

## Carumonam の細菌学的検討

井上邦雄・中根たみ子・松田耕二・井上松久\*・三橋 進

エビゾーム研究所 (微生物化学研究所赤城支所)

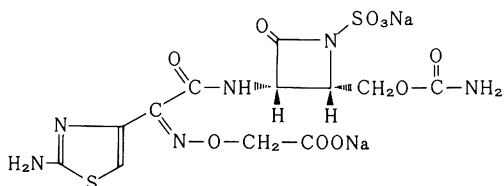
群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設\*

1. Carumonam (CRMN) は、グラム陰性桿菌に対し、対照薬剤 aztreonam (AZT), cefotaxime (CTX) と同等かそれ以上の抗菌力を示した。
2. CRMN は、グラム陽性菌に対する抗菌力は弱い。
3. CRMN は、プラスミド性および染色体性支配の  $\beta$ -lactamase に対し安定であった。
4. 殺菌力について、CRMN は、AZT および CTX と同様に強い殺菌効果を示した。
5. マウス感染実験系における CRMN の防御効果は、AZT, CTX と同程度ないしは、より優れた治療効果を示した。

## は じ め に

Sulfazecin は、1981 年に今田らにより *Pseudomonas acidophila* から分離されたが、この化合物の抗菌力は弱かった<sup>1)</sup>。その後、1983 年、岸本らにより sulfazecin が化学修飾され、抗菌力、 $\beta$ -lactamase に対する安定性などが改良された<sup>2)</sup>。Carumonam (CRMN, AMA-1080) は azetidinone 環の C(4) 位に carbamoyloxymethyl 基をもつ化合物であり、その特徴は、azetidinone 環の C(3) と C(4) 位の置換基が互いに cis 位に配置する点である。その構造式は Fig. 1 に示すとおりであり、構造的に特徴のある CRMN について細菌学的立場からその抗菌力について検討したので報告する。

Fig. 1 Chemical structure of carumonam



## I. 材 料 と 方 法

## 1. 使用薬剤

Carumonam (CRMN) は武田薬品工業株式会社から、aztreonam (AZT) は日本スクイブ株式会社、cefotaxime (CTX) はヘキストジャパン社からそれぞれ分与されたものを使用した。その他の薬

品は市販品を用いた。

## 2. 使用菌株

化学療法学会設定の標準菌株<sup>3)</sup> および各種臨床分離株を用いた。臨床分離株は昭和 54 年から昭和 58 年に亘り分離し、群大医・薬剤耐性菌実験施設で保存のものを用いた。

## 3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

とくに記載しない限り日本化学療法学会感受性測定法<sup>4)</sup>に従い行った。各被験菌の薬剤濃度に対する MIC 累積百分率を片対数グラフにプロットして、そこから菌の発育阻止率 50% および 90% を、それぞれ MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> として表わした<sup>5)</sup>。使用培地は菌種により異なる場合があるので、Table 1 にまとめて示した。なお、*Haemophilus influenzae* および *Neisseria gonorrhoeae* はローソク培養を行った。

## 4. 殺菌効果の測定

## (1) 最小殺菌濃度 (MBC)

被験菌を ST ブイヨン培地にて一夜培養し、その菌液を希釈して薬剤添加の同培地に最終濃度が 10<sup>4</sup> cells/ml になるように接種した。37°C 18 時間培養後、肉眼で濁度の認められない最小濃度を MIC とした。MIC 以上の薬剤を含有する培地から、ミクロプランター (佐久間製作所) を用いて薬剤無添加 ST 寒天培地へ 5  $\mu$ l を接種し、37°C 18 時間培養後、菌の生育の認められない最小薬剤濃度を MBC とした。

## (2) 増殖曲線に及ぼす影響

ST ブイヨン培地を用い、試験菌の一夜培養液を新しい培地に接種し、振盪培養した。菌数が 2 $\times$ 10<sup>4</sup>

Table 1 Media used

Media*	Organism
For preculture	
BHIB	<i>S. pyogenes</i>
BHIB+5% horse serum	<i>S. pneumoniae</i>
BHIB+1% hemin +0.2% $\beta$ -NAD	<i>H. influenzae</i>
Proteose peptone No.3	
+1% hemoglobin+1% Isovitale X	<i>N. gonorrhoeae</i>
STB	The other organisms
For MIC determination	
BHIA	<i>S. pyogenes</i>
BHIA+5% horse blood	<i>S. pneumoniae</i>
BHIA+1% hemin +0.2% $\beta$ -NAD	<i>H. influenzae</i>
Proteose peptone No.3	
+1% hemoglobin+1% Isovitale X	<i>N. gonorrhoeae</i>
+1.5% agar	
STA	The other organisms

\* BHIB, brain heart infusion broth(Difco);  $\beta$ -NAD,  $\beta$ -nicotinamido-adeninedinucleotide(Sigma Chemical Co.); STB, sensitivity test broth (Nissui); BHIA, brain heart infusion agar(Difco); STA, sensitivity test agar(Nissui)

cells/ml $\sim$ 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml に達した時に MIC 前後の薬剤を加え振盪培養し、経時的に生菌数を測定した。

#### 5. $\beta$ -Lactamase の調整

Medium B ブイヨン培地にて培養した菌体を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、同緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。その後、10,000  $\times$ g, 30 分間冷却遠心して得た上清をストレプトマイシン処理、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などを用いて精製し、 $\beta$ -lactamase サンプルとした。

#### 6. $\beta$ -Lactamase 活性の測定

$\beta$ -Lactamase 活性は spectrophotometric method<sup>6)</sup> によって測定し、酵素液の蛋白量は LOWRY 法<sup>7)</sup> によって求めた。各薬剤の基質濃度は 100  $\mu$ M で、用いた緩衝液は 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、反応温度は 30°C で測定を行った。Penicillinase (PCase) では benzylpenicillin (PC-G) を 100 とし、cephalosporinase (CSase) および oxyimino CSase (CXase) では cephaloridine (CER) を 100 とした相対加水分解速度で各薬剤の加水分解速度を表示した。

#### 7. 正常マウス実験感染における治療効果

*Escherichia coli* ML4707, *E. coli* ML4970, *Serratia marcescens* GN7577, *Klebsiella pneumoniae* GN6445 を感染菌として用いた。感染に際しては 37°C, 24 時間寒天平板で増やした菌を集菌し、生理食塩水に懸濁し目的の菌量に調整した。被験菌はマウス腹腔内に感染させ、1 時間後薬剤を皮下投与した。感染 7 日後の生存率から LITCH-FIELD-WILCOXON 法<sup>8)</sup> に基づき、ED<sub>50</sub> および 95% 信頼限界を求めた。なお用いたマウスは STD-ddy  $\delta$  (20 g $\pm$ 1 g) を各薬剤 1 濃度あたりそれぞれ 10 匹用いた。

### II. 実験成績

#### 1. 抗菌スペクトル

CRMN の標準菌株に対する抗菌力を AZT, CTX を対照薬剤として比較検討し、その結果を Table 2 に示した。

調べたグラム陽性菌に対し CRMN の抗菌活性はほとんど認められなかった。

グラム陰性各菌種に対し CRMN は対照薬剤

Table 2 Antibacterial activity of CRMN against standard strains of bacteria

Organism	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )*		
	CRMN	AZT	CTX
<i>S.aureus</i> FDA 209P JC-1	>100	>100	3.13
<i>S.aureus</i> Terajima	>100	100	0.39
<i>S.aureus</i> MS353	>100	>100	0.78
<i>S.pyogenes</i> Cook	6.25	6.25	0.012
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	>100	>100	3.13
<i>M.luteus</i> ATCC 9341	25	12.5	0.05
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.05	0.05
<i>E.coli</i> K-12 C600	0.05	0.05	0.05
<i>E.cloacae</i> 963	0.05	0.05	0.2
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048	0.1	0.05	0.2
<i>K.pneumoniae</i> PCI-602	0.0025	0.006	0.0015
<i>S.typhimurium</i> IID 971	0.05	0.05	0.05
<i>S.typhi</i> 901	0.013	0.006	0.05
<i>S.paratyphi</i> 1015	0.025	0.006	0.003
<i>S.schottmuelleri</i> 8006	0.05	0.05	0.025
<i>S.enteritidis</i> G 14	0.025	0.006	0.013
<i>S.marcescens</i> IAM 1184	0.013	0.013	0.1
<i>M.morganii</i> IFO 3848	0.025	0.006	<0.0015
<i>P.mirabilis</i> IFO 3849	0.025	0.013	0.05
<i>P.vulgaris</i> OX-19	0.025	0.006	0.006
<i>P.vulgaris</i> HX-19	0.025	0.006	0.006
<i>P.rettgeri</i> IFO 3850	0.39	0.39	12.5
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3445	6.25	3.13	25
<i>P.aeruginosa</i> NCTC 10490	0.39	0.39	3.13
<i>P.aeruginosa</i> PAO 1	3.13	6.25	25

