

## Carumonam のペニシリン結合蛋白への 親和性、殺菌・溶菌作用ならびに 形態変化誘発作用について

中尾雅文・幸重浩一・長谷暁子

近藤正熙・今田 哲

武田薬品工業株式会社中央研究所

Carumonam の各種細菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) への親和性、殺菌・溶菌作用ならびに形態変化誘発作用を、同じ単環性 N-sulfo  $\beta$ -lactam 剤の aztreonam および第三代 cephem 剤のそれらと比較検討した。

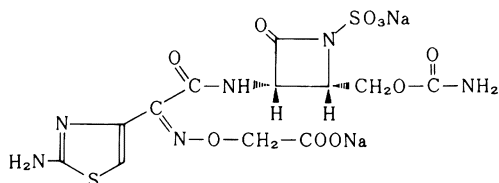
Carumonam は aztreonam と同様、腸内細菌の PBP3 に対して高い親和性を示し、その  $I_{50}$  値は *Enterobacter cloacae* を除く大部分の菌で MIC 値に近似した。*Pseudomonas aeruginosa* の PBP3 にも高い親和性を示したが、抗菌力とは関連しなかった。一方、抗菌力を示さない *Staphylococcus aureus* や *Bacteroides fragilis* の PBP への親和性は低かった。Carumonam は aztreonam と同様、腸内細菌に対しては MIC ないしそれ以下の濃度で強い殺菌作用を、*P. aeruginosa* に対しては MIC 以上で弱い殺菌作用を示した。Carumonam および aztreonam は、*Escherichia coli* など一部の菌に溶菌作用を示した。

Carumonam 処理菌の形態変化は伸長化が主体であり、スフェロプラスト形成能は cephem 剤よりも弱かったが、*E. coli* や *Serratia marcescens* では薬剤との接触時間が長びくにつれて細胞の扁平化や細胞質の希薄化が認められた。

### 結 言

Carumonam (CRMN) は武田薬品中央研究所で合成された新規単環性の N-sulfo  $\beta$ -lactam 剤である<sup>1,2)</sup> (Fig. 1)。CRMN は *Pseudomonas aeruginosa* を含む各種のグラム陰性菌に強い抗菌活性を有しているが、グラム陽性菌および嫌気性菌に対する抗菌力は弱い<sup>3)</sup>。本研究では CRMN の抗菌活性評価の一環として、同剤の各種細菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) への親和性、殺菌・溶菌作用、ならびに形態変化誘発作用を同じ単環性 N-sulfo  $\beta$ -lactam 剤である aztreonam (AZT)<sup>4)</sup>、および cefoperazone (CPZ)<sup>5)</sup>、cefmenoxime (CMX)<sup>6)</sup>、cefsulodin (CFS)<sup>7)</sup> などの cephem 剤のそれらと比較検

Fig. 1 Chemical structure of carumonam



討した。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 使用薬剤

CRMN および CMX は武田薬品中央研究所で、AZT は Hoffmann-La Roche 社でそれぞれ合成したものを、CPZ (富山化学) および CFS (武田薬品) は市販品を用いた。

#### 2. 使用菌株および培養条件

実験室保存好気性細菌は Trypticase soy agar (TSA: BBL) あるいは Mueller-Hinton agar (MHA: BBL) で、また *Bacteroides fragilis* は GAM 半流動高層培地 (GAMA: 日水製薬) で継代保存した。*B. fragilis* は GAM broth (GAMB: 日水製薬) で、その他の菌は Trypticase soy broth (TSB: BBL) を用いて 37°C 一夜培養後、実験に供した。

#### 3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC は TSB あるいは GAMB を用いた液体希釈法で測定した。それぞれの培地で約  $10^6$  CFU/ml に

調製した菌液 4.5 ml に 2 倍希釈濃度系列の薬剤 0.5 ml を添加して 37°C 一夜培養後、肉眼的に培地の混濁が認められないか、あるいは薬剤を含まない培地におけるよりも著しく菌の発育が阻害された最小薬剤濃度を MIC とした。

#### 4. PBP への親和性測定

PBP に対する被験薬剤の親和性は、対数増殖期の菌を破碎して膜画分を得、以下 Nozaki ら<sup>8)</sup>の方法に準じて測定し、各 PBP への [<sup>14</sup>C] benzylpenicillin の結合を 50% 阻害する薬剤濃度 (I<sub>50</sub>) として表した。

#### 5. 殺菌作用

TSB を用いて約 10<sup>6</sup> CFU/ml に調製した被験菌液を Biophotometer (Bio-Log II, Jouan-Quentin, S.A.) 内のセルに接種し、これに 2 倍希釈濃度系列の薬剤を添加して 37°C で振盪培養した。0, 1, 2, 4, 6 および 8 時間後に培養液の一部を採取し、適宜希釈を行って TSA を用いて混釈培養した。37°C 一夜培養後、発育したコロニー数より各検体 1 ml 中の生菌数 (CFU) を求めた。

#### 6. 溶菌作用

TSB を用いて約 10<sup>6</sup> CFU/ml に調製した被験菌液を Biophotometer 内のセルに接種して 37°C で振盪培養し、増殖が transmittance 90% に達した時点で、4 倍希釈濃度系列の薬剤を添加して以後の濁度の変化を自動的に記録した。

