

Carbapenem 系薬の緑膿菌外膜透過性におよぼす塩基性アミノ酸の影響

大屋 哲・増田 修久・坂川 栄子

三共株式会社第二生物研究所*

(平成 9 年 9 月 25 日受付・平成 9 年 12 月 8 日受理)

Panipenem, imipenem などのカルバペネム系薬はセフェム系薬、ペニシリン系薬と比べると緑膿菌に対して MIC に比べてマウスでの感染治療効果が優れていた。この理由を検討した結果、postantibiotic effect や短時間殺菌力などが優れていることのほか、カルバペネム系薬の緑膿菌外膜透過に関する問題が重要と思われた。カルバペネム系薬の抗菌力を低栄養培地中で測定すると、通常 MIC 測定に用いられている Mueller-Hinton 培地中で測定した値より 8~16 倍優れた抗菌力を示した。最少培地に各種培地成分を添加して検討したところ、L-リジン、L-ヒスチジン、L-アルギニンなどの塩基性アミノ酸がカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性を低下させていることが明らかになった。その他のアミノ酸にはこの作用はなかった。塩基性アミノ酸によるカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性の低下は濃度依存であった。imipenem 耐性を指標に *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 株から分離した OprD 欠損変異株では塩基性アミノ酸の影響はまったく見られなかったため、この現象は OprD 透過孔からのカルバペネム系薬と塩基性アミノ酸の拮抗により起こるものと考えられた。このような抗緑膿菌活性におよぼす塩基性アミノ酸の影響はセフェム系薬、ペニシリン系薬、ニューキノロン系薬、アミノグリコシド系薬などの抗菌剤では見られず、カルバペネム系薬に特有の現象であった。¹⁴C-panipenem を用いて菌体への取り込みを検討したところ、panipenem の取り込みは L-リジンにより抑制された。OprD 欠損変異株では L-リジンの取り込みは親株より著しく低く、また L-リジンによる取り込み阻害も見られなかった。ヒト血漿中の遊離塩基性アミノ酸濃度は Mueller-Hinton 培地中よりかなり低い (1/40 程度) ので、カルバペネム系薬は Mueller-Hinton 培地中で測定した MIC より生体内でより優れた抗緑膿菌活性を示すと考えられる。

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, permeability, OprD protein, carbapenem, basic amino acids

緑膿菌は重症あるいは難治性感染症の原因菌としてしばしば検出され、臨床にきわめて重要な菌種と考えられる。また、緑膿菌は多くの抗菌剤に自然耐性を示し、治療上選択できる薬剤の種類が少ない。近年開発されたニューキノロン系薬やカルバペネム系薬は緑膿菌に対する抗菌力が改善され、緑膿菌による感染症の治療に優れた効果を上げるようになった。しかし、これらの薬剤の使用増加に伴って耐性株が出現するようになってきた。カルバペネム系薬耐性株は以前は少なかったが、Quinn ら¹⁾が報告して以来外膜蛋白質 OprD (D2 protein) を欠損するカルバペネム系薬耐性株が報告されるようになってきた。また、カルバペネマーゼ (metallo- β -lactamase) 産生による耐性株の報告も見られるようになった²⁾。Trias^{3,4)} らによれば OprD 蛋白質は塩基性アミノ酸および類似化学構造を有する物質の透過孔を形成しており、塩基性アミノ酸と類似の化学構造を有するカルバペネム系薬はこの透過孔を選択的に透過すると考えられる。したがって、OprD 蛋白質欠損株はカルバペネム系薬に対して耐性化することが明らかになっている⁵⁻⁸⁾。

一方、我々は緑膿菌に対するカルバペネム系薬の *in vivo* 効果がカルバペネム系薬の MIC から期待されるより優れていることをすでに報告した^{9,10)}。マウス全身感染系でのカルバペネム系薬の優れた治療効果はその殺菌力の強さ、セフェム系薬では見られない postantibiotic effect を有することなどが一因であることはすでに明らかになっている¹¹⁾。これらの特徴は緑膿菌のペニシリン結合蛋白質に対するカルバペネム系薬親和性の特異性によってある程度説明できる¹²⁾。我々はこれら以外の理由を種々検討した結果、生体内におけるカルバペネム系薬の緑膿菌外膜透過性は MIC 測定培地中よりはるかに高いと考えられ、OprD 透過孔はカルバペネム系薬耐性だけでなく *in vivo* におけるカルバペネム系薬の優れた抗菌力に大きく寄与していることを明らかにしたので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤及び菌株

