

β-lactam 薬 剤 の 抗 菌 力

とくに β-lactamase に対する安定性について

横 田 健
順天堂大学医学部細菌学教室

(昭和 54 年 2 月 28 日受付)

はじめに

原核細胞という特異な構造の細菌細胞はその形と固さを保つため細胞壁に murein と呼ばれる、アセチルグルコサミンとペプチドから成る高分子物質をもっている。β-lactam 薬剤と総称される penicillin 類 (PC) と cephalosporin 類 (CES) はこの murein 生合成の最終段階を抑えるので、その作用を受けた細菌は細胞壁の固さを保つことができなくなり自己融解をおこして殺菌される。しかも人体細胞は細胞壁をもたないので β-lactam 薬剤の影響をうけず、薬物アレルギーを注意すれば安全な化学療法剤といえる。このように人体細胞に作用点がない抗菌物質を質的選択毒性 (qualitatively selective toxicity) のある化学療法剤というが、β-lactam 薬剤はこれに属する数少ないものの一つである。

元来、β-lactam 薬剤の抗菌力はグラム陽性菌では細胞質膜にある作用点 (murein transpeptidase) に対する阻害効果の強弱に左右されるが、グラム陰性菌は細胞の最外層に外膜 (outer membrane) といわれる余計なものがあり、これが分子量数百以上の物質透過に関係するので、この群の菌に対しては作用点における阻害効果のほか、外膜の通り易さが β-lactam 薬剤の抗菌力に深い関係がある。PC や CES のうち一部のものだけがグラム陰性桿菌にも有効なのはこのためで、それを広域 β-lactam 薬剤という。

さて、PCG や ampicillin (ABPC) が感染症の治療に応用された当初は以上の 1 つまたは 2 つの要因が薬剤の抗菌力を決める主なものであったが、長い間の臨床使用の結果耐性菌が増加した今日では耐性菌の産生する β-lactam 薬剤加水分解酵素すなわち β-lactamase に対する安定性 (加水分解され難さ) もこれからの β-lactam 薬剤には欠くことのできない重要な性質である。

現在においては、優れた β-lactam 薬剤とは抗菌力に関係して少くとも上記の (1). 作用点 (murein transpeptidase) に対する強い阻害作用, (2). 良好なグラム陰性菌外膜の通過性, (3). β-lactamase に対する高

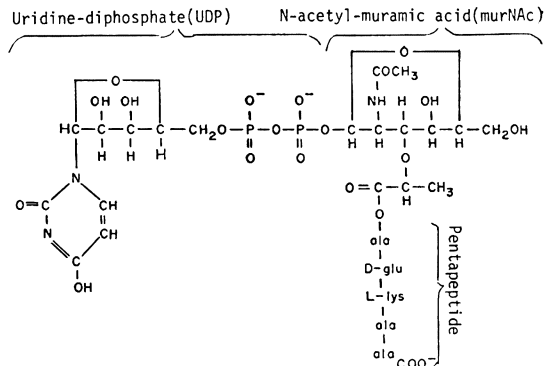
い安定性 (水解され難さ) の 3 つの性質を兼ねそなえなければならぬ。

1. β-lactam 薬剤の murein transpeptidase に対する阻害作用: PC 結合蛋白群への親和性

青かびの代謝産物がブドウ球菌をとかす現象を見出したのが PC 発見のいとぐちになっているので (FLEMING, 1929 年)¹⁾, この薬が菌の細胞壁合成阻害に関係しているらしいことは早くから形態学的に想像されていた。

すでに PC が実用化されて 5 年後の 1946 年には DUGUID²⁾ が PC の抗菌力発現には菌が増殖可能な条件下にあることが必要であり、増殖阻止濃度以下の薬剤加培地に培養された菌細胞の形態変化からその作用点は細胞壁合成経路にあるであろうことを明らかにしている。しかし作用点のくわしい究明の手がかりをつかむにはその後 10 年の研究期間を要し、PARK^{3,4,5)} や STROMINGER⁶⁾ の努力により PC で増殖が阻止されたブドウ球菌が培地中に細胞壁 murein の前駆体である UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide (Fig. 1) 等を蓄積することがわかった (1952~1959 年)。さらにその後 PC は murein

Fig. 1 PARK-STROMINGER nucleotide that accumulates in penicillin-treated *Staphylococcus aureus*

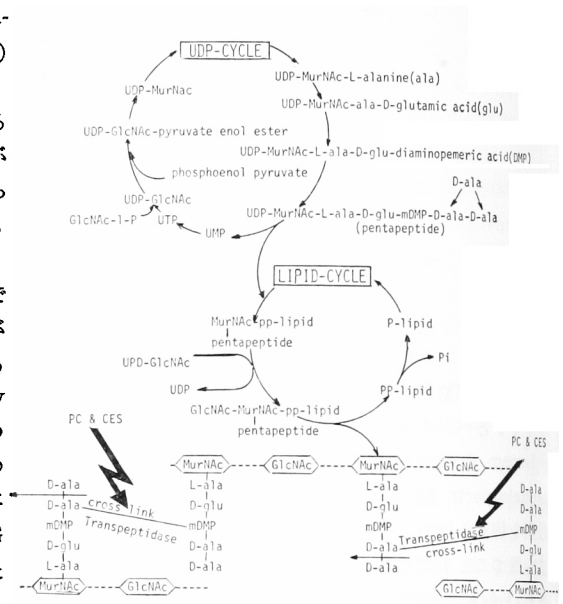


(PARK & STROMINGER SCIENCE 125:99, 1957)

のモノマーである N-acetyl-glucosaminyl-N-acetyl-muramyl-pentapeptide のペプチド末端 D-alaninyl-D-alanine にその立体構造が似ているため⁷⁾, それが murein ポリマーに組み込まれたあと, 隣接の pentapeptide との間で形成される架橋結合 (cross linking) を阻害し, 細胞壁合成を抑えることが明らかにされ⁸⁾, 抽出された大腸菌の murein モノマーをダイマーにする酵素, transpeptidase-D-alanine carboxypeptidase が PC 作用の標的酵素 (target enzyme) であると考えられるに至った (IZAKI, MATSUHASHI & STROMINGER, 1966 年)⁹⁾.