#### 7. 光学顕微鏡による形態観察

TSB を用いて 37°C 一夜培養した菌を TSB で 100 倍希釈し、37°C 1 時間静置培養した。この菌液 9 ml と 2 倍希釈濃度系列の薬剤 1 ml とを T 字形試験管に分注し、モノ式振盪培養装置を用いて 37°C で培養した。2 および 4 時間後に培養液を 1 白金耳採取してスライドガラスに塗抹し、常法に従って固定を行い、メチレンブルーで染色後鏡検した。形態変化の判定は Tsuchiya ら<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。またマラカイトグリーン-フクシン染色法<sup>9)</sup>により菌の生死を判定した。

#### 8. 電子顕微鏡による形態観察

薬剤処理した菌は 0.05M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 2.5% グルタルアルデヒドで 3 時間前固定し、同緩衝液に溶解した 1% オスミウム酸で 2 時間後固定した。エタノールの濃度上昇系列で脱水後、走査電子顕微鏡 (SEM) 用の試料は臨界点乾燥を行い、金蒸着を施して ISI-DS130

型走査電子顕微鏡で観察した。透過電子顕微鏡 (TEM) 用の試料は Epon 812 に包埋し、超薄切片を作製後電子染色を施して JEM 1200EX 型透過電子顕微鏡で観察した。

## 成 績

### 1. PBP への親和性

各種細菌の PBP のパターンおよび各種薬剤のこれら PBP への親和性を Table 1 に示す。CRMN は同薬剤に高い感受性を示す各種好気性グラム陰性菌の PBP3 に高い親和性を示し、その I<sub>50</sub> 値は *Enterobacter cloacae* IFO 12937 および *P. aeruginosa* P9 を除く大部分の菌で MIC 値に近かった。*E. cloacae* IFO 12937 および *P. aeruginosa* P9 の PBP3 での I<sub>50</sub> 値は MIC 値よりも著しく低かった。また PBP1 がフルオログラム上で複数のバンドに分離した場合、その一部にもある程度の親和性を示したが、PBP2, 4 および 5/6 にはほとんど結合しなかった。一方、CRMN が抗菌力を示さない *Staphylococcus aureus* および *B. fragilis* の PBP への親和性は低かった。AZT の PBP への親和性パターンは CRMN とほぼ同様であったが、CPZ および CMX は PBP3 のほか 1 および 2 にも高い親和性を示した。

### 2. 殺菌作用

CRMN は *E. coli* NIHJ JC-2 に対して 0.2 μg/ml (1 MIC) 以上で明らかな殺菌作用を示し、8 時間後まで生菌数が減少した。AZT および CMX では 6 時間以降わずかな菌数の増加が認められた。CPZ の殺菌作用は他剤よりも弱かった (Fig. 2)。*Klebsiella pneumoniae* DT-S に対して CRMN は 0.05 μg/ml (1/2 MIC) 以上の濃度で殺菌作用を示した。AZT は CRMN とほぼ同程度の殺菌効果を示し、CMX の殺菌作用は被験薬剤の中で最も強かった (Fig. 3)。*Serratia marcescens* IFO 12648 および *Proteus mirabilis* IFO 3849 に対して CRMN は 1/4~4 MIC の濃度範囲で同程度の強い殺菌作用を示し、8 時間後まで生菌数が減少した。CMX は CRMN とほぼ同様の傾向を示した。AZT および CPZ では MIC 以下の濃度で再増殖がみられた (Fig. 4, 5)。CRMN の *P. aeruginosa* P9 に対する殺菌作用はさきの *Enterobacteriaceae* の各菌種に対するよりも弱く、1.56 μg/ml (1 MIC) 以上の濃度で生菌数の減少がみられた。CRMN の殺菌効果は

Table 1 Affinities of carumonam and reference antibiotics for penicillin-binding proteins (PBPs)

Organism	PBP No.	$I_{50}$ , $\mu\text{g/ml}^a$				Organism	PBP No.	$I_{50}$ , $\mu\text{g/ml}$				Organism	PBP No.	$I_{50}$ , $\mu\text{g/ml}$			
		CRMN <sup>b)</sup>	AZT	CPZ	CMX			CRMN	AZT	CPZ	CMX			CRMN	AZT	CPZ	CMX
<i>S. aureus</i> FDA 209P	1	294	124	0.306	0.201	<i>K. pneumoniae</i> No. 13	1	>40	>40	2.46	0.60	<i>P. vulgaris</i> IFO 3988	1a	2.51	0.99	0.56	0.99
	2	291	125	0.059	0.177		2	>40	>40	0.68	0.61		1b	>40	>40	2.56	6.98
	3	>400	275	0.224	0.580		3	0.059	0.095	<0.04	0.013		2	>40	>40	0.23	0.59
	*	>400	282	0.200	0.180		4	>40	>40	>40	38.8		3	0.045	0.067	0.04	0.029
	4	>400	>400	>40	13.0		5/6	>40	>40	>40	>40		4	>40	>40	>40	>40
MIC		>100	>100	0.78	0.78	MIC		0.05	0.1	1.56	0.39	MIC		0.1	0.05	1.56	0.1
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1a	2.6	0.33	0.44	0.41	<i>E. cloacae</i> IFO 12937	1a	12.1	0.77	0.69	0.18	<i>P. aeruginosa</i> P 9	1a	10.4	2.76	0.11	0.04
	1b	>40	>40	1.14	1.46		1b	>40	21.1	1.28	0.38		1b	4.42	4.58	1.54	2.21
	2	>40	>40	0.63	1.72		2	>40	>40	1.02	0.84		2	>40	>40	>40	>40
	3	0.06	0.02	0.04	0.17		3	0.045	0.05	3.33	0.06		3	0.031	0.010	<0.04	0.015
	4	>40	>40	>40	>40		4	>40	>40	>40	>40		4	>40	>40	>40	>40
5/6	>40	>40	>40	>40	5/6	>40	>40	>40	>40	5/6	>40	>40	>40	>40			
MIC		0.2	0.39	0.39	0.78	MIC		6.25	50	12.5	25	MIC		1.56	1.56	3.13	6.25
<i>C. freundii</i> IFO 12681	1	>40	9.66	1.05	1.10	<i>S. marcescens</i> IFO 12648	1	19.6	5.13	6.04	0.34	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	1	90.1	16.0	16.1	0.157
	2	>40	>40	0.87	1.35		1a	10.3	12.5	6.51	0.55		1	66.4	12.0	14.4	0.149
	3	0.24	0.13	<0.04	0.082		1b	12.4	17.6	7.52	0.86		2	16.4	6.26	1.11	0.071
	4	>40	>40	>40	>40		2	>40	>40	1.99	0.37		3	>400	>400	1.02	3.39
	5/6	>40	>40	>40	>40		3	0.069	0.034	0.14	0.023		4	158	>400	>400	290
MIC		0.1	0.1	0.2	0.1	MIC		0.1	0.1	1.56	0.2	MIC		12.5	>100	50	50

