

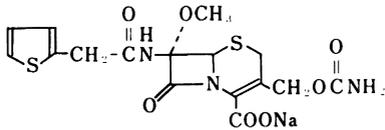
Cefoxitin の各種 β -ラクタマーゼに対する安定性と β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌作用

澤井哲夫・高橋郁子・山岸三郎

千葉大学薬学部微生物薬品化学教室

Cefoxitin (CFX) は米国メルク研究所 (MSDRL) において開発されたセファマイシン系の新 β -ラクタム抗生物質である¹⁾。本抗生物質は微生物に対する抗菌作用の生化学的機序において従来の β -ラクタム抗生物質と本質的に同一と考えられるが、Fig. 1 に示すようにセファロsporin母核の7位にメトキシ基を有し従来のセファロsporin系抗生物質と化学構造上異なるだけでなく、 β -ラクタマーゼに対し安定と報告されている²⁾。このような β -ラクタマーゼ、とくに cephalosporin β -lactamase (セファロsporinナーゼ, CSase) に対する安定性は従来の多くのセファロsporin系抗生物質には見られないものである。

Fig. 1 Chemical structure of sodium cefoxitin



一方、微生物の産生する β -ラクタマーゼはその基質特異性、物理化学的性質、産生様式においてきわめて変化に富む酵素群である。CFX の β -ラクタマーゼに対する安定性の確認は更に多種の β -ラクタマーゼ、とくに CSase について検討が必要と考えられる。临床上 CFX の主要な対象であるグラム陰性菌の産生する6種の β -ラクタマーゼに対する CFX の安定性を、Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC), Cephalothin (CET), Cefazolin (CEZ) を比較薬剤として検討した。またグラム陰性菌の中でおもに当研究室においてその産生する β -ラクタマーゼの性質とその産生量のよく調べられている8菌種、18株について、CFX の β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力を比較薬剤と共に検討した結果も合わせて報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株：使用菌株は *Escherichia coli* 5株, *Klebsiella pneumoniae* 2株, *Citrobacter freundii* 3株, *Serratia marcescens* 1株, *Proteus mirabilis* 2株, *Pr. vulgaris* 2株, *Pr. morganii* 2株, *Pr. rettgeri* 1株の計18株である。*E. coli* W 3630 を除いてい

ずれも人病巣由来株である。使用菌株中 β -ラクタマーゼ非産生株として用いられた *E. coli* W 3630 以外はいずれも penicillin β -lactamase (ペニシリナーゼ, PCase) または CSase 産生菌である。Table 2にこれら菌株の β -ラクタマーゼ活性値と基質特異性に基づく分類 (PCase 又は CSase) を示す。*E. coli* W 3630 RGN 823, *E. coli* W 3630 RGN 14, および *E. coli* W 3630 RGN 238 はいずれも ABPC 耐性 R プラスミドの感染菌であり、プラスミド支配の PCase を産生する。RGN 823, RGN 14 支配の PCase は I 型 PCase³⁾⁴⁾, RGN 238 支配の PCase は II 型 PCase³⁾ である。その他の菌株の産生する β -ラクタマーゼは菌種特異的 (クロモソーム支配) β -ラクタマーゼである⁵⁾。

2. 使用薬剤： β -ラクタム抗生物質は ABPC (明治製薬), CBPC, CEZ (藤沢薬品), CET (塩野義製薬) および CFX (MSDRL) を使用した。

3. 使用培地：薬剤感受性測定には heart infusion (HI)-寒天 (栄研) を使用した。菌の前培養および菌液の希釈は HI broth (栄研) を使用した。 β -ラクタマーゼ試料を得るための菌培養は HI broth を用いた。

4. 薬剤感受性測定：HI-寒天を用いて寒天平板希釈法で測定した。薬剤濃度は 1,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を最高濃度とし、以下順次 2 倍希釈を行ない最低薬剤濃度を 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。被験菌株の HI broth, 37°C 18 時間培養液 (約 3×10^8 cells/ml) を HI broth で 100 倍に希釈し、希釈菌液 1 白金耳を薬剤含有平板に接種した。接種平板を 37°C 18 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

5. β -ラクタマーゼ試料の調製：*E. coli* W 3630 RGN 823, *E. coli* GN 206, *C. freundii* GN 346, *Pr. vulgaris* GN 76, *Pr. morganii* 1510 および *Ser. marcescens* GN 629 の 6 菌株からそれぞれ β -ラクタマーゼ試料を調製した。

