

主論文題名

カンピロバクター属の β -ラクタム系
抗生物質に対する耐性機構

学位申請者 岡田 貢

カンピロバクター属のβ-ラクタム系
抗生物質に対する耐性機構

岡田 貢 *

Resistant Mechanisms of Campylobacter
to β-Lactam Antibiotics

Mitsugi OKADA

s. c.

(平成 2 年 11 月 26 日 受付)

緒 言

カンピロバクターは微好気性のグラム陰性螺旋状桿菌で、Vibrio fetusとして牛より初めて分離された。初期には牛や羊の流産の原因菌として知られていたが、その後、ヒト

脚注

への病原性が示唆されるようになり²⁾、わが国においても、近年カンピロバクターによる急性腸炎をはじめとして、菌血症、関節炎、髄膜炎、胆嚢炎、さらに日和見感染症が報告されている。またこの菌属の一部は口腔内常在菌でもある³⁾。現在病原性を示す菌種としては、Campylobacter jejuni、C. coli、C. fetusおよびC. laridisがある⁴⁾。細菌性食中毒のなかでは、特に小児においてC. jejuniによるものが最も多く、臨床的にも問題になっている⁵⁾。

治療としては、通常 erythromycin および tetracycline 等の抗生物質が用いられるが、この菌属は一般的に種々の感染症に広く用いられているβ-ラクタム系抗生物質の多くに耐性を示すことが知られている⁶⁾、⁷⁾。本菌のβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性のメカニズムとしては、C. jejuniおよびC. coliの臨床分離株の90%はβ-ラクタマーゼを産生することや⁸⁾、⁹⁾、β-ラクタマーゼ阻害剤

である clavulanic acid (CVA) や sulbactam (SBT) を併用した β -ラクタム系抗生物質感受性試験において感受性が高まったことから¹⁰⁾、本菌の β -ラクタム系抗生物質に対する耐性は、 β -ラクタマーゼによるものとする報告がある。

一方、Van der Auweraら¹¹⁾は β -ラクタマーゼ阻害剤による β -ラクタム系抗生物質に対する感受性に変化がなかったことから、本菌の外膜透過障害が主な耐性機構であろうとしているが、直接的な証明はなされておらず、未だ不明な点が多い。

β -ラクタム系抗生物質は、ペプチドグリカン生合成の最終段階であるペプチド鎖間の架橋形成を担う transpeptidase を阻害することにより抗菌力を発揮するとされている¹²⁾。¹⁴⁾ したがってグラム陰性菌の β -ラクタム系抗生物質に対する感受性は、1) 薬物の外膜透過性¹⁵⁾、2) β -ラクタマーゼに対する薬物の安定性、3) ペプチドグリカンの

架橋形成酵素の薬物に対する感受性によって決定される（図1）。

そこで著者は、カンピロバクターのβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性機構についてこれら3要因を中心に検討を行った。

図 1

材料並びに方法

1. 使用菌株

使用菌株は、Campylobacter jejuni JCM 2013, C. coli JCM2529 および C. fetus JCM 2527の標準株3株ならびに広島県衛生研究所より分与されたC. jejuni 臨床分離株104株を用いた。

Uridine 5'-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanine (UDP-MurNAc-

pentapeptide) の抽出には, Bacillus megaterium KMを用いた。

2. 培養条件

培地は全て Meuller Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA, 以下 MHBと略す) を用い, 5%O₂, 10%CO₂の微好気の下で, 37℃で振盪培養機(パーソナル Ace. 大洋科学工業, 東京)を用い, 振幅30mm, 200rpmの条件で培養し, 大量培養には回転振盪培養機(TA-H-RS, 12S, トーマス科学器械, 東京)を用い, 振幅70mm, 180rpmの条件下で培養した。

3. 使用抗生物質

使用した抗生物質は, 以下の通りである。

ampicillin (ABPC), benzylpenicillin (PCG, 明治製菓株式会社, 東京), amoxicillin (AMPC), clavulanic acid (CVA, ビーチャム薬品株式会社, 東京), cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業株式会社, 大阪), vancomycin (VCM, 塩野

義製薬株式会社，大阪）。

4. 抗生物質感受性試験

抗生物質感受性は，日本化学療法学会の規定に準じ，最小発育阻止濃度（Minimal Inhibitory Concentration，以下MICと略す）をもって示し，微量液体希釈法を用いた。

96ウェルのマイクロタイタープレートに抗生物質を含む培地を2倍系列希釈し，それぞれのウェルに菌数が 10^6 /mlになるように調製して接種した。培養は微好気 conditions で 37°C ，24時間行い，肉眼的に菌の発育が認められなかった最小抗生物質濃度をMICとした。

5. 外膜透過性

グラム陰性菌の外膜に，ethylenediamine tetraacetic acid（以下EDTAと略す）を作用させるとその外膜よりリポ多糖－蛋白質複合体が遊離され，薬物の透過性が向上する（図2）。この性質を利用して $1/4$ MICおよび $1/2$ MIC濃度のEDTA存在下で4項と同様の方法でそれぞれ各抗生物質のMICを求め，未添加の

MICと比較した。

図 2

6. β -ラクタマーゼ活性の測定

β -ラクタマーゼの産生の有無を調べるために、Cefinase disk (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA) を用いた。

β -ラクタマーゼ活性の定量試験はマイクロヨード法¹⁶⁾を用いて検討した。1/4MIC濃度のPCGで誘導して培養した対数増殖期の菌を0.1M phosphate buffer (pH 7.0) で懸濁後、菌体をSupersonic vibrator (UR 150, 富永製作所, 東京) で破壊し、12,000×g, 30分間、4℃で遠心分離後、その上清を β -ラクタマーゼの粗酵素標品とした。

0.2mMの基質(抗生物質)0.1ml, 50mMのphosphate buffer (pH 7.0) 0.8mlおよび0.1mlの調製した粗酵素液(蛋白量5mg/ml)とを30℃にて10分間反応させた後、0.15Mのタングステン酸ナトリウム1mlで反応を停止し、

ヨードデンプン溶液を 3ml 加えて室温で 20 分間放置後、波長 595nm の吸収を測定した。

反応前後での optical density (以下 O.D. と略す) の差を $\Delta O.D.$ 、および活性量は単位時間に分解された基質量とし、係数 $\times \Delta O.D. / F / V /$ 反応時間 (分) にて算出した。係数は $\Delta O.D. = 1.0$ に相当するヨウ素デンプン試液中の I_2 濃度 ($\mu mol / 3ml$)、V は反応液に加えた酵素試料液量 (ml)、F は分解基質のヨウ素 (I_2) 消費当量を示す。各抗生物質の F 値は ABPC; 5.43, AMPC; 7.00, CEZ; 5.60 および CZX; 21.0 である。基質 $1 \mu mol$ を 1 分間で分解する酵素量を 1 unit とした。酵素蛋白量は Lowry 法¹⁷⁾によって求めた。

さらに β -ラクタマーゼ阻害剤である CVA を用いて β -ラクタマーゼの耐性への関与を検討した。1/2MIC 濃度の CVA 存在下で、4 項と同様の方法で各抗生物質の MIC を求めた。

7. UDP-MurNAc-pentapeptide の精製

peptidoglycan の前駆体である UDP-MurNAc-

pentapeptideは Lugtenbergらの方法^{18), 19)}に準じ調製した。Bacillus megaterium KMを trypticase soybroth (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA) 9 ℓ に接種後, 37℃ で振盪培養し, 対数増殖中期に vancomycinを最終濃度が 20mg/mlになるよう添加後, さらに60分間振盪培養を行った。遠心分離 (8,900 × g, 15分間, 4℃) にて集菌し生理的食塩水で洗浄した後, 菌体を60mlの水冷した蒸留水に懸濁させ, trichloroacetic acid (以下 TCAと略す) を最終濃度が10%になるように加え30分間攪拌した。懸濁液を遠心分離 (25,000 × g, 10分間) して, 沈渣には同様のTCAによる処理をさらに2度繰り返した後, それぞれの上清を集めて同量の diethyletherにてTCAの除去を3度施した。水層を1N NaOHで中和後, 残留diethyletherを流気化にて除去し, さらに減圧下で試料容量を約 5mlにした。

得られた試料は, Sephadex G-10 (30 cm ×

40cm) を用い蒸留水を溶媒として分画を行った。溶出液には2つの紫外線吸収のピークがみられ、各々紫外線吸収画分に対するニンヒドリン反応およびN-アセチルアミノ糖の検出から、1番目の画分をさらにDowex AG1イオン交換クロマトグラフィー(1cm × 10cm)を用い、0.01M HCl中のNaClが0~0.3Mの濃度勾配を有する溶媒で溶出させた。溶出液の2つの紫外線吸収画分のうち、ニンヒドリン反応およびN-アセチルアミノ糖陽性の画分をさらにもう一度Sephadex G-10によるゲル濾過を行い精製した。ゲル濾過で得られた溶出液はただ1つの紫外線吸収のピークを有し、この画分のアミノ酸分析を行い、UDP-MurNAc-pentapeptideであることを確認して以下の実験に用いた。

