

SY5555 の試験管内抗菌力と生物学的安定性

横田 健[#]・神田佳代子・館田（鈴木）映子

順天堂大学医学部細菌学教室*

春山 宗忠・坂之上 佐和子

サントリー株式会社生物医学研究所

[#] 現 順天堂医療短期大学

SY5555 の *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* の 15~51臨床分離株に対する MIC₅₀ はそれぞれ 0.2, 6.25, 0.1, ≤0.013, ≤0.013, 1.56, >100, 0.78, 0.39, 0.78, 0.78, 6.25, 1.56, 1.56, 6.25, >100, 3.13, >100, 6.25, 0.39 および 1.56 μg/ml であった。*E. faecalis* を含むグラム陽性菌および *B. fragilis* に対して、SY5555 の抗菌力は imipenem (IPM) とほぼ同等であり、対照薬として用いた経口セフェム薬より優れていた。また、*C. freundii* および *E. cloacae* に対する本薬の抗菌力は IPM より弱い、経口セフェム薬より明らかに強かった。

SY5555 は *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対して IPM と同等もしくは若干強い結合親和性を示した。しかし、MRSA の PBP 2' に対する本薬の結合親和性は IPM より弱かった。

SY5555 は Type Va β-lactamase に対して IPM より強い永久不活化作用を、また、Type III β-lactamase に対して IPM とほぼ同等の永久不活化作用を示した。しかし、Type Ic, IIb および IVb β-lactamase に対する本薬の永久不活化作用は IPM より弱かった。

SY5555 のモルモット補体との協力殺菌作用は顕著には認められなかった。一方、本薬はマウス培養マクロファージ (Mφ) とは良好な協力殺菌作用を示し、1/8MIC 以上の SY5555 存在下で Mφ は *E. coli* 生細胞を食菌した。

ヒト腎 dehydropeptidase-I に対する SY5555 の安定性は IPM より良好である傾向が認められた。

Key words : SY5555, PBPs, β-lactamase, マウス培養 Mφ, DHP-I

SY5555 はサントリー株式会社により創製された我が国初のペネム系抗生物質である。本薬の臨床効果を推定するため、試験管内抗菌力、作用点ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性、β-lactamase に対する永久不活化作用およびモルモット補体またはマウス培養マクロファージ (Mφ) との協力殺菌作用等の基礎的検討を行った。さらに、ペネム系およびカルバペネム系の β-ラクタム薬を分解する生体内酵素 dehydropeptidase-I (DHP-I)¹⁾ に対する本薬の安定性も併せて検討した。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

臨床分離株に対する試験管内抗菌力の測定には、順天堂大学附属病院中央検査室および東京都老人研究所附属病院中央検査室から分与された *Staphylococcus aureus* 49株, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 48株, coagulase-negative staphylococci (CNS) 41株, *Streptococcus pyogenes* 50株, *Streptococcus pneumoniae* 20株, *Enterococcus faecalis* 38株, *Enterococcus faecium* 40株, *Escherichia coli* CS2 (R⁺) 51株, *Kle-*

bsiella pneumoniae 50株, *Proteus mirabilis* 48株, *Proteus vulgaris* 35株, *Providencia rettgeri* 27株, *Citrobacter freundii* 50株, *Enterobacter cloacae* 50株, *Serratia marcescens* 50株, *Pseudomonas aeruginosa* 50株, *Pseudomonas cepacia* 33株, *Xanthomonas maltophilia* 48株, *Acinetobacter calcoaceticus* 29株, *Haemophilus influenzae* 15株および *Bacteroides fragilis* 38株を使用した。なお, *E. coli* CS2 (R⁺) は順天堂大学附属病院中央検査室の臨床分離株より得られた51種類のR plasmid (ampicillin耐性の *K. pneumoniae* および *E. coli* 由来のR plasmid) を当教室で *E. coli* CS2に接合伝達したものである。

2. 使用薬剤

SY5555はサントリー株式会社から分与された原末を用いた。対照薬剤として cefpodoxime (CPDX: 三共株式会社), ceftam (CFTM: 富山化学工業株式会社), cefixime (CFIX: 藤沢薬品工業株式会社), cefaclor (CCL: 塩野義製薬株式会社), imipenem (IPM: 萬有製薬株式会社), clavulanic acid (CVA: スミスクライン・ビーチャム株式会社), sulbactam (SBT: ファイザー製薬株式会社) および flucloxacillin (MFIPC: スミスクライン・ビーチャム株式会社) を用いた。

3. 試験管内抗菌力の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は日本化学療法学会標準法²⁾に準じて以下の通りに行った。試験菌をL-brothで一夜振盪培養し、その培養液をグラム陽性菌の場合は100倍に、グラム陰性菌の場合は1,000倍に希釈したものを10⁶CFU/mlの接種菌液とした。ただし、*S. pyogenes*ではHeart Infusion (HI) broth (Difco) を、*H. influenzae*では5% Fildes extract (Oxoid) 加HI brothを、*B. fragilis*ではGAM broth (日水) をそれぞれ用いて培養した。また、*S. pneumoniae*の場合には、5%ヒツジ脱繊維血液加HI agar (栄研) で培養した菌を、660nmの波長での吸光度が0.5になるようHI brothに懸濁し、この懸濁液を100倍希釈して接種菌液とした。

2倍希釈系列の各薬剤を含むMueller Hinton medium (Difco) にマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて、菌液を接種した。なお、*Streptococcus* 属には5%ヒツジ脱繊維血液加HI agarを、*H. influenzae*には5%Fildes extract加HI agarを、*B. fragilis*にはGAM agar (日水) を試験培地として用いた。また、*B. fragilis*の嫌気培養にはGas pack (BBL) を使用した。

4. ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する結合親和性の検討

S. aureus 209P, *S. aureus* 108-1 (MRSA), *E. coli* NIHJ JC-2, *P. vulgaris* 33, *S. marcescens* 13 および *P. aeruginosa* PAO-1を試験菌として、Sprattら³⁾の方法に準じ、SY5555またはIPMと [¹⁴C]-penicillin G ([¹⁴C]-PCG: Amersham, 50μCi/μmole/ml) との競合結合実験から検討した。

10mlのL-brothで一夜振盪培養した試験菌の全量を坂口フラスコ中の200mlの同培地に接種し、37℃で4時間振盪培養することにより、対数増殖期の菌体を得た。冷却下で遠心分離により集めた菌体を10mM MgCl₂加50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で1回洗浄し、同緩衝液8mlに浮遊した後、BRANSON sonifierを用いて氷冷下で超音波破碎 (10kc, 効率20%) した。破碎物を遠心分離 (3,000×g, 10分間) した後、その上清をさらに超遠心分離 (100,000×g, 30分間) し、沈殿を得た。沈殿を同緩衝液で1回洗浄した後、少量の同緩衝液に懸濁し、その懸濁液を膜画分 (蛋白量10~15mg/ml) とした。

膜画分30μlに3μlのSY5555またはIPMを所定の濃度になるよう加え、30℃で10分間反応させた後、 [¹⁴C]-PCGを3μl加え、さらに30℃で10分間反応させた。この反応液を氷冷し、20% (w/v) sarkosylと60mg/ml PCGとの等量混合液を3μl加えた。不溶画分を遠心分離 (10,000×g, 30分間) で除いた後、上清30μlに15μlのSDS緩衝液および5μlのβ-mercaptoethanolを加え、沸騰水中で2分間加熱した。その全量を10% polyacrylamide 平板ゲル (ただし、*S. aureus*の場合は8%ゲル) にのせ、120Vで定電圧電気泳動を行った。泳動後のゲルを7%酢酸50%メタノール液で処理し、水洗した後、2,5-diphenyloxazoleに浸し、ろ紙上で乾燥させた。Kodak X-Omat フィルムを用いて-80℃で20日間fluorographyを行い、PBPsを検出した。

5. 各種β-lactamaseに対する永久不活化作用の検討

試験薬としてSY5555, IPM, CVA, SBTおよびMFIPCを用いた。Type Ic, IIb, III, IVbおよびVa β-lactamaseはそれぞれ *P. vulgaris* 33, *P. mirabilis* JY10, *E. coli* CS2/RK1, *K. pneumoniae* 42 および *E. coli* CS2/RE45より調製した。すなわち、対数増殖期後期の各菌体を超音波破碎し、その破碎物の遠心分離上清を粗酵素液とした。

β-lactamaseに対する永久不活化作用はFisherら⁴⁾の希釈法に準じて検討した。約100unitの各β-lacta-

mase粗酵素液0.1mlと10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で所定の濃度に調製した各試験薬0.1mlとを混合し、30°Cで50分間反応させた。これを β -lactamaseの活性測定用基質溶液で200倍に希釈し、さらに30°Cで30分間反応させた後、残存する酵素活性をmacroiodometry法で測定した。なお、 β -lactamaseの残存活性は薬剤無添加の対照における酵素活性を100とした相対値で表した。

6. モルモット血清補体との協力殺菌作用の検討

試験薬としてSY5555およびCCLを、試験菌株として*E. coli* NIHJ JC-2を使用した。薬剤の作用濃度は約 10^5 CFU/mlの試験菌に3時間作用させた時その生菌数を約 10^4 CFU/mlに減少させる濃度、すなわち、SY5555では0.75 μ g/ml、CCLでは1.0 μ g/mlとした。また、モルモット補体(Inter-Cell Technologies, Inc.)の添加濃度は試験菌の増殖に影響を及ぼさない最大濃度、すなわち4%とした。

L-brothで一夜培養した試験菌を同培地で10,000倍に希釈し、37°Cで1時間振盪培養した。この培養液に薬剤、モルモット補体またはその両者を添加し、さらに振盪培養を続け、1, 3, 5時間後の生菌数を定量培養により測定した。

7. マウス培養 $M\phi$ との協力殺菌作用の検討

試験菌株として*E. coli* NIHJ JC-2を使用した。3% thioglycolate medium II (和光)を腹腔内投与後4日目のマウス(BALB/c, 雌, 5~8週齢)よりperitoneal exudate cell (PEC)を採取した。1 $\times 10^5$ cells/mlのPEC 1mlをカバースリップを沈めた12穴plateの各wellに分注し、5%CO₂存在下37°Cで1時間培養した。各wellをRPMI1640培地(日水)で3回洗浄して浮遊細胞を除き、付着した細胞を $M\phi$ とした。これを10% fetal calf serum (FCS) 加RPMI1640培地でさらに一夜培養した後、F12培地(日水)で3回洗浄し、以下の実験に用いた。

10%FCS加F12培地に浮遊させた試験菌を、 $M\phi$ の50倍量すなわち約5 $\times 10^6$ cellsとなるよう各wellに接種し、さらに1/2~1/16MICのSY5555を加えた。培養5時間後、カバースリップを生理食塩水で洗浄し、メタノールで固定した後、Giemsa染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

8. ヒト腎 dehydropeptidase-I (DHP-I) に対する安定性

試験薬としてSY5555およびIPMを使用した。各薬剤0.1mg/mlまたは1.0mg/mlを含む0.5mlの50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)に、0.02unitのヒト腎DHP-I(サントリー株式会社)を含む同緩衝液10 μ lを

加え、0~180分間、37°Cで反応させた。80°C、5分間の加熱により酵素を失活させた後、反応液中の残存薬剤量を bioassay により測定した。なお、両薬剤の検定菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いた。

