の5日間連続経口投与し, CCLの同量経口投与群と比較した。Imipenem/cilastatin (IPM/CS), CTX, cefotetan (CTT, 山之内製薬)のそれぞれ皮下投与群も対照に加えた。投与終了1日目および7日目にマウス盲腸内の *C. difficile* の菌数を, *C. difficile* の選択培地である Cycloserine-cefoxitin mannitol agar (CCMA) 培地を用いる定量培養法で測定した。定量培養の操作はすべて嫌気チェンバー内で行った。

II. 結 果

1. RIPMの抗菌スペクトル

RIPMのATCC由来の参考菌株を含む主要な嫌気性菌種に対する 10^8 CFU/ml接種でのMIC値をTable 1からTable 5に示した。グラム陰性菌に対して, RIPMは $0.78 \mu\text{g/ml}$ ($\leq 0.025 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$)の濃度で全株の発育を阻止した。比較的弱い抗菌力($0.39 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$)しか示さなかった菌種は, *Fusobacterium varium* ATCC 8501, *Bacteroides distasonis* ATCC 8503, *B. ovatus* ATCC 8483, *Bilophila wadsworthia* WAL 7959のみであり, その他の菌種は全て $0.20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。グラム陽性球菌に対しても $0.20 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で全株の発育を阻止した。グラム陽性桿菌では, *Propionibacterium* spp.に著しく強い抗菌力を示した。*Propionibacterium* 以外では, *Eubacterium*, *Actinomyces*の各々1菌種, *Bifidobacterium*の5菌種, *Lactobacillus*の7菌種の発育阻止に必要な濃度は, $0.10 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあった。芽胞形成菌に対してもすぐれた抗菌力を示し, *Clostridium difficile* GAI 10029の $6.25 \mu\text{g/ml}$ を除くとすべてが, $0.39 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

β -lactamaseを産生し, 各種 β -lactam剤に耐性傾向の強い代表的な *B. fragilis* の5株(GAI 0558, GAI 7955, GAI 10150, GAI 30079, GAI 30144)に対するRIPMのMICをTable 6に示した。GAI 0558, 7955および10150の3株に対しては低いMICを示したが, GAI 30079および30144に対しては抗菌力を示さなかった。全体的として, 対照薬剤よりは顕著に優れた抗菌力であった。

2. 臨床分離株に対する抗菌作用

10^8 CFU/ml接種での成績をTable 7に示した。*B. fragilis* 78株に対し, RIPMは $0.10 \mu\text{g/ml}$, $0.20 \mu\text{g/ml}$ のMIC₅₀およびMIC₉₀値を示し, 対照薬剤のいずれよりも顕著に優れた抗菌力を示した。又imipenem耐性の *B. fragilis* group に対するMIC₅₀値は6.25

Table 1. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against anaerobic gram-negative rods and cocci

