

Cefuroxime に対する β -lactamase の作用

宮村 定男・仁田原 義之・寺尾 通徳

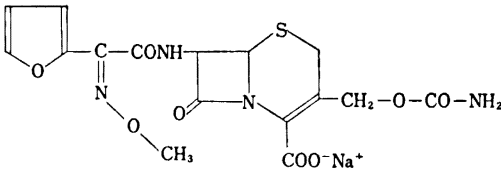
新潟大学医学部細菌学教室

cephalosporinase および penicillinase を産生する 8 種のグラム陰性菌から β -lactamase を抽出し、新 cephalosporin 誘導体 Cefuroxime に対する作用を実験し、3 種の penicillin 系および 3 種の cephalosporin 系抗菌薬と比較した。

その結果、Cefuroxime はこれらの β -lactamase に対して、*Proteus vulgaris* GN 76 (RICHMOND Type Ic) からのもの以外は、他の cephalosporin 薬より安定で、かつ β -lactamase の作用に阻害効果を有することを認めた。

Cefuroxime は cephalosporin C から化学的に合成された 7-amino cephalosporanic acid の誘導体で、Fig. 1 のような化学構造を有する¹⁾。

Fig. 1 Structure of Cefuroxime



本薬の特色は β -lactamase に対する抵抗性が強く、ブドウ球菌あるいはグラム陰性菌の産生するこの酵素に安定であるとされている^{2,3)}。 β -lactam 系抗生物質に対する耐性菌の大部分は、この酵素を産生することによって耐性を示すと考えられているので、本薬が本酵素に安定であるということは、その抗菌性の範囲を大きく拡大するものと思われる。よって、とくにグラム陰性菌の産生する β -lactamase の本薬に対する作用について実験し、同系の抗生物質と比較したので、ここに報告する。

I. 実験材料および方法

1. 供試 β -lactamase 産生菌株

cephalosporinase (CSase と略) 産生菌としては、群馬大学微生物学教室から分与された *Citrobacter freundii* GN 346 (RICHMOND Type Ia の β -lactamase を産生⁴⁾)、*Proteus inconstans* GN 627 (同 Ia)、*Proteus vulgaris* GN 627 (同 Ic) およびわれわれの教室で分離し Ia に属する酵素を産生すると思われる *Yersinia enterocolitica* NU 294 を、penicillinase (PCase) 産生菌としては同じく群馬大学の *Proteus mirabilis* GN 79 (同 IIb)、*Escherichia coli* RGN 14 (同 III)、*Klebsiella pneumoniae* GN 69 (同 IVb) および教室分離の N 型に属すると考えられる *Serratia marcescens* NU 3

の計 8 株を使用した。

2. 供試薬

新日本実業株式会社から提供された Cefuroxime (以下 CXM と略) のほか、Penicillin-G (PCG)、Ampicillin (ABPC) および Cloxacillin (MCIPC) の 3 種の penicillin および Cephaloridine (CER)、Cephalothin (CET) および Cefazolin (CEZ) の 3 種の cephalosporin の計 7 薬を使用した。

3. 薬剤感受性測定

寒天平板希釈法によった。すなわち各菌株の普通寒天培地 18 時間培養より 10^8 cells/ml になるように菌浮遊液を作成し、各試験薬を所定濃度含有した普通寒天平板上に 1 滴宛接種、 37°C 18 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

4. β -lactamase の調製

供試菌株の HI-broth 37°C 24 時間振盪培養を、さらに同培地に 1/100 量接種、 37°C 4 時間振盪培養を行なった後遠心し、集めた菌体を 0.01 M PBS (pH 7.0) で 3 回洗浄した後、Sonicator 10 kc/sec 30 分処置で菌体を破壊し、再び遠心した上清に 85% 硫酸アンモニウムを加え、沈殿を透析して、酵素液とした。酵素の活性は、LAWRY 法によって測定した。蛋白量当りの PCase は PCG、CSase は CER の不活性化をもって評価した。

5. β -lactamase の測定

Bioassay および NOVIÉ⁵⁾ の Micro-iodometric assay を用いた。

生物学的方法は、基質と酵素を 37°C 1 時間作用させた後、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする薄層カップ法で基質の残存力価を測定して酵素作用を計算した。

