

Cefotiam (SCE-963) の β -lactamase に対する 態度および細菌細胞外膜透過性

小此木研二・木田 誠・米田雅彦

武田薬品工業株式会社中央研究所

三 橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

β -Lactam 抗生物質の抗菌力は、薬剤の標的（細胞壁合成酵素）への到達性および標的に対する作用力の強さにより決定されるが、薬剤の標的への到達性は薬剤不活化酵素（ β -lactamase）の作用によって低下する¹⁾とともに、 β -lactam 抗生物質の標的が細胞内膜にある²⁾ためグラム陰性菌の場合には細胞外膜による透過障害作用によっても低下する^{3)~6)}。

β -Lactam 薬剤の抗菌力に影響するこれらの要因のうち β -lactamase 安定性は直接測定することが可能であり、細胞外膜透過性はグラム陰性菌の β -lactamase が細胞外膜と細胞内膜の間隙（periplasm）に存在し⁷⁾、生菌による薬剤加水分解速度が破砕菌による加水分解速度より小さい⁷⁾⁸⁾ことを利用して間接的に測定することができる⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。また標的酵素に対する作用力はペニンシリン結合たん白質への親和性から推定できる¹²⁾。

本報告では新合成セファロスポリン Cefotiam (CTM, SCE-963) の抗菌力解明の一助として、上記三要因のうち β -lactamase 安定性およびグラム陰性菌の細胞外膜透過性を検討した結果について述べる。

実験材料および実験方法

1. 使用菌株

GN 番号および TN 番号の株はそれぞれ群馬大学および武田薬品工業株式会社中央研究所で各地の病院より収集した臨床分離株である。IFO 番号の株は財団法人発酵研究所より分与された。その他の株は武田薬品工業株式会社中央研究所の保存株である。

2. 薬 剤

Cefotiam は武田薬品工業株式会社中央研究所で合成されたものを使用した。Cephaloridine (CER) および Cephalothin (CET) は塩野義製薬株式会社、Cefazolin (CEZ) は藤沢薬品工業株式会社、Benzylpenicillin (PCG) は明治製菓株式会社、Dicloxacillin (MDIPC) は萬有製薬株式会社の市販品を使用した。

3. 抗菌力の測定

Trypticase soy broth (TSB ; BBL) で 37°C, 1 夜静

置培養した菌液を同培地で 10 倍および 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 Trypticase soy agar (TSA ; BBL) に接種し、37°C で 18 時間培養後最少発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

4. β -Lactamase の精製

a) *S. aureus* 1840 の β -lactamase : CY 培地¹³⁾ 150 ml で 37°C, 1 夜振とう培養した菌液を同培地で 20 倍に希釈し、1 L の三角フラスコ 12 本に分注して 37°C で 2.5 時間ロータリーシェーカー (220 rpm) を用いて振とう培養後、Dicloxacillin を 0.5 μ g/ml となるように加えてさらに 6 時間培養を続けた。培養液の遠心上清 (15,000 \times g 10 分) に乾燥重量 10 g の P-cellulose を加え 4°C で 18 時間攪拌した。酵素を吸着させた P-cellulose をカラム (2 \times 13.5 cm) に充填し、水 500 ml および 0.01 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) 500 ml で洗浄後、2 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) で酵素を溶出した。

b) *E. coli* TN 713, TN 649 および TN 639 の β -lactamase は前報の方法で精製した¹⁴⁾。

c) *K. pneumoniae* TN 1700, TN 1698 および TN 1711 の β -lactamase : TSB 500 ml で 37°C, 1 夜振とう培養した菌液を同培地で 10 倍に希釈し、1 L の三角フラスコ 15 本に分注して 37°C で 5 時間ロータリーシェーカー (220 rpm) を用いて振とう培養後菌体を遠心集菌 (15,000 \times g, 15 分) した。集菌々体を 250 ml の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に懸濁して超音波破碎 (海上電機 4280 型, 2.5 A, 20 分) 後、菌体破片を遠心除去 (15,000 \times g, 20 分) して菌体抽出液を得た。

K. pneumoniae TN 1700 の菌体抽出液は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して 4°C で 1 夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した CM-cellulose によるカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ 3 \times 36 cm) を行い、素通り画分 (A) と同緩衝液中 0~1 M 食塩の直線的濃度勾配により溶出される活性画分 (B) とに分けた。A 画分は 0.02 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) に対して 4°C で 1

夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ3.1×34 cm) を行い、同緩衝液中 0~1 M 食塩の直線的濃度勾配により溶出される活性画分を凍結乾燥後、25 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に溶解し、同緩衝液を用いて Sephadex G-100 によるゲル濾過 (カラムサイズ4.1×72 cm) を行った。B 画分は凍結乾燥後25 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に溶解し、A 画分と同様 Sephadex G-100 によるゲル濾過を行った。

K. pneumoniae TN 1698 の菌体抽出液は0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して 4°C で1夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した CM-cellulose を用いてカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ3.1×34 cm) を行い、同緩衝液中 0~1 M 食塩の直線的濃度勾配により酵素を溶出した。