\* By the agar dilution method (Inoculum size:  $10^6$  cells/ml)

AZT, CTXとともに強い抗菌活性を示した。*Pseudomonas aeruginosa*に対する抗菌力はCRMN, AZTともにCTXよりやや強い抗菌力を示した。

## 2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床分離株20菌種に対するCRMNの抗菌力を累積百分率として、その一部をFig.2～Fig.10に示した。またTable 3に各菌種に対する各薬剤のMIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>をまとめた。

*Staphylococcus aureus*に対するCRMNのMIC値は、用いた全株が>100  $\mu\text{g/ml}$ を示した。AZTも>100  $\mu\text{g/ml}$ のMICを示す菌が70%前後認められ

たが、AZTの方がCRMNより抗菌力がややすぐれていた。しかしCTXの感受性ピークは1.56  $\mu\text{g/ml}$ を示しCRMN, AZTより抗菌力がすぐれていた (Fig. 2)。

同様に、*Staphylococcus epidermidis* 100株に対するCRMNのMIC値は全株が>100  $\mu\text{g/ml}$ を示し、AZTも>100  $\mu\text{g/ml}$ の菌株が大半を示した。CTXでは0.78～3.13  $\mu\text{g/ml}$ の幅広い感受性ピークを示した。*Streptococcus pyogenes* 53株に対する本剤の抗菌力は、対照薬剤のAZTとともに12.5  $\mu\text{g/ml}$ にMICピークを示し、12.5  $\mu\text{g/ml}$ で、全ての菌の発育