Panipenem (PAPM), imipenem (IPM), cefpirome (CPR), meropenem (MEPM) は三共株式会社研究所

で合成した検体を使用した。以下に記す検体は市販品を使用した。cephaloridine (CER, 日本グラクソ), cefsulodin (CFS, 武田薬品工業), cefoperazone (CPZ, 富山化学), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), aztreonam (AZT, エーザイ), piperacillin (PIPC, 三共), norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), gentamicin (GM, エセックス日本)。市販製剤の力価は、表示されている含有量を製剤の全重量で除した値を用いた。菌株は標準株 *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 および本株から IPM 耐性を指標に分離した OprD 欠損変異株 2 株のほか、三共研究所保有株中から無作為に選択した緑膿菌臨床分離株 18 株を使用した。マウス全身感染治療実験に対しては、この目的に適した臨床分離株 *P. aeruginosa* 1008, 1872, 2093 の 3 株を使用した。

2. MIC の測定

日本化学療法学会標準法¹³⁾による Mueller-Hinton agar (MHA; BBL) を用いた寒天平板法のほか、以下に述べる様に寒天平板を作製して同様に測定した。接種菌量は 10^6 CFU/ml に調整した菌液 1 スポット (5 μ l) とした。使用した最少培地 (MM) は液体培地 1 liter 中に 10.5 g K_2HPO_4 , 4.5 g KH_2PO_4 , 1.0 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.36 g sodium gluconate を含有し、アミノ酸の影響を調べる場合には MM に 50 mM のアミノ酸を添加し、1.5 % agar (Difco) で固化した寒天培地 (MMA) を使用した。

液体培地による方法は MHB のほか非働化 (56 $^{\circ}C$, 45 分処理) したマウスおよびヒトの 100 % 血清を培地として用いて微量液体希釈法により測定した。非働化血清を用いた場合には、血清自身の濁度の影響により被検菌の生育の有無が不明瞭で MIC の判定が困難な場合があった。その場合にはマイクロプレートの各ウェル内の生菌数を普通寒天培地 (栄研) を用いた寒天平板希釈法により測定し、肉眼的検出限界 (10^7 CFU/ml) 以下の時に菌の生育なしと判定した。寒天平板法との整合性を考慮し、液体法での MIC 測定においても 100 μ g/ml を基準とした 2 倍段階希釈の薬剤濃度を用いた。接種菌量は 10^4 CFU/ml とした。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による培地中の PAPM の定量

既報¹⁴⁾にしたがって測定した。

4. OprD 蛋白質欠損株の分離

L-broth 中で一夜振盪培養した *P. aeruginosa* PAO 1 を 10 μ g/ml の IPM を含む L-agar に接種し、37 $^{\circ}C$ 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耐性株を得た。これらの株の外膜蛋白を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、OprD 蛋白質欠損株を選

択した。

5. 外膜の調製と SDS-PAGE による分析

L-broth または最少培地中で菌を振盪培養し、対数増殖後期に集菌した ($5,000 \times g$, 20 分)。菌体を *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES; pH 8) で洗浄後、同緩衝液に浮遊して超音波 (超音波工業 UV-40/12 RN10-3B, 10 kHz, 150 W, 3 分) で破碎した。未破碎の菌体を遠心 ($5,000 \times g$, 20 分) により除去した後、上清を $100,000 \times g$ で 1 時間遠心分離して膜画分を得た。この膜画分を HEPES 緩衝液に懸濁し、最終濃度 1 % (w/v) に sodium *N*-lauroyl sarcosinate を添加して 30 $^{\circ}C$, 30 分間静置して細胞質膜を可溶化した。18,000 $\times g$ で 40 分間遠心分離し、沈渣を HEPES 緩衝液に懸濁して外膜画分とした。外膜画分は Laemmli¹⁵⁾ の方法に従って SDS-PAGE を行った。蛋白質の定量は bovine serum albumin (Sigma) を標準として、Lowry 法¹⁶⁾ の方法で行った。

6. β -ラクタマーゼ活性の測定

被検菌の一夜培養液を同じ培地で 1/10 に希釈し、2 時間振盪培養した後、PAPM, IPM または CAZ を 0.2 μ g/ml (最終濃度) 添加し、さらに 2 時間振盪培養を続けた。集菌 ($8,000 \times g$, 10 分) 後、菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に浮遊して超音波破碎し、この遠心上清を粗酵素液とした。 β -lactamase 活性は PAPM または cephaloridine を基質として UV 法¹⁷⁾ で測定した。

