

Carumonam の試験管内抗菌力, 作用点,
ペニシリン結合蛋白に対する結合親和性,
および血清補体, マクロファージとの協力的殺菌作用

横田 健・新井京子・鈴木映子

順天堂大学医学部細菌学教室

Carumonam (CRMN) の *Staphylococcus aureus*, MRSA, R 因子保有 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* 24~52 臨床分離株に対する MIC₅₀ は, >100, >100, 0.1, 0.1, 0.025, 0.025, 0.39, 0.025, 0.39, 3.13, 0.39, 0.39, 6.25, 100, 0.39, >100 であった。CRMN は, *E. coli* では PBP3, 1A, 1B の順に, *S. marcescens* では 3, 1B, 1C の順に, *P. aeruginosa* では 3, 1A, 1B の順に, *A. calcoaceticus* では 3, 1A の順に結合親和性が高かったが, *S. aureus* の PBP には高濃度でも全く結合しなかった。

ID₅₀ の CRMN と 0.75 units/ml の血清補体 (被検菌の増殖に影響しない最高濃度) を共存させると, *E. coli* NIHJ JC-2 に対し, 著明な協力的殺菌作用を示した。また subMIC の CRMN 存在下でマウス培養 M ϕ に *E. coli* NIHJ JC-2 の細胞を食菌させると, 1/8 MIC まで食菌された細胞がよく消化された。

はじめに

Carumonam (CRMN) は全合成された国産初の monocyclic β -lactam である。その有用性を知る基礎実験として, CRMN の試験管内抗菌力を先行している aztreonam (AZT) と各種細菌臨床分離株に対する試験管内抗菌力を比較した。また β -lactam 薬剤の作用点 murein transpeptidase に対する結合親和性を, penicillin binding protein (PBP) に対する競合結合実験から検討した。さらに本剤の生体内効果を予測するための一助として, 血清補体との協力的殺菌作用, およびマウス培養マクロファージ (M ϕ) との協力的食菌・殺菌作用も調べた。

実験材料および方法

1. CRMN の試験管内抗菌力の検討方法

CRMN (武田薬品), AZT (SQUIBB), cefoperazone (CPZ: 富士化学), ceftazidime (CAZ: GLAXO), cefotaxime (CTX:

ROUCEL), cefmetazole (CMZ: 三共), および cefazolin (CEZ: 藤沢) の, 各種細菌 26~52 臨床分離株に対する試験管内最小発育阻止濃度 (MIC) は, 日本化学療法学会標準法¹⁾に基づく平板希釈法で測定した。すなわち被検菌を L-broth²⁾ 5 ml 中で一夜 37°C 振盪培養し, グラム陽性菌は 100 倍に, グラム陰性菌は 1,000 倍に新鮮 L-broth で希釈して, 10⁶ cfu/ml の菌浮遊液を調製した。ただし, *Haemophilus influenzae* は FILDES EXTRACT (OXOID) を 5% に加えた HI-broth (DIFCO) で前培養し, *Bacteroides fragilis* は, GAM-broth (日水) 中で, gas pack 法により嫌氣的に前培養した。

10⁶ cfu/ml 菌浮遊液を, 倍々希釈濃度の薬剤を含む Mueller Hinton agar (MH: DIFCO) の表面にマイクロプランターを使って one spot 接種し, 37°C 一夜培養後の菌増殖の有無から, MIC を求めた。*H. influenzae* および *B. fragilis* にはそれぞれ 5% FILDES EXTRACT 加 MH 寒天および GAM 寒天を使用した。GAM 寒天平板は gas pack 法で嫌

気培養した。

2. PBP に対する結合親和性の検討方法

β -Lactam 薬剤の作用点である各種細菌の PBP に対する CRMN の結合親和性は、SPRATT³⁾の方法を一部改良して検討した。すなわち 200 ml の L-broth 中に培養した対数増殖期後半の被検菌細胞を BRANSON SONIFIER で 20 kc 超音波破碎した。遠心分画で菌の膜画分を集め、少量の 0.05M phosphate buffer 中に 10~15 mg protein/ml の濃度に再浮遊した。その 30 μ l に CRMN または AZT を種々の濃度に加え、30°C 10 分間前処理後、さらに 3 μ l, 0.15 μ Ci ¹⁴C-PCG (AMERSHAM: 50 μ Ci/ μ moles) を加え 30°C 10 分間処理した。反応を非放射性 penicillin G (PCG) と sarkosyl で止めると、後者で細胞質膜が溶かされ、膜蛋白が遊離される。外膜を遠心で除き、その上清全量を acrylamide slab gel 電気泳動にかけた。酸で蛋白を固定し、ゲルに増感剤 (2,5-diphenyloxazole) を浸み込ませた後、真空下でゲルを乾燥し、レントゲンフィルム (KODAK X-Omat) に密着して、-80°C 20 日間感光させた。

3. CRMN と血清補体との協力的殺菌作用の検討方法

Escherichia coli NIHJ JC-2 を 10 ml の L-broth 中で、一夜 37°C 振盪培養した。これを新鮮 L-broth で 10,000 倍に希釈し、5 ml ずつ中試験管に分注した。3 本 1 組としその 1 本に、CRMN 50% 増殖阻止濃度 (ID₅₀: 5 時間後に生菌数が対照の 50% となる CRMN の濃度) を加え、他の 1 本には 0.75 units/ml のモルモット補体と 20% ヒト非働化血清 (*E. coli* の増殖に影響しない補体の最高濃度) を添加し、3 本目には CRMN と補体およびヒト血清を加えた。37°C で振盪培養を続け、培養開始後 1, 3, 5 および 24 時間目にそれぞれの一部を取り出し適当に対数希釈して、寒天平板法により生残生菌数を測定した。

4. CRMN 存在下におけるマウス培養 M ϕ の食菌・殺菌作用の検討方法⁴⁾

M ϕ は ICR δ 4 週令マウスの腹腔を、8 ml の 10% fetal calf serum 加 F 12 培地 (日水製薬) で洗って採取し、同培地 5 ml に浮遊させた。洗浄後 10⁶ cells/ml の細胞浮遊液を作り、その 0.1 ml をカバースリップを沈めた FALCON multi dish の各 well に接種し、5% CO₂ 存在下で 37°C 30 分静置後、同培地を 1 ml ずつ加え、一夜 CO₂ 培養をした。翌日浮遊液を除き、20% L-CM (conditioned medium L