Fig. 2 Antibacterial activity of CRMN against *S. aureus*

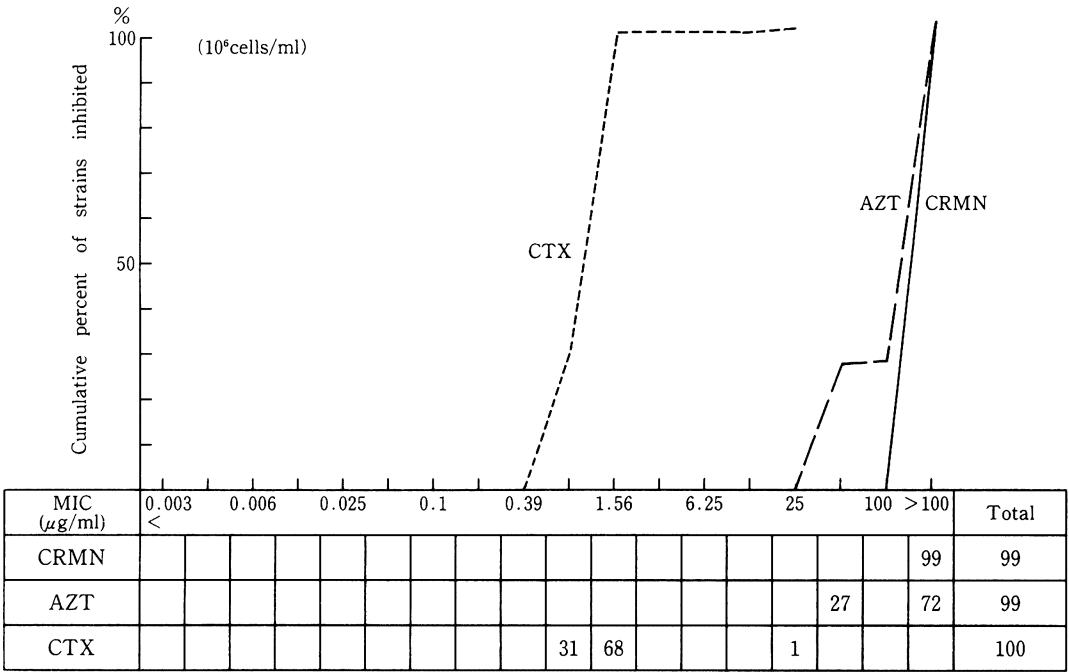


Fig. 3 Antibacterial activity of CRMN against *E. coli*

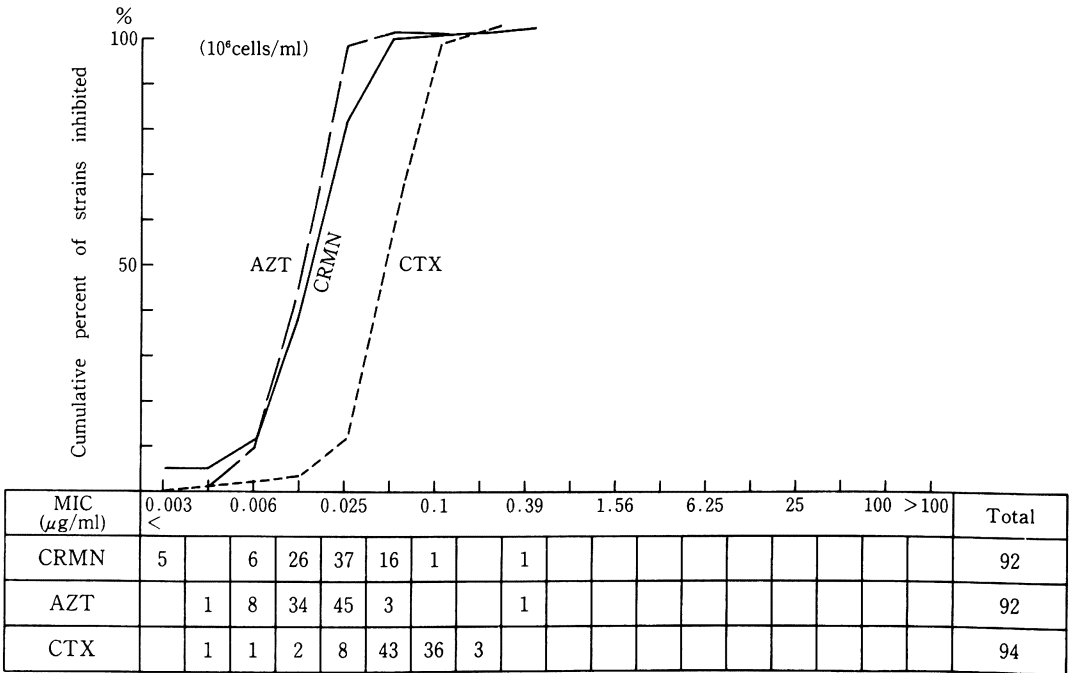


Fig. 4 Antibacterial activity of CRMN against *C. freundii*

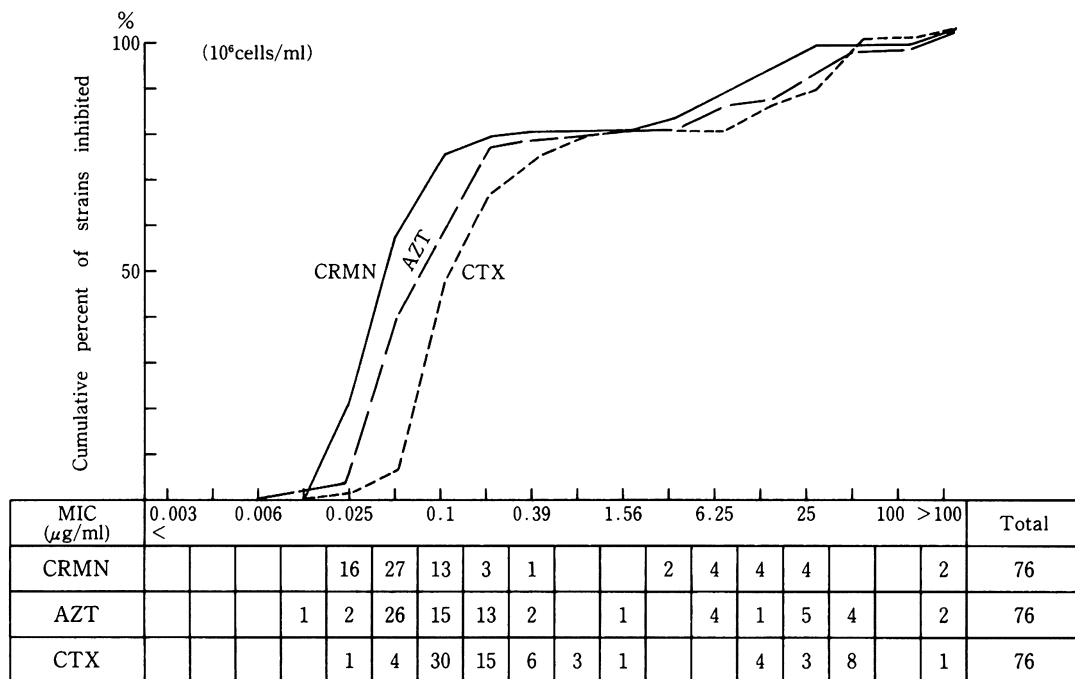


Fig. 5 Antibacterial activity of CRMN against *K. pneumoniae*

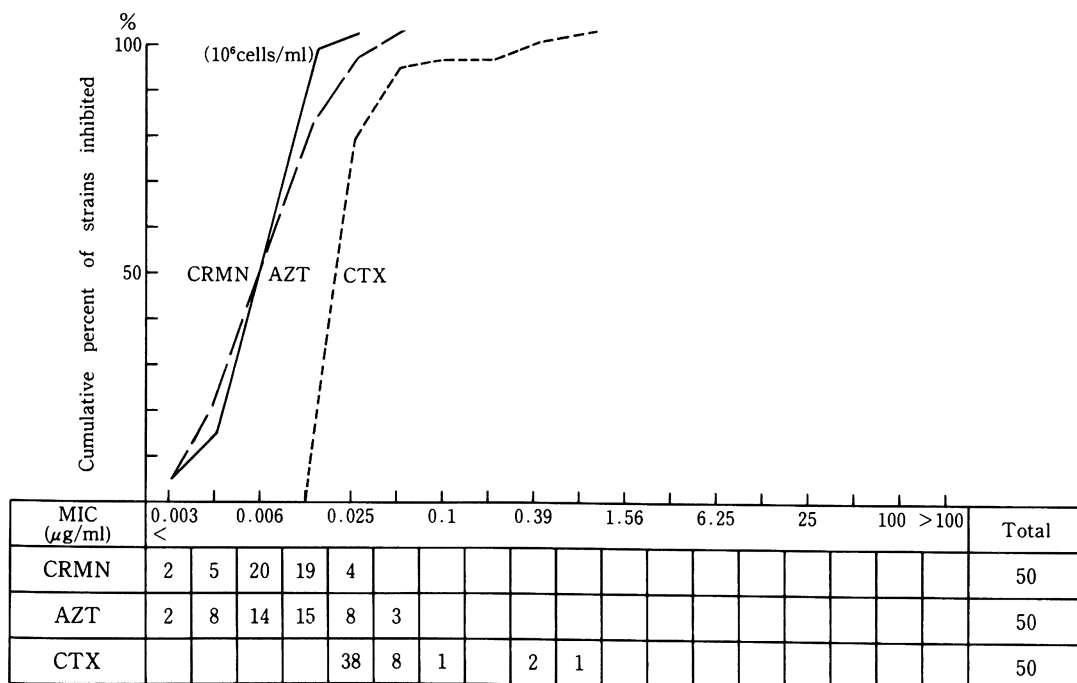


Fig. 6 Antibacterial activity of CRMN against *S. marcescens*

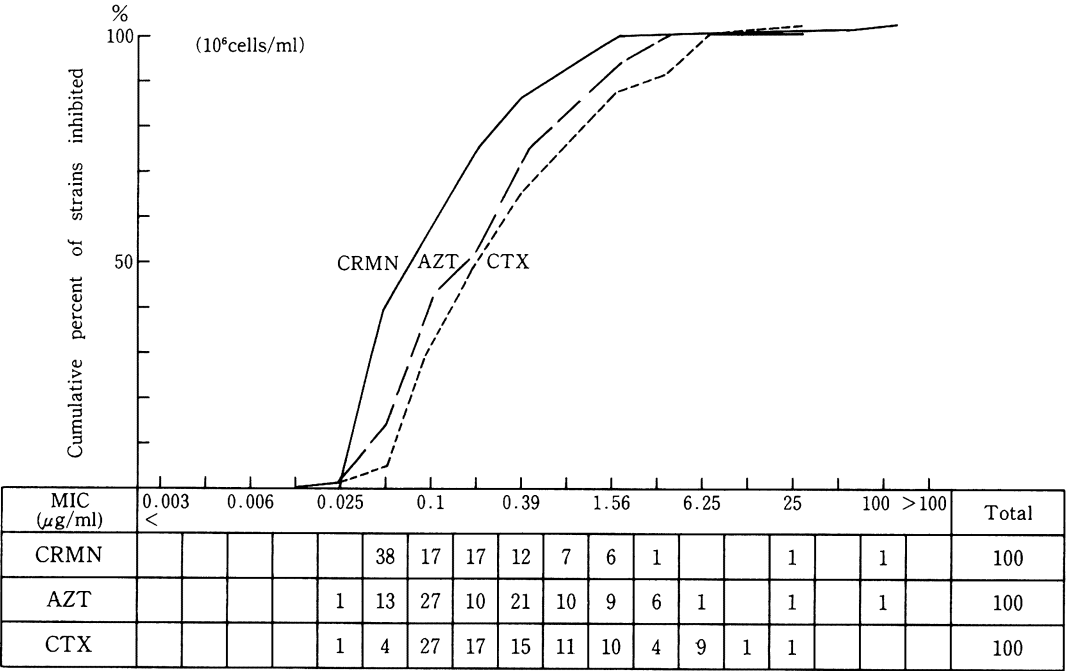


Fig. 7 Antibacterial activity of CRMN against *P. vulgaris*

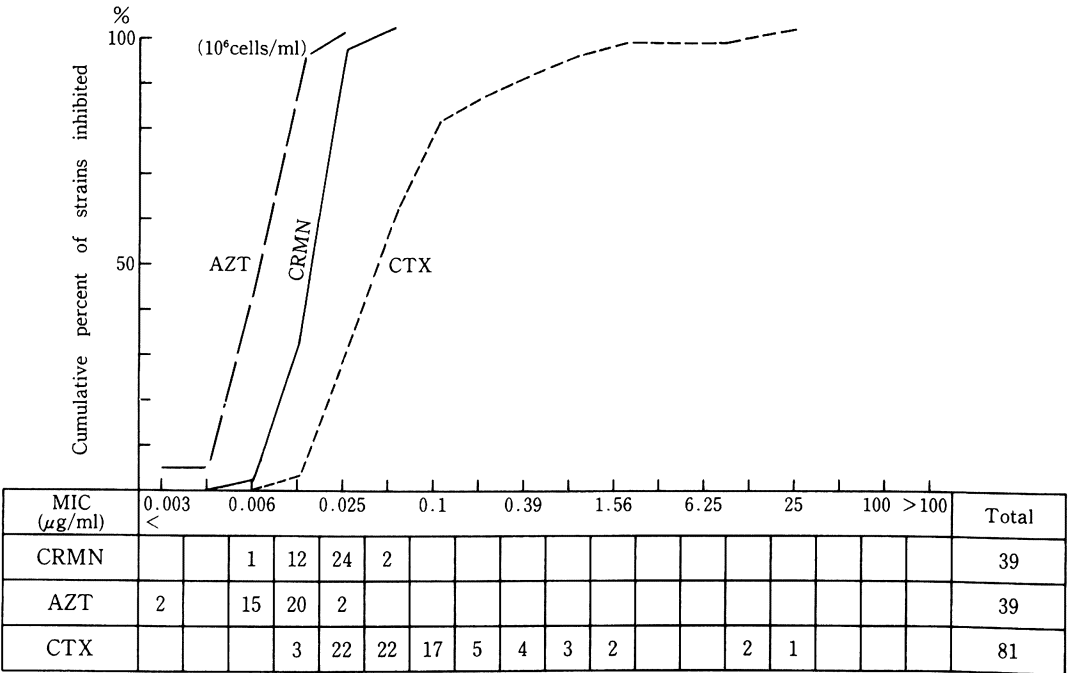


Fig. 8 Antibacterial activity of CRMN against *P. mirabilis*

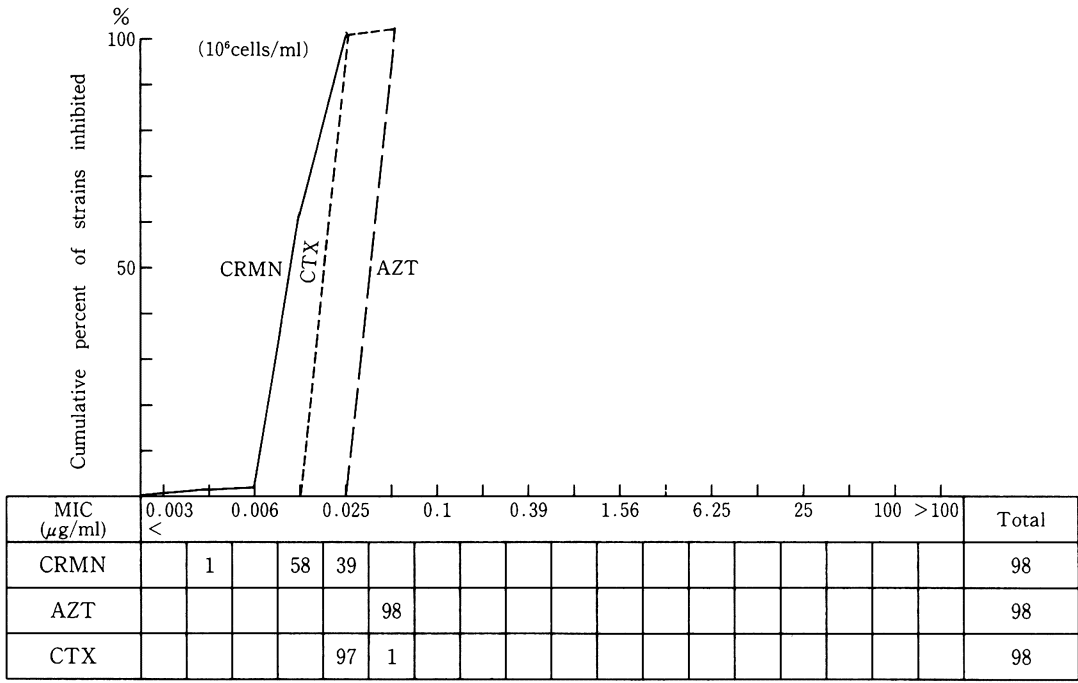


Fig. 9 Antibacterial activity of CRMN against *P. aeruginosa*

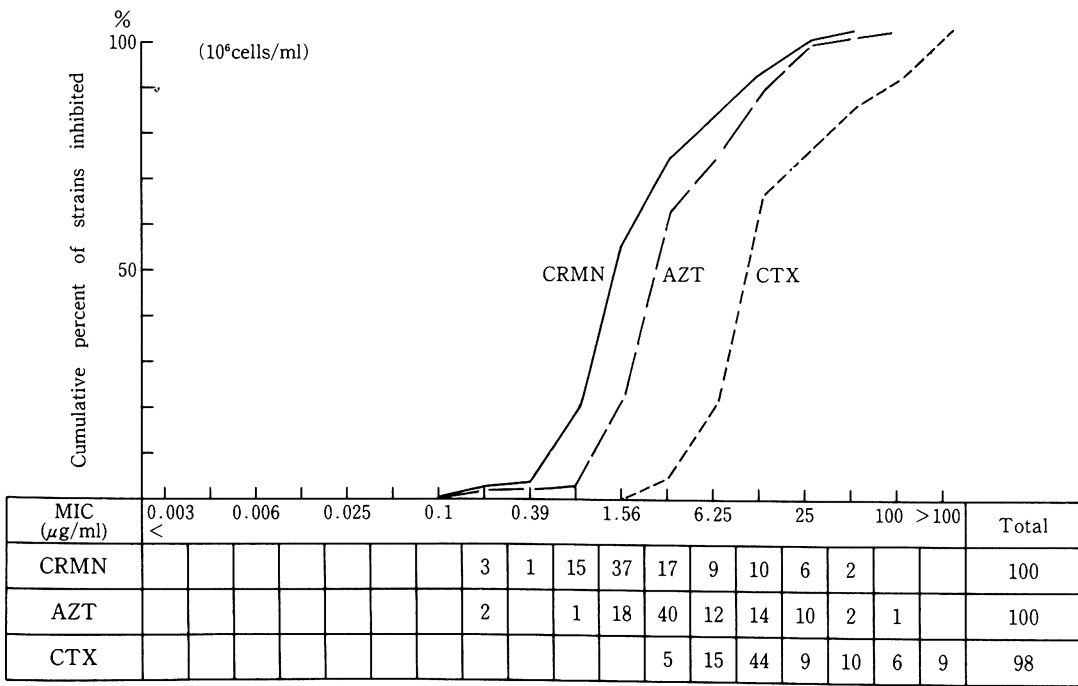


Table 3-1 Comparative MICs of CRMN and other antibiotics tested against clinical isolates

Organism	Antibiotics	MIC range ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>50</sub> * ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> * ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>S. aureus</i>	( 99) CRMN	>100	141.4	186.6
	( 99) AZT	50 ~ >100	124.2	181.8
	(100) CTX	0.78 ~ 25	0.95	1.42
<i>S. epidermidis</i>	(100) CRMN	>100	141.4	186.6
	(100) AZT	12.5 ~ >100	115.4	179.2
	(100) CTX	0.1 ~ >100	1.47	8.51
