

Ceftezole の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性

根橋 敏行\*・山本 達男・横田 健

順天堂大学医学部細菌学教室

(主任: 横田 健教授)

$\beta$ -lactam を母核とする Penicillin (PC) 類と Cephalosporin 類の作用機序は原核細胞 (prokaryotic cell) 特有の murein を主体とする細胞壁合成阻害にあるので、その選択毒性は高く、細菌に強い殺菌力を示すのに反し動物細胞に対する傷害力は弱い。したがってこの系統の薬剤は薬物アレルギーの問題を別にすれば理想的な化学療法剤として使用されてきた。しかし、近年これら薬剤に対する耐性菌の割合が増加し、その利用価値が低下しつつあることは憂慮すべき点である。

$\beta$ -Lactam 系化学療法剤に対する耐性の主要な生化学的機構は、耐性菌が  $\beta$ -lactam 環を水解開裂する酵素、 $\beta$ -lactamase を産生するためであることはよく知られているが、gram 陽性菌と gram 陰性菌ではその酵素産生機構、基質特異性等に著明な差が認められる。すなわち、前者では  $\beta$ -lactamase が誘導型 (inducible) の penicillinase (PCase) 型菌体外酵素であるため多くの Cephalosporin 類や PCase 抵抗性 PC 類に依然として感受性を示すのに対し<sup>3)</sup>、後者ではそれほど簡単でない<sup>4)</sup>。元来 gram 陰性桿菌に対して Cephalosporin 類は強い抗菌力を示すが、PC 類では Aminobenzyl-PC (ABPC), Carboxybenzyl-PC (CBPC), Sulfo-benzyl-PC (SBPC) 等のいわゆる広域 PC だけが有効である。これは gram 陰性桿菌の細胞壁が外膜 (outer membrane) を有するためそれを通過し難い PC G 等にはあまり強い抗菌力は期待できないものと考えられている<sup>5)</sup>。これに加え、gram 陰性桿菌の  $\beta$ -lactamase は表層酵素 (prienzyme) であり遺伝学的には染色体性のものと plasmid 性 (R 因子) のものとにわけられ、酵素学的には PCase 型と cephalosporinase (CESase) 型とが認められる等菌種、菌株によって複雑多岐にわたっている<sup>6)</sup>。以上の理由から新しい  $\beta$ -lactam 系化学療法剤を開発評価する時には、各菌種に対する抗菌力を見るほかに、 $\beta$ -lactamase、とくに gram 陰性桿菌の各種のものに対してその安定性を検討することが肝要

である。

Ceftezole (CTZ) は、わが国で合成され、現在開発中の新しい Cephalosporin 誘導体である。本報告においてはこの CTZ の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定度を既存の PC 類、Cephalosporin 類と比較検討した結果を明らかにしたい。

## 材料ならびに方法

1. 被検菌株: 順天堂大学医学部附属病院臨床検査室において患者から分離された ABPC 100  $\mu$ g/ml 以上耐性の *E. coli* 48 株, *Klebsiella* spp. 43 株, *Ent. cloacae* 51 株は小酒井教授から分与された。これらのうち、*E. coli* および *Klebsiella* spp. のなかには Cephalosporin 類に 100  $\mu$ g/ml 以上の高度耐性を示すものは 1 株も認められなかったが、*Ent. cloacae* Nek-39 株は PC 類, Cephalosporin 類すべてに対し、6,400  $\mu$ g/ml 以上のきわめて高い耐性を示した。PC G 耐性の *Staph. aureus* JU-5 株も小酒井教授から分与された患者分離株である。
2. 供試薬剤: PC 類として PC G, ABPC, SBPC (武田薬品工業), CBPC (藤沢薬品工業), Cloxacillin (MCIPC: 明治製薬) を、Cephalosporin 類として Cephaloridine (CER), Cepharothin (CET), Cephalexin (CEX), Cephaloglycin (CEG, 塩野義製薬), Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業) および Ceftezole (CTZ, 中外製薬) を使用した。
3. 最小発育阻止濃度の測定: 各薬剤の MIC の測定は日本化学療法学会標準法<sup>7)</sup>に準拠した。すなわち、被検菌のブイヨン 1 夜培養液を滅菌生理食塩液で 100 倍希釈し、その 1 白金耳量を倍々希釈濃度の薬剤を含む感受性試験用培地 (栄研) の寒天平板に塗布し、37°C, 1 夜培養して、その増殖の有無から判定した。
4. R plasmid の伝達: 臨床分離の ABPC 耐性 *E. coli* と *Klebsiella*, および ABPC と CER に高度耐性の *Ent. cloacae* を donor とし、*E. coli* CSH 2 (F<sup>-</sup>, met B) の Nalidixic acid (NA) 100  $\mu$ g/ml 耐性交

\* 現在中外製薬株式会社総合研究所

異菌 (*nal*) を recipient として R plasmid<sup>9)</sup> の伝達を試みた。すなわち, donor および recipient の L-ブイオン<sup>9)</sup> 1夜培養液それぞれ 0.1 ml および 1 ml と新鮮 L-ブイオン 4 ml を混合し, 37°C で4時間振盪培養したのち, その 0.1 ml を NA (第一製薬) 100 µg/ml および ABPC または CER 25 µg/ml を含む Mac Conkey 寒天 (栄研) 平板上に塗布し, 37°C 1夜培養後, NA 耐性の recipient に ABPC または CER 耐性が伝達された集落の数を算定した。

5.  $\beta$ -lactamase 粗酵素の調製: R plasmid による  $\beta$ -lactamase の粗酵素は, すべてこれらを標準 *E. coli* CSH 2 (*met B, nal*) に伝達した菌から調製した。

