

Azthreonam (SQ 26,776) の抗菌力, β -lactamase 安定性 および補体と白血球との協力的殺菌作用

横田 健・吉田 玲子・鈴木 映子

順天堂大学医学部細菌学教室

Azthreonam は、全合成された初の monobactam 系抗生物質である。グラム陽性菌に対する抗菌力は弱い、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* 属各菌種, *C. freundii*, *S. marcescens*, および *H. influenzae* には, oxim 型第3世代 cephem 系抗生物質に優るとも劣らぬ力を示すことが実験的に明らかにされた。*P. aeruginosa* には, CFS と同程度の強い抗菌力を示すが, *P. cepacia* や *P. maltophilia* には中等度の力を示すにすぎない。

Azthreonam は, *E. coli* などの PBP3 と 1A に親和性が強いので, sub MIC では菌が filament 化するが, 生体内では補体や白血球との協力的殺菌作用が著明なので, 生体内での良好な効果が期待された。グラム陽性菌との混合感染の場合には, Azthreonam との間で明らかな協力作用を示す。半合成狭域ペニシリンすなわち MCIPC や MFIPC との併用が有用であろう。

Azthreonam は、全合成された初の monobactam 系抗生物質である。グラム陰性菌には強い抗菌力を示すが、グラム陽性菌には作用が弱いといわれる。本剤のくわしい抗菌力を各種細菌の臨床分離株, β -lactamase 産生株などを用いて検討した。また β -lactam 系抗生物質は細胞壁合成阻害剤であり、菌の表面構造に影響を与えるため、生体の大きな感染防御因子である補体の殺菌力を強く受けるように菌を変化させたり、マクロファージ (M ϕ) や多形核白血球 (PMN) に容易に食菌、殺菌されるように菌に影響を与えることが知られているので、Azthreonam とこれら生体感染防御因子との協力の度合いを他の β -lactam 系抗生物質と比較した。

I. 材料および方法

1. 各種細菌臨床分離株に対する MIC の測定

順天堂大学付属病院中央検査室から分与された、新鮮臨床分離の *E. coli* 47 株, *K. pneumoniae* 45 株, *P. mirabilis* 50 株, *P. vulgaris* 41 株, *P.morganii* 54 株, *P. rettgeri* 30 株, *C. freundii* 48 株, *S. marcescens* 50 株, *E. cloacae* 45 株, *P. aeruginosa* 50 株, *P. cepacia* 45 株, *P. maltophilia* 29 株, *A. calcoaceticus* 50 株 および *H. influenzae* 36 株を使用した。また *E. coli* CS 2 に 52 種類の R (*bla*) を伝達した, Ampicillin (ABPC) 高度耐性株に対する MIC も検討した。MIC の測定は、日本化学療法学会法 (平板希釈法) に従い、 10^8 /ml の菌浮遊液をマイクロプランターでスポットする方法をとった。

2. β -lactamase に対する安定性の検討

200 ml の L-broth 中に、37°C で振盪培養した対数

増殖期の菌を冷却遠心機で集め、洗浄後、0.01 M のリン酸緩衝液 5 ml に再浮遊し、10 kc の音波破細機で氷冷しながら 30 秒 4 回処理した。6,000 \times g, 30 分, および 105,000 \times g, 30 分の遠心により得られた菌体抽出液を粗酵素として使用した¹⁾。Richmond 分類 Ia, Ic, II b, III = TEM, IV, および V = OXA 型 β -lactamase の source として, *E. cloacae* Nek 39, *P. vulgaris* 33, *P. mirabilis* JY 10, *E. coli* CS 2 (RK 1), *K. pneumoniae* 42, および *E. coli* CS 2 (RE 45) を使用した。

V_{max} の測定は macroiodo 法²⁾により、 K_i 値は pH 指示薬を使用する acidimetry 法によった³⁾。

3. 各種細菌 ペニシリン結合蛋白 (PBP) への Azthreonam の親和性の検討

E. coli, *S. marcescens* および *A. calcoaceticus* の PBP 各画分に対する結合親和性は, SPRATT の方法⁴⁾により行なった。すなわち 200 ml の L-broth 中に 37°C で振盪培養した, 対数増殖期の *E. coli* NIHJ JC-2 などの細胞を洗浄後, 0.01 M リン酸緩衝液 8 ml 中に再浮遊し, 氷冷しながら 10 kc の音波破細機で 30 秒ずつ 10 回処理した。105,000 \times g, 30 分の超遠心で膜画分を集め, 0.01 M MgCl₂ 加 0.05 M リン酸緩衝液中に, 蛋白量が 15 mg/ml になるように再浮遊した。Azthreonam の結合親和性は ¹⁴C-PCG との競合結合から調べた⁵⁾。