K. pneumoniae TN 1711 の菌体抽出液は0.02 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) に対して 4°C で1夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose を用いてカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ4.1×41 cm) を行い、0.02 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) で溶出される活性画分を凍結乾燥後、35 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に溶解して同緩衝液を用いて Sephadex G-100 によるゲル濾過 (カラムサイズ4.1×72 cm) を行った。

d) *C. freundii* GN 1706 および *E. cloacae* TN 1282 の β -lactamase : TSB 500 ml で37°C、1夜振とう培養した菌液を同培地で10倍に希釈し、1 L の三角フラスコ 15本に分注して37°Cで3時間ロータリーシェーカー (220 rpm) を用いて振とう培養後、Benzylpenicillin を 1 mg/ml となるように加えてさらに2時間培養を続けた。培養液を遠心分離 (15,000×g, 15分) して得た菌体を200 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁して超音波破碎 (海上電機4280型, 2.5 A, 20分) した。破碎菌液の遠心上清 (15,000×g, 15分) を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して4°C で1夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した CM-cellulose を用いてカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ3.1×31 cm) を行った。同緩衝液中 0~0.5 M 食塩の直線的濃度勾配により溶出する活性画分を凍結乾燥後、15 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に溶解し、同緩衝液を用いて Sephadex G-100 によるゲル濾過 (カラムサイズ4.1×72 cm) を行った。

e) *P. vulgaris* GN 4413 の β -lactamase : d) と同様にして得た菌体を100 ml の 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して超音波破碎 (海上電機4280型, 2.5 A, 20分) した。破碎菌液の遠心上清 (15,000×g, 15分) を 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) に対して 4°C で1夜

透析後、予め同緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose を用いてカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ3.2×41 cm) を行った。0.05 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) で溶出する活性画分に最終濃度80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて得られた沈澱を20 ml の 0.02 M Tris 緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、同緩衝液を用いて Sephadex G-100 によるゲル濾過 (カラムサイズ2.2×97 cm) を行った。活性画分を0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に対して 4°C で1夜透析後、予め同緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-50 に吸着させ、同緩衝液中 0~0.5 M 食塩の直線的濃度勾配によるカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ2.0×22 cm) により酵素を溶出した。

5. β -Lactamase 活性の測定

a) 生菌による薬剤の不活化 : 5 ml の TSB にスラントより試験菌を接種し、37°C で18時間静置培養後遠心分離 (15,000×g, 15分) して得た菌体を、600 nm の吸光度が2.0となるように0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に懸濁した。菌体懸濁液0.05 ml に 2 mM の薬剤溶液 0.1 ml および TSB 0.85 ml を加え30°C で1時間反応させた。反応液に5倍容のメタノールを加えて反応を停止した後、残存薬剤量を *B. subtilis* PCI 219 を指示菌とするペーパーディスク法により測定した。

b) 菌体抽出液による薬剤の加水分解 : TSB 3 ml で37°C 1夜振とう培養した菌液を同培地で20倍に希釈し、2本の試験管に6 ml ずつを分注して37°C で3時間振とう培養後、一方の試験管に Benzylpenicillin を 1 mg/ml (*S. aureus* 1840では0.01 mg/ml, *E. coli* NIHJ JC-2, CS 2911 および CS 2913では0.1 mg/ml) となるように加えてさらに2時間培養を続けた。培養液を遠心分離 (15,000×g, 10分) して得た菌体を3 ml の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に懸濁して超音波破碎 (海上電機4280型, 2.5 A, 2分) し、菌体破片を遠心除去 (15,000×g, 10分) して酵素液を得た。ただし、*S. aureus* 1840では培養液の遠心上清 (15,000×g, 10分) を酵素液として用いた。基質 0.2 μ mole を溶解した0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) 0.95 ml に適当に希釈した酵素液 0.05 ml を加えて30°C で10分間反応後、2 ml のメタノールを加えて反応を停止した。Cefotiam を基質とした場合は275 nm, Cephaloridine, Cephalothin および Cefazolin を基質とした場合は265 nm での反応液の吸光度を測定し、メタノール添加後に酵素液を加えた対照反応液の吸光度との差から基質加水分解量を定量した。

c) 精製酵素による kinetics : セファロスポリンを基質とした場合は0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) に溶解した基質溶液3.8 ml に酵素液 0.2 ml を加え、30°C

Table 1 Comparison of antibiotic susceptibility of bacteria with the capacity to degrade cefotiam and other cephalosporins by β -lactamase

Culture	Inoculum size*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				Antibiotic degraded**			
		CTM	CEZ	CET	CER	CTM	CEZ	CET	CER
<i>Escherichia coli</i>									
NIHJ JC-2	10^6	0.10	1.56	6.25	3.13	-	-	-	-
	10^8	0.20	1.56	12.5	3.13				
CS 2911***	10^6	25	50	200	100	-	-	-	-
	10^8	25	100	200	100				
CS 2913***	10^6	12.5	100	200	100	-	-	-	-
	10^8	25	100	200	200				
TN 650	10^6	0.10	0.78	6.25	3.13	-	±	-	-
	10^8	0.20	1.56	25	3.13				
TN 649	10^6	0.20	0.78	6.25	3.13	-	±	-	-
	10^8	0.78	3.13	25	6.25				
TN 639	10^6	0.20	3.13	12.5	25	-	-	-	+
	10^8	0.78	25	50	200				
TN 635	10^6	0.10	3.13	6.25	6.25	-	±	-	+
	10^8	0.39	6.25	50	25				
TN 643	10^6	0.20	3.13	12.5	12.5	±	+	±	‡
	10^8	1.56	100	100	800				
TN 713	10^6	0.20	12.5	25	50	+	‡	±	‡
	10^8	1.56	100	200	400				
T-7	10^6	1.56	50	100	200	+	+	+	‡
	10^8	12.5	200	800	1600				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>									
DT	10^6	≤0.05	0.78	0.78	1.56	-	-	-	-
	10^8	0.10	1.56	1.56	1.56				
TN 1429	10^6	0.20	1.56	3.13	3.13	±	±	±	+
	10^8	0.20	3.13	6.25	12.5				
GN 3835	10^6	0.20	1.56	6.25	6.25	±	±	±	‡
	10^8	0.78	12.5	25	100				
TN 1436	10^6	0.39	3.13	12.5	12.5	±	±	±	‡
	10^8	1.56	25	25	100				
TN 1700	10^6	0.39	12.5	50	100	+	+	±	‡
	10^8	12.5	400	400	400				
TN 1698	10^6	0.78	100	50	50	‡	‡	+	‡
	10^8	50	800	400	800				
TN 1711	10^6	6.25	200	200	200	+	‡	+	‡
	10^8	400	>1600	>1600	800				
<i>Proteus mirabilis</i>									
GN 4359	10^6	0.20	3.13	3.13	3.13	-	-	±	-
	10^8	0.39	6.25	12.5	6.25				
GN 4374	10^6	0.20	3.13	3.13	6.25	-	-	-	-
	10^8	0.20	6.25	6.25	12.5				
GN 4758	10^6	0.20	3.13	3.13	6.25	±	±	±	-
	10^8	0.39	12.5	6.25	12.5				
GN 4345	10^6	0.39	6.25	6.25	6.25	±	±	-	±
	10^8	1.56	12.5	6.25	12.5				
GN 4364	10^6	0.39	3.13	6.25	6.25	±	±	±	±
	10^8	0.78	12.5	6.25	50				