*Staph. aureus* JU-5, *Ent. cloacae* Nek-39 および臨床分離の *E. coli* または *Klebsiella* spp. から R plasmid を受けとった *E. coli* CSH 2/R<sup>+</sup> の対数増殖期, 初〜中期のブイオン培養を遠心集菌し, 0.01Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で1回洗浄した後, 同緩衝液に浮遊した。これを氷冷しながら富永 sonicator (10 Kc) を使用して 30 秒ずつ3回音波処理して細胞を破砕し, 105,000 G 30分間超遠心した後, その上清を粗酵素として使用した。蛋白量の定量は LOWREY 法<sup>10)</sup> で行なった。

6.  $\beta$ -lactamase 活性の測定: Macroiodometry を主とし, これに bioassay<sup>12)</sup> を併用した。すなわち 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にとかした 10 mM の PC または Cephalosporin 類溶液 5 ml に粗酵素 (蛋白量 10~50 µg) を加え, 30°C 20分反応させたのち, 0.0166 N のヨード溶液を加えて室温に 10分間放置した。この反応液中の余剰のヨードを 0.0166 N のチオ硫酸ナトリウム液で滴定定量し,  $\beta$ -lactamase によって開裂した  $\beta$ -lactam によるヨード消費量を求め, それから PC または Cephalosporin 類の分解量を計算した。1 mole の PC 類が完全に水解されたときのヨード消費量は誘導体の種類にかかわらず 4 mole であることは知られているが<sup>11)</sup>, Cephalosporin 類については  $\beta$ -lactamase により分解された 1 分子量が何分子量のヨードを消費するかは Cephalosporin C の場合<sup>11)</sup> を除いて明確な文献が見当たらない。そこで実験的に各 Cephalosporin 類加水分解物のヨード消費量を求めたが, Cephalosporin 類は PC 類と異なりアルカリ処理では完全水解できないことがわかったので, 後述の *Ent. cloacae* Nek-39 の CESase を使用して酵素的に完全分解したものをを用いた。この場合それぞれの Cephalosporin 類の 0.1 mM~20 mM にわたる種々の濃度の溶液 5 ml に過剰の CESase を加えて反応させ, 完全に水解されたこと

を bioassay で確認したのち, ヨード消費量を求め, 分解された基質量とヨード消費量が比例関係にあることを確認した。

残存 Cephalosporin 類の bioassay は *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌<sup>10)</sup> とし, 薄層 disc 法で行なった。

7. *Ent. cloacae* Nek-39 の染色体性と R plasmid 性の  $\beta$ -lactamases の分離: 多量の L-ブイオン中に培養された *Ent. cloacae* Nek-39 の対数増殖期の細胞を遠心集菌し, 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で1回洗浄したのち -20°C に保存した。毎回の実験にはその適当量を取り出し, 冷した乳鉢の中で, アルミナ粉を加えて磨細した。少量の上記リン酸緩衝液で抽出し, その 105,000 G 遠心上清の蛋白 1 mg に対し 3 mg の protamine を加えて核酸を除去したのち, Sephadex G-75 カラムでゲル濾過した。その濾液を CM-cellulose カラム (0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.0) を通すと PC ase 型の  $\beta$ -lactamase は吸着されずに溶出し, いっぽう吸着された CESase 型のもの 0.2 から 1.0 M の

Fig 1 Purification procedure of penicillinase-type and cephalosporinase type  $\beta$ -lactamases from bacterial cells

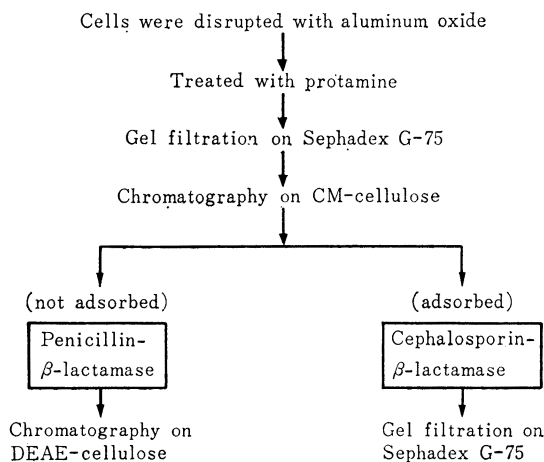


Table 1 Confirmed R<sup>+</sup> strains in aminobenzyl penicillin-resistant bacilli

Species	Number of strains tested	Number of R <sup>+</sup> strains	% of R <sup>+</sup> strains
<i>E. coli</i>	48	28	58.4
<i>Klebsiella</i> spp.	43	33	76.6

範囲の NaCl 連続濃度勾配溶出により抽出された。

分離された PCase 画分はさらに DEAE-cellulose カラム (0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.5) に吸着させ、0.3 M~1.0 M NaCl 連続濃度勾配溶出で精製し、CESase 画分は再度 Sephadex G-75 (0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0) ゲル透過を行なって、精製度を検討した (Fig. 1)。上記カラムクロマトグラフィーにおける各 fraction 中の蛋白濃度は OD<sub>280</sub> で、 $\beta$ -lactamase 活性は ABPC および CTZ を基質とする macroiodometry により行なった。