<sup>a)</sup> Concentration required to inhibit [<sup>14</sup>C] benzylpenicillin binding by 50%.

<sup>b)</sup> Abbreviations: CRMN, carumonam; AZT, aztreonam; CPZ, cefoperazone; CMX, cefmenoxime.

CPZ や CFS と同程度であり、AZT よりもやや強かった (Fig. 6)。

### 3. 溶菌作用

CRMN および AZT の各種グラム陰性菌に対する溶菌作用を Fig. 7 に示す。 *E. coli* NIHJ JC-2 では CRMN 添加後約 1.5 時間まで培養液の濁度が上昇したが、それ以降 0.05~0.78  $\mu\text{g/ml}$  (1/4~4 MIC) の濃度範囲で同程度の溶菌作用を示した。 *K. pneumoniae* DT-S に対して CRMN はわずかに増殖抑制効果を示したが、6.25  $\mu\text{g/ml}$  (64 MIC) においても明らかな溶菌作用はみられなかった。 *S. marcescens* IFO 12648 では CRMN 添加後の時間経

過とともに培養液の濁度の低下がみられた。 *P. mirabilis* IFO 3849 に対して CRMN はわずかな増殖抑制効果を示したが、3.13  $\mu\text{g/ml}$  (64 MIC) においても溶菌作用はみられなかった。 *P. aeruginosa* P9 に対して CRMN は培養液の濁度の増加をわずかに阻害したのみで、溶菌作用は示さなかった。 AZT の溶菌作用は CRMN と同程度であった。

### 4. 光学顕微鏡による形態観察

*E. coli* NIHJ JC-2 では CRMN で 2 時間処理すると、0.1  $\mu\text{g/ml}$  (1/2 MIC) 以上の濃度で細胞の伸長化とともに溶菌がみられた。 4 時間処理後の主な形態変化は溶菌であった。 CPZ は 2 時間処理後で他

Fig. 2 Bactericidal activity of carumonam and reference antibiotics against *E. coli* NIHJ JC-2. ●, control; ○, 1/4 MIC; ▲, 1/2 MIC; △, 1 MIC; ■, 2 MIC; □, 4 MIC

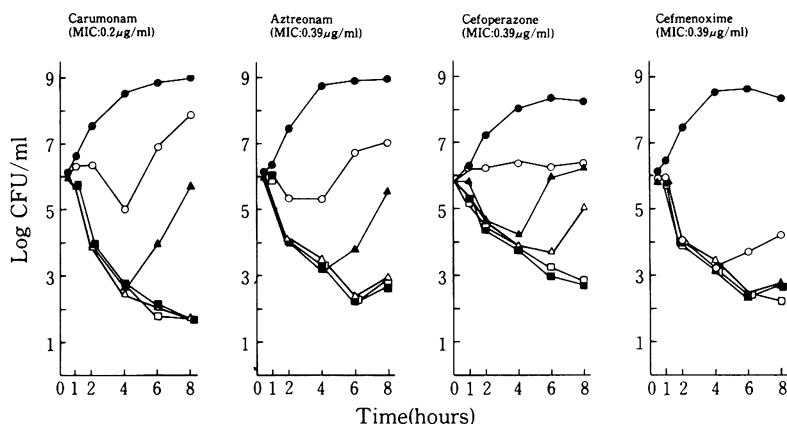


Fig. 3 Bactericidal activity of carumonam and reference antibiotics against *K. pneumoniae* DT-S. ●, control; ○, 1/4 MIC; ▲, 1/2 MIC; △, 1 MIC; ■, 2 MIC; □, 4 MIC

