

## Carumonam のグラム陰性桿菌に対する抗菌機序

杉中秀寿・三井一史・三宅洋一郎

広島大学歯学部口腔細菌学講座

Carumonam は新しく開発された合成モノバクタム系抗生剤の一つで、広範囲のグラム陰性菌に対して、他の  $\beta$ -ラクタム系抗生剤よりも強い抗菌力を有している。

この抗生剤の抗菌機序について、*Pseudomonas aeruginosa* KM338, *Escherichia coli* K12 および *Serratia marcescens* IFO 12648 を用いて、sulfazecin の作用と比較し、検討を加えた。

それぞれの被検菌株に対する carumonam の最小発育阻止濃度 (MIC) は、12.5, 0.05 および 0.1  $\mu\text{g/ml}$  で、一方 sulfazecin の MIC はそれぞれ 3,200, 12.5 および 100  $\mu\text{g/ml}$  であった。

Carumonam が sulfazecin に比べて、いずれの被検菌株に対しても優れた抗菌力を示すのは、外膜透過性に優れ、 $\beta$ -lactamase に安定で、しかも標的酵素に対して高い感受性を示すためであろうと考えられる。

## 緒 言

Carumonam (CRMN, AMA-1080) は新しく開発された合成単環性  $\beta$ -ラクタム系抗生剤の一つである。従来の  $\beta$ -ラクタム系抗生剤には主として  $\beta$ -ラクタム環の隣に 5 員環 (チアゾリジン環) を有するペニシリン系抗生剤と 6 員環 (ジヒドロチアジン環) を持つセフェム系抗生剤とが知られている。この単環性  $\beta$ -ラクタム系抗生剤はモノバクタムと呼ばれ、単一の  $\beta$ -ラクタム環を母核 (3 アミノモノバクタミン酸) とする新しい  $\beta$ -ラクタム系抗生剤<sup>1)</sup> である。

CRMN は *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとする広範囲のグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示すことが報告<sup>2)</sup> されている。そこでこの抗生剤の抗菌機序を *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* および *Serratia marcescens* の標準株を用いて、同じ骨格をもつ天然型 sulfazecin<sup>3)</sup> のそれと対比して検討した。

## I. 材 料 と 方 法

## 1. 抗 生 剤

Carumonam (CRMN, AMA-1080) は disodium (+)-(Z)-[[[1-(2-amino-4-thiazolyl)-2-[[[(2S, 3S)-2-(carbamoyloxymethyl)-4-oxo-1-sulfonato-3-azetidiny] amino]-2-oxoethylidene] amino] oxy] acetate<sup>1)</sup> (900  $\mu\text{g/mg}$ ) で、武田薬品工

業株式会社より得た。また対照として同系の抗生剤の天然モノバクタムの一つである sulfazecin<sup>3)</sup> (906  $\mu\text{g/mg}$ , 武田薬品) を用いた。その他、市販の benzylpenicillin (PCG) (1,600 unit/mg, 明治製薬) および cefazolin (CEZ) (935  $\mu\text{g/mg}$ , 藤沢薬品) を対照薬剤として使用した。

## 2. 使用菌株

*Pseudomonas aeruginosa* KM338, *Escherichia coli* K12 および *Serratia marcescens* IFO 12648 を被検菌に、*Staphylococcus aureus* 209P を対照菌株として用いた。

## 3. ペプチドグリカンの合成基質

ペプチドグリカンの前駆体である uridine 5'-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanine (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala) は *Bacillus megaterium* KM の対数増殖中期に最終濃度が 20 mg/ml になるように vancomycin を添加し、1 時間培養後、その洗浄菌体を 10% trichloroacetic acid (TCA) に浮遊させ、0°C で、30 分間攪拌し、その上清から得た<sup>4)</sup>。この操作を 3 回くり返した後、それぞれの上清を集めてエーテル抽出を行い、その抽出液を濃縮後、Sephadex G-10 および Dowex AG1 を用いて分画精製した。一方もう一つの前駆体である uridine 5'-diphos-

phate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) は N-acetylglucosamine が  $^{14}\text{C}$  でラベルされたものを使用した。この UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc (290 mCi/mmol) は New England Nuclear 社 (Boston, Mass. USA) より購入した。

#### 4. エーテル処理菌体

それぞれの被検菌株を Trypticase soy broth (BBL 社, Cockeysville, Md. USA) で振盪培養し、対数増殖期に集菌、それぞれの洗浄菌体を VORBERG と HOFFMANN-BERLING の方法<sup>5)</sup>に従って 2mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA) 存在下で 1 分間、0°C でエーテル処理した。このエーテル処理菌体をペプチドグリカン合成の酵素標品<sup>4,6)</sup>とした。