### 実験成績

1. PC および Cephalosporin 耐性 R plasmid の保有率

Table 1 に ABPC または CER 耐性 *E. coli* および *Klebsiella* spp. からその耐性が *E. coli* CSH 2 (F<sup>-</sup>met B, nal) に伝達される菌株数の割合を示した。ABPC 耐性の *E. coli* および *Klebsiella* spp. のなかには CER 100  $\mu$ g/ml 以上の高度耐性を示す株は 1 株もなく、またそれぞれの ABPC 耐性を *E. coli* CSH 2 に伝達した時にも、その一部のものが CER 25  $\mu$ g/ml 以下の低い耐性を同時に獲得しただけであった。また *Ent. cloacae* のなかには PC および Cephalosporin 類すべてに高度耐性を示すものが若干認められたが、これらの菌から *E. coli* CSH 2 に伝達可能なものは PC 類に対する高度耐性株と Cephalosporin 類に対する低度耐性株に限られ、高度 Cephalosporin 類はすべて非伝達性であった。このほか、Cephalosporin 耐性の *Serratia*, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Pr. morgani*, *Pr. rettgeri* 等からも Cephalosporin 耐性の伝達を試みたが、いずれの場合も Cephalosporin 類に高度耐性を与える R plasmid の存在を証明することはできなかった。したがって CTZ についてもその高度耐性を伝達する R plasmid は 1 株も見つけられなかった。

2. Macroiodometry における Cephalosporin 類の定量性

Table 2 Iodine equivalents of cephalosporins

Drugs	Consumed mole of I <sub>2</sub>	
	Mole of hydrolysed cephalosporin	
CER	2.8	
CEZ	4.9	
CTZ	5.1	
CEX	3.4	
CET	2.5	

各 Cephalosporin 類が水解された時のヨード消費量は PC 類の場合と異なり、誘導体ごとに個有の値を示すことが明らかになった (Table 2)。この値を使用して算出したある  $\beta$ -lactamase の各基質に対する Vmax 値は、同時に残存基質を bioassay により測定し、これから算出した値とほぼ一致し、高い信頼性のあることが立証された (Fig. 6)。例外として CEG だけは macroiodometry による非特異反応が強く、この方法で  $\beta$ -lactamase による被分解率を算定することは不可能であった。CTZ のヨード消費量は 5.1 moles/mole であった。

3. R plasmid による  $\beta$ -lactamases に対する CTZ の安定性

臨床分離 ABPC 耐性 *E. coli* および *Klebsiella* spp. から得られた総計 61 株の R plasmids (Table 1) を整理すると、*E. coli* からの R plasmids の約 40% は PC 類に高い耐性を与えるが、Cephalosporin 類については CER 耐性を感性菌の 2 倍程度上昇させるほかはすべてに感性のままであった。また約 24% のものは PC 類に対する高い耐性と CES 類に対する低い耐性を与えることがわかった (Fig. 2)。

これら R plasmids をもつ *E. coli* CSH 2/R<sup>+</sup> から調製した  $\beta$ -lactamase の基質特異性は Fig. 3 および

Fig. 2 Resistance levels to various penicillin and cephalosporin derivatives of *E. coli* CSH 2 carrying different R factors found in *E. coli*

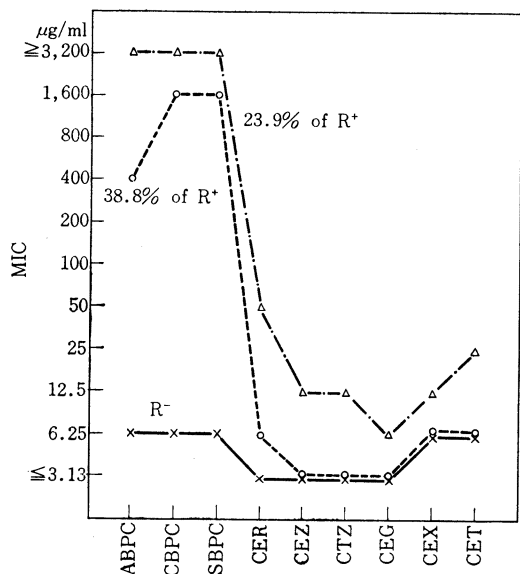


Fig. 3 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *E. coli* CSH 2 carrying R-E 66 factor found in *E. coli* 66