* A loopful of bacterial suspension (approximately 10^6 and 10^8 cells/ml) was inoculated.

** Approximately 10^8 cells in 1 ml of Trypticase soy broth (BBL) containing $0.2 \mu\text{mole}$ (approximately $100 \mu\text{g}$) of each antibiotic were incubated at 30°C for 1 hour. After the reaction was stopped by the addition of 4 volumes of methanol, the remaining activity of the antibiotic was determined by the paper disc method using *B. subtilis* PCI219 as a test organism. The degree of antibiotics degraded was expressed as follows: (-) 0-5%, (±) 6-20%, (+) 21-50%, (‡) 51-80%, (‡) 81-100%.

*** CS 2911 and CS 2913 are resistant strains obtained from *E. coli* NIHJ JC-2 by repeated exposure to cefotiam and cefazolin respectively.

Table 1 Continued

Culture	Inoculum size*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				Antibiotic degraded**			
		CTM	CEZ	CET	CER	CTM	CEZ	CET	CER
<i>Proteus vulgaris</i>									
IFO 3988	10 ⁶ 10 ⁸	0.20 0.39	6.25 50	3.13 6.25	12.5 50	+	++	+	+
GN 5297	10 ⁶ 10 ⁸	0.20 0.39	3.13 6.25	3.13 6.25	6.25 12.5	±	-	±	-
TN 227	10 ⁶ 10 ⁸	0.20 0.39	3.13 12.5	3.13 6.25	6.25 12.5	+	-	-	-
GN 4420	10 ⁶ 10 ⁸	100 >1600	400 >1600	200 >1600	400 >1600	++	##	##	++
GN 4413	10 ⁶ 10 ⁸	400 >1600	1600 >1600	1600 >1600	1600 >1600	++	##	++	+
<i>Proteus rettgeri</i>									
TN 338	10 ⁶ 10 ⁸	≤0.05 ≤0.05	0.10 0.39	1.56 12.5	1.56 50	+	+	+	++
GN 4733	10 ⁶ 10 ⁸	0.39 1.56	50 1600	100 400	100 400	±	+	±	+
GN 5224	10 ⁶ 10 ⁸	0.20 3.13	1.56 50	25 200	12.5 400	+	##	+	++
GN 4424	10 ⁶ 10 ⁸	0.10 6.25	25 1600	400 >1600	400 >1600	++	##	##	##
TN 344	10 ⁶ 10 ⁸	12.5 200	200 1600	400 800	200 800	+	++	+	++
<i>Proteus morganii</i>									
IFO 3168	10 ⁶ 10 ⁸	0.39 3.13	100 400	1600 1600	400 800	+	+	++	++
GN 4796	10 ⁶ 10 ⁸	0.20 200	400 >1600	>1600 >1600	800 >1600	-	±	+	+
TN 374	10 ⁶ 10 ⁸	3.13 800	400 >1600	1600 >1600	800 >1600	++	##	++	++
GN 4794	10 ⁶ 10 ⁸	12.5 400	200 >1600	>1600 >1600	400 >1600	++	##	++	##
GN 4715	10 ⁶ 10 ⁸	50 400	400 1600	>1600 >1600	400 >1600	##	##	##	##
<i>Staphylococcus aureus</i>									
FDA 209P	10 ⁶ 10 ⁸	0.39 0.39	0.20 0.20	0.10 0.20	≤0.05 ≤0.05	-	±	-	-
1840	10 ⁶ 10 ⁸	0.39 0.78	0.20 0.39	0.20 0.20	0.10 0.20	±	±	-	±
<i>Serratia marcescens</i>									
IFO 12648	10 ⁶ 10 ⁸	3.13 1600	1600 >1600	>1600 >1600	800 >1600	+	++	+	++
TN 61	10 ⁶ 10 ⁸	1.56 1600	800 >1600	>1600 >1600	400 1600	+	+	+	+
TN 69	10 ⁶ 10 ⁸	6.25 400	>1600 >1600	>1600 >1600	400 >1600	+	+	+	++
TN 24	10 ⁶ 10 ⁸	25 1600	1600 >1600	>1600 >1600	800 >1600	++	##	++	##
TN 86	10 ⁶ 10 ⁸	1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	>1600 >1600	±	±	±	+