4. Azthreonam の *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する殺菌力の検討

E. coli NIHJ JC-2, または *P. aeruginosa* 18 S の

L-broth, 37°C 一夜振盪培養液を 10^4 /ml になるように L-broth で希釈した。薬剤無添加, Azthreonom 1/4~8 MIC または, Cefoperazone (CPZ) 1/4~8 MIC 添加の試験管を作り, 37°C で振盪培養を続けながら, 1~7 時間目にその一部を取り寒天平板法で生菌数を測定して, 両薬剤の殺菌力を比較した。

5. 補体および M ϕ と Azthreonom の協力的殺菌効果の検討

E. coli NIHJ JC-2, または *P. aeruginosa* 18S の L-broth, 37°C 一夜振盪培養液を L-broth で希釈し, 10^5 /ml の菌浮遊液を作った。薬剤無添加ヒト非働化血清 20% およびモルモット補体 0.75 unit (*E. coli*) または, 10 unit (*P. aeruginosa*) 加, Azthreonom 50% 発育阻止濃度 (0.07 μ g/ml=*E. coli*; 10.5 μ g/ml=*P. aeruginosa*) 加, および血清, 補体, Azthreonom 全部を加えた試験管をそれぞれ作り, 37°C で振盪培養を続けながら 1~24 時間目にその一部を取り, 生菌数計算によって単独または協力的殺菌作用を比較した。対照薬として, CPZ, Ceftazidime (CAZ) および Letamoxef (LMOX) についても同様の実験を行なった。

白血球と Azthreonom との協力的食菌殺菌作用はマウス培養 M ϕ を使用して行なった。すなわち IcR 3 マウス腹腔内を 10% fetal calf serum 加 MCDB 103 培地 5 ml で洗浄して正常 M ϕ を集め洗浄後, カバースリップを沈めた Falcon multi dish の各 well に約 10^4 cells ずつ接種した。37°C, 5% CO₂ 存在下で一夜培養し, 浮遊細胞を除いた後, L-CM (conditioned of medium L 929) 20% を添加した 1 ml の MCDB 103 培地を各 well に加え, M ϕ を活性化後一夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を M ϕ の 50 培量 (5×10^5 cells/well) 接種した。同時に一部の区画には 1~1/4 MIC の Azthreonom を添加し培養した。薬剤添加後 4 時間目にカバースリップを取り出し, Saline G で軽く洗浄後, metanol 固定しギムザ染色で光顕像を, 2%-glutal aldehyde 固定, 白金パラジウム蒸着で走査電顕観察を行なった⁶⁾。

6. Azthreonom と Flucloxacillin の協力作用の検討

Azthreonom はグラム陽性菌に協力作用が弱いので, グラム陽性菌専用の狭域 β -lactamase 抵抗性 penicillin である, Flucloxacillin (MFIPC) または Cloxacillin (MCIPC) との協力作用をチェッカーボード法で検討した。すなわち, L-broth 5 ml に Azthreonom 0~800 μ g/ml および, MCIPC または MFIPC を 0~800 μ g/ml 加えた試験管群に, *S. aureus* 209 P または *E. coli* NIHJ JC-2 を 1×10^5 /ml 接種し, 37°C 一夜振盪培養後濁度から増殖の有無を判定した。

II. 成績

1. 臨床分離株に対する抗菌力

Fig. 1 および 2 のように Azthreonom は *E. coli* および *K. pneumoniae* には CAZ, CPZ などより強い抗菌力を示し, Cefotaxime (CTX) と同等またはやや劣る結果であった。また Fig. 3, 4, 5 および 6 に示すように, Azthreonom の *Proteus* 属に対する抗菌力は極めて強く, 対照薬すべてより優っていた。*C. freundii* および *S. marcescens* に対しては, ほぼ CTX と同等で, *S. marcescens* で CAZ より若干中等度耐性株が多かった (Fig. 7, 8)。*E. cloacae* には CTX や CAZ に近い成績であるが, Fig. 9 のとおり感受性株に対する抗菌力は Azthreonom が最も強い。

P. aeruginosa に対する抗菌力は, Fig. 10 のように, CPZ には優るが CAZ には劣る。*P. cepacia* に対して

Fig. 1 Sensitivity distribution of 47 clinical isolates of *E. coli* to various β -lactam antibiotics

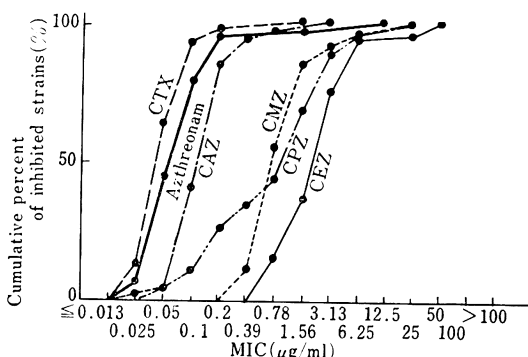


Fig. 2 Sensitivity distribution of 45 clinical isolates of *K. pneumoniae* to various β -lactam antibiotics