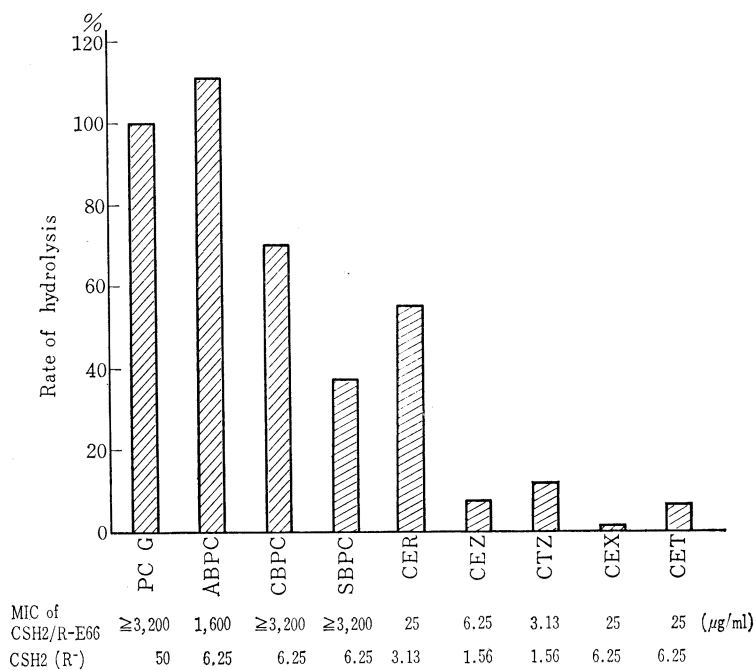
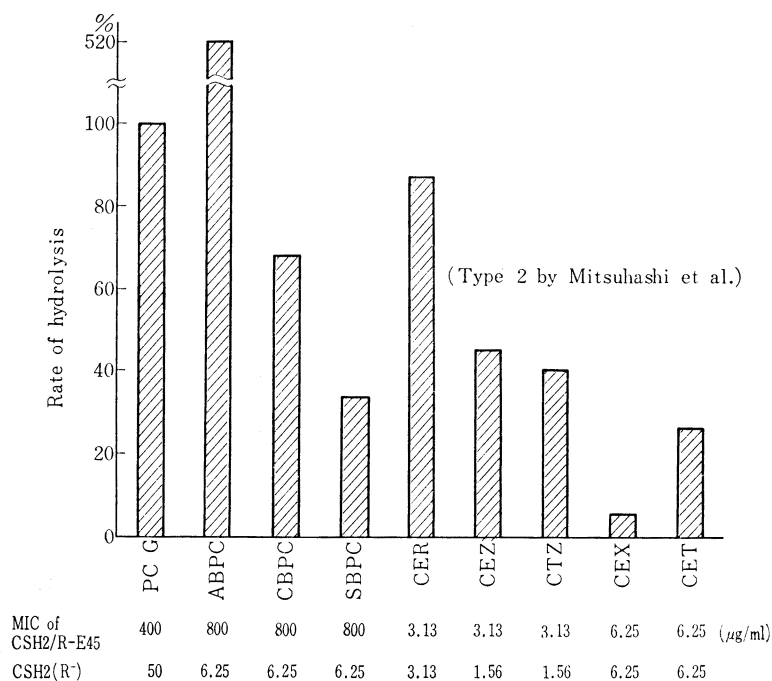


Fig. 4 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *E. coli* CSH<sub>2</sub> carrying R-E 45 factor found in *E. coli* 45



4に示すとおりで、どちらの群に属する  $\beta$ -lactamase でも PC G, ABPC および CER に対する  $V_{max}$  が大きく, CTZ, CEZ, CET, CEX, SBPC, CBPC に対する  $V_{max}$  は小さい。しかしこれら R plasmids は SBPC, CBPC には高い耐性を与えた。さらに奇妙なことに CEX, CET, CEZ に対する  $V_{max}$  がきわめて小さい  $\beta$ -lactamase を産生する R plasmid がこれらの薬剤に対する耐性 (MIC) を4倍程度上昇させることは興味深い。

*Klebsiella* spp. から得られた ABPC 耐性 plasmid の半数以上は宿主菌に中等度の Cephalosporin 類に対する耐性を同時に与え, PC 類に対する耐性だけを与えるものはわずか10%程度にすぎない (Fig. 5)。前者に属する R plasmids を伝達された *E. coli* CSH 2/R<sup>+</sup> 2株の  $\beta$ -lactamase の基質特異性を示したものが Fig. 6 および7である。*Klebsiella* spp. から得られる R plasmids の  $\beta$ -lactamase は PC G, ABPC および CER に対する  $V_{max}$  値が大きく, CTZ, CEZ, CEX, CET, SBPC, CBPC に対する  $V_{max}$  の低いものが多い。しかしこれらの R plasmids が PC 類すべてに対する高度耐性と, CER, CET, CEX に対する中等度耐性を与えることは *E. coli* から得られた R plasmids の

Fig. 5 Resistance levels to various penicillin and cephalosporin derivatives, of *E. coli* CSH 2 carrying different R factors found in *Klebsiella*

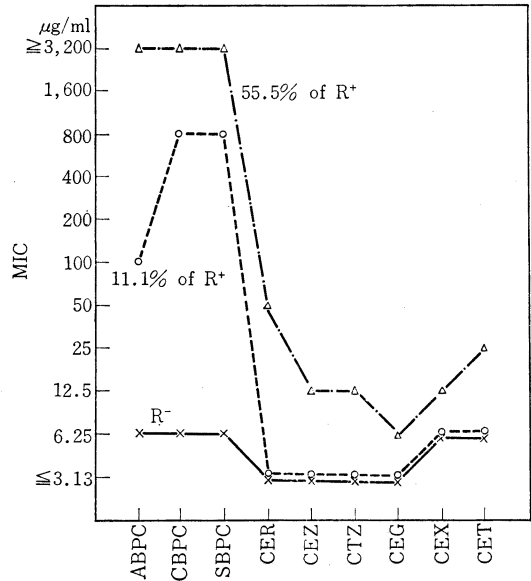
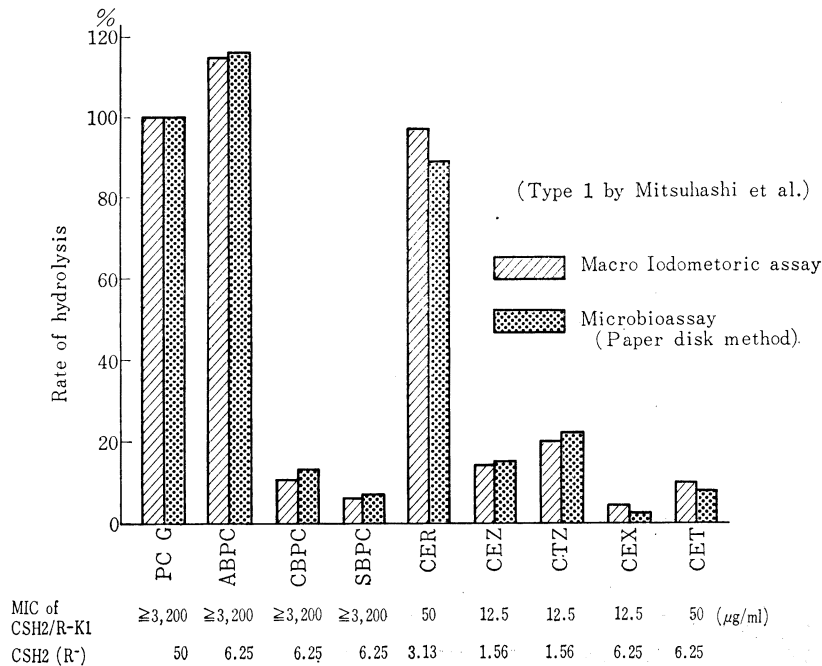