使用菌株の HI broth 37°C 18 時間培養菌液 100 ml を HI broth 1 L に加え、37°C 約 4 時間振盪培養後、菌体を遠心集菌 (6,000 \times g, 15 分) した。ただし, *Pr. vulgaris* と *Ser. marcescens* は誘導性の CSase を産生するため振盪培養開始約 2 時間後に誘導物質としてベンジルペニシリンを 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培養菌液に添

加した。集菌菌体を生食リン酸 buffer で1回洗った後 0.1M リン酸 buffer (pH 7.0) 約 20 ml に懸濁し、氷冷下 3 分間ソニケーター (20 kc) 破碎した。破碎菌液の遠心上清 (102,000 g, 30分) に硫酸ストレプトマイシンを終濃度 2% となるように添加し、除核酸処理を行なった。90,000×g, 30分遠心後、遠心上清の Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過 (溶出液, 0.1M リン酸 buffer, pH 7.0) を行ない β -ラクタマーゼ活性分画を集め酵素試料とし以下の実験に用いた。

6. β -ラクタマーゼ活性測定法: β -ラクタマーゼ活性の測定は SARGENT のヨード法⁶⁾の沢井らによる改良法⁷⁾を用いた。より高感度を要する β -ラクタマーゼ活性の測定には NOVICK のマイクロヨード法⁸⁾の改良法を用いた。

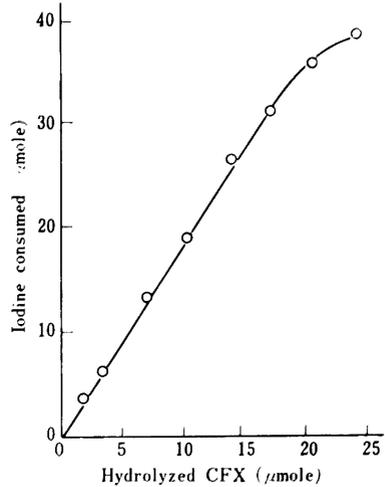
7. CFX の加水分解物の調製: CFX の β -ラクタム環加水分解物のヨード消費量を求めるための CFX 加水分解物は次の方法により調製した。CFX 100 μ mole を含む 0.2 N NaOH 溶液 5 ml を 30°C 20分間加温後、ただちに氷冷下 0.2 N HCl で中和した。加水分解が量的に行なわれたことは、加温後10分から30分まで反応液のヨード消費量が一定値であったこと、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を指示菌とする bioassay 法で加水分解溶液の抗菌活性が全く観察されないことにより確認した。

II. 実験成績

1. CFX を基質とする β -ラクタマーゼ活性測定法: ヨード法による β -ラクタマーゼ活性測定法の原理はペニシリン、セファロスポリンの β -ラクタム環加水分解物が一定条件下でヨードを定量的に還元することを利用したものである。加水分解物のヨード消費当量 (1分子の加水分解物が消費するヨードの分子数) は各ペニシリン、セファロスポリンにより異なり、それぞれ実験的に決定しなければならない。CFX のヨード消費当量を求めるため、上記の方法で CFX の定量的加水分解物を得、ついで沢井ら⁷⁾の方法に従い CFX の加水分解物のヨード消費当量を測定し、1.9の値を得た。但し、CFX 加水分解物とヨードの反応条件は室温、10分である。Fig. 2 に CFX 加水分解物の量と消費されるヨード量との関係を測定した結果を示す。40 μ mole のヨード量 (SARGENT 改良法で用いられるヨード量) の約80%が消費されるまで CFX 分解物の量とヨード消費量は直線的な相関を示し、CEX を基質とする β -ラクタマーゼの活性測定にヨード法が適用できることを示している。

2. CFX の各種 β -ラクタマーゼに対する安定性: R プラスミド支配の I 型 PCase, および 5種の菌種特異的 CSase を用いて、CFX, ABPC, CBPC, CET, CEZ の *in vitro* における安定性を検討した結果を Fig. 3 に示

Fig. 2 The relationship between the amount of the hydrolyzed cefoxitin and the consumption of iodine