ヨード法は、基質、酵素およびヨード混合液を 2 ml となるように、0.1 M PBS (pH 7.0) の溶液中で 30°C

Table 1 MIC ($\mu\text{g/ml}$) of test strains

Strain	PCG	ABPC	MCIPC	CER	CET	CEZ	CXM
<i>C. freundii</i> GN 346	>1,000	1,000	250	500	>1,000	>1,000	100
<i>P. inconstans</i> GN 627	>1,000	500	125	250	1,000	1,000	100
<i>Y. enterocolitica</i> NU 294	>1,000	62.5	125	62.5	500	31.2	3.12
<i>P. vulgaris</i> GN 76	1,000	500	500	1,000	1,000	500	>1,000
<i>P. mirabilis</i> GN 79	>1,000	>1,000	125	31.2	31.2	15.6	0.78
<i>E. coli</i> RGN 14	>1,000	>1,000	1,000	7.8	31.2	3.9	1.56
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	>1,000	1,000	500	7.8	31.2	3.9	1.56
<i>S. marcescens</i> NU 3	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000

Table 2 Relative rate of hydrolysis by β -lactamases

Enzyme from	Specific activity units/mg protein		Substrate						
	PCase	CSase	PCG	ABPC	MCIPC	CER	CET	CEZ	CXM
<i>C. freundii</i> GN 346		3.6	80	2.4	0.24	100	200	400	3.12
<i>P. inconstans</i> GN 627		0.2	5.8	1.6	1.0	100	26	200	8.3
<i>S. marcescens</i> NU 3		4.0	200	3,200	40	100	50	100	25
<i>Y. enterocolitica</i> NU 294		7.3	25	6.2	0.5	100	50	100	12.5
<i>P. vulgaris</i> GN 76		0.0033	50	50	50	100	400	400	1,600
<i>P. mirabilis</i> GN 79	15.0		100	800	0.2	0.1	0.1	0.1	4.0
<i>E. coli</i> RGN 14	96.6		100	160	1.0	10	0.6	0.3	0.3
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	10.5		100	400	1.2	2.4	0.3	0.6	0.6
<i>S. marcescens</i> NU 3	9.4		100	160	20	50	25	50	12.5
<i>Y. enterocolitica</i> NU 294	2.1		100	25	2	400	200	400	25

Table 3 Kinetics of hydrolysis by various β -lactamases

Substrate	Enzyme from								
	<i>Y. enterocolitica</i> NU 294			<i>S. marcescens</i> NU 3			<i>P. vulgaris</i> GN 76		
	K_m (μM)	V_{\max} *	Relative rate of hydrolysis	K_m (μM)	V_{\max}	Relative rate of hydrolysis	K_m (μM)	V_{\max}	Relative rate of hydrolysis
CXM	28	0.63	12.5	24.9	0.6	25	2.2	0.606	1,600
CER	17	0.64	100	18.4	1	100	14.28	0.82	100
CEZ	21	0.63	100	9.1	1.7	100	26.23	1.428	400
PCG	33	1.85	25	16	2	200	7.68	0.625	50
MCIPC			0.5	1.5	1.5	40			

* $\Delta\text{OD}/\text{min}/\text{ml}$

1 分間作用させた後、分光光度計で経時的に OD 620 nm を自記装置で測定することによって、酵素作用を計算した。

II. 実験成績および考按

1. 供試菌株の薬剤感受性

供試薬の各菌株に対する MIC は Table 1 に示すとおりである。CXM は PCase を産生する *P. mirabilis*, *E. coli* および *K. pneumoniae* と CSase を産生する *Y. enterocolitica* に感受性を有した。CER と CEZ が *E. coli* および *K. pneumoniae* に感受性を示したほか、

他の試験薬は 8 菌株に対して作用は弱く、*C. freundii*, *P. inconstans* および *S. marcescens* は CXM を含め、全薬に対し耐性を示した。

2. β -lactamase に対する安定性

各菌株からそれぞれ調製した β -lactamase を用いて、Bioassay により供試 cephalosporin および penicillin 系薬の加水分解度を測定した結果は Table 2 のとおりである。CSase 産生株では CER を 100 として、PCase 産生株では PCG を 100 として比較したが、CXM は PCase に対しては、他の cephalosporin 系薬と同程度