-929)⁵⁾ を添加した同培地と交換し、2 時間 CO₂ 培養を行って M ϕ を活性化した。各 well に一夜 37°C で L-broth 中に振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2 細胞を M ϕ の 50 倍量 (5 \times 10⁶ cfu/well) 接種した。一部の well には、1~1/16 MIC の CRMN を加えて培養した。5 時間 CO₂ 培養を続けた後、カバースリップを取り出し saline G で軽く洗浄後、メタノールで固定し、Giemsa 染色して光顕像を撮影した。

5. CRMN と cloxacillin との協力作用の検討方法

CRMN はグラム陰性菌専用の抗生物質で、狭域半合成 penicillin, cloxacillin (MCIPC) などと対称的な抗菌域を持つ。グラム陽・陰性菌の混合感染時における CRMN と MCIPC の併用療法を行うための基礎実験として、両薬剤併用時の FIC index を求めた。種々の濃度の両薬剤を異なった比率で含有する MH 寒天平板上に、*E. coli* NIHJ JC-2 または *Staphylococcus aureus* 209P の 10⁶ cfu/ml 浮遊液をマイクロプランターで one spot 接種し、一夜培養後のそれぞれの平板上における増殖の有無からチェッカーボード法で両薬剤の相互作用を検討した。FIC index は

$$\text{FIC index} = \frac{\text{併用時 MICa}'}{\text{単剤時 MICa}} + \frac{\text{併用時 MICb}'}{\text{単剤時 MICb}}$$

の式から計算した。

成 績

1. CRMN の試験管内抗菌力

E. coli CS2 に各種 R plasmid を伝達した 52 亜株に対する CRMN の感受性累積百分率を AZT, CPZ, CAZ, CTX, CMZ および CEZ と比較すると、Fig. 1 のとおり CRMN は、CAZ および CTX とともに最も強い抗菌力を示した。*Klebsiella pneumoniae* 45 株に対しても Fig. 2 のとおり、最も強い抗菌力を示し耐性株は認められない。*Proteus mirabilis* 50 株では、CRMN の抗菌力は AZT に若干劣るものの他の対照薬剤よりも抗菌力が強かった (Fig. 3)。*Proteus vulgaris* 41 株には Fig. 4 のとおり、CRMN と AZT の抗菌力が最も強かった。*Morganella morganii* 54 株にも CRMN の抗菌力は最も強い者の一つであった (Fig. 5)。*Providencia rettgeri* 29 株にも Fig. 6 のとおり CRMN の抗菌力が最も強かったが、少数の耐性株がみられた。

Fig. 1 Cumulative sensitivities of 52 subclones of *E. coli* carrying various R (bla) plasmids to carumonam and other cephalosporins

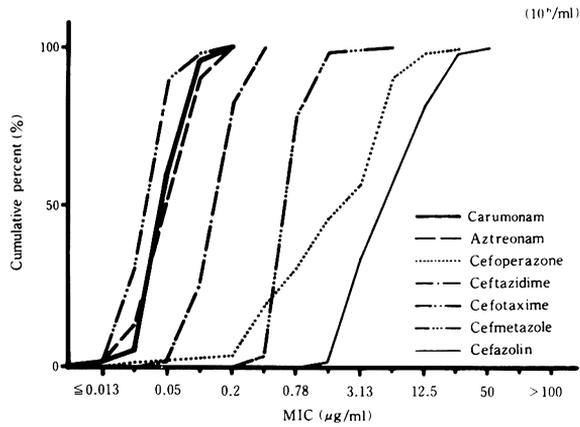


Fig. 2 Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *K. pneumoniae* to carumonam and other cephalosporins

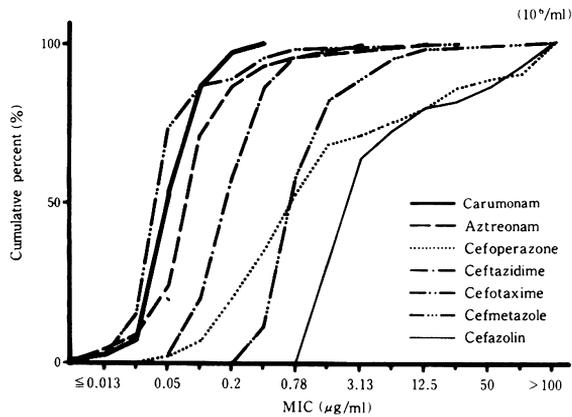


Fig. 3 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. mirabilis* to carumonam and other cephalosporins

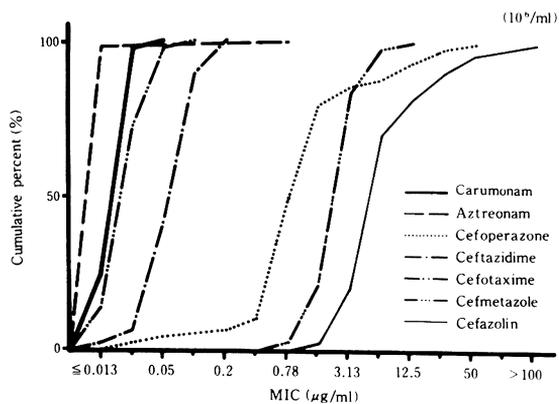


Fig. 4 Cumulative sensitivities of 41 clinical isolates of *P. vulgaris* to carumonam and other cephalosporins

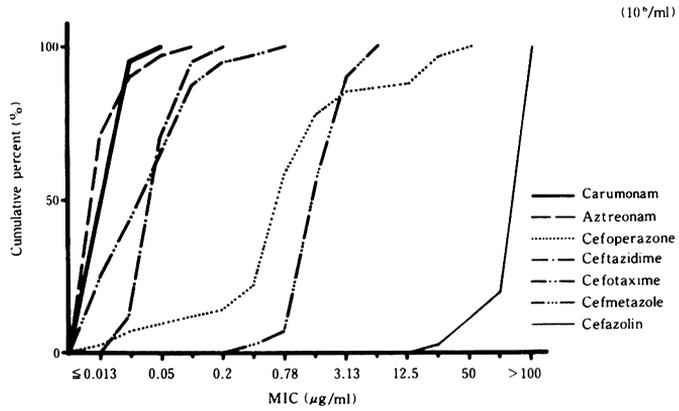


Fig. 5 Cumulative sensitivities of 54 clinical isolates of *M. morgani* to carumonam and other cephalosporins

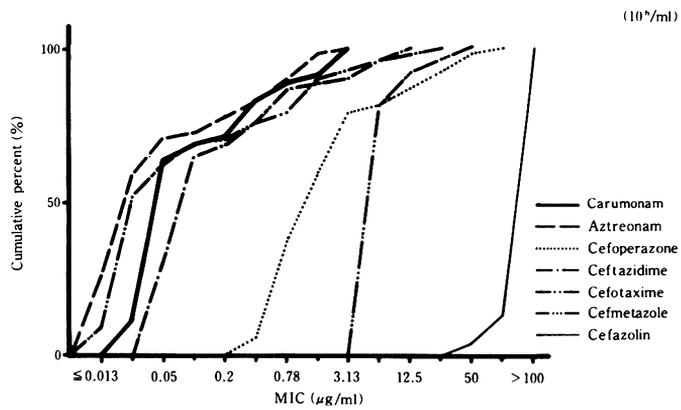


Fig. 6 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *P. rettgeri* to carumonam and other cephalosporins