#### 5. 抗菌力の測定<sup>7)</sup>

最小発育阻止濃度 (MIC) は 2 倍数系列希釈の被検抗生剤を含む Trypticase soy broth (BBL 社) に終末濃度が約  $10^6$  cell/ml になるように被検菌を接種し、37°C, 18 時間培養後に測定した。

#### 6. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下での抗菌力の測定<sup>8)</sup>

EDTA 存在下でのそれぞれの抗生剤の MIC の測定は上記 5 項に記載した系に 1/2 MIC 濃度の EDTA を添加し、未添加のそれぞれの抗生剤の MIC と比較した。なお EDTA 単独での *P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12, *S. marcescens* IFO12648 および *S. aureus* 209P に対する MIC は、それぞれ 3.8, 3.8, 7.6 および 1.9  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 7. ペプチドグリカンの架橋形成の測定<sup>4,6)</sup>

ペプチドグリカンの前駆体である 1  $\mu\text{M}$  UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala と 0.172  $\mu\text{M}$  UDP- $^{14}\text{C}$  GlcNAc を基質とし、10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride 緩衝液 (pH 7.2), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  および 0.1 mM 2-mercaptoethanol 存在下、総量 200  $\mu\text{l}$  の反応液中に約 10 mg の蛋白質相当の上記エーテル処理菌体を酵素源として加え、37°C, 30 分間反応させた。反応後、4% sodium dodecylsulfate (SDS) を加え、さらに 100°C, 30 分間加熱して反応を止めた。次いで SDS に不溶性である架橋ペプチドグリカンをメンブランフィルター上に集め、このフィルターを直接液体シンチレーションカウンターでその放射能を測定した。

## II. 実験結果

### 1. 抗菌力

Table 1 の None の項にそれぞれの被検菌株に対する CRMN, sulfazecin, PCG および CEZ の MIC を示す。種々の抗生剤に高度耐性を示す *P. aeruginosa* KM338 に対する各抗生剤の MIC は 12.5, 3, 200, 12,800 および 51,200  $\mu\text{g/ml}$  であり、CRMN は他の 3 剤よりもはるかに優れた抗菌力を示した。*E. coli* K12 に対する各抗生剤の MIC は 0.05, 12.5, 12.5 および 1.56  $\mu\text{g/ml}$  で、CRMN は sulfazecin よりも 250 倍優れた抗菌活性を持っていた。*S. marcescens* IFO12648 に対する各抗生剤の MIC はそれぞれ 0.1, 100, 1,600 および 6,400  $\mu\text{g/ml}$  で、*P. aeruginosa* に対しての場合と同様、CRMN は他の 3 剤に比べてきわめて高い抗菌力を有した。一方グラム陽性菌の代表である *S. aureus* に対する各抗生剤の MIC は、それぞれ 6,400, 1,600, 0.0125 および 0.39  $\mu\text{g/ml}$  で、CRMN および sulfazecin はほとんど *S. aureus* に抗菌力を示さなかった。

### 2. 外膜透過性

グラム陰性菌の外膜はリン脂質、リポ多糖、蛋白質およびリポ蛋白質からなり、そこに 2 価陽イオンが挿入されて細菌細胞表層をおおっている。2 価陽イオンのキレーターである EDTA はこの薬剤透過障害の荷ない手である外膜に障害を与え、薬剤の透過性をよくすることが知られている<sup>9)</sup>。そこで菌の発育に影響をおよぼさない濃度 (1/2 MIC) の EDTA を添加して各抗生剤の MIC を調べ、未添加のそれぞれの MIC と比較して抗生剤の外膜透過障害の程度を検討した (Table 1)。その結果、*P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO12648 に対して、EDTA 添加によって CRMN の抗菌力は 4, 2 および 2 倍しかに上昇したが、sulfazecin の抗菌力は 16, 4 および 8 倍上昇した。このことは CRMN が sulfazecin に比べて、グラム陰性菌の外膜透過性にすぐれていることを示唆している。また対照として用いた PCG や CEZ の抗菌力は、とくに *P. aeruginosa* や *S. marcescens* に対して EDTA 添加によって著明に高まった。なお外膜をもたないグラム陽性菌の一つである *S. aureus* に対しては、いずれの抗生剤も EDTA 添加によって MIC は変らなかった。

