

Imipenem (MK-0787) の *in vitro* 抗菌力について

西野 武志・中村 和則・田中真由美
後藤 季美・大槻 雅子・谷野 輝雄
京都薬科大学微生物学教室

新しい β -lactam 系抗生物質である imipenem (MK-0787) の *in vitro* 抗菌力について検討を行い、以下の結果を得た。

MK-0787 はグラム陽性菌および *P. maltophilia* を除くグラム陰性菌や *Bacteroides* に対して幅広い抗菌スペクトラムを示した。各種臨床分離菌に対する抗菌力は、グラム陽性菌では cefmetazole, ceftizoxime, latamoxef より優れていた。またグラム陰性菌では比較薬剤に耐性な株についても感受性を示した。特に *P. aeruginosa* については gentamicin や cefsulodin 耐性株にも交差耐性を示さなかった。

抗菌力に及ぼす諸因子の影響について検討したところ、培地 pH, 馬血清添加では影響がみられなかったが、接種菌量では *E. coli* および *K. pneumoniae* で菌量により若干の影響を受けた。

抗菌作用型式について検討したところ、MK-0787 は dose response のある殺菌作用を示した。*E. coli*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* に対する形態変化を位相差顕微鏡により観察したところ、MK-0787 の作用により菌体の球形化や spheroplast 形成そして bulge 状の細胞を観察することができた。

E. coli および *P. aeruginosa* のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する親和性を検討したところ、MK-0787 は両菌種の PBP 2 に良好な親和性を示した。

Imipenem (MK-0787) は、米国メルク社で開発された新しい注射用カルバペネム系抗生物質である。化学名は [5R-[5 α , 6 α (R*)]]-6-(1-hydroxyethyl)-3-[[2-[(imino-methyl) amino] ethyl] thio]-7-oxo-1-azabicyclo [3, 2, 0] hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate で、分子式は $C_{12}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$, 分子量 317.36 の白色または、黄白色の粉末であり、その構造式を Fig. 1 に示した。本物質は、グラム陽性菌、グラム陰性菌および嫌気性菌に対して良好な抗菌力を示すと報告されている¹⁾²⁾。

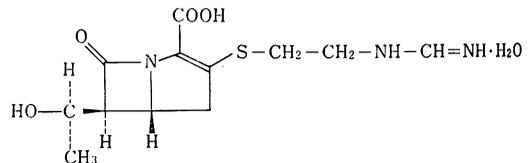
今回我々は cefoperazone, ceftizoxime, latamoxef, ceftazidime, cefmetazole, cefsulodin, sulbenicillin, piperacillin および gentamicin を比較薬として MK-0787 の *in vitro* 抗菌力について検討を行なったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

抗菌スペクトラムは、教室保存のグラム陽性菌 18 株、グラム陰性菌 35 株、嫌気性菌 11 株を用いて検討を行い、臨床分離株に対する感受性分布には臨床由来の *Staphylococcus aureus* 42 株, *Streptococcus pyogenes* 31 株, *Escherichia coli* 59 株, *Klebsiella pneumoniae*

Fig. 1 Imipenem (MK-0787)



59 株, *Enterobacter cloacae* 30 株, *Enterobacter aerogenes* 34 株, *Serratia marcescens* 52 株, *Proteus mirabilis* 32 株, *Proteus vulgaris* 32 株, *Providencia rettgeri* 15 株, *Morganella morganii* 25 株, *Pseudomonas aeruginosa* 112 株, *Acinetobacter calcoaceticus* 44 株および *Haemophilus influenzae* 48 株を使用した。

2. 使用薬物

Imipenem (MK-0787), ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), cefoperazone (CPZ), cefmetazole (CMZ), cefsulodin (CFS), ceftazidime (CAZ), piperacillin (PIPC), sulbenicillin (SBPC) および gentamicin (GM) のいずれも力価の明らかな標準品を使用した。

3. 感受性測定法

前培養に感受性ブイヨン培地 (栄研), 測定用に感受

Table 1 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC
Gram-positive bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.013	1.56	6.25	3.13	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.013	1.56	3.13	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMAN	0.025	1.56	3.13	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> TERASHIMA	0.025	3.13	1.56	6.25	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.013	1.56	1.56	3.13	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PC-R)	0.025	3.13	3.13	6.25	6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.05	6.25	50	12.5	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	≤0.006	0.10	0.013	0.78	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	≤0.006	0.10	0.025	0.78	0.05
<i>Streptococcus faecalis</i> *	1.56	6.25	>100	100	12.5
Viridans group <i>Streptococcus</i> *	1.56	6.25	>100	100	12.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I*	≤0.006	0.10	0.05	0.39	0.025
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II*	≤0.006	0.10	0.05	1.56	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III*	≤0.006	0.10	0.05	0.78	0.025
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	0.025	3.13	0.78	3.13	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.10	0.10	0.78	0.025
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.013	0.39	0.78	3.13	0.20
<i>Bacillus anthracis</i>	0.013	1.56	25	1.56	0.78

Inoculum size : 10⁶ cells/ml

MIC(μg/ml)

* Sensitivity test agar supplement with 10% horse blood

Table 2 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC
Gram-positive bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.013	1.56	6.25	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.025	1.56	3.13	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMAN	0.025	1.56	3.13	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> TERASHIMA	0.05	3.13	3.13	6.25	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.025	1.56	1.56	6.25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No.80 (PC-R)	0.025	6.25	3.13	6.25	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.05	12.5	50	12.5	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	≤0.006	0.20	0.025	1.56	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	≤0.006	0.10	0.025	0.78	0.05
<i>Streptococcus faecalis</i> *	3.13	25	>100	>100	25
Viridans group <i>Streptococcus</i> *	3.13	25	>100	>100	25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I*	≤0.006	0.10	0.05	0.78	0.025
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II*	≤0.006	0.20	0.05	1.56	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III*	≤0.006	0.10	0.05	1.56	0.05
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	0.025	3.13	0.78	3.13	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.10	0.39	0.78	0.05
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.013	0.78	25	3.13	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.025	3.13	50	3.13	1.56

Inoculum size : 10⁸ cells/ml

MIC (μg/ml)

*Sensitivity test agar supplemented with 10% horse blood

性ディスク用培地(栄研)を用いて、日本化学療法学会感受性測定法⁴⁾に準じて行った。なお、*Streptococcus* 属、*Corynebacterium diphtheriae* には、10% 馬脱纖維血液を、*H. influenzae* には 3% Bacto Fildes enrich-

ment(Difco) を含んだ感受性ディスク用培地を用いた。また *Neisseria* 属は、1% supplement を加えた gonococcus 培地(栄研)を用いて、37°C 48時間ローソク培養した。*Bacteroides* 属および *Clostridium* 属には、

Table 3 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC
Gram-negative bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.013	0.013	≦ 0.006	0.025	≦ 0.006
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.05	0.05	≦ 0.006	≦ 0.006	0.05
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.05	0.025	0.05	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.10	0.013	0.013	0.05	0.39
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.20	0.025	0.025	0.05	0.78
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.39	0.20	0.20	0.10	0.39
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	0.10	≦ 0.006	0.025	0.39
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.10	0.10	≦ 0.006	0.05	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.20	0.20	≦ 0.006	0.05	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.05	0.20	0.013	0.05	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.20	0.20	0.025	0.05	3.13
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.05	0.10	0.025	0.10	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.20	0.10	0.05	0.39	0.78
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	0.025	0.013	0.05	0.20
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.10	0.10	0.025	0.05	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.39	0.10	0.013	0.10	1.56
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.10	0.39	0.39	0.20	6.25
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.20	0.39	0.20	0.20	6.25
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.20	3.13	0.10	0.10	6.25
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.20	0.78	0.05	0.20	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.39	0.20	≦ 0.006	0.10	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.20	0.013	≦ 0.006	0.20	0.013
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	0.39	≦ 0.006	≦ 0.006	0.025	0.013
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118 (Providencia)	0.20	0.78	≦ 0.006	0.10	3.13
<i>Morganella morganii</i> KONO	0.78	1.56	0.78	0.10	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	0.78	0.39	0.78	1.56	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1095	1.56	3.13	25	3.13	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	1.56	3.13	25	12.5	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	12.5	0.39	1.56	1.56	0.39
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 25416	0.39	3.13	25	6.25	3.13
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ATCC 13637	100	3.13	50	0.20	25
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 12552	0.05	>100	25	50	50
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM 1015	0.013	1.56	1.56	6.25	0.78
<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO 1311	0.20	0.78	3.13	1.56	0.39
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	0.39	≦ 0.006	≦ 0.006	0.025	≦ 0.006