7. ^{14}C -PAPM の菌体内への取り込み

MHB で前培養した *P. aeruginosa* PAO 1 および DD-11 の菌液を同培地で 100 倍に希釈し、37 $^{\circ}C$ で振盪培養して対数増殖期の菌液 (550 nm の吸光度: 0.6 ~ 0.7) を得た。この菌液を 50 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し ($1,000 \times g$, 15 分)、同緩衝液に浮遊した (550 nm の吸光度: 0.5)。200 μ l の菌浮遊液 (3.3×10^7 CFU) に等量の ^{14}C -PAPM 溶液 (140 μ g/ml) を添加し、37 $^{\circ}C$ で振盪した。1, 10 および 30 分後に反応液 100 μ l をサンプリングし、メンブランフィルター (Millipore HA, 0.45 μ m) で濾過した。フィルターは 1 ml MES 緩衝液で 10 回洗浄し、乾燥後 10 ml のシンチレーター (Pico-Fluor 40; Packard Instrument Co.) 中で放射活性を測定した (Aloka scintillation counter)。L-リジンの影響を見るときは反応液に最終濃度 100 mM L-リジンを添加して同様に行った。

8. マウス全身感染モデル

ddY 系雄性マウス 4 週齢 (20 ± 2 g; 日本 SLC) に Trypticase soy broth (BBL) で前培養し毒力に応じ適宜希釈した緑膿菌液 0.2 ml を腹腔内に接種した。感染直後および 4 時間後の 2 回被検薬剤液 0.2 ml を皮下投

与し (1 群 7 匹) 治療した。感染 5 日後のマウスの生存率から Probit 法により 50% 有効濃度 (ED₅₀) および 95% 信頼限界を求め、1 回当たりの投与量 (mg/kg/dose) で示した。

II. 結 果

1. 緑膿菌に対するカルバペネム系薬の抗菌力と感染治療効果

Table 1 には PAMP, IPM のカルバペネム系薬 2 剤と対照薬 CAZ, CFS, CPZ, AZT の緑膿菌株に対する MIC とマウス全身感染系での治療効果 (ED₅₀) を示す。Mueller-Hinton broth (MHB) 中で測定した MIC 値は、CPZ を除けばカルバペネム系薬 2 剤と対照薬の間には大きな違いはなかった。CPZ は 2 株に対する MIC が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、やや抗菌力が弱かったが、それ以外の対照薬はカルバペネム系薬 2 剤と比べると MIC は 4 倍以内の違いであった。一方、これらの緑膿菌 3 株による感染に対して PAMP, IPM は 0.4~1.3 mg/kg/dose の ED₅₀ を示したが、対照薬の ED₅₀ はいずれもその 10 倍以上の値であった。表中にはマウス非働化血清を液体培地として測定した MIC 値も示した。この場合には、カルバペネム系薬 2 剤の MIC は MHB で求めた値の 1/4~1/16 の値となったが、対照薬はほとんどの場合 MHB で求めた値より大きくなった。

2. カルバペネム系薬の *in vitro* 抗緑膿菌活性におよぼす各種アミノ酸の影響

P. aeruginosa PAO 1 より IPM 耐性株を選択することにより、外膜蛋白質 OprD の欠損変異株を分離した。Fig. 1 は親株および OprD 欠損変異株の外膜蛋白質の電気泳動パターンを示す。変異株 DD-13 および

DD-62 は親株には見られる分子量約 43 kDa の OprD 蛋白質のバンドが欠損しており、外膜蛋白質を過剰に用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った場合にも、OprD に相当するバンドは検出されなかった。また、*P. aeruginosa* PAO は、L-broth 中で培養した場合にも、アミノ酸を含まない最少培地で培養した場合にも OprD 蛋白質の量的な変化は見られなかった。

Table 2 にはカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性におよぼす各種アミノ酸の影響を検討する目的で、親株およびこれらの OprD 欠損変異株に対する PAMP の MIC を各種寒天培地を用いて測定した結果を示す。MHA 中

