

Azthreonom (SQ 26, 776) に関する細菌学的評価

大槻 雅子・後藤 季美・西野 武志・谷野 輝雄

京都薬科大学微生物学教室

新しく開発された β -ラクタム抗生物質でモノバクタムに属する Azthreonom の細菌学的評価を Latamoxef (LMOX), Cefmenoxime (CMX) および Cefoperazone (CPZ) を比較薬として検討し、以下の成績を得た。

1. Azthreonom は、グラム陰性菌群に対し、LMOX, CPZ より優れ、CMX とほぼ同等の抗菌スペクトラムを有していたが、グラム陽性菌群、嫌気性菌群に対しては、ほとんど抗菌力を示さなかった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布において Azthreonom は、*Haemophilus* 属で CMX, CPZ に劣るものの、*Pseudomonas* 属を含む他のグラム陰性菌に対しては最も優れた抗菌力を示した。

3. 接種菌量による MIC, MBC の変動は、4 剤とも、ほとんどみられなかった。接種菌量と殺菌効果について検討したところ、4 剤とも菌量の増加により殺菌力の低下が認められた。

マウス実験の感染症に対する治療効果への菌量の影響は、Azthreonom が最も受けにくく、次いで CMX, LMOX, CPZ の順であった。

4. Azthreonom は、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* に対して作用濃度に応じた殺菌作用を示した。

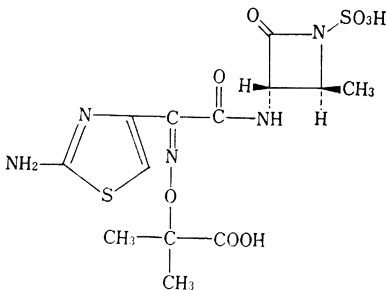
5. いずれの薬剤も MIC 値と 20 時間 MLC 値はほとんど同じであったが、3 時間あるいは 6 時間 MLC 値との間には大きな差が認められた。

6. マウス実験の感染症に対する Azthreonom の治療効果は、*E. coli*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* で 4 剤中、最も優れていたが、*K. pneumoniae* に対しては、CMX, CPZ に、*Proteus morgani* に対しては CMX, LMOX に劣っていた。

7. Azthreonom を *E. coli*, *P. aeruginosa* に作用させた場合の形態変化を観察したところ、菌体は著しく伸長化し溶菌も認められた。また、*E. coli* のペニシリン結合蛋白質に対し Azthreonom は PBP 3 に強い親和性を示した。

Azthreonom は、新しく米国スクイブ社で開発された“モノバクタム”系抗生物質で Fig. 1 に示す構造式を有している。化学名は (-)-2-[(Z)-[[1-(2-amino-4-thiazolyl)-2-[(2S, 3S)-2-methyl-4-oxo-1-sulfo-3-azetidinyl]amino]-2-oxoethylidene]amino]oxy]-2-methylpropionic acid, 分子式 $C_{13}H_{17}N_5O_8S_2$, 分子量 435.44

Fig. 1 Chemical structure of Azthreonom



の白色の結晶性粉末である。

本薬剤はグラム陰性菌に対し広範囲な抗菌力を示すがグラム陽性菌、嫌気性菌に対してはほとんど活性をもたないという特徴的な抗菌スペクトラムを有し β -lactamase に対しては極めて安定であるが、CXase により多少、分解されると報告されている¹⁾。

今回、われわれは、Latamoxef, Cefmenoxime および Cefoperazone を比較薬として Azthreonom の細菌学的評価を検討した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株および使用薬

教室保存の標準株と臨床分離株を用いた。薬剤としては Azthreonom (947 μ g/mg), Latamoxef (LMOX, 924 μ g/mg), Cefmenoxime (CMX, 941 μ g/mg), Cefoperazone (CPZ, 930 μ g/mg), Carbenicillin (CBPC, 700 μ g/mg) を用いた。

2. 感受性測定法

前培養に tryptosoya broth (ニッスイ), 感受性測定用培地に heart infusion agar (ニッスイ) を用い日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法²⁾ に従って行なった。

なお, *Streptococcus* 属, *Corynebacterium diphtheriae* には, 10% 馬脱繊維血液を添加した同培地を用いて測定した。

嫌気性菌には GAM agar (ニッスイ) を用い, 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法³⁾ に従って測定した。

Neisseria 属には, GC 培地 (ニッスイ) を用いローソク培養法による 37°C, 48 時間培養後の MIC を求めた。

3. 接種菌量の影響

a) MIC, MBC への影響

種々の割合に調製した菌液を用いて液体希釈法により MIC を, 次いで最小殺菌濃度 (MBC) を求めた。

b) 殺菌効果に及ぼす影響

Heart infusion broth (HIB, ニッスイ) 中で増殖させた対数期の菌数の異なる時点で 10MIC に相当する濃度の薬を作用させ, 生菌数を測定することにより接種菌量と殺菌効果の関連性を検討した。

c) マウス実験的感染症に対する治療効果への影響

ddY 系雄性マウス (体重 18±1g) 1 群 10 匹を用い, 6% gastric mucin (Nutritional Biochemicals Corporation) と等量混合した菌量の異なる菌液をそれぞれマウス腹腔内に接種し, 接種 2 時間後に 1 回, Azthreanam, LMOX, CMX, CPZ, CBPC で皮下治療を行なった。その後 7 日間, マウスの生死を観察し, 7 日目の生存率から LITCHFIELD-WILCOXON 法⁴⁾ により ED₅₀(mg/mouse) およびその 95% 信頼限界値を算出し, 治療効果への菌量の影響をみた。

4. 殺菌作用

HIB で増殖させた対数期の菌に種々の濃度の薬を作用させ, 4 時間までの生菌数を測定した。

5. MIC と MLC

最小発育阻止濃度測定用平板から経時的に薬剤無添加の平板にレプリカを行ない, 3, 6, 20 時間に接種時の菌が 99.9% 殺菌されるに要する濃度 minimum lethal concentration (MLC) を求めた。

6. マウス実験的感染症に対する治療効果

ddY 系雄性マウス (体重 18±1g) 1 群 10 匹を用い, 6% gastric mucin (Nutritional Biochemicals Corporation) と等量混合した菌液をマウス腹腔内に接種した。接種 2 時間後に 1 回皮下投与を行ない, 7 日目のマウス

の生存率から LITCHFIELD-WILCOXON 法⁴⁾ により ED₅₀ (mg/mouse) およびその 95% 信頼限界値を算出し, 治療効果を求めた。

7. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬を含ませたフィルム寒天培地を作製し, 一方, 対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し, これを寒天培地にかぶせ, パラフィンで封入した。この標本を倒立位相差顕微鏡 (Nikon) で観察した。

8. ペニシリン結合蛋白質 (PBP) への親和性

SPRATT の方法⁵⁾ により *E. coli* の膜画分を調製し, [¹⁴C]-penicillin G (PCG) とのコンペティションにより各々の PBP への Azthreanam の親和性を検討した。また, X 線フィルム上の [¹⁴C]PCG による感光度を Dual-wavelength TLC scanners 90 (Shimadzu Co.) で測定し, この値から 50% 阻害濃度を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌, グラム陰性菌, および嫌気性菌に対する試験管内抗菌力について検討した結果を Table 1~6 に示した。Azthreanam はすべてのグラム陰性菌に対して抗菌力を示し, その抗菌力は, LMOX, CPZ より優れ, CMX とはほぼ同等であった。

P. aeruginosa に対しては, Azthreanam が最も優れていた。

一方, グラム陽性菌, 嫌気性菌に対しては, Azthreanam は, ほとんど抗菌力を有さず, 表には示していないが *S. aureus* では, その MIC 値は 800~1,600 μg/ml であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床分離株に対する感受性分布と累積分布を 10⁸ cells/ml と 10⁹ cells/ml について検討した結果を Fig. 2~29 に示した。

a) *S. aureus* の場合

Fig. 2, 3 に示すように, 接種菌量が 10⁸ および 10⁹ cells/ml のいずれの場合も, Azthreanam の MIC は, 100 μg/ml 以上に分布していた。

接種菌量が 10⁸ cells/ml の場合は, Fig. 2 に示すように LMOX の感受性ピークは, 3.13 μg/ml, CMX, CPZ のピークは 1.56 μg/ml であった。

10⁹ cells/ml の場合は, Fig. 3 に示すように LMOX は, すべての株が 3.13 μg/ml にその MIC をもち, CMX は 1.56~3.13 μg/ml に, CPZ は 0.78~3.13 μg/ml に分布していた。いずれの菌量においても Azthreanam の抗菌力は他剤に比べて劣っていた。

b) *S. pyogenes* の場合

接種菌量が 10⁸ cells/ml の場合, Fig. 4 に示すように

Table 1 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)					
Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	>100	6.25	1.56	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	>100	12.5	1.56	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	>100	6.25	1.56	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	>100	12.5	1.56	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	>100	6.25	0.78	0.78	
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80 (PC ^r)	>100	6.25	0.78	3.13	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>100	25	6.25	6.25	
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	25	3.13	0.012	0.10	
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	25	3.13	0.025	0.39	
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	>100	>100	
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	>100	>100	>100	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	>100	3.13	0.012	0.05	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	100	3.13	0.012	0.10	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	>100	1.56	0.006	0.05	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12.5	0.78	0.025	0.10	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>100	12.5	1.56	1.56	
<i>Bacillus anthracis</i>	>100	6.25	12.5	6.25	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	>100	12.5	0.78	3.13	

MIC (μ g/ml)

Table 2 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Gram-positive bacteria (10^6 cells/ml)					
Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	>100	6.25	1.56	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	>100	6.25	0.78	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	>100	6.25	0.78	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	>100	6.25	0.78	1.56	
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	>100	6.25	0.78	0.78	
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80 (PC ^r)	>100	6.25	0.78	1.56	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>100	12.5	6.25	6.25	
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	25	3.13	0.012	0.10	
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	25	1.56	0.012	0.10	
<i>Streptococcus faecalis</i>	>100	>100	100	12.5	
<i>Streptococcus viridans</i>	>100	>100	100	12.5	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	50	1.56	0.006	0.05	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II	50	3.13	0.006	0.10	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	50	1.56	0.006	0.05	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12.5	0.78	0.012	0.10	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>100	6.25	0.78	0.78	
<i>Bacillus anthracis</i>	>100	6.25	12.5	3.13	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	>100	12.5	0.78	3.13	

MIC (μ g/ml)

Table 3 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Gram-negative bacteria (10^8 cells/ml)

Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.012	0.012	\leq 0.006	0.05
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.025	\leq 0.006	0.012	0.05
<i>Haemophilus influenzae</i> N-36	0.05	0.05	0.012	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.20	0.20	0.10	0.20
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.39	0.78	0.05	0.10
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.05	0.10	0.05	0.05
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	25	3.13	12.5	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.025	0.10	0.025	0.10
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.012	0.05	0.025	0.10
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.012	0.05	0.012	0.20
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.012	0.10	0.025	0.20
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.10	0.20	0.10	0.39
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.10	0.39	0.05	0.10
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.10	0.20	0.025	0.05
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	0.10	0.025	0.10
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.025	0.10	0.025	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.05	0.20	0.05	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.012	0.10	0.025	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.20	0.78	0.39	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.05	0.39	0.10	0.20
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.20	0.39	0.39	0.78
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.20	0.20	0.39	3.13
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.10	0.39	0.20	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.012	0.39	0.012	0.05
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	\leq 0.006	0.20	\leq 0.006	0.78
<i>Proteus morgani</i> Kono	0.78	0.20	0.78	12.5
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	\leq 0.006	0.025	\leq 0.006	\leq 0.006
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.025	0.20	0.012	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No.12	6.25	25	25	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	0.39	6.25	3.13	6.25

MIC (μ g/ml)

Table 4 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Gram-negative bacteria (10^6 cells/ml)				
Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.012	0.012	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.025	≤ 0.006	0.012	0.025
<i>Haemophilus influenzae</i> N-36	0.025	0.025	0.012	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.20	0.20	0.10	0.20
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.10	0.20	0.012	0.05
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.025	0.10	0.012	0.012
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.78	0.39	0.39	1.56
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.012	0.05	0.012	0.10
<i>Salmonella typhi</i> O-901	≤ 0.006	0.05	0.012	0.10
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.012	0.05	0.012	0.20
<i>Salmonella paratyphi</i> B	≤ 0.006	0.05	0.012	0.20
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.025	0.05	0.025	0.39
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.10	0.10	0.05	0.10
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.05	0.10	0.025	0.05
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.05	0.10	0.025	0.10
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.012	0.10	0.012	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.025	0.10	0.025	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.012	0.10	0.025	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.10	0.20	0.20	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.025	0.10	0.025	0.20
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.10	0.39	0.20	0.39
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.05	0.10	0.10	0.78
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.05	0.20	0.05	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	≤ 0.006	0.20	≤ 0.006	0.012
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	≤ 0.006	0.10	≤ 0.006	0.10
<i>Proteus morgani</i> Kono	0.012	0.10	0.025	3.13
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	≤ 0.006	0.012	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	≤ 0.006	0.10	0.012	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No.12	3.13	25	25	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	0.20	1.56	1.56	0.20

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

Table 5 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Anaerobic bacteria (10^8 cells/ml)				
Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ
<i>Clostridium tetani</i>	>100	0.39	0.78	0.025
<i>Clostridium perfringens</i>	>100	3.13	1.56	3.13
<i>Clostridium sporogenes</i>	>100	0.39	0.78	0.78
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	25	0.78	12.5	25
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	>100	0.78	12.5	25
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	>100	6.25	>100	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	>100	3.13	>100	>100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	>100	25	>100	>100
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	>100	12.5	50	>100
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	100	1.56	12.5	25
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	>100	50	50	50

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

Table 6 Antibacterial spectrum of Azthreonam, LMOX, CMX and CPZ

Organisms	Azthreonam	LMOX	CMX	CPZ
<i>Clostridium tetani</i>	6.25	0.10	0.012	0.025
<i>Clostridium perfringens</i>	12.5	0.39	0.78	1.56
<i>Clostridium sporogenes</i>	100	0.39	0.78	0.78
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	6.25	0.39	1.56	6.25
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	>100	0.78	3.13	25
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	>100	6.25	>100	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	>100	3.13	50	>100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	>100	3.13	>100	>100
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	>100	1.56	12.5	50
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	12.5	1.56	12.5	25
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	>100	50	50	25

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

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates

S.aureus 31 strains (10^8 cells/ml)

S.aureus 31 strains (10^6 cells/ml)

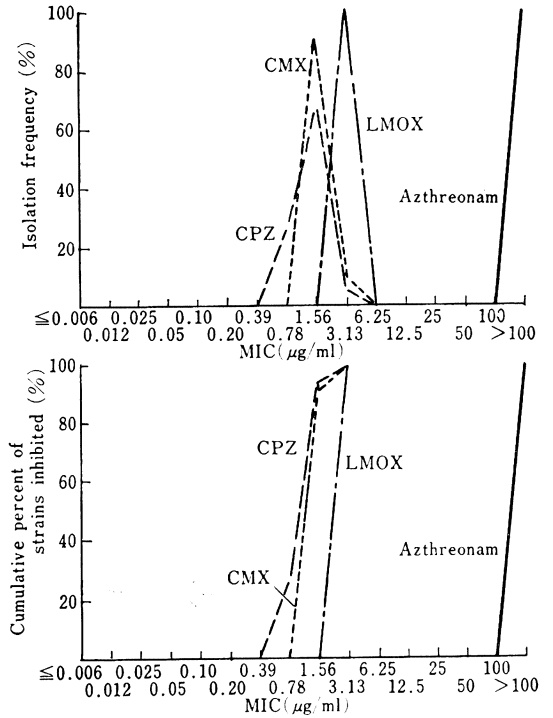
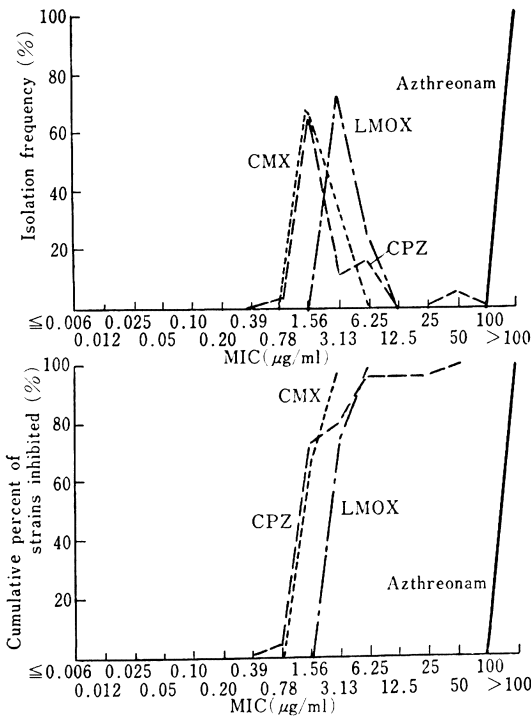


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates

S.pyogenes 17 strains (10⁸cells/ml)

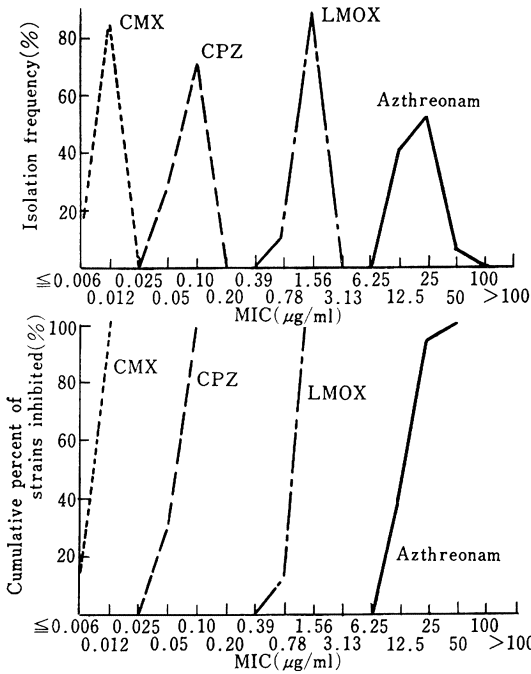


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates

S.pyogenes 17 strains (10⁶cells/ml)

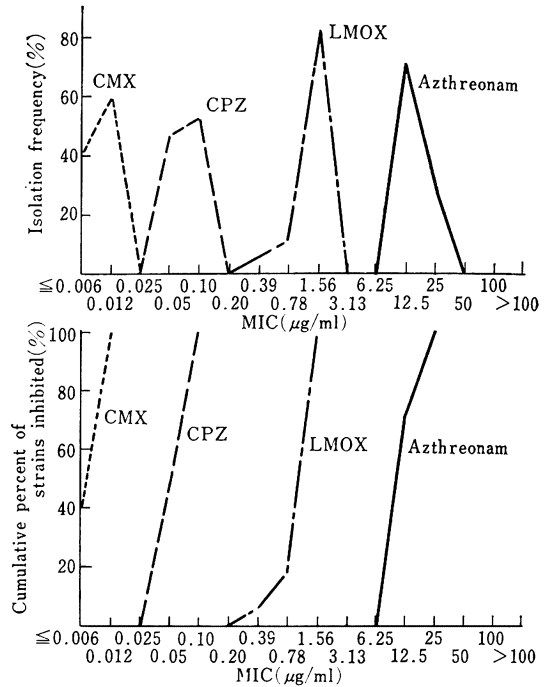


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates

E.coli 31 strains (10⁸cells/ml)

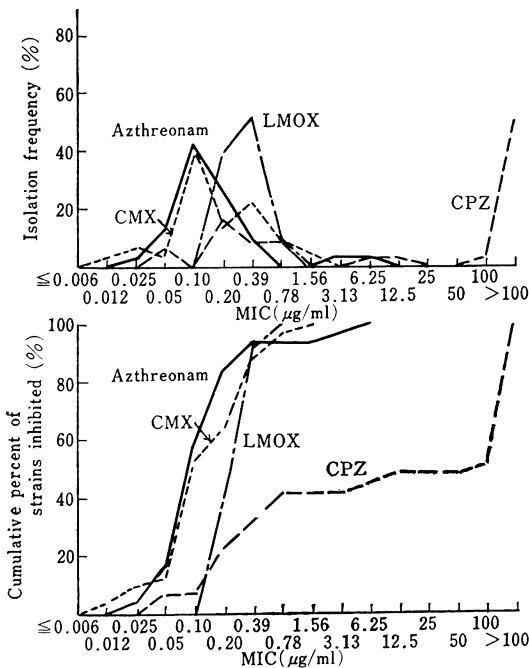


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates

E.coli 31 strains (10⁶cells/ml)

