

## Carumonam の $\beta$ -lactamase に対する安定性 および $\beta$ -lactamase 産生菌に対する抗菌力

小此木研二・久野光造

武田薬品工業株式会社中央研究所

Carumonam (CRMN) は aztreonam (AZT) および種々の第3世代セフェム剤を加水分解する *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* および *Bacteroides fragilis* の酵素を含む7種の染色体性  $\beta$ -lactamase および12種のプラスミド性  $\beta$ -lactamase のいずれに対してもきわめて安定であった。この安定性を反映して、CRMN はほとんどの  $\beta$ -lactamase 産生菌に対して強い抗菌力を示し、とくに *K. oxytoca* の  $\beta$ -lactamase 高活性株に対しては AZT より16~512倍強い抗菌力を示した。一方、CRMN は penicillinase および *P. vulgaris* の oxyimino-cephalosporinase に対して低親和性であったが、cephalosporinase に対しては比較的高親和性であった。また、CRMN の  $\beta$ -lactamase 誘導活性は弱く、大部分の菌の生育を阻止する 10  $\mu$ g/ml ではほとんど誘導活性を示さなかった。

### はじめに

近年、臨床材料から分離される細菌の多くが  $\beta$ -lactamase 産生菌であるので、 $\beta$ -lactamase に安定であることは  $\beta$ -ラクタム剤の必須条件の一つである。そこで sulfazecin<sup>1)</sup> 型の新単環性  $\beta$ -ラクタム抗生物質 carumonam の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性および親和性、 $\beta$ -lactamase 誘導活性とともに  $\beta$ -lactamase 産生菌に対する抗菌力を調べ、aztreonam, cefmenoxime および cefoperazone のそれらと比較した。

### 実験材料および方法

#### 1. 使用菌株およびRプラスミド

主として Table 1 に示した臨床分離株およびそれらより得た  $\beta$ -lactamase 欠損変異株、 $\beta$ -lactamase 構成型変異株を用いた。R プラスミド 16 種(R1, RP4, R997, R1010, RGN238, R46, R57b, R2, RP1, pMG90, pMG48, RIP64, RPL11, R151, Rms149, pMG19)<sup>2)</sup> およびそれらの宿主菌 *Escherichia coli* J53-2, *Pseudomonas aeruginosa* PU21 および PAO38 は JACOBY 博士 (Massachusetts General Hospital, Boston) より分与された。

#### 2. 使用薬剤

Carumonam (CRMN) および類縁物質 I (CRMN の開環体; Fig. 1) は武田薬品工業株式会

社中央研究所で合成したものを、aztreonam (AZT) は Hoffmann-La Roche Inc., USA より分与されたものを用いた。Cefmenoxime (CMX; 武田薬品), cefoperazone (CPZ; 富山化学), ce-

Fig. 1 Chemical structures of carumonam and related compounds.

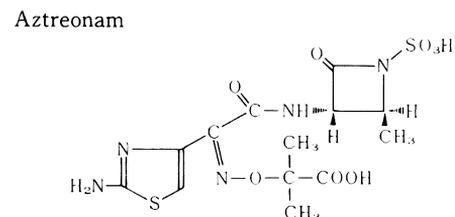
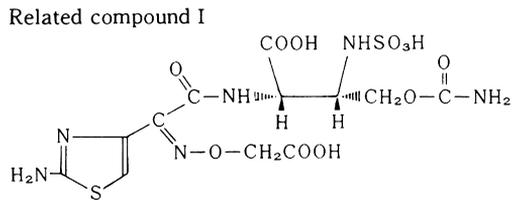
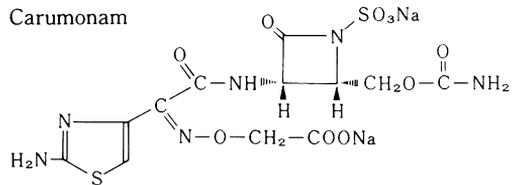