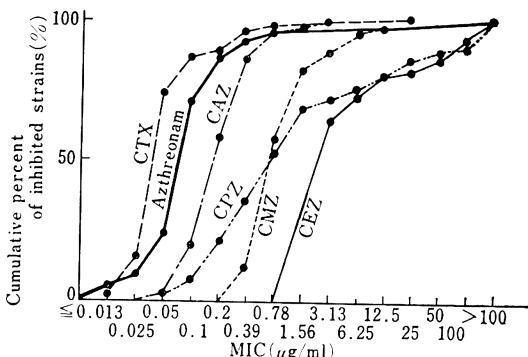


Fig. 3 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *P. mirabilis* to various β -lactam antibiotics

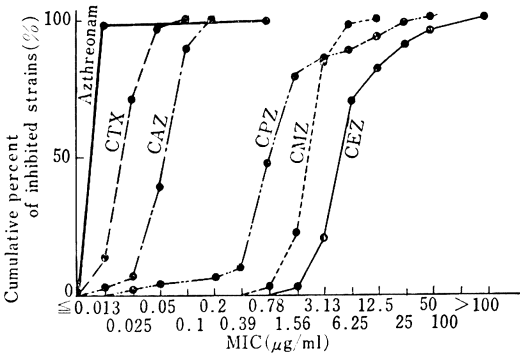


Fig. 6 Sensitivity distribution of 30 clinical isolates of *P. rettgeri* to various β -lactam antibiotics

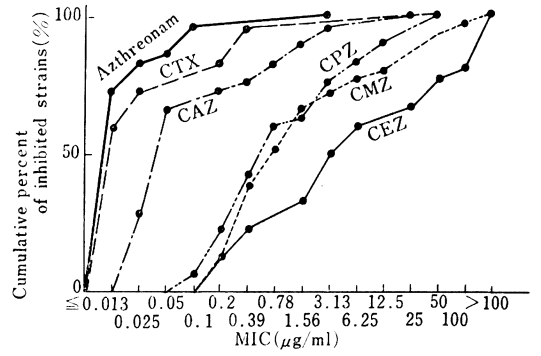


Fig. 4 Sensitivity distribution of 41 clinical isolates of *P. vulgaris* to various β -lactam antibiotics

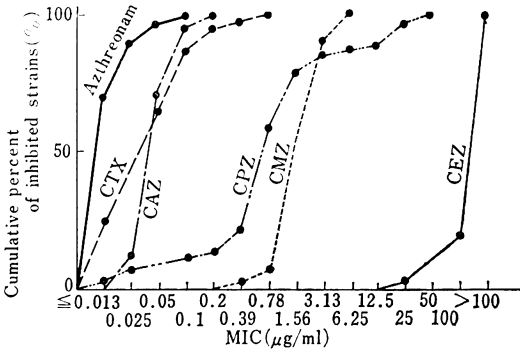


Fig. 7 Sensitivity distribution of 48 clinical isolates of *C. freundii* to various β -lactam antibiotics

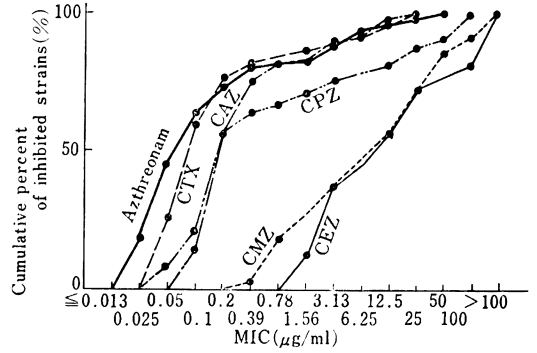


Fig. 5 Sensitivity distribution of 54 clinical isolates of *P. morganii* to various β -lactam antibiotics

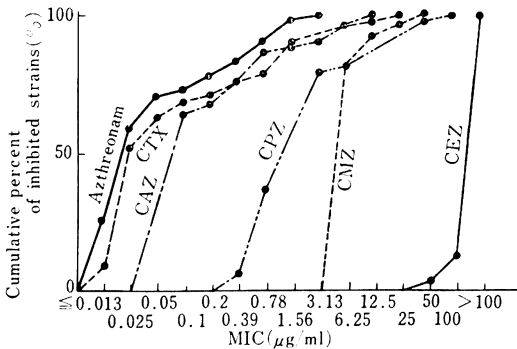


Fig. 8 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *S. marcescens* to various β -lactam antibiotics

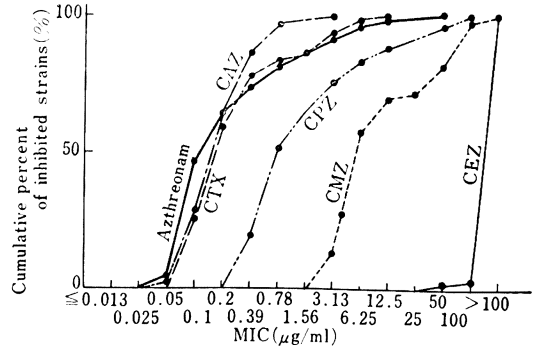


Fig. 9 Sensitivity distribution of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to various β -lactam antibiotics