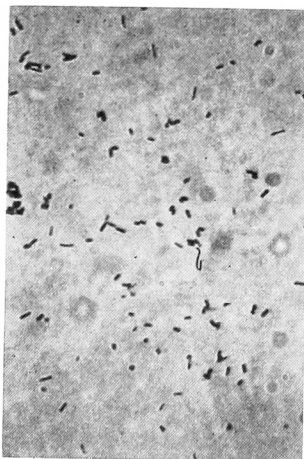
その後 STROMINGER は細胞壁 murein が固さだけでなく, 菌の形も決めていることに注目し, PC の作用点が複数存在する可能性を指摘し, 菌の細胞質膜に存在する PC に結合性の高い蛋白群を affinity chromatography とゲル電気泳動で解析した結果, 枯草菌には 5 種類の PC 結合蛋白が存在することを明らかにした^{10,11)}. この方法は複雑であったため普及しなかったが, 1975 年 SPRATT^{12,13)}が大腸菌の細胞破碎液の膜画分に ¹⁴C-PCG を作用させたあと, 表面活性剤で膜をとかし, 遊離した PC 結合蛋白群をアクリルアミド平板電気泳動で分け, これを蛍光ラヂオオートグラフィーで見る方法を開発して以来, この分野の研究は急速に進展した. その結果, 大腸菌には PC 結合蛋白として, 菌細胞伸長時合成される murein の架橋結合を司ると考えられる 1a と 1b, 特有の細胞形態に必要な murein に関係する 2, 隔壁 (septum) の murein 合成に要する 3, まだ役目が明らかでない 4, 5 および 6 の少くとも 3 種以上が存在する

Fig. 2 Pathway of biosynthesis of the peptidoglycan in *Escherichia coli* and site of action of penicillins and cephalosporins

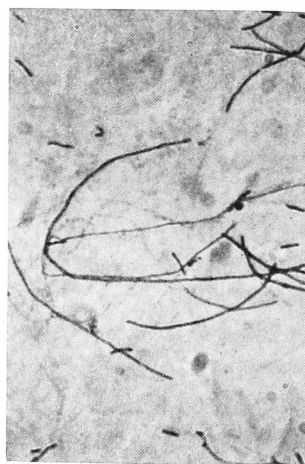


ことが知られた. また先に PC の標的酵素と考えられた transpeptidase-D-alanine-carboxypeptidase 1A と 1B は PC 結合蛋白 4 および 5, 6 に相当するが, その後の松橋^{14,15)}ら, 広田¹⁶⁾らの研究から, それらを欠く変異菌でも正常に細胞壁合成がおこなわれ, PC にも感受性を示すことがわかり, 真の作用点でないと考えられるに至った. したがって現在では大腸菌の PC の標的酵素は

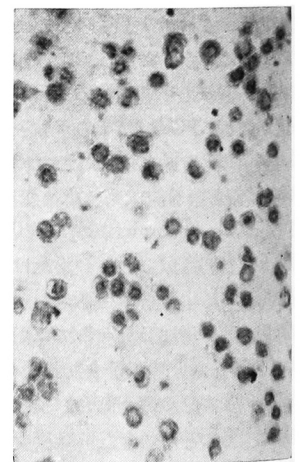
Fig. 3 Morphological changes of the cells of *Escherichia coli* induced by β -lactams



Grown without drugs



Grown with 1/8 MIC of cefuroxime that has strong affinity to PC-binding protein 3 required for the septum formation



Spheroplasts induced by 100 µg/ml of PCG in the presence of 20% sucrose and 0.2% MgCl₂

C 結合蛋白 1a, 1b, 2 および 3 と理解され、これを上記の murein モノマーをダイマーにする transpeptidase-D-alanine-carboxypeptidases と区別し、murein transpeptidases と呼んでいる。しかしまだ酵素として単離されていない (Fig. 2)。

CES の作用点も PC のそれとほぼ同じと考えられているが、大腸菌では 7 種の PS-CES 結合蛋白に加え、1 種以上の CES 結合蛋白の存在が示唆されている¹⁷⁾。

これらの PC-CES または CES 結合蛋白群に対する β -lactam 薬剤の親和性は誘導体毎に差が認められ、薬添加でおきる菌細胞の形態変化を良く説明することが出来る (Fig. 3)。一般に PC-CES 結合蛋白 1 (特に 1b) の親和性の高い薬剤は殺菌力が強く、またこのような薬の低濃度 (MIC 以下) 存在下で増殖した菌は血清 (特補体) の殺菌効果をうけ易いことが著者らの研究からかった¹⁸⁾。

Fig. 4, 5 および 6 に開発中の新 CES, cefuroxime (CXM), cefoxitin (CFX), cefmetazole (CMZ), 6059 S および FK 749 を 1~25 $\mu\text{g/ml}$ 大腸菌の膜画分に加え、0°C で 2~10 分間結合させたあと、さらに ^{14}C -PCG を 30°C, 10 分反応させた時の競合結合による PC-CES 結合蛋白群の電気泳動パターン変化を蛍光ラジオオートグラフィーで示した*。一般に CES は 1a と 3 に高い親和性を示すが、側鎖の変化によって微妙な差があり、 α 位に methoxy 基 ($-\text{OCH}_3$) を持つ CFX, CMZ, 059 等は 1a と 3 に加えて 4, 5, 6 に親和性が強く、Z の 2 位に methoxyimino ($=\text{NOCH}_3$) のある誘導体、例えば CXM, HR 756, FK 749 等は他に比べて 1b に対する親和性が高いように見える*。したがってこのような薬剤は殺菌力が優れているのみならず、低濃度の存在下で増殖した菌は血清により殺菌され易いた

め、生体内での効果が特に良いことも想像される (Fig. 7)。今後研究が進めば PC-CES 結合蛋白への親和性と薬剤の化学構造との関係がわかり、この方向からの drug design が可能となる時が来ることを期待したい。

大腸菌以外の PC-CES 結合蛋白と薬剤親和性に関する研究はまだ少いが、斎藤¹⁸⁾らはインフルエンザ菌の PC 結合蛋白をしらべ、3 が 2 種類あることを報告し、NOGUCHI¹⁹⁾らは緑膿菌の PC 結合蛋白は 7 種類で 3 と 4 が各々 2 本のバンドに別れ、抗緑膿菌新 PC, apalcillin (APPC) に対し、1a と 3 が強い結合親和性を示すという。また RODRIGUEZ ら²⁰⁾は淋菌の PC 結合蛋白は 8 画分に別れ、人工 PC 耐性株 (β -lactamase 非産性) は感受性株にくらべ PC 結合蛋白の PC に対する親和性が低下していることを明らかにした。