Table 1 Bacterial strains

Organism	Strain	Remarks
<i>E. cloacae</i>	GN5797	Clinical isolate producing inducible cephalosporinase (CSase)
<i>E. cloacae</i>	GN5788	Clinical isolate producing inducible CSase
<i>E. cloacae</i>	CS4494	CSase-constitutive mutant of GN5788
<i>E. cloacae</i>	CS4495	CSase-deficient mutant of CS4494
<i>C. freundii</i>	TN480	Clinical isolate producing low level of inducible CSase
<i>C. freundii</i>	TN549	Clinical isolate producing inducible CSase
<i>P. aeruginosa</i>	U31	Clinical isolate producing inducible CSase
<i>P. aeruginosa</i>	P2	CSase-deficient mutant of U31
<i>P. aeruginosa</i>	PU21	Host strain of R plasmids
<i>P. aeruginosa</i>	PAO38	Host strain of R plasmid
<i>S. marcescens</i>	IFO12648	Producer of low level of inducible CSase
<i>S. marcescens</i>	TN81	Clinical isolate producing inducible CSase
<i>P. morganii</i>	IFO3168	Producer of low level of inducible CSase
<i>P. morganii</i>	GN4738	Clinical isolate producing constitutive CSase
<i>P. vulgaris</i>	GN4421	Clinical isolate producing inducible oxyimino-cephalosporinase (CXMase)
<i>P. vulgaris</i>	GN4818	Clinical isolate producing inducible CXMase
<i>P. vulgaris</i>	CS4017	CXMase-constitutive mutant of GN4818
<i>P. vulgaris</i>	CS4035	CXMase-deficient mutant of CS4017
<i>K. oxytoca</i>	TN1719	Clinical isolate producing high level of constitutive penicillinase (PCase)
<i>K. oxytoca</i>	CS4538	PCase-deficient mutant of TN1719
<i>E. coli</i>	J53-2	Host strain of R plasmids
<i>S. aureus</i>	1840	Clinical isolate producing inducible PCase
<i>S. aureus</i>	1840S	Derivative of 1840 lacking PCase plasmid

phaloridine (CER; 塩野義製薬), cephalothin (CET; 塩野義製薬), ampicillin (ABPC; 武田薬品) および benzylpenicillin (PCG; 明治製薬) は市販品を用いた。

### 3. $\beta$ -Lactamase

*Enterobacter cloacae* TN1282, *Citrobacter freundii* GN1706, *P. aeruginosa* U31, *Serratia marcescens* TN81, *Proteus vulgaris* GN4413, *Bacteroides fragilis* V284-3, *Klebsiella oxytoca* TN1719, *Staphylococcus aureus* 1840, *E. coli* TN713 (TEM-1; I型), *E. coli* TN649 (OXA-1; II型) および *P. aeruginosa* GN3407 (PSE-1; IV型) の  $\beta$ -lactamase は既報の精製酵素<sup>3)</sup> を用いた。また、その他のプラスミド性  $\beta$ -lactamase は R プラスミドを保有する *E. coli* J53-2, *P. aeruginosa* PU21 または PAO38 を 20ml の Trypticase soy broth (BBL Microbiology System) で対数増殖後期まで培養し、遠心分離して得た菌体を 4 ml の

0.05M リン酸緩衝液 (pH6.9) に懸濁して超音波処理 (2.5A, 1分) した後、菌体破片を遠心除去して得た。

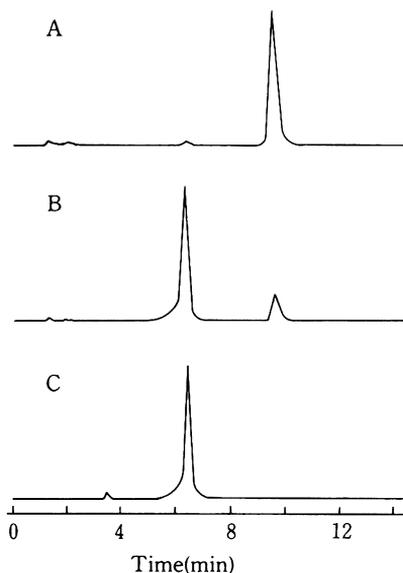
### 4. $\beta$ -Lactamase 活性測定法

CRMN および AZT の加水分解速度は下記の UV 法およびバイオアッセイ法で、その他の薬剤の加水分解速度はマイクロウ素法<sup>3)</sup> で測定した。Penicillinase (PCase) および cephalosporinase (CSase) の 1 ユニット (U) はそれぞれ  $1 \mu\text{mol}$  の PCG および CER を  $30^\circ\text{C}$ , 1 分間で加水分解する酵素量とした。また、阻害定数 (Ki) は ABPC または CET を基質とし、既報に準じて Lineweaver-Burk プロットより求めた<sup>3)</sup>。

(i) UV 法: 反応液組成は  $2 \text{ mM}$  基質  $0.2 \text{ ml}$ , 酵素液  $0.1 \text{ ml}$  および  $0.05 \text{ M}$  リン酸緩衝液 (pH 6.9)  $1.7 \text{ ml}$  とし、酵素反応は  $30^\circ\text{C}$  に保温した Gilford 250 分光光度計に装着したキュベットの中で行った。基質の加水分解速度は 215 または 320 nm における

Fig. 2 HPLC of carumonam and its hydrolysis product.