Inoculum size : 10^6 cells/ml

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

* *Gonococcus* medium

GAM ブイオン (ニッスイ) で前培養を行い、測定用に GAM 寒天 (ニッスイ) を用い嫌気培養装置で培養を行い、嫌気性菌の発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁵⁾に従って測定した。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について, *S. aureus* 209 P JC, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 および *P. aeruginosa* E-2 を被検菌として, 培地 pH は, 5.5, 7.0 および 8.5 について, また, 血清添加による影響は, 馬血清を 10 および 25% 添加した感受性ディスク用培地を用いた寒天平板希釈法により検討を行った。さらに接種菌量の影響に

ついても寒天平板希釈法で測定した。

5. 殺菌作用

ハートインヒュージョンブイオン (HIB; ニッスイ) で前培養した *S. aureus* 209-P JC, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 を同培地に移し, 対数期中期まで振盪培養した。この菌液を同培地で希釈し, 約 10^7 cells/ml および 10^8 cells/ml に調製後薬物を添加し, 1, 2 および 4 時間後の生菌数を測定した。

6. 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 HI agar (ニッスイ) のフィルム寒天培地を作製した。一方, 対数期途上の菌

Table 4 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC
Gram-negative bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.013	0.025	≤0.006	0.025	0.013
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.10	0.05	≤0.006	0.013	0.05
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.39	0.10	0.025	0.05	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.20	0.025	0.05	0.20	0.78
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.39	0.05	0.05	0.10	0.78
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.78	25	50	1.56	50
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.10	0.20	0.013	0.025	0.39
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.10	0.20	0.013	0.05	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.78	0.39	0.013	0.05	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.39	0.39	0.013	0.05	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.39	0.39	0.05	0.10	3.13
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.10	0.20	0.05	0.20	1.56
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.39	0.10	0.05	0.39	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	0.05	0.025	0.10	0.39
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.20	0.10	0.05	0.05	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	1.56	0.78	0.10	0.10	6.25
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	1.56	1.56	1.56	3.13	12.5
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	3.13	0.78	1.56	0.39	6.25
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.78	6.25	0.39	0.39	12.5
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.78	1.56	0.10	0.10	1.56
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	1.56	0.39	≤0.006	0.20	0.20
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	1.56	0.05	0.013	0.20	0.20
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	0.78	0.013	≤0.006	0.025	0.025
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118 (<i>Providencia</i> sp.)	0.78	1.56	≤0.006	0.10	3.13
<i>Morganella morganii</i> KONO	1.56	12.5	12.5	3.13	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	0.78	0.78	3.13	3.13	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1095	1.56	3.13	25	12.5	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	1.56	3.13	50	25	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	25	0.78	12.5	12.5	1.56
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 25416	0.78	3.13	25	6.25	3.13
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ATCC 13637	100	>100	>100	0.78	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 12552	0.10	>100	25	100	100
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM 1015	0.025	3.13	12.5	6.25	0.78
<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO 1311	0.78	1.56	12.5	3.13	1.56
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	3.13	≤0.006	≤0.006	0.05	0.013

Inoculum size : 10⁸ cells/ml

MIC (μg/ml)

* *Gonococcus* medium

液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天にかぶせ、パラフィンで封じた。この標本を 37°C の恒温装置付きの倒立位相差顕微鏡 (Nikon) で観察した。

7. PBP_s に対する親和性

B. G. SPRATT⁶⁾ の方法に従って行った。すなわち、*E. coli* K-12 および *P. aeruginosa* E-2 を HIB を用いて 37°C で振盪培養し、対数期後半に集菌した。これを超音波で処理することにより得た膜画分と MK-0787 を 30°C、10 分反応させ、その後 [¹⁴C]-penicillin G (PCG) を添加しさらに 30°C、10 分間保温した。反応後直ちに無標識 PCG と sarkosyl を加え、反応を停止させるとともに細胞質膜を可溶化した。これに sodium lauryl sul-

fate と 2-mercaptoethanol を加え、沸騰水浴中で 2 分間処理を行った。この試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、蛋白質を分離後フルオログラフィーで親和性の検討を行った。

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感受性について検討した結果を Table 1~6 に示した。

グラム陽性菌群に対しては Table 1, 2 に示すように、10⁸ および 10⁶ cells/ml 接種において、MK-0787 の抗菌力 (MIC) は ≤0.006~3.13 μg/ml を示し、CPZ, CZX,

Table 5 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC anaerobic bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Clostridium tetani</i>	0.05	0.05	0.39	0.20	0.20
<i>Clostridium perfringens</i>	0.05	≤0.006	0.025	0.05	0.013
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.10	1.56	25	0.78	0.20
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	0.05	6.25	1.56	0.78	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.05	6.25	1.56	0.78	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	0.78	>100	100	12.5	100
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	0.20	>100	25	6.25	25
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	0.20	>100	50	6.25	50
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	1.56	100	3.13	1.56	100
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	0.20	25	0.78	1.56	6.25
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	0.20	25	6.25	50	12.5

Inoculum size : 10⁶ cells/ml MIC (μg/ml)

Table 6 Antibacterial spectrum of MK-0787, CPZ, CZX, LMOX and PIPC Anaerobic bacteria

Organism	MK-0787	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
<i>Clostridium tetani</i>	0.20	0.20	6.25	1.56	0.78
<i>Clostridium perfringens</i>	0.20	12.5	6.25	6.25	6.25
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.20	1.56	50	0.78	0.20
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	0.78	50	25	3.13	12.5
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.20	>100	25	1.56	12.5
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	0.78	>100	>100	25	>100
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	0.78	>100	>100	6.25	>100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	0.78	>100	>100	>100	>100
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	3.13	100	50	50	>100
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	0.78	50	6.25	1.56	12.5
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	0.39	100	12.5	100	25

Inoculum size : 10⁶ cells/ml MIC (μg/ml)

LMOX および PIPC よりも優れていた。

グラム陰性菌群に対しては、Table 3, 4 に示すように広いスペクトラムを示し、その MIC は 10⁶ cells/ml 接種では 0.013~100 μg/ml であった。特に *P. aeruginosa*、*P. cepacia*、*A. calcoaceticus* および *A. faecalis* では本剤は比較薬よりも優れた抗菌力を示した。しかし、その他の菌種、特に *P. maltophilia* には、本剤は比較薬よりも抗菌力が劣っていた。

Table 5, 6 に嫌気性菌の結果を示したが、MK-0787 の MIC は 10⁶ cells/ml 接種で、0.05~1.56 μg/ml であり、比較薬に比べて優れていた。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床由来の 14 菌種について、10⁶ cells/ml の菌液を 1 白金耳画線接種時の感受性分布および累積分布を Fig. 2~Fig. 17 に示した。また Table 7, 8 には各菌種の 80% の株を発育阻止する濃度 MIC₈₀ を求め表に示した。

1) *S. aureus* の場合

Fig. 2 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 0.025 μg/ml にあり、その MIC₈₀ 値は 0.025 μg/ml であり CZX の 125 倍、CMZ の 62.5 倍、LMOX の 500 倍優れていた。

2) *S. pyogenes* の場合

Fig. 3 に示すように MK-0787 の MIC 値は、全株 ≤0.006 μg/ml であり、CZX より若干優れ、LMOX および CMZ より優れていた。

3) *E. coli* の場合

Fig. 4 に示すように MK-0787 の感受性ピークは 0.2 μg/ml にあり、CZX の 0.025~0.05 μg/ml に比べて約 4 倍劣っていた。MIC₈₀ 値では、MK-0787 は 0.2 μg/ml であり CMZ の 0.78 μg/ml よりは優れていたが、LMOX とは同等で、CZX の 0.05 μg/ml より劣っていた。