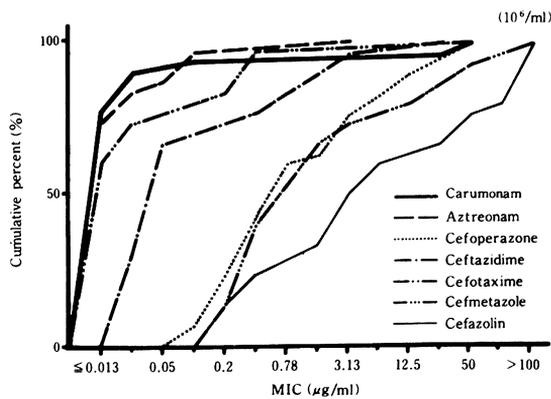


Fig. 7 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *C. freundii* to carumonam and other cephalosporins

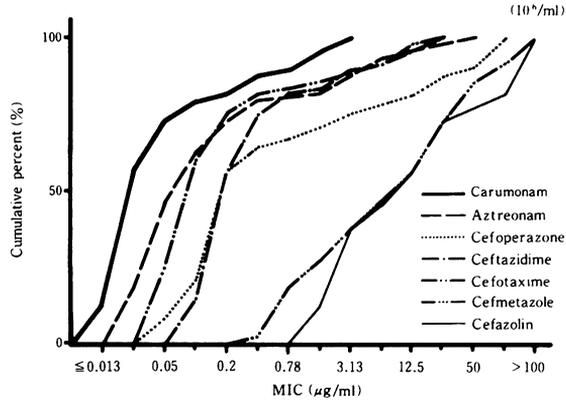


Fig. 8 Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to carumonam and other cephalosporins

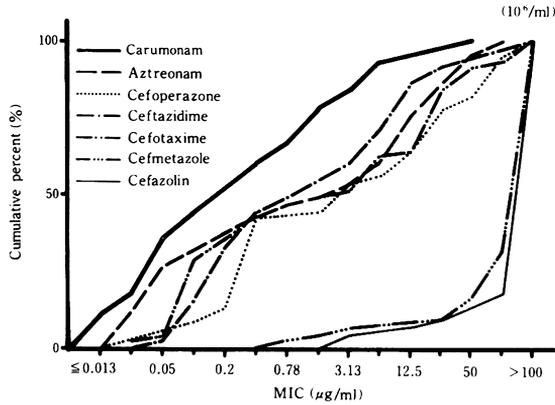


Fig. 9 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *S. marcescens* to carumonam and other cephalosporins

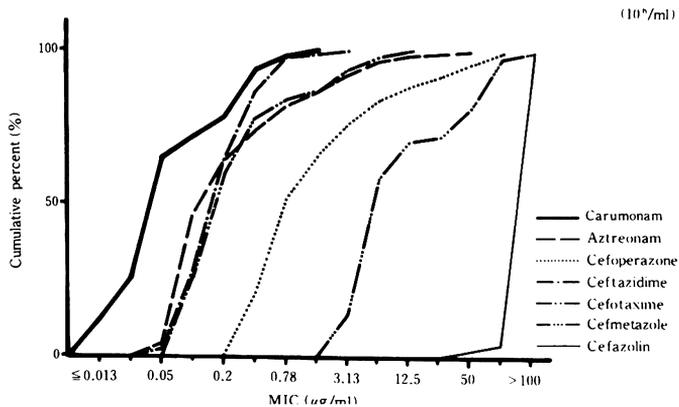


Fig. 10 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to carumonam and other cephalosporins

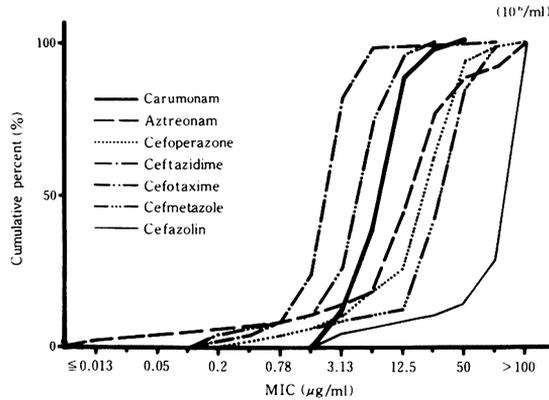
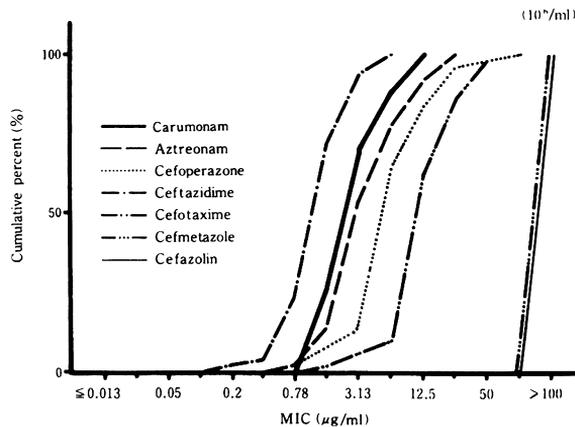


Fig. 11 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to carumonam and other cephalosporins



Citrobacter freundii 48 株に対しては、CRMN の抗菌力は AZT のそれを越え、最も強い抗菌力を示した (Fig. 7)。 *Enterobacter cloacae* 45 株にも CRMN は対照薬剤中最も強い抗菌力を示したが、若干の中等度耐性株がみられる (Fig. 8)。 *Serratia marcescens* 50 株に対しても CRMN の抗菌力は最も強く、全株 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下で増殖が阻止された (Fig. 9)。 *Acinetobacter calcoaceticus* 50 株に対する CRMN の抗菌力は、Fig. 10 のとおり中等度に止まった。 *Pseudomonas aeruginosa* 50 株に対する CRMN の抗菌力は、CAZ に劣り AZT より若干強かった (Fig. 11)。 *Xanthomonas maltophilia* 29 株には、CRMN は AZT とともに Fig. 12 のとおり弱い抗菌力しか示さない。 ABPC 耐性 *H. influenzae*