<i>S. pyogenes</i>	( 53) CRMN	6.25 ~ 12.5	8.47	11.56
	( 53) AZT	6.25 ~ 12.5	8.66	11.61
	( 53) CTX	0.0015 ~ 0.013	0.004	0.008
<i>E. coli</i>	( 92) CRMN	$\leq 0.0015$ ~ 0.39	0.015	0.037
	( 92) AZT	0.003 ~ 0.39	0.014	0.023
	( 94) CTX	0.003 ~ 0.2	0.044	0.088
<i>C. freundii</i>	( 76) CRMN	0.025 ~ >100	0.044	9.47
	( 76) AZT	0.013 ~ >100	0.076	20.03
	( 76) CTX	0.025 ~ >100	0.115	28.22
<i>E. cloacae</i>	( 54) CRMN	0.013 ~ 25	0.4	8.25
	( 54) AZT	0.013 ~ 25	0.39	11.83
	( 54) CTX	0.025 ~ >100	2.21	71.7
<i>K. pneumoniae</i>	( 55) CRMN	0.0015 ~ 0.025	0.006	0.012
	( 50) AZT	0.0015 ~ 0.05	0.006	0.021
	( 50) CTX	0.025 ~ 0.78	0.02	0.046
<i>K. oxytoca</i>	( 50) CRMN	0.006 ~ 0.013	0.007	0.011
	( 50) AZT	0.0015 ~ 0.78	0.008	0.05
	( 50) CTX	0.025 ~ 0.39	0.019	0.1
<i>S. marcescens</i>	(100) CRMN	0.05 ~ 100	0.082	0.706
	(100) AZT	0.025 ~ 100	0.187	1.444
	(100) CTX	0.025 ~ 25	0.209	3.381
<i>P. vulgaris</i>	( 39) CRMN	0.006 ~ 0.05	0.016	0.0237
	( 39) AZT	0.0015 ~ 0.025	0.007	0.0121
	( 81) CTX	0.013 ~ 25	0.041	0.39
<i>M. morgani</i>	( 94) CRMN	0.006 ~ 6.25	0.023	0.365
	( 94) AZT	0.0015 ~ 3.13	0.01	0.072
	( 94) CTX	0.006 ~ 12.5	0.042	0.679
<i>P. mirabilis</i>	( 98) CRMN	0.003 ~ 0.025	0.011	0.021
	( 98) AZT	0.05	0.035	0.047
	( 98) CTX	0.025 ~ 0.05	0.018	0.023



Table 3-2 Comparative MICs of CRMN and other antibiotics tested against clinical isolates

