Mecillinam の *Escherichia coli* に対する抗菌力および β-lactamase に対する態度

小此木研二・木田　誠・土屋皖司・米田雅彦
武田薬品工業株式会社中央研究所

細菌感染症起因菌のうち *Escherichia coli* の占める割合は高い。本菌感染症に対しては Ampicillin が広く使われてきたが，近年臨床分離 *E. coli* 中の Ampicillin 耐性株の割合はきわめて高くなっている。Mecillinam は Ampicillin 耐性菌を含む *E. coli* に強い抗菌力を示す penicillin であり，その特異な構造[1]・作用機作[2~4]の上からも注目されている。

臨床分離 *E. coli* の Penicillin 耐性の主要因が β-lactamase であることは広く知られている[5)6)]ので，Mecillinam の *E. coli* β-lactamase に対する態度とともに主として Ampicillin 耐性株に対する Mecillinam の抗菌力および抗菌力に与える接種菌量の影響について検討した。

実験材料および実験方法

1. 使用菌株

臨床分離 *Escherichia coli* 88株は（TN 629～TN 718）大阪大学附属病院・清水先生より分与された。R-plasmid の受容菌として用いた *E. coli* ML 1410（NA^r, met^-）は群馬大学・三橋教授より分与された。

2. 薬　剤

Mecillinam は武田薬品工業株式会社で合成された。Penicillin-G, Ampicillin, Sulbenicillin, Cephalexin, Kanamycin および Tetracycline は武田薬品工業株式会社の市販品を用いた。Carbenicillin, Cefazolin および Cloxacillin は藤沢薬品工業株式会社より，Cephaloridine および Cephalothin は塩野義製薬株式会社より，Chloramphenicol および Streptomycin は三共株式会社より，Sulfonamide は大日本製薬株式会社よりそれぞれ購入した。Cephacetrile は CIBA-GEIGY より入手した。

3. 抗菌力の測定

Trypticase soy broth（TSB；BBL）で37℃，1夜静置培養した菌液を同培地で1,000倍に希釈し，その1白金耳を2倍希釈濃度系列の薬剤を含む普通寒天培地（栄研）に接種し，37℃で18時間培養後最少発育阻止濃度（MIC）を判定した。接種菌量の影響は10および1,000倍希釈菌液を Nutrient agar (Difco) に接種して調べた。

4. R-plasmid の伝達

R-plasmid の伝達は DATTA らの方法[7)]に準じて行なった。

5. β-lactamase 活性の測定

a）活性測定法：β-'actamase 活性の測定は NOVIC のミクロヨウ素法[8)9)]を以下のように改変して行なった。

基質0.10 ml, 0.5 Mリン酸緩衝液（pH 6.85）0.10 ml および水 0.75 ml に酵素液 0.05 ml を添加して30℃で20分間反応させた後，反応停止液（0.15Mタングステン酸ナトリウムを溶解した2M酢酸緩衝液（pH 4.0））0.5 ml を添加した。対照には反応停止液添加後に酵素液を加えた。次にヨウ素澱粉液（0.04Mリン酸緩衝液（pH 6.0）で調製した0.4%澱粉溶液 100 ml に 10 mM ヨウ素-160 mM ヨウ化カリウム溶液 1.0 ml を用時加えて調製）1.5 ml を加えて室温に20分間（Cefazolin を基質とした場合は30分間）放置した後 620 nm の吸光度を測定した。対照の吸光度との差に各基質のヨウ素消費量より定めた係数（penicillin 類：0.0300, Cephaloridine：0.0481, Cephalothin：0.0475, Cephalexin：0.0325, Cefazolin：0.0229, Cephacetrile：0.0522）を乗じて各基質に対する活性（μ mole of substrate hydrolysed/min.）を求めた。また Km 値は5段階の基質濃度での反応初速度を上記の方法で測定した後 LINEWEAVER & BURK の方法[10)]により求めた。なお，酵素1 unit は30℃，0.05Mリン酸緩衝液（pH 6.85）中で1分間に 1 μ moleの Penicillin-G を加水分解する酵素量とした。

b）酵素産生量の測定：TSB で1夜振とう培養した菌液 0.5 ml を同培地で20倍に希釈し，L 字管中37℃で3時間振とう培養した後，遠心分離して得た菌体を0.01 Mリン酸緩衝液（pH 6.85）で1回洗浄し，5 ml の同緩衝液に懸濁して超音波処理（海上電機4280型，2.2A，5分）した。得られた超音波処理液を酵素液とし，200