8. ether処理菌体の調製

ether treated bacterial cell (以下 ETB cellと略す) は、Vosbergらの方法²⁰⁾に従い調製した。各被験菌株を500mlのMHB中で振盪

培養し、対数増殖期に集菌・洗浄した菌体を 80mM KCl, 40mM tris (hydroxymethyl) aminomethanehydrochloride (tris- HCl) buffer (pH 7.5) , 7mM MgCl₂, 2mM ethylene glycoltetraacetic acid, 0.4mM spermidine および 0.5M Sucrose を含む 5ml の溶液に懸濁させた。この菌液に同量の ether を 0℃ で加えて 1 分間 ゆっくりと攪拌した後 ether 層を除き、7,000× g で 8 分間遠心分離した沈査を ether 処理菌体 (ETB cell) とし、架橋ペプチドグリカン生合成に用いた。

9. 架橋ペプチドグリカン生合成

ペプチドグリカン架橋形成反応は ETB cell を粗酵素源として Mirelman らの方法²¹⁾を一部改変して行った。

ETB cell を粗酵素源とした架橋ペプチドグリカン生合成は、その前駆体である UDP-MurNAc-pentapeptide と ¹⁴C でラベルした Uridine-5'-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) を基質とし、50mM tris-HCl

buffer (pH 7.5) に懸濁したそれぞれの ETB cell を粗酵素として架橋ペプチドグリカンの生合成を行った。

UDP-MurNAc-pentapeptide は 7 の項に示した方法で抽出，精製したものを用い，UDP-GlcNAc は，市販の UDP- $[^{14}\text{C}]$ GlcNAc (11 GBq/mmol, NEN, Boston, MA, USA) を使用した。1mM UDP-MurNAc-pentapeptide 10 μ l, 34.4 μ M UDP- $[^{14}\text{C}]$ GlcNAc 5 μ l, 1M tris-HCl buffer (pH 7.5) 10 μ l, 1M NH_4Cl 10 μ l, 1M MgCl_2 5 μ l, 20mM 2-mercaptoethanol 5 μ l および精製水 55 μ l に ETB cell 100 μ l を加え，37°C で 30, 60, 90 および 120 分間，それぞれ反応させた。反応後，1ml の 4% Sodium dodecyl sulphate (以下 SDS と略す) を加え，30 分間，80°C 以上で加熱し反応を停止させた。

反応液は冷却後，SDS 不溶性画分をポアサイズ 0.22 μ m の membrane filter (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) 上に集め，2% SDS と精製水で洗った。この不溶性ペプチドグリ

カンの付着した Membrane filter を乾燥し，
10ml のトルエンシンチレーターを用いて，液
体シンチレーションカウンター（LSC-903，
ALOKA，東京）でその放射活性を測定した。

10. 抗生物質による架橋ペプチドグリ カン合成阻害の測定

9の項の反応液中の $55\mu\text{l}$ の精製水を $20\mu\text{l}$
の0，0.1，1.0，10，100および $1,000\mu\text{g/ml}$
各濃度（最終濃度は，0，0.01，0.1，1.0，
10および $100\mu\text{g/ml}$ ）の各抗生物質および 35
 μl の精製水に変え，結果の5の項の経時的
測定の結果により，C. jejuniは60分間，C.
coliおよびC. fetusは120分間反応させた。反
応後，同様にSDS不溶性画分の放射活性を測
定した。抗生物質を含まない反応系の活性値
を100とし，その値に対する活性値の減少率
（%）をもって阻害率とした。

11. 細胞質膜画分の調製

膜画分の調製は，Sprattらの方法²²⁾を用
いた。Meuller Hinton brothに菌を接種し，

37℃， 微好気条件下で対数増殖期まで培養した。 10mM phosphate buffer (pH 7.0) で菌体を洗浄後， 氷冷下で菌体を超音波で破壊し， 未破壊の菌体を遠心分離 (8,000×g, 10分間) によって除去した。 その上清を100,000×g, 30分間， 4℃ で2度超遠心し， 沈査を10mM MgCl₂を含む50mM phosphate buffer (pH7.0) に懸濁して蛋白量が10mg/mlになるように調製した。 使用するまで-80℃で保存した。

1 2. ペニシリン結合蛋白の検出と抗生物質との親和性

ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, 以下PBPと略す) の検出は以下の方法を用いて行った。 50μlの膜画分と5μlの³⁵Sで標識したPCG (specific activity, 114 GBq/mmol, NEN, Boston, MA, USA) とを最終濃度30mMになるように加え， 30℃， 10分間反応させた。 5μlの50mg/mlの非標識PCGを含む10% (w/v) Sarcosylで反応を停止し， 室温で20分放置後， 10,000×g, 20℃， 30分間遠

心分離した。上清に25 μ lのsample buffer (0.2M tris-HCl (pH 6.8) ; 3% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol; 0.002% bromophenol blue) と10 μ lの2-mercaptoethanolを加え、3分間加熱処理したものをPBPs泳動サンプルとした。

SDS電気泳動はWeberとOsbornらの方法²³⁾を用い、7.5%のポリアクリルアミドゲルで泳動後、2,5-Diphenyloxazoleで増感し、デュポン社製MRF32フィルムで2週間オートラジオグラフィーしてPBPsを検出した。

ABPC, AMPC, CEZおよびCZXとの競合実験は、³⁵S]PCGと反応させる前に膜画分を5 μ lの抗生物質を10分間反応させることにより行った。

結 果

1. 抗生物質感受性

表1に Campylobacter jejuni, C. coliお

よび *C. fetus* 標準株 3 株の使用抗生物質に対する感受性を示し、図 3 に *C. jejuni* 臨床分離株の MIC を累積 % 分布で示す。標準株 3 株すべて ABPC および CEZ に対して高度耐性を示し、AMPC および CZX に対しては感受性を示した。

C. jejuni 臨床分離株も標準株と同様に、ABPC および CEZ に対して耐性を示し、50% および 90% の細菌の発育を阻止する濃度、MIC₅₀ および MIC₉₀ は、それぞれ ABPC では、200 および 200、CEZ では、1600 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ であった。

一方、AMPC および CZX に対して感受性を示し、AMPC の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 3.13 および 6.25、CZX の MIC₅₀ および MIC₉₀ は、それぞれ 6.25 および 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

表 1

図 3

2. 外膜透過性

表 2 に 1/4 MIC および 1/2 MIC 濃度の EDTA を添加したときの標準株の各抗生物質に対する

MICと、表 3 に $1/2$ MIC 濃度の EDTA を添加したときの各抗生物質に対する MIC の変化した臨床分離株の菌株数を示す。EDTA 存在下で、標準株いずれの菌種においても、それぞれの抗生物質の MIC に全く変化は認められなかった。臨床分離株では EDTA 存在下で、各抗生物質の MIC に変化がなかったか、あるいは半分に減少した菌株しか認められなかった。

したがっていずれの抗生物質に対しても標準株、臨床分離株共にすべての菌株において相乗効果を示すような MIC の減少は認められなかった。

| |
|-----|
| 表 2 |
|-----|

| |
|-----|
| 表 3 |
|-----|

3. クラブラン酸添加による抗生物質の感受性の変化

表 4 に β -ラクタマーゼ阻害剤である CVA を $1/2$ MIC 濃度添加したときの標準株の各抗生物質に対する MIC と、表 5 に $1/2$ MIC 濃度の CVA

を添加したときの各抗生物質に対するMICの
変化した臨床分離株の菌株数を示す。標準株
3株のCVA存在下で各抗生物質のMICは、CVA
非存在下に比べ変化がないかまたは半分に減
少しただけであった。臨床分離株でもCVA存
在下で、CVA非存在下に比べMICに変化か
がないか、あるいは半分に減少したものがほと
んどを占め、相乗効果を示したのはAMPICに
対して1株のみであった。

したがって、いずれの抗生物質に対しても
相乗効果を示す菌株は、標準株においては認
められず、臨床分離株においては1株を除
いて認められなかった。

| |
|-----|
| 表 4 |
|-----|

| |
|-----|
| 表 5 |
|-----|

4. β -ラクタマーゼ活性

セフィナーゼディスクによる β -ラクタマ
ーゼ活性定性の試験では、標準株においてC.
jejuniは陰性で、C. coliおよびC. fetusは陽

性であった。また C. jejuni 臨床分離株では 70% が陽性であった。しかし、カンピロバクター標準株の β -ラクタマーゼ活性の定量試験では、いずれの菌株においてもそれぞれの抗生物質に対する活性は、0.001 unit/mg protein 以下であった（表 6）。