Fig. 4 Competition of cefuroxime (CXM) and cephaloridine (CER) for penicillin binding proteins of *Escherichia coli*

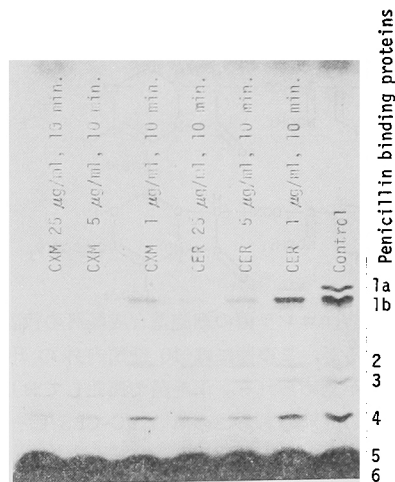
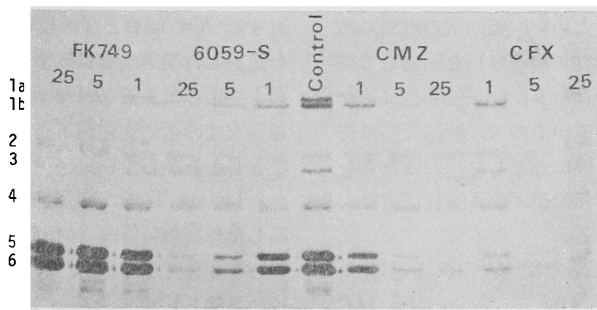
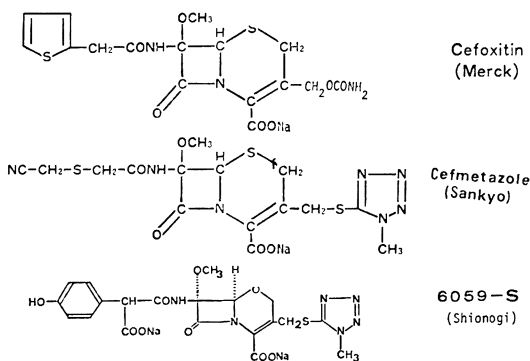


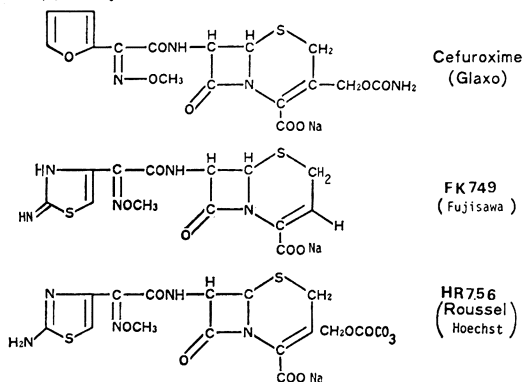
Fig. 5 Competition of various cephalosporin derivatives for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*



Indicated amounts ($\mu\text{g/ml}$) of drugs were incubated for 10 min. at 30°C prior to the addition of ^{14}C -PCG. (SEKIGUCHI & YOKOTA, 1979*)

Fig. 6 New, β -lactamase tolerant-derivatives of cephalosporin and related chemicals1. 7- α -methoxy-derivatives

2. 7-Z(2)-methoxyimino-derivatives



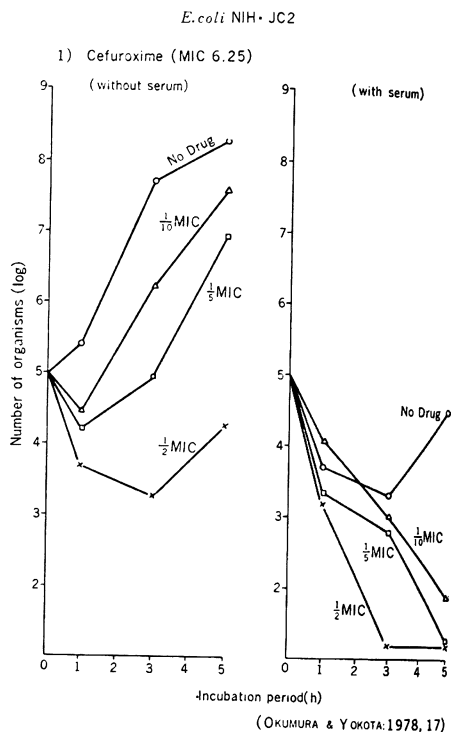
著者ら²¹⁾はコレラ菌の細胞壁合成経路の代謝調節を研究中であるが、この菌には 10 種類内外の PC-CES 結合蛋白群が認められる。単毛菌で彎曲しており細胞に前後と腹背の区別のあるこの菌の PC-CES 結合蛋白群が大腸菌のそれより複雑なことは、murein 合成酵素の分化と関連して興味深い*。

2. β -lactam 薬剤のグラム陰性桿菌の外膜通過性

グラム陰性菌には細胞壁の外側に外膜 (outer membrane) がある²²⁾。この構造物は分子量数百以上の物質が菌体内に入る時の第一の関所で²³⁾、その物質透過の性質を通過性 (penetrability) といい、細胞壁の内側にある細胞質膜の物質透過性 (permeability) と区別して呼ばれる場合が多い²⁴⁾。前述の PC-CES の作用点 (結合蛋白群) は細胞膜上に結合しているので、細胞質膜の透過性制御はうけないが²⁵⁾、外膜は通過しなければならないので、これを通り易い薬剤だけがグラム陰性桿菌にも優れた抗菌力を示すことになる。

1961 年最初の広域 PC, ampicillin (ABPC) が開発されて以来²⁶⁾、hetacillin (IPABPC), ciclacillin (AC PC), carbenicillin (CBPC), sulbenicillin (SBPC), amoxicillin (AMPC), talampicillin (TAPC), car-

Fig. 7 Influence of 7-Z(2)-methoxyimino derivatives of cephalosporin on the bactericidal effect of the fresh sheep-serum



fecillin (PCBPC) 等続々実用化されたが、これらのものはたまたまグラム陰性桿菌にも強い抗菌力を示すことが見出されたもので、薬剤の化学構造と外膜通過性の関係はわからない。