μM の Mecillinam および Ampicillin を基質として活性を測定した。なお，超音波処理前に菌体懸濁液の600 nm での吸光度を測定し，あらかじめ調べておいた吸光度と乾燥菌体重量との関係（1 OD_{600}=0.422 mg dry weight/ml）から酵素液が相当する乾燥菌体重量を求め，酵素産生量は乾燥菌体重量当りの酵素活性で表示した。

6. β-lactamase の精製

a）*E. coli* TN713 および TN639 の β-lactamase：NEU らの osmotic shock 法[11] に従って細胞から遊離させた酵素を0.02Mトリス緩衝液（pH 8.0）で平衡化した DEAE-cellulose に吸着させ0.5M食塩を含む同緩衝液で溶出した。溶出液の80%飽和硫酸アンモニウム沈澱画分を0.02M トリス緩衝液（pH 7.5）に溶解し，同緩衝液を用いて Sephadex G-100 のゲル沪過を行なった。次に0.02Mトリス緩衝液（pH 7.5）で平衡化した DEAE-cellulose に吸着させ，0～0.5M食塩の直線的濃度勾配により溶出し，活性のある画分を凍結乾燥して得た粉末を水に溶解した後0.02Mトリス衝緩液（pH 7.5）を用いて Sephadex G-100 のゲル沪過を行なった。

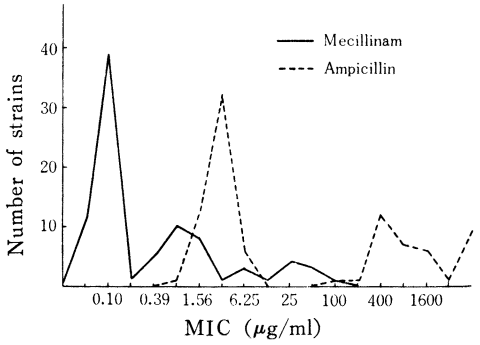
b）*E. coli* TN649の β-lactamase：TSB で培養して得た菌体の超音波処理抽出液に最終濃度60%飽和の硫酸アンモニウムを加えた。得られた沈澱を0.02Mトリス緩衝液（pH 7.5）に溶解し，5%の硫酸ストレプトマイシンを加えて除核酸した後再び60%飽和の硫酸アンモニウムで沈澱させた。沈澱を0.02Mトリス緩衝液（pH 8.5）に溶解し，同緩衝液に対して透析した後同緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose に吸着させ0.02Mトリス緩衝液（pH 8.5）で溶出した。活性画分を凍結乾燥した後0.02Mトリス緩衝液（pH 7.5）を用いて Sephadex G-100 のゲル沪過を行なった。

実験成績

1. 臨床分離 *E. coli* の Mecillinam および Ampicillin 感受性

臨床分離 *E. coli* 88株中50株はいわゆる Ampicillin 感性株で，これらの株に対して Mecillinam は0.03～0.20 μg/ml の濃度で抗菌力を示した。一方 Ampicillin に耐性を示す38株（MIC：100～>3,200 μg/ml）に対する Mecillinam の MIC は0.39～100 μg/ml であった（Fig. 1）。これら38株の Ampicillin 耐性株は Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamide および Kanamycin のうちの1～5剤にも耐性であった。また38株中26株で Ampicillin 耐性が *E. coli* ML1410へ伝達された。

Fig. 1 Distribution of sensitivity of clinically isolated *E. coli* against Mecillinam and Ampicillin



2. Ampicillin 耐性 *E. coli* の β-lactamase

Ampicillin 感性株には β-lactamase 活性は検出されなかったが，38株の Ampicillin 耐性株には全株で β-lactamase 活性が検出された。Ampicillin 耐性株38株中36株（*E. coli* TN713その他）の β-lactamase は三橋らのⅠ型 penicillinase[12]，1株（*E. coli* TN649）のそれはⅡ型 penicillinase[12]，残る1株（*E. coli* TN639）のそれは carbenicillinase 型[13][14] の基質特異性を示した（Table 1，2，3）。

Table 1 Kinetics of hydrolysis of Mecillinam and other β-lactam antibiotics by purified β-lactamase from *E. coli* TN713

Substrate	Vmax*	Km(μM)	Vmax/Km
Penicillin-G	100	20	5.000
Mecillinam	467	5000	0.093
Ampicillin	161	42	3.830
Carbenicillin	12	15	0.787
Sulbenicillin	6	7	0.851
Cloxacillin	2	20	0.113
Cephaloridine	110	645	0.171
Cehalothin	10	196	0.051
Cephalexin	2	1420	0.001
Cefazolin	13	415	0.030
Cephacetrile	19	1090	0.018

* Activity of enzyme used was 2625 units/mg of protein. Vmax is expressed as relative rate of hydrolysis taking the rate for Penicillin-G as 100.