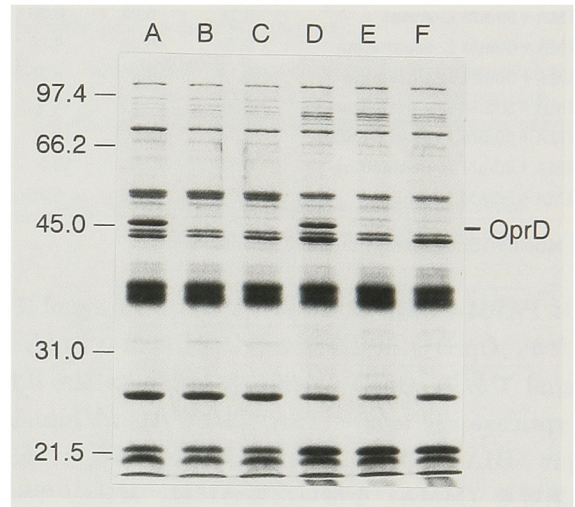


Fig. 1. SDS-PAGE showing the outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (A&D) and its OprD-deficient mutants, DD-62 (B&E) and DD-13 (C&F), grown in L-broth (A, B&C) and in minimal medium (D, E&F).

Table 1. Therapeutic effects of various antibiotics against murine systemic infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their sensitivity in Mueller-Hinton broth (MHB) and heat-inactivated mouse serum

Strain	Challenge dose (CFU/mouse)	Antibiotic	ED ₅₀ (mg/kg/dose)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) in:	
				MHB	mouse serum
1008	1.9×10^6	panipenem	0.4	6.25	0.78
		imipenem	0.5	3.13	0.39
		ceftazidime	16.1	3.13	3.13
		cefsulodin	14.2	3.13	12.5
		cefoperazone	>100	6.25	50
		aztreonam	62.4	3.13	12.5
1872	1.5×10^7	panipenem	0.4	1.56	0.10
		imipenem	1.0	0.78	0.10
		ceftazidime	>100	3.13	3.13
		cefsulodin	>100	3.13	12.5
		cefoperazone	>100	12.5	25
		aztreonam	>100	3.13	6.25
2093	1.5×10^7	panipenem	0.8	3.13	0.39
		imipenem	1.3	1.56	0.39
		ceftazidime	>100	6.25	3.13
		cefoperazone	>100	25	100

Table 2. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and its OprD-deficient mutants to panipenem in various media

Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	PAO 1	DD-13	DD-62
MHA ^{a)}	3.13	25	25
Trypticase soy agar	3.13	12.5	12.5
Heart infusion agar	6.25	25	25
MMA ^{b)}	0.39	6.25	6.25
MMA + 2% casamino acids	3.13	6.25	6.25
MMA + 50mM L-lysine	6.25	6.25	12.5
MMA + 50mM L-histidine	3.13	12.5	12.5
MMA + 50mM L-arginine	6.25	12.5	12.5
MMA + 50mM glycine	0.39	6.25	6.25
MMA + 50mM L-serine	0.78	6.25	6.25
MMA + 50mM L-asparagine	0.78	6.25	6.25
MMA + 50mM L-glutamine	0.78	6.25	6.25
MMA + 50mM L-glutamic acid	0.78	6.25	12.5
MMA + 50mM L-phenylalanine	0.78	12.5	12.5
MMA + 50mM L-methionine	0.78	12.5	12.5
MMA + 50mM L-proline	0.78	6.25	6.25

^{a)} Mueller-Hinton agar, ^{b)} minimal medium agar

では PAMP の MIC は親株に対しては 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であったが, OprD 欠損変異株 2 株に対してはいずれも 25 $\mu\text{g/ml}$ であり, OprD の欠損による耐性化が見られた。Trypticase soy agar (TSA) および Heart infusion agar (HIA) においても同様の傾向が見られた。最少必須培地 (MMA) を用いた場合には, MHA, TSA, HIA などの栄養豊富な培地に比べ PAMP の親株に対する MIC は 1/8~1/16 となった。MHA の 1 成分であり, 各種アミノ酸を含有しているカザミノ酸を MMA に添加した培地中では親株に対する PAMP の MIC は MHA 中と等しい値を示した。

MMA に 50 mM の各種アミノ酸を添加した培地中では, 親株に対する PAMP の MIC は添加したアミノ酸の種類により異なっていた。塩基性アミノ酸である L-リジン, L-ヒスチジンまたは L-アルギニンを添加したときには, 親株に対する PAMP の MIC は MMA のみの培地に比べ 8~16 倍大きな値を示し, MHA で測定した MIC と等しい値となった。一方, 塩基性以外のアミノ酸の添加では, PAMP の親株に対する MIC はほとんど影響を受けなかった。これに対して, OprD 欠損変異株に対する PAMP の MIC は添加したアミノ酸の種類にかかわらず影響を受けなかった。