Organism	Inoculum size : 10 ⁶ CFU/ml				
	MIC (μg/ml)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
<i>Bacteroides</i>					
<i>B. fragilis</i> GAI 5562	0.05	6.25	12.5	25	100
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	0.05	12.5	25	50	200
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	0.05	6.25	12.5	50	200
<i>B. vulgatus</i> ATCC 8482	0.05	1.56	0.20	6.25	3.13
<i>B. distasonis</i> ATCC 8503	0.39	0.20	0.10	6.25	6.25
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	0.39	50	100	100	>200
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	0.10	50	50	100	200
<i>B. uniformis</i> ATCC 8492	0.20	6.25	6.25	12.5	12.5
<i>B. eggerthii</i> ATCC 27754	≤0.025	0.20	0.05	0.39	0.78
<i>B. gracilis</i> GAI 10428	0.20	1.56	0.39	1.56	0.78
<i>B. ureolyticus</i> NCTC 10941	0.20	≤0.025	≤0.025	0.39	0.39
<i>Prevotella</i>					
<i>P. melaninogenica</i> GAI 5490	≤0.025	0.10	0.10	0.39	0.39
<i>P. bivia</i> ATCC 29303	≤0.025	50	6.25	>200	50
<i>P. buccae</i> ATCC 33574	0.05	0.78	1.56	1.56	1.56
<i>P. corporis</i> GAI 91000	≤0.025	0.78	0.39	6.25	0.78
<i>P. heparinolytica</i> ATCC 35895	≤0.025	0.39	0.05	0.20	0.39
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	0.05	0.20	0.20	0.20	0.39
<i>P. oralis</i> ATCC 33269	≤0.025	0.39	0.10	0.78	0.39
<i>P. oris</i> ATCC 33573	0.05	0.39	0.10	0.39	0.39
<i>Porphyromonas</i>					
<i>P. asaccharolytica</i> ATCC 25260	≤0.025	≤0.025	≤0.025	0.10	≤0.025
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	≤0.025	≤0.025	≤0.025	0.20	0.10
<i>Fusobacterium</i>					
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	0.05	1.56	0.78	0.39	0.78
<i>F. varium</i> ATCC 8501	0.78	25	6.25	6.25	25
<i>F. necrophorum</i> ATCC 25286	≤0.025	0.10	0.20	0.39	3.13
<i>Desulfomonas pigra</i> DSM 749	0.20	0.78	1.56	6.25	100
<i>Bilophila wadsworthia</i> WAL 7959	0.39	50	6.25	6.25	12.5
<i>Veillonella</i>					
<i>V. parvula</i> ATCC 10790	0.10	0.39	0.78	0.20	0.10
<i>V. atypica</i> ATCC 17748	0.10	0.39	0.78	0.39	0.10

Table 2. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against anaerobic gram-positive cocci.

Organism	Inoculum size : 10 ⁶ CFU/ml				
	MIC (μg/ml)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
<i>Peptostreptococcus</i>					
<i>P. anaerobius</i> ATCC 27337	0.10	0.20	3.13	0.78	0.39
<i>P. asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.05	0.39	0.78	0.78	1.56
<i>P. indolicus</i> GAI 0915	0.05	≤0.025	≤0.025	0.20	0.05
<i>P. magnus</i> ATCC 29328	0.20	1.56	25	3.13	3.13
<i>P. micros</i> VPI 5464-1	0.05	0.39	0.78	0.39	0.78
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	≤0.025	0.39	3.13	1.56	0.39
<i>Staphylococcus</i>					
<i>S. saccharolyticus</i> ATCC 14953	0.05	1.56	3.13	0.20	0.10
<i>Streptococcus</i>					
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	0.20	0.39	6.25	3.13	3.13
<i>S. intermedius</i> ATCC 27735	0.20	0.20	3.13	1.56	3.13
<i>S. parvulus</i> VPI 0546	0.05	1.56	3.13	1.56	0.78
<i>Gemella morbillorum</i> ATCC 27824	≤0.025	≤0.025	0.20	≤0.025	0.78

Table 3. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against nonspore-forming anaerobic gram-positive rods.

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
Inoculum size : 10^6 CFU/ml					
<i>Propionibacterium</i>					
<i>P. acnes</i> ATCC 11828	≤ 0.025	0.39	1.56	0.78	1.56
<i>P. granulosum</i> ATCC 25564	≤ 0.025	0.39	1.56	0.78	0.39
<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 25559	1.56	100	200	50	25
<i>Actinomyces odontolyticus</i> GAI 91002	0.20	0.39	0.78	0.78	0.39