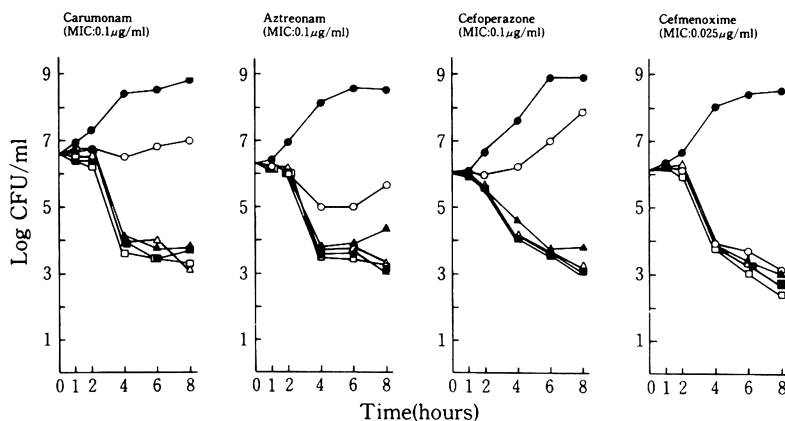


Fig. 4 Bactericidal activity of carumonam and reference antibiotics against *S. marcescens* IFO 12648. ●, control; ○, 1/4 MIC; ▲, 1/2 MIC; △, 1 MIC; ■, 2 MIC; □, 4 MIC

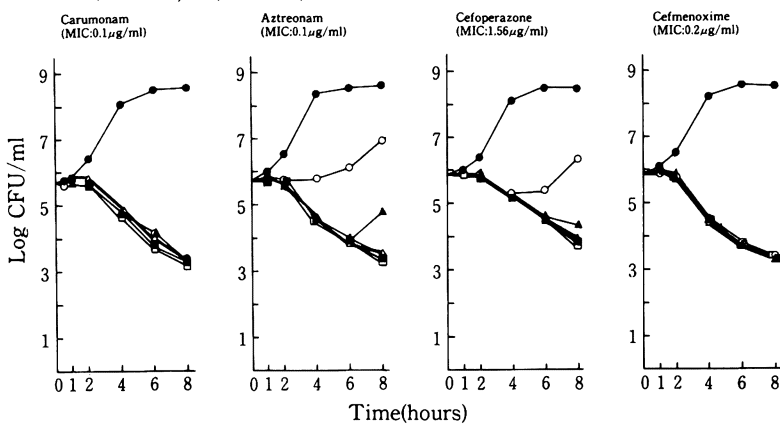


Fig. 5 Bactericidal activity of carumonam and reference antibiotics against *P. mirabilis* IFO 3849. ●, control; ○, 1/4 MIC; ▲, 1/2 MIC; △, 1 MIC; ■, 2 MIC; □, 4 MIC

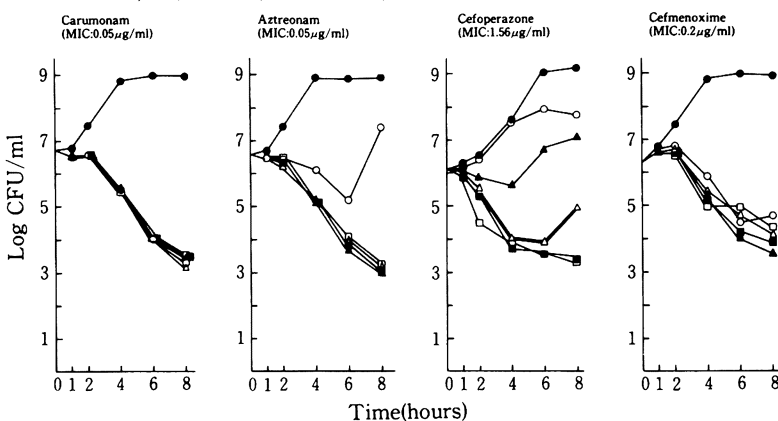


Fig. 6 Bactericidal activity of carumonam and reference antibiotics against *P. aeruginosa* P9. ●, control; ○, 1/4 MIC; ▲, 1/2 MIC; △, 1 MIC; ■, 2 MIC; □, 4 MIC

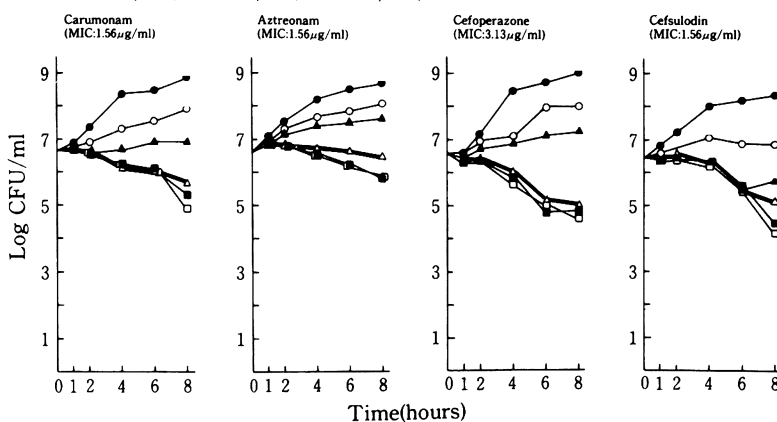
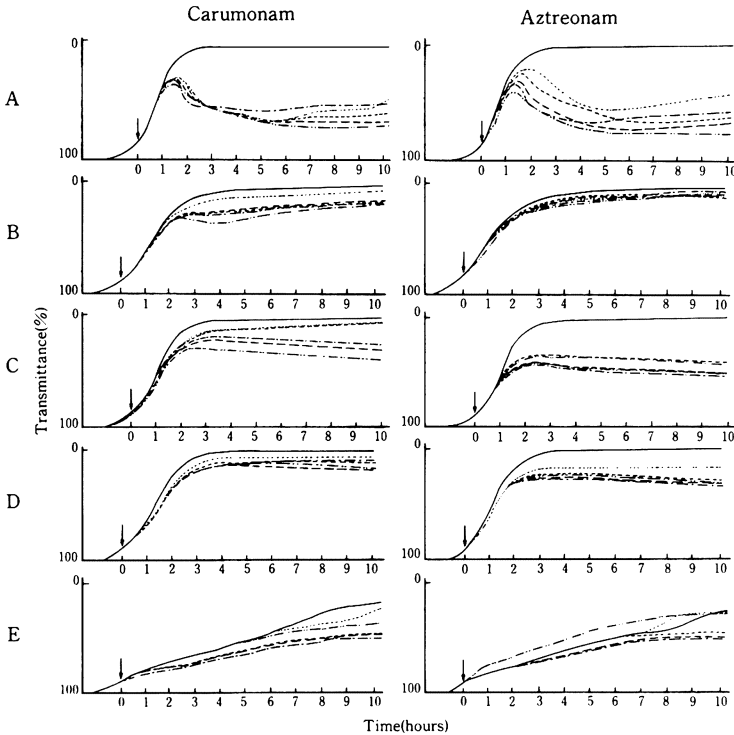