表 6

5. エーテル処理菌体における架橋ペプチドグリカンの生合成

C. jejuni, C. coli および C. fetus 標準株 3 株の ETB cell を粗酵素源とし、基質としてペプチドグリカンの前駆体である UDP-MurNAc-pentapeptide と UDP-GlcNAc とを反応させると、いずれの菌株も架橋ペプチドグリカン生合成反応が起こり、経時的に SDS 不溶性ペプチドグリカン（架橋ペプチドグリカン）量が増加した。図 4 に架橋ペプチドグリカン生合成の経時的変化を示す。いずれの菌種においても架橋ペプチドグリカンは、反応開始より時間

とともに直線的に増加し，C. jejuniは90分，C. coliおよびC. fetusは180分まで生成量は経時的に増加した。

この結果より，抗生物質の架橋ペプチドグリカン生合成に及ぼす影響を調べる実験では，反応時間をそれぞれC. jejuniでは60分間，C. coliおよびC. fetusでは120分間とした。

図 4

6. 架橋ペプチドグリカン生合成に及ぼす抗生物質の影響

図5は，結果5で示した反応系に種々の濃度の抗生物質を添加して，各濃度での架橋ペプチドグリカン生合成量を未添加のそれと比べ，それぞれの阻害度を%で示したものである。いずれの菌株においてもETB cellによる架橋ペプチドグリカン生合成は，各抗生物質添加により阻害されたが，ABPCおよびCEZはAMPICおよびCZXに比べて架橋ペプチドグリカン生合成阻害に対する抗生物質の濃度は高く，

その阻害効果はかなり低かった。

表 7 に C. jejuni 臨床分離株の架橋ペプチドグリカン生合成に及ぼす抗生物質の影響を示す。C. jejuni 標準株が感受性を示した AMPC および CZX に対して、C. jejuni 臨床分離株 C. jejuni Lior 1 および C. jejuni WG215 は耐性を示した。これらの菌株を用いて臨床分離株 C. jejuni Lior 5 を対照とし、架橋ペプチドグリカン生合成の阻害実験を行った。いずれの菌株においても、抗生物質のペプチドグリカン架橋酵素に対する阻害程度は、耐性を示した C. jejuni Lior 1 および C. jejuni WG215 において C. jejuni Lior 5 より低く、MIC の間に相関が認められた。

図 5

表 7

7. ペニシリン結合蛋白および競合阻害

図 6 に標準株 3 株の PBP s のプロフィールを示す。C. jejuni の膜面分では 4 つの PBP s のバ

ンドが認められ，C. coliおよびC. fetusは5つのバンドが認められ，それぞれのPBPsの分子量は60K～70Kであった。

図7にC. jejuni JCM2013の各種抗生物質による競合阻害実験の結果を示す。

AMPCおよびCZX添加によりPBPsのいずれのバンドも抗生物質濃度の上昇とともに消失しているのに対し，ABPCおよびCEZでは，AMPCおよびCZXに比べると高い濃度の抗生物質でも消失しないバンドが存在した。

したがってC. jejuniのPBPsは，AMPCおよびCZXに対して高い親和性を示したが，ABPCおよびCEZに対しての親和性は低かった。

図 6

図 7

考 察

1947年にカンピロバクターのヒトへの病原性が示唆されて以来²⁾、わが国でも本菌による腸炎が報告され、また分離および培養方法も確立されてきた。そのため、本菌による腸炎の検出は年々増え続け、集団下痢の発生も珍しくなくなった。また、腸炎以外にも菌血症、敗血症、髄膜炎、胆嚢炎、関節炎および日和見感染症などの種々の疾患が報告されている³⁾。現在、本菌による腸炎は、細菌性食中毒の中では最も多く発生しており、臨床的にも問題になっている。特に、小児において *C. jejuni* による下痢症の報告は多い。症状は軽度なものから敗血症まで進行するような重篤なものまで様々である⁵⁾。その治療としては抗生物質が用いられるが、菌が同定されるまでに48時間以上必要なので、それまでカンピロバクターであると同定できず、本菌が耐性を示すβ-ラクタム系抗生物質を投与することもある。したがって、カンピロバクターが原因菌であると同定されるまで症状は改善

されない可能性がある。また、 β -ラクタム系以外の抗生物質の使用も行われるが、kanamycinおよびtetracyclineに対して耐性化が進んでいるという報告もあり²⁴⁾、²⁵⁾、有効な抗生物質の選択が望まれる。

カンピロバクターはグラム陰性菌特有の外膜をその最外層に有し、これが β -ラクタム系をはじめとする種々の抗生物質のペリプラスムへの透過障害となっている。外膜と内膜(細胞質膜)の間のペリプラスムには β -ラクタマーゼが局在しており、外膜を透過し得た抗生物質も、この β -ラクタマーゼにより分解を受けると抗菌力を発揮できない。 β -ラクタマーゼによる分解を免れた抗生物質はさらに内膜上に存在する標的酵素と結合することにより、初めて抗菌力を示すことができる¹²⁾ - ¹⁴⁾。そこで、カンピロバクターの β -ラクタム系抗生物質に対する耐性機構を明らかにする目的で、薬物の外膜透過性、 β -ラクタマーゼに対する薬物の安定性およびペ

プチドグリカンの架橋形成酵素の薬物に対する感受性の3要因を中心に検討した。

1. β -ラクタム系抗生物質に対する感受性

C. jejuni JCM2013, C. coli JCM2529およびC. fetus JCM2527の標準株3株では, ABPCおよびCEZに対し高度耐性を示し, AMPCおよびCZXには感受性を示した。ABPC耐性は以前より報告されており^{5) - 9)}, またCEZ耐性に関しても1986年に, その耐性率(MIC $>$ 16 μ g/ml)は100%と報告されており⁸⁾, 今回の感受性試験でも同様な結果を得た。

2. 外膜透過障害

グラム陰性菌の外膜は, 抗生物質に対する透過障害として耐性の大きな要因であることが知られている^{26) - 28)}。この外膜は, リポ多糖, リポ蛋白質, 磷脂質および数種のタンパク質などから構成されており, β -ラクタム系抗生物質はporinと呼ばれるタンパク質から構成される透過孔を透過して外膜を通過

する²⁹⁾⁻³¹⁾。このような外膜の構成成分は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの2価の陽イオンを介して互いに結合し、2価の陽イオンのキレーターであるEDTAを作用させると外膜およびporinの一部が遊離して、外膜の透過性に変化が生じることが知られている^{32), 33)}。このような状態になると、外膜より透過障害を受けていた物質は容易にペリプラスム内へ入ることができるようになる³³⁾⁻³⁵⁾(図2)。Van der Auweraらは¹¹⁾、 β -ラクタム系抗生物質耐性が外膜透過障害によると推論しているが、本研究では、EDTAにより外膜透過性を向上させてMICの変化を検討した結果から、 β -ラクタム系抗生物質の外膜透過障害は認められなかった。さらに、EDTAを用いたこの方法の妥当性を検討するため、 β -ラクタム系以外の抗生物質を用いて検討した。データには示していないが、細胞壁合成阻害剤のfosfomycin、蛋白質合成阻害剤であるtetracyclineならびにマクロライド系抗生物質のrokita-

mycin³⁶⁾, erythromycin および clindamycin
では EDTA の添加により MIC に大きな減少が認められたため、この方法は妥当と考えられる。

一般にグラム陰性菌において抗生物質の外膜透過障害は少なからず存在するが³⁷⁾、カンピロバクターにおいてβ-ラクタム系抗生物質に対して外膜透過障害が認められないことは極めて興味深い。

3. β-ラクタマーゼによるβ-ラクタム系抗生物質の分解

β-ラクタマーゼは、グラム陰性菌ではペリプラスム内に局在しており、耐性の大きな担い手であることはよく知られている。これはβ-ラクタム環がβ-ラクタマーゼにより開環されて不活化されることによる(図8)。

Lariviere⁸⁾ および Fliegelman⁹⁾ らは、C. jejuni および C. coli の臨床分離株の90%は、β-ラクタマーゼを産生していると報告している。しかしその活性の検討は定性試験のみで、それがどの程度抗生物質の耐性に影響し