(A) Carumonam, (B) carumonam incubated with *P. vulgaris*  $\beta$ -lactamase, (C) Related compound I.



UV 吸収の減少を記録し、単位時間当たりの UV 吸収の変化値より求めた。なお、CRMN および AZT の加水分解前後の分子吸光係数の差 ( $\Delta \epsilon$ ;  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) は 215 nm では 1340 および 1320, 320 nm では 420 および 490 であった。

(ii) バイオアッセイ法：酵素液 0.025 ml, 2 mM 基質 0.05 ml および 0.05M リン酸緩衝液 (pH 6.9) 0.425 ml より成る反応液を 30°C でインキュベートし、一定時間毎にサンプリングした反応液 25  $\mu$ l を 475  $\mu$ l のメタノールに加えて反応を停止させた。基質の加水分解速度は残存薬量を *E. coli* LD-2 を試験菌とするペーパーディスク法で測定して求めた。

### 5. $\beta$ -Lactamase の誘導

$\beta$ -Lactamase の誘導は既報<sup>4)</sup>のとおり Brain heart infusion 培地 (栄研) を用い、培養液の 600 nm における吸光度が 1 に達した時点で薬剤を添加し、30°C で 1 時間培養して行った。 $\beta$ -Lactamase 活性は 0.2mM の CER を基質としてマイクロウ素法で測定した。

Table 2 Stability of carumonam and reference antibiotics to hydrolysis by  $\beta$ -lactamases

Type or source of enzyme	Relative rate of hydrolysis <sup>a)</sup>					
	CRMN	AZT	CMX	CPZ	PCG	CER
<i>E. cloacae</i> TN1282	<0.01	<0.01	0.08	2.94	25	100
<i>C. freundii</i> GN1706	<0.01	<0.01	0.09	1.67	9	100
<i>S. marcescens</i> TN81	<0.01	<0.01	0.29	11.6	12	100
<i>P. aeruginosa</i> U31	<0.1	<0.1	0.3	4.30	81	100
<i>P. vulgaris</i> GN4413	<0.01	0.66	44.9	10.5	16	100
<i>B. fragilis</i> V284-3	0.07	1.01	10.1	29.1	6	100
<i>K. oxytoca</i> TN1719	<0.01	4.33	8.15	1.55	100	37
<i>S. aureus</i> 1840	<0.01	<0.01	<0.01	0.19	100	1
TEM-1	<0.01	<0.01	0.08	11.2	100	21
TEM-2	<0.01	0.02	0.10	12.0	100	26
HMS-1	0.05	0.06	0.48	11.5	100	19
SHV-1	0.02	0.08	0.25	10.4	100	21
OXA-1	0.08	6.30	33.8	8.10	100	35
OXA-2	<0.02	<0.02	0.08	15.4	100	10
OXA-3	<0.02	0.04	0.06	8.16	100	8
PSE-1	<0.01	<0.01	<0.05	0.38	100	5
PSE-2	0.63	1.24	45.8	17.6	100	8
PSE-3	0.16	0.15	0.34	0.09	100	9
PSE-4	0.01	<0.01	0.02	0.31	100	5

a) The activity was determined spectrophotometrically, microbiologically, or microiodometrically using a 0.2 mM concentration of each substrate and was expressed as relative rate of hydrolysis, taking the rate for benzylpenicillin (penicillinase) or cephaloridine (cephalosporinase) as 100.