Fig. 7 Bacteriolytic activity of carumonam and aztreonam against (A) *E. coli* NIHJ JC-2, (B) *K. pneumoniae* DT-S, (C) *S. marcescens* IFO 12648, (D) *P. mirabilis* IFO 3849 and (E) *P. aeruginosa* P9. Arrows indicate drug addition. —, control; ·····, 1/4 MIC; ----, 1 MIC; ---, 4 MIC; -·-·, 16 MIC; -·-·-·, 64 MIC



剤よりも強いスフェロプラスト形成能および溶菌誘発能を示した (Fig. 8)。 *K. pneumoniae* DT-S では CRMN で 2 時間処理すると 0.025~50  $\mu\text{g/ml}$  (1/4~512 MIC) の広い濃度範囲で大部分の菌が伸長化し, 100  $\mu\text{g/ml}$  以上では溶菌した。4 時間処理後の形態変化もほぼ同様であった。 AZT は CRMN と同様の作用を示したが, 対照の cephem 剤はスフェロプラスト形成および溶菌誘発作用が強かった (Fig. 9)。 *S. marcescens* IFO 12648 では CRMN で 2 時間処理すると, 0.025  $\mu\text{g/ml}$  (1/4 MIC) ですべての細胞が伸長化し, 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上では一部溶菌した。4 時間処理後にはより低濃度域から溶菌した (Fig. 10)。 *P. mirabilis* IFO 3849 では CRMN で 2 時間処理すると, 0.025~6.25  $\mu\text{g/ml}$  (1/2~128 MIC) の濃度範囲でほぼすべての細胞が伸長化し, 12.5~200  $\mu\text{g/ml}$  では一部溶菌し, 400  $\mu\text{g/ml}$  以上では溶菌が

顕著であった。4 時間処理後の形態変化もほぼ同様であった。 AZT の溶菌作用は CRMN よりも強く, 4 時間後にはその差が明らかとなった (Fig. 11)。 *P. aeruginosa* P9 では CRMN の 2 時間処理により, 0.2~800  $\mu\text{g/ml}$  (1/8~512 MIC) の広い濃度範囲で主として細胞の伸長化がおこった。4 時間処理では 400  $\mu\text{g/ml}$  以上で溶菌が顕著となったが, それ以下の濃度では伸長化が主な変化であった (Fig. 12)。

CRMN 無処理および処理菌についてマラカイトグリーン-フクシンならびにメチレンブルーによる染色性を比較した。正常な *E. coli* NIHJ JC-2 および *S. marcescens* IFO 12648 はマラカイトグリーンにより青緑色に染まったが, 薬剤処理により伸長化した菌はフクシンでピンクに染まり, viability を失っていると判定された。一方, *P. aeruginosa* P9 では薬剤処理の有無にかかわらず, ほぼすべての細胞

Fig. 8 Morphological response profiles of *E. coli* NIHJ JC-2 exposed to carumonam and reference antibiotics. Arrows indicate the MIC. ■, normal cells; ▨, filaments; □, spheroplasts and lysed cell debris

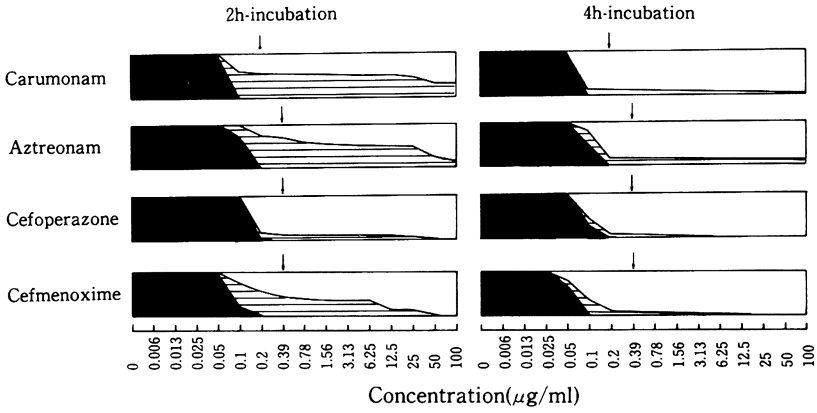


Fig. 9 Morphological response profiles of *K. pneumoniae* DT-S exposed to carumonam and reference antibiotics. Arrows indicate the MIC. ■, normal cells; ▨, filaments; □, spheroplasts and lysed cell debris