Table 1 Continued

Culture	Inoculum size*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				Antibiotic degraded**			
		CTM	CEZ	CET	CER	CTM	CEZ	CET	CER
<i>Citrobacter freundii</i>									
GN 99	10^6	0.39	12.5	25	50	±	+	±	+
	10^8	12.5	1600	400	400				
TN 522	10^6	0.78	100	50	200	±	++	+	++
	10^8	50	1600	400	1600				
TN 530	10^6	1.56	200	400	200	-	++	+	++
	10^8	50	1600	1600	800				
GN 1706	10^6	1.56	400	400	400	+	++	+	++
	10^8	100	1600	1600	1600				
TN 515	10^6	100	1600	>1600	400	±	++	+	++
	10^8	1600	>1600	>1600	>1600				
<i>Enterobacter cloacae</i>									
TN 603	10^6	0.39	6.25	25	25	+	±	±	±
	10^8	1.56	200	400	200				
TN 580	10^6	0.39	200	200	800	++	++	±	++
	10^8	50	800	1600	1600				
TN 594	10^6	0.39	100	200	400	++	+	±	++
	10^8	100	>1600	1600	1600				
TN 1282	10^6	3.13	800	1600	1600	+	+	-	++
	10^8	400	1600	>1600	>1600				
TN 613	10^6	800	>1600	>1600	>1600	±	+	-	+
	10^8	>1600	>1600	>1600	>1600				
<i>Enterobacter aerogenes</i>									
TN 570	10^6	0.39	12.5	50	100	+	+	-	++
	10^8	100	1600	400	800				
TN 582	10^6	200	>1600	>1600	800	++	++	±	++
	10^8	800	>1600	>1600	>1600				
<i>Enterobacter liquefaciens</i>									
TN 577	10^6	1.56	400	>1600	400	++	++	+	++
	10^8	400	>1600	>1600	1600				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>									
TN 1140	10^6	50	200	400	100	±	±	±	-
	10^8	200	800	800	400				
TN 1125	10^6	100	400	800	400	±	-	±	-
	10^8	200	1600	1600	1600				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
TN 1373	10^6	>1600	>1600	>1600	>1600	-	-	±	-
	10^8	>1600	>1600	>1600	>1600				
GN 3407	10^6	>1600	>1600	>1600	>1600	-	±	±	+
	10^8	>1600	>1600	>1600	>1600				
TN 1347	10^6	>1600	>1600	>1600	>1600	±	+	+	+
	10^8	>1600	>1600	>1600	>1600				

で紫外部吸収の変動を Gilford 分光光度計 Model 2000 を用いて記録し、吸光度の変化量から加水分解速度を求めた (UV 法)。ペニシリンを基質とした場合の活性測定はマイクロヨウ素法¹⁴⁾で行った。Km および Vmax は LINEWEAVER-BURK の方法¹⁵⁾により算出した。

6. 薬剤の細菌外膜透過性

5 mM の MgSO_4 を含む TSB で培養した対数増殖期の菌体を遠心集菌 (7,000×g, 10分, 25°C) し、5 mM MgSO_4 を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.85) で 1 回洗浄後、600 nm の吸光度が 3.0 となるように同緩衝液に懸濁した。懸濁液の超音波破碎前と破碎後での β -lactamase 活性を Gilford 分光光度計を用いた UV 法

で測定し、SAWAI ら¹¹⁾および ZIMMERMANN ら¹⁰⁾の方法に従って periplasm 中の薬剤濃度および細胞外膜透過係数を求めた。なお、 β -lactamase の菌体外漏出を防ぐために 5 mM の $MgSO_4$ が存在下で菌の培養および活性測定を行った¹⁶⁾が、菌体からの酵素の漏出を完全には阻止できず 0.1~0.5% の酵素が漏出していたので、生菌による薬剤の加水分解速度は細胞懸濁液の活性から細胞懸濁液を遠心分離して菌体を除去した上清の活性を差し引いて求めた。

実験成績

1. 生菌の薬剤不活化力と薬剤感受性

Cefotiam, Cefazolin, Cephalothin および Cephaloridine を 1 夜培養した生菌と培地中でインキュベートして不活化を調べた (Table 1)。

S. aureus および *P. mirabilis* では調べたいずれのセファロスポリンも殆ど不活化されず、これらの菌に対して 4 薬剤とも抗菌力を示した。*E. coli*, *K. pneumoniae* および *C. freundii* では Cefotiam および Cephalothin は Cephaloridine, Cefazolin より不活化されにくく、これらの菌に対して Cefotiam が最も強い抗菌力を示した。*P.morganii*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* および *S. marcescens* では 4 薬剤とも不活化されやすかったが、接種菌量が少ない場合 (10^6 CFU/ml) には Cefotiam は他の 3 剤に耐性な株の多くに対しても抗菌力を示した。一方、4 薬剤とも *A. calcoaceticus* では不活化されず、*P. aeruginosa* でも不活化されにくかったが、これらの菌に対しては抗菌力を示さなかった。

多くの生菌で Cephaloridine が最も不活化されやすく、次いで Cefazolin, Cefotiam, Cephalothin の順であった。Cephaloridine および cefazolin では *A. calcoaceticus* および *P. aeruginosa* を除く菌で抗菌力と不活化度との間にはほぼ相関性が認められたが、Cefotiam は *P. rettgeri* および *Enterobacter* のように比較的の不活化力の強い菌に対しても抗菌力を示す傾向があり、cephalothin は逆に不活化力の弱い菌に対しても弱い抗菌力しか示さない傾向があった。