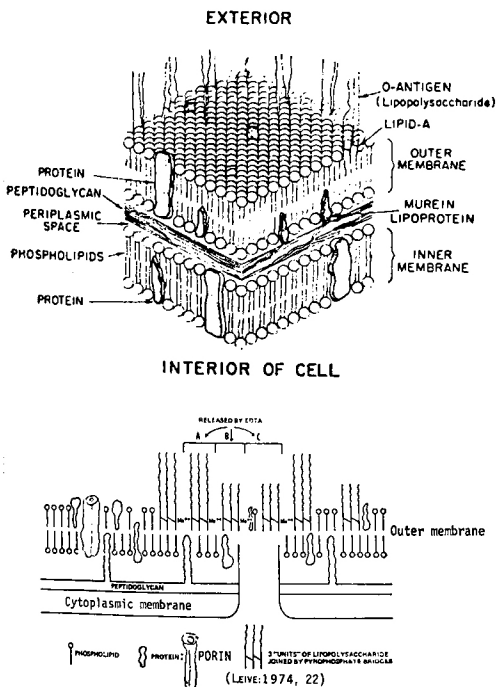
また β -lactam 薬剤の外膜通過度を正確に測定する方法もまだ確立されておらず、RICHMOND と CURTIS²⁴⁾ は β -lactamase 産生グラム陰性桿菌の細胞破砕液による薬剤加水分解速度 (β -lactamase 活性) と全菌体によるそれとの比から薬剤の外膜通過性を推定することを考え、これを cripticity value (訳語は無い) と呼び、沢井²⁷⁾らは各薬剤の cripticity value と β -lactamase に対する K_m 値および添加した薬剤濃度から、菌の外膜を通過した薬剤量を算出する計算式を提唱したが、どちらも全菌体による β -lactamase の反応初速度と薬剤の通過速度の経時変化が不明なので問題が多く、大まかなことしかわからない。

β -lactam 薬剤の正確な外膜通過性を知るには分離精製した外膜の再構成 vesicle²⁸⁾ による薬剤のとり込みを見るより仕方がないが、その実験系は未完成である。改善の方法として、薬剤の MIC と、作用点である PC-CES 結合蛋白 1a, 1b, 2 または 3 の 50% 量に数分間で結合する最低薬剤濃度の比を見ることが一法であら

グラム陰性桿菌のなかでも緑膿菌の仲間 (*Pseudomonas* 属) の外膜は特別に通過性が悪く、 β -lactam 薬剤のうち CBPC, SBPC, APPC, piperacillin (T-1220) 等の PC や FK 749, HR 756, 6059-S, T 1551 などの ES 等特殊なものだけが、程度の差はあるが、有効である。緑膿菌のもつ薬剤耐性因子 (*R* plasmid) のなかには β -lactamase 産性遺伝子のはか、外膜の薬剤通過性を低下させる遺伝子 (intrinsic factor) をもつものがあることも知られている²⁴⁾。

一方、大腸菌の変異株で β -lactam 薬剤に対する外膜通過性が良くなったと考えられるものも知られている^{28,29)}、どのような外膜構造の変化が通過性上昇に関係しているかはわからない。グラム陰性桿菌の外膜は Fig. 8 示すように磷脂質の二重膜と O 抗原内毒素であるリポ多糖体 (LPS) および porin といわれる小孔を形成する蛋白等のモザイクと考えられているが³⁰⁾、二階堂³¹⁾らは LPS が変化すれば疎水性 (lipophilic) の β -lactam 薬剤の通過が良くなるとし、RAETZ と FOULD³²⁾ は磷脂質二重膜中の phosphatidylethanolamine (陰陽荷電リピド) (Fig. 9) の含有量が低下すると親水性 (hydrophilic) 薬剤の通過性が良くなるといい、まだ全体を説

Fig. 8 Schematic diagram of the bacterial envelope: the outer membrane, peptidoglycan and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*



明できるまでに至らない。 β -lactam 薬剤の化学構造とその抗菌域の広さ (外膜通過性の良否) の理論的関係の究明は残された研究課題である。

3. β -lactam 薬剤の β -lactamase に対する安定性

PC および CES にある β -lactam 環を加水分解してその抗菌力を失わせる β -lactamase は臨床分離の耐性菌が産生する薬剤不活化酵素であるが、その遺伝的背景と酵素特性が多様なため各菌種における PC と CES 各誘導体間の交叉耐性はかなり複雑である。この点に関してはすでに多くの綜説があるので^{33,34,35,36)}、今回は考え方を整理して見たい。

(1) β -lactam 薬剤耐性菌の β -lactamase 活性と耐性度の関係

β -lactamase の PC または CES 破壊速度 (酵素活性) は存在する薬剤 (基質) 濃度によって変化する (Fig. 10)。薬剤が酵素量に比べ過量にある時の加水分解速度

Fig. 9 Major membrane phospholipids of *Escherichia coli*

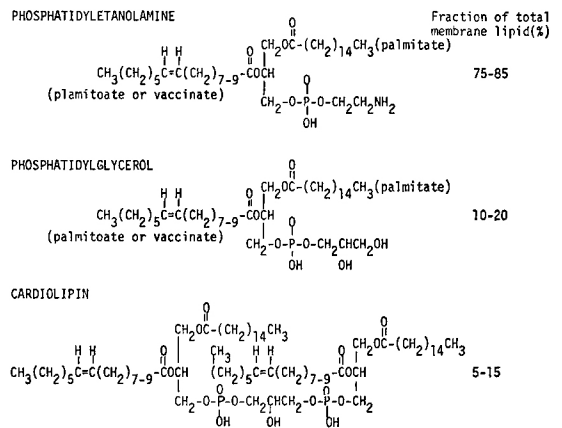
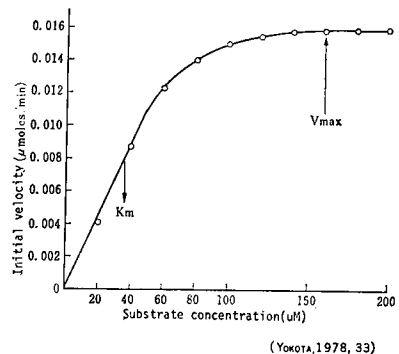


Fig. 10 Influence of substrate (PC)-concentration on the type III β -lactamase encoded by *R* plasmids