Table 4. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
Inoculum size : 10^6 CFU/ml					
<i>Bifidobacterium</i>					
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	0.20	0.20	6.25	3.13	0.78
<i>B. bifidum</i> JCM 1255	0.10	0.39	12.5	3.13	1.56
<i>B. breve</i> ATCC 15700	1.56	1.56	200	25	12.5
<i>B. longum</i> ATCC 15707	1.56	1.56	100	12.5	3.13
<i>B. pseudolongum</i> ATCC 25526	0.78	0.20	12.5	6.25	0.39
<i>Lactobacillus</i>					
<i>L. acidophilus</i> JCM 1132	0.39	0.20	3.13	6.25	25
<i>L. brevis</i> subsp. <i>brevis</i> JCM 1059	1.56	25	200	25	100
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM 1134	0.78	3.13	200	3.13	100
<i>L. fermentum</i> JCM 1173	0.39	100	200	12.5	50
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	1.56	0.39	12.5	25	50
<i>L. reuteri</i> JCM 1112	0.78	50	200	25	200
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> JCM 1231	0.39	1.56	12.5	3.13	50

Table 5. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against spore-forming rods.

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
Inoculum size : 10^6 CFU/ml					
<i>Clostridium</i>					
<i>C. difficile</i> GAI 10029	6.25	100	>200	>200	6.25
<i>C. histolyticum</i> ATCC 19401	0.10	0.20	1.56	0.20	0.20
<i>C. sordellii</i> ATCC 9417	≤ 0.025	0.39	0.39	0.78	0.78
<i>C. septicum</i> ATCC 1264	≤ 0.025	6.25	>200	1.56	≤ 0.025
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	0.20	0.78	3.13	0.39	0.39
<i>C. ramosum</i> ATCC 25582	0.39	50	>200	0.78	25

Table 6. Comparative *in vitro* activity of ritipenem and other oral agents against cephem- and imipenem-resistant *B. fragilis*

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	ritipenem	cefteram	cefixime	cefotiam	cefaclor
Inoculum size : 10^6 CFU/ml					
<i>B. fragilis</i> GAI 0558	0.20	>200	>200	>200	>200
<i>B. fragilis</i> GAI 7955	0.39	>200	>200	>200	>200
<i>B. fragilis</i> GAI 10150	0.78	>200	>200	>200	>200
<i>B. fragilis</i> GAI 30079	>200	>200	>200	>200	>200
<i>B. fragilis</i> GAI 30144	>200	>200	>200	>200	>200

Table 7. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates to ritipenem and five reference antimicrobial agents