Fig. 6 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *E. coli* CSH 2 carrying R-K1 factor found in *Klebsiella* sp. 1



場合と同様で、 $\beta$ -lactamase に対する安定性と実際の耐性度とが必ずしも平行関係にないことを示している。

研究の主題である CTZ の R plasmid 性  $\beta$ -lactamase に対する安定度は CEX より若干低く、CEZ、CET と同程度であるが、CTZ はこれらの R plasmid が伝達された時宿主菌の耐性上昇率が最も小さい薬剤であることが注目された。

#### 4. *Ent. cloacae* Nek-39 の染色体性および plasmid 性 $\beta$ -lactamases に対する CTZ の安定性

*Ent. cloacae* Nek-39 は Table 3 に示すように、すべての  $\beta$ -lactam 抗生物質に 6,400  $\mu$ g/ml 以上のきわめて高い耐性を示す。この菌株から他の菌への耐性伝達を試みたところ、*E. coli* CSH 2 (*nal*) に低頻度ながら PC 類に対する高度耐性と、Cephalosporin 類に対する中～低度耐性が伝達されたが、Cephalosporin 類に対する高度耐性の伝達は認められなかった。また *Ent. cloacae* CL 12 (感性株) への耐性伝達は成功しなかった。

以上の遺伝学的実験から *Ent. cloacae* Nek-39 は R plasmid による PCase 型と染色体性の CESase 型との2つの  $\beta$ -lactamase を持っていることが想像されたので、その分類を試みた。除核酸した菌体抽出液を Sephadex G 75 でゲル濾過したあと CM-cellulose カ

ラムクロマトグラフィーを行なうと、Fig. 8 に示すように PCase 活性を有する画分はカラムに吸着されずに溶出し、CESase 活性画分は吸着したあと NaCl 濃度勾配溶出で抽出された。PCase 活性部分をあつめ、DEAE-cellulose に吸着させたのち NaCl 濃度勾配溶出を行なうと、Fig. 9 のように、他の蛋白質と分離された。いっぽう CM-cellulose カラムから抽出された Cephase 画分を再度 Sephadex G-75 でゲル濾過すると、Fig. 10 に示すように、蛋白濃度の peak と酵素

Table 3 Sensitivities to three penicillins and to four cephalosporins of *Ent. cloacae* Nek-39

Drugs	MIC ( $\mu$ g/ml)
PC G	$\geq 6,400$
ABPC	"
SBPC	"
CER	"
CEZ	"
CTZ	"
CEX	"
CET	"

Fig. 7 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *E. coli* CSH 2 carrying RK-45 factor found in *Klebsiella* sp. 45

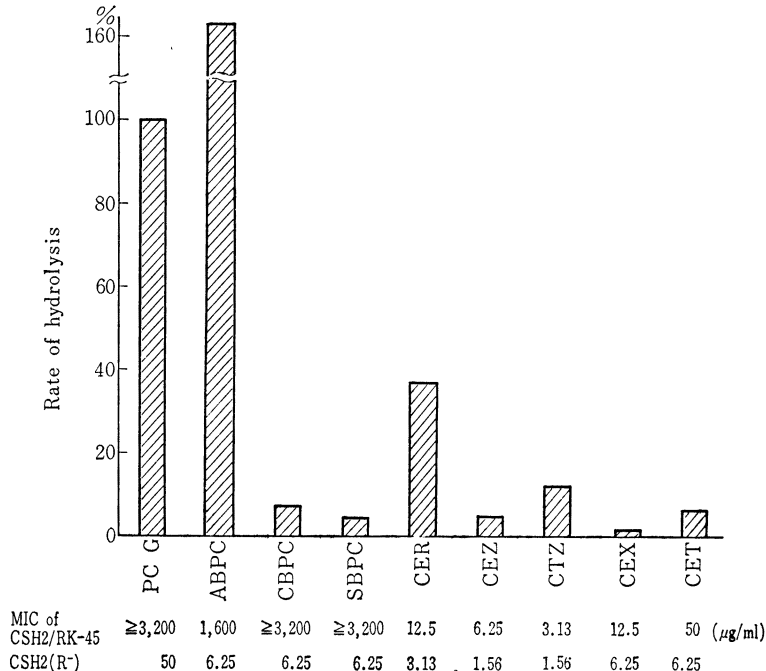


Fig. 8 Chromatography on CM-cellulose

0.01M Phosphate buffer pH6.0

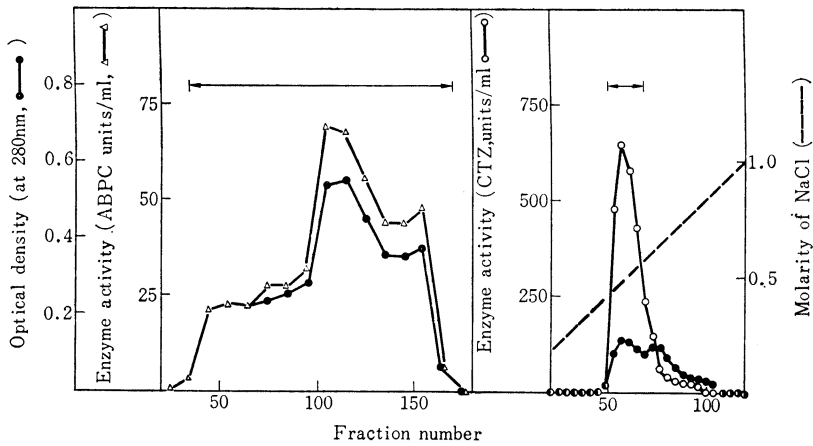


Fig. 10 GEL filtration of cephalosporinase-type  $\beta$ -lactamase on sephadex G-75