## 6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLCは Waters モデル 6000A ポンプ, モデル 440 検出器 (254 nm) および Nucleosil 5C<sub>18</sub> カラム (0.4×15 cm; Macherey Nagel Co.) を用い, 0.01 % 硫酸アンモニウム, メタノール, 酢酸 (97:2:1, v/v) を移動相として流速 0.8 ml/min, 室温で行った。

## 7. 抗菌力の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法に従い, Mueller Hinton 培地 (Difco) を用いた寒天平板希釈法で測定した。接種菌液は Mueller Hinton broth (Difco) で 37°C, 1 夜培養した菌液を同培地で 10<sup>6</sup> colony-forming units/ml に希釈して調製し, その 5 μl をマイクロプランター (佐久間) を用いて薬剤含有平板培地に接種した。

## 実験結果

## 1. β-Lactamase による CRMN の加水分解

CRMN に *P. vulgaris* GN4413 の β-lactamase を作用させた後の産物を HPLC で調べた (Fig. 2)。CRMN の保持時間が 10.1 分であったのに対し, CRMN (196 μM) に大量の酵素 (6 μM) を 30°C で 90 分間作用させると, 保持時間 6.7 分の新たなピークが出現した。このピークは CRMN の開環体である類縁物質 I (Fig. 1) と同定された。また, 反応液中の残存 CRMN 量と開環体の量との総計は最初に加えた CRMN の量に一致し, 90 分間のインキュベーション中に CRMN の 83% が開環体に転換された。一方, 320 nm の吸収の減少から推定した同条件下での CRMN の加水分解率は 82% であり, この時の CRMN 加水分解の初速度は 1 分間に酵素 1 モル当り 0.41 モルと計算された。

## 2. β-Lactamase に対する安定性

CRMN, AZT, CMX および CPZ の各種 β-lactamase に対する安定性を比較した (Table 2)。*E. cloacae* TN1282, *C. freundii* GN1706, *P. aeruginosa* U31, *S. marcescens* TN81, *P. vulgaris* GN4413, *B. fragilis* V284-3 および *K. oxytoca* TN1719 の酵素は染色体性 β-lactamase であり, その他はプラスミド性 β-lactamase である。

CRMN はこれらの β-lactamase に高い安定性を示し, AZT, CMX および CPZ を加水分解する *K. oxytoca* および *P. vulgaris* の β-lactamase に対してもきわめて安定であった。*B. fragilis* の酵素で

Table 3 Inhibition of β-lactamases by carumonam and aztreonam

Type or source of enzyme	K <sub>i</sub> (μM) <sup>a)</sup>	
	CRMN	AZT
TEM-1	>500	>500
OXA-1	>500	>500
OXA-2	>500	>500
OXA-3	>500	>500
PSE-1	>500	>500
<i>S. aureus</i> 1840	>500	>500
<i>K. oxytoca</i> TN1719	>500	141
<i>E. cloacae</i> TN1282	0.32	0.053
<i>C. freundii</i> GN1706	0.14	0.048
<i>S. marcescens</i> TN81	0.72	0.34
<i>P. vulgaris</i> GN4413	>500	14.9

a) K<sub>i</sub> was determined by assessing the ability of antibiotics to inhibit the hydrolysis of ampicillin or cephalothin.

CRMN もわずかに加水分解されたが, 調べた薬剤中では最も安定であった。また, CRMN は PSE-2, PSE-3 などの一部のプラスミド性 β-lactamase で若干加水分解されたが, その加水分解速度は PCG 加水分解速度の 1% 以下であった。

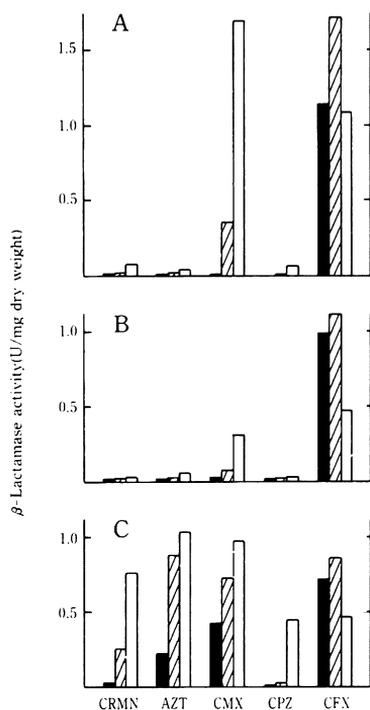
## 3. β-Lactamase に対する親和性

β-Lactamase 阻害活性を測定することによって酵素に対する親和性を調べた (Table 3)。CRMN はプラスミド性 β-lactamase および *K. oxytoca* TN1719, *P. vulgaris* GN4413 の β-lactamase を阻害しなかったが, *E. cloacae* TN1282, *C. freundii* GN1706 および *S. marcescens* TN81 の染色体性 CSase に高い親和性を示して拮抗的に強く阻害し, その阻害定数 (K<sub>i</sub>) は 0.14~0.72 μM であった。一方, AZT は上記 CSase を CRMN より強く阻害したほか, *P. vulgaris* および *K. oxytoca* の β-lactamase に対しても阻害作用を示し, CRMN より β-lactamase に高親和性であった。