24 株に対しては、CRMN は Fig. 13 のとおり全株 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以下で増殖を阻止したが、AZT, CPZ, CAZ の抗菌力には及ばなかった。 嫌気性菌 *B. fragilis* 47 株には、Fig. 14 のとおり CRMN の抗菌力は弱かった。

S. aureus 50 株に対しては、CRMN は抗菌力がほとんど無く、全株 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。

2. CRMN の各種細菌 PBP に対する結合親和性

Fig. 15 のとおり *E. coli* NIHJ JC-2 の PBP に対し CRMN は 3, 1A, 1B の順に結合親和性が高く、その程度は AZT とほぼ等しかった。 *S. marcescens* 13 の PBP には、Fig. 16 のとおり CRMN は 3, 1B, 1C の順に結合親和性を示したが、PBP 1A に

Fig. 12 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *X. maltophilia* to carumonam and other cephalosporins

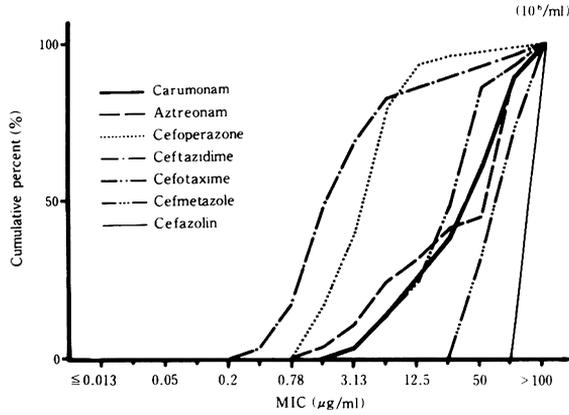


Fig. 13 Cumulative sensitivities of 24 clinical isolates of *H. influenzae* resistant to ABPC to carumonam and other cephalosporins

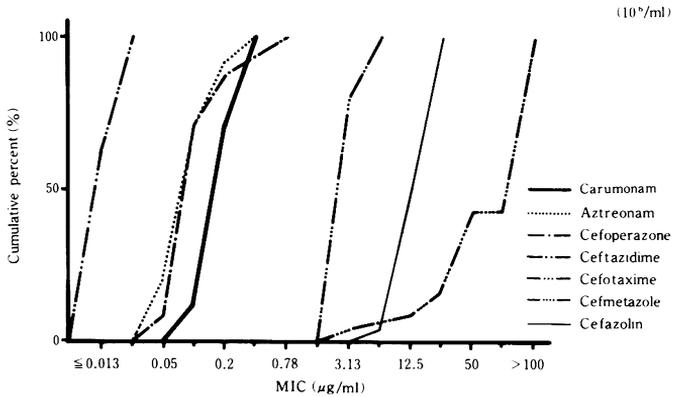


Fig. 14 Cumulative sensitivities of 47 clinical isolates of *B. fragilis* to carumonam and other cephalosporins

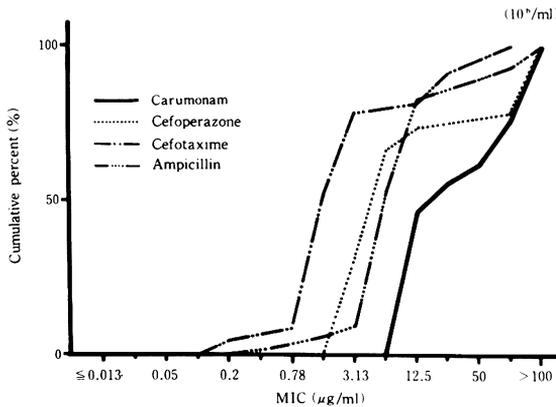


Fig. 15 Competition of carumonam and aztreonam for penicillin binding proteins of *E. coli* NIHJ JC-2

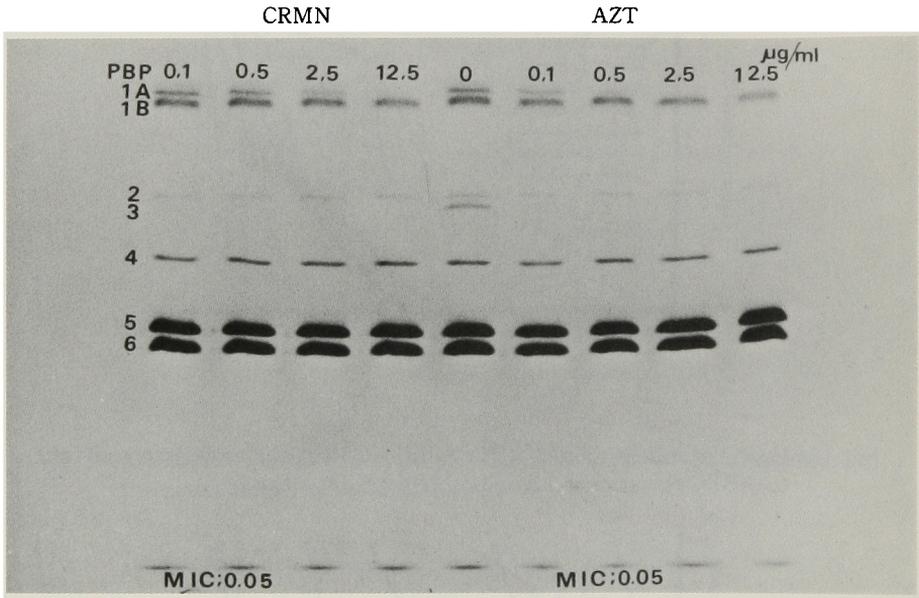


Fig. 16 Competition of carumonam and aztreonam for penicillin binding proteins of *S. marcescens* 13

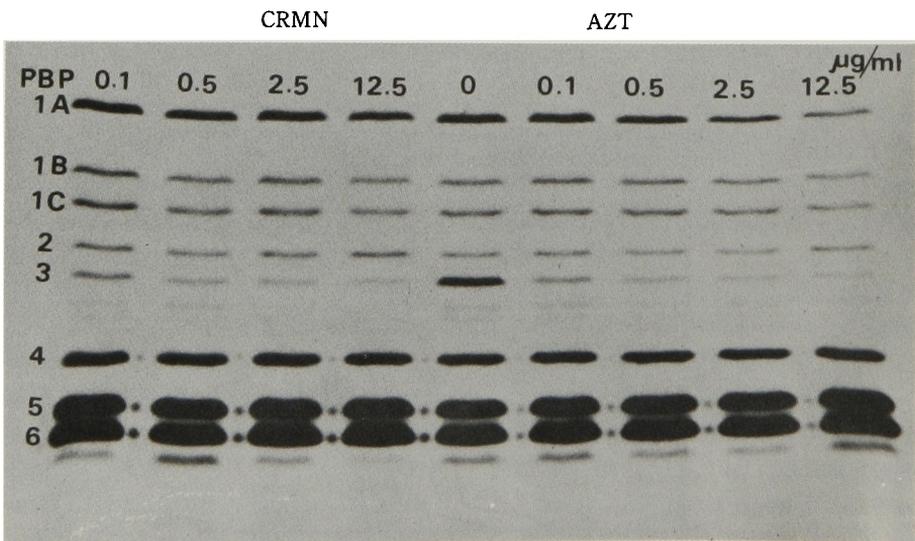


Fig. 17 Competition of carumonam and aztreonam for penicillin binding proteins of *A. calcoaceticus* 5