2. 菌体粗抽出液による薬剤の加水分解

S. aureus 1840 は penicillinase 型 β -lactamase 産生株であるが、粗抽出液中にはセファロスポリンに対する酵素活性は検出されなかった。*A. calcoaceticus* では酵素活性は検出されず、*P. aeruginosa* の酵素活性も弱かった。*E. coli* CS 2911 および CS 2913 は *E. coli* NIHJ JC-2 をそれぞれ Cefotiam および Cefazolin 存在下で継代培養して得た *in vitro* 耐性株であるが、両株とも β -lactamase 活性は検出されなかった。その他の菌種で

はセファロスポリン感性株で酵素活性が弱いか検出されなかったのに対し、*Proteus*, *Enterobacter*, *C. freundii*, *E. coli* および *K. pneumoniae* などのセファロスポリン耐性株では強い酵素活性が検出された。

E. coli および *K. pneumoniae* などの産生する penicillinase 型 β -lactamase では Cefotiam, Cephalothin および Cefazolin は Cephaloridine より加水分解されにくく、*P. vulgaris* を除くインドール陽性 *Proteus*, *C. freundii* および *Enterobacter* などの産生する cephalosporinase 型 β -lactamase では Cefotiam は他 3 薬剤より加水分解されにくい傾向を示した (Table 2)。

3. β -Lactamase 活性の kinetics

各種 β -lactamase に対する Cefotiam の態度を調べるために、精製酵素による K_m および V_{max} を測定し、Cefazolin, Cephalothin, Cephaloridine および Benzylpenicillin と比較した (Table 3)。

S. aureus 1840 の penicillinase ではいずれのセファロスポリンも極めて加水分解されにくかった。*E. coli* TN 713, TN 649 および TN 639 の β -lactamase はそれぞれ I 型, II 型および IV 型 penicillinase である¹⁴⁾。ペニシリン耐性 *E. coli* の大部分が産生する I 型 penicillinase によって Cefotiam, Cefazolin および Cephalothin は Cephaloridine および Benzylpenicillin より加水分解されにくかった。*K. pneumoniae* TN 1700 は異なる 2 つの R-plasmid に由来する高活性の I 型 penicillinase (A) と低活性の penicillinase (B) とを併産し、*K. pneumoniae* TN 1698 および TN 1711 は A, B いずれとも異なる高活性の非伝達性 penicillinase を産生した。Cefotiam は *K. pneumoniae* の産生するいずれの penicillinase によっても加水分解されにくかった。

一方、Cefotiam は *P. vulgaris* GN 4413 の cephalosporinase では他のセファロスポリン同様加水分解されやすかったが、*C. freundii* GN 1706 および *E. cloacae* TN 1282 の cephalosporinase では他のセファロスポリンより加水分解されにくかった。

4. 細菌の細胞外膜透過性

生菌 (Table 1) と粗抽出液 (Table 2) とでの薬剤の相対的加水分解速度を比較すると、大部分の生菌では Cephaloridine が最も加水分解されやすく、次いで Cefazolin, Cefotiam, Cephalothin の順であったのに対し、粗抽出液では Cephalothin の方が Cefotiam より加水分解されやすい。これは Cefotiam が Cephalothin より細胞外膜を透過しやすいためと考えられる。このことを確かめるため、R-plasmid 由来の I 型 penicillinase を産生する *E. coli* TN 713 および非伝達性の penicillinase を産生する *K. pneumoniae* TN 1698 を用いて

Table 2 Hydrolysis of cefotiam and other cephalosporins by β -lactamases

Source of enzyme	Induction*	β -lactamase activity**				Relative rate of hydrolysis (CER=100)		
		μ moles of substrate hydrolysed per minute per mg of bacterial dry cells				CTM	CEZ	CET
		CTM	CEZ	CET	CER	CTM	CEZ	CET
<i>Escherichia coli</i>								
NIHJ JC-2	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
CS 2911	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
CS 2913	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
TN 649	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
TN 639	-	0.02	0.03	0.03	0.17	12	16	18
	+	0.02	0.03	0.03	0.17	13	18	19
TN 713	-	0.05	0.11	0.14	0.68	7	17	20
	+	0.09	0.24	0.29	1.22	7	20	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>								
TN 1429	-	<0.01	0.01	0.01	0.04	<20	32	32
	+	<0.01	0.01	0.01	0.04	<20	24	32
GN 3835	-	0.02	0.04	0.03	0.12	14	35	24
	+	0.02	0.02	0.03	0.14	14	16	23
TN 1700	-	0.06	0.12	0.15	0.77	8	15	19
	+	0.07	0.13	0.16	0.69	10	18	23
TN 1698	-	0.03	0.37	0.20	1.49	2	25	14
	+	0.04	0.39	0.21	1.76	2	22	12
TN 1711	-	0.33	1.47	1.26	1.16	28	127	108
	+	0.34	1.66	1.29	1.18	29	141	109
<i>Proteus mirabilis</i>								
GN 4359	-	<0.01	0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	0.02	0.02	<0.01			
GN 4364	-	0.02	<0.01	0.01	0.02	109	<57	82
	+	<0.01	0.02	<0.01	0.02	<71	79	<59
<i>Proteus vulgaris</i>								
IFO 3988	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	0.02	<0.01	<0.01			
GN 4413	-	<0.01	0.02	<0.01	<0.01			
	+	1.27	3.41	1.16	0.79	160	430	146
<i>Proteus rettgeri</i>								
GN 4733	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	0.04	0.20	0.20	0.21	20	98	98
GN 4424	-	0.09	0.23	0.24	1.09	9	21	22
	+	0.09	0.23	0.29	1.10	9	21	26
<i>Proteus morgani</i>								
IFO 3168	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	0.03	0.04	0.09	0.07	43	61	119
GN 4715	-	0.25	0.55	1.14	1.16	22	47	99
	+	0.24	0.58	1.26	1.12	21	52	113

* The bacteria grown to the late logarithmic phase in Trypticase soy broth (TSB; BBL), were incubated for 2 hours with(+) or without(-) 1 mg (but 0.01 mg for *S. aureus* 1840 and 0.1 mg for *E. coli* NIHJ JC-2, CS 2911 and CS 2913) of benzylpenicillin per ml of TSB to induce β -lactamase.