Organism	Drug	Inoculum size : 10 ⁶ CFU/ml		
		MIC (μg/ml)		
		range	50%	90%
<i>B. fragilis</i> (78)	ritipenem	≤0.025 ~ 1.56	0.10	0.20
	cefteram	6.25 ~ 200<	12.5	200<
	cefixime	6.25 ~ 200<	25	200<
	cefotiam	12.5 ~ 200<	100	200<
	cefaclor	50 ~ 200<	200	200<
imipenem-resistant <i>B. fragilis</i> group (20)	ritipenem	3.13 ~ 200<	6.25	200<
	cefteram	50 ~ 200<	200<	200<
	cefixime	25 ~ 200<	200<	200<
	cefotiam	200 ~ 200<	200<	200<
	cefaclor	200<	200<	200<
<i>B. thetaiotaomicron</i> (34)	ritipenem	0.10 ~ 3.13	0.78	1.56
	cefteram	25 ~ 200<	100	200<
	cefixime	25 ~ 200<	200	200<
	cefotiam	50 ~ 200<	100	200<
	cefaclor	100 ~ 200<	200	200<
other <i>B. fragilis</i> group (20)	ritipenem	0.05 ~ 6.25	0.78	1.56
	cefteram	1.56 ~ 200<	50	200
	cefixime	0.20 ~ 200<	12.5	100
	cefotiam	12.5 ~ 200<	100	200<
	cefaclor	6.25 ~ 200<	100	200<
<i>P. bivia</i> (41)	ritipenem	≤0.025 ~ 0.10	0.05	0.05
	cefteram	0.20 ~ 100	12.5	50
	cefixime	0.05 ~ 50	3.13	12.5
	cefotiam	0.78 ~ 200	100	100
	cefaclor	0.20 ~ 200<	100	200<
<i>P. anaerobius</i> (26)	ritipenem	0.05 ~ 6.25	0.20	3.13
	cefteram	0.10 ~ 12.5	0.39	12.5
	cefixime	1.56 ~ 50	3.13	50
	cefotiam	0.39 ~ 25	1.56	25
	cefaclor	0.39 ~ 50	1.56	50
<i>P. asaccharolyticus</i> (18)	ritipenem	≤0.025 ~ 0.20	≤0.025	0.20
	cefteram	0.20 ~ 3.13	0.39	3.13
	cefixime	0.39 ~ 100	0.78	100
	cefotiam	0.10 ~ 12.5	0.39	12.5
	cefaclor	0.05 ~ 12.5	0.20	6.25
<i>P. magnus</i> (46)	ritipenem	0.10 ~ 1.56	0.20	0.39
	cefteram	0.39 ~ 12.5	3.13	6.25
	cefixime	6.25 ~ 100	25	50
	cefotiam	0.39 ~ 3.13	1.56	3.13
	cefaclor	0.78 ~ 12.5	3.13	6.25
<i>P. micros</i> (18)	ritipenem	≤0.025 ~ 0.10	0.10	0.10
	cefteram	0.20 ~ 1.56	0.39	1.56
	cefixime	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	cefotiam	0.20 ~ 3.13	0.39	1.56
	cefaclor	0.78 ~ 100	3.13	50
<i>Veillonella</i> spp. (11)	ritipenem	0.20 ~ 6.25	1.56	3.13
	cefteram	0.78 ~ 25	12.5	25
	cefixime	0.78 ~ 100	12.5	25
	cefotiam	0.20 ~ 25	3.13	25
	cefaclor	0.20 ~ 12.5	3.13	12.5

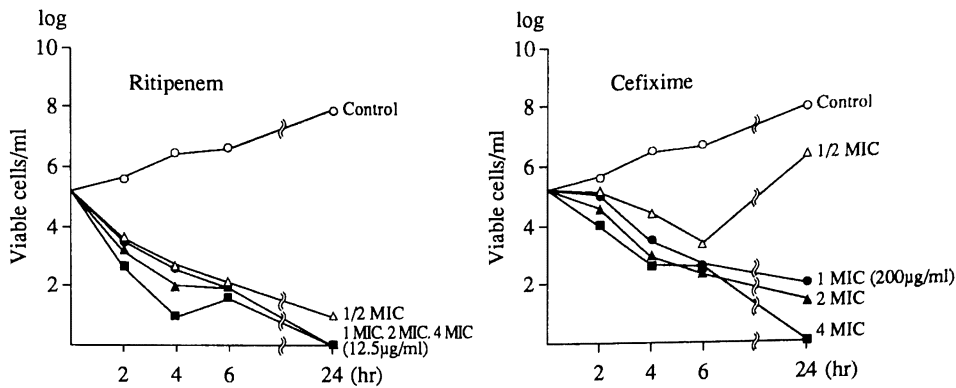


Fig. 1. Killing kinetics of ritipenem against *B. fragilis* GAI 5562

$\mu\text{g/ml}$ と対照薬剤 4 剤の $>200 \mu\text{g/ml}$ より優れた。*B. thetaiotaomicron* 34 株に対してもそれぞれ 0.78, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の MIC_{50} および MIC_{90} 値であり, 上記 2 菌種以外の *B. fragilis* group や *P. bivia* に対しても全く同様の成績であった。嫌気性球菌に対しては, *P. magnus*, *P. asaccharolyticus*, *P. anaerobius*, *P. micros*, *Veillonella* spp. といずれの菌種に対しても, 対照薬剤より優れる成績であった。