0.01M Phosphate buffer pH7.0

Fig. 9 Chromatography on DEAE-cellulose

0.01M Phosphate buffer pH7.5

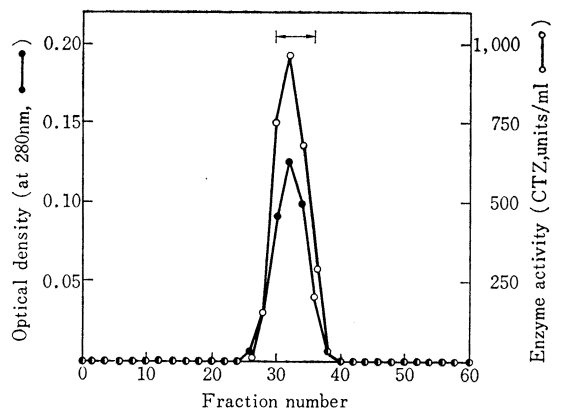
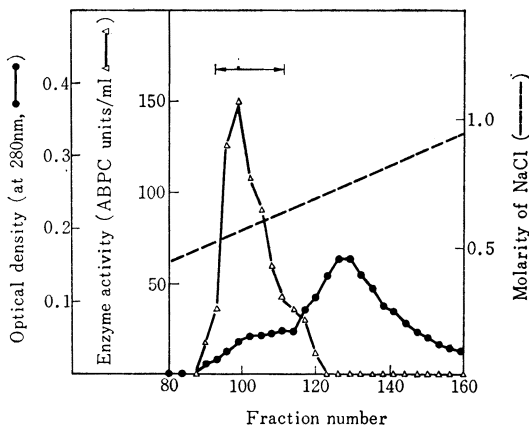


Table 4 Summary of the purification of cephalosporinase-type  $\beta$ -lactamase from *Ent. cloacae* Nek-39

Stage No.	Procedure	Specific activity (units/mg of protein)	
		ABPC	CTZ
1	Cells were disrupted with aluminum oxide	44.1	250
2	Treated with protamine	54.3	330
3	Gel filtration on Sephadex G-75	89.0	410
4	Chromatography on CM-cellulose	< 1	6,200
5	Gel filtration on Sephadex G-75	< 1	9,800

活性 peak は一致し、夾雑蛋白の少ないことを示している。Table 4 にこの菌の CESase 分離精製過程の specific activity の変化を示したが約 40 倍に精製され、かつ PCase 活性がほとんど除かれたことを示している。いっぽう PCase の DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー後の精製度は約 30 倍であった。以上のように、*Ent. cloacae* Nek-39 は plasmid 性の PCase 型と染色体性の CESase 型 2 種類の  $\beta$ -lactamases を同時に産生している菌であることが明らかになった。

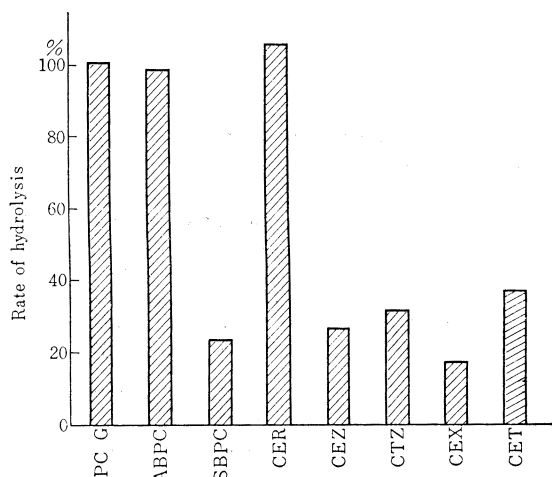
Fig. 11 に同菌の plasmid 性 PCase 型  $\beta$ -lactamase の基質特異性を、Fig. 12 にその染色体性 Cephalosporin 型のそれを示した。

CTZ は *Ent. cloacae* の plasmid 型  $\beta$ -lactamase に対しては水解され難く、CET や CEZ と同程度に安定であったが (Fig. 11), 同じ菌の産生する染色体性 CESase 型  $\beta$ -lactamase による  $V_{max}$  値は他の Cephalosporin 類同様高かった。しかし CER と CEZ より低い被水解率を示した (Fig. 12)。

#### 5. *Staph. aureus* JU-5 の $\beta$ -lactamase に対する CTZ の安定性

臨床分離の PC G 耐性 *Staph. aureus* JU-5 の対数期初期の細胞から音波処理によって抽出した  $\beta$ -lactamase の PC 類および Cephalosporin 類水解率を Fig. 13 に示した。CTZ は他の Cephalosporin 類同様きわめて安定であり、実際に PC G 耐性 *Staph. aureus* JU-5 に対する抗菌力も強かった。

Fig. 11 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *Ent. cloacae* Nek-39