を $V_{\max}$ といい、 $V_{\max}$ の2分の1の水解速度を与える薬剤濃度を K_m として1モル濃度で示す。薬剤が菌の増殖に影響を与える MIC 前後の量は β -lactamase の基質としてはかなり低濃度なので、この酵素の水解速度(薬剤を不活化する効率)は $V_{\max}$ よりかなり低くなるのが普通である。また PC や CES は誘導体毎に β -lactamase に対する K_m 値が違うので、それが小さい薬剤は MIC 近辺でもよく破壊されるが、 K_m 値の大きな薬は MIC 近くの濃度では $V_{\max}$ よりはるかに遅い速度でしか水解されない。このことから POLLOCK (1965 年)³⁷⁾ は耐性菌の MIC と関係が深いのは $V_{\max}$ を K_m で割った係数で、 $V_{\max}$ 値そのものでないことを明らかにした。

しかし $V_{\max}/K_m$ 値が等しい β -lactamase 産生菌でもその産生量が異なれば耐性度が違うのは当然で、結局 $V_{\max}/K_m \times$ 酵素単位/蛋白量ということになる。酵素単位/蛋白量は菌体抽出液の specific activity を示す。

(2) グラム陽性菌の β -lactamase と薬剤耐性

グラム陽性菌は β -lactamase を菌体外酵素 (exoenzyme) として分泌する。誘導酵素で、薬剤が存在する時の産生量はかなり多いが菌体外で薄められるため、細

胞数が少ないと薬剤破壊に必要な酵素濃度に達せず、たとえ PC 耐性株でも接種菌量が小さい時はかなり低い耐性度を示す。接種菌量の増大とともに耐性度は急激に高い価を示すようになる³⁷⁾。

グラム陽性菌の β -lactamase は penicillinase (PCase) 型で、基質特異性が高く、PCG 等の天然 PC と、それに構造が近い ABPC や AMPC などの一部の合成 PC を水解するに過ぎない³⁸⁾。したがって PCG 耐性ブドウ球菌等には現在でも cloxacillin (MCIPC), methicillin (DMPPC), SBPC, CBPC 等多くの合成 PC やすべての CES は有効なことが多い。近年 MCIPC や cephaloridine (CER) にもかなり抵抗性の高いブドウ球菌³⁹⁾ や肺炎球菌^{40,41)} が報告されつつあるが、その耐性の仕組みは細胞壁合成系の変化(おそらくは PC 結合蛋白の β -lactam 薬剤に対する親和性低下の変異)によるもので、 β -lactamase ではない。

グラム陽性菌の β -lactamase はブドウ球菌のように非伝達性細胞質因子 (miniplasmid) に支配されるものと、セレウス菌のように染色体上の遺伝子によるものがある⁴²⁾。どちらも接合 (conjugation) による菌から菌への伝達はないが、前者の miniplasmid はバクテリオ

Table 1 Interrelationships between types of β -lactamase and drug-resistance in bacteria

Gram	Genetic code	Enzyme character	RICHMOND classification	Origin in clinical isolates	Drugs hydrolyzed	Become resistant to
+	Mini-plasmid	Exoenzyme inducible	PCase	<i>Staph. aureus</i>	PCG, ABPC, AMPC	PCG, ABPC, AMPC
—	Chromosome	Perienzyme inducible	Ia (CESase)	<i>Enterobacter Serratia</i>	CER, CET, CEX, CEG, CEZ, CEP	All CES & PC expt. FK 749, 6059, RH 756
		Perienzyme constitutive	Ib (CESase)	<i>E. coli Sh. sonnei</i>	Very low specific activity	Practically no resistance
		Perienzyme inducible	Ic (PCase)	<i>P. vulgaris</i>	All CES except CFX, CMZ, FK749, HR756, 6059-S	All CES except FK-749, RH 756 6059-S
		Perienzyme	Id (CESase)	<i>Ps. aeruginosa</i>	CER, CET, CEX, CEG, CEZ, CEP	Complex resistance due to impenetrability
	Chromosome	Perienzyme constitutive	IIa (PCase)	<i>P. morganii</i>	ABPC, AMPC, MPIPC	All PC and CER, less CEX, CEZ*
		Perienzyme constitutive	IIb (PCase)	<i>P. mirabilis</i>	ABPC, AMPC, MPIPC	All PC and CER, less CEX, CEZ*
	R plasmid	Perienzyme constitutive	III	R ⁺ bacilli	ABPC, AMPC, CER Less CEX, CEZ*	All PC and CER some times CEX, CEZ
	Chromosome	Perienzyme constitutive	IV	<i>Klebsiella</i>	ABPC, AMPC, CER less CEX, CEZ*	All PC and CER some times CEX, CEZ
	R plasmid	Perienzyme constitutive	V	Small portion of R ⁺ bacilli	ABPC, AMPC, MPIPC	All PC and CER some times CEX, CEZ

* less CEX, CEZ indicates that the enzyme hydrolyzes CER, CEZ, CET, CEG, CEP, CTZ, CEC, and CED in less extent but not CRX, CFX, CMZ, FK749, HR756 and 6059-S.; some times CEX, CEZ means the same sense but confers the resistance only when a large amount of the enzyme is produced.

ページの形質等入で運ばれるので、ブドウ球菌多剤耐化の原因となる⁴³⁾。

(3) グラム陰性菌の β -lactamase と薬剤耐性
グラム陰性菌、とくに桿菌は次の2つの理由から β -lactam 薬剤に対し耐性化し易く、しかも耐性化したあ

(イ) 遺伝学的、酵素学的多様性

グラム陰性菌の β -lactamase には伝達性細胞質因子 (plasmid) 上にその産生遺伝子があるものと、染色

1型はいわゆる日和見病原体 (opportunistic patho-

I型 β -lactamase の特徴はそれによって加水分解さ

III型とV型は *R* plasmid の支配する PCase 型 β -

III型 β -lactamase は ABPC, CER に高い V_{max} を

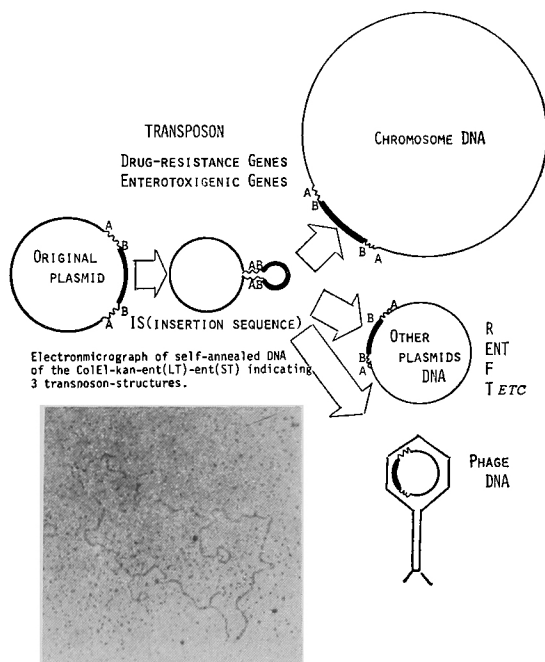
K_m 値が大きいため (1,000 μ M 内外), V_{max}/K_m

となる理由は別に求めなければならない (次項参照)。

V型 β -lactamase は oxacillin (MPIPC) を含め多くの

II型およびIV型の β -lactamase はプロテウス・ミラ

Fig. 11 Representative illustration of transposable genes (transposons)