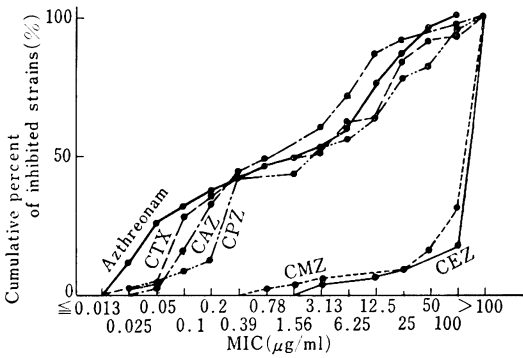


Fig. 12 Sensitivity distribution of 29 clinical isolates of *P. maltophilia* to various β -lactam antibiotics

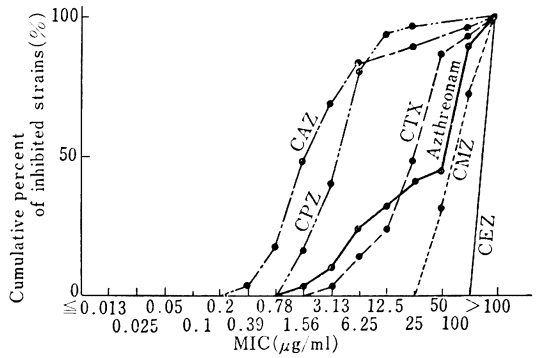


Fig. 10 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to various β -lactam antibiotics

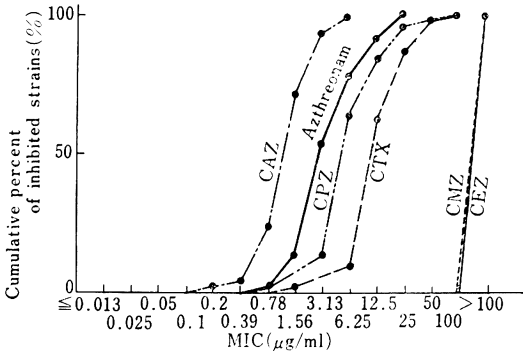


Fig. 13 Sensitivity distribution of 50 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to various β -lactam antibiotics

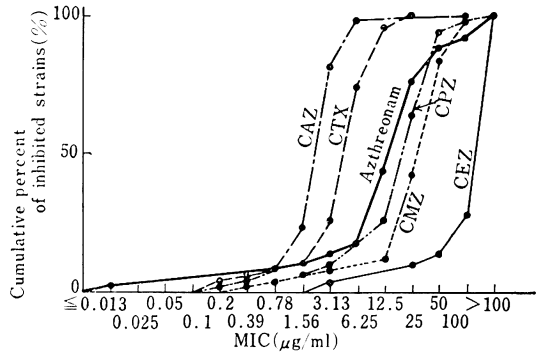


Fig. 11 Sensitivity distribution of 45 clinical isolates of *P. cepacia* to various β -lactam antibiotics

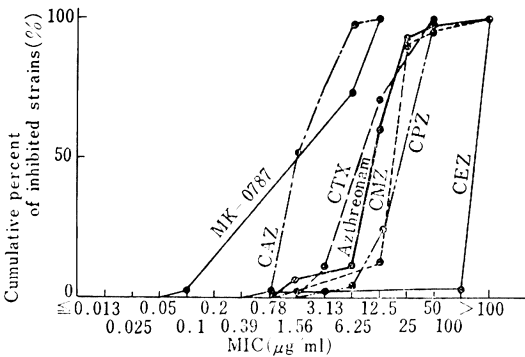


Fig. 14 Sensitivity distribution of 36 clinical isolates of *H. influenzae* to various β -lactam antibiotics

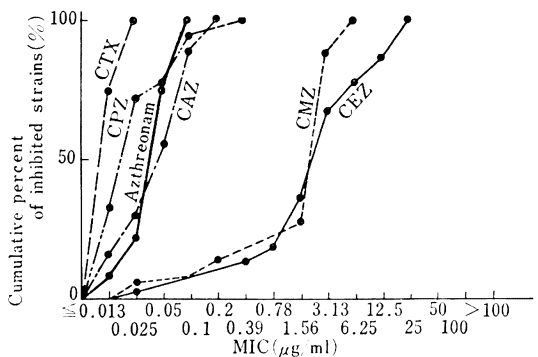


Fig. 15 Relative hydrolysis ratios of various β -lactam antibiotics by penicillinase-type β -lactamases produced by gram-negative bacteria