Table 2 Kinetics of hydrolysis of Mecillinam and other β-lactam antibiotics by purified β-lactamase from *E. coli* TN649

Substrate	Vmax*	Km(μM)	Vmax/Km
Penicillin-G	100	2	58.82
Mecillinam	652	8000	0.08
Ampicillin	626	18	34.40
Carbenicillin	67	10	6.50
Sulbenicillin	69	25	2.76
Cloxacillin	186	4	43.26
Cephaloridine	41	120	0.34
Cephalothin	12	25	0.48
Cephalexin	<1	ND**	ND**
Cefazolin	14	18	0.77

* Activity of enzyme used was 9.61 units/mg of protein. Vmax is expressed as relative rate of hydrolysis taking the rate for Penicillin-G as 100.
** Not determined.

Table 3 Kinetics of hydrolysis of Mecillinam and other β-lactam antibiotics by purified β-lactamase from *E. coli* TN639

Substrate	Vmax*	Km(μM)	Vmax/Km
Penicillin-G	100	17	5.814
Mecillinam	17	12200	0.001
Ampicillin	107	39	2.716
Carbenicillin	96	19	5.189
Sulbenicillin	54	12	4.426
Cloxacillin	1	77	0.018
Cephaloridine	17	660	0.026
Cephalothin	1	300	0.002
Cephalexin	<1	ND**	ND**
Cefazolin	1	175	0.005
Cephacetrile	1	480	0.002

* Activity of enzyme used was 1606 units/mg of protein. Vmax is expressed as relative rate of hydrolysis taking the rate for Penicillin-G as 100.
** Not determined.

I型および carbenicillinase 型 β-lactamase による各基質加水分解の Km 値は cephalosporin より penicillin で低いが Mecillinam では極めて高かった。またII型 penicillinase では penicillin および cephalosporin で同程度の Km 値を示し，Mecillinam では前二者と同様極めて Km 値が高かった。

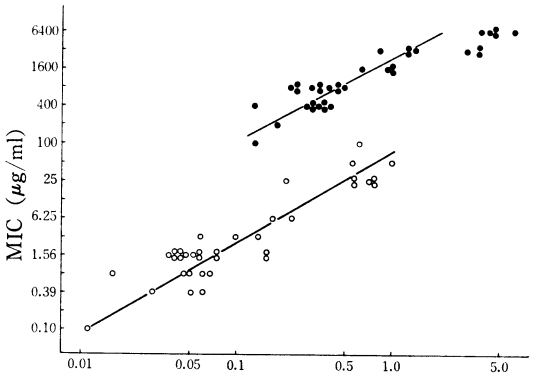
3. β-lactamase 産生量と MIC

Ampicillin 耐性株はすべて β-lactamase を産生したが，その産生量は株により大きく異なり乾燥菌体重量(mg) 当り 0.1～5 unit であった。各株の産生する酵素の Mecillinam および Ampicillin に対する活性と両薬剤の MIC 値とを両対数軸上にプロットすると両者の間には直線関係が得られた (Fig. 2)。

4. 接種菌量の影響と β-lactamase 産生量

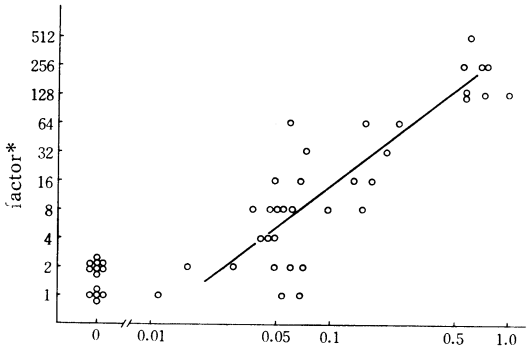
β-lactamase 非産生株に対する Mecillinam の MIC

Fig. 2 Relationship between β-lactamase activity and MIC of Mecillinam and Ampicillin



β-lactamase activity to Mecillinam (○) and Ampicillin (●)
(μ moles of substrate hydrolysed/min./mg dry wt. bacteria)

Fig. 3 Effect of inoculum size on MIC of Mecillinam and β-lactamase activity in *E. coli*



β-lactamase activity to Mecillinam
(μ moles of substrate hydrolysed/min./mg dry wt. bacteria)

* The factor for each strain was calculated as follows : the MIC at 10^{-1} diluted 18-h culture was divided by the MIC at 10^{-3} diluted 18-h culture.