(YAMAMOTO & YOKOTA, 1979)

Fig. 12 Electronmicrogram of thin section of *Escherichia coli* cells and model of the location of β -lactamase

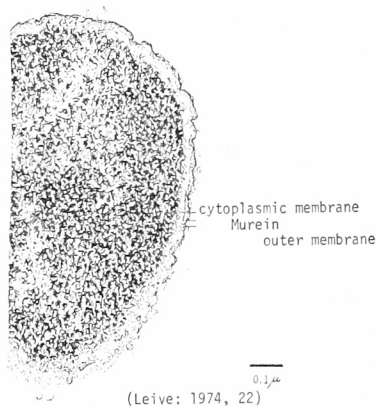
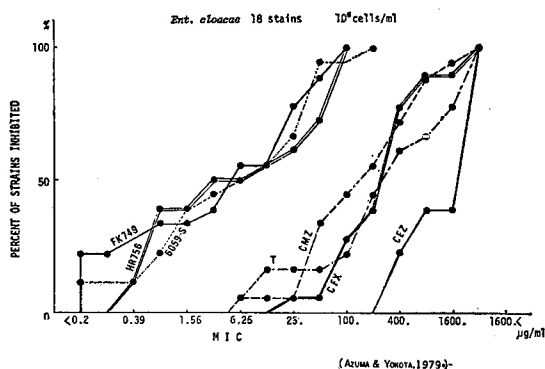


Fig. 13 Comparative susceptibility to new cephalosporin-derivatives of cefoxitin (CFX)-resistant clinical isolates of *Enterobacter*

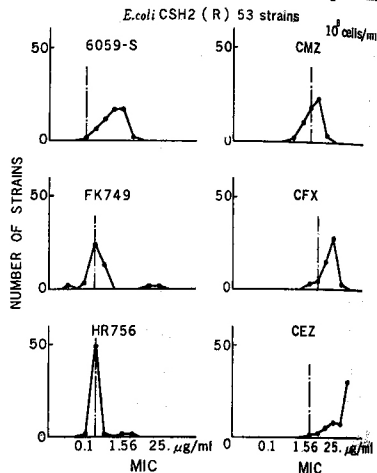


の *bla* transposon が染色体上に転位した結果かも知れない。幸い I 型の CES タイプの β -lactamase 産生遺伝子は transposon ではないので、CES 高度耐性が弱毒菌から強毒菌に拡大する心配は少ない。

(ロ) 表層酵素であるグラム陰性菌 β -lactamase の薬剤結合親和性と耐性 (Fig. 12)

臨床分離の PC, CES 耐性菌の主な仕組が β -lactamase にあるので、もしこの酵素で加水分解され難い新薬剤を開発すれば耐性菌にも強い抗菌力を示すはずである。事実グラム陽性菌ではこの考え方が的を射て、PCG 耐性ブドウ球菌の問題を解決した歴史もある。しかしグラム陰性桿菌では必ずしもこの通りにならない。Fig. 13 に

Fig. 14 Shift of the sensitivity distribution curve to new cephalosporin-derivatives by the transfer of 53 R plasmids to *Escherichia coli* CSH 2. Broken bars indicate the sensitivity of *E. coli* CSH 2 not receiving R plasmids.



(AZUMA & YOKOTA, 1979*)

CFX 耐性のエンテロバクター 18 株に対する CFX, CMZ, FK 749, HR 756, および 6059-S の MIC 累積曲線を、Fig. 14 に大腸菌 CSH 2 に 53 種類の ABPC 耐性 plasmid を伝達した時の MIC 変化の分布曲線をあげた*。これらの CES 新誘導体はエンテロバクターの産生する 1a 型にも R⁺ 大腸菌の作る III または V 型の β -lactamase にも分解されない。それにもかかわらず、1a 型 β -lactamase を産生するエンテロバクター (CFX 耐性) の 95% が CMZ には 50~1,600 μ g/ml の耐性を示し、FK 749, HR 756, 6059-S に対しても 20~40% のものが 25~100 μ g/ml の耐性であるのは何故であろうか。また PCase 型 β -lactamase を産生する R plasmids (III 型 51 種, V 型 2 株) を伝達された大腸菌 CSH 2 はそれをうけとる前に比べ FK 749 と HR 756 では MIC の変化はほとんど無いが、6059-S で平均 10 倍、CFX で 4 倍、CMZ で 2 倍の耐性上昇が認められた。

著者ら⁵¹⁾はすでに III 型 β -lactamase を産生する R plasmid を大腸菌に伝達すると、それにより水解される ABPC のみならず、加水分解され難い SBPC や CBPC に対しても高度耐性となる現象を解析し、グラム陰性桿菌では β -lactamase が外膜と細胞質膜の間に表層酵素 (perienzyme) として局在するため、たとえ水解されにくい薬剤でも β -lactamase に結合親和性の高いものは両者が結合して薬剤の作用点到達をさまたげる壁を形成するという仮説を立てたが、これは普遍的なものらしく Table 2 に示した新 CES 剤の β -lactamase に対する K_i 値が大きいもの (結合親和性が低い) は耐性株が少いのはこれを裏付けている*。

Table 2 Affinities of now β -lactamase-tolerant cephalosporin derivatives to various β -lactamases

Enzyme		Specific activity	K_i (μ M)					
pe	Source		K_m	6059-S	CMZ	CFX	HR 756	FK 749
Ia	<i>Ent. cloacae</i> Nek 39	21.4	323.	0.0036	0.004	0.002	0.26	0.012
Ic	<i>P. vulgaris</i> GN 76	4.1	111.	65.7	12.0	5.4	3,330.	1,860.
Ib	<i>P. mirabilis</i> GN 79	158.1	148.	503.	2,960.	6,230.	11,200.	N. D.
I	<i>E. coli</i> CSH 2 (RK 1)	1,200.	54.	158.	960.	3,160.	15,500.	23,300.
Ib	<i>Klebsiella</i> GN 69	84.7	61.	36.3	1,200.	5,100.	10,100.	N. D.
Ia	<i>E. coli</i> ML 1410 (RGN 238)	40.4	35.	5.4	80.	191.	120.	58.5