Organism	Antibiotics	MIC range ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>50</sub> * ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> * ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Salmonella</i> spp.	( 99) CRMN	0.006 ~ 0.05	0.017	0.024
	( 99) AZT	0.006 ~ 0.05	0.018	0.025
	( 99) CTX	0.025 ~ 0.2	0.037	0.074
<i>Shigella</i> spp.	(108) CRMN	0.006 ~ 0.2	0.016	0.024
	(108) AZT	0.013 ~ 1.56	0.015	0.033
	(108) CTX	0.006 ~ 0.78	0.019	0.04
<i>P.aeruginosa</i>	(100) CRMN	0.2 ~ 50	1.39	10.88
	(100) AZT	0.2 ~ 100	2.58	15.39
	( 98) CTX	3.13 ~ >100	9.87	91.17
<i>P.cepacia</i>	( 44) CRMN	3.13 ~ 12.5	3.24	5.964
	( 44) AZT	3.13 ~ >100	4.69	24.32
	( 44) CTX	3.13 ~ 50	3.94	10.15
<i>X.maltophilia</i>	( 48) CRMN	0.78 ~ 25	3.94	15.5
	( 40) AZT	6.25 ~ >100	50	151.6
	( 48) CTX	1.56 ~ >100	31.5	114.9
<i>H.influenzae</i>	( 68) CRMN	$\leq 0.0015$ ~ 0.2	0.006	0.017
	( 68) AZT	$\leq 0.0015$ ~ 0.1	0.007	0.014
	( 68) CTX	0.013 ~ 0.025	0.009	0.012
<i>Acinetobacter</i> spp.	( 24) CRMN	1.56 ~ 50	8.34	19.61
	( 24) AZT	6.25 ~ >100	35.36	85.07
	( 24) CTX	0.39 ~ 25	7.55	16.49
<i>N.gonorrhoeae</i>	( 17) CRMN	0.1 ~ 1.56	0.584	1.28
	( 17) AZT	0.013 ~ 0.2	0.541	0.158
	( 17) CTX	$\leq 0.003$ ~ 0.05	0.009	0.028

\* MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were represented as the concentration at which more than 50% and 90% of the isolates were inhibited, respectively.  
Inoculum size; 1 loopful of bacterial suspension ( $1 \times 10^6$  cells/ml)

を阻止した。この時、CTX の感受性ピークは 0.006  $\mu\text{g/ml}$  であり CTX の方が CRMN, AZT に比べ強い抗菌活性を示した。

一方、CRMN はグラム陽性菌よりグラム陰性菌に対して強い活性を示した。*E. coli* に対する CRMN は AZT と同様の抗菌活性を示し、その感受性分布は 1 峯性であり、その感受性ピークは 0.025  $\mu\text{g/ml}$  であった。なお CTX は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  に MIC ピークを示した (Fig. 3)。

*Citrobacter freundii* 76 株 に対する CRMN の MIC<sub>50</sub> は 0.044  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> は 9.47  $\mu\text{g/ml}$  で累

積百分率の勾配は MIC<sub>50</sub> 以上の範囲で比較的小さかった。この傾向は AZT, CTX でも同様であった (Fig. 4)。

*Enterobacter cloacae* 54 株 に対する CRMN の抗菌力は *C. freundii* の場合と同様の傾向を示した。MIC<sub>90</sub> で比較すると抗菌力の強さは CRMN > AZT > CTX の順であった。

*K. pneumoniae* 50 株 に対する CRMN の MIC ピークは、0.006  $\mu\text{g/ml}$  ~ 0.013  $\mu\text{g/ml}$  であり、AZT は 0.003  $\mu\text{g/ml}$  ~ 0.025  $\mu\text{g/ml}$ , CTX は 0.025  $\mu\text{g/ml}$  にそれぞれ MIC ピークを示した。また CRMN

は  $0.025 \mu\text{g/ml}$  ですべての菌株の発育を阻止した (Fig. 5)。

*Klebsiella oxytoca* 50 株に対しても CRMN は強い抗菌活性を示し、 $0.013 \mu\text{g/ml}$  でその発育を完全に抑えた。一方、AZT の感受性ピークは  $0.006 \mu\text{g/ml}$  ～  $0.025 \mu\text{g/ml}$ 、CTX は  $0.025 \mu\text{g/ml}$  であった。

*S. marcescens* 100 株に対する CRMN の  $\text{MIC}_{90}$  は、 $0.71 \mu\text{g/ml}$ 、AZT の  $\text{MIC}_{90}$  は  $1.44 \mu\text{g/ml}$ 、CTX の  $\text{MIC}_{90}$  は  $3.38 \mu\text{g/ml}$  であり、3 薬剤の中で CRMN の抗菌力が優れていた。この傾向は  $\text{MIC}_{50}$  でも同様であった (Fig. 6)。

*Proteus vulgaris* に対する CRMN の感受性ピークは  $0.025 \mu\text{g/ml}$  であり、 $0.05 \mu\text{g/ml}$  ですべての菌の発育を阻止した。AZT、CTX の感受性ピークはそれぞれ  $0.006 \mu\text{g/ml}$  ～  $0.013 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.025 \mu\text{g/ml}$  ～  $0.1 \mu\text{g/ml}$  であった (Fig. 7)。

*Morganella morganii* に対する 3 薬剤の抗菌力は、 $\text{AZT} > \text{CRMN} > \text{CTX}$  の順で *P. vulgaris* と同様の感受性分布を示した。ただし、*M. morganii* における CRMN、AZT の  $\text{MIC}$  領域の差は、*P. vulgaris* に比べ、広い分布を示した (Table 3)。

インドール (-) 菌 *Proteus mirabilis* 98 株に対す

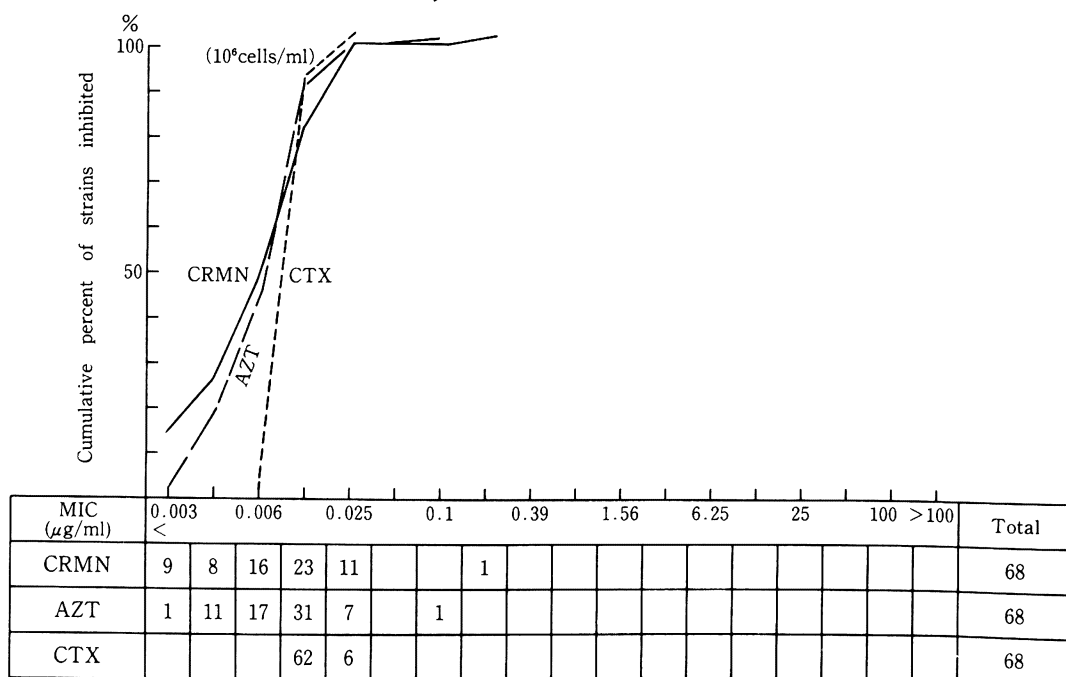
る CRMN の抗菌力は  $0.025 \mu\text{g/ml}$  ですべての菌の発育を抑え、強い抗菌活性を示した。この時、AZT の感受性ピークは  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、CTX は  $0.025 \mu\text{g/ml}$  でともに強い抗菌力を示した (Fig. 8)。