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates

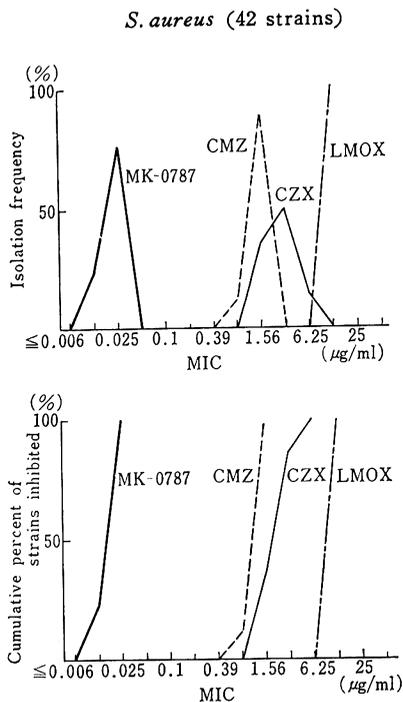


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates

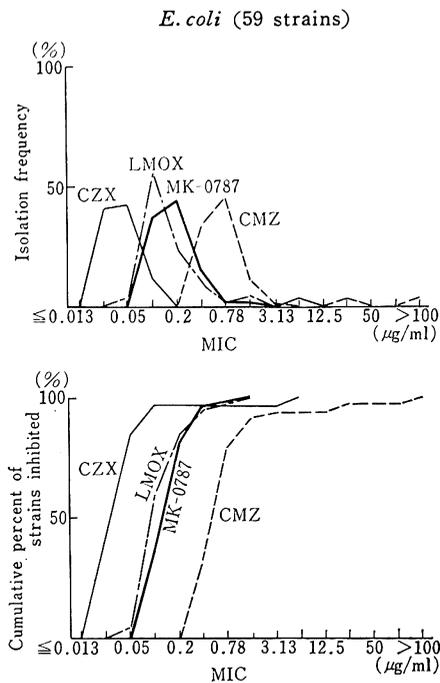


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates

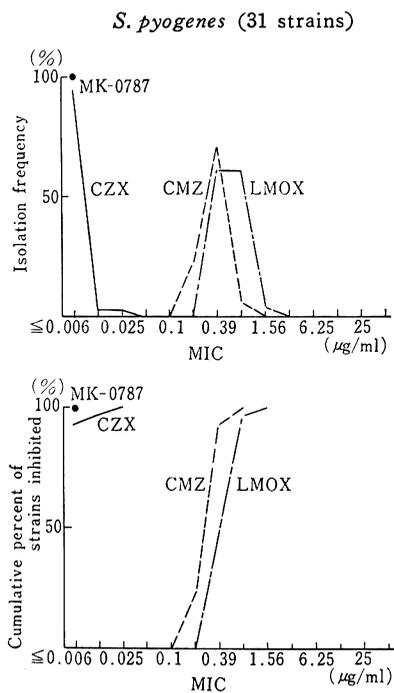


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates

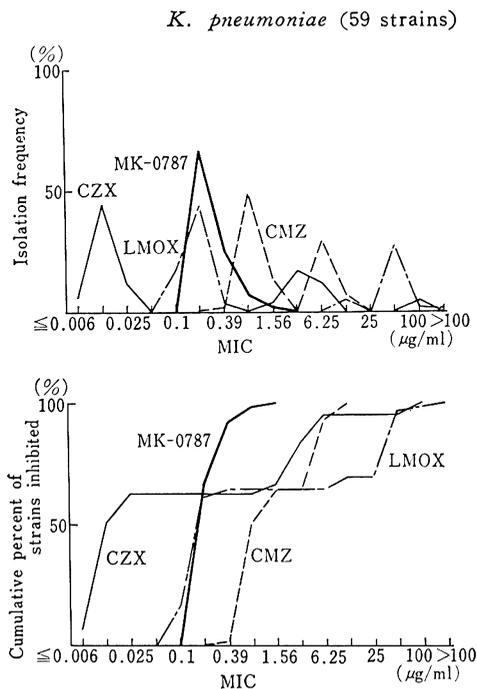


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates

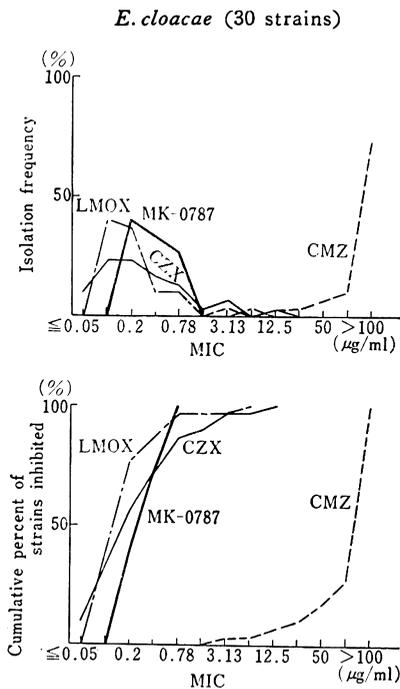


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates

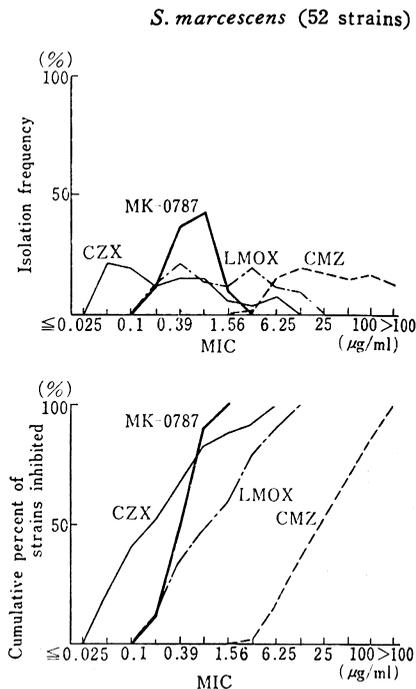


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates

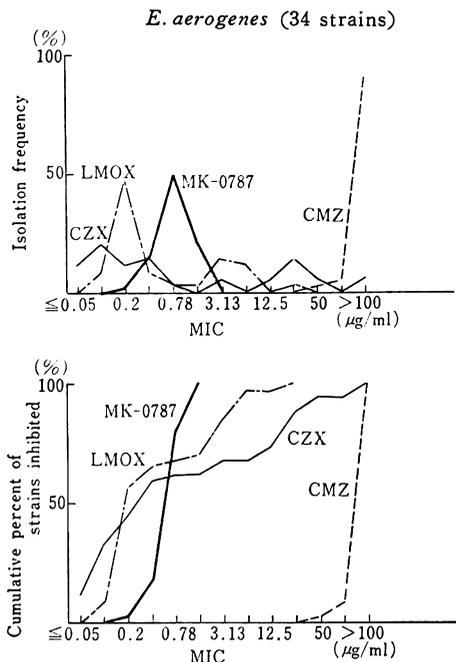


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates

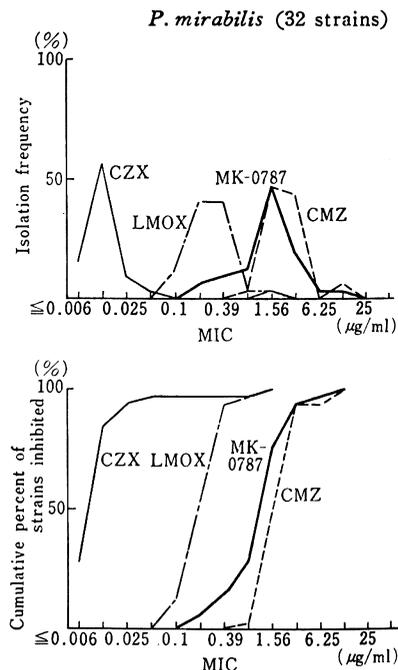


Fig.10 Sensitivity distribution of clinical isolates

P. vulgaris (32 strains)

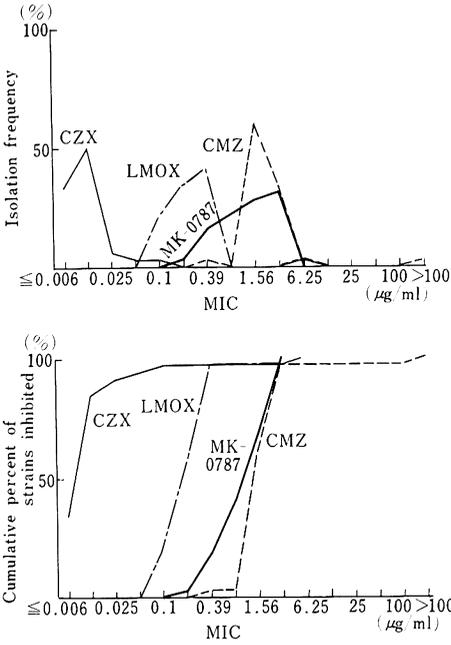


Fig.11 Sensitivity distribution of clinical isolates

P. rettgeri (15 strains)

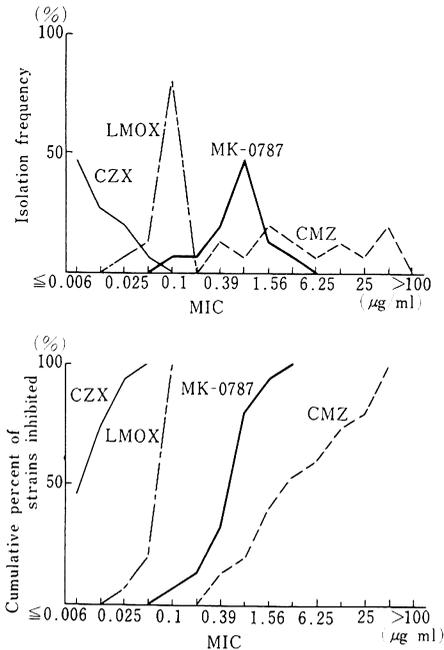


Fig.12 Sensitivity distribution of clinical isolates

M. morgani (25 strains)

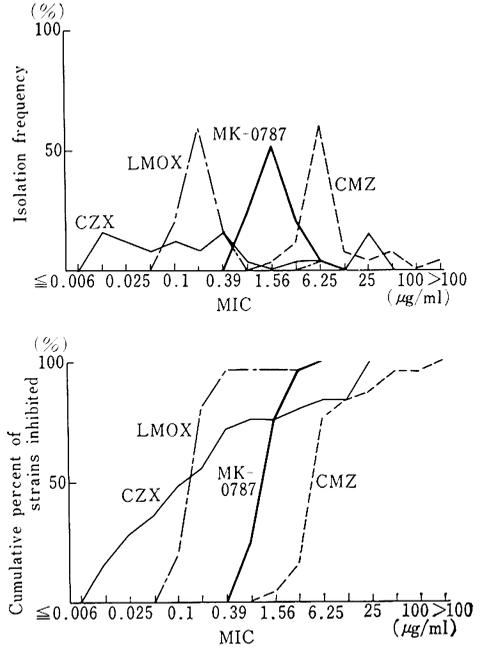


Fig.13 Sensitivity distribution of clinical isolates

P. aeruginosa (40 strains)