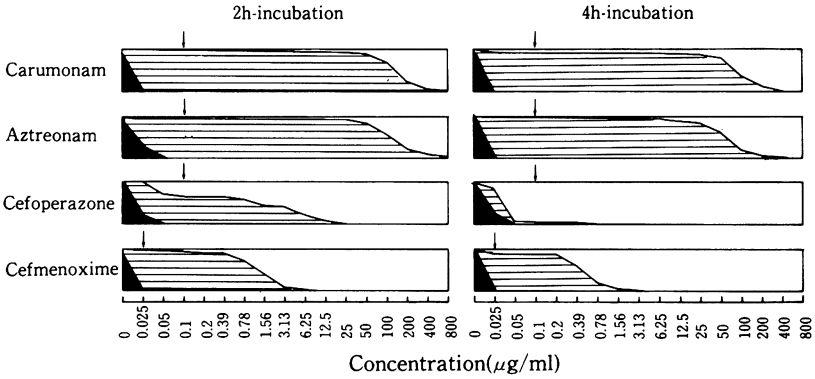


Fig. 10 Morphological response profiles of *S. marcescens* IFO 12648 exposed to carumonam and reference antibiotics. Arrows indicate the MIC. ■, normal cells; ▨, filaments; □, spheroplasts and lysed cell debris

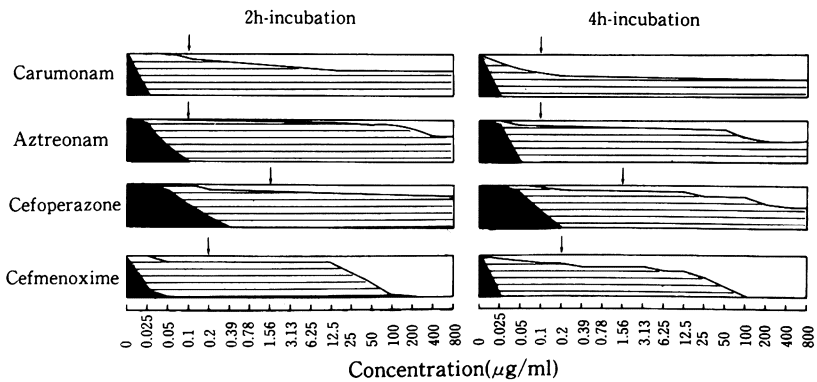


Fig. 11 Morphological response profiles of *P. mirabilis* IFO 3849 exposed to carumonam and reference antibiotics. Arrows indicate the MIC. ■, normal cells; ▨, filaments; □, spheroplasts and lysed cell debris

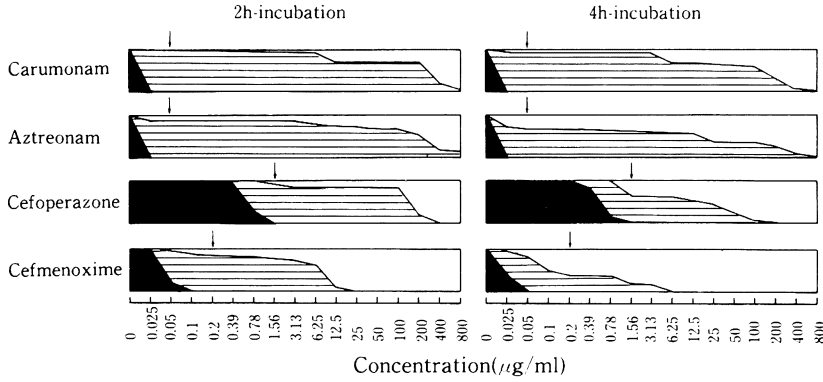
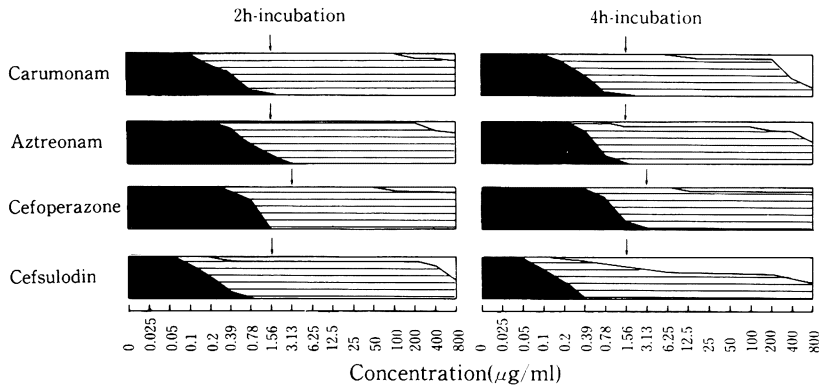


Fig. 12 Morphological response profiles of *P. aeruginosa* P9 exposed to carumonam and reference antibiotics. Arrows indicate the MIC. ■, normal cells; ▨, filaments; □, spheroplasts and lysed cell debris



がマラカイトグリーンにより青緑色に染まり、viabilityを有していると判定された。また、メチレンブルーによる染色で、腸内細菌はCRMNとの接触時間が長びくにつれて染色性を失ったが、*P. aeruginosa* P9の染色性は変化しなかった。

#### 5. 電子顕微鏡による形態観察

*E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* IFO 12648 および *P. aeruginosa* P9について1 MICのCRMNで4時間処理後の電子顕微鏡像をFig. 13に示す。すべての被験菌で細胞の伸長化が主な形態変化として認められた。*E. coli* NIHJ JC-2では細胞が扁平化するとともにバルジやスフェロプラスト形成がみられ、断裂した細胞質膜や外膜を残して溶菌した像が認められた。*S. marcescens* IFO 12648では細胞