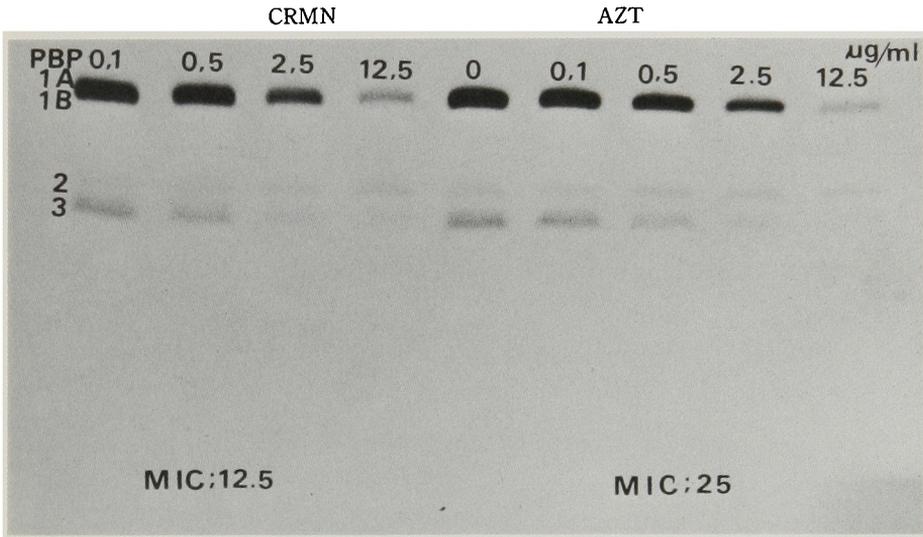


Fig. 18 Competition of carumonam and aztreonam for penicillin binding proteins of *P. aeruginosa* PAO-1

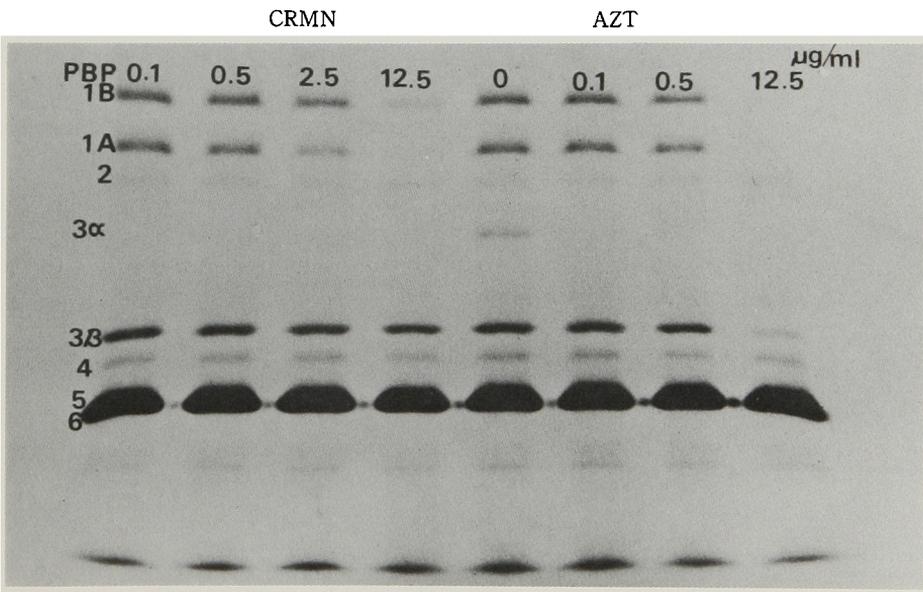


Fig. 19 Competition of carumonam and aztreonam for penicillin binding proteins of *S. aureus* 209P

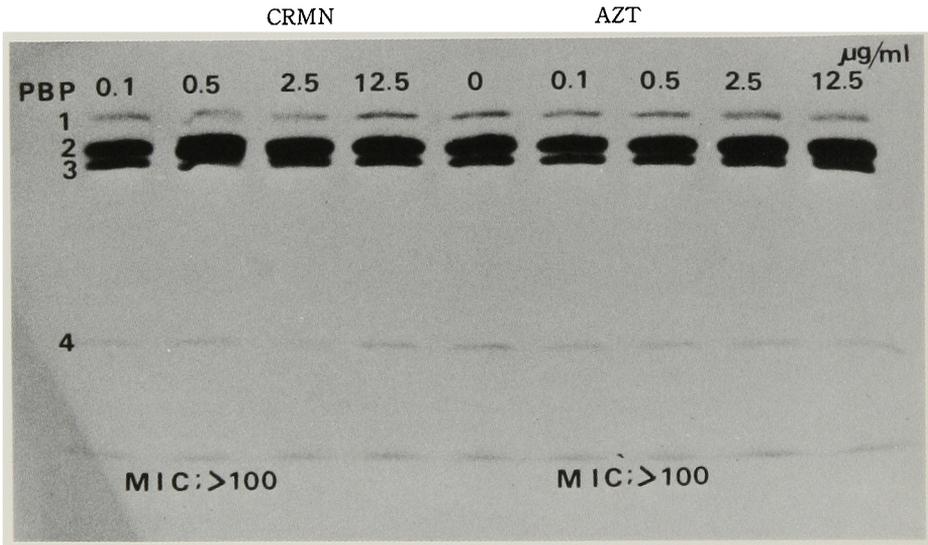
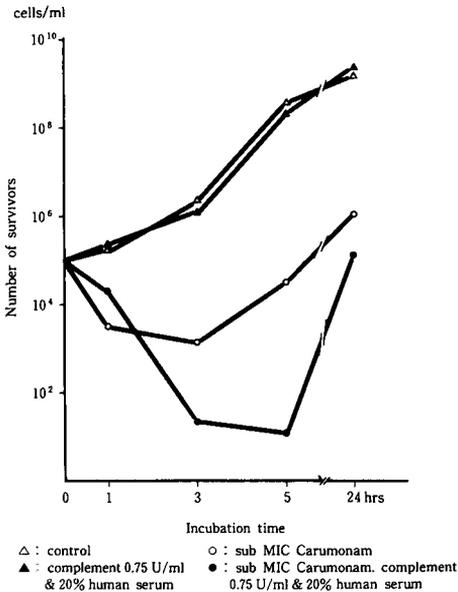