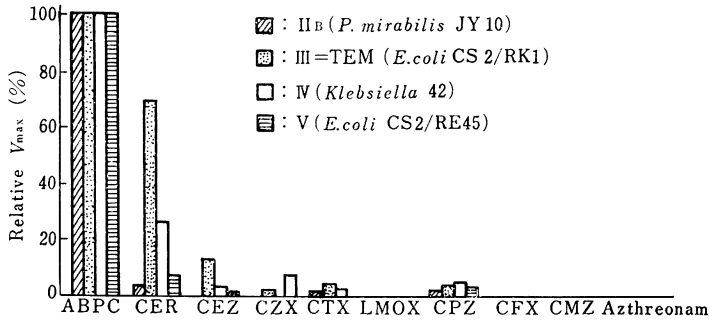


Fig. 16 Relative hydrolysis ratios of various β -lactam antibiotics by cephalosporinase-type β -lactamases produced by gram-negative bacteria

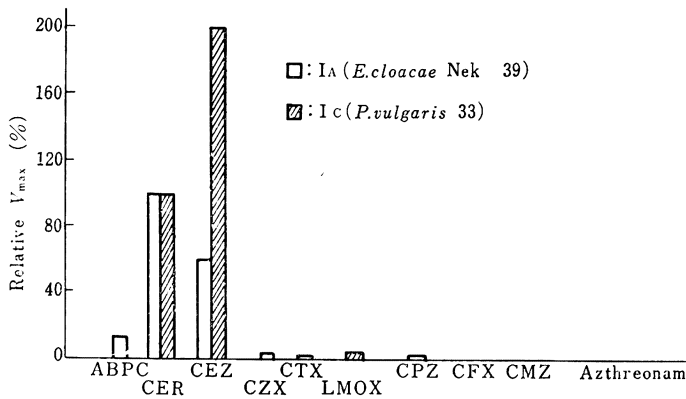
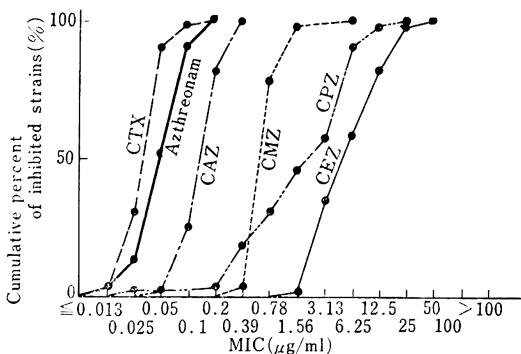


Fig. 17 Sensitivity distribution of 52 substrains of *E. coli* CS 2 carrying various R (bla) plasmids to Azthreonam and various cephem antibiotics



は、中等度の抗菌力を示すにすぎなかった (Fig. 11)。 *P. maltophilia* および *A. calcoaceticus* に対する Azthreonam の抗菌力は弱く、CAZ よりかなり劣ってい

た (Fig. 12, 13)。 *H. influenzae* に対しては、 Fig. 14 のように ABPC 耐性株を含めて Azthreonam は強い抗菌力を示すが CTX には劣る。

2. β -lactamase に対する安定性

Azthreonam は弱毒グラム陰性桿菌が染色体性に作る、cephalosporinase (CEPase) 型の Ia および Ic 型 β -lactamase、R プラスミドによる III=TEM、V=OX A や *P. mirabilis*、*K. pneumoniae* が染色体性に産生する II および IV 型などの penicillinase (PCase) 型 β -lactamase すべてに高い安定性を示し、 Fig. 15 および 16 のように全く加水分解されない。したがって Fig. 17 のように 52 種類の R (bla) プラスミドを伝達した *E. coli* CS 2 の亜株には R⁻ 菌と同等の強い抗菌力を示した。

Azthreonam の K_i 値は、 Table 1 のように Ia 型 CEPase には小さく、結合親和性は高いが、 Ic 型にはかなり低い親和性をもち、 II、 III、 IV および V 型 β -lactamase には K_i 値は極めて大きく事実上ほとんど結合しない。したがって、 R プラスミドを保有する菌の

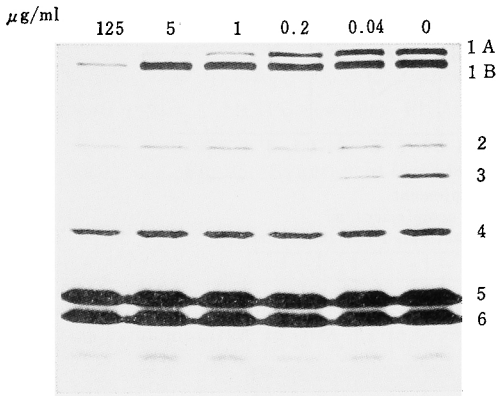
Table 1 K_i values of Azthreonom to various types of β -lactamase produced by gram-negative bacteria

Type	Enzyme Source	Specific activity (unit/mg)	K_m (μ M)	K_i (μ M)
			CER, ABPC	Azthreonom
I a	<i>E. cloacae</i> Nek39	201.0	125	0.014
I c	<i>P. vulgaris</i> 33	139.8	132	52.8
II	<i>P. mirabilis</i> JY10	256.5	50	37,300
III	<i>E. coli</i> CS2/RK1	863.6	50	23,200
IV	<i>Klebsiella</i> 42	100.6	36	15,300
V	<i>E. coli</i> CS2/RE45	18.0	26	2,850

Fig. 18 Competition of Azthreonom to the penicillin-binding proteins of *E. coli*. The membrane fraction was pretreated with indicated amounts of Azthreonom at 30°C for 10 min., followed by the addition of ¹⁴C-PCG at 30°C for further 10 min.