ているのかの報告はない。また、 β -ラクタマーゼ阻害剤（CVAおよびSBT）の添加により、感受性が上昇したとしているが¹⁰⁾、これらの阻害剤は菌株のMICに対応した濃度の阻害剤を添加していない。本研究では、阻害剤の各菌株のMICに対応してその1/2MIC濃度のCVAを添加し、相乗効果の有無により耐性への関与を検討した。セフィナーゼディスク法により陽性を示した株は臨床分離株の70%であったが、 β -ラクタマーゼ阻害剤である1/2MICおよび1/4MIC濃度のCVAを添加して、各抗生物質のMICの変化を検討した結果、相乗効果を示すような株は1株を除いて認められなかった。その菌株はAMPICに対して相乗効果を示したが、耐性を示すABPCに対しては相乗効果を示さなかった。また、標準株においてミクロヨード法による β -ラクタマーゼ活性の定量試験では、いずれの菌種においてもそれぞれの活性は非常に低く、 β -ラクタマーゼ産生菌の値に比べると無視できる程度であった。

以上の結果から β -ラクタマーゼの産生が耐性に関与しているようには考えられない。

4. β -ラクタム系抗生物質の標的酵素阻害

細菌細胞の特有な構築物であるペプチドグリカン³⁸⁾は細胞表層を被う網目状構造をした巨大分子で、細胞特有の形態維持に重要な役割を果たしている。 β -ラクタム系抗生物質はこのペプチドグリカン生合成の最終段階である架橋形成を阻害する。この架橋形成にあずかる transpeptidase は、D-alanine carboxypeptidase 等と共に PBPs と呼ばれる一群のタンパク質として細胞質膜上に存在し、 β -ラクタム系抗生物質の標的酵素である^{38) - 40)}。

カンピロバクターのペプチドグリカンは大腸菌と同じく Dap 型である⁴¹⁾ (図 9) と報告されており、用いた前駆体により確かに架橋形成が行われた。

カンピロバクターの β -ラクタム系抗生物質に対する感受性は、標準株、臨床分離株共

に ABPC および CEZ に対しては低感受性であり、AMPC および CZX に対しては感受性を示した。架橋ペプチドグリカン生合成を 50% 阻害する抗生物質の濃度 (ID₅₀) は ABPC および CEZ では高く、AMPC および CZX では低く、感受性と酵素阻害の間に相関が見られた。

また、PBPs の抗生物質に対する親和性について標識した PCG との競合阻害実験の結果から、ABPC および CEZ に対しては親和性が低く、AMPC および CZX に対しては親和性が高いことが明らかとなった。このことは PBPs の ABPC および CEZ に対する低親和性によって耐性が生じているということを示唆している。またこの結果が、ETB cell によるペプチドグリカン架橋形成阻害実験の結果をよく説明している。

PBPs の抗生物質に対する親和性の変化による耐性は、グラム陽性菌ではメチシリン耐性の黄色ブドウ球菌、肺炎双球菌および Clostridium perfringens など知られており、グ

ラム陰性菌では，淋菌，大腸菌および緑膿菌などでの報告がある^{4 2)}。しかし，グラム陰性菌においてPBP_sの親和性の低下のみが耐性の原因であるという報告はない。

以上の結果より，カンピロバクターのβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性機構は，外膜透過障害やβ-ラクタマーゼによる薬物の不活化ではなく，標的酵素の低親和性であることが明らかとなった。

図 9

総 括

カンピロバクターのβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性機構を明らかにする目的で，薬物の外膜透過性，β-ラクタマーゼ活性，および標的酵素であるPBP_sに対する親和性について，ABPC，AMPC，CEZおよびCZXを用いて

比較検討し，以下の結果を得た。

1. カンピロバクターは標準株，臨床分離株共に AMPC および CZX にはある程度感受性を示したが， ABPC および CEZ には耐性を示した。

2. すべての被験菌において， β -ラクタム系抗生物質に対する外膜透過障害は認められなかった。

3. β -ラクタマーゼ活性定性試験では，陽性を示す株もあったが， β -ラクタマーゼ活性定量試験および阻害剤を用いた実験では無視できる程度の活性しか有していなかった。

4. β -ラクタム系抗生物質の架橋ペプチドグリカン生合成に対する阻害効果は ABPC および CEZ では低く， AMPC および CZX では高かった。

5. カンピロバクター標準株の PBPs は分子量 60～70K の間に C. jejuni JCM2013 では 4 つ， C. coli JCM2529 および C. fetus JCM2527 では 5 つのバンドが認められた。 C. jejuni

JCM2013 における PBP_s の β -ラクタム系抗生物質に対する親和性は、ABPC および CEZ では低く、AMPC および CZX では高かった。

以上の結果より、カンピロバクター属の β -ラクタム系抗生物質に対する耐性は、従来より報告されている外膜透過障害や β -ラクタマーゼによるよりも、標的酵素であるペプチドグリカンの架橋形成にあずかる *trans-peptidase* の低親和性が耐性の主な要因であることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究のご指導と本論文の御校閲を賜った本学小児歯科学講座長坂信夫教授ならびに本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に衷心より感謝の意を表します。また、御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座辻本明教授に深謝します。さらに、研究遂行上および本論文作製上御助言を戴いた本学口

腔細菌学講座三宅洋一郎助教授および菅井基
行助手に厚く御礼を申し上げます。菌の使用
に際し快く菌株を分与して頂いた広島県衛生
研究所佐々木実己子女史に深く感謝します。
最後に、研究遂行上惜しみない御協力を頂い
た小児歯科学講座および口腔細菌学講座教室
員各位に深く感謝します。

参 考 文 献

- 1) Walker, R. I. , Caldwell, M. B. , Lee, E. C. ,
Guerry, P., Trust, T.J. and Ruiz-Palacios, G.
M. (1986) : Pathophysiology of Campylobacter
enteritis. Microbiological Reviews. 50, 81-94
- 2) Vinzent, R. , Dumas, J. and Picard N. (1947):
Septicemie grave au cours de la grossesse due a
un vibrion: avortement consecutif. Bull. Acad.
Natl. Med., 131, 90-92.
- 3) Smibert, R.M. (1984): Genus Campylobacter Sebald
and Veron 1963, 907^{AL}, Bergey's Manual of Sys-
tematic Bacteriology., vol. 1, 111-118. (Krieg,
N. R. and Holt, J. G., editors). Williams and
Wilkins press, London.
- 4) 本田武司, 三宅真実 (1986) : Campylobacterの病原
因子. メディヤサークル 31, 385-390, 昭和61.
- 5) 佐々一枝, 杉本清, 内山百合子 (1983) : Campylo-
bacter jejuni/coli の MIC測定に関する検討. The
Japanese Journal of Antibiotics, XXXVI -10,

2757-2762.

- 6) Vanhoof, R., Vanderlinden, M. P., Dierickx, R., Lauwers, S., Yourassowsky, E. and Butzler, J. P. (1978) : Susceptibility of Campylobacter fetus subsp. jejuni to twenty-nine antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 14, 553-556.
- 7) Walder, M. (1979) : Susceptibility of Campylobacter fetus subsp. jejuni to twenty antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 37-39.
- 8) Lariviere, L.A., Gaureau C.L. and Turgeon, F.F. (1986) : Susceptibility of clinical isolates of Campylobacter jejuni to twenty-five antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother., 18, 681-685.
- 9) Fliegelman, R. M., Petrak, R.M., Goodman, L.J., Gordon, J. S., Trenholme, M. and Kaplan, R.L. (1985) : Comparative in vitro activities of twelve antimicrobial agents against Campylo-

- bacter species. Antimicrob. Agents Chemother.,
27, 429-430.
- 10) Gaudreau, C.L., Lariviere, L.A., Lauzer, J.C.
and Turgeon, F.F. (1987): Effect of clavulanic
acid on susceptibilty of Campylobacter jejuni
and Campylobacter coli to eight β -lactam
antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother.,
31, 940-942.
- 11) Van der Auwera, P. and Scorneaux, B. (1985):
In vitro susceptibility of Campylobacter je-
juni to 27 antimicrobial agents and various
combinations of β -lactams with clavulanic
acid or sulbactam. Antimicrob. Agents Chemo-
ther., 28, 37-40.
- 12) Izaki, K., Matsubishi, M. and Strominger, J.L.
(1966) : Glycopeptide transpeptidase and D-
alanine carboxypeptidase: Penicillin-sensitive
enzymatic reactions. Proc. Natl. Acad. Sci.,
USA, 55, 656-663
- 13) Izaki, K., Matsubishi, M. and Strominger, J.L.

- (1968) : Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls X III. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: Penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of Escherichia coli. J. Biol. Chem., 243, 3180-3192.
- 14) Strominger, J. L. , Blumberg, P. M., Suginaka, H., Umbreit, J. and Wickus, G. G. (1971): How penicillin kills bacteria : Progress and problems. Proc. R. Soc. Lond. B., 179, 369-383.
- 15) Nikaido, H. and T. Nakae. (1979) : The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20, 163-250.
- 16) Novick, R. P. (1962) : Micro-iodometric assay for penicillinase. Biochem. J., 83, 236-240.
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 18) Lugtenberg, E.J.J., van Schijndel-van Dam, A.

and van Bellegem, T. H. M. (1971): In vivo and in vitro action of new antibiotics interfering with the utilization of N-acetyl-glucosamine-N-acetyl-muramyl-pentapeptide. J. Bacteriol., 108, 20-29.