II. 成績

1. 各種臨床分離株に対する試験管内抗菌力

SY5555の各種臨床分離株に対する試験管内抗菌力を、Table 1および2に示す。

SY5555の*S. aureus*に対するMIC₉₀は1.56 μ g/mlであり、その値はIPMより劣るものの対照とした経口セフェム薬(CPDX, CFTM, CFIXおよびCCL)より優れていた。

また、MRSAに対してSY5555は対照の経口セフェム薬より良好な抗菌力を示し、そのMIC₅₀は6.25 μ g/mlであった。しかし、本薬のMIC₉₀はセフェム薬と同様>100 μ g/mlと高い値を示した。

CNSに対するSY5555のMIC₅₀は0.1 μ g/mlであり、試験薬中最も優れた成績であった。しかし、本菌種に対するMIC₉₀はすべての薬剤において高い値であった。

S. pyogenes および *S. pneumoniae* に対し、SY5555は ≤ 0.013 μ g/mlと良好なMIC₉₀を示し、本薬の抗菌力はIPMと同様非常に優れていた。

E. faecalis に対しては、対照の経口セフェム薬はほとんど抗菌力を示さなかったが、SY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々1.56および3.13 μ g/mlであり、本薬はIPMと同等の優れた抗菌力を示した。

E. faecium に対する本薬および対照薬の抗菌力は弱く、すべての薬剤においてMIC₅₀は>100 μ g/mlであった。

E. coli CS2 (R⁺) に対するSY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀はともに0.78 μ g/mlであった。本薬の抗菌力はCFTM, CFIXより劣るものの、CPDX, IPMとほぼ同等で、CCLより優れていた。

K. pneumoniae に対するSY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々0.39および1.56 μ g/mlであった。MIC₉₀で比較した場合、本薬はCFIX, IPMより劣るものの、CPDX, CFTMおよびCCLより優れた値を示した。

P. mirabilis に対するSY5555の抗菌力はCCL, IPMとほぼ同等であり、本薬のMIC₅₀は0.78 μ g/ml, MIC₉₀は1.56 μ g/mlであった。

P. vulgaris に対するSY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々0.78および1.56 μ g/mlであった。本薬の抗菌力はCFTM, CFIXより劣るものの、CPDX, IPMとほぼ同等であり、CCLより明らかに優れていた。

P. rettgeri に対する本薬のMIC₅₀およびMIC₉₀は

Table 1. Antibacterial activity of SY5555 against gram-positive clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> (49)	SY5555	0.05 ~ >100	0.2	1.56
	cefpodoxime	1.56 ~ >100	3.13	>100
	cefteram	1.56 ~ >100	3.13	>100
	cefixime	6.25 ~ >100	50	>100
	cefaclor	1.56 ~ >100	6.25	>100
	imipenem	$\leq 0.013 \sim 50$	0.05	0.39
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (48)	SY5555	0.2 ~ >100	6.25	>100
	cefpodoxime	1.56 ~ >100	>100	>100
	cefteram	6.25 ~ >100	100	>100
	cefixime	50 ~ >100	>100	>100
	cefaclor	50 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.025 ~ 100	1.56	50
Coagulase-negative staphylococci (41)	SY5555	$\leq 0.013 \sim >100$	0.1	>100
	cefpodoxime	0.2 ~ >100	6.25	>100
	cefteram	0.39 ~ >100	12.5	>100
	cefixime	1.56 ~ >100	50	>100
	cefaclor	0.2 ~ >100	6.25	50
	imipenem	$\leq 0.013 \sim >100$	0.2	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> (50)	SY5555	$\leq 0.013 \sim 0.39$	≤ 0.013	≤ 0.013
	cefpodoxime	$\leq 0.013 \sim 0.78$	≤ 0.013	0.05
	cefteram	$\leq 0.013 \sim 0.39$	≤ 0.013	≤ 0.013
	cefixime	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
	cefaclor	0.05 ~ 6.25	0.1	0.78
	imipenem	$\leq 0.013 \sim 0.05$	≤ 0.013	≤ 0.013
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (20)	SY5555	$\leq 0.013 \sim 0.05$	≤ 0.013	≤ 0.013
	cefpodoxime	0.025 ~ 0.2	0.05	0.05
	cefteram	$\leq 0.013 \sim 0.39$	≤ 0.013	0.025
	cefixime	0.2 ~ 0.78	0.2	0.39
	cefaclor	0.39 ~ 1.56	0.78	0.78
	imipenem	$\leq 0.013 \sim 0.025$	≤ 0.013	≤ 0.013
<i>Enterococcus faecalis</i> (38)	SY5555	0.1 ~ 3.13	1.56	3.13
	cefpodoxime	>100	>100	>100
	cefteram	0.2 ~ >100	>100	>100
	cefixime	>100	>100	>100
	cefaclor	12.5 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.05 ~ 3.13	1.56	1.56
<i>Enterococcus faecium</i> (40)	SY5555	3.13 ~ >100	>100	>100
	cefpodoxime	>100	>100	>100
	cefteram	100 ~ >100	>100	>100
	cefixime	>100	>100	>100
	cefaclor	50 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.39 ~ >100	>100	>100