Fig. 2 には MMA 中の L-リジンの濃度を変化させた場合の PAMP の MIC を親株と OprD 欠損変異株 DD-13 について示す。親株の場合は, 培地中の L-リジン濃度が低下するにつれ PAMP の抗菌力の増強が見られた。一方, OprD 欠損変異株に対しては培地中の L-リジンの濃度が変化しても PAMP の MIC に影響をおよぼさなかった。

Table 3 には抗緑膿菌活性におよぼす L-リジンの影

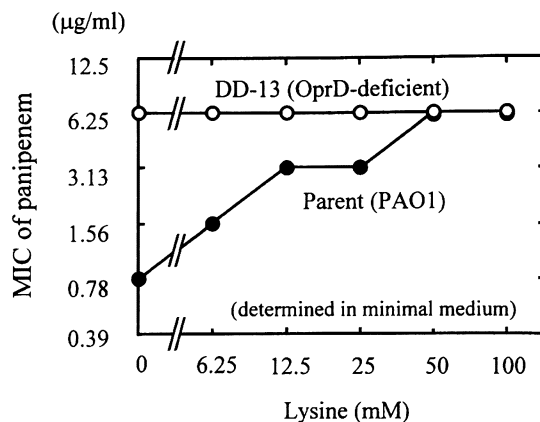


Fig. 2. Effect of L-lysine concentration in MM on the sensitivities of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (○) and its OprD-deficient mutant DD-13 (●) to panipenem.

Table 3. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and its OprD-deficient mutant to various antibiotics

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	PAO 1		DD-13	
	MMA	MMA + Lys	MMA	MMA + Lys
Panipenem	0.39	3.13	6.25	6.25
Imipenem	0.20	1.56	6.25	12.5
Meropenem	0.012	0.20	0.78	1.56
Cefsulodin	0.39	0.39	0.39	0.20
Ceftazidime	0.20	0.20	0.39	0.20
Cefpirome	0.78	0.78	0.78	0.78
Piperacillin	0.39	0.78	0.78	0.78
Norfloracin	0.20	0.20	0.20	0.20
Ofloxacin	0.39	0.39	0.39	0.39
Ciprofloxacin	0.05	0.05	0.05	0.05
Gentamicin	0.78	0.78	1.56	1.56

響をカルバペネム系薬 3 剤およびその他の抗菌剤について検討した結果を示す。IPM, MEPM のカルバペネム系薬では PAMP で見られたのと同様に, 親株では L-リジン添加により MIC の上昇が見られた。しかし, OprD 欠損変異株では親株より MIC は上昇していたが L-リジン添加の影響は見られなかった。一方, セフェム系薬 (CFS, CAZ, CPR), ペニシリン系薬 (PIPC), ニューキノロン系薬 (NFLX, OFLX, CPMX), アミノグリコシド系薬 (GM) ではいずれも L-リジン添加による MIC の影響は見られず, OprD 欠損変異での MIC の上昇も見られなかった。

3. ¹⁴C-PAMP の菌体内への取り込み

Fig. 3 には ¹⁴C 標識 PAMP の緑膿菌菌体内への取り込みを親株および OprD 欠損変異株について検討した結果を示す。親株に対する ¹⁴C-PAMP の取り込み量は L-リジン非存在下では時間の経過にしたがって増加した。この ¹⁴C-PAMP の取り込みは 100 mM L-リジンを培地中に添加することによって著しく抑制された。一

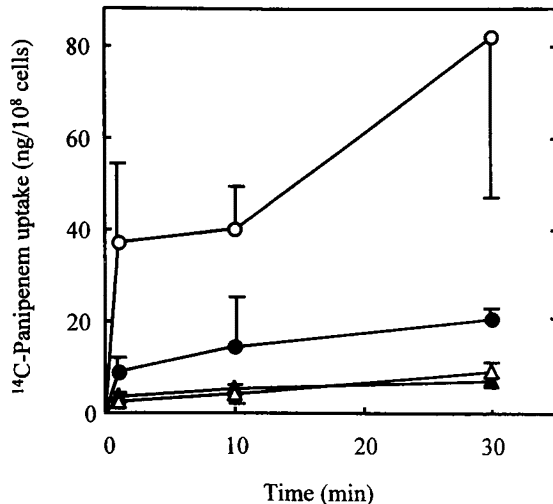


Fig. 3. Uptake of ^{14}C -panipenem in *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (●, ○) and its OprD pro-teiin-deficient mutant, DD-11, (▲, △) in the presence (○, △) or absence (●, ▲) of 100 mM L-lysine. The experiment was run in triplicate and the results are shown as means \pm standard errors.