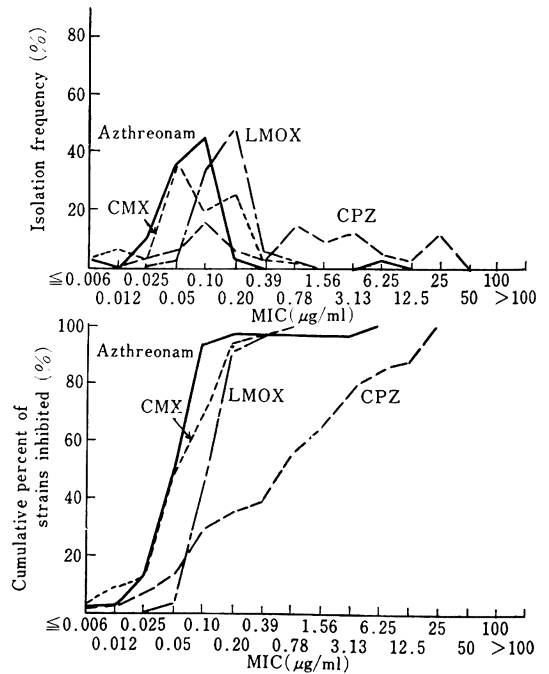


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates

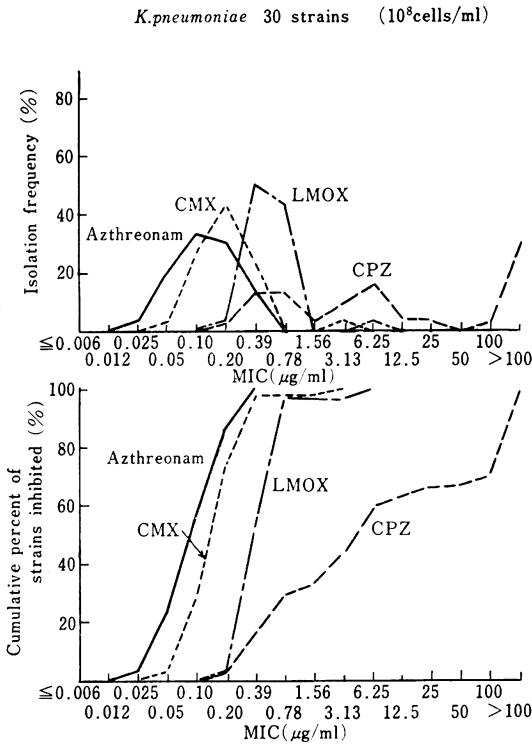


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates

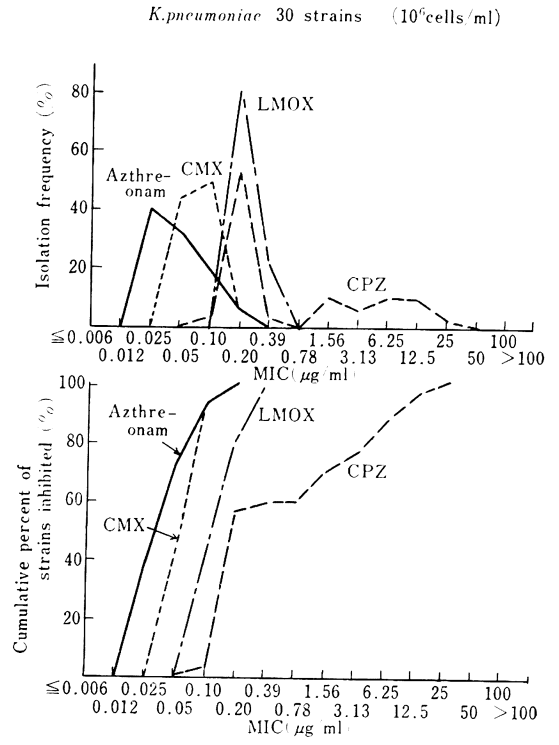


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates

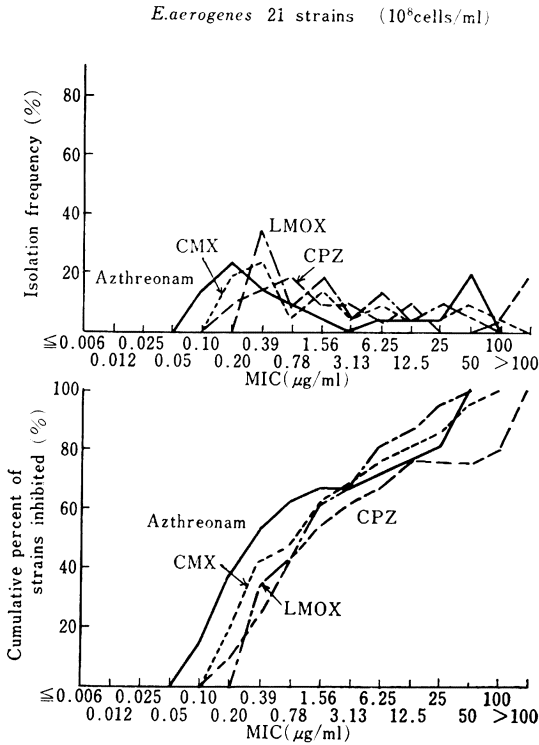


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates

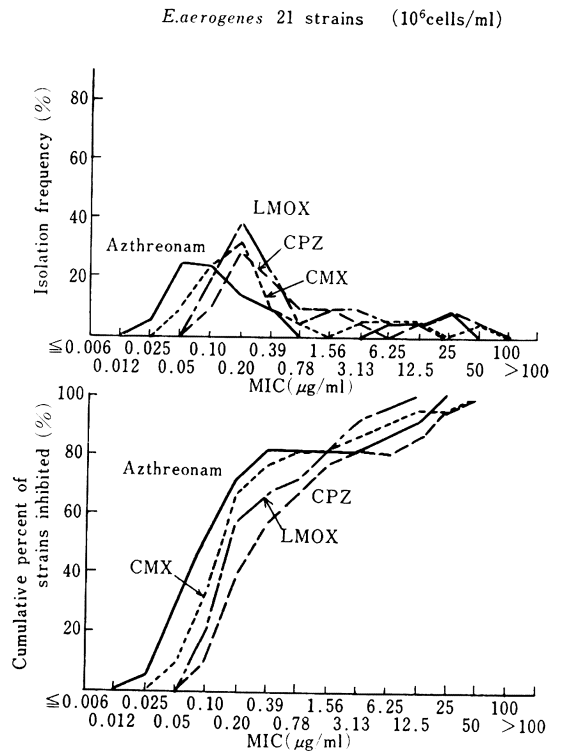


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates

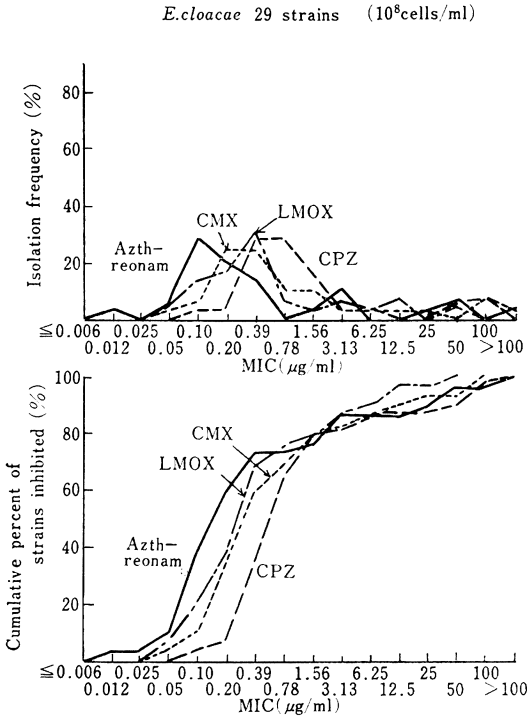


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates

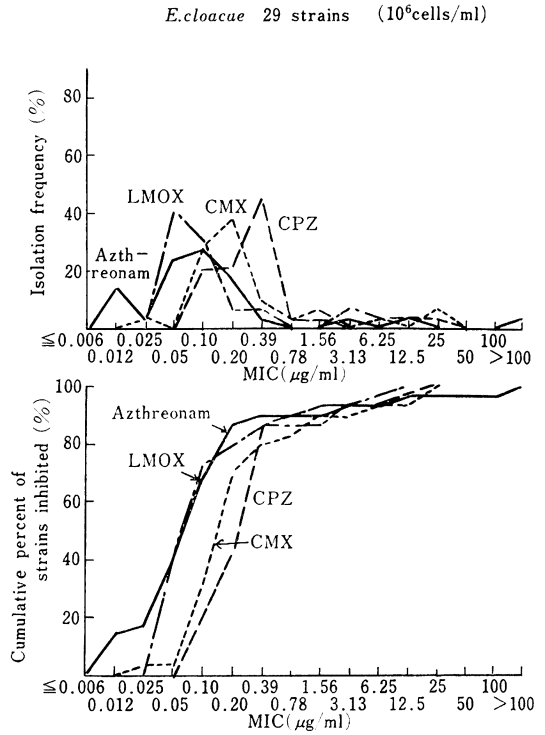


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates

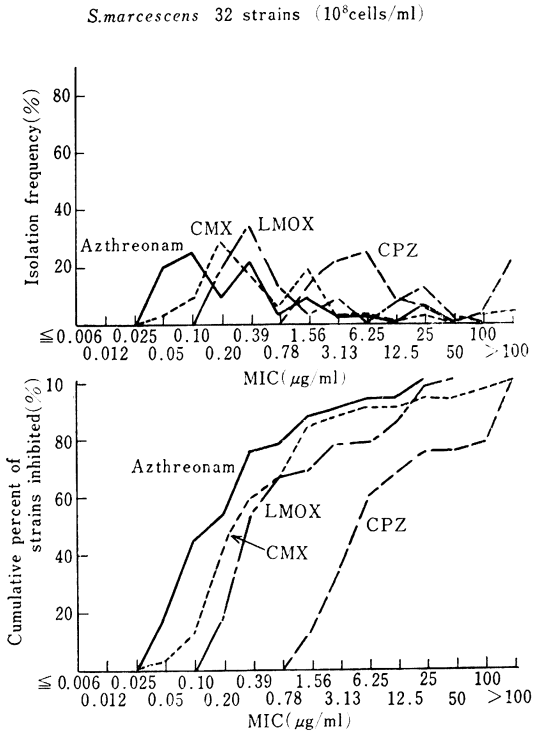


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates

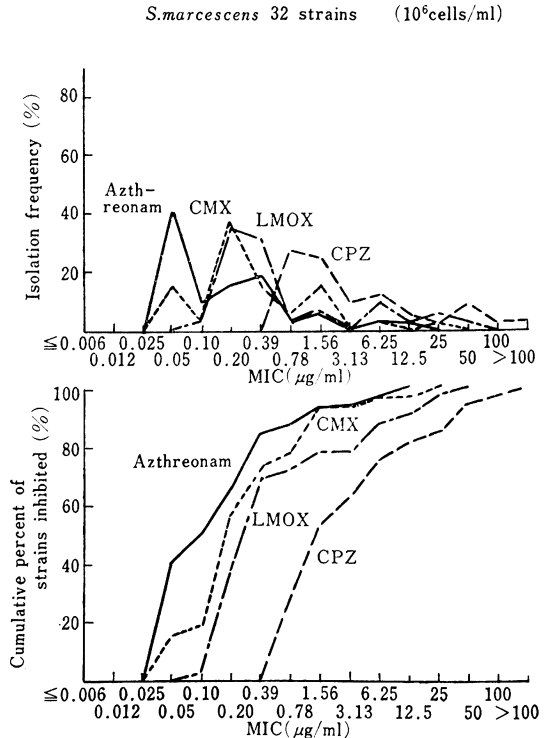


Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates

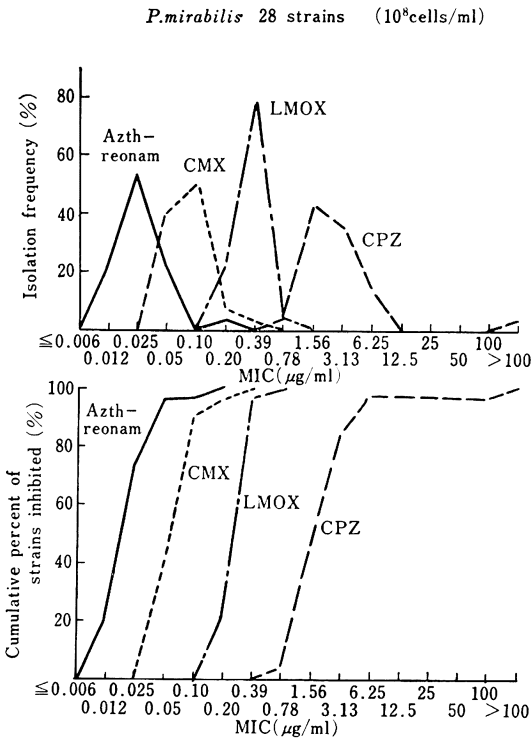


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates

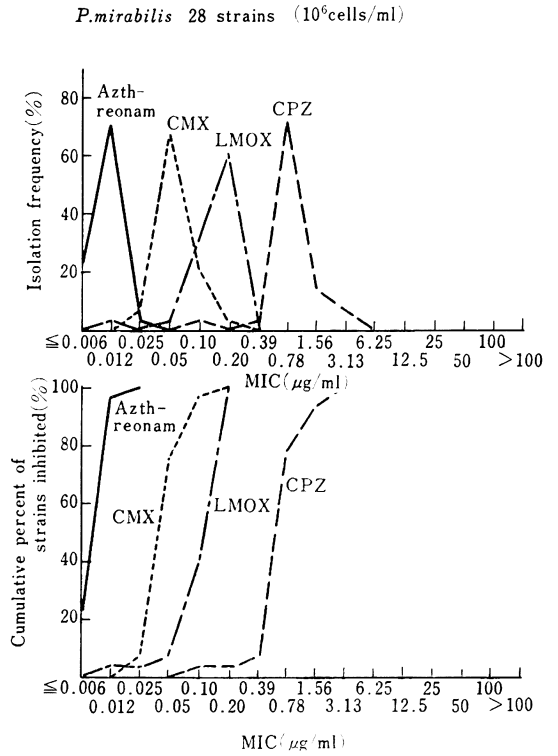


Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates

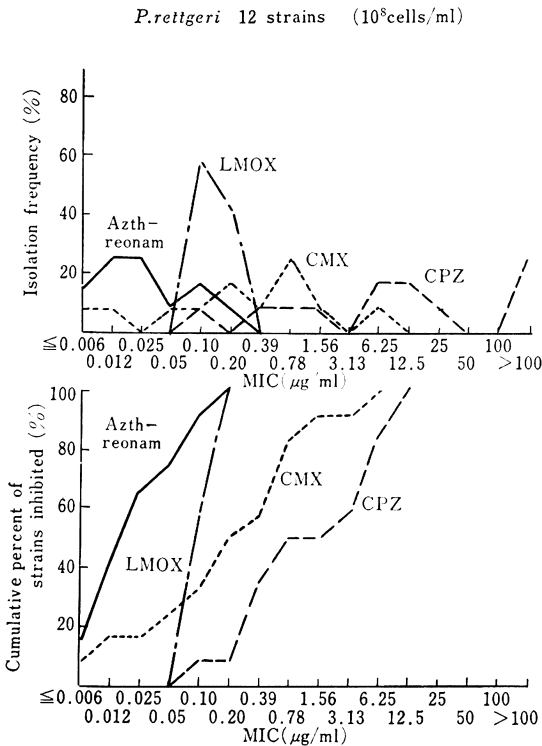


Fig. 19 Sensitivity distribution of clinical isolates

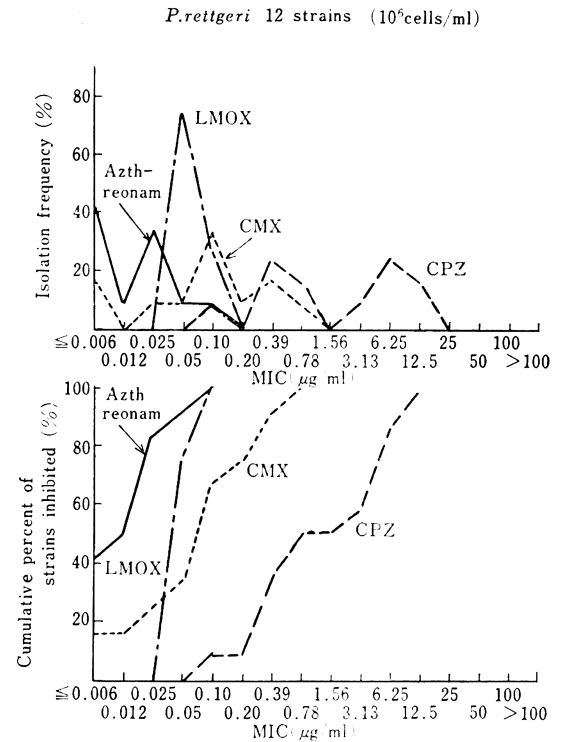


Fig. 20 Sensitivity distribution of clinical isolates

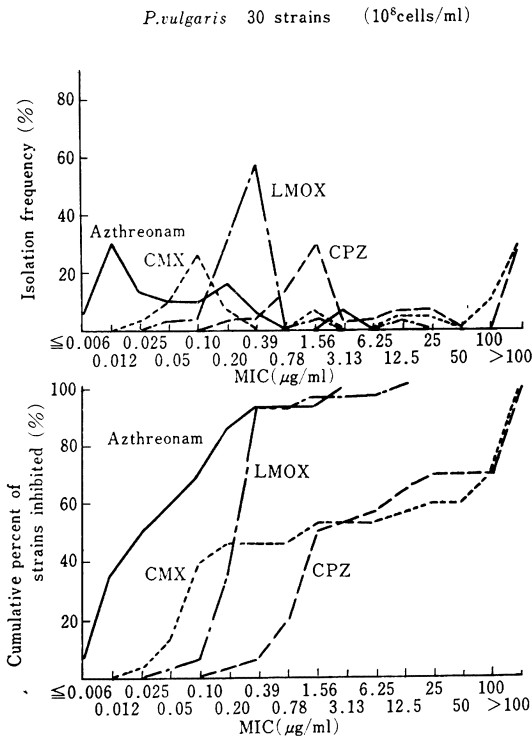


Fig. 21 Sensitivity distribution of clinical isolates

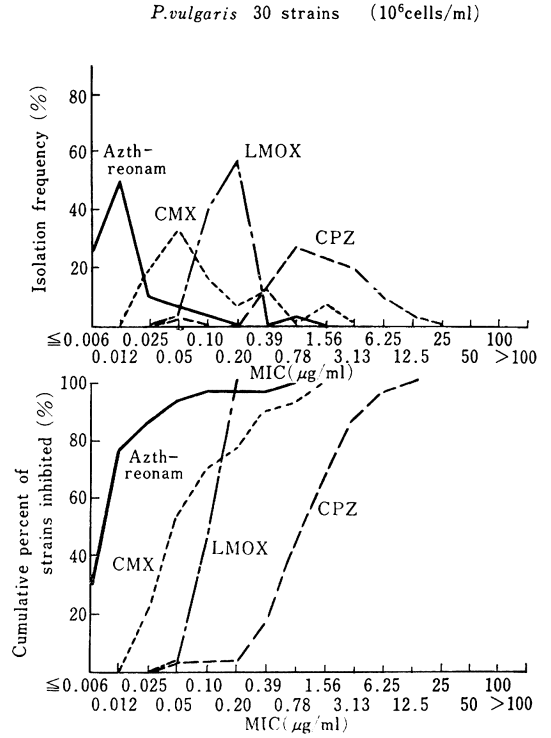


Fig. 22 Sensitivity distribution of clinical isolates

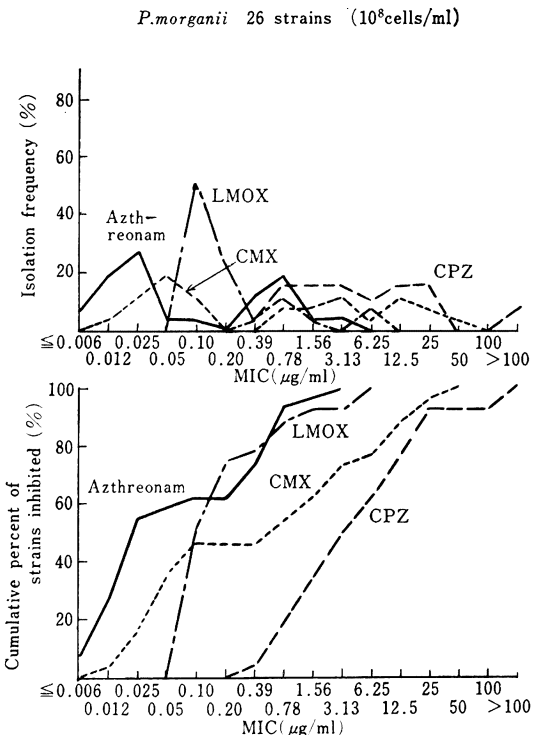


Fig. 23 Sensitivity distribution of clinical isolates

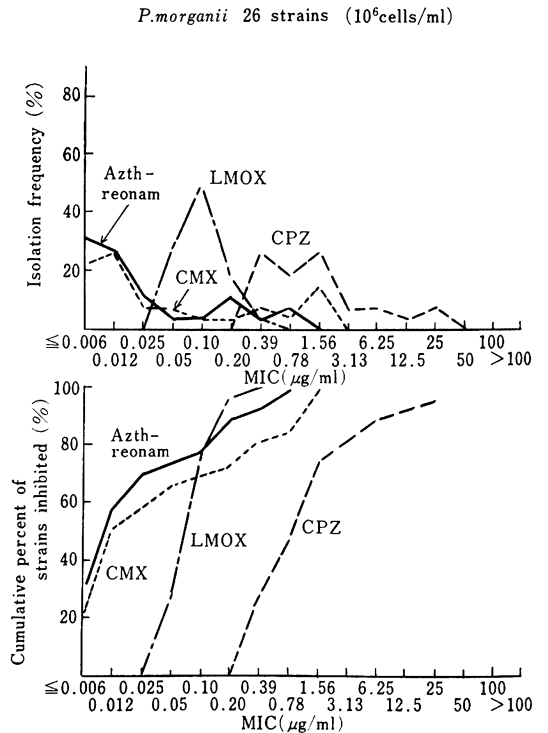


Fig. 24 Sensitivity distribution of clinical isolates

H.influenzae 27 strains (10⁸cells/ml)