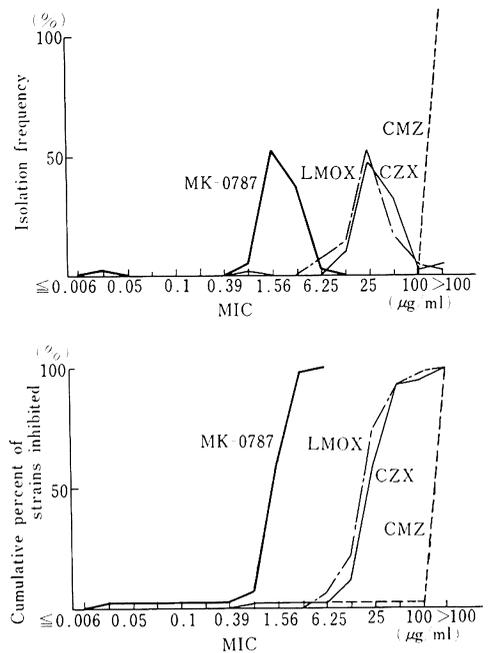


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates

A. calcoaceticus (44 strains)

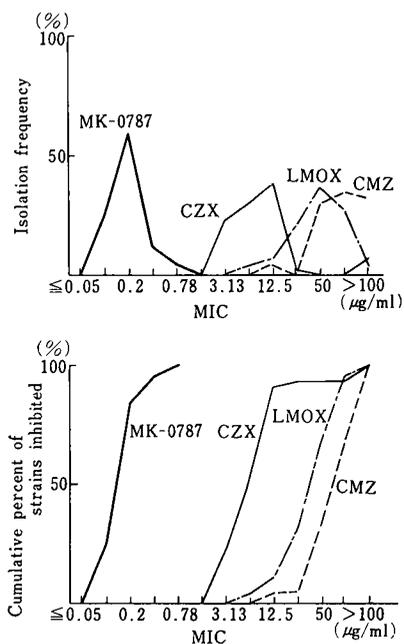


Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates

GM^r, SBPC^r *P. aeruginosa* (37 strains)

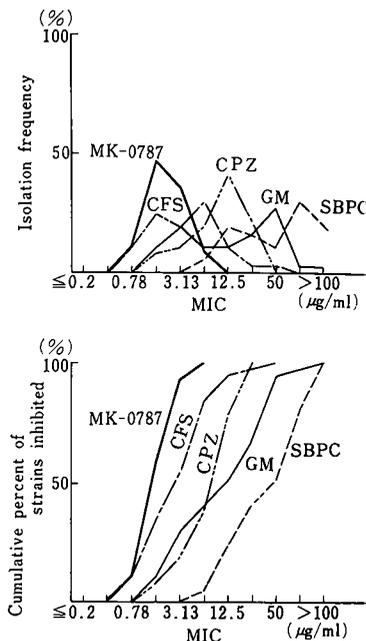


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates

H. influenzae (48 strains)

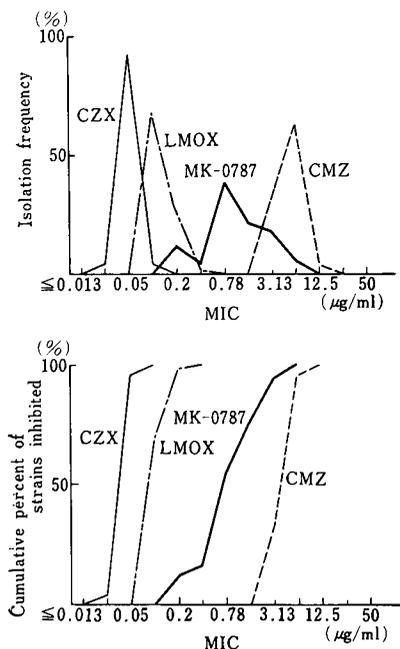


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates

CFS^r *P. aeruginosa* (35 strains)

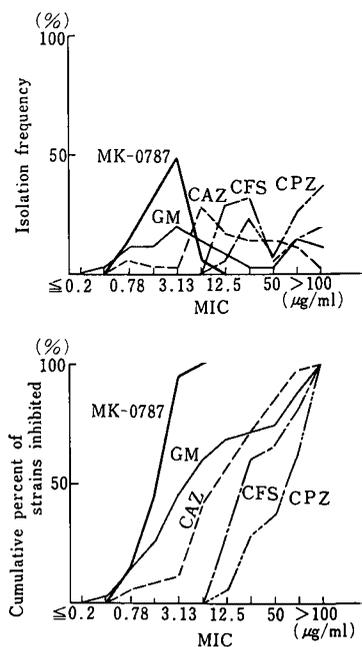


Table 7 Antibacterial activity of MK-0787

Organism	No. of strains	MIC ₈₀ * (μg/ml)			
		MK-0787	CZX	CMZ	LMOX
<i>S. aureus</i>	42	0.025	3.13	1.56	12.5
<i>S. pyogenes</i>	31	≤0.006	≤0.006	0.39	0.78
<i>E. coli</i>	59	0.20	0.05	0.78	0.20
<i>K. pneumoniae</i>	59	0.39	3.13	6.25	50
<i>E. cloacae</i>	30	0.78	0.78	>100	0.39
<i>E. aerogenes</i>	34	0.78	25	>100	3.13
<i>S. marcescens</i>	52	0.78	0.78	100	6.25
<i>P. mirabilis</i>	32	3.13	0.013	3.13	0.39
<i>P. vulgaris</i>	32	3.13	0.013	3.13	0.39
<i>P. rettgeri</i>	15	0.78	0.025	25	0.10
<i>M. morgani</i>	25	3.13	3.13	12.5	0.20
<i>P. aeruginosa</i>	40	3.13	50	>100	50
<i>A. calcoaceticus</i>	44	0.20	12.5	>100	100
<i>H. influenzae</i>	48	3.13	0.05	6.25	0.20