## 4. β-Lactamase 誘導活性

*E. cloacae* GN5797 (CRMN, AZT, CMX, CPZ, CFX の MIC はそれぞれ 0.1, 0.39, 0.78, 0.78, 100 μg/ml), *S. marcescens* 72-2 (CRMN, AZT, CMX, CPZ, CFX の MIC はそれぞれ 0.2, 0.78, 1.56, 6.25, 100 μg/ml) および *P. vulgaris* GN4421 (CRMN, AZT, CMX, CPZ, CFX の MIC はそれぞれ 0.025, 0.025, 0.1, 0.78, 3.13 μg/ml)

Fig. 3 Induction of  $\beta$ -lactamases. The  $\beta$ -lactamases of (A) *E. cloacae* GN5797, (B) *S. marcescens* 72-2, and (C) *P. vulgaris* GN4421 were induced with 10 (■), 100 (▨), and 1000 (□)  $\mu$ g/ml of each antibiotic.



ml) を薬剤存在下で1時間培養し、菌体内および培地中の全酵素活性を測定した。なお、このとき、1000  $\mu$ g/ml の CMX および CFX で *E. cloacae* GN5797 が溶菌した以外は顕著な溶菌は認められなかった。

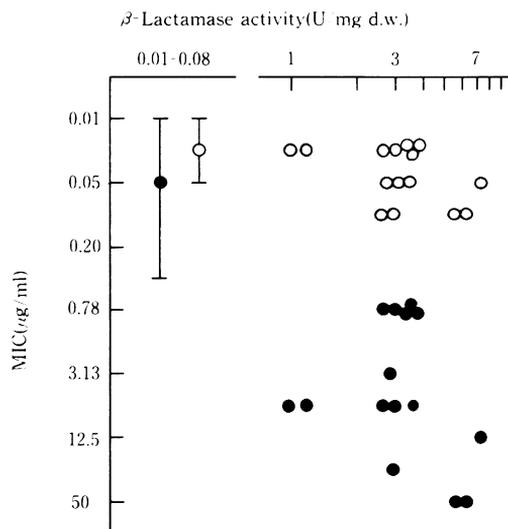
CRMN および AZT は、 $\beta$ -lactamase 誘導活性が弱い CPZ<sup>5)</sup> と同様、*E. cloacae* GN5797 および *S. marcescens* 72-2 の  $\beta$ -lactamase をほとんど誘導しなかった。また、*P. vulgaris* GN4421 では CRMN の誘導活性は CPZ より強いが、AZT, CMX, CFX より弱く、10  $\mu$ g/ml では CRMN は  $\beta$ -lactamase をごくわずかしき誘導しなかった (Fig. 3)。

#### 5. 抗菌力

染色体性  $\beta$ -lactamase 産生菌 (Table 4) およびプラスミド性  $\beta$ -lactamase 産生菌 (Table 5) に対する CRMN および対照薬剤の抗菌力を比較した。CRMN は大部分の  $\beta$ -lactamase 産生菌に対して強い抗菌力を示し、とくに、*P. vulgaris*, *K. oxytoca*, *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する抗菌力は  $\beta$ -

Fig. 4 Correlation between  $\beta$ -lactamase activity and susceptibility to carumonam (○) and aztreonam (●) in clinical isolates of *K. oxytoca*.

MICs against producers of low level of  $\beta$ -lactamase were means of results for 12 strains; bars indicate the range.



lactamase 産生の有無にほとんど影響されなかった。しかし、大量の  $\beta$ -lactamase を構成的に産生し、対照薬剤のすべてに耐性な *E. cloacae* CS4494 および *P.morganii* GN4738 は CRMN に対しても低い感受性を示した。CRMN に高い感受性を示す  $\beta$ -lactamase 産生菌のうち *K. oxytoca* TN1719 が AZT と CPZ に、*P. vulgaris* CS4017 が CMX と CPZ に、また、多くのプラスミド性  $\beta$ -lactamase 産生菌が CPZ に低感受性であった。