(AZUMA, SUZUKI & YOKOTA, 1979*)

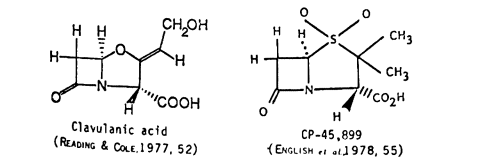
もちろん、この水解されにくい β -lactam 薬剤が β -lactamase の結合することだけでおきる耐性化の度合 この酵素で水解される薬剤に対する耐性化にくらべ遙かに低いが、無視できるものではない。

ハ) β -lactamase 活性の阻害と薬剤耐性度の低下
 β -lactamase による耐性菌にも有効な β -lactam 薬剤、この酵素に水解されにくいもののほかに、 β -lactamase 活性を阻害するものが考えられる。しかし実際はその阻害型式が不可逆的なものでないという意味がな
古くから MCIPC が Ia 型 CESase を競合的に阻害することが知られ、これと CER または CEZ を併用
れば CES 耐性菌にも有効な薬剤ができるかも知れないと思われたが結果は期待外れであった。これは MCIPC β -lactamase 結合物は可逆的なため CER 等が多量であればそれとの結合物にかわり、その後の薬剤の作用
も達もまたげると考えれば納得される。

知物質で β -lactamase を不可逆的に不活化するのは
ラプラン酸 (clavulanic acid)^{52,53,54)} と CP-45, 899⁵⁵⁾
で、PCase 型 β -lactamase を強く不活化し、AB
と併用すれば、Ia, CSEase 産生菌以外のものには
明な協力作用が認められる。不思議なことに CES 型
ラプラン酸ともいうべき 6059-S には CESase に
対する不可逆的な不活化作用は無い (Fig.15)。

さらに
 β -lactam 薬剤の抗菌力に関する基礎的研究の最終目
は化学構造と抗菌力に関する諸因子の相関を知り、
優れた薬剤をデザインすることにある。しかし内外
の研究者の努力にかかわらず、まだ新薬剤の開発は

Fig. 15 Irreversible inhibitors of β -lactamase



試行錯誤の域をでない。
本総説においては、主として現在臨床応用が検討され
つつある新 CES 誘導体について、抗菌力に関係する 3
つの因子、すなわち、作用点における作用の強弱、グラム
陰性桿菌外膜通過性の良否、および β -lactamase に対す
る安定性についてしらべた結果を通じ、将来の β -lactam
薬剤についての著者の考え方をまとめた積りである。
優れた抗生物質、化学療法剤は抗菌力のほかに体内動態
や安全性 (毒性、発癌性) 等の面でも秀れていなければ
ならないことはいうまでもない。しかし後者については
それぞれ優れた研究者がおられるので、今回は細菌学の
立場から PC と CES の抗菌力に的をしばった。本総説
が β -lactam 薬剤の臨床使用にいささかでも参考になれば
著者の望外の幸である。

引用文献

1) FLEMING, A. : On the specific antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Expt. Pathol. 10 : 226~236, 1929

2) DUGUID, J.P. : The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. Edinburgh Med. J. 53 : 401~412, 1946

3) PARK, J. T. : Uridine-5'-pyrophosphate derivatives. I. Isolation from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 194 : 877~887, 1952

4) PARK, J. T. : Uridine-5'-pyrophosphate derivatives. II. A structure common to the derivatives. J. Biol. Chem. 194 : 885~895, 1952

5) PARK, J. T. : Uridine-5'-pyrophosphate derivatives. III. Amino acid-containing derivatives. J. Biol. Chem. 194 : 897~904, 1952

6) STROMINGER, J. L. : The amino acid sequence in the uridine nucleotidepeptide from *Staphylococcus aureus*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg 31 : 181~192, 1959

7) TIPPER, D. J. & J. L. STROMINGER : Mechanism of action of penicillins : a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 54 :

- 1131~1141, 1965
- 8) TIPPER, D.J. & J.L. STROMINGER : Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins : Studies in *Staphylococcus aureus in vivo*. J. Biol. Chem. 243 : 3169~3179, 1968
- 9) IZAKI, K.; M. MATSUHASHI & J.L. STROMINGER : Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIII. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase : Penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 243 : 3180~3192, 1968
- 10) BLUMBERG, P.M. & J.L. STROMINGER : Isolation by covalent affinity chromatography of the penicillin binding components from membranes of *Bacillus subtilis*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 : 3751~3755, 1972
- 11) BLUMBERG, P.M. & J.L. STROMINGER : Interaction of penicillin with the bacterial cell : Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. Bacteriol. Rev. 38 : 291~335, 1974
- 12) SPRATT, B.G. & A.B. PARDEE : Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. Nature 254 : 516~517, 1975
- 13) SPRATT, B.G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 2999~3003, 1975
- 14) MATHUHASHI, M.; Y. TAKAGAKI, I.N. MARUYAMA, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, H. SUZUKI, U. OGINO & Y. HIROTA : Mutants of *Escherichia coli* lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 2976~2979, 1977
- 15) SPRATT, G.B. & J.L. STROMINGER : Identification of the major penicillin-binding protein of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase IA. J. Bacteriol. 127 : 660~663, 1976
- 16) SUZUKI, H.; Y. NISHIMURA & Y. HIROTA : On the process of cellular division in *Escherichia coli* : A series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75 : 664~668, 1978
- 17) 松橋通生 : ペニシリン結合蛋白, 第 25 回日本化学療法学会東日本支部総会, 東京, Oct. 1978
- 17') 奥村和夫, 横田 健 : Cefuroxime の血清および多形核好中球による殺菌増強効果について。Chemotherapy 26 : Cefuloxime 特集号 (印刷中), 1979
- 18) 斎藤洪太, 生方公子, 紺野昌俊 : インフルエンザ菌のペニシリン結合蛋白について。第 26 回日本化学療法学会総会, 東京, June 1978
- 19) NOGUCHI, H.; M. MATSUHASHI, M. TAKAOKA & S. MITSUHASHI : New antipseudomonal penicillin, PC-904 : Affinity to penicillin-binding proteins and inhibition of the enzyme cross-linking peptidoglycan. Antimicrob. Agents & Chemother. 14 : 617~624, 1978
- 20) RODRIGUEZ, W.J. & A.K. SAZ : Differential binding of penicillin by membrane fractions from penicillin-susceptible and -resistant gonococci. Antimicrob. Agents & Chemother. 13 : 597~598, 1978
- 21) YOKOTA, T. & S. KUWAHARA : Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-deficient mutants of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 120 : 106~113, 1974
- 22) LEIVE, L. : The barrier function of the gram-negative envelope. Ann. New York Acad. Sci. 235 : 106~127, 1974
- 23) NAKAE, T. & H. NIKAI : Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium* : Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. J. Biol. Chem. 250 : 7359~7366, 1975
- 24) RICHMOND, M.H. & A.C. CURTIS : The interplay of β -lactamases and intrinsic factor in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. Ann. New York Acad. Sci. 235 : 553~567, 1974
- 25) STROMINGER, J.L.; WILLOUGHBY, E., 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
- 26) ROLINSON, G.N. & S. STEVENS : Microbiological studies on "Penbritin", a new broad-spectrum penicillin. Brit. Med. J. 2 : 191~196, 1961
- 27) 沢井哲夫, 松葉清貴, 山岸三郎 : β -ラクタム抗生物質の細菌表層透過性, (1) 透過性測定法について。第 36 回日本細菌学会関東支部総会, 東京, Nov. 1976
- 28) RICHMOND, M.H.; D.C. CLARK & S. WOTTON : Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase-nonsusceptible penicillins and cephalosporins in *Escherichia coli* strains. Antimicrob. Agents & Chemother. 10 : 215~218, 1976
- 29) RICHMOND, M.H. & S. WOTTON : Comparative study of seven cephalosporins : susceptibility to beta-lactamases and ability to penetrate the surface layers of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents & Chemother. 10 : 219~222, 1976
- 30) RAETZ, C.R.H. : Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 42 : 614~659, 1978
- 31) 中江太治, 二階堂 淳 : 細菌外膜の構造および物