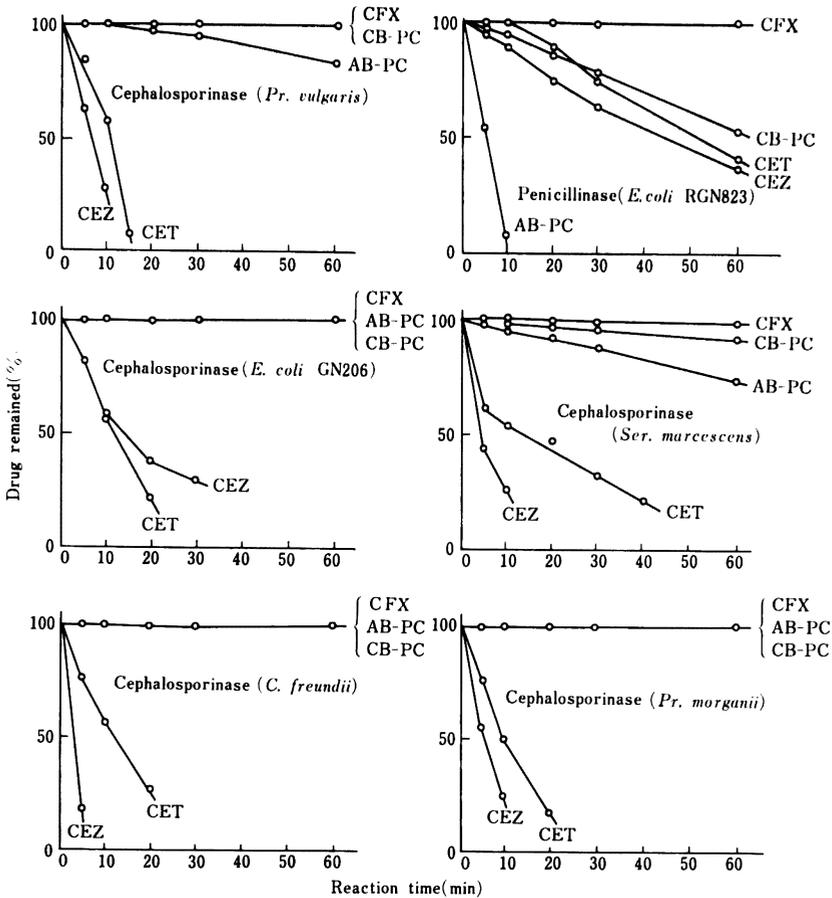
す。

I 型 PCase に対して ABPC は最も安定性が低く、次いで CFZ, CET, CBPC がほぼ同程度の安定性を示すが、いずれも PCase により分解される。I 型 PCase は基質特異性から PCase として分類されるが、グラム陽性菌の PCase と異なりかなり強い CSase 活性を持つことが知られている。CFX は I 型 PCase に対してきわめて安定であり、酵素反応 60分後も SARGENT 改良法で分解が検出できなかった。5種の CSase に対して CET, CEZ はきわめて不安定であった。グラム陰性菌の CSase は一般に PCase 活性が弱く、特に半合成ペニシリンに対してはほとんど活性を示さないが *Pr. vulgaris*, *Ser. marcescens* の CSase は比較的広い基質特異性をもつ β -ラクタマーゼである。CFX はいずれの CSase にもきわめて安定であり酵素 60分後でも加水分解物は検出されなかった。

Fig. 3 に示した安定性の測定は基質濃度 8mM で行なわれた。これは通常酵素反応の基質濃度としては特に高くはないが、薬剤の生体内濃度に比較するときわめて高い濃度である。Table 1 に生理的薬剤濃度に近い基質濃度における CFX の 5種の β -ラクタマーゼに対する安定性を微量活性測定法を用いて測定した結果を示す。CFX の分解率は同一条件下で測定した CET の分解速度を 100% とした時の相対的分解速度で示した。低基質濃度においても 5種の β -ラクタマーゼによる CFX の分解速度は CET の 1% 以下でありきわめて安定であった。

3. 各種 β -ラクタマーゼ産生菌に対する CFX の抗

Fig. 3 Kinetics of hydrolysis of five β -lactam antibiotics by various kinds of β -lactamases



The enzyme reaction was carried out at 30 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 8 mM of substrate. Ten to 20 units of β -lactamase activity per 20 ml of the reaction mixture was employed, and the amount of hydrolyzed substrate was assayed by a modified method of Sargent's method.