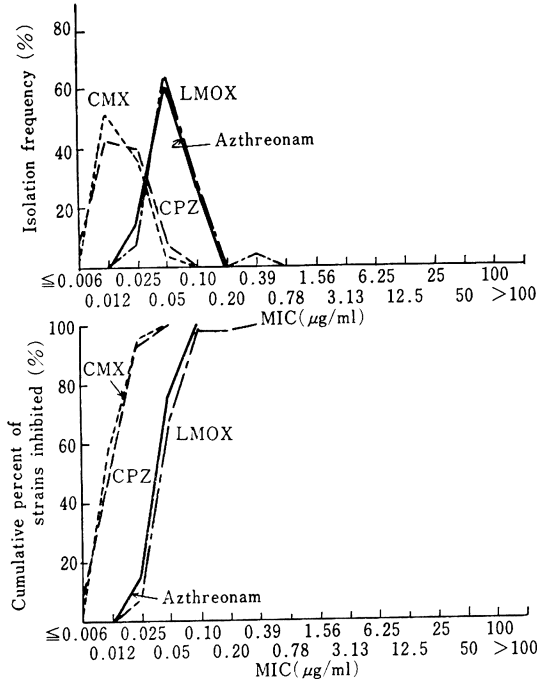


Fig. 25 Sensitivity distribution of clinical isolates

H.influenzae 27 strains (10⁶cells/ml)

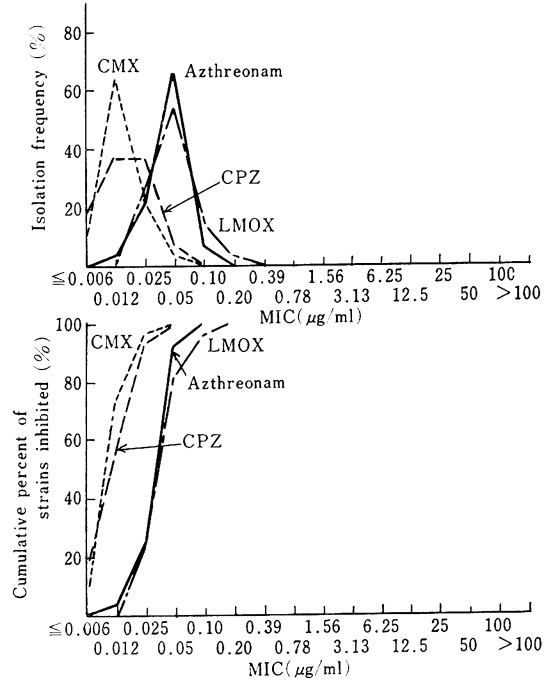


Fig. 26 Sensitivity distribution of clinical isolates

P.aeruginosa 31 strains (10⁸cells/ml)

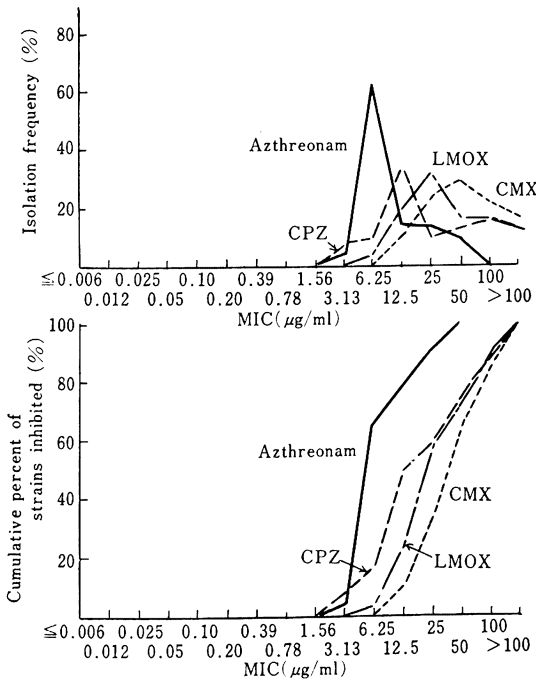


Fig. 27 Sensitivity distribution of clinical isolates

P.aeruginosa 31 strains (10⁶cells/ml)

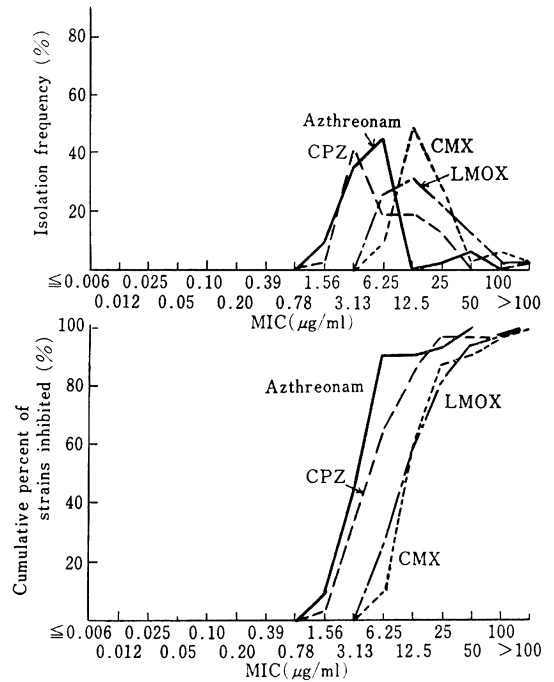
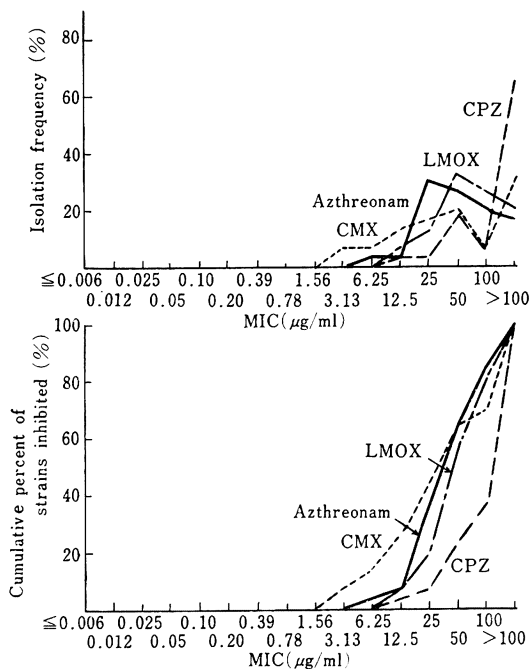


Fig. 28 Sensitivity distribution of clinical isolates

A.calcoaceticus 30 strains (10⁸cells/ml)



Azthreonom は 25 μ g/ml にピークがあり、12.5~50 μ g/ml に分布していた。一方、LMOX は、1.56 μ g/ml に、CMX は 0.012 μ g/ml に、CPZ は 0.10 μ g/ml にピークを有する分布を示した。

10⁸cells/ml の場合は、Fig. 5 に示すように Azthreonom の感受性ピークは、12.5 μ g/ml であり、12.5~25 μ g/ml に分布していた。いずれの菌量においても CMX、CPZ、LMOX、Azthreonom の順に優れていた。

c) *E. coli* の場合

10⁸cells/ml の場合は、Fig. 6 に示すように Azthreonom の感受性ピークは 0.10 μ g/ml であり、LMOX では 0.39 μ g/ml であった。CMX は 0.012~1.56 μ g/ml に分布し、CPZ は 0.05~>100 μ g/ml と幅広い分布を示していた。

10⁶cells/ml の場合も、Fig. 7 に示すように 10⁸cells/ml の場合とほぼ同様であった。

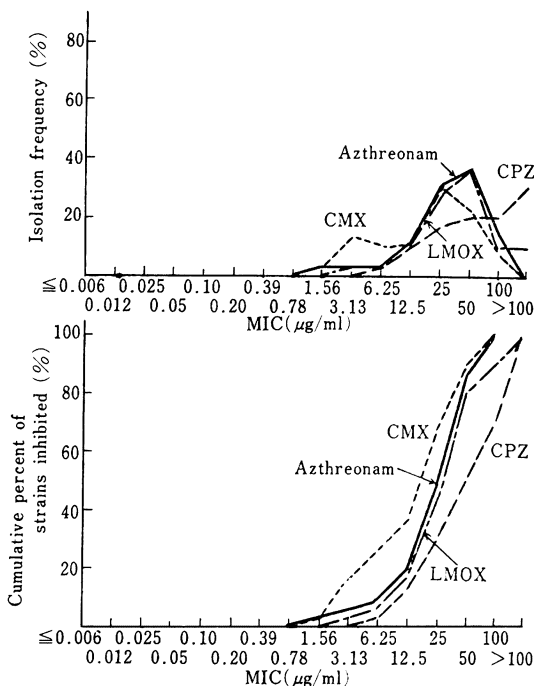
d) *K. pneumoniae* の場合

10⁸cells/ml の場合は、Fig. 8 に示すように Azthreonom は 0.025~0.39 μ g/ml に、LMOX は 0.20~6.25 μ g/ml に分布していた。CMX は 0.20 μ g/ml にピークがあり、0.05~0.39 μ g/ml に約 97% の株が分布していた。CPZ は 0.20~>100 μ g/ml と幅広く分布していた。

10⁶cells/ml の場合も Fig. 9 に示すように 10⁸cells/ml

Fig. 29 Sensitivity distribution of clinical isolates

A.calcoaceticus 30 strains (10⁶cells/ml)



の場合と同様、Azthreonom、CMX、LMOX、CPZ の順に抗菌力が優れていた。

e) *E. aerogenes* の場合

10⁸cells/ml では、Fig. 10 に示すように Azthreonom、LMOX、CMX、CPZ はともに幅広い分布を示し、4 剤間にあまり抗菌力の差が認められなかった。

10⁶cells/ml でも、Fig. 11 に示すように 10⁸cells/ml とほぼ同様であった。

f) *E. cloacae* の場合

10⁸cells/ml では、Fig. 12 に示すように Azthreonom、LMOX、CMX、CPZ はともに幅広い分布を示し、各々、0.012~>100 μ g/ml、0.05~50 μ g/ml、0.05~100 μ g/ml、0.10~>100 μ g/ml に分布していた。

10⁶cells/ml では、Fig. 13 に示すように 10⁸cells/ml とほぼ同様で、4 剤間にあまり差がみられなかった。

g) *S. marcescens* の場合

10⁸cells/ml の場合は、Fig. 14 に示すように Azthreonom は、0.05~25 μ g/ml に、LMOX は 0.20~50 μ g/ml に、CMX は 0.05~>100 μ g/ml に、CPZ は 1.56~>100 μ g/ml と、4 剤ともに幅広く分布していた。

10⁶cells/ml の場合も Fig. 15 に示すように 10⁸cells/ml の場合とほぼ同様な傾向を示した。

h) *P. mirabilis* の場合

10^8 cells/ml の場合は, Fig. 16 に示すように Azthreonom の感受性ピークは, $0.025 \mu\text{g/ml}$ であり, $0.012 \sim 0.05 \mu\text{g/ml}$ に約 96% の株が分布していた。