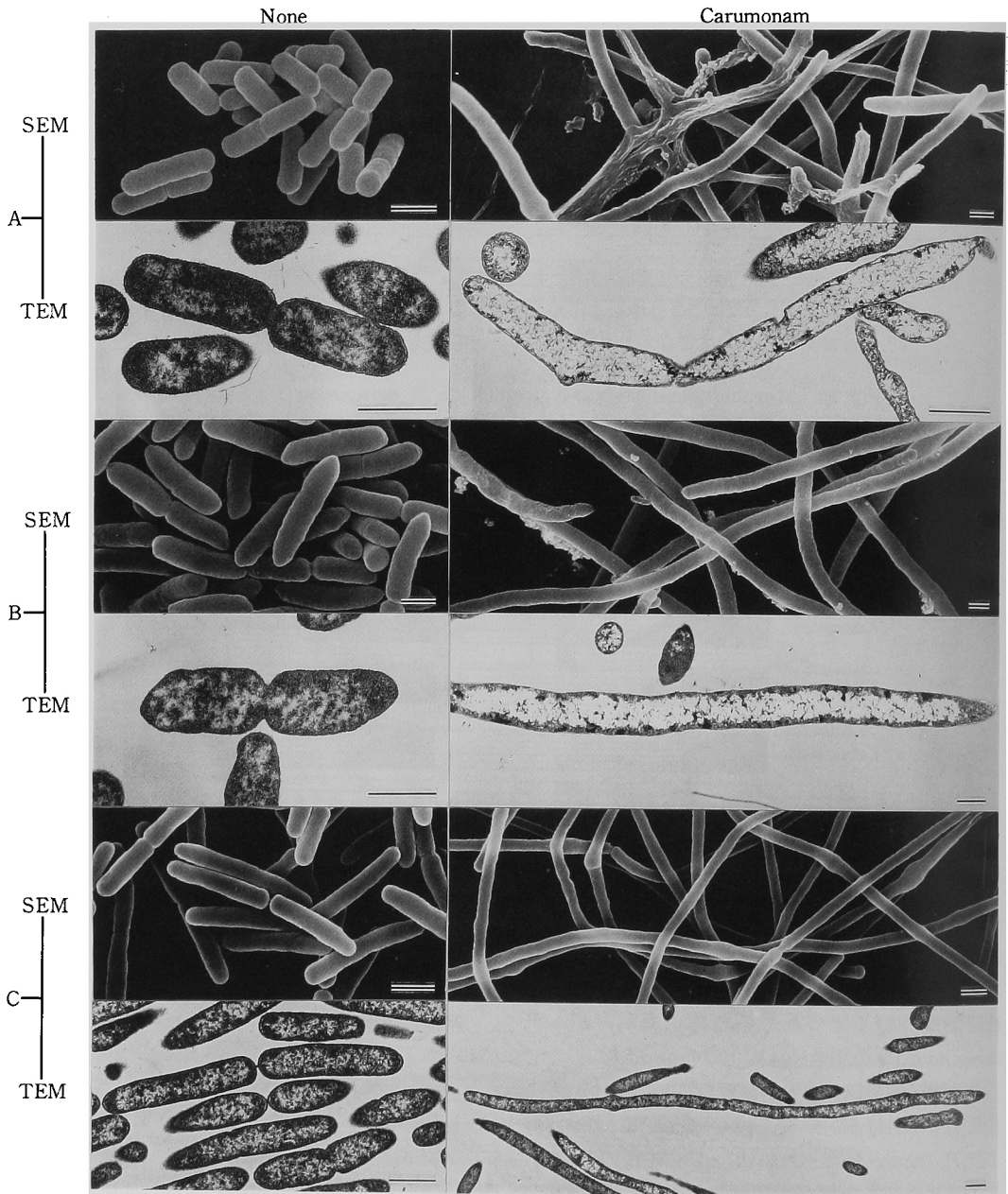
表面には目だった変化が現れなかったが、培養時間が長びくにつれて細胞質内が希薄化した。*P. aeruginosa* P9では伸長化した菌の一部がやや膨隆したが、細胞質内の変化はほとんど認められなかった。

#### 考 察

CRMNはAZT<sup>10)</sup>と同様に隔壁形成時のペプチドグリカン合成に関与しているPBP3<sup>11)</sup>に特異的に高い親和性を示したが、この特性は本剤が広い濃度範囲で腸内細菌および*P. aeruginosa*の細胞伸長化を惹起することに反映されていた。SPRATT<sup>12)</sup>はPBP3の失活が菌の死につながることを*E. coli* K12の温度感受性変異株を用いて明らかにした。今回の実験では大部分の腸内細菌でPBP3のI<sub>50</sub>値と



Fig. 13 Electron micrographs of (A) *E. coli* NIHJ JC-2, (B) *S. marcescens* IFO 12648 and (C) *P. aeruginosa* P9 exposed to carumonam at concentrations of the respective MICs for 4h. Bars represent 1  $\mu$ m



MIC 値とが相関しており、さらに MIC 値で殺菌作用がみられたことから、CRMN は PBP3 へ結合することにより菌を致死させるものと思われる。HAYES と ORR<sup>13)</sup> も ceftazidime の *E. coli* や *P. aeruginosa* に対する優れた抗菌作用が、PBP3 への高い親和性に基づくことを報告している。一方、*E. cloacae* IFO 12937 や *P. aeruginosa* P9 では、いずれの薬剤も PBP3 に対する  $I_{50}$  値が MIC 値よりもはるかに小さく、これらの菌では外膜が薬剤透過の障壁として作用していることが推察される。CRMN の *S. aureus* や *B. fragilis* に対する抗菌力は弱い、これは本剤のこれらの菌の PBP への親和性が低いことに因るものと思われる。