Azthreonom

E. coli NIHJ JC-2



β -lactamase には加水分解もされず、結合親和性による耐性もほとんど出ないので、Rプラスミドの有無は Azthreonom 感受性に影響しないと考えられる。結合親和性による耐性株出現の心配は、Ia 型酵素を大量に生産する *Enterobacter* などに限られるであろう。

3. Azthreonom の PBP に対する結合親和性

Azthreonom は、*E. coli* の PBP に対し Fig. 18 のとおり、低濃度で 1A および 3 に、やや濃度が高くなると 1B に結合する。*S. marcescens* および *A. calcoaceticus* の PBP (Fig. 19) には、低濃度で 3 に、25 μ g/ml の中濃度ではすべての画分に親和性を示す。

以上の結果から、sub MIC の Azthreonom 存在下で培養された菌は filament 化が著しいと考えられるが、これは実際の観察結果によく合う。

Fig. 19 Competition of Azthreonom to the penicillin-binding proteins of *S. marcescens* and *A. calcoaceticus*. The membrane fractions were pretreated by indicated amounts of Azthreonom at 30°C for 10 min., followed by the addition of ¹⁴C-PCG at 30°C for 10 min.

Azthreonom

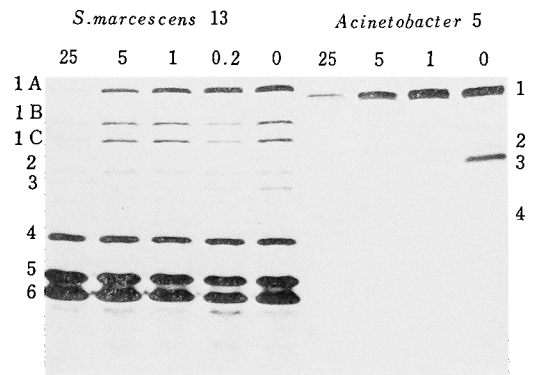


Fig. 20 Bactericidal effect of Azthreonom and Cefoperazone on *E. coli* NIHJ JC-2

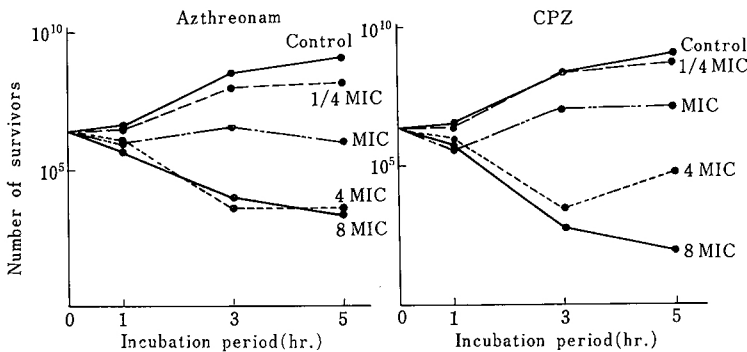


Fig. 21 Bactericidal effect of Azthreonom and Cefoperazone on *P. aeruginosa* 18S

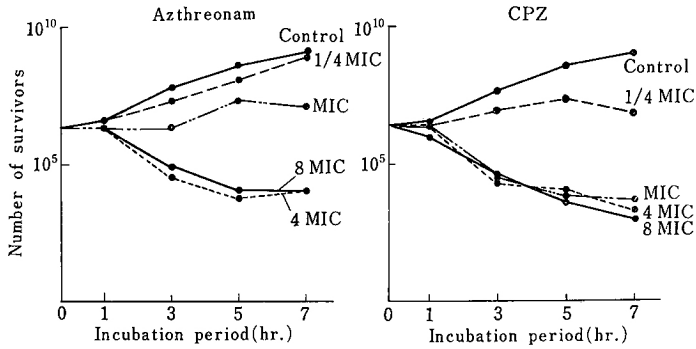


Fig. 22 Synergy of bactericidal effects between the complement and sub-MIC cephem antibiotics or Azthreonom