- 19) Moore, B. A. , Jevons, S. and Brammer, K. W. (1979) : Peptidoglycan transpeptidase inhibition in Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli by penicillins and cephalosporins. Anti-microb. Agents Chemother., 15, 513-517.
- 20) Vosberg, H. P. and Hoffman-Berling, H. (1971): DNA syntesis in nucleotide-permeable Escherichia coli cells. I. Preparation and properties of ether-treated cells. J. Mol. Biol., 58, 739-753.
- 21) Mirelman, D., Yashouv-Gan, Y. and Schwarz, U. (1976): Peptidoglycan biosynthesis in a thermosensitive division mutant of Escherichia coli. Biochemistry., 15, 1781-1790.
- 22) Spratt, B. G. (1977): Properties of the peni-

- cillin-binding proteins of Escherichia coli K12. Eur. J. Biochem., 72, 341-352.
- 23) Weber, K. and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 24) Sagara, H., Mochizuki, A., Okamura N. and Nakaya R. (1987): Antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 31, 713-719.
- 25) Papadopoulou, B. and Courvalin, P. (1988) : Dispersal in Campylobacter spp. of aphA-3, a kanamycin resistance determinant from gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother., 32, 945-948.
- 26) Suginaka, H., Kotani, S., Tanaka, N. and Ogawa, M. (1980): 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.
- 27) Suginaka, H., Ichikawa, A. and Kotani, S. (1974): 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.
- 28) Suginaka, H., Ichikawa, A. and Kotani, S. (1975): Penicillin-resistant mechanisms on Pseudomonas aeruginosa: Binding of penicillin to Pseudomonas aeruginosa KM338. Antimicrob. Agents Chemother., 7, 629-635.
- 29) Leive, L. (1974): The barrier function of the gram-negative envelope. Ann. N.Y. Acad. Sci., 235, 109-129.
- 30) Nakae, T., (1976): Outer membrane of Salmonella. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. J. Biol. Chem., 251, 2176-2178.

- 31) Nakae, T. (1976): Identification of the outer membrane of E.coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 877-884.
- 32) Weiser, R., Asscher, A.W. and Wimpenny, J. (1968): In vitro reversal of antibiotic resistance by ethylenediamine tetraacetic acid. Nature (London) 219, 1365-1366.
- 33) Hamilton-Miller, J.M.T. (1965): Effect of EDTA upon bacterial permeability to bezympenicillin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 688-691.
- 34) Rogers, S.W., Gilleland, H.E. and Eagon, R.G. (1969): Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of Pseudomonas aeruginosa by ethylenediamine tetraacetic acid. Can. J. Microbiol., 15, 743-748.
- 35) Eagon, R.G. and Carson, K.J. (1965): Lysis of

- cell walls and intact cells of Pseudomonas aeruginosa by ethylenediamine tetraacetic acid and by lysozyme. Can. J. Microbiol., 11, 193-201.
- 36) Miyake, Y., Okada, M., Sasaki, M., Nagasaka, N. and Suginaka, H. (1990): In vitro susceptibility of Campylobacter jejuni to rokitamycin. Antimicrob. Agents Chemother., 34, 1440-1441.
- 37) Miyake, Y., Mitsui, K. and Suginaka, H. (1986): Effects of ethylenediamine tetraacetic acid and gentamicin on the antibacterial activity of pyridone carboxylic acid derivatives against gram-negative bacilli. J. Antimicrob. Chemother., 17, 327-332.
- 38) Suginaka, H., Blumberg, P.M. and Strominger, J. L. (1972): Multiple penicillin-binding components in Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J. Biochem., 247, 5279-5288.
- 39) Spratt, B.G. (1975): Distinct penicillin-bind-

- ing proteins involved in the division, elongation and shape of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 2999-3003.
- 40) Matsubishi, M., Nakagawa, J., Ishino, F., Nakajima-Iuima, S., Tomioka, S., Doi, M. and Tamaki, S. (1981): Penicillin-binding proteins: Their nature and functions in the cellular duplication and mechanism of action of β -lactam antibiotics in Escherichia coli. Beta-lactam Antibiotics. Edited by Matsubishi, S., Japan scientific societies press. Tokyo. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. 203-222.
- 41) Winter, A. J. , Katz, W. and Martin, H. H. (1971): Murein (peptidoglycan) structure of Vibrio fetus comparison of a venereal and an intestinal strain. Biochim. Biophys. Acta, 244, 58-64.
- 42) 三橋進, 井上松久, 岡本了一, 宇津井幸男, 平岡聖樹 (1987): 1-3 耐性機序; β -ラクタム系薬 (上

田泰, 清水喜八郎編), 南江堂, 東京, 40-47, 昭和
62.

表題脚注

* 広島大学歯学部小児歯科学講座 主任：長坂信夫教授

本論文の要旨は昭和63年4月の第61回日本細菌学会大会，昭和63年5月の第26回日本小児歯科学会大会，平成元年5月の第27回日本小児歯科学会大会および平成元年6月の広島大学歯学会総会において発表した。

表1 C. jejuni, C. coliおよびC. fetus標準株のABPC, AMPC, CEZ
およびCZXに対する感受性

| Bacterium | Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--------------------------|---|------|-------|------|
| | Antibiotic | | | |
| | ABPC | AMPC | CEZ | CZX |
| <u>C. jejuni</u> JCM2013 | 25 | 0.78 | 400 | 6.25 |
| <u>C. coli</u> JCM2529 | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| <u>C. fetus</u> JCM2527 | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |

表2 C. jejuni, C. coliおよびC. fetus標準株の
EDTA添加時における抗生物質感受性の比較

Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)

| Bacterium | Antibiotic | | | |
|--------------------------|------------|------|-------|------|
| | ABPC | AMPC | CEZ | CZX |
| <u>C. jejuni</u> JCM2013 | 25 | 0.78 | 400 | 6.25 |
| EDTA (1/4MIC) | 25 | 0.78 | 400 | 6.25 |
| EDTA (1/2MIC) | 25 | 0.78 | 400 | 6.25 |
| <u>C. coli</u> JCM2529 | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| EDTA (1/4MIC) | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| EDTA (1/2MIC) | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| <u>C. fetus</u> JCM2527 | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| EDTA (1/4MIC) | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |
| EDTA (1/2MIC) | 400 | 6.25 | 1,600 | 12.5 |

表3 *C. jejuni*臨床分離株104株のEDTAによる各抗生物質に対してMICの変化した菌株数

| Antibiotic | MIC reduction | |
|------------|---------------|--------|
| | 1/1 * | 1/2 ** |
| AMPC | 82 | 22 |
| ABPC | 72 | 32 |
| CZX | 85 | 19 |
| CEZ | 81 | 23 |

1/2MIC濃度のEDTA添加時.

- * EDTA存在下で未添加のMICに比べ変化のなかったもの。
- ** EDTA存在下で未添加のMICに比べMICが半分に減少したもの。

表4 C. jejuni, C. coliおよびC. fetus標準株のβ-ラクタマーゼ
阻害剤による各抗生物質に対するMICの比較

| Antibiotic | Minimal inhibitory concentration (μg/ml) | | | | | |
|------------|--|-------|------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | <u>C. jejuni</u> JCM2013 | | <u>C. coli</u> JCM2529 | | <u>C. fetus</u> JCM2527 | |
| | -CVA | +CVA* | -CVA | +CVA* | -CVA | +CVA* |
| ABPC | 25 | 25 | 400 | 200 | 400 | 400 |
| AMPC | 0.78 | 0.39 | 6.25 | 3.13 | 6.25 | 3.13 |
| CEZ | 400 | 200 | 1,600 | 1,600 | 1,600 | 800 |
| CZX | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 12.5 | 6.25 |

* 1/2MIC濃度のCVAを添加したときの各抗生物質のMICを示す。

表5 C. jejuni臨床分離株104株のβ-ラクタマーゼ阻害剤による
各抗生物質に対してMICの変化した菌株数

| Antibiotic | MIC reduction | | |
|------------|---------------|--------|---------|
| | 1/1 * | 1/2 ** | 1/4 *** |
| AMPC | 60 | 43 | 1 |
| ABPC | 68 | 36 | |
| CZX | 80 | 24 | |
| CEZ | 76 | 28 | |

1/2MIC濃度のCVA添加時.