Table 2-1. Antibacterial activity of SY5555 against gram-negative clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Escherichia coli</i> CS2(R ⁺) (51)	SY5555	0.2 ~ >100	0.78	0.78
	cefpodoxime	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
	cefteram	≤ 0.013 ~ 0.78	0.2	0.2
	cefixime	0.1 ~ 1.56	0.2	0.39
	cefaclor	1.56 ~ 25	3.13	12.5
	imipenem	0.1 ~ >100	0.39	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (50)	SY5555	0.1 ~ 25	0.39	1.56
	cefpodoxime	0.05 ~ 50	0.2	50
	cefteram	0.05 ~ 50	0.2	25
	cefixime	0.025 ~ 6.25	0.1	0.78
	cefaclor	0.78 ~ >100	3.13	>100
	imipenem	0.1 ~ 1.56	0.1	0.2
<i>Proteus mirabilis</i> (48)	SY5555	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	cefpodoxime	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
	cefteram	≤ 0.013 ~ 0.2	0.05	0.1
	cefixime	≤ 0.013 ~ 0.05	0.025	0.025
	cefaclor	0.78 ~ 3.13	1.56	1.56
	imipenem	0.2 ~ 3.13	1.56	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> (35)	SY5555	0.1 ~ 3.13	0.78	1.56
	cefpodoxime	0.1 ~ 12.5	0.39	1.56
	cefteram	0.05 ~ 12.5	0.2	0.2
	cefixime	0.025 ~ 0.39	0.05	0.1
	cefaclor	25 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56
<i>Providencia rettgeri</i> (27)	SY5555	0.78 ~ 25	6.25	25
	cefpodoxime	≤ 0.013 ~ 12.5	1.56	12.5
	cefteram	≤ 0.013 ~ 25	3.13	12.5
	cefixime	≤ 0.013 ~ 12.5	0.39	6.25
	cefaclor	6.25 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.39 ~ 6.25	1.56	6.25
<i>Citrobacter freundii</i> (50)	SY5555	0.39 ~ 50	1.56	25
	cefpodoxime	0.78 ~ >100	100	>100
	cefteram	0.39 ~ >100	25	100
	cefixime	0.39 ~ >100	50	>100
	cefaclor	3.13 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.2 ~ 0.78	0.2	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> (50)	SY5555	0.39 ~ 100	1.56	6.25
	cefpodoxime	0.39 ~ >100	>100	>100
	cefteram	0.1 ~ >100	50	>100
	cefixime	0.39 ~ >100	>100	>100
	cefaclor	25 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.1 ~ > 1.56	0.2	0.2

Table 2-2. Antibacterial activity of SY5555 against gram-negative clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Serratia marcescens</i> (50)	SY5555	1.56 ~ >100	6.25	100
	cefepodoxime	0.39 ~ >100	1.56	>100
	cefteram	0.39 ~ >100	0.78	>100
	cefixime	0.1 ~ >100	0.39	100
	cefaclor	50 ~ >100	>100	>100
	imipenem	0.2 ~ 12.5	0.39	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (50)	SY5555	50 ~ >100	>100	>100
	cefepodoxime	50 ~ >100	>100	>100
	cefteram	25 ~ >100	>100	>100
	cefixime	25 ~ >100	100	>100
	cefaclor	>100	>100	>100
	imipenem	0.39 ~ 25	1.56	3.13
<i>Pseudomonas cepacia</i> (33)	SY5555	3.13 ~ >100	3.13	12.5
	cefepodoxime	3.13 ~ 25	6.25	12.5
	cefteram	6.25 ~ >100	12.5	12.5
	cefixime	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	cefaclor	100 ~ >100	>100	>100
	imipenem	3.13 ~ >100	6.25	12.5
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (48)	SY5555	12.5 ~ >100	>100	>100
	cefepodoxime	>100	>100	>100
	cefteram	3.13 ~ >100	>100	>100
	cefixime	50 ~ >100	>100	>100
	cefaclor	>100	>100	>100
	imipenem	1.56 ~ >100	>100	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (29)	SY5555	1.56 ~ 25	6.25	12.5
	cefepodoxime	6.25 ~ >100	12.5	>100
	cefteram	0.39 ~ >100	50	>100
	cefixime	6.25 ~ >100	12.5	>100
	cefaclor	25 ~ >100	50	>100
	imipenem	0.1 ~ 3.13	0.39	0.78
<i>Haemophilus influenzae</i> (15)	SY5555	0.2 ~ 1.56	0.39	1.56
	cefepodoxime	0.025 ~ 0.1	0.025	0.05
	cefteram	≤ 0.013 ~ 0.025	≤ 0.013	0.025
	cefixime	≤ 0.013 ~ 0.1	0.025	0.05
	cefaclor	0.39 ~ 25	3.13	25
	imipenem	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> (38)	SY5555	0.1 ~ 6.25	1.56	3.13
	cefepodoxime	3.13 ~ >100	12.5	>100
	cefteram	1.56 ~ >100	12.5	>100
	cefixime	3.13 ~ >100	12.5	>100
	cefaclor	>100	>100	>100
	imipenem	0.1 ~ 1.56	0.39	0.78

各々6.25および25 $\mu\text{g/ml}$ であった。この値はCCLより優れていたが他の4薬剤よりは劣っていた。

C. freundii に対し、対照の経口セフェム薬の抗菌力は弱かった。一方、SY5555は本菌種に対し良好な抗菌力を示し、本薬のMIC₅₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ 、またMIC₉₀は25 $\mu\text{g/ml}$ であった。

E. cloacae においても *C. freundii* の場合と同様の結果が得られた。すなわち本菌種に対する経口セフェム薬のMIC₅₀およびMIC₉₀は非常に高い値を示したが、SY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々1.56および6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、本薬はセフェム薬より優れた抗菌力を示した。

S. marcescens に対するSY5555のMIC₅₀は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、この値はCCLより優れていたが、その他の薬剤より劣っていた。一方、本菌種に対するMIC₉₀はIPMを除くすべての薬剤において100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

P. aeruginosa に対するSY5555のMIC₅₀は>100 $\mu\text{g/ml}$ であった。本菌種はSY5555および対照の経口セフェム薬に耐性であり、IPMのみに感受性を示した。

P. cepacia に対するSY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々3.13および12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、本薬の抗菌力はCFIXより劣るものの、CPDX、CFTMおよびIPMとほぼ同等であり、CCLより優れていた。

