

Cefotetan (YM09330) の *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* KM338 および *Serratia marcescens* IFO12648 に対する抗菌機序

杉中 秀寿

大阪大学歯学部口腔細菌学教室

高田 直樹・小川 道雄

大阪大学医学部第二外科学教室

要 旨

新しく開発された Cephamycin 系抗生剤の一つである Cefotetan (CTT, YM09330) の抗菌機序を *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338 および *S. marcescens* IFO12648 を用い、Cefazolin のそれと対比して検討した。

それぞれの菌株に対する Cefotetan の最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.39, 800 および 0.05 $\mu\text{g/ml}$ で、この抗生剤は被検 *E. coli* および *S. marcescens* に対してきわめてすぐれた抗菌力を発揮し、*P. aeruginosa* に対しては、その抗菌作用が比較的弱かった。グラム陰性菌の外膜に障害を与える ethylenediaminetetraacetic acid (1/2 MIC) 添加によって、被検 *E. coli* および *S. marcescens* に対する Cefotetan の抗菌力はほとんど変わらず、*P. aeruginosa* に対しては、その抗菌力が著明に高まった。Cefotetan は被検菌 3 株のもつ β -lactamase に対してきわめて安定であった。Cefotetan はエーテル処理被検菌による架橋 peptidoglycan 合成を Cefazolin にくらべてはるかに低濃度で阻害した。

以上の結果から、Cefotetan が被検 *E. coli* および *S. marcescens* に対してすぐれた抗菌力を発揮するのは、この抗生剤が両菌株の外膜透過性にすぐれ、 β -lactamase に安定でしかも peptidoglycan の架橋形成にあずかる標的酵素 (transpeptidase) に対してすぐれた親和性を示すためであり、一方、*P. aeruginosa* に対して、この抗生剤が比較的耐性を示すのは、その外膜透過性が悪いためであると結論した。

序 文

Cefotetan (CTT, YM09330) は新しく開発された半合成 Cephamycin 系抗生剤の一つである。この抗生剤は多くのグラム陰性桿菌に対して、現在市販の β -Lactam 系抗生剤よりもすぐれた抗菌力を発揮するとされている¹⁾。特に従来、種々の β -Lactam 抗生剤に耐性であり、日和見感染の病原体として、最近注目されつつあるセラチア菌に対しても、この抗生剤は大腸菌に対してと同程度の抗菌活性を示すことが報告²⁾されている。

一般にグラム陰性菌に対する β -Lactam 抗生剤の抗菌力の程度は、細菌細胞表層をおおう外膜に対する薬剤の透過性、外膜と内膜 (細胞質膜) の間のペリプラズムに局在する β -lactamase に対する薬剤の安定性、および細胞質膜 (内膜) 上に存在する β -Lactam 抗生剤の標的酵素 (transpeptidase および D-alanine carboxypeptidase) に対する親和性によって決定される。

そこで、Cefotetan の抗菌機序をこの抗生剤に高度感受性を示す大腸菌およびセラチア菌、ならびに比較的耐性を示す緑膿菌を用い、上記 3 要因について、Cefazolin のそれと対比して検討した。

材 料 と 方 法

1. 試験薬剤

Cefotetan (CTT) {Disodium (6R,7S)-7-[[4-(carbamoylcarboxylatomethylene)-1,3-dithietan-2-yl]carboxamido]-7-methoxy-3-[[[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo (4.2.0.) oct-2-ene-2-carboxylate] と市販の Cefazolin (CEZ) および Benzylpenicillin (PCG) を用いた。

2. 使用菌株

E. coli K12, *P. aeruginosa* KM338 および *S. marcescens* IFO12648 を用い、対照として *S. aureus* FDA209P も用いた。

3. 最小発育阻止濃度の測定

それぞれの菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 2 倍数系列希釈の各抗生剤をふくむ trypticase soy broth (BBL 社, Microbiology System, Cockysville, Md. USA) に約 10^6 cell/ml 濃度になるように菌を接種し、18 時間、37°C で静置培養して測定した。

4. Ethylenediaminetetraacetic acid 存在下での抗菌力の測定

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下での各抗生剤の MIC は上記培地に $\frac{1}{2}$ MIC 濃度の EDTA を添加して 3 の項と同様の方法²⁾で調べた。なお EDTA 単独での被検 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* および *S. aureus* に対する MIC は 3.8, 3.8, 7.8 および 1.9 $\mu\text{mol/ml}$ であった。