は接種菌量に殆んど影響されなかったが，β-lactamase 産生株では接種菌量の影響が大きかった。この接種菌量が MIC に与える影響は β-lactamase 産生量が少ない株ではわずかであったが，β-lactamase 高産生株では顕著であった (Fig. 3)。

なお，Ampicillin では β-lactamase 産生株でも接種菌量の影響はあまりなく，いずれも高度耐性を示した。

考　　察

臨床検体より得られた88株の *E. coli* のうち43%が Ampicillin 耐性株であり，そのうち68%の株が Ampicillin 耐性を伝達し得ることは臨床分離 *E. coli* 中での Ampicillin 耐性株の重要性を示唆する。これらの Ampicillin 耐性株はすべて β-lactamase を産生し，三橋らのⅠ型 penicillinase 産生株が38株中36株で圧倒的に多く，Ⅱ型 penicillinase 産生株は1株であった。残り1株の産生する酵素は *Pseudomonas aeruginosa* の産生する carbenicillinase 型 penicillinase に基質特異性が酷似していた。carbenicillinase 型 penicillinase の産生は *E. coli* では報告されておらず興味がもたれる。これら3種の β-lactamase により Ampicillin は容易に加水分解されたが，Mecillinam は Km 値が極めて高く基質親和性が低いために薬剤が実際に使用される濃度 (100 μg/ml 以下) では Ampicillin よりはるかに加水分解されにくいことが示唆された。事実 β-lactamase 産生株に対する Ampicillin の MIC は β-lactamase 非産生株に対するそれの100～2,000倍であったのに対し，Mecillinam ではその値は4～500倍であった。一方 Ampicillin 耐性 *E. coli* に対する Mecillinam および Ampicillin の MIC と β-lactamase 産生量の間には相関性が認められた。これらの結果は両薬剤ともその抗菌力が β-lactamase に影響されるが，Mecillinam の方が Ampicillin より β-lactamase の影響を受けにくい事を示唆する。

Penicillin-G 耐性 *Staphylococcus aureus* においては Penicillin-G の MIC 値が接種菌量に大きく影響されるが，これは本菌が産生する β-lactamase が原因と考えられている[15]。*E. coli* に対する Mecillinam の MIC も β-lactamase 産生量の多い株ほど接種菌量に影響されやすく，Penicillin-G 耐性 *Staph. aureus* に対する Penicillin-G の場合と同様，接種菌量による MIC の変動に対して β-lactamase が何らかの形で重要な役割を果している事が明らかである。一方，*Staph. aureus* と *E. coli* の β-lactamase を比較すると，*Staph. aureus* の β-lactamase が誘導酵素で菌体外に放出され，かつ Penicillin-G に極めて高い基質親和性を示すのに対し，*E. coli* の β-lactamase は菌体内構成酵素で Mecillinam に対して極めて親和性が低いなど両者の性質は多くの点で相違がみられる。このことから *Staph. aureus*, *E. coli* に対する Mecillinam の MIC 変動の原因が β-lactamase にあることは共通であるが，β-lactamase がどのように作用して MIC の変動に到るかという細部の機構では両者で異なるものと考えられる。

結　　論

臨床分離 *Escherichia coli* 88株に対する Mecillinam の抗菌力およびこれらの菌の産生する β-lactamase に対する Mecillinam の安定性を Ampicillin と比較検討した。

1. Mecillinam は Ampicillin 感性 *E. coli* に対し Ampicillin より約32倍，また Ampicillin 耐性 *E. coli* に対しては Ampicillin より約512倍強い抗菌力を示した。

2. Ampicillin 耐性 *E. coli* は全て β-lactamase を産生した。これらの株に対して Mecillinam は β-lactamase 非産生株より4～500倍高い MIC 値を示し，Ampicillin は100～2,000倍高い MIC 値を示した。