* 80% Inhibitory concentrations of MK-0787, CZX, CMZ and LMOX

Table 8 Antibacterial activity of MK-0787 on GM, SBPC and CFS resistant *P. aeruginosa*

Compound	MIC ₈₀ * (μg/ml)	
	GM ^r , SBPC ^r (37 strains)	CFS ^r (35 strains)
MK-0787	3.13	3.13
Gentamicin	50	100
Cefsulodin	6.25	100
Cefoperazone	25	>100
Sulbenicillin	100	N. T.
Ceftazidime	N. T.	50

* 80% Inhibitory concentration of MK-0787, GM, CFS, CPZ, SBPC and CAZ
N.T.: Not test

4) *K. pneumoniae* の場合

Fig. 5 に示すように MK-0787 は 0.2 μg/ml に一峰性のピークを示したが、比較薬は二峰性のピークを示した。MIC₈₀ 値では、本剤は 0.39 μg/ml であり、CZX の 3.13 μg/ml, CMZ の 6.25 μg/ml, LMOX の 50 μg/ml に比べて優れていた。

5) *E. cloacae* の場合

Fig. 6 に示すように、MK-0787 の感受性ピーク値は 0.2 μg/ml にあり、LMOX や CZX の 0.1 μg/ml よりも若干劣っていた。MIC₈₀ 値では本剤は 0.78 μg/ml であり、CZX とほぼ同等で LMOX の 0.39 μg/ml よりは若干劣っていた。

6) *E. aerogenes* の場合

Fig. 7 に示すように MK-0787 は一峰性のピークを 0.78 μg/ml に示し、CZX および LMOX は二峰性のピークを示した。MIC₈₀ 値では本剤は 0.78 μg/ml であり、

LMOX の 3.13 μg/ml および CZX の 25 μg/ml よりも優れていた。

7) *S. marcescens* の場合

Fig. 8 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 0.78 μg/ml であり、CZX は 0.05, 0.78 μg/ml, LMOX は 0.39, 3.13 μg/ml, CMZ は 12.5, 100 μg/ml に小さなピークを示し、幅広く分布した。MIC₈₀ 値では本剤は 0.78 μg/ml であり、CZX とほぼ同等で、LMOX の 6.25 μg/ml および CMZ の 100 μg/ml よりも優れていた。

8) *P. mirabilis* の場合

Fig. 9 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 1.56 μg/ml にあり、CZX の 0.013 μg/ml や LMOX の 0.2~0.39 μg/ml より劣り、CMZ とほぼ同等であった。MIC₈₀ 値では本剤は 3.13 μg/ml であり、CZX の 0.013 μg/ml や LMOX の 0.39 μg/ml より劣り、CMZ とほぼ同等であった。

9) *P. vulgaris* の場合

Fig. 10 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 3.13 μg/ml であり、CZX の 0.013 μg/ml, LMOX の 0.39 μg/ml CMZ の 1.56 μg/ml よりも劣っていた。MIC₈₀ 値でも本剤は CMZ と同等ではあったが、CZX や LMOX よりも劣っていた。

10) *P. rettgeri* の場合

Fig. 11 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 0.78 μg/ml であり、CZX の ≤0.006 μg/ml や LMOX の 0.1 μg/ml に比べて劣っていた。MIC₈₀ 値では本剤は 0.78 μg/ml を示し、CMZ よりは優れていたが、CZX および LMOX よりは劣っていた。

Table 9 Influence of inoculum size on the antibacterial activity of MK-0787

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MK-0787	CPZ	PIPC	CZX	LMOX
<i>S. aureus</i> 209-P JC	3.2×10^4	0.013	0.78	0.39	3.13	3.13
	3.2×10^5	0.013	0.78	0.39	6.25	3.13
	3.2×10^6	0.013	0.78	0.78	6.25	3.13
	3.2×10^7	0.013	1.56	0.78	6.25	3.13
	3.2×10^8	0.013	1.56	0.78	6.25	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	7.3×10^4	0.10	0.05	1.56	0.025	0.05
	7.3×10^5	0.20	0.05	1.56	0.025	0.05
	7.3×10^6	0.20	0.05	1.56	0.025	0.05
	7.3×10^7	0.39	0.10	1.56	0.025	0.10
	7.3×10^8	0.78	0.20	3.13	0.05	0.20
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	2.4×10^4	0.10	0.05	0.39	≤ 0.006	0.05
	2.4×10^5	0.10	0.05	0.78	≤ 0.006	0.05
	2.4×10^6	0.20	0.05	0.78	0.013	0.10
	2.4×10^7	0.39	3.13	3.13	3.13	25
	2.4×10^8	0.78	3.13	6.25	6.25	25
<i>P. aeruginosa</i> E-2	8.0×10^4	1.56	3.13	3.13	25	12.5
	8.0×10^5	1.56	3.13	3.13	25	12.5
	8.0×10^6	1.56	3.13	6.25	25	25
	8.0×10^7	1.56	6.25	12.5	>100	25
	8.0×10^8	1.56	25	12.5	>100	100

MIC : $\mu\text{g/ml}$

Table 10 Influence of medium pH on the antibacterial activity of MK-0787

Organism	pH	MK-0787	CPZ	PIPC	CZX	LMOX
<i>S. aureus</i> 209-P JC	5.5	≤ 0.006	0.20	0.20	0.78	1.56
	7.0	0.013	1.56	0.78	6.25	6.25
	8.5	0.025	1.56	0.78	6.25	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	5.5	0.20	0.39	6.25	0.05	0.20
	7.0	0.20	0.05	1.56	0.025	0.05
	8.5	0.39	0.05	1.56	0.025	0.10
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	5.5	0.20	0.39	3.13	0.10	0.39
	7.0	0.20	0.05	0.39	≤ 0.006	0.10
	8.5	0.39	0.10	0.78	≤ 0.006	0.20
<i>P. aeruginosa</i> E-2	5.5	1.56	3.13	3.13	50	12.5
	7.0	1.56	3.13	3.13	25	12.5
	8.5	3.13	6.25	6.25	50	12.5

Inoculum size : 10^6 cells/mlMIC : $\mu\text{g/ml}$ 11) *M. morgani* の場合

Fig. 12 に示すように MK-0787 は $1.56 \mu\text{g/ml}$ に感受性ピーク値があり、LMOX は $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、CMZ は $6.25 \mu\text{g/ml}$ にピークを示したが、CZX は幅広い分布を示し、明らかなピークを認めなかった。MIC₈₀ 値では本剤は $3.13 \mu\text{g/ml}$ で、CZX と同等で、LMOX の $0.2 \mu\text{g/ml}$ より劣っていたが、CMZ より優れていた。

12) *P. aeruginosa* の場合

Fig. 13 に示すように MK-0787 は $1.56 \mu\text{g/ml}$ に感受

性ピーク値があり、比較薬は CZX、LMOX が $25 \mu\text{g/ml}$ で CMZ が $>100 \mu\text{g/ml}$ であった。MIC₈₀ 値では本剤は $3.13 \mu\text{g/ml}$ で比較薬よりも明らかに優れていた。

13) *A. calcoaceticus* の場合

Fig. 14 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は $0.2 \mu\text{g/ml}$ にあり、CZX の $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、LMOX の $50 \mu\text{g/ml}$ 、CMZ の $100 \mu\text{g/ml}$ より優れていた。MIC₈₀ 値の比較においても、本剤は $0.2 \mu\text{g/ml}$ であり、CZX の $12.5 \mu\text{g/ml}$ や CMZ、LMOX の $100 \mu\text{g/ml}$ より優れて