5. β -Lactamase 標品の調整

被検菌株の一夜培養液をそれぞれ 250ml の trypticase soy broth の入った各 2 本の振盪フラスコに 5% になるように接種し、37°C、2 時間、振盪培養したのち、一方に *E. coli*, *P. aeruginosa* および *S. marcescens* の場合、それぞれ 10, 1,600 および 400 $\mu\text{g/ml}$ 濃度になるように PCG を添加し、他方は未添加の対照として、両者をさらに 1.5 時間培養を続けた。培養後、各菌体を遠心して集め、50mM 燐酸緩衝液 (pH 6.8) で菌体を洗滌、各 8ml の上記緩衝液に浮遊させた。この浮遊液を super sonic vibrater (UR-150, 富永製作所, 東京) で 5 分間処理し、未破砕の菌体をのぞいたのち、その上清を β -lactamase 酵素標品³⁾とした。

6. β -Lactamase 活性の測定

β -Lactamase 活性は PERRET の方法⁴⁾を改変⁵⁾して測定した。反応は 8 mM のそれぞれの基質をふくむ 0.1M 燐酸緩衝液 (pH 6.8) 中で、上記酵素標品を用いて 30°C、30 分間で行った。それぞれの抗生剤に対する分解活性は 1 分間に 1 μmole の基質を分解する活性を 1 単位とした。

7. エーテル処理菌の調整

被検菌株を 500ml の trypticase soy broth で振盪培養し、対数増殖期に集菌、それぞれの洗滌菌体を VORBERG と HOFFMAN-BERLING の方法⁶⁾にしたがって、80 mM KCl, 40 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane-hydrochloride (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.5), 7 mM MgCl_2 , 2 mM ethyleneglycoltetraacetic acid, 0.4mM spermidine および 0.5M sucrose を含んだ 8 ml の溶液に浮遊させ、同量の ether を 0°C で加えて、1 分間ゆっくりと攪拌し、ついで ether 層をのぞいたのち、7,000 \times g, 10 分間遠心して、その沈渣の処理菌体を約 2 ml の上記溶液に浮遊させ (蛋白質量として 30~40mg/ml 濃度)、これを peptidoglycan 合成の酵素標品⁷⁾とした。

8. Peptidoglycan 架橋形成の測定

Peptidoglycan 合成はその前駆体である uridine 5'-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanine (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala) と uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-

GlcNAc) を基質とし MIRELMAN らの方法⁸⁾を一部改変^{7,9)}して測定した。前者の基質は Vancomycin 処理した *B. megaterium* KM の菌体より LUGENBERG らの方法¹⁰⁾に従って抽出、精製してえた。また後者の基質として New England Nuclear 社 (Boston, Mass., USA) より購入した UDP-(¹⁴C)GlcNAc (290 mCi/mmol) を用いた。Peptidoglycan 合成は 10 μl の 1 mM UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala, 5 μl の 34.4 μM UDP-(¹⁴C)GlcNAc, 10 μl の 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 10 μl の 1M NH_4Cl , 5 μl の 1M MgCl_2 , 5 μl の 20mM 2-mercaptoethanol, 85 μl の精製水, 20 μl の 0, 0.1, 1, 10, 100 および 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の各抗生剤溶液および 50 μl の ether 処理菌体浮遊液 (約 8 mg/ml 蛋白質量) を加え、37°C、60 分間行った。反応後、1 ml の 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加え、ついで 30 分間、100°C で加熱して反応を止めた。この反応液を冷却後、SDS-不溶性画分を millipore filter (0.45 μm) 上に集め、さらに 2.5ml の 2% SDS で、ついで 15ml の精製水で洗ったのち、この不溶性 peptidoglycan をふくむ filter を乾燥し、液体シンチレーションカウンターでその放射能を測定した。なお β -Lactam 抗生剤によって、架橋形成が阻害されると未架橋の peptidoglycan が生成され、可溶性となるため、上記操作で SDS 可溶性となり filter を通過することが知られている。

実験結果

1. 抗菌力

Table 1 の None の項に *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338, *S. marcescens* IFO12648 および *S. aureus* FDA209P に対する CTT の MIC を CEZ および PCG のそれぞれと対比して示す。CTT のそれぞれの菌株に対する MIC は 0.39, 800, 0.05 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ で、この抗生剤は *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO12648 に対して著明な抗菌力を示した。しかし種々の抗生剤に高度耐性^{11,12)}の *P. aeruginosa* KM338 に対しては、CEZ や PCG よりも抗菌活性を示すが比較的耐性であった。一方グラム陽性の *S. aureus* FDA209P に対しては CEZ や PCG よりもその抗菌力は劣っていた。