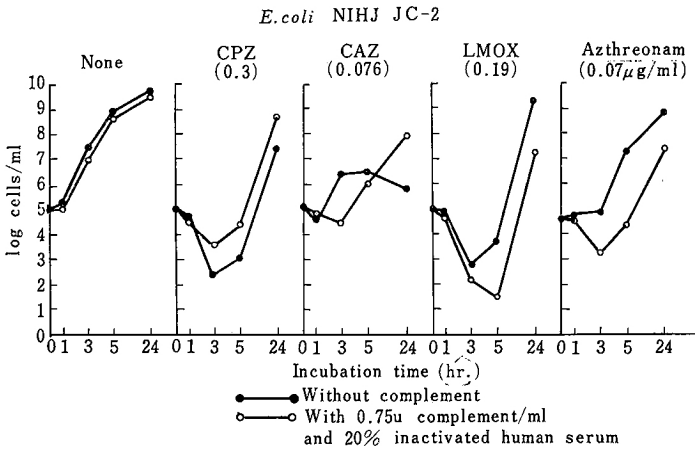
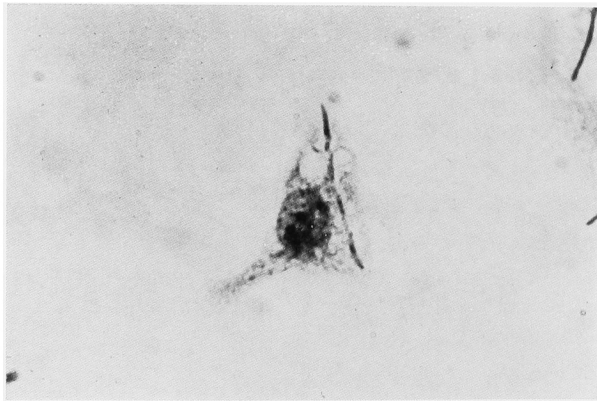


Fig. 23 Light-microscopy of mouse cultured macrophages phagocytizing the cells of *E. coli* NIHJ JC-2 in the presence of 1/8 MIC of Azthreonom



4. Azthreonom の殺菌力の検討

Azthreonom は, Fig. 20 および 21 に示すとおり, *E. coli* および *P. aeruginosa* に対し, sub MIC では殺菌力は弱いながら 4 MIC 以上になると CPZ と同程度の殺菌力を示す。

5. 補体および Mφ と Azthreonom の協力的殺菌作用

E. coli NIHJ JC-2 に対し, Fig. 22 のように, Azthreonom の 50% 発育阻止濃度 (ID₅₀) 存在下では, 補体との間に協力的殺菌作用が認められる。その度合いは, LMOX より若干劣るが CAZ より強い。ちなみに CPZ は, ヒトの血清蛋白に対する結合率が高いため, 補体の存在により他のものとは逆に殺菌力が低下する。

sub MIC の Azthreonom 存在下で培養された菌は, filament 化するが, 培養 Mφ によく食菌消化される。1/8 MIC の Azthreonom でも Mφ が存在すれば治療効果が期待できることを示唆する成績が Fig. 23 の光顕像でも, Fig. 24 の電顕像でも観察された。

6. Azthreonom と狭域半合成ペニシリンとの協力作
用

Azthreonom は, PCase に抵抗性の狭域半合成ペニシリンである MCIPC または MFIPC と組み合わせると, Fig. 25 のように *S. aureus* に対しても *E. coli* に対しても相当程度の協力作用が認められる。*S. aureus* および *E. coli* に対する MCIPC との間の FIC index

Fig. 24 Electron-microscopy of mouse cultured macrophages phagocytizing the cells of *E. coli* NIHJ JC-2 in the presence of 1/8 MIC of Azthreonom

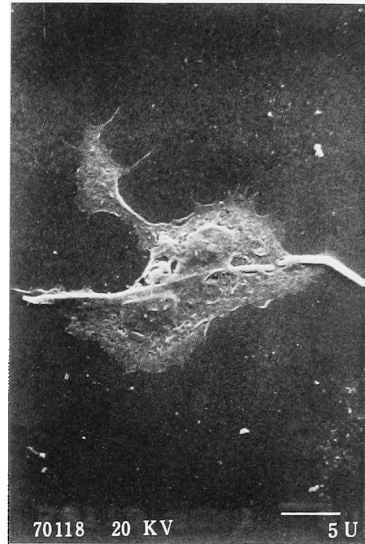
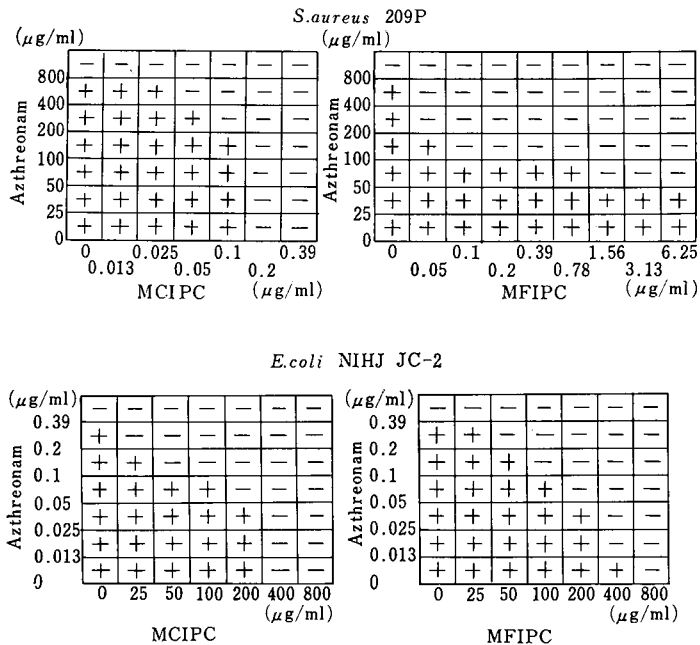