方, OprD 欠損変異株では, L-リジン非存在下においても ^{14}C -PAPM の菌体内取り込みはわずかであり, 100 mM L-リジン存在下において ^{14}C -PAPM の取り込みはほとんど影響を受けなかった。

4. 非働化ヒト血清中でのカルバペネム系薬の抗菌力

Fig. 4 は非働化ヒト血清を培地として緑膿菌臨床分離株に対する PAPM と IPM の MIC を測定し, MHB で測定した値と比較した結果を示す。検討した 12 株いずれに対しても PAPM, IPM は MHB より非働化血清中で優れた抗緑膿菌活性を示し, MIC は PAPM で 32~250 倍, IPM で 8~62 倍優れていた。

5. OprD 産生, β -ラクタマーゼ産生などにおよぼす L-リジンの影響

培地中に L-リジンが存在しないとき, OprD の産生量が増加してカルバペネム系薬の外膜透過が促進されたためにカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性が増強された可能性を検討する目的で, L-broth および MM で培養した PAO 1 株の OprD 量に変化が見られるか否かを検討した。Fig. 1 (lane D) に示す通り, *P. aeruginosa* PAO 1 の OprD 産生量は, L-リジンを含まない MM 培地で培養した場合にも L-broth で培養した場合 (lane A) と比べて著明な変化は見られなかった。

また, β -ラクタマーゼおよびペニシリン結合蛋白質産生におよぼす L-リジンの影響を検討したが, いずれも顕著な影響は見られなかった。培地中の L-リジンがカルバペネム系薬の安定性に影響をおよぼすか否かを高速液体クロマトグラフィーを用いて検討したが, 大きな影響は見られなかった (いずれもデータ省略)。

III. 考 察

緑膿菌外膜の OprD 蛋白質の欠損がカルバペネム系

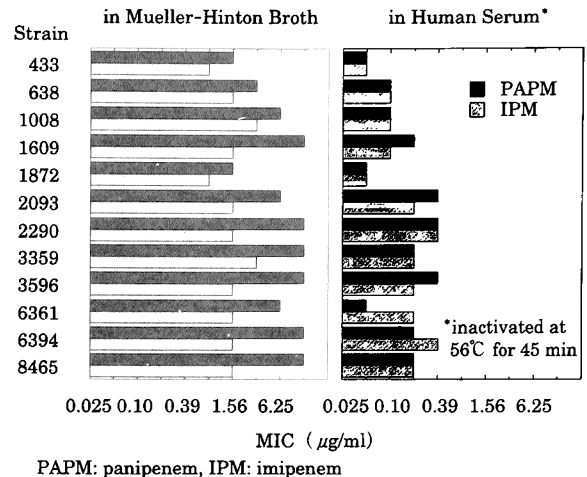


Fig. 4. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to panipenem and imipenem in Mueller-Hinton broth and inactivated human serum.

Table 4. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to panipenem in MMA and MMA containing 50 mM L-Lysine

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Change in MIC (fold)
	MMA	MMA + Lys	
1872	0.20	1.56	8
2287	0.20	1.56	8
2396	0.20	1.56	8
1611	0.20	1.56	8
1594	0.20	3.13	16
2394	0.20	3.13	16
3725	0.20	3.13	16
1601	0.39	6.25	16
1602	0.39	6.25	16
1615	0.39	6.25	16
1599	0.78	6.25	8
1874	0.78	6.25	8
1875	0.78	6.25	8
3498	0.78	12.5	16
1573	3.13	12.5	4
1584	3.13	12.5	4
1583	3.13	12.5	4
2400	6.25	12.5	2

薬の耐性化に関与していることは以前から指摘されていた³⁾。一方, 我々はカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性を検討する過程で OprD の重要性を示すことができた。培地中の塩基性アミノ酸濃度を低下させることにより, カルバペネム系薬の抗緑膿菌活性が増強し, この現象に OprD 蛋白質が関与していることが明らかになった。IPM 耐性緑膿菌臨床分離株では OprD 蛋白質の産生量低下がしばしば観察され, OprD が IPM の透過孔であろうと推定されていた。Trias ら³⁾ は精製 OprD を組み込んだリボソームの swelling assay により, OprD 透過孔を透過できるのは IPM などのカルバペネム系薬のほかカルバペネム系薬と構造的に類似するペネム系薬