2. EDTA 存在下での抗菌力

2 価陽イオンのキレーターである EDTA は、薬剤の透過障害の担い手であるグラム陰性菌外膜に障害を与えることが知られている¹³⁾。そのために EDTA 存在下で各抗生剤の MIC を測定すると、外膜で透過障害を受けていた薬剤の抗菌力が高まることが報告^{2,7,9,14,15)}されている。そこで、 $\frac{1}{2}$ MIC 濃度の EDTA 存在下で CTT の MIC を未添加の場合と比較し、外膜透過障害の程度を檢

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs) and effects of EDTA on the MICs of CTT, CEZ and PCG for *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338, *S. marcescens* IFO12648 and *S. aureus* FDA209P

Strain	EDTA conc. (μmol/ml)	MIC (μg/ml)		
		CTT	CEZ	PCG
<i>E. coli</i> K 12	None	0.39	1.56	25
	1.9	0.05	0.78	6.25
<i>P. aeruginosa</i> KM 338	None	800	51,200	12,800
	1.9	25	3,200	400
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	None	0.05	6,400	1,600
	3.8	0.05	100	50
<i>S. aureus</i> FDA 209P	None	6.25	0.39	0.0125
	0.5	6.25	0.39	0.0125

Table 2 Comparison of inducible and noninducible β -lactamase activities against CTT, CEZ and PCG in *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338 and *S. marcescens* IFO12648

Strain Enzyme sources	Enzyme activity (unit/mg of protein)			
	CTT	CEZ	PCG	
<i>E. coli</i> K 12	Not induced	0.000696	0.00884	0.00333
	Induced	0.000580	0.00737	0.00333
<i>P. aeruginosa</i> KM 338	Not induced	0.00124	0.0158	0.00238
	Induced	0.00217	7.97	0.875
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	Not induced	0.000966	0.165	0.00185
	Induced	0.000828	0.506	0.00556

討した (Table 1)。

CTT の抗菌力は *E. coli* K12 および *P. aeruginosa* KM338 では EDTA 添加によって、それぞれ 8 と 32 倍高まり、*S. marcescens* IFO12648 では全くその抗菌力が変わらなかった。この結果から、CTT の *P. aeruginosa* KM338 外膜の透過性はきわめて悪く、*S. marcescens* IFO12648 のそれは非常によく、また *E. coli* K12 では *S. marcescens* IFO12648 にくらべていくぶんその透過性が悪い傾向を示すことが示唆された。一方、対照薬剤として用いた CEZ および PCG の *P. aeruginosa* KM338 および *S. marcescens* IFO12648 に対する抗菌力は EDTA 添加によって著明に高まるのに対して、上記 2 抗生剤に比較的感受性を示す *E. coli* K12 に対しては EDTA 添加によってそれぞれの感受性が 2 と 4 倍高まるにすぎなかった。なお対照菌として用いた外膜をもたない *S. aureus* FDA209P では EDTA 添加によっていずれの抗生剤でも抗菌力に変化が認められなかった。

3. β -Lactamase に対する安定性

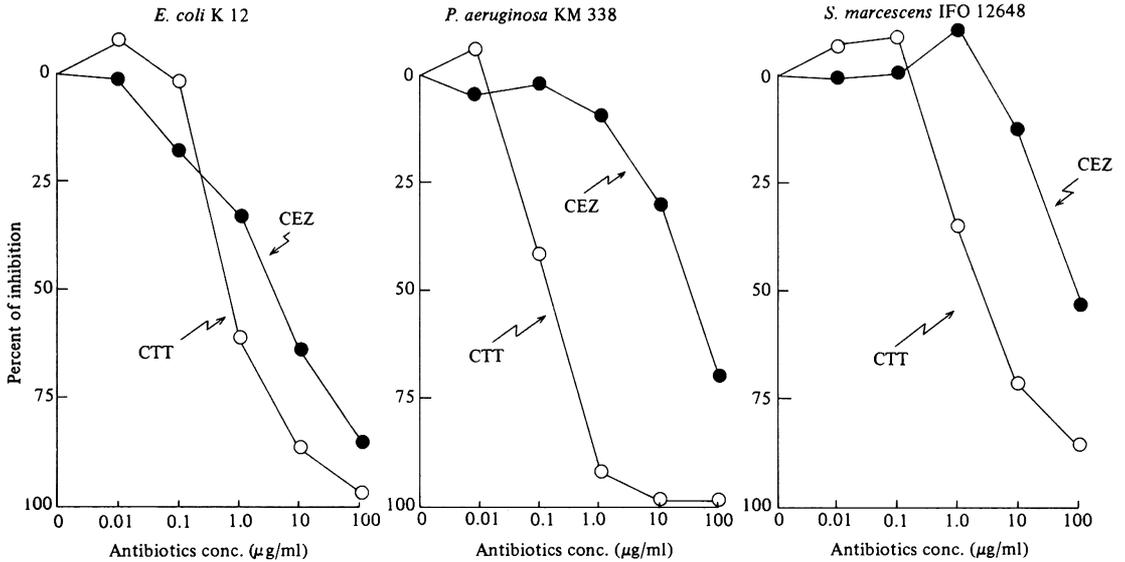
Table 2 は *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338 および