Fig. 20 Influence of subMIC carumonam (CRMN: 0.04 µg/ml) on the bactericidal effect of the serum complement for *E. coli* NIHJ JC-2



対する親和性は AZT よりも弱かった。CRMN が AZT より強い抗菌力をこの株に示す理由は、CRMN の方が外膜通過性が良好なためと考えられた。Fig. 17 のとおり CRMN は AZT 同様 *A. calcoaceticus* 5 の PBP3, 1A の順に結合親和性が高い。AZT の結合親和性も同程度なので、CRMN が AZT よりこの菌に抗菌力が強いのは、外膜通過性の良さに依るものと想像される。*P. aeruginosa* PAO1 の PBP には、CRMN は AZT とともに 3 α , 1A, 1B の順に結合親和性が高かった (Fig. 18)。

S. aureus 209P の PBP に対しては CRMN も AZT も全く結合親和性を示さない (Fig. 19)。Monocyclic β -lactam がブドウ球菌に抗菌力を持たないのは、この菌の作用点に薬剤が働かないためであることが確認された。

3. CRMN と血清補体との協力的殺菌作用

菌の増殖に影響しない最高濃度の補体 (0.75 units/ml) と ID₅₀ の CRMN を共存させると、Fig. 20 のとおりそれぞれ単独で菌に作用させたより殺菌力が強かった。CRMN は血清補体と強い協力的殺菌作用を示すと結論された。

4. CRMN とマウス培養 M ϕ との協力的食菌・殺

Fig. 21 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown without drugs, at 5hr after infection

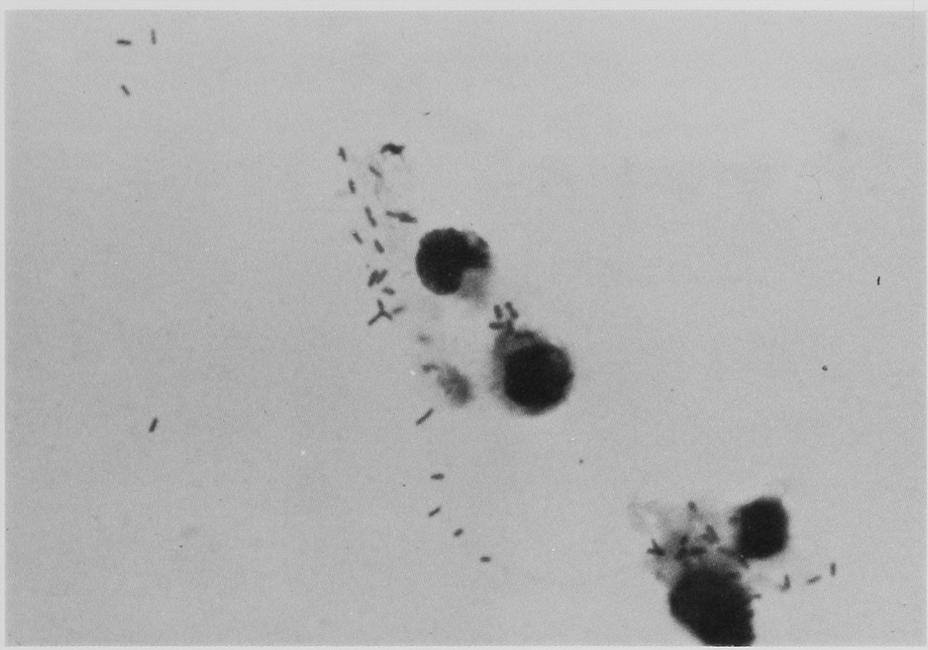


Fig. 22 Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2 MIC of carumonam, at 5hr after infection

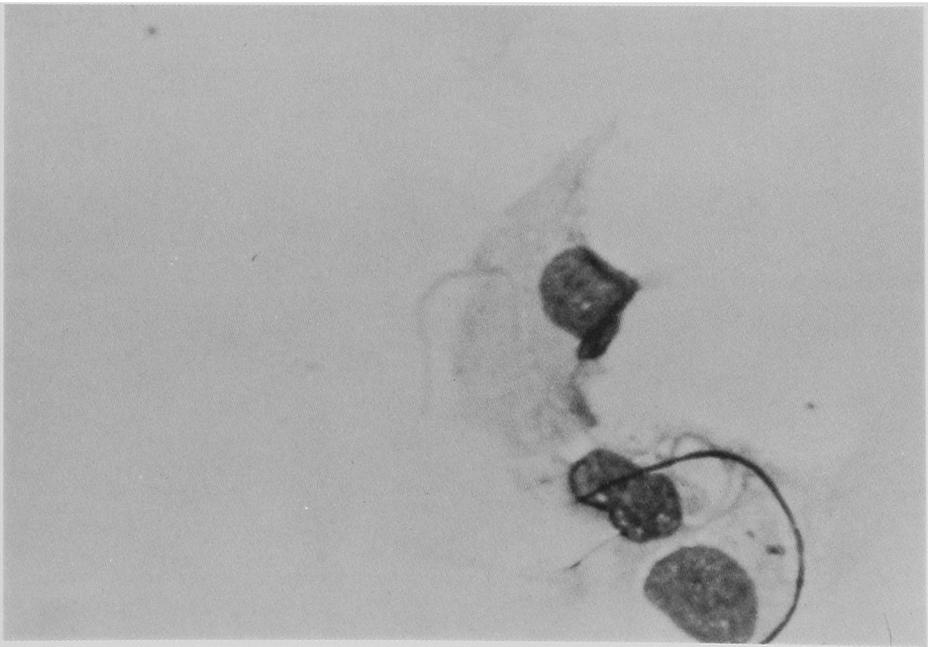


Fig. 23 Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/4 MIC of carumonam, at 5hr after infection



Fig. 24 Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/8 MIC of carumonam, at 5hr after infection