- * CVA存在下で未添加のMICに比べ変化のなかったもの。
- ** CVA存在下で未添加のMICに比べMICが半分に減少したもの。
- *** CVA存在下で未添加のMICに比べMICが1/4に減少したもの。

表6 ABPC, AMPC, CEZおよびCZXに対するC. jejuni, C. coliおよびC. fetus標準株のβ-ラクタマーゼ活性

| Bacterium | β-lactamase activity (unit/mg protein) | | | |
|--------------------------|--|--------|--------|---------|
| | Antibiotic | | | |
| | ABPC | AMPC | CEZ | CZX |
| <u>C. jejuni</u> JCM2013 | 0.0001 | 0.0003 | 0.0009 | 0.0001 |
| <u>C. coli</u> JCM2529 | 0.0009 | 0.0006 | 0.0002 | <0.0001 |
| <u>C. fetus</u> JCM2527 | 0.0009 | 0.0009 | 0.0002 | <0.0001 |

表7 C. jejuni臨床分離株3株の各抗生物質に対する感受性
および架橋ペプチドグリカン生合成50%阻害濃度

| Bacterium | MIC ($\mu\text{g/ml}$) (ID ₅₀) | |
|-------------------------|---|---------------|
| | AMPC | CZX |
| <u>C. jejuni</u> Lior 5 | 0.39 (0.36) | 3.13 (0.9) |
| <u>C. jejuni</u> Lior 1 | 50 (6.2) | N.D. |
| <u>C. jejuni</u> WG215 | N.D. | 25 (2.1) |

() 内に架橋ペプチドグリカン生合成50%阻害に必要な
各抗生物質の濃度を示す。

N.D. ; not done

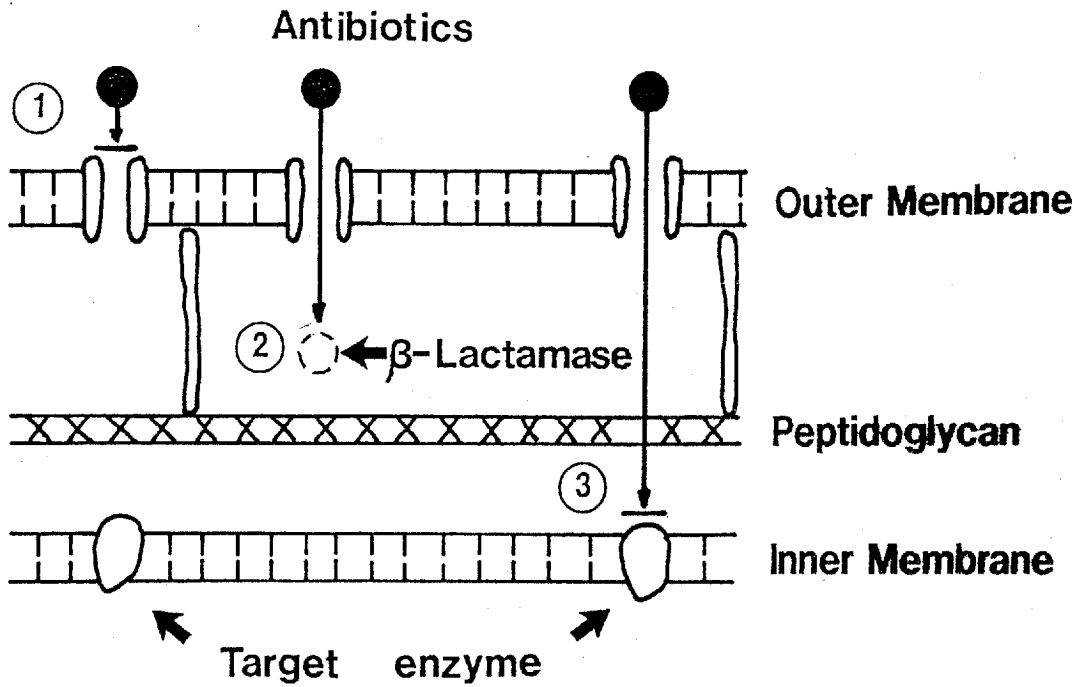


図1 グラム陰性菌の細胞表層構造と β -ラクタム系抗生物質耐性の3つの要因.

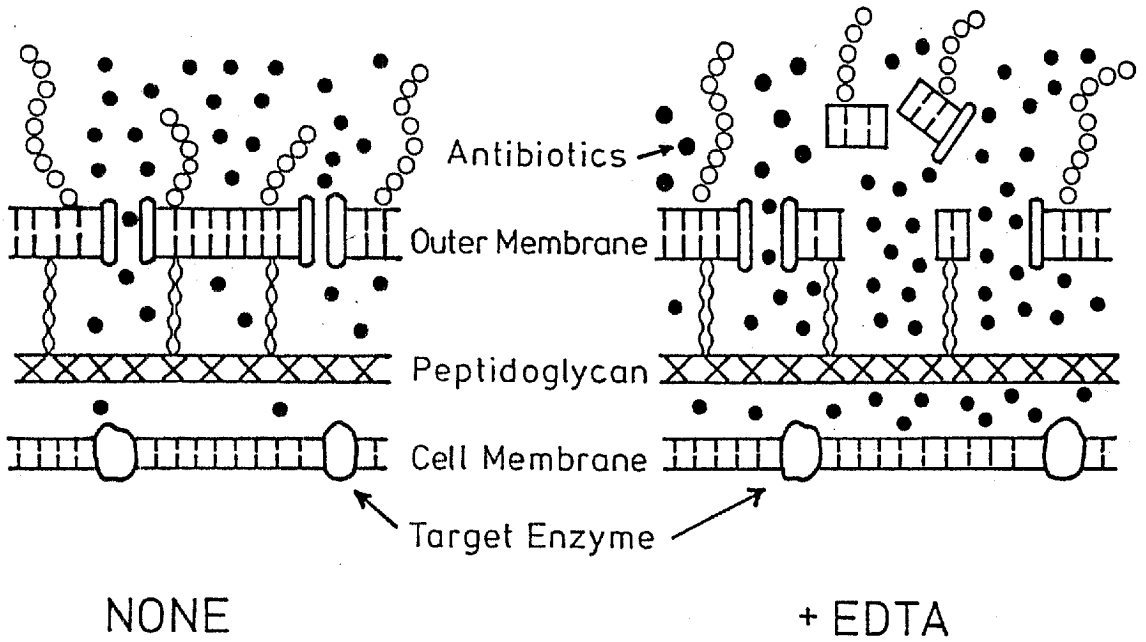


図2 EDTA添加による抗生物質に対するグラム陰性菌の外膜透過性の変化の模式図.