### 3. ペプチドグリカンの架橋形成阻害

一般に  $\beta$ -ラクタム系抗生剤であるペニシリン系およびセフェム系抗生剤はその標的酵素である transpeptidase および D-alanine carboxypeptidase に働き、ペプチドグリカンの架橋形成を阻害して抗菌力を発揮する<sup>10)</sup>。同様の  $\beta$ -ラクタム環を有するモノバクタム系抗生剤も上記の架橋形成反応を同じように阻害するかどうかについて検討した。被検菌株の対数増殖期のエーテル処理菌体を酵素源とし、ペプチドグリカンの前駆体である UDP-MurNAc-D-Ala-D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala と UDP-[<sup>14</sup>C] GlcNAc を基質として全菌レベルで反応させると、いずれの菌株でも SDS-不溶性画分に [<sup>14</sup>C] GlcNAc がとり込まれ、架橋ペプチドグリカンが合成される<sup>4,6)</sup>。この反応系に種々の濃度の CRMN および sulfazecin を添加して架橋形成阻害の程度を未添加の場合と比較して調べた (Fig. 1)。

CRMN による *P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO12648 の架橋ペプチドグリカン合成の 50%阻害濃度は、それぞれ約 6.7, 28 お

よび 110  $\mu\text{g/ml}$  で、一方 sulfazecin によるそれぞれは 150, 48 および  $>800 \mu\text{g/ml}$  であった。いずれの被検菌に対しても、CRMN は sulfazecin に比べて、その阻害濃度は低かった。この事実は CRMN が sulfazecin に比べて優れた抗菌力を示す一つの要因であろうと考えられる。

### III. 考 察

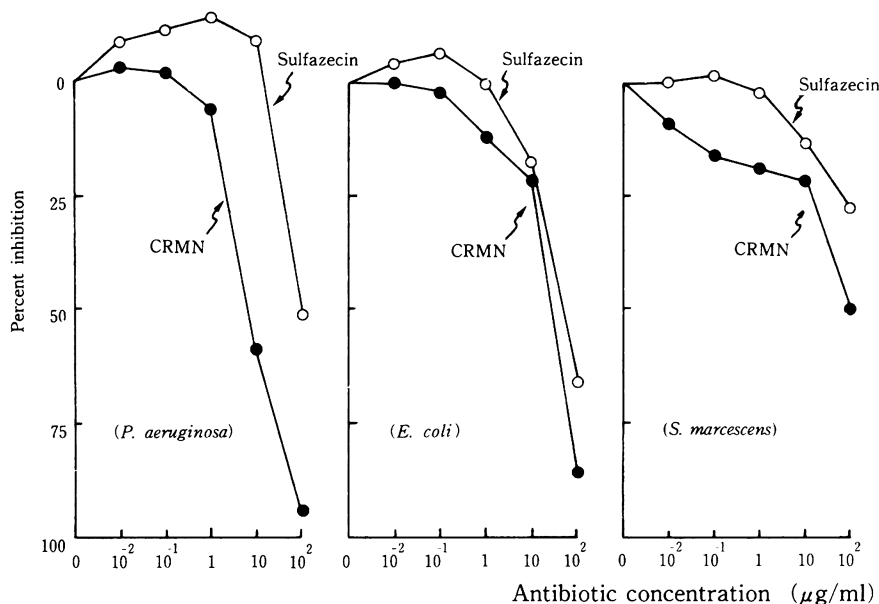
このたび新しく開発されたモノバクタム系抗生剤の一つである CRMN は  $\beta$ -ラクタム環のみを母核 (3 アミノモノバクタミン酸) とする単環性  $\beta$ -ラクタム抗生剤である<sup>1)</sup>。

この抗生剤は種々の抗生剤に高度耐性を示す *P. aeruginosa* や *S. marcescens* などをはじめとしてグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示し、一方グラム陽性菌の代表である *S. aureus* に対してはほとんど感受性を示さず、*Streptococcus pyogenes* に対しては中程度の感受性を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。今回の実験で対照として用いた sulfazecin は *Pseudomonas* spp. のある種の株が産生する天然の

Table 1 MICs and effect of EDTA on the MICs of carumonam, sulfazecin, benzylpenicillin and cefazolin for *P. aeruginosa* KM 338, *E. coli* K 12, *S. marcescens* IFO 12648 and *S. aureus* 209P