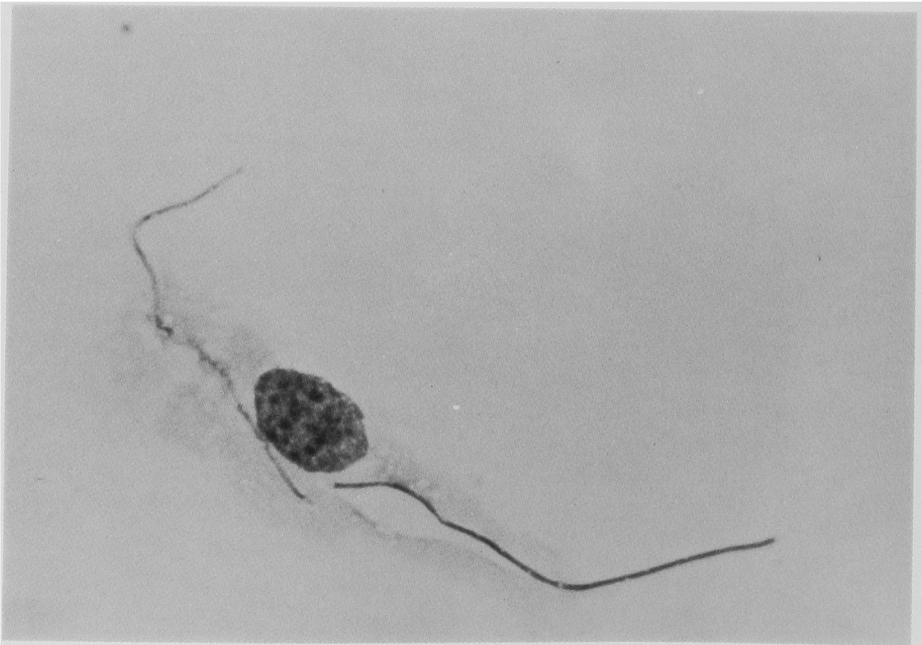
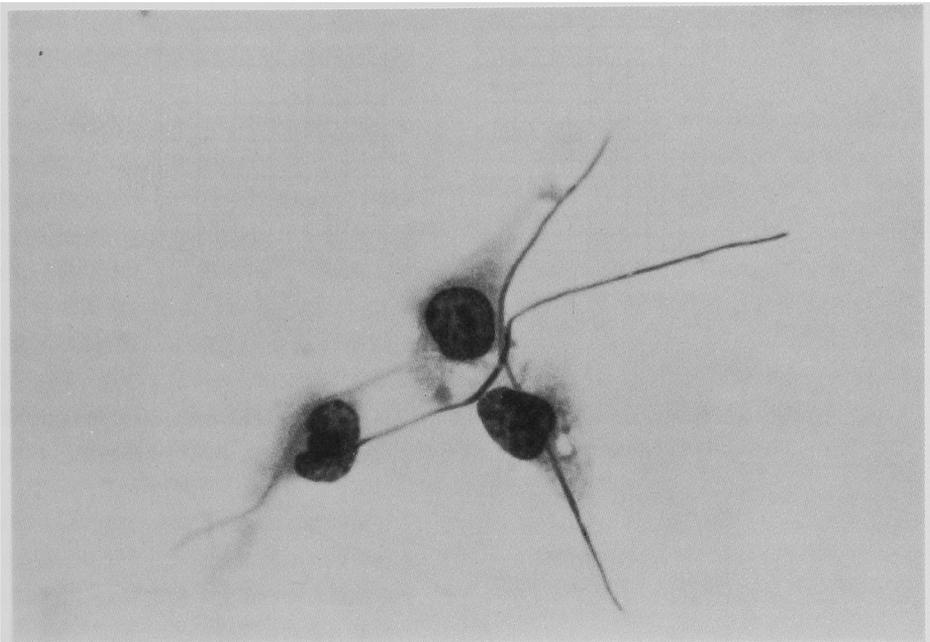


Fig. 25 Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/16 MIC of carumonam, at 5hr after infection



菌作用

E. coli NIHJ JC-2 をマウス培養 $M\phi$ に感染させると、2~3 時間後には多数菌細胞を食菌した $M\phi$ の像がみられるが、5 時間後には Fig. 21 のとおり細胞内で増殖した菌細胞が $M\phi$ を破壊して遊出する。この場合、1/2 MIC の CRMN 存在下で菌を感染させると、Fig. 22 のとおり薬剤の影響で filament 化した細胞は $M\phi$ に良く食菌され、5 時間後には殺菌消化が進んで ghost 化した菌細胞と、食胞がみられる。1/4~1/8 MIC でも同様で、Fig. 23 および 24 のとおり食菌された菌細胞は急速に消化されている。Fig. 25 に 1/16 MIC の CRMN 存在下で *E. coli* を食菌した $M\phi$ の像を示したが、食菌された菌細胞はこの低濃度でも消化が進んでいることが解る。

5. CRMN と MCIPC の協力作用

E. coli NIHJ JC-2 および *S. aureus* 209P に対する CRMN と MCIPC の協力作用をチェッカーボード法で調べると、Fig. 26 のとおりそれぞれ FIC index 0.75 および 0.75 を示し、協力的抗菌作用が認められる。MRSA 52 株に対し CRMN および MCIPC 単独での感受性分布をみると、Fig. 27 のとおり CRMN はこの菌に対し全く抗菌力を示さないが、MCIPC は MRSA に対しても、なお相当程度の

抗菌力を保持していることが解る。0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MCIPC 存在下で CRMN の感受性分布を調べると MCIPC に対する感受性が 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の菌株では、すべて CRMN との間で強い相乗効果が認められた。しかし、混合した MCIPC にも増殖が抑えられない株では、CRMN の抗菌力は認められなかった。

考 察

AZT に続く国産第 1 号の monocyclic β -lactam, CRMN は、グラム陽性菌に対する抗菌力は弱い³⁾、グラム陰性菌では *C. freundii*, *E. cloacae* および *S. marcescens* の臨床分離株に対し、AZT や CAZ を含む oxime 型 cephem および cephamycin 型と ureido 型 cephem よりかなり強い抗菌力を示した。また R 因子保有 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. organii* および *P. rettgeri* に対し、AZT および CTX に近い抗菌力を示し、対照薬剤中最も強いものの一つであった。また *P. aeruginosa* に対しては CAZ には劣るものの、AZT とその他の第三世代、第二世代 cephem より強い抗菌力を示した。Ampicillin (ABPC) 耐性 *H. influenzae* に対する CRMN の抗菌力は AZT, CPZ