Table 5. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and its OprD protein-deficient mutant DD-11 to panipenem, imipenem, and ceftazidime in MHB and biological fluids

Strain	Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		panipenem	imipenem	ceftazidime
PAO 1	MHB	6.25	1.56	3.13
	Biological fluids ^{a)}			
	Human serum	0.20	0.20	12.5
	Human serum + Lys ^{b)}	1.56	1.56	12.5
	Mouse serum	3.13	0.78	3.13
	Mouse serum + Lys	3.13	0.78	3.13
	Mouse ascitic fluid	0.2	0.1	1.56
Mouse ascitic fluid + Lys	6.25	3.13	3.13	
DD-11	MHB	25	12.5	1.56
	Mouse serum	12.5	6.25	1.56
	Mouse serum + Lys	12.5	6.25	1.56
	Mouse ascitic fluid	12.5	6.25	1.56
	Mouse ascitic fluid + Lys	25	6.25	3.13

^{a)} Biological fluids were inactivated by heating at 56°C for 45 min before use.

^{b)} Supplemented with 10 m mol of L-lysine

などで塩基性側鎖を持つ化合物であることを示した。また、これらの化合物の OprD からの透過は L-リジン、L-ヒスチジン、L-アルギニンなどの塩基性アミノ酸によって阻害されることから、OprD は塩基性アミノ酸の透過孔であり、塩基性アミノ酸と類似構造を有するカルバペネム系薬やベネム系薬がこの透過孔を選択的に利用するものと推定した。また、OprD 透過孔の欠損により緑膿菌はこれらの薬剤に耐性化することを示した。我々が得た結論も OprD 透過孔が塩基性アミノ酸とカルバペネム系薬の選択的透過孔であることを示している。我々はまた、培地中の塩基性アミノ酸がカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性を低下させており、塩基性アミノ酸濃度を低下させることによりカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性を増強させることができることを示した。このことが重要な意味を持つのは、感受性測定培地として標準的に用いられている Mueller-Hinton 培地にはカザミノ酸として高濃度の塩基性アミノ酸が含まれているが、生体内ではこのような高濃度の遊離アミノ酸は存在せず¹⁸⁾、このためカルバペネム系薬は MHA で測定した MIC から予測される以上に優れた生体内効果を示すものと結論される。実際、非働化マウスおよびヒト血清を液体培地として MIC を測定した場合、塩基性アミノ酸非含有培地同様に良好な結果が得られたこともこのことを支持している。

カルバペネム系薬が MIC から期待される以上に優れた抗緑膿菌活性を示す理由にはいくつかの機構が考えられる。通常 β -ラクタム系薬は緑膿菌などのグラム陰性菌には postantibiotic effect を示さないが、カルバペネム系薬が示す点はカルバペネム系薬の優れた抗緑膿菌活性の一因と考えられる。これはおそらくカルバペ

ネム系薬が緑膿菌の PBP-3 よりも PBP-2 に高い親和性を示す¹²⁾ ことに由来しているものと思われる。また、一般的に β -ラクタム系薬は活発な増殖期にある菌に対しては強い殺菌力を示すが、定常期に近づき増殖速度の遅い菌に対しては殺菌力は弱い。カルバペネム系薬は他の β -ラクタム系薬に比べ定常期に近づいた菌に対しても優れた殺菌力を示す¹²⁾ ことが明らかにされている。生体内の感染部位では試験管内のような急速な菌の増殖はそれほど長い時間続いているとは思われず、多くは定常期に近いような遅い速度で増殖していると考えられる。この点もカルバペネム系薬が生体内で優れた効果を示す一因となっているものと思われる。

以上、カルバペネム系薬の抗緑膿菌活性は、OprD 透過孔からの外膜透過において塩基性アミノ酸との競合があるため影響を受けやすいことを示した。したがって、カルバペネム系薬の治療効果を予測する場合、塩基性アミノ酸を含む測定培地で求めた MIC 値のみからの評価では時として過小評価してしまう可能性がある。十分に注意しなければならない。