X. maltophilia に対するMIC₅₀は、すべての薬剤において>100 $\mu\text{g/ml}$ であった。

A. calcoaceticus に対し、SY5555はIPMより劣るものの経口セフェム薬より優れた抗菌力を示し、本薬のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々6.25および12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

H. influenzae に対するSY5555のMIC₅₀は0.39 $\mu\text{g/ml}$ 、MIC₉₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。本薬の抗菌力はCPDX、CFTMおよびCFIXより劣り、IPMとほぼ同等で、CCLより優れていた。

B. fragilis に対し、SY5555のMIC₅₀およびMIC₉₀は各々1.56 $\mu\text{g/ml}$ および3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり、本薬はIPMより劣るものの良好な抗菌力を示した。一方、本菌種に対する経口セフェム薬の抗菌力は弱かった。

2. PBP_sに対する結合親和性

SY5555のPBP_sに対する結合親和性をIPMと比較検討した結果をFig. 1に示す。

S. aureus 209Pの場合、SY5555はすべてのPBP_sに対しIPMより強い親和性を示した。高分子のPBP_sのうち、本薬はPBP 3に対する親和性が最も強く、続いてPBP 1および2に対する親和性が強かった。

一方、MRSAである*S. aureus* 108-1のPBP 2'に対する本薬の結合親和性はIPMより弱かった。

E. coli NIHJ JC-2において、SY5555の親和性はPBP 2に対し最も強かった。また、本薬はPBP 1A, 1B, 3および4に対しても強い親和性を示した。IPMと比較した場合、PBP 1A, 1B, 5および6に対する親和性においては本薬がIPMより若干弱く、また、PBP 2, 3および4に対する親和性においては両剤ともほぼ同等であった。

P. vulgaris 33のPBP_sに対しては、SY5555はPBP 4に最も親和性が高く、次いで1A, 2および3の順に強い親和性を示した。また、本薬の親和性はすべてのPBP_sにおいてIPMよりも強かった。

S. marcescens 13において、SY5555はPBP 2および4への親和性が強かった。また、本薬の親和性はIPMと同等であった。

P. aeruginosa PAO-1においては、SY5555はPBP 4および5を除くすべてのPBP_sに対し強い親和性を示した。また、その親和性はIPMより強かった。

3. 各種 β -lactamaseに対する永久不活化作用

SY5555の各種 β -lactamaseに対する永久不活化作用を検討した結果をFig. 2に示す。

SY5555はType Icの β -lactamaseに対しては、約30%の酵素を永久不活化した。しかし、本薬の永久不活化作用はCVA, IPMおよびSBTより弱かった。

Type IIbおよびType IVbの β -lactamaseに対するSY5555の永久不活化作用は5~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではほとんど認められなかった。

SY5555はType IIIの β -lactamaseに対し約40%の酵素を永久不活化した。本薬の作用は10~25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではSBTより強く、IPMとほぼ同等であった。

SY5555はType Vaの β -lactamaseに対し、非常に強い永久不活化作用を示した。また、本薬の作用は試験薬中最も強かった。

4. モルモット補体との協力殺菌作用

SY5555とモルモット補体との協力殺菌作用を検討した結果をFig. 3に示す。

SY5555とモルモット補体を共存させた場合、本薬単独時よりも殺菌効果が若干向上した。しかし、その程度はCCLより小さかった。

5. マウス培養M ϕ との協力殺菌作用

マウス培養M ϕ に*E. coli* NIHJ JC-2を接種後5時間目の光学顕微鏡像をFig. 4に示す。

SY5555非存在下ではM ϕ に取り込まれた*E. coli*細胞が増殖を続け、M ϕ を破壊している像が観察された。一方、1/8~1/2MICのSY5555存在下では、*E. coli*