10^6 cells/ml の場合は, Fig. 17 に示すように 10^8 cells/ml の場合と同様, Azthreonom, CMX, LMOX, CPZ の順に抗菌力が優れていた。

i) *P. rettgeri* の場合

10^8 cells/ml の場合は, Fig. 18 に示すように Azthreonom は $\leq 0.006 \sim 0.20 \mu\text{g/ml}$ に分布していた。LMOX は $0.10 \mu\text{g/ml}$ にピークがあり, $0.10 \sim 0.20 \mu\text{g/ml}$ に分布していたが CMX は $\leq 0.006 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$, CPZ は $0.10 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ と幅広く分布していた。

10^6 cells/ml の場合も Fig. 19 に示すように 10^8 cells/ml の場合と同様, Azthreonom, LMOX, CMX, CPZ の順に抗菌力が優れていた。

j) *P. vulgaris* の場合

10^8 cells/ml では, Fig. 20 に示すように Azthreonom は $\leq 0.006 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$, LMOX は $0.05 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$, CMX は $0.025 \sim >100 \mu\text{g/ml}$, CPZ は $0.20 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布していた。

10^6 cells/ml でも Fig. 21 に示すように 10^8 cells/ml とほぼ同様な傾向を示した。

k) *P. morganii* の場合

10^8 cells/ml では, Fig. 22 に示すように, Azthreonom は $\leq 0.006 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ に分布し, $0.025 \mu\text{g/ml}$ と $0.78 \mu\text{g/ml}$ とにピークをもつ二峰性を示した。LMOX は $0.10 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に, CMX は $0.012 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ に, CPZ は, $0.39 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布していた。

10^6 cells/ml の場合も 10^8 cells/ml とほぼ同様であった。

1) *H. influenzae* の場合

10^8 cells/ml の場合, Fig. 24 に示すように Azthreonom は, LMOX とほぼ同等の分布を示し $0.05 \mu\text{g/ml}$ にピークをもち $0.025 \sim 0.10 \mu\text{g/ml}$ に分布していた。CMX, CPZ は $0.012 \mu\text{g/ml}$ にピークがあり $0.05 \mu\text{g/ml}$ で全株増殖が阻止された。

10^6 cells/ml の場合も Fig. 25 に示すように 10^8 cells/ml の場合と同様であった。

m) *P. aeruginosa* の場合

10^8 cells/ml の場合は, Fig. 26 に示すように Azthreonom の感受性ピークは, $6.25 \mu\text{g/ml}$ であり, $3.13 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ に分布していた。LMOX は $25 \mu\text{g/ml}$ に, CMX は $50 \mu\text{g/ml}$ に, CPZ は $12.5 \mu\text{g/ml}$ にピークをもち, その分布は, 各々 $6.25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$, $12.5 \sim >100 \mu\text{g/ml}$, $3.13 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ であった。

10^6 cells/ml の場合も Fig. 27 に示すように 10^8 cells/ml の場合と同様であった。

n) *Acinetobacter* spp. の場合

10^8 cells/ml の場合は, Fig. 28 に示すように Azthreonom は $6.25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に, LMOX, CPZ は $12.5 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に, CMX は $3.13 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に分布し, CPZ では約 63% の株が $>100 \mu\text{g/ml}$ であった。

10^6 cells/ml でも Fig. 29 に示すように 10^8 cells/ml の場合とほぼ同様であった。

3. 接種菌量の影響

a) MIC, MBC への影響

E. coli KC-14 を用いて検討した結果を Table 7 に示した。すなわち, 培地中の菌量を 2.7×10^4 から 2.7×10^7 cells/ml まで変化させた場合の MIC, MBC 値を測定したが, 接種菌量の影響は, ほとんどみられなかった。

b) 殺菌効果に及ぼす影響

接種菌量と殺菌作用について *E. coli* KC-14 を用いて検討した結果を Fig. 30 に示した。増殖途上の 10^6 , 10^8 cells/ml でそれぞれ 10MIC に相当する濃度を作用させた。Azthreonom, LMOX, CMX, CPZ いずれも菌量が少ない場合は, 1時間目より殺菌作用が認められたが, 菌量が高くなると, ほとんど静菌的な作用しかみられず, 4 剤ともその殺菌作用は接種菌量の影響を受けていることが認められた。

c) マウス実験的感染症に対する治療効果への影響

E. coli KC-14 を用い, マウス実験的感染症における治療効果を攻撃菌量を変え検討した結果を Table 8 に示した。攻撃菌量が 100 倍になると Azthreonom では約 6 倍, LMOX, CMX では約 8 倍, CPZ では約 12 倍, 治療効果が低下し, *in vivo* 効果も菌量により影響を受

Table 7 Influence of inoculum size of *E. coli* KC-14 on the antibacterial activity

Inoculum size (cells/ml)	Azthreonom		LMOX		CMX		CPZ	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
2.7×10^7	0.05	0.05	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.20
2.7×10^6	0.05	0.05	0.10	0.10	0.05	0.10	0.10	0.10
2.7×10^5	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.05	0.10	0.10
2.7×10^4	0.025	0.025	0.05	0.10	0.025	0.025	0.10	0.10

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

Table 8 Influence of challenge dose on ED₅₀ of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ in experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Antibiotic	Challenge dose (cells/mouse)		MIC (μg/ml)	
	1.6×10 ⁴ (28 LD ₅₀)	1.6×10 ⁶ (2800 LD ₅₀)	10 ^a	10 ^b
Azthreonom	0.0014 (0.0011~0.0018)	0.0084 (0.0059~0.012)	0.05	0.025
LMOX	0.0014 (0.0011~0.0018)	0.011 (0.0034~0.034)	0.10	0.05
CMX	0.0009 (0.00065~0.0013)	0.0074 (0.0053~0.010)	0.05	0.025
CPZ	0.0022 (0.0016~0.0029)	0.026 (0.011~0.062)	0.10	0.05

Mouse : ddY -strain, Male, 17~18g
 Challenge route : i.p. infection of 0.5ml/3% mucin
 () : 95% confidence limits

Fig. 30 Effect of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on viability of *E. coli* KC-14

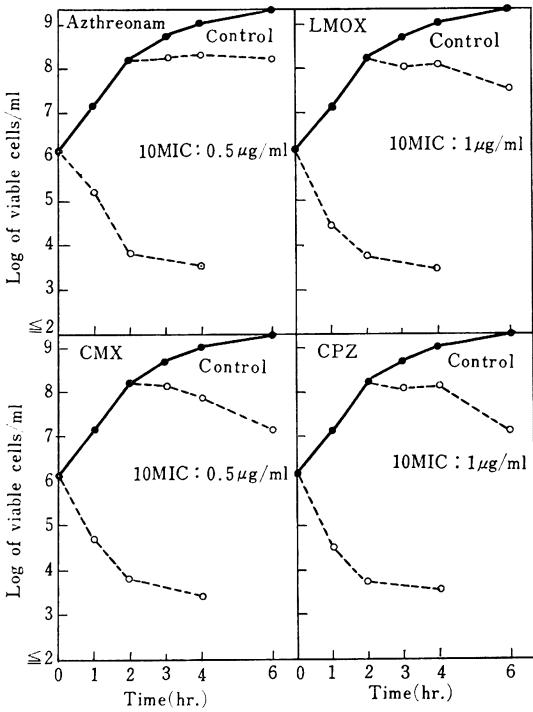
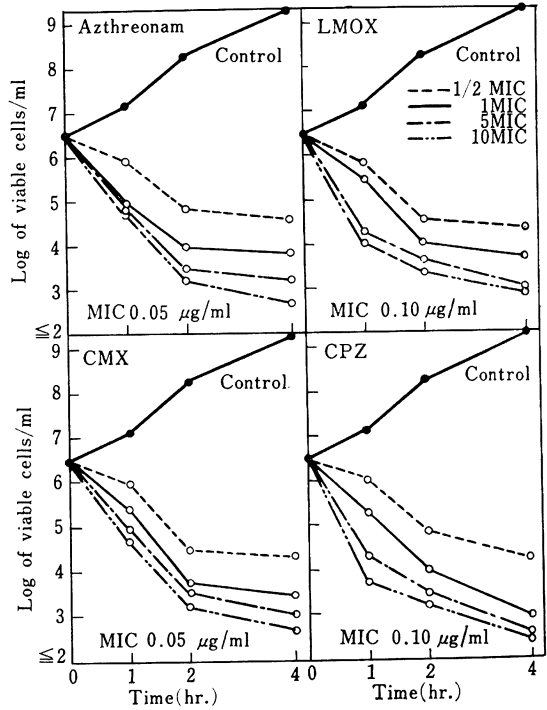


Fig. 31 Effect of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on viability of *E. coli* KC-14



けることがわかった。

4. 殺菌作用

a) *E. coli* KC-14 の場合

Fig. 31 に示すように、4 剤とも dose response のある作用を示し、1/2MIC 濃度でも殺菌作用が認められた。

b) *E. coli* K-12 の場合

Fig. 32 に示すように 4 剤とも、MIC 濃度以上で殺菌性がみられたが、1/2MIC 濃度では Azthreonom, CPZ

は、静菌的な作用、LMOX, CMX は弱い殺菌性を示した。作用後 1 時間以内の殺菌作用は、Azthreonom が最も弱かった。

c) *K. pneumoniae* KC-1 の場合

Fig. 33 に示すように 4 剤とも、1/2MIC 濃度でも殺菌性が認められた。しかし、いずれの薬剤も短時間の殺菌力は弱かった。

d) *P. aeruginosa* E-2 の場合

Fig. 34 に示すように 4 剤とも、1/2MIC 濃度で静菌的

Fig. 32 Effect of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on viability of *E. coli* K-12

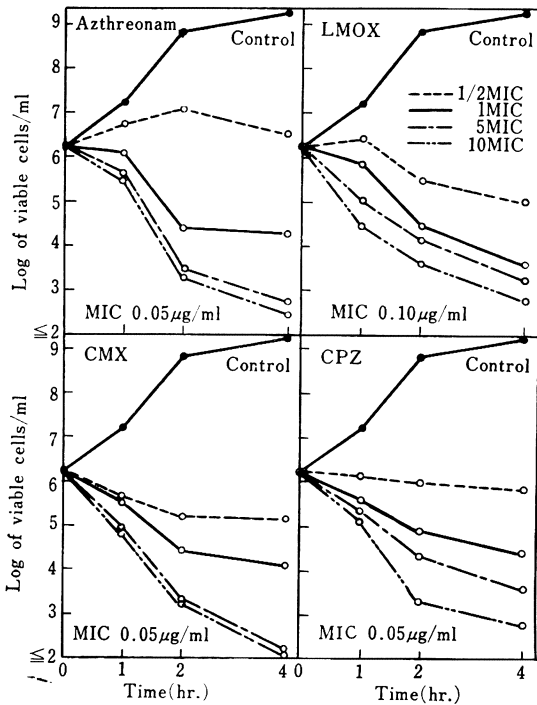


Fig. 34 Effect of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on viability of *P. aeruginosa* E-2