** The sonic extract of bacterial cells except *S. aureus* for which culture filtrate was employed, was used as enzyme. The enzyme was incubated with 200 μ M of each substrate for 10 minutes and the reaction was stopped by the addition of 2 volumes of methanol. The enzyme activity was determined by the reduction of ultra violet absorption caused by the hydrolysis of the β -lactam bond of cephalosporins.

Table 2 Continued

Source of enzyme	Induction*	β -lactamase activity** μ moles of substrate hydrolysed per minute per mg of bacterial dry cells				Relative rate of hydrolysis (CER=100)		
		CTM	CEZ	CET	CER	CTM	CEZ	CET
<i>Staphylococcus aureus</i>								
1840	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
<i>Serratia marcescens</i>								
IFO 12648	-	0.02	0.05	0.04	0.03	63	155	138
	+	0.05	0.32	0.20	0.12	45	266	169
TN 24	-	0.02	0.13	0.08	0.05	54	285	184
	+	0.11	0.87	0.57	0.28	38	311	204
TN 86	-	<0.01	0.03	0.04	0.07	<21	50	53
	+	0.02	0.04	0.06	0.04	58	120	152
<i>Citrobacter freundii</i>								
GN 1706	-	0.01	0.02	0.01	0.02	82	107	84
	+	0.02	0.29	0.16	0.21	10	139	77
TN 515	-	0.05	0.92	0.43	1.00	5	91	43
	+	0.04	0.77	0.45	0.85	5	90	53
<i>Enterobacter cloacae</i>								
TN 603	-	0.02	0.02	0.02	<0.01			
	+	0.05	0.03	0.19	0.04	115	78	452
TN 580	-	<0.01	0.01	<0.01	0.02	<60	74	<73
	+	0.02	0.15	0.06	0.20	10	72	30
TN 613	-	0.02	0.03	0.03	0.10	17	33	27
	+	0.01	0.06	0.04	0.07	14	85	62
TN 1282	-	0.02	0.01	0.02	0.01	109	86	171
	+	0.03	0.03	0.12	0.05	54	67	241
<i>Enterobacter aerogenes</i>								
TN 582	-	<0.01	0.02	0.02	0.02	<60	77	112
	+	0.02	0.08	0.06	0.09	21	84	63
<i>Enterobacter liquefaciens</i>								
TN 577	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	0.01	0.03	0.05	0.03	39	87	184
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>								
TN 1140	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
TN 1373	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01			
	+	0.02	0.12	0.08	0.06	36	206	143
GN 3407	-	<0.01	0.02	<0.01	0.10	<12	19	<14
	+	<0.01	0.02	<0.01	0.06	<22	32	<31
TN 1347	-	<0.01	0.02	0.03	0.10	<16	20	30
	+	<0.01	0.04	0.07	0.12	<16	36	63

Table 3 Kinetics of hydrolysis of cefotiam and several β -lactam antibiotics by β -lactamase

Source of enzyme	Vmax*					Km (μ M)				
	CTM	CEZ	CET	CER	PCG	CTM	CEZ	CET	CER	PCG
<i>S. aureus</i> 1840	0.007	0.17	0.003	0.07	100	1.7	3.8	1.0	1.7	8.8
<i>E. coli</i> TN 713	16	17	12	114	100	1350	555	270	862	20
<i>E. coli</i> TN 649	45	14	12	41	100	4.1	18	25	120	1.7
<i>E. coli</i> TN 639	1.2	0.8	0.6	17	100	562	175	300	483	17
<i>K. pneumoniae</i> TN 1700(A)**	7.0	12	7.7	79	100	1150	690	333	1000	24
<i>K. pneumoniae</i> TN 1700(B)**	1.7	2.6	1.6	30	100	241	200	49	308	22
<i>K. pneumoniae</i> TN 1698	0.9	8.9	6.1	60	100	18	11	39	208	19
<i>K. pneumoniae</i> TN 1711	8.9	29	28	32	100	105	44	96	172	67
<i>C. freundii</i> GN 1706	1.7	200	24	100	3.3	15	1370	17	556	3.1
<i>P. vulgaris</i> GN 4413	274	774	178	100	11	238	313	48	130	7.2
<i>E. cloacae</i> TN 1282	16	277	104	100	10	87	4350	93	671	8.8

* Vmax is expressed as relative rate of hydrolysis taking the rate for benzylpenicillin (penicillinase) or cephaloridine (cephalosporinase) as 100.