Fig. 25 Synergy of Azthreonom with cloxacillin and flucloxacillin



はそれぞれ、0.75 および 0.38 であった。

III. おわりに

Azthreonam は、グラム陽性菌には作用は弱い、グラム陰性菌では緑膿菌を含め強い抗菌力を示す。特に *Proteus* 属、*Citrobacter* 属、*Serratia* 属、*H. influenzae* などには第 3 世代 cephem に優るとも劣らない抗菌力を持ち、*P. aeruginosa* には CPZ に優り CFS と同程度の力をもつ。

各種細菌の産生する β -lactamase には、CEPase 型であっても、PCase 型であっても全く加水分解を受けないうえ、Ic 型以外の酵素には結合親和性も低いので、耐性菌は *Enterobacter* など、この酵素を多量に作る菌種以外では出にくいであろう。

Azthreonam は、*E. coli*、*S. marcescens*、*A. calcoaceticus* などの PBP3 および 1A に高い親和性を 1Bs に中等度の親和性を示す。菌は sub MIC の Azthreonam 存在下で培養されると filament 化するが、MIC を若干上回る濃度で殺菌がみられる。

Azthreonam の特徴の一つは、生体の感染防御因子との協力が良好なことである。すなわち殺菌力を示さない程度の補体と、 ID_{50} の Azthreonam を組み合わせると、*E. coli* でも *P. aeruginosa* でも協力的殺菌作用がみられる。特に他の薬剤では補体との協力的殺菌作用が出にくい *P. aeruginosa* でそれが認められたことは、将来の臨床応用にどのように反映するか興味深い。

以上のとおり、Azthreonam はグラム陰性菌による感染症には有用性が高いが、グラム陽性菌に作用が弱いた

め、両者の混合感染の場合には、なんらかの対策が必要である。Azthreonam と MCIPC や MFIPC を組み合わせると、協力作用がみられるので、グラム陽性、陰性菌の混合感染菌には、このような併用療法が有用であろう。

文 献

- 1) 横田 健・ β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。モダンメディア別冊 24 (7) : 360~377, 1983
- 2) ROSS, G. W. & C. H. O'CALLAGHAN: β -lactamase assay. *Methods Enzymol.* 43 : 69~85, 1975
- 3) RUBIN, F. A. & D. H. SMITH: Characterization of R factor β -lactamases by the acidimetric method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3 : 68~73, 1973
- 4) SPRATT, R. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 72 : 2999~3003, 1975
- 5) YOKOTA, T. & R. SEKIGUCHI: Ceftizoxime (CZX), a novel cephalosporin with high affinity for penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* (Biotype EL TOR). *Chemotherapy* 28 (5) : 44~49, 1980
- 6) YOKOTA, T. & R. SEKIGUCHI: Synergy of T-1982 for bactericidal effect with the complement and cultured macrophages. *Chemotherapy* 30 (3) : 20~28, 1982

AZTHREONAM: ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY,
STABILITY TO β -LACTAMASES, AND THE SYNERGY
OF BACTERICIDAL EFFECT WITH THE
COMPLEMENT, AND MOUSE CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, REIKO YOSHIDA and EIKO SUZUKI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

Azthreonom is the first synthetic monobactam. The activity of Azthreonom to gram-positive bacteria was weak, although it manifested higher or same growth inhibitory effect on *E. coli*, *K. pneumoniae*, every species of genus *Proteus*, *C. freundii*, [*S. marcescens* and *H. influenzae* than 3rd generation oxime-type cephem antibiotics. Azthreonom showed antipseudomonal activity as strong as cefsulodin to *P. aeruginosa*, the activity, however, was moderate to *P. cepacia* and *P. maltophilia*.

Since Azthreonom possessed a high binding affinity to the penicillinbinding protein (PBP) 3 and 1A of *E. coli*, *S. marcescens* etc., bacterial filamentous cells were induced *in vitro* in the presence of this drug. Azthreonom, however, was expected marked bactericidal activity *in vivo* because of its synergy of bactericidal effect with the serum complement and macrophages.

In cases of mixed infections by gram-positive and gram-negative bacteria, combination of Azthreonom and semisynthetic β -lactamase-tolerant penicillins, i. e. cloxacillin, flucloxacillin etc., was recommended because of their mutual compensation of antibacterial spectra.