*Salmonella* spp. 99 株における CRMN の抗菌活性は強く、感受性ピークは  $0.025 \mu\text{g/ml}$  であった。また、対照薬剤 AZT、CTX も CRMN と同様な傾向を示した。*Shigella* spp. 108 株に対しても 3 薬剤は抗菌活性が強く、その感受性ピークは CRMN、AZT、CTX とともに  $0.025 \mu\text{g/ml}$  であった。

*P. aeruginosa* に対する CRMN の感受性ピークは  $1.56 \mu\text{g/ml}$  で、AZT ( $3.13 \mu\text{g/ml}$ )、CTX ( $12.5 \mu\text{g/ml}$ ) に比べ 1～3 管 (2～8 倍) 程度強い抗菌活性を示した (Fig. 9)。しかし、これまで述べた菌種に比べ CRMN、AZT、CTX の抗菌力は劣っていた。

*Pseudomonas cepacia* では、CRMN の抗菌力は AZT、CTX とほぼ同程度であった。 $\text{MIC}_{90}$  は CRMN ( $5.96 \mu\text{g/ml}$ )、AZT ( $24.3 \mu\text{g/ml}$ )、CTX ( $10.15 \mu\text{g/ml}$ ) と 3 薬剤の間で明らかに差が認められた。*Xanthomonas maltophilia* に対し、3 薬剤とも明確な感受性ピークが認められないが、CRMN では  $25 \mu\text{g/ml}$  ですべての菌の発育を抑え、CTX、

Fig. 10 Antibacterial activity of CRMN against *H. influenzae*



AZT は 10~20% が  $>100 \mu\text{g/ml}$  の MIC 値を示した。

*H. influenzae* 68 株に対する CRMN の抗菌活性は非常に強く  $0.013 \mu\text{g/ml}$  に感受性ピークを示した。対照薬剤 AZT, CTX も全く同様であった (Fig. 10)。

*Acinetobacter* spp. 24 株に対し, 3 薬剤の抗菌力は, CRMN と CTX はほぼ同程度の  $12.5 \mu\text{g/ml}$  に感受性ピークを示し, AZT は, それより 2 管程度劣った結果を示した。*N. gonorrhoeae* 17 株に対する CRMN の MIC 分布は, 2 峯性を示したが,  $1.56 \mu\text{g/ml}$  ですべての菌の発育を阻止した。しかし, AZT, CTX に較べるとその抗菌力は劣る結果であった。

### 3. 殺菌効果

(1) 標準菌株 19 株を用いて, CRMN の MIC と MBC を AZT, CTX を対照薬剤として比較した。各菌種に対し, CRMN および対照薬剤ともに MIC, MBC の間にはほとんど差が認められなかつ

た (Table 4)。

(2) 殺菌力を, 細菌の増殖曲線に及ぼす影響から検討した (Fig. 11~Fig. 14)。*E. coli* GN5482 は, CRMN  $6.25 \mu\text{g/ml}$  で, 24 時間後も再増殖が認められなかったが, AZT は  $6.25 \mu\text{g/ml}$  でわずかの再増殖が認められた (Fig. 11)。*E. coli* K-12C600 に対して, CRMN, AZT とともに  $0.4 \mu\text{g/ml}$  で 6 時間目まで殺菌力に作用し, 24 時間後も再増殖が認められなかった (Fig. 12)。

*P. vulgaris* GN7919 に対する増殖曲線の影響では, CRMN は AZT に比べ約 1/100 の濃度で, ほぼ同程度の殺菌力を示した。しかし菌は薬剤作用後 24 時間目から再増殖が認められた (Fig. 13)。

*P. vulgaris* OX-19 は, CRMN  $0.025 \mu\text{g/ml}$  の濃度で, 24 時間後も再増殖が認められなかった。しかし, AZT は  $0.025 \mu\text{g/ml}$  でわずかの再増殖が認められた (Fig. 14)。

### 4. $\beta$ -Lactamase に対する安定性

Table 4 Bactericidal activity of CRMN against standard strains

Test strain	CRMN		AZT		CTX	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>E.coli</i> K-12 C 600	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>E.cloacae</i> 963	0.39	0.39	0.78	0.78	6.25	3.13
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13	1.56
<i>K.pneumoniae</i> PCI-602	0.05	0.05	0.013	0.013	0.013	0.006
<i>S.typhimurium</i> IID 971	0.1	0.1	0.2	0.1	0.39	0.2
<i>S.typhi</i> 901	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S.paratyphi</i> 1015	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025	0.013
<i>S.schottmuelleri</i> 8006	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S.enteritidis</i> G 14	0.05	0.05	0.05	0.025	0.05	0.05
<i>S.marcescens</i> IAM-1184	0.05	0.05	0.05	0.025	0.2	0.1
<i>M.morganii</i> IFO 3848	0.05	0.025	0.013	0.013	$<0.013$	$<0.013$
<i>P.mirabilis</i> IFO 3849	0.05	0.05	0.025	0.025	0.1	0.05
<i>P.vulgaris</i> OX-19	0.05	0.05	0.025	0.013	0.025	0.025
<i>P.vulgaris</i> HX-19	0.05	0.05	0.013	0.013	$<0.013$	$<0.013$
<i>P.rettgeri</i> IFO 3850	0.013	0.013	0.013	0.013	$<0.013$	$<0.013$
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3445	3.13	3.13	12.5	6.25	200	100
<i>P.aeruginosa</i> NCTC 10490	0.78	0.39	1.56	0.78	25	12.5
<i>P.aeruginosa</i> PAO 1	6.25	6.25	25	6.25	100	100

MBC : Minimal bactericidal concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

MIC : Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

(1)  $\beta$ -Lactamase 産生菌株に対する CRMN の抗菌力

Table 5 は各種の  $\beta$ -lactamase 産生菌に対する CRMN の抗菌力を示している。CRMN は宿主とし

て *P. aeruginosa*, *X. maltophilia* を除く各種  $\beta$ -lactamase 産生菌に対し強い抗菌力を示し、その抗菌力は AZT の抗菌力とほぼ同程度であった。しかし、CSase 産生菌 *E. cloacae* および CXase 産生菌

Table 5 Antibacterial activity of CRMN against  $\beta$ -lactamase producing organisms

Organism	MIC ( $\mu$ g/ml)*		
	CRMN	AZT	CTX
<i>P. rettgeri</i> GN 5284	1.56	3.13	0.2
<i>P. rettgeri</i> GN 4430	0.006	0.013	0.05
<i>P. rettgeri</i> GN 4424	0.013	0.013	0.013
<i>P. rettgeri</i> GN 4429	0.006	0.013	0.05
<i>P. rettgeri</i> GN 4762	0.025	0.05	0.39
<i>E. coli</i> GN 5482	1.56	0.78	0.39
<i>E. coli</i> No.1058	0.05	0.05	0.1
<i>E. coli</i> No.96	0.78	0.78	0.39
<i>E. cloacae</i> GN 7471	0.2	1.56	6.25
<i>E. cloacae</i> GN 7467	0.39	3.13	6.25
<i>E. cloacae</i> GN 5797	0.1	0.2	0.39
<i>M. morganii</i> GN 5407	0.1	0.013	0.2
<i>M. morganii</i> GN 5307	0.025	0.013	6.25
<i>M. morganii</i> GN 5375	0.025	0.013	0.78
<i>P. vulgaris</i> GN 76	0.025	0.006	0.05
<i>P. vulgaris</i> GN 4413	0.1	0.05	12.5
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	12.5	12.5	50
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362	3.13	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> GN 10367	3.13	3.13	12.5
<i>S. marcescens</i> L-48	0.39	0.78	6.25
<i>S. marcescens</i> L-65	0.1	0.2	0.2
<i>S. marcescens</i> L-82	0.1	0.05	0.39
<i>P. vulgaris</i> GN 7919	0.05	0.2	12.5
<i>K. oxytoca</i> GN 10650	0.025	12.5	3.13
<i>P. cepacia</i> GN 11164	1.56	0.78	12.5
<i>X. maltophilia</i> GN 12873	12.5	>200	>100
Rms 212/ <i>E. coli</i> W 3630 type I	0.1	0.2	0.2
Rms 213/ <i>E. coli</i> W 3630 type II	0.025	0.013	0.39
Rte 16/ <i>E. coli</i> ML 1410 type III	0.025	0.05	0.1
Rms 149/ <i>E. coli</i> C type IV	0.05	0.05	0.05

\* Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension ( $10^6$  cells/ml).