Fig. 26 Synergy of carumonam with cloxacillin

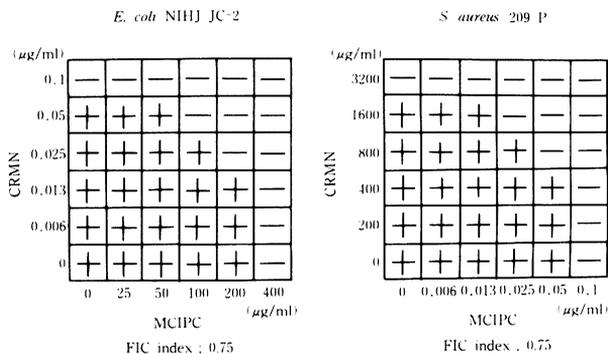
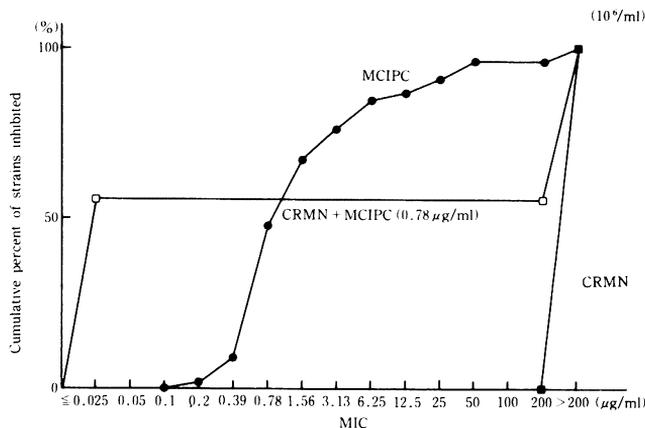


Fig. 27 Cumulative sensitivities of 52 clinical isolates of MRSA to carumonam, cloxacillin and carumonam with cloxacillin



および CAZ のそれに劣ったが、全株 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以下で増殖が阻止された。しかし、*A. calcoaceticus* および *X. maltophilia* に対する CRMN の抗菌力は強くなく、前者では CAZ と CTX のそれに劣り、後者では CAZ と CPZ より弱かった。また嫌気性菌 *B. fragilis* にも抗菌力は弱く、CPZ、CTX および ABPC のそれに及ばなかった。

作用点 PBP に対し CRMN の結合親和性は、*E. coli* NIHJ JC-2、*S. marcescens* 13 および *P. aeruginosa* PAO1 では、PBP3、PBP1 (A または B) の順に結合親和性が高く、その程度は AZT のそれとほぼ等しかった。*A. calcoaceticus* 5 の PBP でも PBP3 および 1A の順に高い結合親和性を示した。CRMN により、隔壁合成に用いる PBP3 がまず抑えられるので菌は filament 化するが、PBP 1A の阻害もみられるので、グラム陰性菌では、bulge 形成

による溶菌が起こると考えられる。monocyclic β -lactam は *S. aureus* などのグラム陽性菌には作用が弱い、この菌の必須の画分 PBP2 および 3 に CRMN も AZT も高濃度でも全く結合しないので、作用点への働き弱さがグラム陽性菌に抗菌力を示さない理由であることが解った。

CRMN は 50% 発育阻止濃度で補体と共存させると、協力的殺菌作用が明らかに認められた。また subMIC の CRMN 存在下で、*E. coli* の細胞をマウス培養 $M\phi$ に食菌させると、1/8 MIC まで協力的食菌・殺菌作用がみられ、感染後 5 時間目には、薬剤の影響で filament 化した菌細胞が殺菌消化されて ghost 化し、 $M\phi$ は正常に止まった。同一条件で薬剤非存在下で *E. coli* の細胞を食菌させると、培養 $M\phi$ は生体内での力を持たないためか、菌細胞の細胞内増殖により逆に $M\phi$ が破壊されるので、

subMIC の CRMN は、 $M\phi$ と強い協力的食菌作用を $M\phi$ との間で示すが、cephem などでは 1, 2 の例外を除いて、 $1/2 \sim 1/4$ MIC が協力作用の限度なので、CRMN の白血球との協力作用は cephem より強い。

グラム陰性菌に抗菌スペクトルが傾った CRMN は、ブドウ球菌などとの混合感染の場合には、後者に対する薬剤を併用しなければならない。MRSA にも、なおある程度の抗菌力を保持している半合成 PC, MCIPC と併用すると、*S. aureus* のみならず *E. coli* にも協力作用が認められる。また少量の MCIPC 存在下で MCIPC に感受性を示す MRSA は、CRMN と強い協力作用を示した。以上の成績は、グラム陽性菌混合感染に対し CRMN と MCIPC の併用が良好な治療効果を持たらず可能性を示唆している。

CRMN は、少数の例外を除き、グラム陰性菌に平均した強い抗菌力を示す。 β -lactamase には安定なので耐性株が少ない。緑膿菌を含めたグラム陰性菌感染症には、優れた臨床効果が期待される。またグ

ラム陽性菌との混合感染には、CRMN と MCIPC の併用が、MRSA 感染症を含め有効と考えられるので、本剤の有用性は高いと思われる。

文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23 : 1~2, 1975
- 2) LENNOX, E.S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1 : 190~206, 1955
- 3) SPRATT, R.G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 2999~3003, 1975
- 4) 横田 健, 関口玲子：T-1982 と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用。Chemotherapy 30 : 20~27, 1982
- 5) NOZAWA, R.T. & T. YOKOTA: Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). Cell. Physiol. 100 : 351~364, 1979

A NEW MONOCYCLIC β -LACTAM, CARUMONAM, ITS *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY, BINDING AFFINITY TO PBP's, AND SYNERGY OF BACTERICIDAL ACTIVITY WITH THE COMPLEMENT AND MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, KYOKO ARAI and EIKO SUZUKI

Department of Bacteriology, School of Medicine,

Juntendo University, Tokyo

Carumonam (CRMN) showed MIC₈₀ to 24~52 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *E. coli*-carrying R plasmids, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* resistant to ampicillin, and *Bacteroides fragilis* as >100, >100, 0.1, 0.1, 0.025, 0.025, 0.39, 0.025, 0.39, 3.13, 0.39, 0.39, 6.25, 100, 0.39 and >100 $\mu\text{g/ml}$, respectively. CRMN bound strongly to PBP 3, 1A and 1B of *E. coli* in that order. High binding-affinities of CRMN were also demonstrated to PBP 3, 1B, and 1C of *S. marcescens*, to PBP 3, 1A and 1B of *P. aeruginosa* and PBP 3 and 1A of *A. calcoaceticus*, in that order, although CRMN did not bind at all to the PBP's of *S. aureus*, even at a dose of 100 $\mu\text{g/ml}$.

Synergy of bactericidal activity between CRMN and the serum complement was prominent in the cells of *E. coli* NIHJ JC-2. Furthermore, these were engulfed and rapidly digested by cultured macrophages derived from the peritoneal cavity of ICR mice in the presence of sub-MIC's of CRMN as low as $1/8$ MIC, whereas in the absence of the drug the same microbes multiplied intracellularly and destroyed the leucocytes.