#### 考 察

CTZ は CEZ に近い構造を有する新しい Cephalosporin 誘導体である。この薬剤は PC G 耐性ブドウ球菌の産生する PCase 型  $\beta$ -lactamase に対して他の Cephalosporin 類同様きわめて安定で、その菌に対する MIC 値も小さい。したがって多剤耐性ブドウ球菌感染症に対してはきわめて有効な化学療法剤の 1 つとなる可能性が高い。gram 陽性菌の  $\beta$ -lactamase は純粋な PCase 型の exoenzyme であるため、耐性度との関係が比較的明快で、PC または Cephalosporin 類の  $\beta$ -

Fig. 12 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *Ent. cloacae* Nek-39

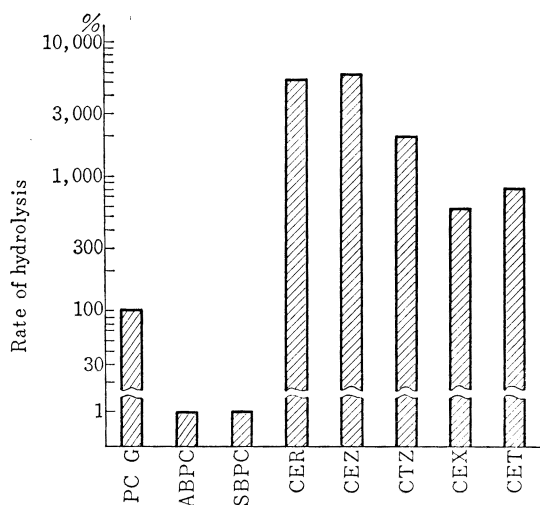
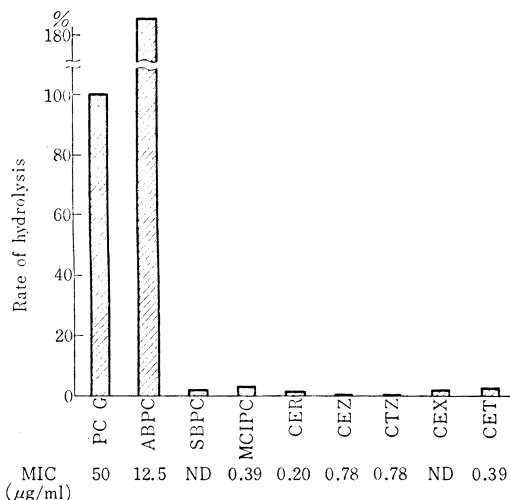


Fig. 13 Substrate specificity of  $\beta$ -lactamase isolated from *Staph. aureus* JU-5





lactamase に対する安定性と耐性菌に対する抗菌力の強弱とが平行する場合が多い<sup>3)</sup>。

gram 陰性桿菌では *E. coli* または *Klebsiella* には plasmid 性または染色体性の PCase 型の  $\beta$ -lactamase が epienzyme として存在する場合がある<sup>4)</sup>。このときの各薬剤の  $\beta$ -lactamase に対する安定度とその菌に対する抗菌力の強弱との関係はブドウ球菌の場合ほど簡単でない。

すなわち第 1 に gram 陰性桿菌の細胞壁には外膜があるため PC または Cephalosporin 類が作用点(細胞壁下層の細胞質膜上にある)に到達するためにはこの外膜を通過しなければならない。一般に Cephalosporin 類は PC 類より外膜を通過し易いので(外膜の通過性は penetrability といわれ細胞質膜の透過性 permeability と区別され、また数量的には菌が  $\beta$ -lactamase をもつときは crypticity として表現される<sup>5)</sup>)、まずこの点から gram 陰性桿菌の化学療法剤としては Cephalosporin 類のほうが PC 類より有望である。しかも *E. coli*, *Klebsiella* spp. の産生する  $\beta$ -lactamase は PCase 型の傾向を有し、CER を除いては多くの Cephalosporin 類は分解され難く、比較的水解率の高い CER でも  $\beta$ -lactamase に対する Km 値が高い(親和性が低い)ので 100  $\mu$ g/ml 以下の低濃度では分解速度はおそい<sup>13)</sup>。以上の 2 つの理由から、少なくとも *E. coli* や *Klebsiella* spp. においては Cephalosporin 類に高い耐性を示す株が急激に増加する危険はなさそうである。とくに CTZ はこれらの菌の PCase 型  $\beta$ -lactamase にきわめて安定で、R (*amp*) plasmid を伝達してもほとんど耐性上昇が認められないので、*E. coli* および *Klebsiella* spp. の PC 類耐性株またはそれを含む多剤耐性株に対する化学療法剤として有望なもの 1 つと考えられる。これに対し、PC 類では仮にそれがこれらの菌の  $\beta$ -lactamase に対して安定であっても透過性の問題等で耐性株には有効でない場合が多く、あまり期待できないのは SBPC や CBPC<sup>13)</sup>で見られたとおりである。

*Enterobacter*, *Serratia*, *Pr. vulgaris*, *Pr. rettgeri* 等は R plasmid による PCase 型のほかに、染色体性の CESase 型  $\beta$ -lactamase を有することがある<sup>6)</sup>。事実著者らの実験においても、*Ent. cloacae* Nek-39 から plasmid による PCase 型と染色体性と考えられる CESase 型の 2 種類の  $\beta$ -lactamase を分離精製することができた。CTZ は前者に対しては CEZ, CEX と同じように高い安定性を示したが、後者によっては他の Cephalosporin 類と同様強く水解され、この菌に対しては抗菌力を示さなかった。さらに gram 陰性桿菌の