本論文は第 6 回上田記念感染症・化学療法研究奨励賞受賞者論文として、既報に新たなデータを追加して作成したものである。

謝 辞

本研究の一部は第 6 回上田 泰記念感染症・化学療法研究奨励賞の援助を受けて実施されました。関係諸氏に深謝いたします。本論文の一部の実験は福岡隆氏の助力を得て実施されました。深謝いたします。

文 献

- 1) Quinn J P, Dudek E J, DiVincenzo C A, et al.: Emergence of resistance to imipenem during thera-

- py for *Pseudomonas aeruginosa* infections. J. Infect. Dis. 154: 289~294, 1986
- 2) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 147~151, 1991
 - 3) Trias J, Nikaido H: Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 52~57, 1990
 - 4) Trias J, 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
 - 5) Cullmann W, Büscher K H, Opferkuch W: Characterization of imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: decreased phenotypic expression of outer membrane proteins D1 and D2. Immun. Infekt. 14: 227~229, 1986
 - 6) Büscher K H, Cullmann W, Dick W, et al.: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 703~708, 1987
 - 7) Büscher K H, Cullmann W, Dick W, et al.: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is due to diminished expression of outer membrane protein. J. Infect. Dis. 156: 681~684, 1987
 - 8) Studemeister A E, Quinn J P: Selective imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished outer membrane permeability. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1267~1268, 1988
 - 9) Fukuoka T, Masuda N, Ohya S, et al.: Increase in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenem antibiotics in low-amino-acid media. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 529~532, 1991
 - 10) Fukuoka T, Ohya S, Narita T, et al.: Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 322~327, 1993
 - 11) 大屋 哲, 福岡 隆, 矢島 努, 他: Panipenem/betamipron に関する細菌学的評価 (第 4 報) Panipenem の抗緑膿菌活性。Chemotherapy 39 (S-3): 124~131, 1991
 - 12) 大屋 哲, 宇津井幸男, 矢島 努, 他: CS-976 に関する細菌学的評価 (第 2 報) CS-533 の抗菌機作。Chemotherapy 39 (S-3): 102~110, 1991
 - 13) 日本化学療法学会 MIC 測定法委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 14) Carlucci G, Biordi L, Vicentini C, et al.: Determination of imipenem in human plasma, urine and tissue by high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 8: 283~286, 1990
 - 15) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680~685, 1970
 - 16) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
 - 17) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139: 789~790, 1974
 - 18) Gitlitz P H, Sunderman Jr. F W, Hohnadel D C: Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing. Clin. Chem. 20: 1305~1312, 1974

Outer membrane permeability and effect of basic amino acids on antipseudomonal activity of carbapenems

Satoshi Ohya, Nobuhisa Masuda and Eiko Sakagawa

Biological Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 2-58 Hiromachi 1-chome,
Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

Carbapenems, such as panipenem and imipenem, showed better therapeutic efficacy against murine systemic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* than the activity expected from their MICs determined by using Mueller-Hinton medium. The mechanism was investigated and concluded that outer membrane permeability of *P. aeruginosa* played important role on carbapenem's antipseudomonal activity as well as existence of postantibiotic effect and strong bactericidal activity of carbapenem. Carbapenems showed 8 to 16 times lower MICs in low-nutritional media than those determined in Mueller-Hinton medium. Basic amino acids, such as L-lysine, L-histidine, and L-arginine, were responsible for the decreased antipseudomonal activity of carbapenems in Mueller-Hinton medium. Other amino acids had little effect on antipseudomonal activity. The effect of basic amino acids on antipseudomonal activity of carbapenem was concentration dependent. OprD-deficient mutants were isolated from *P. aeruginosa* PAO 1 and examined for their susceptibility to carbapenems with or without presence of basic amino acids. It is concluded that the decreased antipseudomonal activity of carbapenems was caused by competing permeation of carbapenems and basic amino acids through OprD channel of *P. aeruginosa*. Such influence by basic amino acids was specific for carbapenems and it was not observed for cepheems, penicillin, new quinolones, and aminoglycoside. Uptake of ^{14}C -panipenem into *P. aeruginosa* PAO 1 was almost suppressed by 100 mM L-lysine, and the inhibition of ^{14}C -panipenem uptake was not observed in the OprD-deficient mutant. Concentrations of free basic amino acids are much lower in human serum than in Mueller-Hinton medium (less than 1/40). This is probably one main reason for carbapenem's stronger antipseudomonal activity than that expected from their MICs determined in Mueller-Hinton medium.