** R-plasmid mediated conjugatively transferable enzyme.

Table 4 Ability of cefotiam and several cephalosporins to penetrate the outer membrane of *Escherichia coli* TN 713 and *Klebsiella pneumoniae* TN 1698

Antibiotic	So (μ M)	<i>E. coli</i> TN 713			<i>K. pneumoniae</i> TN 1698		
		Vo/Vi	Si/So	P	Vo/Vi	Si/So	P
Cefotiam	20				5.4	0.097	0.26
	50	2.6	0.37	0.39	2.3	0.17	0.32
	200	2.6	0.35	0.35			
Cefazolin	20				116	0.0031	0.14
	50	8.0	0.12	0.22	50	0.0037	0.15
	200	7.2	0.11	0.18			
Cephalothin	50	59	0.014	0.048	182	0.0024	0.019
	200	37	0.016	0.040	56	0.0027	0.022
Cephaloridine	50	16	0.059	0.62	30	0.027	0.51
	200	12	0.072	0.66	15	0.035	0.58

So : Antibiotic concentration in the reaction mixture

Si : Calculated antibiotic concentration inside the outer membrane

Vo : Velocity of antibiotic hydrolysis by sonically disrupted cell suspension

Vi : Velocity of antibiotic hydrolysis by intact cells, which was corrected for the activity of leaked-out enzyme

P : Permeability parameter

Cefotiam, Cefazolin, Cephalothin および Cephaloridine の細胞外膜透過性を測定した (Table 4)。

本実験では Km 値より低い薬剤濃度で活性を測定することが望ましく、*K. pneumoniae* TN 1698 の β -lactamase では Cefotiam および Cefazolin の Km が低いので (Table 3), これらの薬剤は 20 μ M および 50 μ M で測定し、他はすべて 50 μ M および 200 μ M で測

定した。

薬剤の細胞外膜透過係数 P は両菌株において Cephaloridine が最も大きく次いで Cefotiam, Cefazolin の順であり、Cephalothin は Cephaloridine の 1/10 以下であった。また *K. pneumoniae* TN 1698 では *E. coli* TN 713 より透過性が各薬剤ともやや悪かった。一方、測定時の細胞外薬剤濃度に対する細胞内 (periplasm 中) 薬

剤濃度は *E. coli* TN 713では Cefotiam 36%, Cefazolin 12%, Cephaloridine 6%, Cephalothin 1.5 %であり, *K. pneumoniae* TN 1698では Cefotiam 10~17%, Cefazolin 0.4%, Cephaloridine 3%, Cephalothin 0.3%であった。

考 察

生育中の菌に β -lactam 薬剤を作用させた場合, periplasm に β -lactamase を持つグラム陰性菌では, 細胞外膜を透過しやすく, かつ β -lactamase に不安定な薬剤ほど不活化されやすい¹⁰⁾。また溶菌活性の強い薬剤ではインキュベーション中に細胞表面が破壊され溶菌が起こり, 薬剤と β -lactamase との接触機会が高まるために溶菌活性の弱い薬剤に比べ, 不活化されやすくなると考えられる。従って培地中で薬剤と生菌とをインキュベートした時の薬剤不活化を調べた Table 1 の結果は薬剤の β -lactamase に対する安定性, 細胞外膜透過性および溶菌活性の総合されたものの反映と考えられる。

P. aeruginosa および *A. calcoaceticus* は生菌, 菌体抽出液いずれにおいても薬剤不活化力は弱いが, Cefotiam, Cefazolin, Cephalothin, Cephaloridine いずれに対しても耐性であり, この薬剤耐性は細胞外膜の薬剤透過障害, 薬剤に対する標的酵素の不感受性のどちらかまたは両方に起因すると考えられる。一方, その他の菌では β -lactamase 活性の高い菌ほどいずれの薬剤に対しても耐性が高く, 上記二要因の他に β -lactamase も重要な耐性要因であることが示唆された。

Cefotiam は他のセファロスポリン耐性菌の一部に対しても抗菌力を示した。この理由として β -lactamase 安定性, 細胞外膜透過性および標的酵素に対する作用力の三要因が考えられる。

P. aeruginosa, *A. calcoaceticus* 以外のセファロスポリン耐性菌の殆んどは高活性の β -lactamase を産生し, Cefotiam は *P. vulgaris* を除くこれらの菌の β -lactamase に対して他のセファロスポリンよりは安定であった (Table 2, 3)。また Cefotiam の *E. coli* TN 713 および *K. pneumoniae* TN 1698 での細胞外膜透過性は Cephaloridine よりはやや劣るが Cephalothin の約10倍, Cefazolin の約2倍であり, これらの菌での Cefotiam の細胞内 (periplasm 中) 濃度は細胞外濃度のそれぞれ35~37%および10~17%に達し, 他薬剤の細胞内濃度の3~70倍であると推定された (Table 4)。細胞内薬剤濃度は薬剤の細胞外膜透過性ばかりでなく, β -lactamase に対する安定性 (V_{max} , K_m) および測定時の細胞外薬剤濃度にも左右され, β -lactamase に加水分解されにくい (V_{max} が小さく K_m が高い) 薬剤ほど, また高濃

度で測定した時ほど高い細胞内濃度に達しやすい¹⁰⁾。Cephaloridine の場合, 細胞外膜透過性は優れているが, β -lactamase による加水分解速度が大きいため, また Cephalothin の場合は細胞外膜透過性が劣るため細胞内濃度が高くないのに対し, Cefotiam は細胞外膜透過性が優れている上に *E. coli* TN 713 では β -lactamase による加水分解の V_{max} が小さく, かつ K_m が高いため, また *K. pneumoniae* TN 1698 では V_{max} が小さいため他薬剤より高い細胞内濃度に達し得ると考えられる。さらに外膜透過性および標的酵素の感受性の二要因のみで薬剤感受性が決定される β -lactamase 非産生株に対して, Cefotiam は外膜透過性が最も優れていると推定される Cephaloridine より強い抗菌力を示す (Table 1) ことから, Cefotiam は標的酵素に対して強い作用力を持つことが示唆された。このことは *E. coli* のペニシリン結合たん白質1および3への Cefotiam の親和性が他の3薬剤より高いことを示す NOZAKI らの実験結果¹⁷⁾からも裏付けられた。