Strain Addition	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Carumonam	Sulfazecin	Benzylpenicillin	Cefazolin
<i>P. aeruginosa</i> KM338				
None	12.5	3,200	12,800	51,200
EDTA (1/2 MIC)	3.13	200	400	3,200
Sensitivity (fold)	(4)	(16)	(32)	(16)
<i>E. coli</i> K12				
None	0.05	12.5	12.5	1.56
EDTA (1/2 MIC)	0.025	3.13	1.56	0.78
Sensitivity (fold)	(2)	(4)	(8)	(2)
<i>S. marcescens</i> IFO 12648				
None	0.1	100	1,600	6,400
EDTA (1/2 MIC)	0.05	12.5	50	100
Sensitivity (fold)	(2)	(8)	(32)	(64)
<i>S. aureus</i> 209P				
None	6,400	1,600	0.0125	0.39
EDTA (1/2 MIC)	6,400	1,600	0.0125	0.39
Sensitivity (fold)	(1)	(1)	(1)	(1)

Fig. 1 Effects of carumonam and sulfazecin on cross-linking reaction of peptidoglycan synthesis by ether-treated cells of *P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 and *S. marcescens* IFO 12648



モノバクタム系抗生剤で、CRMNと同様の母核を有し、CRMNの開発の元になった薬剤である<sup>3)</sup>。この抗生剤はグラム陽性菌にはほとんど抗菌力を示さず、グラム陰性菌の中で *E. coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp. などに中程度の抗菌力を示すことが報告<sup>3)</sup> されている。

一般にグラム陰性菌に対するβ-ラクタム系抗生剤の感受性は、細菌細胞表層に存在する外膜に対する透過性、外膜と細胞質膜(内膜)との間のペリプラズムに局在するβ-lactamaseに対する安定性および細胞膜上に存在する架橋形成酵素(transpeptidase, D-alanine carboxypeptidase)に対する感受性によって決定される。

グラム陰性菌の場合、β-ラクタム系抗生剤がその標的酵素に作用するためには、まず外膜を通過しなければならない。*P. aeruginosa* や *S. marcescens* などの種々の抗生剤に高度耐性のグラム陰性菌では、その細胞の最外層に存在する外膜が抗生剤のbarrierになっており、耐性の荷ない手の大きな要因である<sup>6,11,12)</sup>。この外膜にEDTAを作用させると外膜からリポ多糖-蛋白質複合体が遊離され<sup>8)</sup>、外膜に障害が与えられて透過障害を受けていた物質がペリプラズム内に入ることが知られている<sup>8,9)</sup>。そこでこの現象を利用して、増殖に影響をおよぼさない濃度のEDTA存在下と存在しない場合でのMICを比較す

るとその抗生剤の外膜での透過障害の程度がわかる<sup>8)</sup>。すなわち、両者でのMICの差が大きい程、外膜での透過障害が大きいことを意味している。*P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO12648 に対してCRMNではsulfazecinに比べてEDTA添加によるそれぞれの感受性の上昇が少なかった。この事実はCRMNがsulfazecinよりも上記菌株の外膜に対する透過性に優れていることを示している。また上記菌株に対してCEZやPCGの感受性はEDTA添加によって著明に高まった。すなわちCRMNやsulfazecinはCEZやPCGに比べてはるかに外膜透過性に優れていることを示している。なおデータには示していないが、CRMNと同系の抗生剤の一つであるaztreonamでも同様の結果を得ている<sup>12)</sup>。

次にβ-ラクタム系抗生剤の耐性因子として重要視されているβ-lactamaseに対する安定性については、penicillinase型およびcephalosporinase型いずれのβ-lactamaseに対してもCRMNはきわめて安定であることが報告されている<sup>2)</sup>。被検菌株である*P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO 12648 のもつcephalosporinase型のβ-lactamaseに対してもCRMNおよびsulfazecinはCEZに比べてきわめて安定であった(未発表)。

$\beta$ -ラクタム系抗生剤が外膜を通過し、さらにペリプラズムに存在する  $\beta$ -lactamase による不活化をまぬがれ、細胞質膜上に存在する標的部位にまで到達しても、標的酵素に対する感受性がなければ、抗菌力が発揮できない。 $\beta$ -ラクタム系抗生剤であるペニシリン系およびセフェム系抗生剤はいずれもペプチドグリカンの架橋形成にあずかる標的酵素に阻害作用を示す<sup>10)</sup>。*P. aeruginosa* KM338, *E. coli* K12 および *S. marcescens* IFO 12648 を用いたペプチドグリカンの架橋形成阻害実験で、モノバクタム系抗生剤である CRMN および sulfazecin はペニシリン系やセフェム系抗生剤と同様、架橋形成反応を阻害した。また CRMN は sulfazecin に比べて、いずれの被検菌株のペプチドグリカン架橋形成反応にも優れた阻害効果を示した。この結果は CRMN が sulfazecin よりも優れた抗菌力を有する一つの要因であると考えられる。なおモノバクタム系の抗生剤の一つである aztreonam による架橋形成阻害も CRMN のそれと同程度であった<sup>13)</sup>。