3. Ampicillin 耐性 *E. coli* では β-lactamase 産生量と Mecillinam および Ampicillin の MIC 値との間に相関性が認められた。

4. Mecillinam は Ampicillin 耐性 *E. coli* の産生する3種類の β-lactamase に対して極めて親和性が低く，これらの酵素による加水分解に対して Ampicillin より安定であった。

5. Mecillinam のMIC 値は Ampicillin 感性株では接種菌量に殆んど影響されなかったが，Ampicillin 耐性株では β-lactamase 産生量の多い株ほど接種菌量に影響された。

本実験期間は昭和49年8月より50年1月までである。

謝　　辞

β-Lactamase の調製に協力して下さった当研究室の宮崎武氏に感謝いたします。

文　　献

1) LUND, F. & L. TYBRING : 6β-Amidinopenicillanic acid - a new group of antibiotics. Nature New Biology 236 : 135～137, 1972

2) PARK, J. T. & L. BURMAN : FL-1060 : A new

penicillin with a unique mode of action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51 : 863~868, 1973

3) MATSUHASHI, S. ; T. KAMIRYO, P. M. BLUMBERG, P. LINNETT, E. WILLOUGHBY & J. L. STROMINGER : Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. J. Bacteriol. 117 : 578~587, 1974

4) JAMES, R. ; J. Y. HAGA & A. B. PARDEE : Inhibition of an early event in the cell division cycle of *Escherichia coli* by FL-1060, an amidinopenicillanic acid. J. Bact. 122 : 1283~1292, 1975

5) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES : The β-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microb. Physiol. 9 : 31~88, 1973

6) RUSSEL-ONISHI, H. ; D. R. DAOUST, S. B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY : Cefoxitin, a semisynthetic Cephamycin antibiotics : resistance to beta-lactamase inactivation. Antimicr. Agents & Chemoth. 5 : 38~48, 1974

7) DATTA, N. ; R. W. HEDGES, E. J. SHAW, R. B. SYKES & M. H. RICHMOND : Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 108 : 1244~1249, 1971

8) NOVICK, R. P. : Micro iodometric assay for penicillinase. Biochem. J. 83 : 236~240, 1962

9) NOVICK, R. P. : Analysis by translocation of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 33 : 121~136, 1963

10) LINEWEAVER, H. & D. BURK : The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56 : 658~666, 1934

11) NEU, H. C. & L. A. HEPPEL : The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem. 240 : 3685~3692, 1965

12) YAMAGISHI, S. ; K. OHARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI : The purification and properties of penicillin β-lactamases mediated by transmissible R factors in *Escherichia coli*. J. Biochem. 66 : 11~20, 1969

13) NEWSOM, S. W. B. ; R. B. SYKES & M. H. RICHMOND : Detection of a β-lactamase markedly active against Carbenicillin in a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 101 : 1079~1080, 1970

14) SAWADA, Y. ; S. YAGINUMA, M. TAI, S. IYOBE & S. MITSUHASHI : Plasmid-mediated penicillin beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicr. Agents & Chemoth. 9 : 55~66, 1976

15) SABATH, L. D. ; C. GARNER, C. WILCOX & M. FINLAND : Effect of inoculum and of beta-lactamases on the anti-Staphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. Antimicr. Agents & Chemoth. 8 : 344~349, 1975

MECILLINAM, ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND RESISTANCE TO β-LACTAMASE INACTIVATION

KENJI OKONOGI, MAKOTO KIDA, KANJI TSUCHIYA and MASAHIKO YONEDA
Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

Resistance of mecillinam to hydrolysis by β-lactamase from *Escherichia coli* was examined in relation to the antibacterial activity against 88 clinical isolates of *E. coli*.

1) Mecillinam exhibited approximately 32 times stronger antibacterial activity against ampicillin sensitive strains and approximately 512 times stronger activity against ampicillin resistant strains than ampicillin.

2) All strains of *E. coli* resistant to ampicillin produced β-lactamase. The MIC of mecillinam against those strains was 4~500 times higher than that against β-lactamase non-producing strains. While, the MIC of ampicillin against β-lactamase producing strains was 100~2,000 times higher than that against β-lactamase non-producing strains.

3) There was correlation between the amount of β-lactamase produced by ampicillin resistant strains and the susceptibility of the strains to mecillinam and ampicillin.

4) Three different types of β-lactamase produced by ampicillin resistant strains of *E. coli* showed extremely lower affinity to mecillinam than to ampicillin, and then mecillinam was more resistant to hydrolysis by these enzymes than ampicillin.

5) Although the MIC of mecillinam was not significantly influenced by the inoculum size in ampicillin sensitive strains of *E. coli*, in ampicillin resistant strains it was strongly influenced proportionally to the amount of the β-lactamase produced.