菌作用：PCase 産生菌 7 株，CSase 産生菌 10 株および *E. coli* W 3630 に対する CFX と比較薬剤の MIC 値を Table 2 に示した。

E. coli W 3630 RGN 823, *E. coli* W 3630 RGN 14 は I 型 PCase を産生し、互いに PCase 産生量のみが異なる菌株である。他菌種においても同一菌種内で β -ラクタマーゼ活性値の異なる菌株は酵素化学的にほぼ同等の β -ラクタマーゼの産生量のみ異なるものである。 β -ラクタム抗生物質の MIC 値は、薬剤の β -ラクタマーゼ安定性、菌体表層透過性、薬剤作用点の性質によって変動すると考えられる。透過性、作用点の性質は菌種差が大きいが、同一菌種内では菌株間の差は少ないと考えられる。同一菌種内での β -ラクタマーゼ活性値の異なる菌株間の MIC 値の差は、主に薬剤の β -ラクタマ

ーゼに対する安定性を反映すると考えられる。ABPC, CBPC は菌の PCase 産生量が増加するに従い著しくその抗菌作用が低下する。また CSase 産生菌についても同様の傾向が見られる。CET, CEZ は PCase 産生菌に対して強い抗菌作用を示すが、CSase 産生菌に対してはその抗菌力は著しく低下する。CFX は *C. freundii* GN 346 のような極度に多量の CSase を産生する菌と *E. coli* GN 206 を除いては PCase 産生菌にも CSase 産生菌にも強い抗菌作用を示した。

考察および結論

CFX は R プラスミド支配の I 型 PCase, *E. coli*, *C. freundii*, *Pr. vulgaris*, *Pr. morganii*, *Ser. marcescens* の 5 種の菌種特異的 CSase のいずれによってもほとんど分解を受けなかった。この安定性は基質濃度 8mM に

Table 1 Rates of hydrolysis of cefoxitin at low concentration

Type of β lactamase (Source of enzyme)	Relative rate of hydrolysis ^{a)} of cefoxitin
Penicillinase (<i>E. coli</i> W3630 RGN823)	0.94 %
Cephalosporinase (<i>E. coli</i> GN206)	0.09
Cephalosporinase (<i>C. freundii</i> GN346)	0.26
Cephalosporinase (<i>Pr. morgani</i> 1510)	0.07
Cephalosporinase (<i>Ser. marcescens</i> GN629)	0.001

^{a)} The rates of hydrolysis were determined by a modified micro-iodometric method at 30° C and pH 7.0, with substrate concentration of 100 μ M (about 45 μ g/ml). The rates are relative and expressed as the percentage of hydrolysis of cephalothin.

Table 2 Relationship between β lactamase activity and levels of resistance to β lactam antibiotics in Gram-negative bacteria

Organisms	β lactamase activity ^{a)} (units/mg dry wt. of bacteria)						
	PCase	CSase	CEZ	CET	CFX	ABPC	CBPC
<i>E. coli</i> W3630 RGN823	16.7		3.2	12.5	0.8	>1,600	\geq 1,600
<i>E. coli</i> W3630 RGN14	0.60		1.6	3.2	0.8	400	\geq 1,600
<i>E. coli</i> W3630 RGN238	0.025		0.8	6.3	1.6	200	800
<i>E. coli</i> W3630	<0.003		1.6	6.3	1.6	1.6	1.6
<i>E. coli</i> GN206		0.25	50	800	50	50	50
<i>K. pneumoniae</i> GN69	0.92		3.2	6.3	6.3	800	\geq 1,600
<i>K. pneumoniae</i> GN118	0.047		1.6	3.2	3.2	100	200
<i>Pr. mirabilis</i> GN79	0.73		12.5	12.5	12.5	800	\geq 1,600
<i>Pr. mirabilis</i> GN310	0.017		6.3	—	1.6	12.5	0.8
<i>C. freundii</i> GN346		24.2	800	\geq 1,600	200	200	200
<i>C. freundii</i> GN346 16-10		1.1	100	\geq 1,600	12.5	50	6.3
<i>C. freundii</i> GN346 16		0.067	3.2	12.5	1.6	1.6	1.6
<i>Pr. vulgaris</i> GN76		0.29 ^{b)}	25	100	1.6	100	6.3
<i>Pr. vulgaris</i> GN106		0.013 ^{b)}	1.6	3.2	1.6	3.2	0.8
<i>Pr. morgani</i> 1510		2.68	50	\geq 1,600	3.2	100	12.5
<i>Pr. morgani</i> GN125		0.92	100	400	3.2	6.3	0.8
<i>Pr. rettgeri</i> GN624		1.05	100	100	3.2	50	3.2
<i>Ser. marcescens</i> GN629		0.66 ^{b)}	800	\geq 1,600	12.5	800	800

^{a)} One unit of the enzyme activity is expressed as 1 μ mole substrate hydrolyzed/min at 30° C and pH 7.0. Penicillinase activity was determined with benzylpenicillin as substrate. For cephalosporinase activity, cephaloridine was employed as substrate.