3. *B. fragilis* GAI 5562 の増殖曲線に及ぼす影響

B. fragilis GAI 5562 に対する RIPM の寒天希釈法での MIC は $0.05 \mu\text{g/ml}$ と小さかったが, 液体希釈法での MIC は $12.5 \mu\text{g/ml}$ であった。また, CFX の寒天希釈法での MIC は $6.25 \mu\text{g/ml}$, 液体希釈法での MIC は $200 \mu\text{g/ml}$ であった。

B. fragilis GAI 5562 に RIPM および CFX を作用させ, その後の生菌数の変化を Fig. 1 に示した。RIPM は液体希釈法による MIC の 1/2 濃度でも殺菌的で, 24 時間後の再増殖は認められなかった。一方, CFX は 1 MIC 濃度以上では殺菌的であった。しかし, 1/2 MIC 濃度 ($100 \mu\text{g/ml}$) では 6 時間まで殺菌的に作用したが, 24 時間後には再増殖を許した。

4. 形態変化

Fig. 2 に *B. fragilis* GAI 5562 に RIPM-AC の活性体である RIPM を 1/2, 1, 2, 4 MIC 濃度で作用させた場合の菌の形態変化をまとめた。

RIPM によって引き起こされる形態変化を見ると, 1/2 MIC 濃度で著しいフィラメント化が認められた。1 MIC では 1/2 MIC の場合と異なり, フィラメント化した菌体が不規則に染色されていた。2MIC になるとフィラメント化した菌体はやや膨大傾向を示し, 一部には菌体の破裂した像も観察された。4MIC では菌体はほとんど観察されなかった。これらの変化は対照薬剤である IPM とほぼ同様であった。

5. *B. fragilis* の β -lactamase に対する安定性

β -lactam 薬剤に耐性傾向が強いが IPM には感受性の *B. fragilis* GAI 10150 の産生する β -lactamase に対して, CFX, LMOX, IPM と同様極めて安定であった。

一方, IPM にも耐性を示す *B. fragilis* GAI 30144 由来の β -lactamase に対しては, 本薬剤は IPM や LMOX と同程度に加水分解された (Table 8)。

6. マウス盲腸内細菌叢に対する影響

生理食塩水投与の対照群では 5 匹中 5 匹とも盲腸内の *C. difficile* 菌数は検出限界以下 (200CFU/g 未満) であった。RIPM-AC 投与群の投薬終了翌日および 7 日目の 2 点での盲腸内の *C. difficile* の検出状況を見ると 2 点とも 5 匹中 5 匹が陽性で, その菌数は終了翌日で $10^5 \sim 10^7 \text{CFU/g}$, 終了 7 日目 $10^2 \sim 10^3 \text{CFU/g}$ であった。一方, CCL 投与群では, 2 点とも *C. difficile* は全く検出されなかった。

また, 皮下投与ではあったが, IPM/CS の場合は終了翌日に 5 匹中 1 匹に 10^2CFU/g 程度検出された。CTX の場合は終了翌日および 7 日目ともに, また CTT の場合は投与終了 7 日目にのみ *C. difficile* が検出された。RIPM-AC 投与の成績は対照薬剤の中の CTX 皮下投与群の成績と類似した (Table 9)。

III. 考 察

RIPM-AC は fropenem (FRPM, SY-5555, 山之内製薬) と同様ペネム系に属する新しい経口 β -lactam 剤である。本剤の活性本体である RIPM の嫌気性菌に対する試験管内抗菌作用をすでに汎用されている経口の β -lactam 薬剤を対照薬剤として検討した。