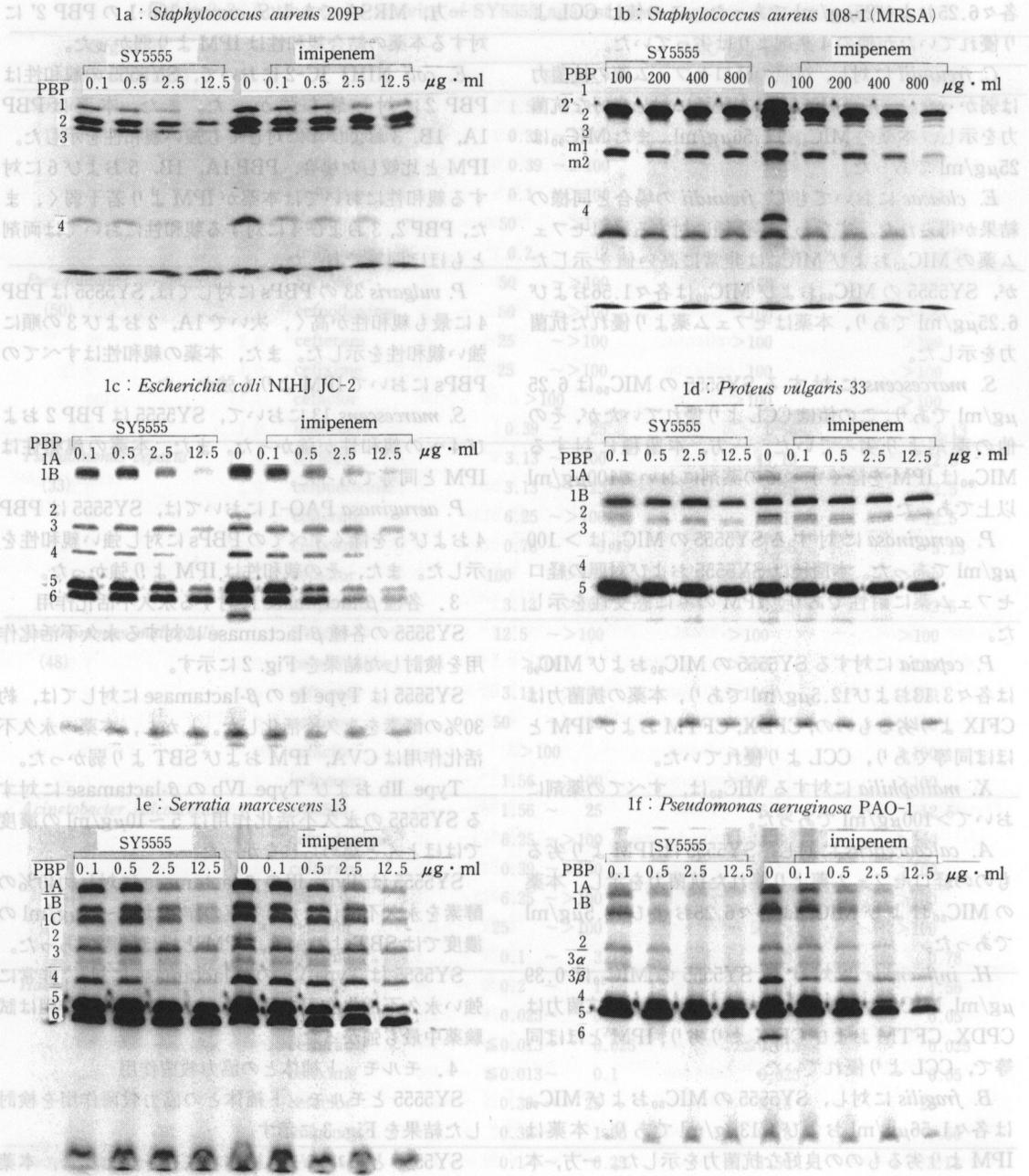


Fig. 1. Binding affinities of SY5555 to bacterial penicillin binding proteins

細胞は $M\phi$ に食菌され、5時間後においても $M\phi$ の破壊像は認められなかった。

6. SY5555 のヒト腎 DHP-I に対する安定性
SY5555 のヒト腎 DHP-I に対する安定性を検討した結果を Fig. 5 に示す。

SY5555 は 0.1mg/ml の濃度において IPM より優れた安定性を示し、180分処理後も60%以上の活性を保持していた。同様に1.0mg/ml の濃度においても、本薬は良好な安定性を示した。

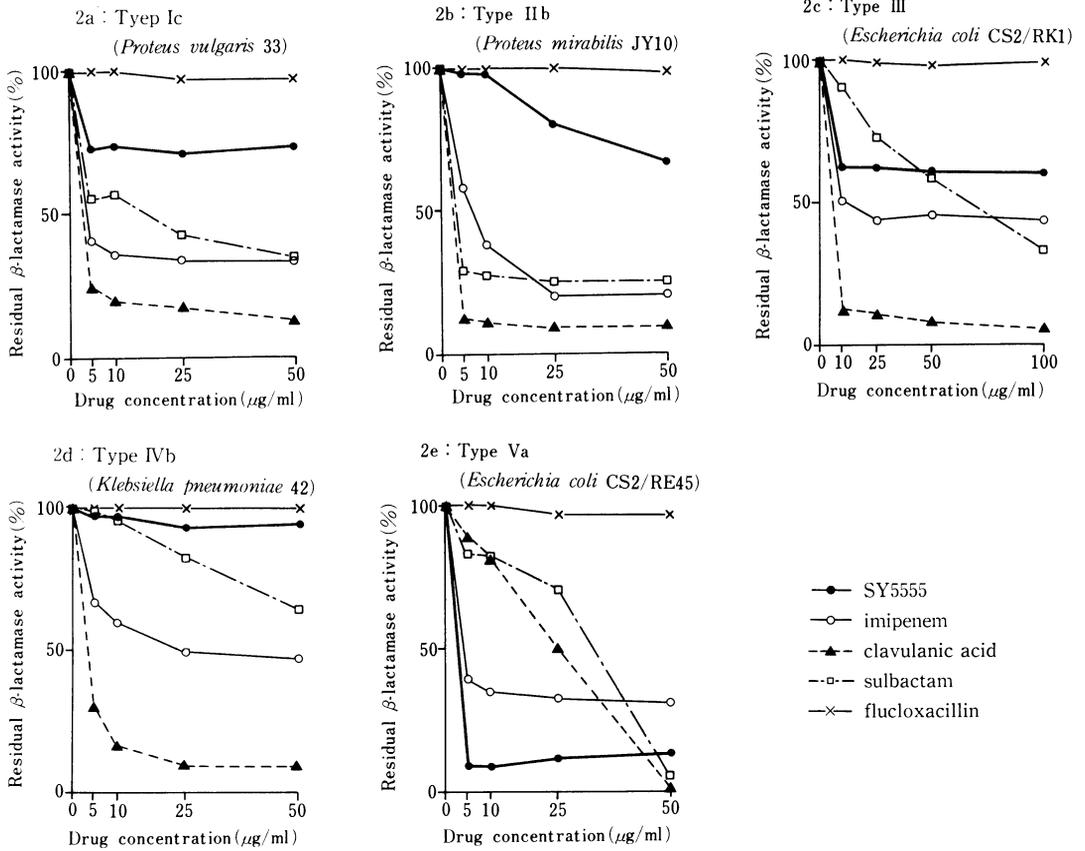
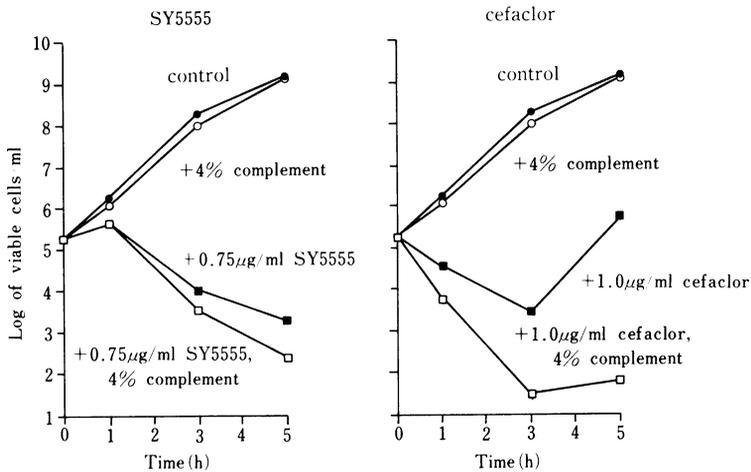