一方、27 株の臨床分離 *K. oxytoca* の  $\beta$ -lactamase 活性を調べた結果、低活性株 12 株 (0.01~0.08 U/mg dry weight) と高活性株 15 株 (1~7 U/mg dry weight) とに区分できた。それらの CRMN および AZT に対する感受性を調べたところ、Fig. 4 に示すように、CRMN に対しては全株が高い感受性を示したが、AZT に対して高活性株は耐性であり、高活性株に対する CRMN の抗菌力は AZT の抗菌力の 16~512 倍であった。

#### 考 察

CRMN は染色体性およびプラスミド性  $\beta$ -lactamase のいずれに対してもきわめて安定であっ

Table 4 Antibacterial activity of carumonam and reference antibiotics against bacteria with or without a chromosomal  $\beta$ -lactamase

Organism		$\beta$ -Lactamase activity <sup>a)</sup> (U/mg d.w.)	MIC ( $\mu$ g/ml)			
			CRMN	AZT	CMX	CPZ
<i>E. cloacae</i>	CS4495	<0.01	0.05	0.10	0.20	0.39
<i>E. cloacae</i>	GN5788	1.49 <sup>b)</sup>	0.05	0.20	0.20	0.78
<i>E. cloacae</i>	CS4494	4.92	12.5	50	50	50
<i>C. freundii</i>	TN480	0.17 <sup>b)</sup>	0.10	0.20	0.10	0.10
<i>C. freundii</i>	TN549	1.24 <sup>b)</sup>	0.20	0.39	0.10	0.39
<i>S. marcescens</i>	IFO12648	0.49 <sup>b)</sup>	0.05	0.05	0.10	0.39
<i>S. marcescens</i>	TN81	0.96 <sup>b)</sup>	0.20	0.39	0.78	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	P2	<0.01 <sup>b)</sup>	3.13	6.25	12.5	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	U31	0.48 <sup>b)</sup>	6.25	12.5	50	25
<i>P. morgani</i>	IFO3168	0.30 <sup>b)</sup>	0.05	0.024	0.024	0.78
<i>P. morgani</i>	GN4738	2.42	1.56	1.56	0.78	12.5
<i>P. vulgaris</i>	CS4035	<0.01 <sup>b)</sup>	0.05	0.024	0.10	0.78
<i>P. vulgaris</i>	GN4818	1.26 <sup>b)</sup>	0.05	0.024	0.05	0.39
<i>P. vulgaris</i>	CS4017	2.44	0.05	0.78	12.5	100
<i>K. oxytoca</i>	CS4538	<0.01	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>K. oxytoca</i>	TN1719	4.27	0.05	25	0.78	100

a) The  $\beta$ -lactamase activities of *K. oxytoca* was determined with benzylpenicillin as a substrate, and those of remainder with cephaloridine.

b) Induced with 1 mg/ml of benzylpenicillin.

た。しかし、大量の *P. vulgaris* GN4413  $\beta$ -lactamase (oxyimino-cephalosporinase; CXMase) を作用させた場合には不活化され、その不活化産物は  $\beta$ -ラクタム環の開環体であることが HPLC によって確認された。この結果は、きわめてわずかではあるが、CRMN の単環性  $\beta$ -ラクタム環も AZT<sup>6)</sup> や nocardicin A<sup>7)</sup> のそれらと同様に  $\beta$ -lactamase の作用を受けることを示している。

CRMN は CSase に高い親和性を示し、PCase および CXMase に対して極めて低親和性であったが、いずれの酵素に対しても安定であった。このことは、CSase による CRMN の加水分解反応においてはミカエリス型複合体形成後の反応が律速段階であるのに対し、PCase および CXMase による反応では複合体形成の過程も律速となっていることを示唆する。実際、CXMase に対して CRMN より高い親和性を示す AZT は本酵素で加水分解されたが、CRMN は極めて安定であった。

$\beta$ -Lactamase に対する高い安定性を反映して、

CRMN は *E. cloacae* CS4494 および *P. morgani* GN4738 以外の  $\beta$ -lactamase 産生菌に対して強い抗菌力を示した。*E. cloacae* CS4494 は GN5788 株より得られた変異株であり、大量の  $\beta$ -lactamase を構成的に産生し、ほとんどの  $\beta$ -ラクタム抗生物質に耐性である。CRMN および AZT は *E. cloacae* の  $\beta$ -lactamase にきわめて安定であるが、本酵素に高い親和性を示すので CS4494 株の両薬剤に対する耐性はいわゆる  $\beta$ -lactamase による非分解型透過障害機構 (nonhydrolytic barrier mechanism)<sup>8-10)</sup> によるものと考えられる。一方、*P. morgani* GN4738 は大量の  $\beta$ -lactamase を構成的に産生する臨床分離株であり、多くの  $\beta$ -ラクタム抗生物質に対して、低  $\beta$ -lactamase 活性の *P. morgani* IFO3168 より低感受性であった。この株の粗酵素液で CRMN は加水分解されなかったが、 $10^9$  CFU/ml の培養液に CRMN を 100  $\mu$ g/ml の濃度に加えて 37°C でインキュベートすると、4 時間で薬剤の 50% が不活化された。このことから、この株の薬剤耐性の少なくと