- 質透過性。日本細菌学雑誌 33 : 715~727, 1978
-) RAETZ, C. R. H. & FOULDS : Envelope composition and antibiotic hypersensitivity of *Escherichia coli* mutants defective in phosphatidylserine synthetase. J. Biol. Chem. 252 : 5911~5915, 1977
-) 横田 健 : β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。モダンメディカ 24 : 360~377, 1978
-) 横田 健 : β -ラクタマーゼと薬剤耐性。ファルマシア 15 : 印刷中, 1979
-) 山岸三郎, 沢井哲夫 : グラム陰性菌の β -lactamase について(その分類を中心として)。日本細菌学雑誌 30 : 615~629, 1975
-) 沢井哲夫, 高橋郁子 : β -ラクタマーゼ測定法とその応用。蛋白質・核酸・酵素 23 : 391~400, 1978
-) CITRI, N. & M. R. POLLOCK : The biochemistry and function of β -lactamase (penicillinase). Advan. Enzymol. 28 : 237~323, 1966
-) RICHMOND, M. H. : Purification and properties of the exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. 88 : 452~459, 1963
-) COBEN, S. ; C. J. GIBSON & H. M. SWEENEY : Phenotypic suppression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by mutant noninducible penicillinase plasmids. J. Bacteriol. 112 : 682~689, 1972
-) DIXON, J. M. S. : *Pneumococcus* with increased resistance to penicillin. Lancet 2 : 474, 1974
-) APPELBAUM, P. C. ; A. F. HALLETT, A. BHAMJEE, J. N. SCRAGG, A. J. BOWEN & R. C. COOPER : Penicillin- and chloramphenicol-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains from clinical specimens. Current Chemotherapy (Proc. 10th Int. Natl. Cong. Chemother.) 1 : 462~464, 1978
-) IMSANDE, J. : Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 42 : 67~83, 1978
-) NOVICK, R. P. : Analysis by transduction of mutants affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 33 : 121~136, 1963
-) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES : β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In Advances in Microbial Physiology. A. H. ROSE & D. W. TEMPEST, Eds. Vol. 9 : 31~85, Academic Press, New York, N. Y., 1973
-) 根橋敏行, 山本達男, 横田 健 : Ceftezole の各種 β -lactamase に対する安定性。Chemotherapy 24 : 635~644, 1976
-) HEDGES, R. W. ; N. DATTA, P. KONTOMICHALOU & T. SMITH : Molecular specificities of *R* factor-determined beta-lactamases : correlation with plasmid compatibility. J. Bacteriol. 117 : 56~62, 1974
- 47) DALE, J. W. & J. T. SMITH : *R*-factor-mediated β -lactamase that hydrolyze oxacillin : evidence for two distinct groups. J. Bacteriol. 119 : 351~356, 1974
- 48) HEDGES, R. W. & A. E. JACOB : Transposition of ampicillin resistance from RP 4 to other replicons. Molec. Gen. Genet. 132 : 31~40, 1974
- 49) HEFFRON, F. ; C. RUBENS & S. FALKOW : Transposition of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance : general description and epidemiologic considerations. In DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes. A. I. BUKHARI, J. A. SHAPIRO & S. L. ADHYA Eds. p. 151~160, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N. Y., 1977
- 50) DREVET, J. ; D. J. KOPECKO, P. NISEN & COHEN : Promotion of insertions and deletions by translocating segments of DNA carrying antibiotic resistance genes. In DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes. A. I. BUKHARI, J. A. SHAPIRO & S. L. ADHYA Eds. p. 169~178, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N. Y., 1977
- 51) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA : Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying *R* plasmids. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11 : 936~940, 1977
- 52) READING, C. & M. COLE : Clavulanic acid : A beta-lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11 : 852~857, 1977
- 53) FISHER, J. ; R. L. CHARNAS & J. R. KNOWLES : Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM β -lactamase by clavulanic acid. Biochem. 17 : 2180~2184, 1978
- 54) CHARNAS, R. L. ; J. FISHER & J. R. KNOWLES : Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM β -lactamase by clavulanic acid. Biochem. 17 : 2185~2189, 1978
- 55) ENGLISH, A. R. ; J. A. RETSEMA, A. E. GIRARD, J. E. LYNCH & W. E. BARTH : CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams : Initial bacteriological characterization. Antimicrob. Agents & Chemoth. 14 : 414~419, 1978
- * 著者と当教室の山本達男, 関口玲子, 東映子の協同研究による未発表成績。