S. marcescens IFO12648 の構成的に産生する β -lactamase 活性を PCG で誘導させた場合のそれと比較し、これらの β -lactamase による CTT, CEZ および PCG の分解活性を対比して示したものである。いずれの菌株も、わずかながら構成的に β -lactamase 活性をペリプラズムにもち、*P. aeruginosa* KM338 と *S. marcescens* IFO12648 は PCG によってその活性が誘導された。これらの β -lactamase はいずれも PCG よりも CEZ をよく分解する cephalosporinase 型であった。しかし CTT はこれらいずれの β -lactamase 活性に対してもきわめて分解を受けにくかった。

4. 架橋 peptidoglycan 合成におよぼす影響

被検菌株の ether 処理菌体と peptidoglycan 前駆体である UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala および UDP- ^{14}C GlcNAc とを反応させると、いずれの菌株でも SDS-不溶性画分 (架橋 peptidoglycan) への ^{14}C GlcNAc のとり込みが認められ、少なくとも 1 時間の反応まではその増加は経時的であった^{7,9)}。Fig. 1 はこの反応系に種々の濃度の CTT および CEZ を添加

Fig. 1 Effects of CTT and CEZ on cross-linking reaction of peptidoglycan synthesis in *E. coli* K 12, *P. aeruginosa* KM 338 and *S. marcescens* IFO 12648 (37°C, 60 min)



して、各濃度での架橋 peptidoglycan 生成量を未添加のそれと比較してそれぞれの阻害度を示したものである。*E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338 および *S. marcescens* IFO12648 の ether 処理菌体による架橋 peptidoglycan 合成の CTT による 50% 阻害濃度は 0.58, 0.15 および 2.7 $\mu\text{g/ml}$ で、いずれの菌株でも非常に低濃度で架橋形成が阻害を受けた。一方、対照として用いた CEZ のそれぞれの 50% 阻害濃度は 3.7, 32 および 82 $\mu\text{g/ml}$ で、CTT にくらべていずれも阻害濃度が高かった。以上の結果から、CTT は CEZ よりもいずれの菌株の架橋形成にあずかる transpeptidase にすぐれた親和性を示すことが明らかとなった。

考 察

CTT は従来の Cephamycin 系抗生剤にくらべて indole 陽性の *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* 等のグラム陰性桿菌に対してすぐれた抗菌力を発揮することが報告¹⁾されている。この論文の実験に用いた *E. coli* K12 に対して、CTT はすぐれた抗菌力を示し、また CEZ に高度耐性⁹⁾の *S. marcescens* IFO12648 に対しても、その MIC が 0.05 $\mu\text{g/ml}$ と非常にすぐれた抗菌力を示した。しかし種々の抗生剤に高度耐性^{10,11)}の *P. aeruginosa* KM338 に対してはかなり耐性であった。