β -lactam 薬剤はその作用機作²⁾¹⁸⁾から考えて, 細胞内 (作用点での) 濃度がある一定レベル, 一定時間保持されてはじめて抗菌力として発揮されると考えられるので, 高い細胞内濃度に達することはそれだけ抗菌力という面からは有利に働くはずである。細胞外膜透過性がよく, かつ β -lactamase に比較的安定なため細胞内濃度が高くなるのが, 標的酵素に対する作用力の強さと相まって他のセファロスポリン耐性菌に対しても Cefotiam が抗菌力を示す原因になっているものと推定される。

結 論

Cefotiam (SCE-963) の各種 β -lactamase に対する態度およびグラム陰性菌の細胞外膜透過性を Cephaloridine, Cephalothin および Cefazolin を対照薬剤として比較検討した。

1. Penicillinase 型 β -lactamase では Cefotiam は Cefazolin および Cephalothin と同様 Cephaloridine より加水分解されにくく, *P. vulgaris* を除く菌の cephalosporinase 型 β -lactamase では他の三薬剤よりは加水分解されにくかった。

2. 薬剤を生菌と培地中でインキュベートした場合には, Cefotiam は Cephaloridine および Cefazolin より安定であったが Cephalothin より是不活化されやすかった。

3. Cefotiam の *E. coli* TN 713 および *K. pneumoniae* TN 1698 での細胞外膜透過係数は Cephalothin の約10倍, Cefazolin の約2倍であったが Cephaloridine よりは小さかった。

4. Cefotiam の細胞内 (periplasm 中) 濃度は *E. coli* TN7 13 で細胞外濃度の 35~37%, *K. pneumoniae* TN 1698 で 10~17% に達し, Cefazolin, Cephaloridine および Cephalothin の 3~70 倍の濃度になることが推定された。

文 献

- 1) RICHMOND, M.H. & R. B. SYKES: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* 9: 31~88, 1973
- 2) 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
- 3) COSTERTON, J.W. & K. J. CHENG: The role of bacterial cell envelope in antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 1: 363~377, 1975
- 4) COSTERTON, J.W.; J.M. INGRAM & K.J. CHENG: Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38: 87~110, 1974
- 5) NIKAIDO, H.: Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide and the outer membrane layer of gram-negative cell wall. in "Bacterial membranes and walls", ed. by L. Leive, Marcel Dekker, Inc. New York, p. 131~208
- 6) NEU, H.C.: The surface location of penicillinase in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32: 258~263, 1968
- 7) HAMILTON-MILLER, J. M. T.; J. T. SMITH & R. KNOX: Interaction of cephaloridine with penicillinase-producing gram-negative bacteria. *Nature* 208: 235~237, 1965
- 8) HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Effect of EDTA upon bacterial permeability to benzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20: 688~691, 1965
- 9) HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Use of Michaelis-Menten kinetics in the analysis of synergism between β -lactam antibiotics. *J. Theor. Biol.* 31: 171~176, 1971
- 10) ZIMMERMANN, W. & A. ROSSELET: Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12: 368~372, 1977
- 11) SAWAI, T.; K. MATSUBA & S. YAMAGISHI: A method for measuring the outer membrane permeability of β -lactam antibiotics in gram-negative bacteria. *J. Antibiotics* 30: 1134~1136, 1977
- 12) SPRATT, B.G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. *Eur. J. Biochem.* 72: 341~352, 1977
- 13) NOVICK, R.P.: Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 33: 121~136, 1963
- 14) 小此木研二, 木田 誠, 土屋 皖司, 米田 雅彦: Mecillinam の大腸菌に対する抗菌力および β -lactamase に対する態度. *Chemotherapy* 25: 94~99, 1977
- 15) LINEWEAVER, H. & D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658~666, 1934
- 16) NIKAIDO, H.; P. BAVOIL & Y. HIROTA: Outer membranes of gram-negative bacteria XV. Transmembrane diffusion rate in lipoprotein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 132: 1045~1047, 1977
- 17) NOZAKI, Y.; A. IMADA & M. YONEDA: SCE-963, a new potent cephalosporin with high affinity for penicillin-binding proteins 1 and 3 of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* (In preparation)
- 18) HAMILTON, T.E. & P.J. LAWRENCE: The formation of functional penicillin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 6578~6585, 1975

CEFOTIAM (SCE-963) STABILITY TO β -LACTAMASE
AND ABILITY TO PENETRATE THE OUTER
MEMBRANE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

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

SUSUMU MITSUHASHI
Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

The rate of hydrolysis of cefotiam (SCE-963) by cephalosporin β -lactamases from various bacteria except *Proteus vulgaris*, was smaller than that of cefazolin, cephaloridine and cephalothin. Cefotiam as well as cefazolin and cephalothin, was hydrolysed more slowly than cephaloridine by penicillin β -lactamases. When incubated with intact cells in the medium, cefotiam was more stable to degradation than cephaloridine and cefazolin but less stable than cephalothin. The ability of cefotiam to penetrate the outer membrane of *Escherichia coli* TN 713 and *Klebsiella pneumoniae* TN 1698 was estimated to be ten and two times greater than that of cephalothin and cefazolin, respectively, but smaller than that of cephaloridine. The calculated concentration of cefotiam inside the outer membrane of *Escherichia coli* TN 713 and *Klebsiella pneumoniae* TN 1698 was 35 to 37% and 10 to 17% of the concentration outside the cells, respectively, and was three to seventy times higher than that of cefazolin, cephaloridine and cephalothin.