penicillin系

cephem系

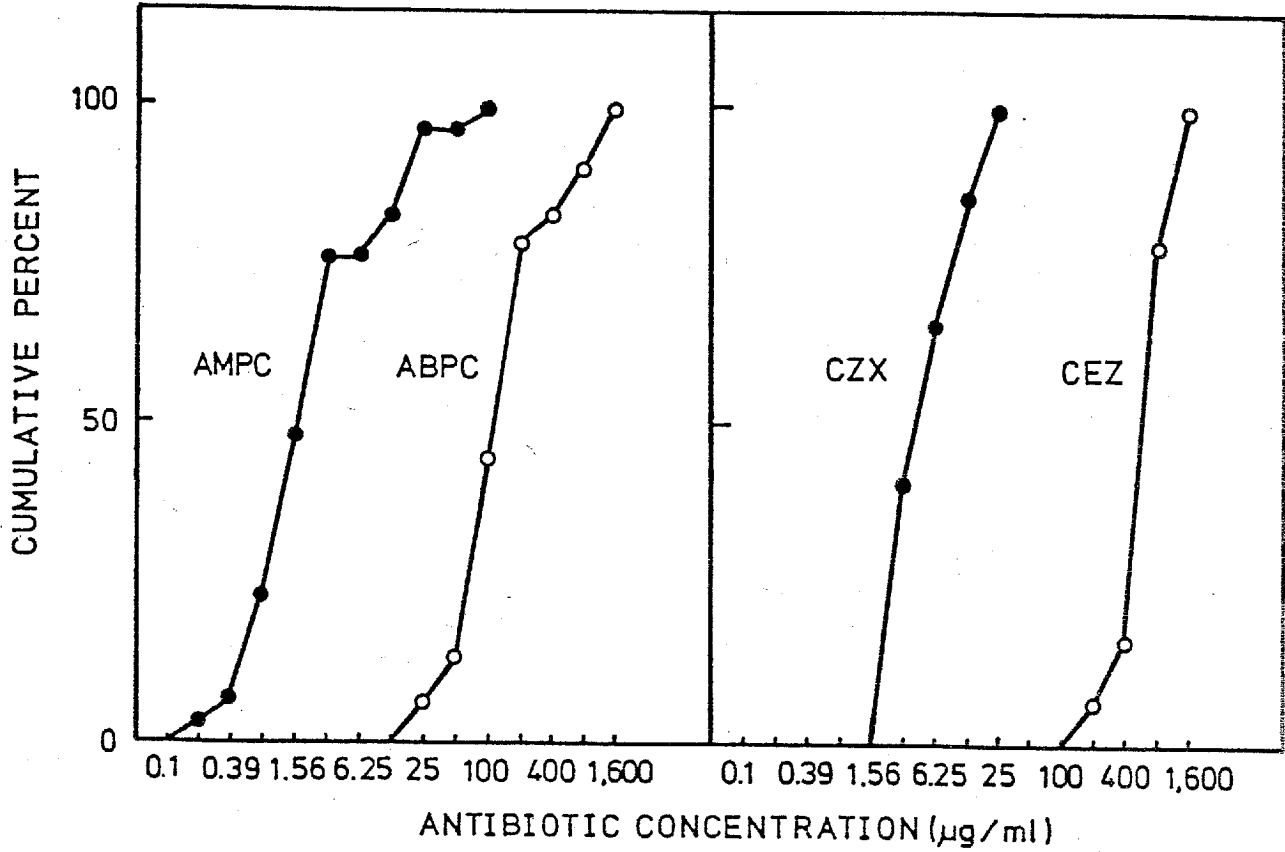


図3 *C. jejuni*臨床分離株の感受性累積分布.
菌株数は104株.

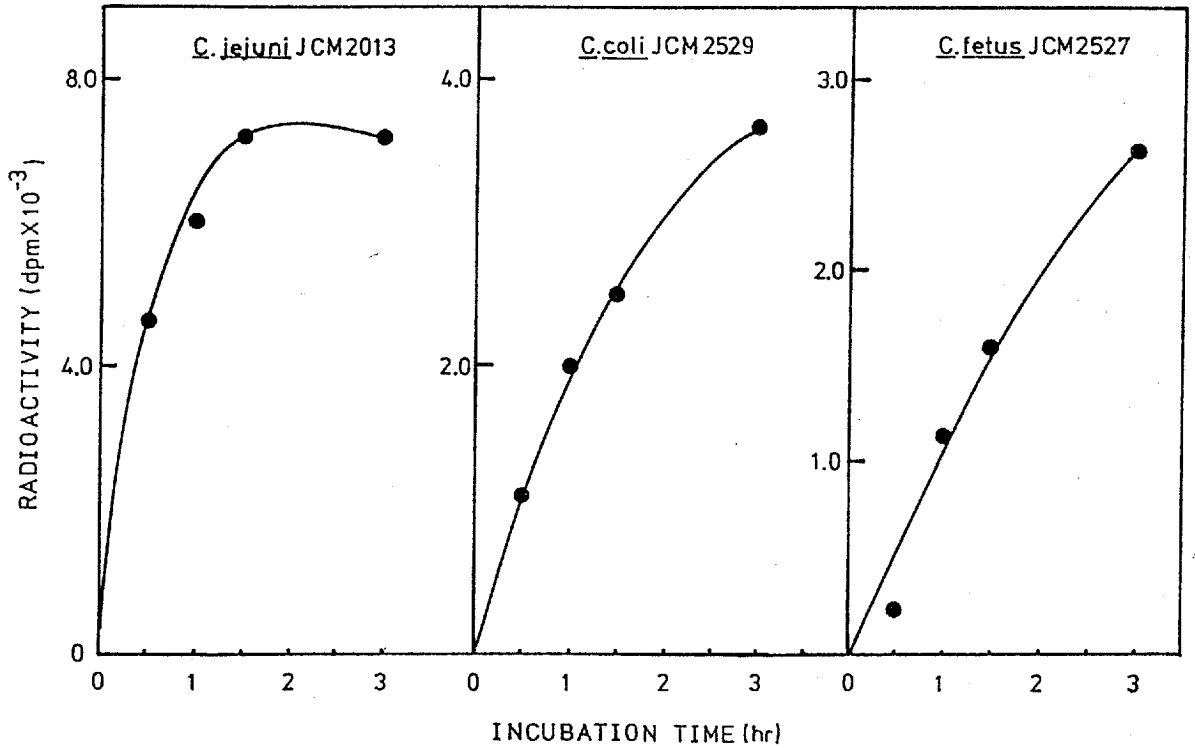


図4 *C. jejuni*, *C. coli*および*C. fetus*における架橋ペプチドグリカン
生合成量の経時的変化。

基質としてUDP-MurNAc-pentapeptideとUDP- ^{14}C GlcNAcを、粗酵素源としてETB cellを用い、SDS不溶性画分の放射活性を指標として全菌レベルで測定した。

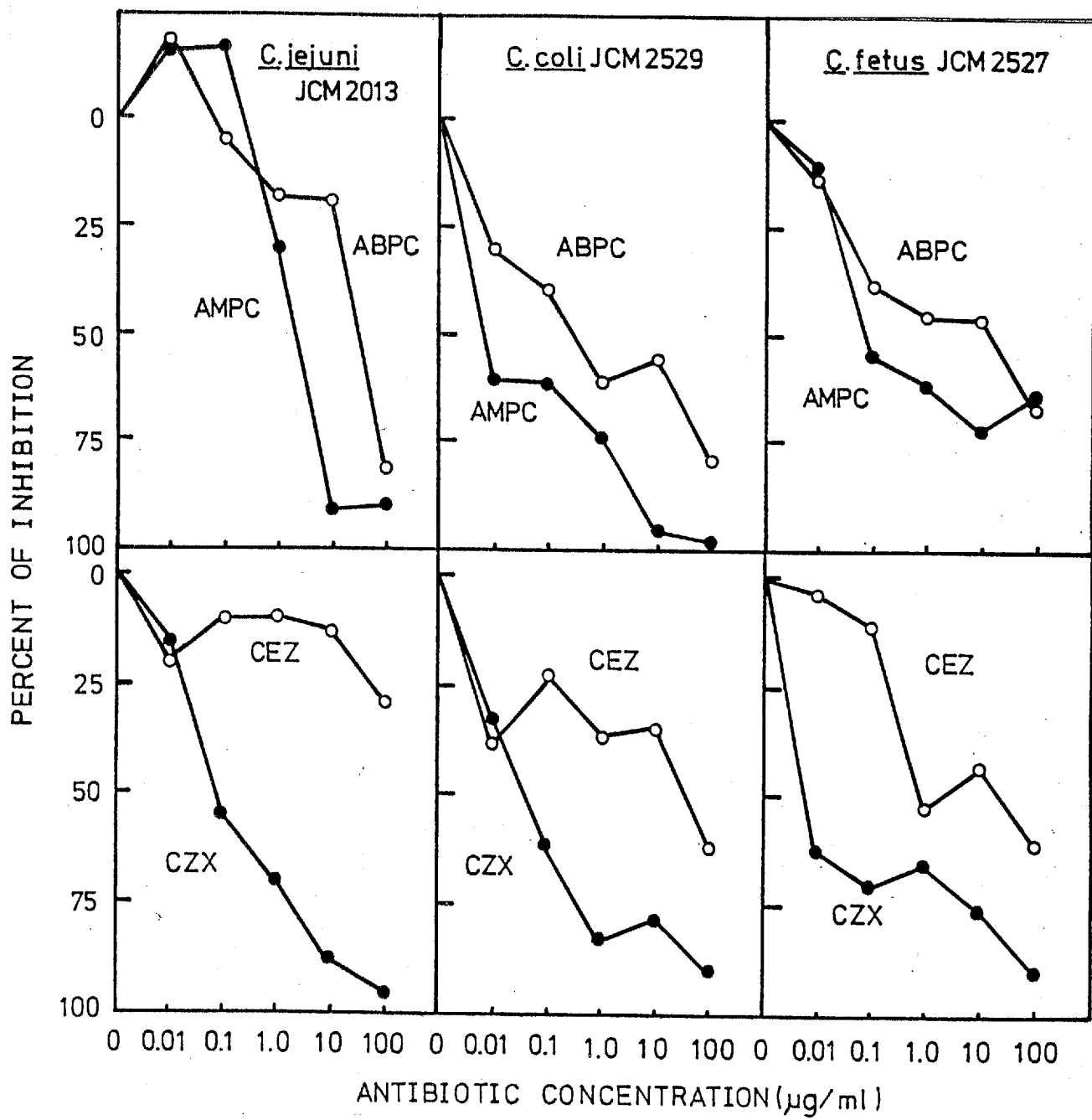


図5 *C. jejuni*, *C. coli*および*C. fetus*の架橋ペプチドグリカン生合成に及ぼす各抗生物質の影響。
 図4と同じ実験条件で、種々の濃度の各抗生物質を添加して測定した。