Fig. 2. Irreversible inactivation of various types of β -lactamases by SY5555



Bacteria : *Escherichia coli* NIHJ JC-2

Fig. 3. Synergy of SY5555 with guinea pig complement in the bactericidal effect

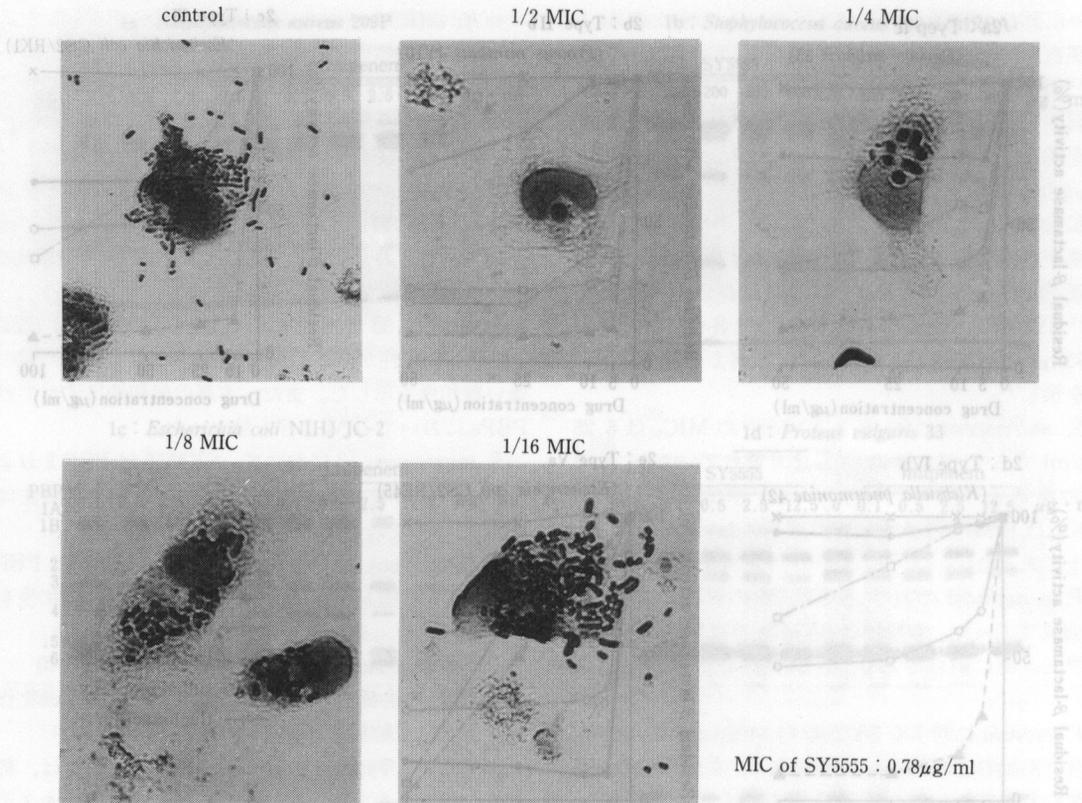


Fig. 4. Phagocytosis of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 by mouse cultured macrophages in the presence of sub MIC of SY5555

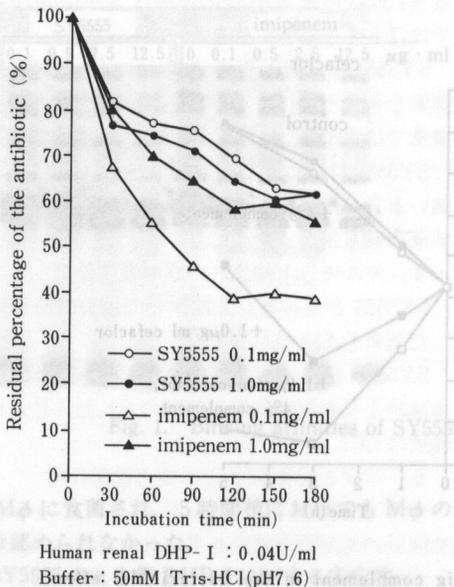


Fig. 5. Stability of SY5555 to human renal DHP-I

III. 考 察

新規経口ペネム系抗生物質 SY5555 は *E. faecium* を除くグラム陽性菌並びに *P. aeruginosa* および *X. maltophilia* を除くグラム陰性菌に対して強い抗菌力を示した。特に、SY5555 の抗菌力は *Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属および *E. faecalis* 等のグラム陽性菌並びに嫌気性菌の *B. fragilis* に対して、IPM とほぼ同等であり、経口セフェム薬より優れていた。また、グラム陰性菌のうち染色体性 β -lactamase を産生する *C. freundii* および *E. cloacae* に対し、本薬の抗菌力は IPM より弱い、経口セフェム薬より明らかに強かった。