Table 11 Influence of horse serum on the antibacterial activity of MK-0787

Organism	Serum conc. (%)	MK-0787	CPZ	PIPC	CZX	LMOX
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0	≤0.006	0.78	0.39	6.25	3.13
	10	0.013	0.78	0.39	3.13	6.25
	25	0.013	0.78	0.39	3.13	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0	0.20	0.10	3.13	0.025	0.10
	10	0.20	0.05	0.78	0.025	0.10
	25	0.39	0.05	0.78	0.013	0.10
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0	0.10	0.05	0.78	≤0.00	0.10
	10	0.20	0.025	0.39	0.013	0.10
	25	0.20	0.05	0.39	≤0.006	0.10
<i>P. aeruginosa</i> E-2	0	0.78	3.13	3.13	25	12.5
	10	0.78	3.13	3.13	25	12.5
	25	0.78	1.56	3.13	25	6.25

Inoculum size : 10⁶ cells/ml

MIC : μg/ml

Fig. 18 Effect of MK-0787 on the viability of *S. aureus* 209-P JC

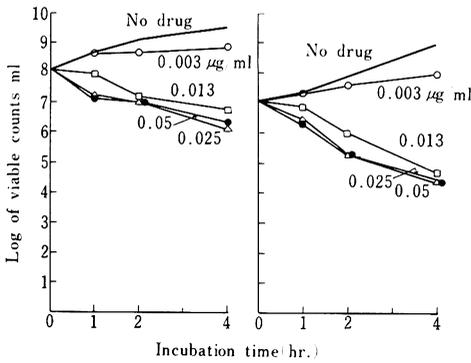


Fig. 20 Effect of MK-0787 on the viability of *K. pneumoniae* KC-1

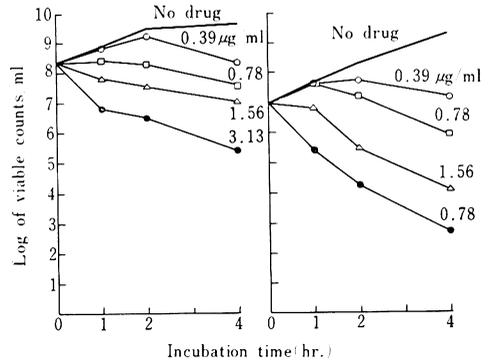


Fig. 19 Effect of MK-0787 on the viability of *E. coli* K-12

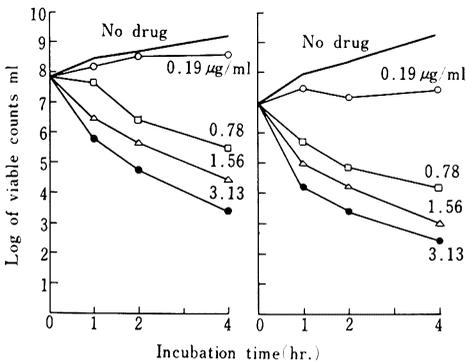


Fig. 21 Effect of MK-0787 on the viability of *S. marcescens* T-55

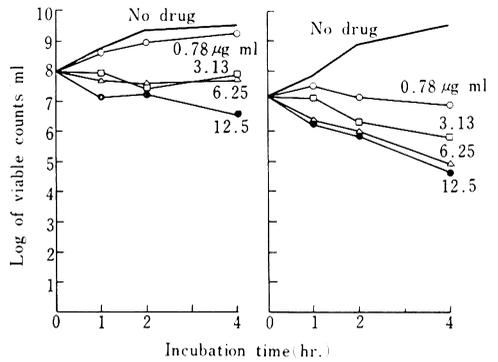
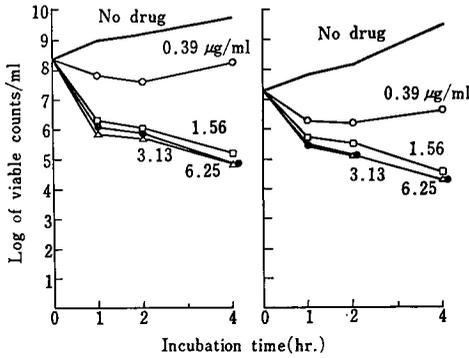


Fig. 22 Effect of MK-0787 on the viability of *P. aeruginosa* E-2



1.56 µg/ml にあり、CFS の 6.25 µg/ml、CPZ の 12.5 µg/ml、GM の 3.13 および 50 µg/ml、SBPC の 12.5 および 100 µg/ml よりも優れていた。その時の MIC₈₀ 値を Table 8 に示した。本剤は 3.13 µg/ml で CFS の 6.25 µg/ml や他の比較薬よりも優れていた。

16) CFS^r *P. aeruginosa* の場合

1983 年に京滋地区の呼吸器感染症患者より分離された *P. aeruginosa* の中で、CFS 耐性 35 株に対する感受性の結果を Fig. 17 に示した。本剤の感受性のピークは 3.13 µg/ml にあり、GM は 3.13 µg/ml、CAZ は 6.25 µg/ml、CPZ は 25 µg/ml、CFS は >100 µg/ml であった。MIC₈₀ 値でみても本剤は 3.13 µg/ml であり、他の比較薬に比べて明らかに優れていた。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus 209-P JC, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 および *P. aeruginosa* E-2 を用いて、抗菌力に及ぼす培地 pH、馬血清添加、接種菌量の影響を CZX、LMOX、CPZ、PIPC と比較した結果を Table 9~11 に示した。本剤を含むすべての薬剤は、いずれの菌株においても、培地 pH、馬血清添加において、MIC の変動はほとんど認められなかった。また本剤は、接種菌量による影響を、*S. aureus* や *P. aeruginosa* ではほとんど受けなかったが、*E. coli*、*K. pneumoniae* では菌量の増加に伴い、感受性は若干低下した。一方比較薬とし

いた。

14) *H. influenzae* の場合

Fig. 15 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は 0.78 µg/ml にあり、CZX の 0.05 µg/ml や LMOX の 0.1 µg/ml より劣り、CMZ の 6.25 µg/ml より優れていた。MIC₈₀ 値の比較でも、本剤は 3.13 µg/ml であり、CZX の 0.05 µg/ml や LMOX の 0.2 µg/ml より劣っていた。

15) GM^r, SBPC^r *P. aeruginosa* の場合

Fig. 16 に示すように MK-0787 の感受性ピーク値は

Fig. 23 Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to MK-0787 for 3 hours at 37°C