RIPM は広い範囲の嫌気性菌菌種に対して極めて強い抗菌力を有し, その力は対照薬剤中最も強い抗菌力を持つと考えられる CFTM より優れていた。

FRPM も嫌気性菌に対して優れた抗菌力を示すことが知られている⁸⁾。同時の比較成績ではないが, RIPM

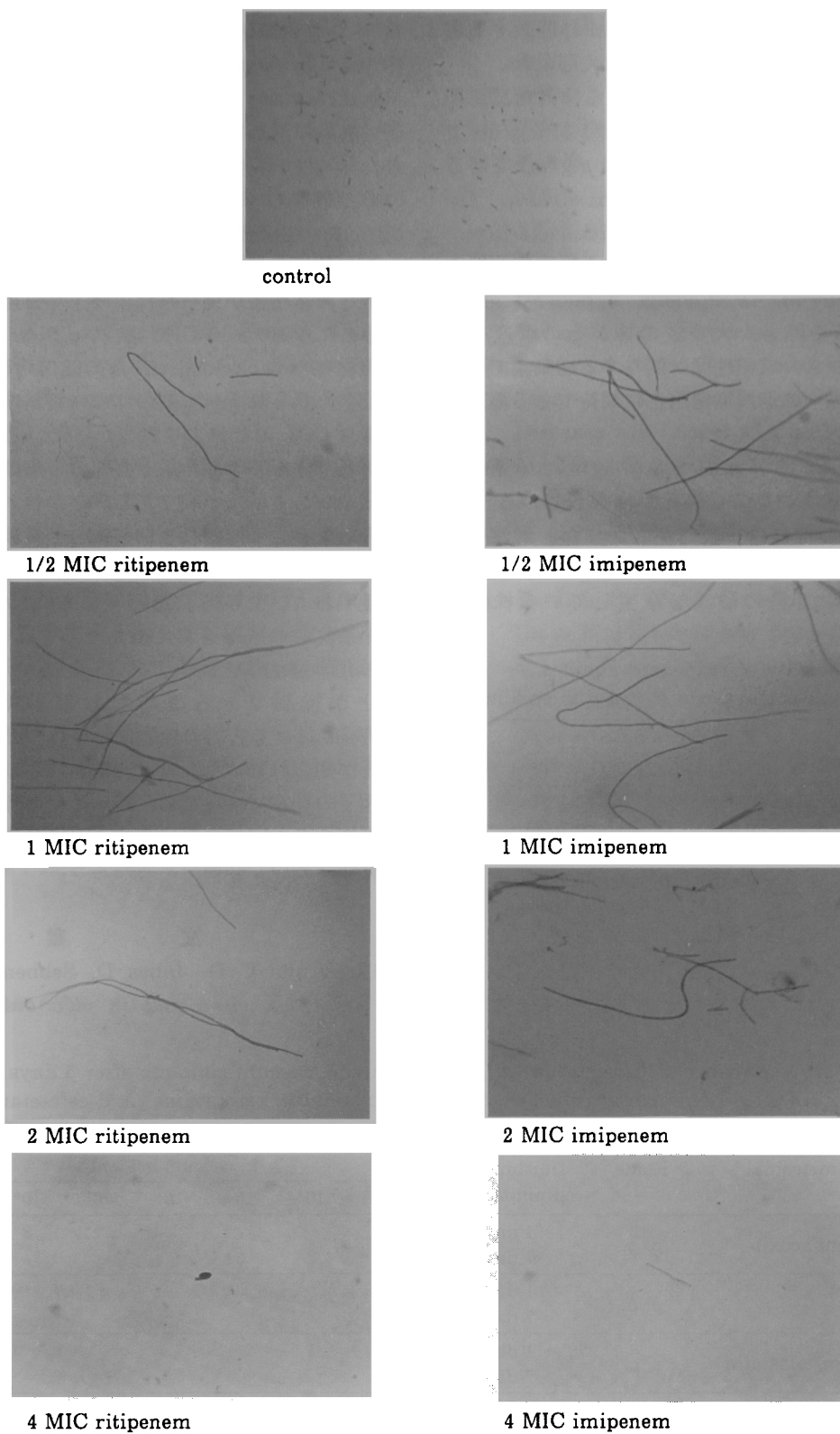


Fig. 2. Morphological alteration of *B. fragilis* GAI 5562 exposed to ritipenem and imipenem for 6 hrs