一般に β -Lactam 抗生剤がグラム陰性菌に対して抗菌作用を発揮するためには、まず細菌細胞表層をおおう

外膜をその薬剤が通過しなければならない。この外膜は高分子物質やある種の薬剤の barrier としての働きをもち¹³⁾、薬剤の外膜透過性は菌種によって、また薬剤の種類によって様々である。外膜は外側にリポ多糖をもち、リン脂質と数種の蛋白質および一部が peptidoglycan と結合しているリポ蛋白質からなり、そのところどころに 2 価陽イオンが挿入された構造¹³⁾をしている。ここに 2 価陽イオンのキレーターである EDTA を作用させると、その外膜から蛋白質・リポ多糖複合体などが遊離^{16,17)}し、外膜に障害を与えて物質の透過がよくなることが知られている¹⁷⁾。そこでこの現象を利用して EDTA 存在下と存在しない場合での抗生剤の抗菌力を比べると、その透過障害の程度がわかる。すなわち両者での薬剤感受性の差が大きいほど薬剤は外膜での透過を大きく阻害されていることを意味している。CTT の場合、この抗生剤にすぐれた感受性を示す *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO12648 では EDTA 添加によってその MIC はほとんど変らなかつたが、比較的耐性を示す *P. aeruginosa* KM338 では EDTA 添加によって著明に感受性が高まった。この事実は CTT が被検の *E. coli* や *S. marcescens* の外膜を透過しやすく、*P. aeruginosa* の外膜透過性は上記 2 株より悪いことを示唆している。

β -Lactamase は耐性の大きな担い手として、古くから重要視されている。グラム陰性菌では β -lactamase は外膜と内膜(細胞質膜)の間のペリプラズムに局在し、 β -

Lactam 抗生剤が外膜を透過してもここに存在する β -lactamase で不活化されれば、その作用を発現することができない。被検 *E. coli*, *P. aeruginosa* および *S. marcescens* の各菌株は構成的にわずかに β -lactamase を産生し、*P. aeruginosa* と *S. marcescens* は PCG 添加によってその活性が誘導された。しかしその活性は β -lactamase 産生のグラム陰性菌にくらべてきわめて低かった。これらの β -lactamase はいずれも PCG よりも CEZ をよく加水分解することから、cephalosporinase 型と推察された。CTT はいずれの菌株のもつ β -lactamase に対しても CEZ にくらべてきわめて安定であった。このことは CTT が被検 *E. coli* や *S. marcescens* にすぐれた抗菌力を発揮する一つの要因であろうと考えられる。

β -Lactam 抗生剤が外膜を通過し、ペリプラズム内に局在する β -lactamase による不活化をまぬがれ、細胞質膜(内膜)上に存在する標的酵素(transpeptidase および D-alanine carboxypeptidase)にまで到達しても、上記酵素に対する親和性に差があれば、当然抗菌力も異なるものと考えられる。被検 3 菌株の ether 処理菌によって peptidoglycan の前駆体である UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala と UDP-GluNAc から架橋 peptidoglycan が合成されることが明らかにされている^{7,9)}。CTT はいずれの菌株による架橋形成も CEZ にくらべてきわめて低濃度で阻害した。すなわち CTT は peptidoglycan の架橋形成にあずかる transpeptidase 活性にきわめて親和性を示すことが明らかにされた。

以上の結果から CTT が *E. coli* K12 や *S. marcescens* IFO12648 に対して CEZ よりもすぐれた抗菌力を示すのは、この抗生剤が両菌株の外膜透過性にすぐれ、 β -lactamase に安定で、しかも架橋形成にあずかる transpeptidase にすぐれた親和性を示すためであろうと考えられる。また CTT が *P. aeruginosa* KM338 の β -lactamase に上記 2 株のそれと同様、きわめて安定で、しかも標的酵素にすぐれた親和性を示すのにもかわらず、その抗菌力が弱いのは、恐らく外膜透過性が悪いためであろうと推測される。