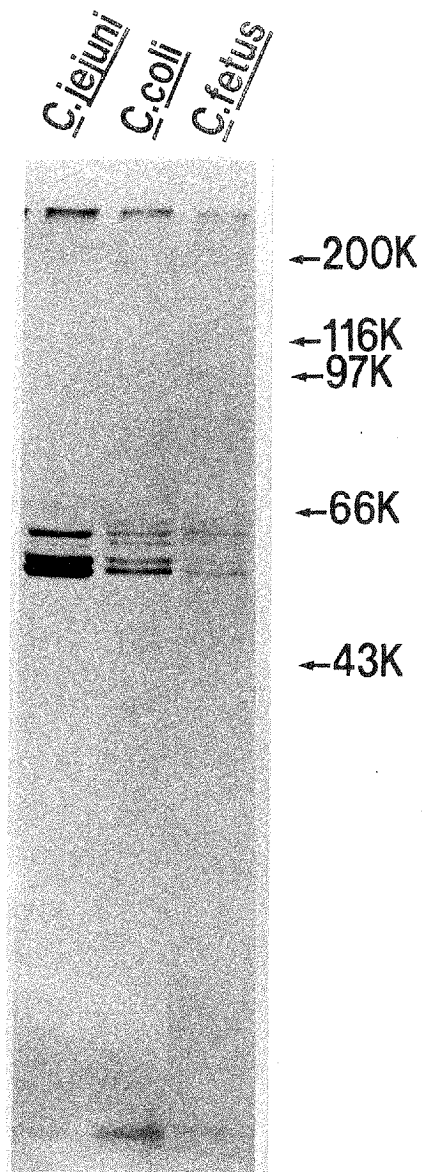
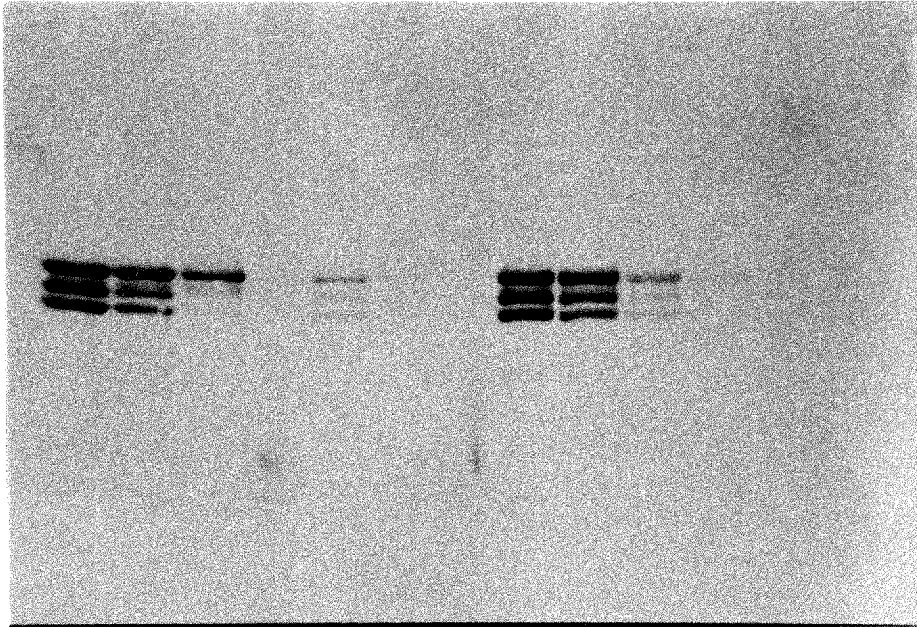


図6 *C. jejuni* JCM2013, *C. coli* JCM2529
および*C. fetus* JCM2527のPBPs.

C.jejuni JCM2013



C 1 10 100 1 10 100 1 10 100 1 10 100 µg/ml
ABPC AMPC CEZ CZX

図7 C.jejuni JCM2013のPBPsの各抗生物質に対する親和性.

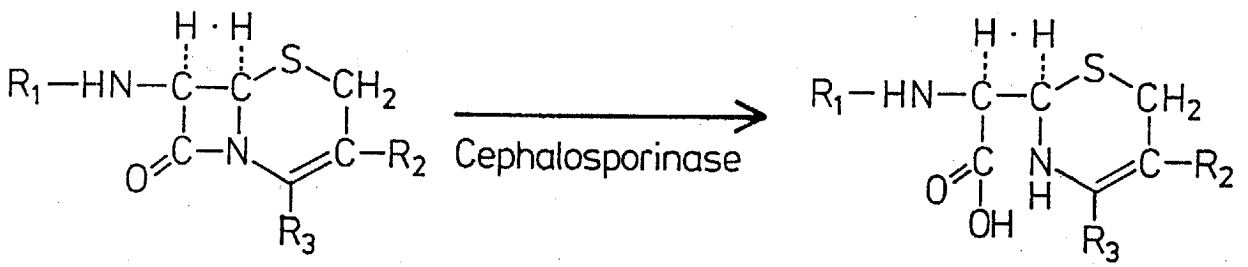
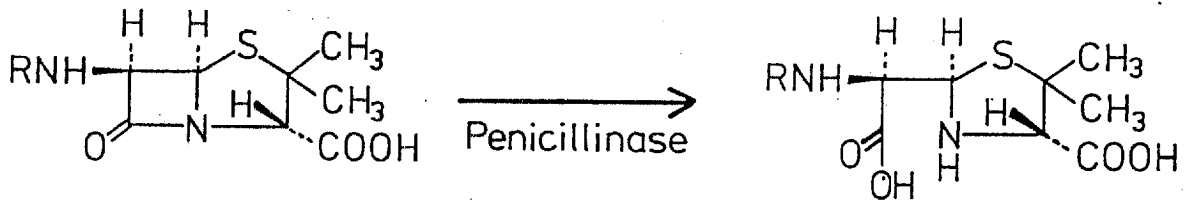


図8 penicillin系およびcephem系抗生物質のβ-ラクタマーゼによる開環.

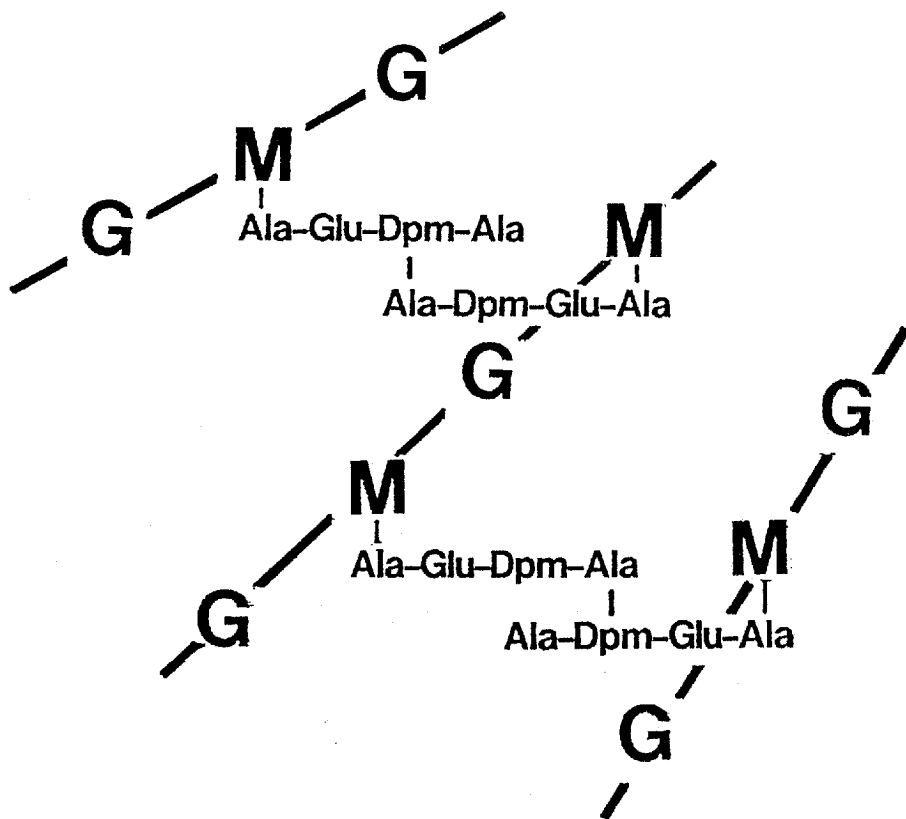


図9 グラム陰性菌の架橋ペプチドグリカンの分子構造。
 G; UDP-GlcNAc, M; UDP-MurNAc-pentapeptide, Ala: alanine,
 Glu; glutamine, Dpm; diaminopimelic acid.