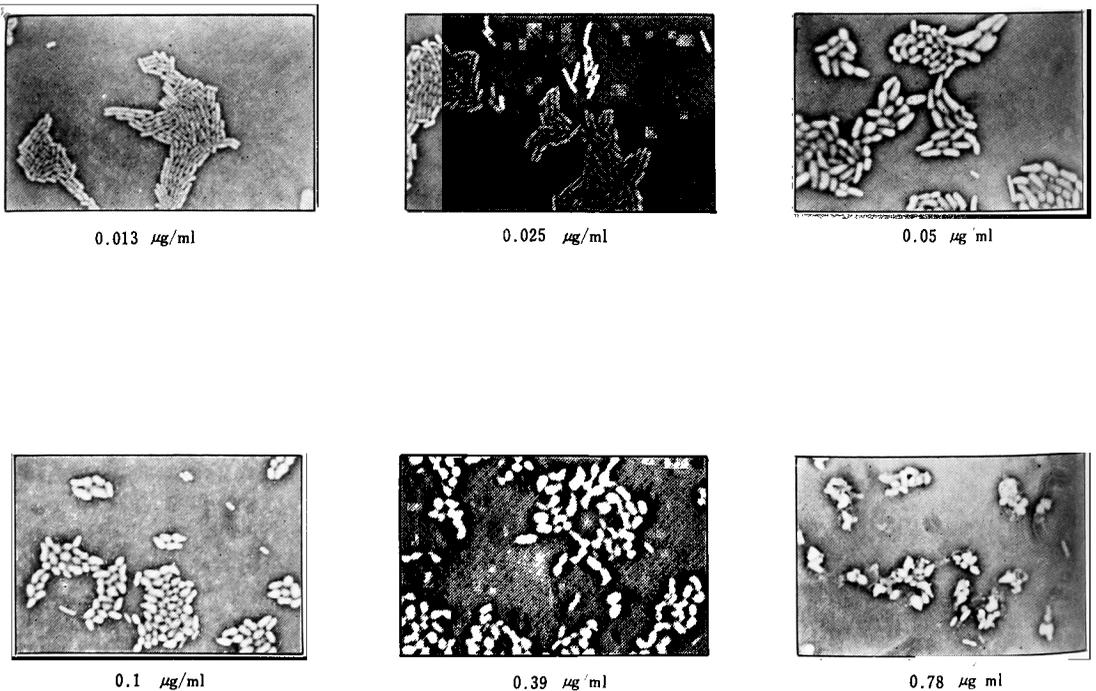
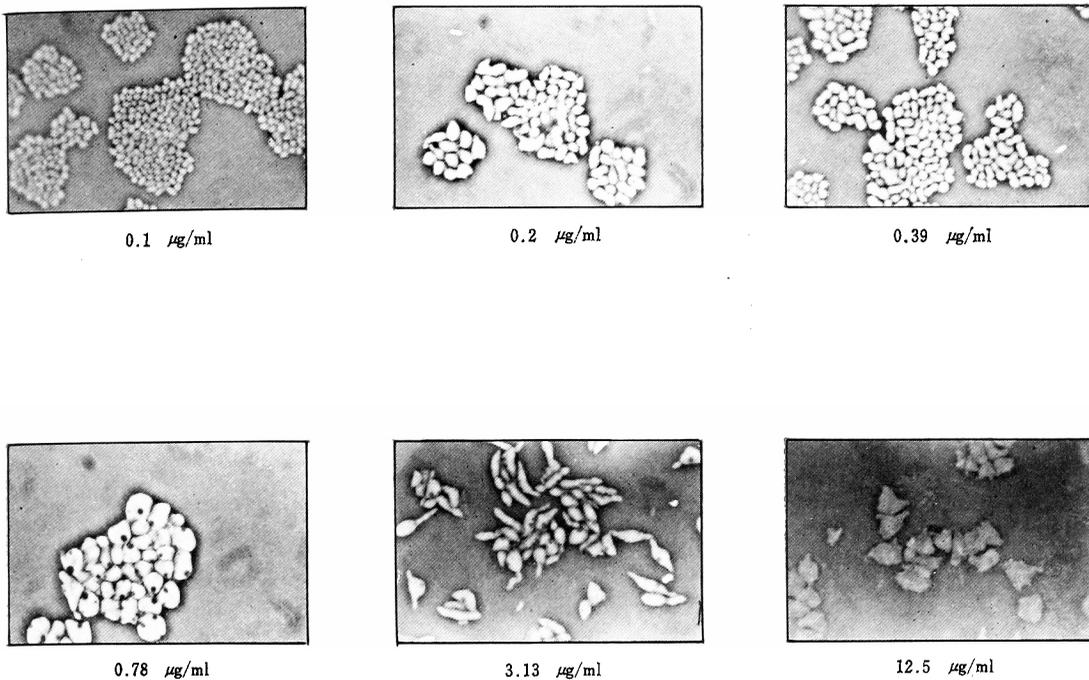
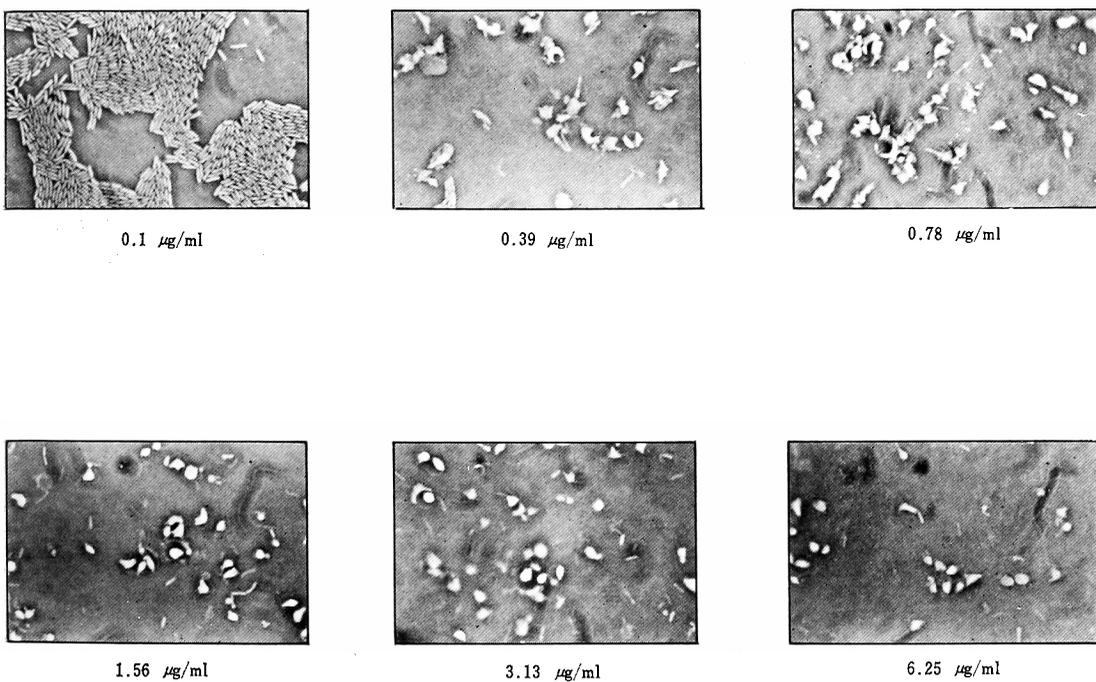


Fig. 24 Phase-contrast micrographs of *S. marcescens* T-55 exposed to MK-0787 for 3 hours at 37°CFig. 25 Phase contrast micrographs of *P. aeruginosa* E-2 exposed to MK-0787 for 3 hours at 37°C

て用いた PIPC, CZX, LMOX では *K. pneumoniae* および *P. aeruginosa* において接種菌量 $10^7 \sim 10^8$ celles/ml で菌量による影響がみられた。

4. 殺菌作用

Fig. 18 に示したように, *S. aureus* に対して MK-0787 は 10^7 , 10^8 cells/ml 接種共に MIC(0.013 $\mu\text{g/ml}$) 以上の濃度で殺菌的に作用した。

E. coli や *K. pneumoniae* に対しては, Fig. 19 および Fig. 20 に示したように MK-0787 のそれぞれの MIC (いずれも 0.78 $\mu\text{g/ml}$) 以上の濃度で dose response のある殺菌作用がみられた。

S. marcescens の場合は, Fig. 21 に示したように, 菌量が 10^7 cells/ml の場合, MIC(3.13 $\mu\text{g/ml}$) 以上の濃度で殺菌作用が見られたが, 10^8 cells/ml の菌量では Σ の殺菌性が減弱する傾向を認めた。

P. aeruginosa に対しては Fig. 22 に示したように MIC(1.56 $\mu\text{g/ml}$) 以上の濃度で殺菌作用がみられたが, *S. aureus* の場合と同様 dose response はあまり顕著ではなかった。

5. 位相差顕微鏡による形態観察

E. coli に対する MK-0787 の形態変化を Fig. 23 に示した。0.013 および 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 作用では control と同様に増殖していく様子が, 0.05, 0.1 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌体の球形化が観察された。また 0.78(MIC) $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌体の球形化や溶菌像を観察することができた。

S. marcescens に対する形態変化の結果を Fig. 24 に示した。0.19, 0.39, 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌は増殖しながら球形化していく様子が観察され, 3.13(MIC) および 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 作用では bulge 状の細胞や球形化して

Fig. 26 Fluorography showing competition of MK-0787 for [^{14}C]-PCG binding in *E. coli* K-12