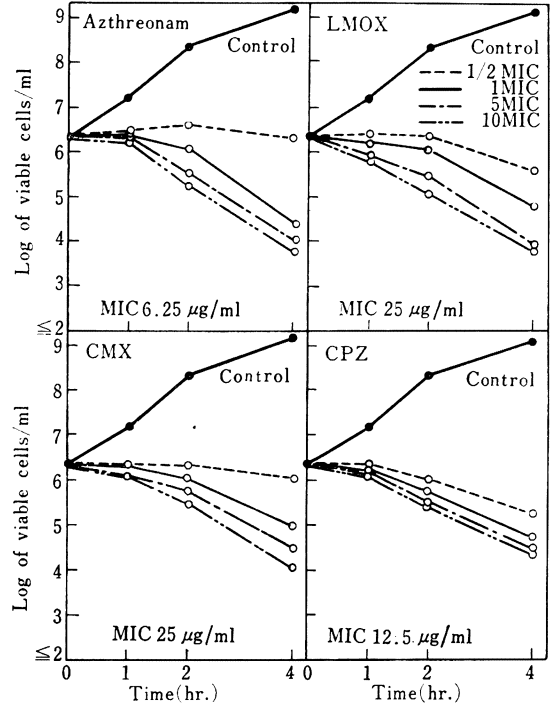
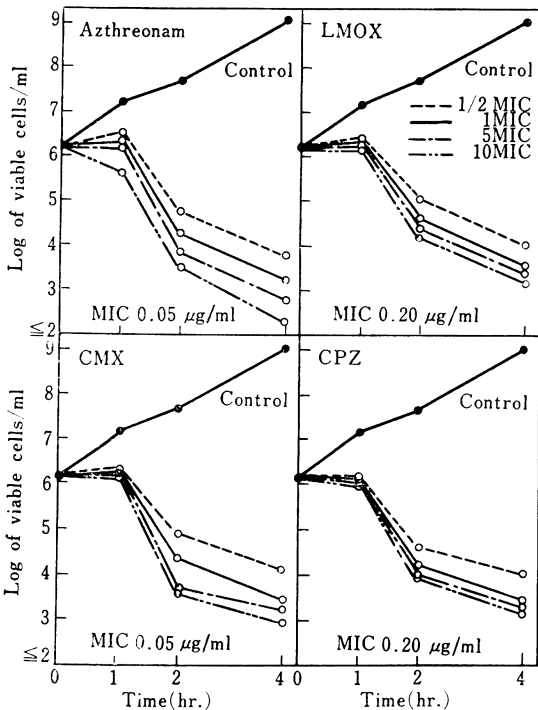


Fig. 33 Effect of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on viability of *K. pneumoniae* KC-1



に、MIC 濃度以上で殺菌的に作用したが、いずれも短時間の殺菌力は弱かった。

5. MIC と MLC

E. coli 21 株を用い、その MIC 値と 3, 6, 20 時間後に 99.9% 殺菌に要する濃度 MLC (MBC) 値との関係を検討した結果を Fig. 35 に示した。Azthreonom, LMOX は、MIC 値と 20 時間 MLC 値がほとんど同じであったが、CMX, CPZ では、若干、差が認められた。4 剤ともに、3 時間目の MLC₅₀ と 20 時間目の MLC₅₀ の差は大きく、また、6 時間目 MLC は 20 時間 MLC より 3 時間 MLC に近い傾向がみられた。

6. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウス実験的感染症に対する治療効果を検討した結果を Table 9 に示した。すなわち、*E. coli* KC-14 感染症に対する治療効果では、Azthreonom の ED₅₀ 値は 0.00098mg/mouse で LMOX とほぼ同程度の効果を示し、CMX, CPZ に比べると若干、優れていた。

K. pneumoniae KC-1 感染症に対する治療効果の場合、ED₅₀ 値は Azthreonom が 0.71mg/mouse と CMX には劣るが LMOX, CPZ とほぼ同様の効果を有していた。

S. marcescens T-55 感染症に対する治療効果では、Azthreonom は LMOX, CMX とほぼ同等の治療効果

Fig. 35 Sensitivity distribution of clinical isolates

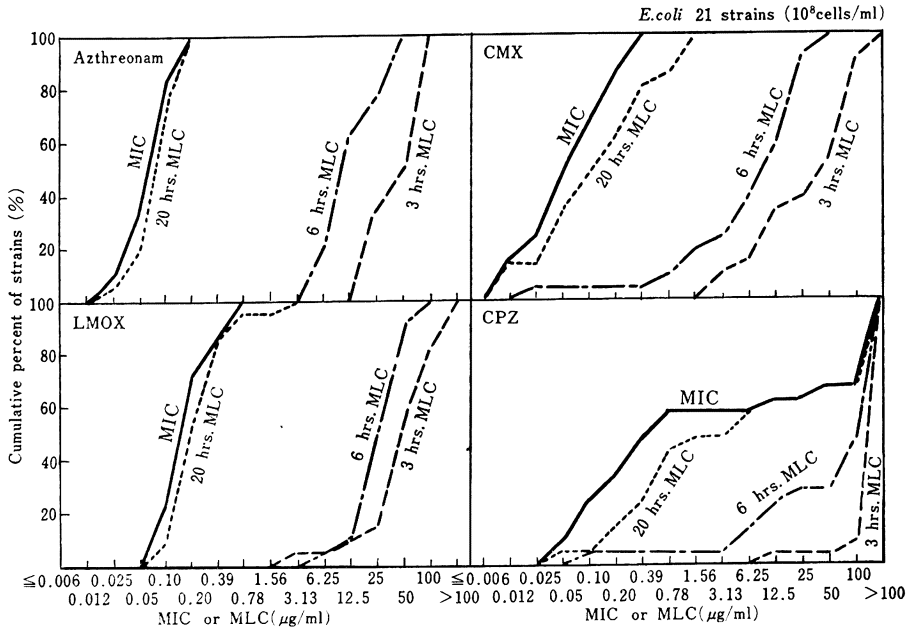


Table 9 Protecting effect of Azthreonom, LMOX, CMX, CPZ and CBPC on experimental infection in mice

Organisms	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotics	ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μ g/ml)	
				10 ^a	10 ^b
<i>E. coli</i> KC-14	23 LD ₅₀ (1.2×10^6)	Azthreonom	0.00098 (0.00065~0.0015)	0.05	0.025
		LMOX	0.0018 (0.0012~0.0027)	0.10	0.05
		CMX	0.0012 (0.00091~0.0016)	0.05	0.025
		CPZ	0.0019 (0.0013~0.0029)	0.10	0.05
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	1100 LD ₅₀ (3.0×10^3)	Azthreonom	0.71 (0.56~0.90)	0.05	0.025
		LMOX	0.75 (0.58~0.98)	0.20	0.10
		CMX	0.38 (0.29~0.50)	0.05	0.025
		CPZ	0.53 (0.45~0.62)	0.20	0.20
<i>S. marcescens</i> T-55	91 LD ₅₀ (5.0×10^6)	Azthreonom	0.073 (0.032~0.17)	0.10	0.05
		LMOX	0.11 (0.055~0.22)	0.78	0.20
		CMX	0.080 (0.038~0.17)	0.20	0.10
		CPZ	0.82 (0.45~1.5)	3.13	0.78
<i>P. morgani</i> 101	77 LD ₅₀ (2.0×10^6)	Azthreonom	0.25 (0.14~0.44)	0.10	0.012
		LMOX	0.088 (0.066~0.12)	0.20	0.05
		CMX	0.070 (0.046~0.11)	0.10	0.012
		CPZ	2.8 (2.2~3.5)	1.56	0.78
<i>P. aeruginosa</i> E-2	32 LD ₅₀ (5.3×10^4)	Azthreonom	1.2 (0.68~2.1)	6.25	6.25
		LMOX	4.1 (3.2~5.3)	25	12.5
		CMX	5.6 (3.3~9.5)	25	25
		CPZ	2.9 (1.6~5.2)	12.5	6.25
		CBPC	7.9 (4.4~14)	50	25

() : 95% confidence limits

を示し、CPZ に比べ優れていた。

P.morganii 101 感染症に対する治療効果では CMX, LMOX が優れた効果を示し、次いで Azthreonom, CPZ の順であった。

P.aeruginosa E-2 感染症に対する治療効果では、Azthreonom の ED₅₀ が 1.2mg/mouse と CPZ に比べ若干優れた効果を示し、LMOX, CMX がこれに次ぎ、CBPC の効果に比べ良好であった。

7. 位相差顕微鏡による観察

a) *E.coli* K-12

Fig. 36 に示すように Azthreonom 作用後、菌は伸長

化し、高濃度になるとスフェロプラスト様構造を示し、その後溶菌した。

位相差顕微鏡による観察結果をまとめたものが Fig. 37 である。Azthreonom は、LMOX, CMX, CPZ に比べ伸長化形成濃度領域が幅広いことがわかった。

b) *P.aeruginosa* E-2

Fig. 38 に示すように Azthreonom の作用により、菌は著しく伸長化し、1,600μg/ml の高濃度でも菌の伸長化を観察することができた。

8) ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) への親和性

E.coli K-12 の PBPs への Azthreonom の親和性を

Fig. 36 Phase-contrast micrographs of *E.coli* K-12 exposed to Azthreonom for 2 hours

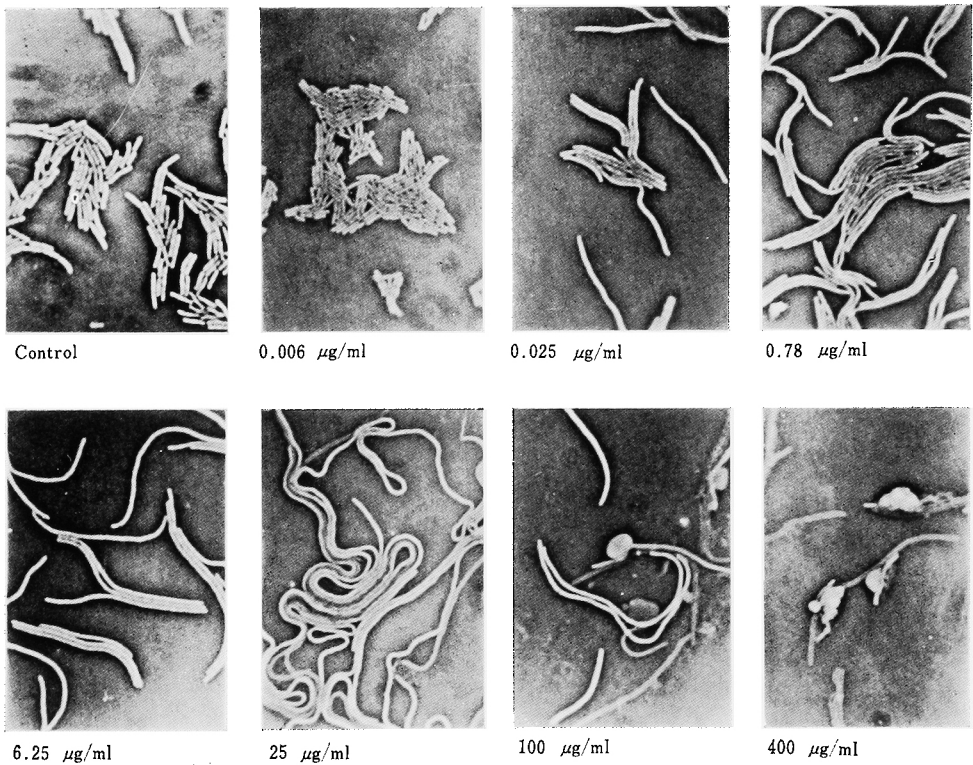


Fig. 37 Morphological effects of Azthreonom, LMOX, CMX and CPZ on *E.coli* K-12 after 2 hours exposure