このように  $\beta$ -ラクタム系抗生剤に感受性を示す標的酵素はその薬剤に親和性をもつ<sup>14)</sup>。この親和性をもつ標的酵素を penicillin binding protein (PBP) と呼び、グラム陰性菌では数種類存在する<sup>14)</sup>。それぞれの PBP は機能も異なり、また抗生剤の種類によってその親和性も異なっている<sup>14)</sup>。CRMN および sulfazecin はとくに細胞の隔壁形成にあずかる PBP 3 に強い親和性を示すことが報告<sup>2,3)</sup> されている。我々の被検菌を用いた実験でも同様の結果を得ている。このことは CRMN を sub MIC 濃度添加して培養した時に細胞が伸長化する事実と一致している。

以上の実験結果から CRMN が sulfazecin よりも被検菌株に優れた抗菌力を発揮するのは、この薬剤が外膜透過性に優れ、 $\beta$ -lactamase に安定で、しかもペプチドグリカンの架橋形成にあずかる標的酵素に対して優れた感受性をもつためであろうと考えられる。

## 文 献

- 1) SENDAI, M.; S. HASHIGUCHI, M. TOMIMOTO, S. KISHIMOTO, T. MATSUO, M. KONDO & M. OCHIAI: Chemical modification of sulfazecin, synthesis of 4-(substituted methyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid derivatives. *J. Antibiotics* 38: 346~371, 1985
- 2) IMADA, A.; M. KONDO, K. OKONO, 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
- 3) 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
- 4) SUGINAKA, H.; S. KOTANI, N. TAKATA & M. OGAWA: Effect of cefotaxime (HR-756) on biosynthesis of cell wall peptidoglycan in *Pseudomonas aeruginosa* KM338 and *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 79~82, 1980
- 5) VORSBERG, H.P. & H. HOFFMANN-BERLING: DNA synthesis in nucleotide permeable *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 58: 739~753, 1971
- 6) TAKATA, N.; H. SUGINAKA, S. KOTANI, M. OGAWA & G. KOSAKI:  $\beta$ -Lactam resistance in *Serratia marcescens*: Comparison of action of benzylpenicillin, apalcillin, cefazolin, and ceftizoxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 397~401, 1981
- 7) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について. *Chemotherapy* 29 (1): 76~79, 1981
- 8) SUGINAKA, H.; M. SHIMATANI, S. KOTANI, M. OGAWA, M. HAMA & G. KOSAKI: Antibacterial mechanisms of cefsulodin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 5: 177~179, 1979
- 9) LEIVE, L.: The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235: 109~129, 1979
- 10) IZAKI, K.; M. MATSUHASHI & J.L. STROMINGER: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIII. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243: 3180~3192, 1968
- 11) SUGINAKA, H.; A. ICHIKAWA & S. KOTANI: Penicillin-resistant mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: effects of penicillin G and carbenicillin on transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 672~675, 1974
- 12) SUGINAKA, H.; A. ICHIKAWA & S. KOTANI: Penicillin-resistant mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: binding of penicillin to *Pseudomonas aeruginosa* KM338. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 629~635, 1975
- 13) 小川道雄: 高田直樹, 森 武貞, 三井一史, 桐山健, 杉中秀寿: グラム陰性桿菌に対する Azth-

- reonom の抗菌機構。Chemotherapy 33 : 963~968,  
1985  
14) SPRATT, B.G. : Distinct penicillin binding proteins

involved in the division, elongation, and shape of  
*Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. 72 :  
2999~3003, 1975

## ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF CARUMONAM AGAINST GRAM-NEGATIVE BACILLI

HIDEKAZU SUGINAKA, KAZUFUMI MITSUI  
and YOICHIRO MIYAKE

Department of Microbiology and Oral Bacteriology,  
Hiroshima University School of Dentistry, Hiroshima

Carumonam, a new synthetic monobactam, has more potent antibacterial activity than other  $\beta$ -lactam antibiotic against a wide variety of Gram-negative organisms.

The antibacterial mechanisms of carumonam were investigated, comparing with those of sulfazecin against *Pseudomonas aeruginosa* KM338, *Escherichia coli* K12 and *Serratia marcescens* IFO 12648.

The minimum inhibitory concentrations (MIC's) of carumonam for these organisms were 12.5, 0.05 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , whereas those of sulfazecin were 3,200, 12.5 and 100  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

The potent antibacterial activity of carumonam, compared with that of sulfazecin, is considered to be due to its higher permeability of the outer membrane, the stability to hydrolysis by  $\beta$ -lactamase and the higher sensitivity of the target enzymes of these organisms.