Fig. 11 Bactericidal activity of CRMN and AZT against *E. coli* GN5482

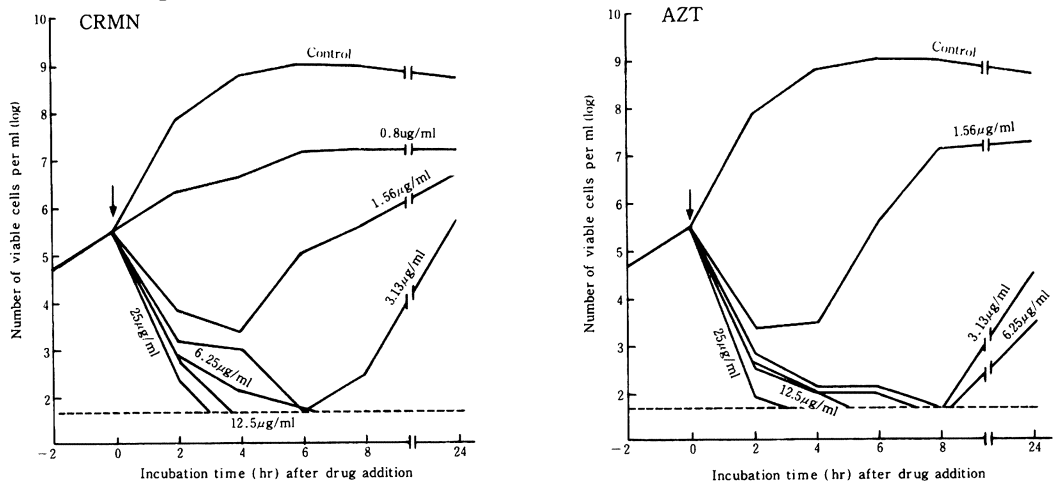


Fig. 12 Bactericidal activity of CRMN and AZT against *E. coli* K-12 C600

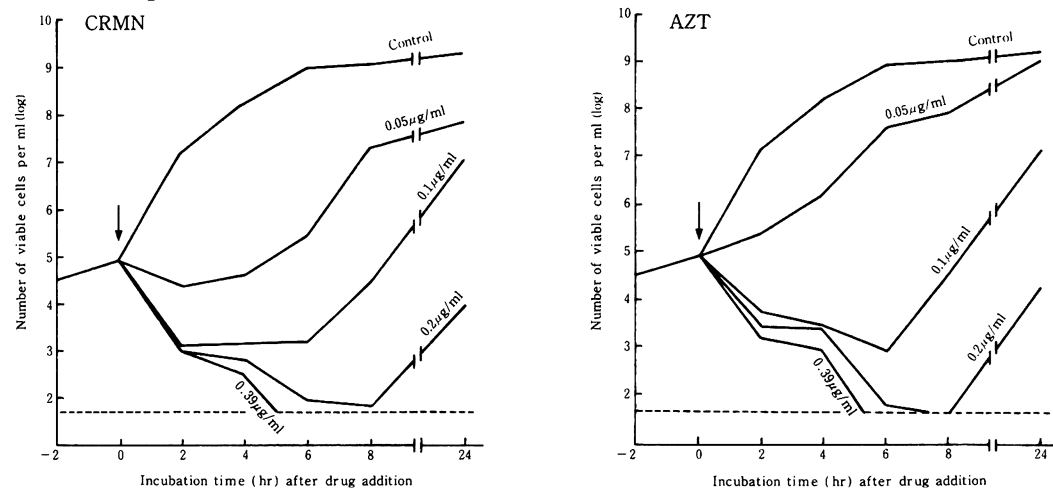


Fig. 13 Bactericidal activity of CRMN and AZT against *P. vulgaris* GN7919

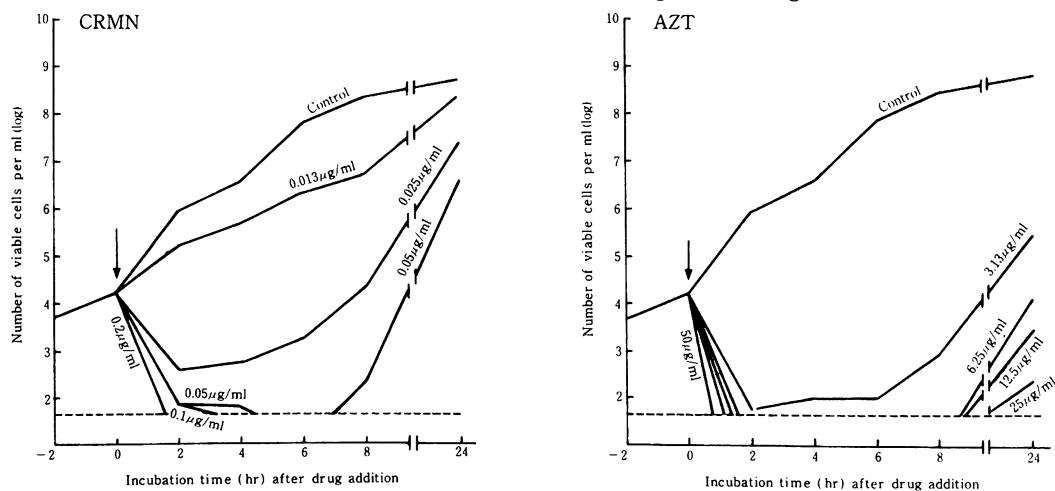
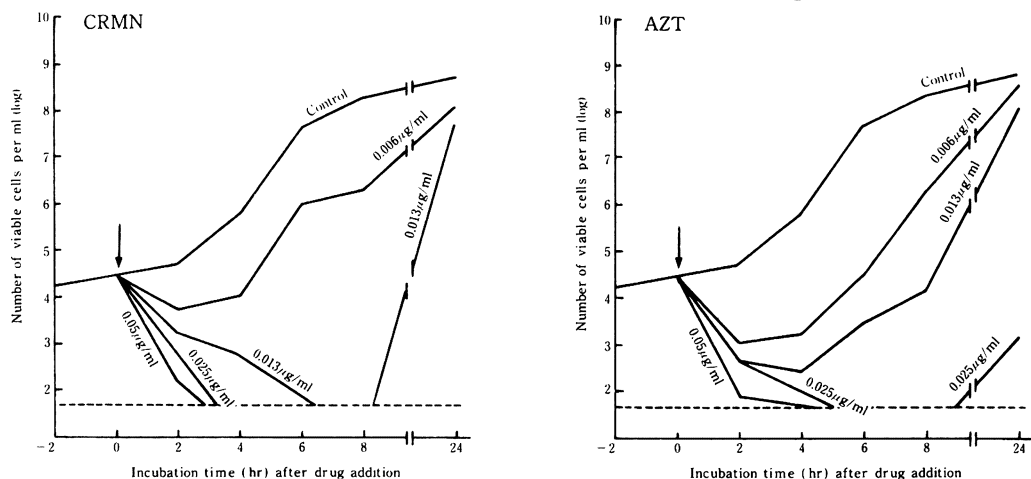


Fig. 14 Bactericidal activity of CRMN and AZT against *P. vulgaris* OX-19Table 6  $\beta$ -Lactamase stability of CRMN against PCase, CSase and CXase

Enzyme source		Relative hydrolysis(Vmax)* and inhibition constant(Ki)**			
		CRMN		AZT	
		Vmax	Ki( $\mu$ M)	Vmax	Ki( $\mu$ M)
Rms 212/ <i>E.coli</i> W 3630(type I)	PCase	0	—	0	—
Rms 213/ <i>E.coli</i> W 3630(type II)	PCase	0	—	0	—
<i>E.coli</i> GN 5482	CSase	0	0.16	0	0.04
<i>P.aeruginosa</i> GN 10362	CSase	0	1.81	0	0.26
<i>E.cloacae</i> GN 7471	CSase	0	1.53	0	0.8
<i>M.morganii</i> GN 5407	CSase	0	0.05	0	0.07
<i>P.rettgeri</i> GN 4430	CSase	0	51.8	0	13.7
<i>P.vulgaris</i> GN 7919	CXase	0	—	0.9	—
<i>K.oxytoca</i> GN 10650	CXase	0	—	13	—
<i>P.cepacia</i> GN 11164	CXase	0	—	63	—
<i>X.maltophilia</i> GN 12873 L-2	CXase	0	—	0.2	—