Cephalosporin 類耐性菌に対する有効な新誘導体としては CESase 型  $\beta$ -lactamase に抵抗性のあるものを開発する必要もあるが、SBPC や CBPC 耐性で示されたように、たんに  $\beta$ -lactamase に水解され難いという点だけでは実際の耐性菌に有効でない場合もあるので、 $\beta$ -lactamase に対する Km の大小等も加味して研究の進展をはかる必要があるように考えられる。

いずれにしても CTZ は PC G 耐性 gram 陽性菌に対してはもちろんのこと、ABPC, SBPC 耐性の gram 陰性桿菌の相当部分に強い抗菌力を示すすぐれた Cephalosporin 類の 1 つであると結論することができる。

#### ま と め

Ceftazole (CTZ) の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性と抗菌力の強弱とに関連して検討した。CTZ は *Staph. aureus* の PCase にきわめて安定で、かつ同菌の PC G 耐性株にはきわめてすぐれた抗菌力を示す。この薬剤は gram 陰性菌における plasmid 性の PCase 型  $\beta$ -lactamase にも水解され難く、これが主体となる ABPC, SBPC 耐性 *E. coli*, *Klebsiella*, *Pr. mirabilis* には強い抗菌力をあらわすが、染色体性の CESase 型  $\beta$ -lactamase にはよく水解されるので、これを主な耐性機構とする *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pr. vulgaris* 等の Cephalosporin 類耐性株には強い抗菌活性は期待し難い。

#### 謝 辞

稿を終るにあたり、菌株の御分与をいただいた順天堂大学附属病院 小酒井望教授に感謝します。

#### 文 献

- 1) STROMINGER, J. L.; E. WILLOUGHBY, T. KAMIRYO, P. M. BLUMBERG & R. R. YOCUM: Penicillin sensitive enzymes and penicillin-binding components in bacterial cells. *Ann. New York Acad. Sci.* 235: 210~224, 1974
- 2) BLUMBERG, P. M. & J. L. STROMINGER: Inactivation of D-alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 2814~2817, 1971
- 3) CITRI, N. & M. R. POLLOCK: The biochemistry and function of  $\beta$ -lactamase (penicillinase). *Advan. Enzymol.* 28: 237~323, 1966
- 4) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The  $\beta$ -lactamase of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In *Advances in Microbial Physiology*, ROSE, A. H. & D. W.

- Tempest Eds. 9 : 31~85, Academic Press, New York, 1973
- 5) RICHMOND, M.H. & N.A. CURTIS : The interplay of  $\beta$ -lactamase and intrinsic factors in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. Ann. New York Acad. Sci. 235 : 553~568, 1974
  - 6) 山岸三郎 : 腸内細菌群の  $\beta$ -lactamase と R 因子のペニシリナーゼとの関係。薬剤耐性, 三橋進編, p.87~99, 朝倉書店, 1973
  - 7) MIC 測定法改定委員会 (小酒井望他) : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
  - 8) YOKOTA, T.; Y. KANAMARU, R. MORI & T. AKIBA : Recombination between thermosensitive Kanamycin resistant factor and a nonthermosensitive multiple drug resistant factor. J. Bact. 98 : 863~873, 1969
  - 9) LENNOX, E.S. : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage  $\phi$ 1. Virology 1 : 190~206, 1955
  - 10) LAYNE, E. : Protein estimation with the Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 3 : 448~450, 1957
  - 11) ALICINO, J.F. : Iodometric assay of natural and synthetic penicillins, 6-aminopenicillanic acid and cephalosporin C. Analy. Chem. 33 : 648~649, 1961
  - 12) 厚生省薬務局 : ベンジルペニシリンカリウム試験法。日本抗生物質医薬品基準解説, p.347 薬業時報社, 1974
  - 13) 山本達男, 高京子, 横田健 : R 因子によるペニシリン, セフェロスポリン耐性, (1) MIC と  $\beta$ -lactamase 活性の相関性。日本細菌学雑誌29 : 115, 1974

## STABILITY OF CEFTEZOLE AGAINST VARIOUS $\beta$ -LACTAMASES FROM GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA

TOSHIYUKI NEHASHI,\* TATSUO YAMAMOTO,\*\* and TAKESHI YOKOTA\*\*

\*Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

\*\*Department of Bacteriology, School of Medicine,

Juntendo University, Tokyo

A newly devised cephalosporin-derivative, ceftazidime (CTZ), was investigated for its stability to various  $\beta$ -lactamases.

Though about 60% of clinically isolated, ampicillin resistant *E. coli* and *Klebsiella* spp. were found to produce penicillinase type  $\beta$ -lactamase mediated by conjugative R plasmids, CTZ was still highly effective against them because of its nonhydrolysable character by such types of  $\beta$ -lactamase.

On the other hand, some strains of *Ent. cloacae*, *Serratia marcescens* and *Pr. vulgaris* were highly resistant not only to penicillins but also cephalosporin derivatives including CTZ. *Ent. cloacae* Nck-39, one of the resistant strains, was confirmed to produce both plasmid-mediated penicillinase type and chromosomally originated cephalosporinase type  $\beta$ -lactamases, by means of Sephadex G-75, CM-cellulose and DEAE-cellulose column chromatography. CTZ was tolerant to the former  $\beta$ -lactamase but not to the latter one.

CTZ was not hydrolysed also by penicillinase produced by penicillin G resistant *Staph. aureus*, and it showed marked antibacterial effect on that.

It may be concluded that CTZ is one of the excellent chemotherapeutics for infectious diseases caused by ampicillin resistant *E. coli* and *Klebsiella*, and by penicillin G resistant *Staphylococcus* as well.