は多くの嫌気性菌の菌種に対し、FRPMに匹敵するあるいはそれ以上の抗菌力を示すものと考えられた。

RIPM-AC 経口投与の際の人における体内動態、即ち 200 mg 投与の最高血中濃度が $2.10 \pm 1.31 \mu\text{g/ml}$ であり、2 時間後の血中濃度が $0.37 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ であることを考慮すると⁹⁾、*Fusobacterium varium*、*Eubacterium lentum* の参考菌株や、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* の参考菌株のある株、さらに臨床分離の *B. thetaiotaomicron*、*Veillonella* spp.、*P. anaerobius* のある株を除き、大多数の株がその濃度を下回っていることから、嫌気性菌が関与する感染巣での嫌気性菌の近隣組織への進展増殖阻止に期待できる薬剤であろうと推察された。

近年、*B. fragilis* に IPM などのカルバペネム系の薬剤に耐性を示す株が数%ではあるが出現している¹⁰⁾。RIPM はこれらの株には抗菌力が弱かった。耐性株の中には、metallo- β -lactamase である oxyimino-cephalosporinase II 型の酵素を産生している株があ

る¹¹⁾¹²⁾。RIPM はこの酵素に不安定であった。しかし、臨床分離の *B. fragilis* のほとんどの株が産生する serine- β -lactamase である oxyimino-cephalosporinase I 型の酵素に対しては極めて安定であることが明らかにされた。

RIPM-AC のマウス盲腸内細菌叢への影響を *C. difficile* の出現を指標として検討した。

5 日間投与終了翌日の盲腸内容物中に *C. difficile* の顕著な異常増殖が見られた。終了 7 日目でも盲腸内容物 1 g あたり $10^2 \sim 10^3$ CFU の *C. difficile* が検出された。対照とした cephalosporin 系の経口用薬剤である CCL では全く見られず、本剤のマウス盲腸内細菌叢に与える影響は CCL のそれより大きかった。このマウスでの成績がヒト臨床での副作用としての下痢の出現とどのような関連があるかは不明である。しかし、成人ボランティアを対象として行われた初期第一相試験を見ると、下痢症状を呈さなかったものの、6 例中 1 例で RIPM-AC 投与中および投与終了 28 日後に *C. difficile* が分離されている。この成績を考え合わせると¹³⁾、本剤も他の多くの化学療法剤と同様、*C. difficile* の菌交代を起こすことが推測できる薬剤であると考えられる。*C. difficile* による病気の発症には生体側の因子が関係することが知られている。まだ明らかにされていない宿主側の因子の存在によっては、臨床応用の際に下痢が発症する可能性を否定できないので、今後の臨床試験で注意して見守っていく必要があるだろう。

文 献

- 1) Bruna C D, Jabes D, Sebben G, Sanfilippo A : *In vitro* and *in vivo* evaluation of the

Table 8. Stability of ritipenem against β -lactamases from *B. fragilis* strains

Drug	β -lactamase from	
	GAI 10150	GAI 30144
Cephaloridine	0.6875*	0.1175
penicillin G	0.047	0.2096
cefotaxime	0.2283	0.0709
ceftizoxime	0.1156	0.2202
cefoxitin	ND**	0.0086
latamoxef	ND	0.0657
imipenem	ND	0.0679
ritipenem	ND	0.0639

* : $\mu\text{mol/min/mg}$ **ND : not detectable

Table 9. Appearance of *Clostridium difficile* in murine caecum contents after 5 days, dosing of ritipenem acoxil, cefaclor, imipenem/cilastatin, cefotaxime, and cefotetan

Antimicrobial*	Route	Days after finishing the administration	No. of <i>C. difficile</i> (colony forming units/g) in caecum contents						
			<10 ²	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Ritipenem acoxil	p. o.	1 day					1**	3	1
		7 days		2	3				
Cefaclor	p. o.	1 day	5						
		7 days	5						
Imipenem/cilastatin	s. c.	1 day	4	1					
		7 days	5						
Cefotaxime	s. c.	1 day		2	1		1	1	
		7 days		3	2				
Cefotetan	s. c.	1 day	5						
		7 days		2			1	2	
Control (saline)	p. o.	1 day	5						
		7 days	5						

* : All mice ($20 \pm 2\text{g}$) received antimicrobials at a dose of 100 mg/kg once a day for 5 days.