\* Cephaloridine=100

\*\* Substrate=Cephaloridine

*K. oxytoca* に対する CRMN の抗菌力は AZT のそれよりも強かった。

(2) 各種の  $\beta$ -lactamase に対する CRMN の安定性

CRMN の  $\beta$ -lactamase に対する安定性を検討した(Table 6)。CRMN は PCase および CSase に対し全く安定で、かつ CSase 活性を阻害した。また、

CRMN は CXase に対しても安定であった。しかし、AZT は *K. oxytoca*, *P. cepacia* の産生する CXase により加水分解された。

#### 5. Dehydropeptidase 1 に対する安定性

腎臓には dehydropeptidase 1 が存在し、carbapenem を不活化することが知られている。豚の腎から精製した dehydropeptidase 1 に対する CRMN

Table 7 Stability of CRMN against swine renal dehydropeptidase

Substrate	Vmax	Km(mM)
Glycyldehydro-phenyl-alanine	100	1.10
CRMN	—*	
AZT	—	
Imipenem	1.88	1.38
PCG	—	
CER	—	

\*Not detected

の安定性を調べた。Table 7 に示すごとく CRMN, AZT は本酵素によって不活化されない。

#### 6. マウス感染治療実験

*E. coli* ML4707, *E. coli* ML4970, *S. marcescens* GN7577, *K. pneumoniae* GN6445 を用い, CRMN の *in vivo* 抗菌活性をマウス感染症に対する感染防御効果で検討した (Table 8)。*E. coli* ML4707 に対し, CRMN の ED<sub>50</sub> は 0.098 mg/kg で, AZT, CTX とほぼ同程度の活性を示した。

*E. coli* ML4970 に対する CRMN の ED<sub>50</sub> は 2.17 mg/kg であり, CTX (48.6 mg/kg), AZT (117.4 mg/kg) に対し, CRMN の方が強い値を示した。

*S. marcescens* に対し, CRMN の ED<sub>50</sub> は 2.64 mg/kg で, AZT より劣った。しかし, CTX に比べ, 約 13 倍程度 CRMN の方が強い活性を示した。

*K. pneumoniae* GN6445 に対する CRMN の ED<sub>50</sub> は 0.43 mg/kg であり, 対照薬剤 AZT (0.36 mg/kg), CTX (0.41 mg/kg) とほぼ同程度の活性であった。

### III. 考 察

CRMN はグラム陰性桿菌に対し強い抗菌力を示したが, グラム陽性菌に対する抗菌力は AZT 同様に弱かった。CRMN の *Pseudomonas* 属, *Acinetobacter* 属に対する抗菌力は AZT より強かった。この両菌種に対する抗菌力のちがいは, その化学構造, とくに azetidinone 環の C(3) と C(4) 位の置換基が互いに *cis* 配置であることを反映しているものと考えられる。

$\beta$ -Lactam 剤耐性菌の耐性機構の主なものは,  $\beta$ -

Table 8 A comparison of the *in vivo* antibacterial activity of CRMN, AZT and CTX against systemic infection

Challenge organism	Challenge dose (cells/mouse)	Antibiotic	MIC ( $\mu$ g/ml)	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	95% confidence limit
<i>E. coli</i> ML 4707	$6.3 \times 10^3$ (139 LD <sub>50</sub> )	CRMN	0.025	0.098	0.060 — 0.15
		AZT	0.025	0.128	0.085 — 0.21
		CTX	0.025	0.076	0.058 — 0.10
<i>E. coli</i> ML 4970	$1.26 \times 10^5$ (43 LD <sub>50</sub> )	CRMN	0.025	2.17	1.38 — 4.15
		AZT	12.5	117.4	82.9 — 706
		CTX	12.5	48.6	33.8 — 90.8
<i>S. marcescens</i> GN 7577	$1.58 \times 10^5$ (74 LD <sub>50</sub> )	CRMN	0.05	2.64	1.25 — 4.18
		AZT	0.1	1.49	0.79 — 2.39
		CTX	0.2	32.5	8.32 — 48.8
<i>K. pneumoniae</i> GN 6445	$1.11 \times 10^6$ (9 LD <sub>50</sub> )	CRMN	0.05	0.43	0.28 — 0.63
		AZT	0.025	0.36	0.22 — 0.57
		CTX	0.013	0.41	0.26 — 0.64

lactamase がその本態である。したがって臨床細菌に対する薬剤の抗菌力は  $\beta$ -lactamase に安定であることが重要な要因となる。CRMN は PCase,

CSase などの  $\beta$ -lactamase のみならず, 多くの  $\beta$ -lactam 剤をも加水分解する CXase に対しても安定であった。また, 調べた CSase に対する CRMN および AZT の  $K_i$  値は傾向として CRMN の方が AZT に比べ大きかった。また, AZT, CRMN の *Providencia rettgeri* の CSase に対する  $K_i$  値はともに他菌種の  $K_i$  値に比べてくに大きい値を示したことも 1 つの特徴である。以上の CRMN の各  $\beta$ -lactamase に対する安定性の結果は抗菌力にも反映していた。この抗菌力の強さは CXase を多量に産生する *P. vulgaris* GN7919 に対する殺菌作用の結果にも示されている。すなわち CRMN は AZT に比べ 1/100 の濃度でほぼ AZT のそれと同程度の殺菌力を示した。しかし, 菌は薬剤作用後 24 時間目から再増殖が認められた。この時, 再増殖した菌の CRMN の MIC 値は元株のそれと全く同様であった。この結果, 再増殖菌は薬剤に対する耐性菌を選択しているわけでないことを示している。

マウス感染治療実験において CRMN は *E. coli* ML4707, *S. marcescens* GN7577, *K. pneumoniae* GN6445 に対して AZT とほぼ同程度の  $ED_{50}$  値を示した。また, *E. coli* ML4970 に対する CRMN の  $ED_{50}$  値は MIC に比例し対照薬剤の AZT, CTX よりも優れた治療効果を示した。以上の結果よりグラム陰性桿菌由来の種々の  $\beta$ -lactamase に安定であ

る CRMN は臨床において十分期待される薬剤といえよう。

## 文 献

- 1) IMADA, A.; K. KITANO, K. KINTAKA, M. MUROI & M. ASAI: Sulfazecin and isosulfazecin, novel  $\beta$ -lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature* 289: 590~591, 1981
- 2) KISHIMOTO, S.; M. SENDAI, S. HASHIGUCHI, M. TOMIMOTO, Y. SATOH, T. MATSUO, M. KONDO & M. OCHIAI: Synthesis of sulfazecin-type 2-azetidinones with a carbon substituent at the 4-position. *J. Antibiotics* 36: 1421~1424, 1981
- 3) 三橋 進, 井上松久: MIC 測定用標準菌株. *Chemotherapy* 27: 561, 1979
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 5) 小柏美恵子, 井上松久, 三橋 進: Ceftazidime (SN401) に関する細菌学的検討. *Chemotherapy* 31: 1~6, 1983
- 6) WALEY, S.G.: A spectrophotometric assay of beta-lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780~789, 1974
- 7) LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurements with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 192: 265~275, 1951
- 8) LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON: A simple method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol.* 92: 99~113, 1948

## IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CARUMONAM

KUNIO INOUE, TAMIKO NAKANE, KOUJI MATSUDA,  
MATSUHISA INOUE\* and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute, Seta, Gunma

\*Laboratory of Drug Resistance in Bacterial,

Gunma University School of Medicine, Maebashi, Gunma

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of carumonam (CRMN) against both Gram-positive and Gram-negative clinical isolates was studied in comparison with that of aztreonam and cefotaxime. CRMN showed potent antibacterial activity against Gram-negative bacteria, particularly strains of *Enterobacteriaceae*. It also inhibited strains of *Pseudomonas* at low concentrations, but showed less activity against Gram-positive bacteria. It was highly resistant to hydrolysis by both chromosomal and plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases. On the other hand, the 50 % effective dose ( $ED_{50}$ ) in experimental murine mice infections was 0.098 mg/kg against *Escherichia coli* ML4707, 2.64 mg/kg against *Serratia marcescens* GN7577 and 0.43 mg/kg against *Klebsiella pneumoniae* GN6445.