Table 5 Antibacterial activity of carumonam and reference antibiotics against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* harboring  $\beta$ -lactamase plasmid

Host strain	Plasmid	$\beta$ -Lactamase		MIC ( $\mu$ g/ml)			
		Type	Activity (U/mg d.w.)	CRMN	AZT	CMX	CPZ
<i>E. coli</i>				CRMN	AZT	CMX	CPZ
J53-2	—	—	<0.01	0.05	0.05	0.05	0.05
J53-2	R1	TEM-1	0.93	0.05	0.05	0.05	0.39
J53-2	RP4	TEM-2	11.26	0.10	0.10	0.05	3.13
J53-2	R997	HMS-1	1.53	0.05	0.10	0.05	12.5
J53-2	R1010	SHV-1	2.08	0.05	0.05	0.05	1.56
J53-2	RGN238	OXA-1	0.05	0.10	0.05	0.20	0.10
J53-2	R46	OXA-2	0.02	0.05	0.05	0.05	0.20
J53-2	R57b	OXA-3	0.02	0.05	0.05	0.05	0.20
<i>P. aeruginosa</i>				CRMN	AZT	CFS	CPZ
PU21	—	—	<0.01	3.13	6.25	3.13	6.25
PU21	R2	TEM-1	2.44	3.13	6.25	50	25
PU21	RP1	TEM-2	5.02	1.56	3.13	50	50
PU21	pMG90	OXA-1	0.10	3.13	6.25	3.13	12.5
PAO38	pMG48	OXA-2	0.61	3.13	3.13	12.5	100
PU21	RIP64	OXA-3	0.22	3.13	6.25	12.5	100
PU21	RPL11	PSE-1	1.67	3.13	6.25	25	50
PU21	R151	PSE-2	0.11	3.13	6.25	12.5	50
PU21	Rms149	PSE-3	0.03	3.13	6.25	12.5	25
PU21	pMG19	PSE-4	1.66	3.13	6.25	50	50
<i>S. aureus</i>				CRMN	AZT	CMX	CPZ
1840S	—	—	<0.01	>100	>100	1.56	0.78
1840	+	—	0.60 <sup>a)</sup>	>100	>100	1.56	3.13

a) Induced with 1  $\mu$ g/ml of cloxacillin.

も一部は加水分解によるものと考えられる。*S. aureus* は  $\beta$ -lactamase の産生性に関係なく CRMN および AZT に耐性であるので、その耐性は本菌種のペニシリン結合蛋白質が両剤に低親和性である<sup>11)</sup> ことが主要因と考えられる。

CRMN は非分解型透過障害による耐性機構が機能する *E. cloacae* などの誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌<sup>4)</sup> に対して強い抗菌力を示した。これは CRMN の  $\beta$ -lactamase 誘導活性が低いために、 $\beta$ -lactamase を誘導する前に標的酵素に作用して菌の生育を阻止するためであろう。また、 $\beta$ -lactamase 誘導活性の高い薬剤は  $\beta$ -lactamase に不安定な他の  $\beta$ -ラクタム剤と併用した場合に拮抗を引き起こすことがあるが<sup>12-15)</sup>、CRMN は  $\beta$ -lactamase 誘導活性が低いので、その危険性は少ないと考えられる。

CRMN と AZT との間の最も顕著な差異は *K.*

*oxytoca* の  $\beta$ -lactamase に対する安定性および本菌に対する抗菌力において観察された。*K. oxytoca* はインドールを産生し、ゼラチンを液化することを除けば *K. pneumoniae* とほぼ同一の生化学的性状を示すが<sup>16)</sup>、抗生物質感受性に関しては二菌種間で差があり、*K. pneumoniae* の臨床分離株には多数の多剤耐性株が存在するのに対し、*K. oxytoca* では多剤耐性株は希である<sup>17)</sup>。また *K. pneumoniae* のセフェム剤耐性株がプラスミド性  $\beta$ -lactamase 産生株であるのに対し、*K. oxytoca* の耐性株は染色体性  $\beta$ -lactamase を大量に産生する。また、*K. oxytoca* の  $\beta$ -lactamase は菌株によって等電点および基質特異性が異なる<sup>18)</sup>。それらの酵素すべてに CRMN は安定であったが、AZT はいずれの酵素でも加水分解された。CRMN と AZT の構造上の主要な違いは 4 位側鎖の構造および立体配位であるが (Fig.