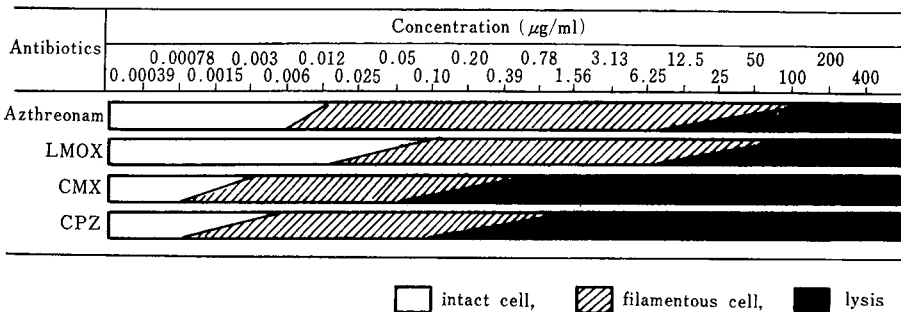
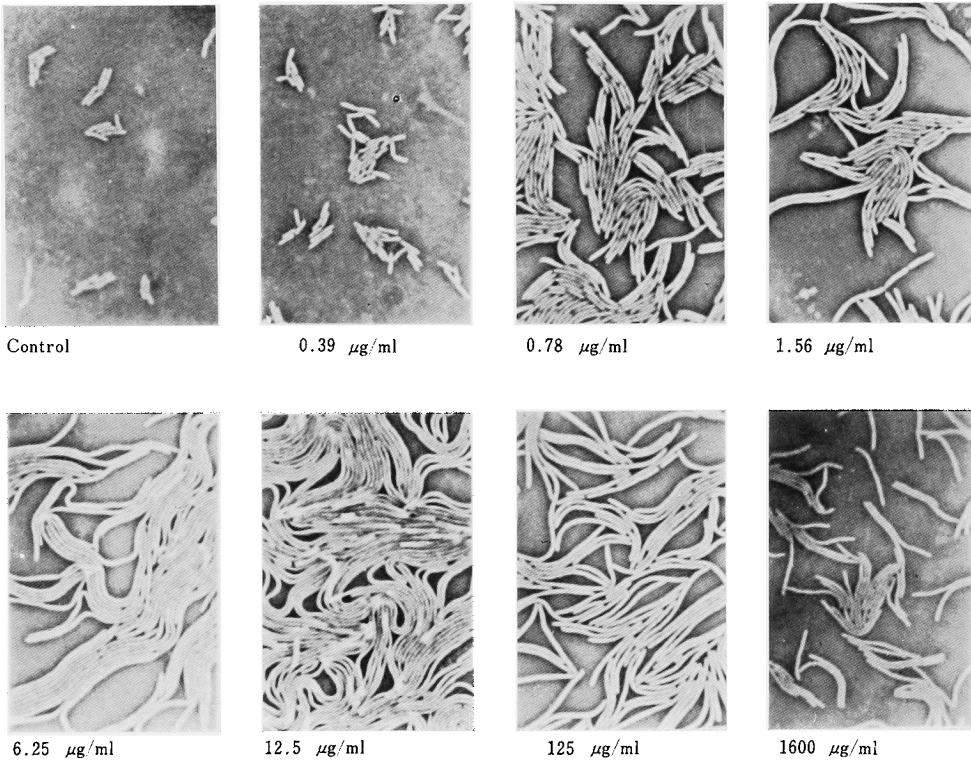
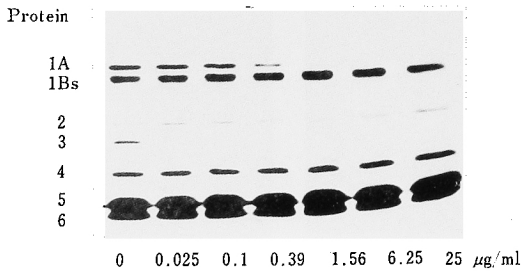


Fig. 38 Phase-contrast micrographs of *P. aeruginosa* E-2 exposed to Azthreonom for 2 hoursFig. 39 Fluorography showing competition of Azthreonom for ¹⁴C-labeled PCG binding in *E. coli* K-12

検討した結果が Fig. 39 で、各々の PBPs への 50% 阻害濃度を求めた結果が Table 10 である。Azthreonom は、PBP 3 に対する親和性が強く、次いで PBP 1A への親和性も認められたが、PBP 1Bs, 2, 4, 5, 6 への親和性はほとんど認められなかった。

Table 10 Competition of Azthreonom with ¹⁴C-labeled penicillin G for binding to PBPs in cytoplasmic membrane of *E. coli* K-12 *in vitro*

PBP	1 A	1 Bs	2	3	4	5	6
Concentration of Azthreonom (µg/ml)	0.34	>25	>25	<0.025	>25	>25	>25

III. 総括および考察

新しく開発された β-ラクタム抗生物質でモノバクタムに属する Azthreonom の細菌学的評価を既知抗生物質と比較検討した。Azthreonom は、グラム陽性菌、嫌気性菌に対しては、ほとんど抗菌力を示さなかったが、グラム陰性菌に対しては、LMOX, CPZ より優れ、CMX とほぼ同等の抗菌力を示した。また、indole 陽性 *Proteus* spp., *S. marcescens*, *P. aeruginosa* に対しても強い抗菌力を有していた。

臨床分離株に対する感受性分布では、*Streptococcus* 属、*Staphylococcus* 属に関しては、Azthreonom は、他剤より劣っていたが、*Proteus* 属、*Serratia* 属、*Escherichia* 属、*Enterobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Pseudomonas* 属では他剤より優れており、*Haemophilus* 属、*Acinetobacter* 属では LMOX とほぼ同等であった。

このように Azthreonom がグラム陽性菌や嫌気性菌に

対して良好な抗菌力を示さないのは、それらの菌のPBP_sに対して親和性をほとんど有さないためと考えられる⁶⁾。

一方、グラム陰性菌に対する良好な抗菌力はPBP 3に対する親和性に由来するものと考えられる⁷⁾。

形態変化の観察では、*E. coli* が Azthreonom の作用により伸長化し、スフェロプラスト様構造を示し、その後溶菌したのに対し、*P. aeruginosa* では伸長化するのみでほとんど溶菌像を観察することができなかった。

また、*E. coli* を用い PBP_s に対する親和性を検討した結果、PBP 3 に対する親和性が強く、次いで PBP 1A への親和性も認められたが、PBP 1Bs, 2, 4, 5, 6 への親和性は、ほとんど認められなかった。この PBP_s の結果は形態変化の観察結果と良く一致していた。

マウス実験的感染症に対する治療効果において、Azthreonom は、*K. pneumoniae* KC-1, *P. morganii* 101 で他剤より劣ったものの、*E. coli* KC-14, *S. marcescens* T-55, *P. aeruginosa* E-2 では、最も優れており、*P. aeruginosa* E-2 においては、CPZ に比べて2倍程度良好な治療効果を示した。

接種菌量と殺菌効果の関係で Azthreonom は、接種時の菌量が多くなると殺菌効果が減弱することや、MIC と 99.9% 殺菌に要する濃度 (MLC) との関係で、Azthreonom の MIC は薬剤との接触時間が長くなるほど低くなり、接触時間が短い場合、同等の効果を得ようとすると作用濃度を増す必要があり、短時間の殺菌能が弱いということから *in vivo* での治療において、これらのことを考慮し、投与しなければならないと思われる。

しかしながら、嫌気性菌に対する抗菌力が弱いため正常細菌叢を乱さずに *P. aeruginosa* などの感染症に有効

であること、また、 β -lactamase に安定であることなどは、Azthreonom の特徴と考えられる。

文 献

- 1) PHILLIPS, I.; A. KING, K. SHANNON & C. WARREN: SQ 26,776: *in-vitro* antibacterial activity and susceptibility to β -lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 8: 103~110, 1981
- 2) 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) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29(1): 76~79, 1981
- 3) 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
- 4) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 5) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 2999~3003, 1975
- 6) GEORGOPAPADAKOU, N. H.; S. A. SMITH, C. M. CIMARUSTI & R. B. SYKES: Binding of Monobactams to Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Relation to Antibacterial Activity. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 98~104, 1983
- 7) GEORGOPAPADAKOU, N. H.; S. A. SMITH & R. B. SYKES: Mode of Action of Aztreonam. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 950~956, 1982

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AZTHREONAM

MASAKO OTSUKI, TOSHIMI GOTOH, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The *in vitro* and *in vivo* activities of Azthreonam, a new β -lactam antibiotic belonging to the recently discovered group of monobactams, were compared with those of Latamoxef (LMOX), Cefmenoxime (CMX) and Cefoperazone (CPZ). The following results were obtained.

1. The antibacterial activity of Azthreonam against gram-negative bacteria was higher than those of LMOX and CPZ and similar to that of CMX. However, Azthreonam had no activity against gram-positive cocci and anaerobic bacteria.

2. In the sensitivity distribution of clinical isolates, Azthreonam was more active than LMOX, CPZ and CMX against gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* but was less active than CMX and CPZ against *Haemophilus* spp.

3. There was little or no inoculum effect on the MICs or MBCs of all antibiotics tested. The influence of inoculum size upon growth curve was also studied. The bactericidal activity of all antibiotics tested decreased by increasing the inoculum size. In the effect of the inoculum size on the protective effects for systemic infections in mice, a large inoculum resulted in a lower activity of all drugs tested, but Azthreonam was more active than the other antibiotics.

4. Azthreonam showed dose-dependent bactericidal action against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *P. aeruginosa*.

5. There was no major difference between MIC and 20 h-MLC, but there was difference between MIC and 3 h-MLC or 6 h-MLC.

6. In the protective effects of Azthreonam on systemic infections in mice, Azthreonam was more effective than LMOX, CMX and CPZ against *E. coli*, *Serratia marcescens* and *P. aeruginosa*. Against infections with *K. pneumoniae*, Azthreonam was slightly less active than CMX and CPZ and was less active than CMX and LMOX against *Proteus morganii*.

7. The morphological response of *E. coli* and *P. aeruginosa* to Azthreonam was investigated by phase contrast microscopy. Azthreonam initially caused the formation of filaments. On continued incubation, lysis of the filaments occurred. Azthreonam showed very high affinity for PBP 3 of *E. coli*.