文 献

- 1) TODA, M. ; T. SAITO, K. YANO, K. SUZAKI, M. SAITO & S. MITSUHASHI : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM09330, a new cephamycin derivative. Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. vol. 1, pp. 280~281, 1980
- 2) SUGINAKA, H. ; M. SHIMATANI, S. KOTANI, M. OGAWA, M. HAMA & G. KOSAKI : Antibacterial mechanism of cefsulodin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 5 : 177~179, 1979
- 3) MIZOGUCHI, J. ; H. SUGINAKA & S. KOTANI : Mechanism of synergistic action of a combination of ampicillin and dicloxacillin against a β -lactamase-producing strain of *Citrobacter freundii*. Antimicrob. Agents & Chemother. 16 : 439~443, 1979
- 4) PERRET, C. T. ; Iodometric assay of penicillinase. Nature(London) 174 : 1012~1013, 1954
- 5) MIZOGUCHI, J. ; T. MOROHOSHI & H. SUGINAKA : Effect of a combination of benzylpenicillin or ampicillin and dicloxacillin on peptidoglycan synthesis in a cell-free system from a β -lactamase producing strain of *Citrobacter freundii*. J. Antibiot. 33 : 731~736, 1980
- 6) VORSBERG, H. P. ; H. HOFFMANN-BERLING : DNA synthesis in nucleotide permeable *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 58 : 739~753, 1971
- 7) SUGINAKA, H. ; S. KOTANI, N. TAKATA & M. OGAWA : Effect of cefotaxime(HR-756) on biosynthesis of cell wall peptidoglycan in *Pseudomonas aeruginosa* KM338 and *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiol. Lett. 8 : 79~82, 1980
- 8) MIRELMAN, D. ; Y. YASHOUV-GAN & U. SCHWARZ : Peptidoglycan biosynthesis in a thermosensitive division mutant of *Escherichia coli*. Biochem. 15 : 1781~1790, 1976
- 9) TAKATA, N. ; H. SUGINAKA, S. KOTANI, M. OGAWA & G. KOSAKI : β -Lactam resistance in *Serratia marcescens* : Comparison of action of benzylpenicillin, apalcillin, cefazolin and ceftizoxime. Antimicrob. Agents & Chemother. 19 : 397~401, 1981
- 10) LUGENBERG, E. J. ; A. VAN SCHIJNDEL-VAN DAM & T. H. M. VAN BELLEGEM : *In vivo* and *in vitro* action of new antibiotics interfering with the utilization of N-acetyl-glucosamine-N-acetyl-muramyl-pentapeptide. J. Bacteriol. 108 : 20~29, 1971
- 11) SUGINAKA, H. ; A. ICHIKAWA & S. KOTANI : Penicillin-resistant mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* : Effects of penicillin G and carbenicillin on transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase activities. Antimicrob. Agents & Chemother. 6 : 672~675, 1974
- 12) SUGINAKA, H. ; A. ICHIKAWA & S. KOTANI : Penicillin-resistant mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* : Binding of penicillin to *Pseudomonas aeruginosa* KM338. Antimicrob. Agents & Chemother. 7 : 629~635, 1975
- 13) LEIVE, L. : The barrier function of the gram-negative envelope. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235 : 109~129, 1974
- 14) HAMILTON-MILLER, J.M.T. : Effect of EDTA upon

- bacterial permeability to benzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20 : 688~691, 1965
- 15) WEISER, R. ; A.W. ASSCHER & J. WIMPENNY : *In vitro* reversal of antibiotic resistance by ethylenediaminetetraacetic acid. *Nature(London)* 219 : 1365~1366, 1968
- 16) ASBELL, M. A. ; R. G. EAGON : Role of multivalent cations in the organization, structure, and assembly of the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 92 : 380~387, 1966
- 17) ROGERS, S. W. ; H. E. GILLELAND, JR. & R. G. EAGON : Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 15 : 743~748, 1969

MODE OF ANTIBACTERIAL ACTION OF CEFOTETAN (YM09330)
AGAINST *ESCHERICHIA COLI* K12, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* KM338
AND *SERRATIA MARCESCENS* IFO12648

HIDEKAZU SUGINAKA

Department of Microbiology & Oral Bacteriology, Osaka University Dental School

NAOKI TAKATA and MICHIO OGAWA

Second Department of Surgery, Osaka University Medical School

The antibacterial action of cefotetan (CTT, YM09330), a new developed cephamycin, was investigated against *E. coli* K12, *P. aeruginosa* KM338 and *S. marcescens* IFO12648, and was compared with that of cefazolin.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of cefotetan for these organisms were 0.39, 800, and 0.05 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The addition of subinhibitory concentration (1/2 MIC) of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), which damages permeability barrier of the outer membrane, caused little changes in the MICs of cefotetan for *E. coli* K12 and *S. marcescens* IFO12648, whereas marked reduction in the MIC of *P. aeruginosa* KM338 was observed in the presence of EDTA. Cefotetan was stable to β -lactamase activities from these organisms whereas cefazolin was hydrolyzed rapidly by the enzymes. The cross-linking reaction of peptidoglycan synthesis catalyzed by the ether-treated cells from these organisms was inhibited by markedly lower concentration of cefotetan than that of cefazolin.

The excellent antibacterial activity of cefotetan to *E. coli* K12 and *S. marcescens* IFO12648 was concluded to be due to the high permeability of the outer membrane, the stability against hydrolysis by β -lactamase and/or high affinity to the target enzymes (transpeptidases) of both organisms. In contrast, the relative resistance to cefotetan in *P. aeruginosa* KM338 was revealed to be due to the permeability barrier of the outer membrane.