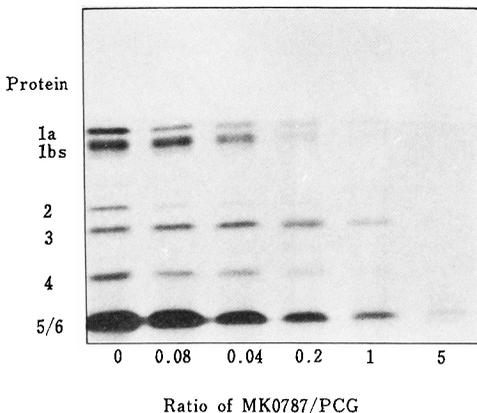
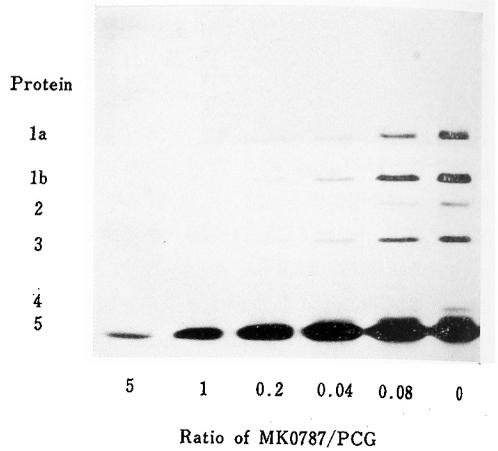


Fig. 27 Fluorography showing competition of MK-0787 for [^{14}C]-PCG binding in *P. aeruginosa* E-2



溶菌像も観察された。

P. aeruginosa に対する形態変化の結果を Fig. 25 に示した。0.1 $\mu\text{g/ml}$ 作用では control と同様に増殖していく様子が観察され, 0.39, 0.78, 1.56(MIC), 3.13, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では bulge 状の細胞や spheroplast 様構造そして溶菌像が観察された。

6. PBPs に対する親和性

E. coli および *P. aeruginosa* の PBPs に対する MK-0787 の親和性を Fig. 26 および Fig. 27 に, そしてデントメーター処理により得た 50% 阻害濃度を Table 12 に示した。

E. coli に対して MK-0787 は PBPs の 2, 1a, 1bs, 3 の順に良好な親和性を示し, それぞれの 50% 阻害濃度は <0.008 , 0.008, 0.048, 0.48 であった。また *P. aeruginosa* に対しては PBP₂=1bs, 1a, 3 の順に良好な親和性を示し, その 50% 阻害濃度はそれぞれ $<0.008 = <0.008$, 0.0094, 0.0105 であった。

III. 総括および考察

新しい β -lactam 系抗生剤である MK-0787 に関する *in vitro* 抗菌力について検討を行った。本剤は, グラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有し, *Bacteroides* にも抗菌力を示した。グラム陽性菌には比較薬として用いた CMZ, CTZ, LMOX よりも良好な抗菌力を示した。グラム陰性菌では *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus* および *A. faecalis* には比較薬よりも優れた抗菌力を示したが, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* 属では, 比較薬に比べて抗菌力が若干低かった。また, *P. maltophilia* には抗菌力を示さなかった。これは SAINO ら⁷⁾ の報告しているように, *P. maltophilia* が

Table 12 Competition of MK-0787 with ^{14}C -labeled penicillin G for binding to PBPs in cytoplasmic membranes of *E. coli* K-12 and *P. aeruginosa* E-2 *in vivo*

<i>E. coli</i> K-12 PBPs	ID ₅₀ *					
	1a	1bs	2	3	4	5/6
MK-0787	0.008	0.048	<0.008	0.48	0.064	0.066

<i>P. aeruginosa</i> E-2 PBPs	ID ₅₀ *					
	1a	1bs	2	3	4	5/6
MK-0787	0.0094	<0.008	<0.008	0.0105	0.0115	0.21

* Concentration as amolar ratio to ^{14}C -labeled penicillin G required for 50% inhibition binding of labeled penicillin G

MK-0787 の水解酵素を産生するためであると思われる。さらに *P. aeruginosa* NC-5 に対して比較薬は感受性を示したが、MK-0787 は 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と中等度耐性を示し、この結果は興味深く思われた。

臨床分離株に対する感受性分布で、 β -lactamase に安定である CZX⁹⁾、LMOX⁹⁾ が二峰性の分布を示した *K. pneumoniae* および *E. aerogenes* にも MK-0787 が一峰性の感受性分布を示したことは、本剤の特徴の一つと思われる。*P. aeruginosa* に関しては、GM、SBPC、CFS 耐性株のいずれにも交差耐性を示さず、耐性株および感受性株に対する MK-0787 の感受性ピーク値は変動せず、いずれも 1.56~3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これは *P. aeruginosa* の産生する β -lactamase に対して本剤が安定であることに起因するものと思われるが、他の要因も考えられ、現在さらに検討を行っている。

位相差顕微鏡による形態観察では、*E. coli*、*S. marcescens*、*P. aeruginosa* の3菌種において、いずれも MK-0787 の作用によりフィラメント状の細胞は観察されず、球形細胞や bulge 状の細胞が観察された。このことは PBPs に対する親和性で MK-0787 が両菌種の PBP 2 に良好な親和性を示すが、PBP 3 に対する親和性が弱いという私どもの結果や HASHIZUME らの報告¹⁰⁾を裏付けているものと思われる。

以上のように本剤は、幅広い抗菌スペクトラムを有し、CZX、LMOX に感受性の低い一部の *K. pneumoniae* や *E. aerogenes* にも抗菌力を示し、また SBPC、CFS および GM 耐性 *P. aeruginosa* に対しても優れた抗菌力を示した。

文 献

1) KROPP, H.; J. G. SUNDELPH, J. S. KAHAN, F. M. KAHAN & J. BIRNBAUM: MK 0787 (*N*-formimidoyl thienamycin): Evaluation of *in vitro* and *in vivo* activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 993~1000, 1980

2) NASU, M.; J. P. MASKELL, R. J. WILLIAMS & J. D. WILLIAMS: *In vitro* activity of MK 0787 (*N*-formimidoyl thienamycin) and other beta-lactam compounds against *Bacteroides* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 433~436, 1981

3) NEU, H. C. & P. LABTHAVIKUL: Comparative *in vitro* activity of *N*-formimidoyl thienamycin against gram-positive and gram-negative aerobic and anaerobic species and its β -lactamase stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 180~187, 1982

4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981

5) 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

6) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 72: 2999~3003, 1975

7) SAINO, Y.; F. KOBAYASHI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 564~570, 1982

8) 三橋 進: Ceftizoxime (CZX) の抗菌力について。 *Chemotherapy* 28 (S-5): 1~6, 1980

9) 三橋 進, 井上松久: 6059-S の抗菌力について。 *Chemotherapy* 28 (S-7): 35~41, 1980

10) HASHIZUME, T.; F. ISHINO, J. NAKAGAWA, S. TAMAKI & M. MATSUHASHI: Studies on the mechanism of action of imipenem (*N*-formimidoyl thienamycin) *in vitro*: Binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J. Antibiot.* 37: 394~400, 1984

IN VITRO ACTIVITY OF IMIPENEM, A NEW CARBAPENEM

TAKESHI NISHINO, KAZUNORI NAKAMURA, MAYUMI TANAKA, TOSHIMI GOTOH

MASAKO OHTSUKI and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The bacteriological evaluation of imipenem(MK-0787), a new β -lactam antibiotic, was studied. the following results were obtained.

MK-0787 showed a broad antibacterial spectrum against gram-positive, gram-negative bacteria with the exception of *P. maltophilia* and *Bacteroides*.

The antibacterial activity of MK-0787 against gram-positive bacteria was superior to that of cefmetazole, ceftizoxime and latamoxef. It inhibited gram-negative bacteria resistant to other agents. It did not show cross resistance for gentamicin or cefsulodin resistant *P. aeruginosa*.

There was minimal effect of inoculum size of *E. coli* and *K. pneumoniae*, and medium pH or horse serum had no effect on activity.

Time-kill curve confirmed a dose response bactericidal activity of MK-0787. In morphological observation of *E. coli* and *P. aeruginosa* by phase contrast microscope, exposure to MK-0787 resulted in the formation of spherical cells, bulge forms and spheroplast-like structures.

MK-0787 showed a high affinity for PBPs 2 of *E. coli* and *P. aeruginosa*.