** : Number of mice.

- penem FCE22101 and its orally absorbed ester FCE22891, G. Ital. Chemother., 30 : 125 ~ 130, 1983
- 2) Van der Auwera P, Ernest F, Grenier P, Glupczynski Y, Husson M, Klastersky J : *In vitro* activity of two new carbapenem FCE22101 and CGP 31608 in comparison with imipenem. J. Antimicrobial chemother. 20 : 179~189, 1987
 - 3) Nord C E, Lindmark A, Person I A : Susceptibility of Anaerobic Bacteria to FCE22101, Antimicrobial Agents Chemother. 31 (5) : 831~833, 1987
 - 4) Holdeman L V, Cato E P, Moore W E C : Anaerobe laboratory Manual 4th Edition, The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Virginia 1972
 - 5) 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(3) : 559~560, 1979
 - 6) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
 - 7) 板東香お里, 武藤吉徳, 加藤直樹, 渡辺邦友, 上野一恵 : *Bacteroides fragilis* の Zn 要求性 β -lactamase について. 嫌気性菌感染症研究, 19 : 97~104, 1989
 - 8) 新薬シンポジウム SY-5555, 第 41 回日本化学療法学会総会, 東京, 1993
 - 9) 熊澤浄一, 浦江明憲, 天本敏明, 入江 伸 : 新ペネム系抗生物質, Ritipenem acoxil の臨床第 1 相試験 (第 2 報) (日本化学療法学会雑誌 投稿予定)
 - 10) Bandoh K, Ueno K, Watanabe K, Kato N : Susceptibility Patterns and Resistance to Imipenem in the *Bacteroides* Group Species in Japan : A 4-Year Study. Clinical Infectious Diseases : 16 (Suppl 4) : S382~386, 1993
 - 11) Cuchural G J Jr, Malmay M H, Tally F P : β -lactamase mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. Antimicrobial Agents Chemother 30 : 645~648, 1986
 - 12) Bandoh K, Muto Y, Watanabe K, Kato N, Ueno K : Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrobial Agents Chemother 35 : 371~372, 1991
 - 13) 熊澤浄一, 上野一恵, 和田光一, 渡辺絢子, 水谷 潤 : Ritipenem acoxil のヒト糞便中細菌叢に及ぼす影響 (日本化学療法学会雑誌 投稿予定)

The anti-anaerobe activities of a new penem, ritipenem acoxil, and its effect on murine cecal flora

Kunitomo Watanabe, Naoki Kato, Kaori Tanaka-Bandoh,
Haru Kato and Kazue Ueno
Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine,
40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

The *in vitro* activity of ritipenem (RIPM) was evaluated by using a total of 360 isolates of anaerobic bacteria including reference strains and fresh clinical isolates. RIPM had a broad antibacterial spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria, most of which were inhibited by 1.56 μ g/ml. RIPM was superior to cefaclor and other oral reference compounds.

RIPM was especially active against β -lactamase producing isolates including *Bacteroides fragilis* and *Prevotella bivia*. This drug showed strong activity against *Peptostreptococcus* spp., especially *P. anaerobius*.

RIPM, at or above 1/2 MIC, was bactericidal against *B. fragilis* GAI 5562 and induced their filamentation. This compound was very stable against the representative β -lactamase preparation from *B. fragilis* GAI 10150, but was unstable against that from *B. fragilis* GAI 30144, which was resistant to imipenem. Ritipenem acoxil (RIPM-AC) increased the viable counts of *Clostridium difficile* in the caecum of mice given a daily dose of 100 mg/kg for 5 days orally.