^{b)} The value is that of specific cephalosporinase activity of the cells induced with 100 μ g/ml of benzylpenicillin.

においても、また生理的薬剤濃度に近い低濃度 (100 μ M) においても確認された。これに対し ABPC, CBPC は PCase によって、CET, CEZ は CSase によって容易に加水分解を受けた。

β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌作用では、CFX は β -ラクタマーゼ産生量の多少による MIC 値の変動が比較薬剤に比べてきわめて小さく、*in vitro* において見られた β -ラクタマーゼに対する特性をよく反映した。すべての PCase 産生菌株、大部分の CSase 産生菌株に対して CFX は 12.5 μ g/ml 以下の濃度で増殖を阻止した。しかし、*C. freundii* GN 346 のように多量の CSase を産生する菌株に対してその抗菌力は低い。*C. freundii* の CSase は CFX をほとんど分解できないので、この CFX 耐性が CSase による CFX の積極的な加水分解の結果とは考え難い。グラム陰性菌の β -ラクタマーゼは一般に β -ラクタム抗生物質の作用点に近いペリプラズムに局在する。ペリプラズム内の多量の CSase によって、CFX の作用点への接近が阻害されることが考えられる。*E. coli* GN 206 において観察されたように比較的低い CSase 活性にもかかわらず CFX に耐性を示す例と共に、これらの CFX 耐性の機構は今後検討を要する。

なお、以上の検討は、昭和50年6月から51年3月にかけて実施されたものである。

文 献

- 1) KARADY, S.; I. M. WEINSTOCK, F. E. ROBERTS, G. S. BRENNER, A. M. HOINOWSKI, T. Y. CHENG & M. SLETZINGER: Semisynthetic cephamycins via a novel acyl exchange reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* 95: 1410~1411, 1972
- 2) ONISHI, H. R.; D. R. DAoust, S. B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 5: 38~48, 1974
- 3) YAMAGISHI, S.; K. OHARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI: The purification of penicillin β -lactamases mediated by transmissible R factors in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 66: 11~20, 1969
- 4) SAWAI, T.; K. TAKAHASHI, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Variant of penicillinase mediated by an R factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104: 620~629, 1970
- 5) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of β -lactamases in Gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. *Jap. J. Microbiol.* 12: 423~434, 1968
- 6) SARGENT, M. G.: Rapid fixed-time assay for penicillinase. *J. Bacteriol.* 95: 1493~1494, 1968
- 7) 沢井哲夫, 高橋郁子, 山岸三郎: β -ラクタマーゼ活性測定法 Sargent 法の各種 β -ラクタム抗生物質への適用。日本細菌学雑誌 31: 161, 1976
- 8) NOVICK, R. P.: Microiodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962

STABILITY OF CEFOXITIN AGAINST VARIOUS β -LACTAMASES AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE DRUG AGAINST β -LACTAMASE-PRODUCING BACTERIA

TETSUO SAWAI, IKUKO TAKAHASHI and SABURO YAMAGISHI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Cefoxitin, a new semisynthetic cephamycin, was investigated for its stability against β -lactamases and for its antibacterial activity against β -lactamase-producing bacteria. Cefoxitin was highly stable to all β -lactamases tested, *i.e.*, type I penicillinase of R plasmid, species-specific cephalosporinases of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus morgani*, *Proteus vulgaris* and *Serratia marcescens*. The enzymatic hydrolysis of cefoxitin could not be detected at the substrate concentration of 8 mM, though ampicillin, carbenicillin, cephalothin and cefazolin were rapidly hydrolyzed by penicillinase or cephalosporinases under the same experimental conditions. The stability of cefoxitin was also confirmed at a lower substrate concentration of 100 μ M. Cefoxitin showed a high antibacterial activity against all penicillinase-producing strains of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*, and also against a majority of cephalosporinase-producing strains of *C. freundii*, *Pr. morgani*, *Pr. vulgaris* and *Ser. marcescens*. However, a strain of *C. freundii* producing an extremely large amount of cephalosporinase, and an *E. coli* strain producing a cephalosporinase, showed resistance to cefoxitin.