1), それぞれの立体異性体を用いた実験から側鎖の構造, 配位ともに  $\beta$ -lactamase 安定性に関与していることが示されている (未発表結果)。

(試験期間: 1981年7月~1985年9月)

#### 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) JACOBY, G.A. & L. SUTTON: Activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* carrying R plasmids determining different  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 243~245, 1979
- 3) OKONOJI, K.; M. KUNO, M. KIDA & S. MITSUHASHI:  $\beta$ -Lactamase stability and antibacterial activity of cefmenoxime (SCE-1365), a novel cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 171~175, 1981
- 4) OKONOJI, K.; A. SUGIURA, M. KUNO, E. HIGASHIDE, M. KONDO & A. IMADA: Effect of  $\beta$ -lactamase induction on susceptibility to cephalosporins in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 31~42, 1985
- 5) MINAMI, S.; A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 382~385, 1980
- 6) BUSH, K.; J.S. FREUDENBERGER & R.B. SYKES: Interaction of azthreonam and related monobactams with  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 414~420, 1982
- 7) PRATT, R.F.; E.G. ANDERSON & I. ODEH: Certain monocyclic  $\beta$ -lactams are  $\beta$ -lactamase substrates: nocardicin A and desthiobenzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 1266~1273, 1980
- 8) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 936~940, 1977
- 9) THEN, R.L. & P. ANGEHRN: Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 711~717, 1982
- 10) SANDERS, C.C.; W.E. SANDERS, Jr. & R.V. GOERING: *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 968~975, 1982
- 11) IMADA, A.; M. KONDO, K. OKONOJI, 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
- 12) WATERWORTH, P.M. & A.M. EMMERSON: Dissociated resistance among cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 497~503, 1979
- 13) CHATTOPADHYAY, B. & I. HALL: Antagonism between cefoxitin and cefuroxime. *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 490~491, 1979
- 14) FU, K.P. & H.C. NEU: The role of inducible  $\beta$ -lactamases in the antagonism seen with certain cephalosporin combinations. *J. Antimicrob. Chemother.* 7: 104~107, 1981
- 15) MILLER, M.A.; M. FINAN & M. YOUSUF: *In vitro* antagonism by *N*-formimidoyl thienamycin and cefoxitin of second and third generation cephalosporins in *Aeromonas hydrophila* and *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 11: 311~318, 1983
- 16) ORSKOV, I.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London (KRIEG, N.R. & J.G. HOLT) pp. 461~465, 1984
- 17) WATANABE, H.; H. HASHIMOTO, T. TANAKA & S. MITSUHASHI: Different patterns of drug resistance and R plasmids between indole-positive and -negative strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* 24: 169~171, 1980
- 18) 小此木研二, 木田 誠, 米田雅彦: セファロsporin耐性 *Klebsiella pneumoniae* について。第8回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録, pp.54~55, 1979

CARUMONAM :  $\beta$ -LACTAMASE STABILITY AND  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY  
AGAINST  $\beta$ -LACTAMASE-PRODUCING BACTERIA

KENJI OKONOGI and MITSUZO KUNO

Central Research Division,

Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka

Carumonam (CRMN) was very resistant to hydrolysis by seven chromosomal and twelve plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases (including those from *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, and *Bacteroides fragilis* that hydrolyzed aztreonam and several third-generation cephalosporins) and consequently was as effective against most  $\beta$ -lactamase-producing bacteria as against  $\beta$ -lactamase-nonproducers. CRMN was 16~512 times as active as aztreonam against *K. oxytoca* strains which produce a large amount of  $\beta$ -lactamase. CRMN showed low affinity for penicillinases and oxyimino-cephalosporinase of *P. vulgaris*, but relatively high affinity for cephalosporinases from several species of *Enterobacteriaceae*. The  $\beta$ -lactamase-inducing activity of CRMN was weak ; little induction was observed at 10  $\mu$ g/ml, the concentration that inhibits the growth of most bacteria.