SY5555 は *S. aureus* 209P の PBP₁ に対して IPM よりも強い親和性を示した。しかし、MRSA である *S. aureus* 108-1 の PBP_{2'} に対する本薬の親和性は IPM よりも弱かった。一方、本薬は *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌の PBP₃ に対し、IPM と同等の強い親和性を示した。一般的に、 β -ラクタム薬の抗菌力は、グラム陽性菌の場合、作用点 PBP₁ への親和性と β -

lactamase に対する安定性の2つの要因により、またグラム陰性菌の場合には、これらに外膜透過性を加えた3つの要因によりそれぞれ決定される。SY5555は各種 β -lactamase に対して安定であることが報告されており⁵⁾、今回得られた結果と併せて考察すると、本薬とIPMとの抗菌力の差は、MRSAの場合にはPBP 2' に対する親和性の差に起因し、また、グラム陰性菌、特に *P. aeruginosa* の場合は外膜透過性の差によるものと考えられる。一方、SY5555はIPMと同様、*E. coli* NIHJ JC-2のPBP 2 に対して強い親和性を示した。*E. coli* のPBP 2はムレイン合成開始位置を制御する酵素であり、カルバペネム系のIPM等の、このPBP に対し親和性の強い薬剤の作用により、*E. coli* は桿菌形態を失い球形化することが報告されている⁶⁻⁸⁾。SY5555においても、M ϕ との協力殺菌作用を検討した光学顕微鏡像 (Fig. 4) で、1/2MICの本薬の作用により球形化した *E. coli* が認められた。

グラム陰性菌の主要な薬剤耐性因子のひとつに R plasmid が挙げられる。この R plasmid 支配の Type III β -lactamase に対してSY5555はIPMとほぼ同等の永久不活化作用を示し、また同じく R plasmid 支配の Type Va β -lactamase に対して本薬は試験薬中最も強い永久不活化作用を示した。

E. coli を用いた検討において、SY5555のモルモット補体との協力殺菌作用は顕著には認められなかった。しかし、SY5555はマウス培養M ϕ とは良好な協力殺菌作用を示し、その作用は1/8MIC (0.1 μ g/ml) 以上の濃度において認められた。

生体内酵素であるDHP-Iに対して、SY5555は1.0 mg/mlの濃度ではIPMと同等の安定性を、また0.1 mg/mlの濃度ではIPMより優れた安定性をそれぞれ

示した。

以上の結果より、SY5555は幅広い抗菌スペクトラムを有し、多くの感染症の治療において優れた臨床効果が期待される。

文 献

- 1) Mitsuhashi S, Fuse A, Mikami H, Saino Y, Inoue M : Purification and characterization of human renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agent and Chemother* 32 : 587~588, 1988
- 2) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 3) Spratt B G, Pardee A B : Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254 : 516~517, 1975
- 4) Fisher J, Charnas R L, Knowles J R : Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM β -lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry* 17 : 2180~2184, 1978
- 5) 井上栄子, 三橋 進 : 新規経口ペネム薬SY5555の細菌学的検討。 *Chemotherapy* 42 (S-1) : 1~12, 1994
- 6) Spratt B G : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72 : 2999~3003, 1975
- 7) 横田 健, 丸山映子, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代 : Imipenem (MK-0787) の試験管内抗菌力、 β -lactamase不活化作用、ペニシリン結合蛋白親和性及びマウスの脳と腎ホモジネートに対する安定性。 *Chemotherapy* 33 (S-4) : 43~53, 1985
- 8) 西野武志, 中村和則, 田中真由美, 後藤季美, 大槻雅子, 谷野輝雄 : Imipenem (MK-0787) の *in vitro* 抗菌力について。 *Chemotherapy* 33 (S-4) : 74~90, 1985

SY5555, its *in vitro* antibacterial activity, binding
affinity to penicillin-binding proteins, inactivation of β -lactamases,
synergy with serum complement or cultured macrophages
in bactericidal effect and stability against DHP-I

Takeshi Yokota #, Kayoko Kanda and Eiko Tateda-Suzuki

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Munetada Haruyama, Sawako Sakanoue

Suntory Institute for Biomedical Research

Present affiliation : Juntendo Medical College of Nursing

SY5555 is a novel oral penem antibiotic with a broad antibacterial spectrum. Minimum inhibitory concentrations of SY5555 for 50% of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Haemophilus influenzae* and *Bacteroides fragilis* were calculated to be 0.2, 6.25, 0.1, ≤ 0.013 , ≤ 0.013 , 1.56, >100, 0.78, 0.39, 0.78, 0.78, 6.25, 1.56, 1.56, 6.25, >100, 3.13, >100, 6.25, 0.39 and 1.56 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Against gram-positive bacteria including *E. faecalis* and against *B. fragilis*, SY5555, similar to imipenem (IPM), demonstrated more potent antibacterial activity than the oral cepheims tested here. The activity of SY5555 against *C. freundii* and *E. cloacae* was inferior to that of IPM but was superior to that of the oral cepheims.

SY5555 showed binding affinity to penicillin-binding proteins (PBPs) of *S. aureus* 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, *P. vulgaris* 33, *S. marcescens* 13 and *P. aeruginosa* PAO-1 to almost the same extent as IPM. To PBP 2' of MRSA, however, the binding affinity of SY5555 was lower than that of IPM.

SY5555 was found to be a more potent inactivator of type Va β -lactamase than IPM, and inactivated, similar to IPM, type III β -lactamase. SY5555, however, showed weaker potency of inactivation to other types of β -lactamases than IPM.

In bactericidal effect, the synergy of SY5555 with guinea pig complement was less than that of cefaclor. SY5555, however, manifested synergy with mouse cultured macrophages (M ϕ). In the presence of higher than 1/8 MIC of SY5555, *E. coli* NIHJ JC-2 cells were engulfed by M ϕ .

The stability of SY5555 against human renal dehydropeptidase-I was superior to that of IPM.