CRMN は各種の腸内細菌に対して MIC ないしそれ以下の濃度で明らかな殺菌作用を示したが、さらに高濃度で作用させた場合にも殺菌力の増強はみられなかった。*P. aeruginosa* P9 に対しては MIC 以上の濃度で殺菌作用を示したが、その作用は腸内細菌におけるよりも弱かった。これらの特性は AZT について報告されたものとはほぼ同じであった<sup>14)</sup>。CRMN は *E. coli* NIHJ JC-2 に対しては明らかな溶菌作用を示したが、その他の被験菌では培養時間の経過とともにわずかに培養液の濁度が低下したのみであり、*P. aeruginosa* P9 では濁度の増加がやや阻害されたが、低下は認められなかった。一方、CRMN は *P. aeruginosa* P9 以外の被験菌に対して一様に殺菌作用を示したことから、CRMN の作用を受けた菌は見かけ上溶菌することなくコロニー形成能を失うか、あるいは液体培地中で増殖を阻害された菌が寒天培地に移されることによる環境の変化に対応できずにコロニー形成能を失うことが考えられた。この点を明らかにするために、CRMN 無処理および処理菌についてマラカイトグリーン-フクシンによる分別染色を行った結果、CRMN の作用を受けた腸内細菌の多くは viability を失っていると判定され、これらの菌に対して CRMN が殺菌的に作用することが示された。

本実験は昭和 57 年 7 月より昭和 60 年 10 月までに行われた。

## 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, 1983
- 3) IMADA, A.; M. KONDO, K. OKONOGI, K. YUKISHIGE & M. KUNO: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of carumonam (AMA-1080), a new N-sulfonated monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 821~827, 1985
- 4) SYKES, R.B.; D.P. BONNER, K. BUSH & N.H. GEORGOPAPADAKOU: Azthreonam (SQ 26, 776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 85~92, 1982
- 5) MATSUBARA, N.; S. MINAMI, T. MURAOKA & S. MITSUHASHI: *In vitro* antibacterial activity of cefoperazone (T-1551), a new semisynthetic cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 731~735, 1979
- 6) TSUCHIYA, K.; M. KONDO, M. KIDA, M. NAKAO, T. IWAHI, T. NISHI, Y. NOJI, M. TAKEUCHI & Y. NOZAKI: Cefmenoxime (SCE-1365), a novel broad-spectrum cephalosporin: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 56~65, 1981
- 7) TSUCHIYA, K.; M. KONDO & H. NAGATOMO: SCE-129, antipseudomonal cephalosporin: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 137~145, 1978
- 8) NOZAKI, Y.; A. IMADA & M. YONEDA: SCE-963, a new potent cephalosporin with high affinity of penicillin-binding proteins 1 and 3 of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 20~27, 1979
- 9) 室橋豊穂, 吉田幸之助: Malachitegreen-fuchsin 法による *E. coli* 分別染色の生物学的意義. *日本細菌学雑誌* 14: 285~289, 1959
- 10) SYKES, R.B.; D.P. BONNER, K. BUSH, N.H. GEORGOPAPADAKOU & J.S. WELLS: Monobactams-monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotics produced by bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 8 (S-E): 1~16, 1981
- 11) BOTTA, G.A. & J.T. PARK: Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J. Bacteriol.* 145: 333~340, 1981
- 12) SPRATT, B.G.: Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* 131: 293~305, 1977

1) IMADA, A.; K. KITANO, K. KINTAKA, M. MUROI & M. ASAI: Sulfazecin and isosulfazecin, novel  $\beta$ -lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature*

- 13) HAYES, M.V. & D.C. ORR: Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 12: 119~126, 1983
- 14) YOURASSOWSKY, E.; M.P. VAN DER LINDEN, M.J. LISMONT & F. CROKAERT: Growth curve patterns of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* submitted to different SQ 26, 776 concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 8 (S-E): 89~96, 1981

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF CARUMONAM :  
AFFINITIES FOR PENICILLIN-BINDING  
PROTEINS, BACTERICIDAL AND BACTERIOLYTIC  
ACTIVITIES AND EFFECT ON BACTERIAL MORPHOLOGY

MASAFUMI NAKAO, KOICHI YUKISHIGE, AKIKO HASE,  
MASAHIRO KONDO and AKIRA IMADA  
Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka

The *in vitro* antibacterial activity of carumonam, a new N-sulfonated monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotic, was evaluated by comparing its affinities for penicillin-binding proteins (PBPs), bactericidal and bacteriolytic activities, and effect on bacterial morphology with those of aztreonam and cephalosporins such as cefoperazone, cefmenoxime and cefsulodin.

Carumonam showed high affinities specifically for PBP 3 of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*, but affinities for PBPs of *Staphylococcus aureus* and *Bacteroides fragilis* were low. Carumonam and aztreonam, at their MIC levels, were strongly bactericidal against *Enterobacteriaceae*, but weakly bactericidal against *P. aeruginosa*. The bacteriolytic activity of carumonam as well as of aztreonam was limited to enteric bacterial species like *Escherichia coli*. Filamentation was the major morphological change in Gram-negative bacilli after exposure to carumonam. *E. coli* and *Serratia marcescens* were converted to ghosts after prolonged incubation with carumonam but *P. aeruginosa* was not.