Fig. 2 Kinetics of inhibition by CXM of *C. freundii*- β -lactamase-CER system (DIXON plot)

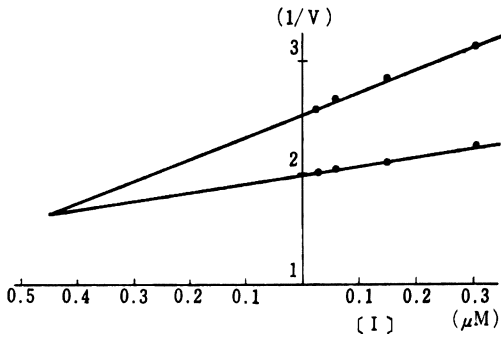
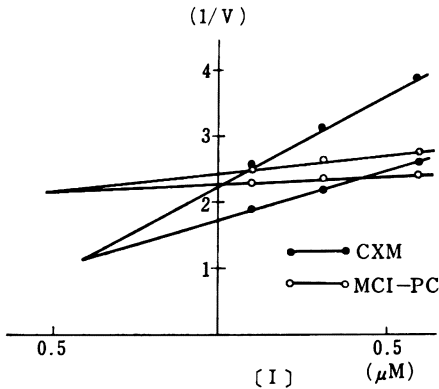


Fig. 3 Kinetics of inhibition by CXM and MCIPC of *P. mirabilis*- β -lactamase-CER system (DIXON plot)



に分解されにくい。CSase に対しても一般に他の薬剤よりも安定であったが、ただ *P. vulgaris* のみについては他の薬剤よりも不安定であるという成績が得られた。

3. β -lactamase による加水分解の動力学

酵素と試験薬の親和性を知るために、以上の成績から CXM が分解される *Y. enterocolitica*, *S. marcescens* および *P. vulgaris* の産生する β -lactamase を用い、Micro-iodometry で K_m および V_{max} 値を求めた。この算出は LINEWEAVER-BURK の plot によったが、その結果は Table 3 に示すとおりである。

CXM は、*P. vulgaris* GN 76 以外は、CER および CEZ に比べて高い K_m 値を示し、 β -lactamase との親和性がこれらより弱いことがうかがわれた。

Table 4 K_i values evaluated by DIXON plot

Enzyme from	K_i (μM)*	
	CXM	MCIPC
<i>C. freundii</i> GN 346	0.45	
<i>P. mirabilis</i> GN 79	0.41	0.52

* Substrate : CER

4. β -lactamase に対する阻害効果

すでに MCIPC, Carbenicillin, Methicillin などが β -lactamase の作用を阻害することが知られているので⁹⁾, *C. freundii*, *P. mirabilis* の産生する β -lactamase を用いて、CER を基質として CXM および MCIPC の阻害作用を、DIXON plot で K_i 値を求めることで比較した。その成績は Fig. 1, Fig. 2 および Table 4 に示すように、CXM および MCIPC に拮抗阻害が認められたが、*P. mirabilis* の産生する β -lactamase について、CXM の K_i 値は、MCIPC よりわずかに低い。いずれにせよ、CXM が β -lactamase に対し拮抗阻害を示すという事実は、CXM がこの酵素由来の耐性菌に対して、同系他薬剤と協効効果を有するであろうということを示唆する。

文 献

- O'CALLAGHAN, C. H.; R. B. SYKES, A. GRIFFITHS & J. E. THORNTON: Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic : Activity *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother 9 : 511~519, 1976
- O'CALLAGHAN, C. H. : R. B. SYKES, D. M. RYAN, R. D. FOORD & P. W. MUGGLETON : Cefuroxime — a new cephalosporin antibiotic. J. Antibiot. 24 : 29~37, 1976
- RICHMOND, M. H. & S. WOTTON : Comparative study of seven cephalosporins : Susceptibility to β -lactamases and ability to penetrate the surface layers of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 10 : 219~222, 1976
- 山岸三郎, 沢井哲夫: グラム陰性菌の β -lactamase について。日細菌誌 30 : 615~629, 1975
- NOVIC, R. P. : Micro-iodometric assay for penicillinase. Biochem. J. 83 : 236~240, 1962
- 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

ACTIVITY OF BETA-LACTAMASE FROM GRAM-NEGATIVE
BACTERIA ON CEFUROXIME

SADAO MIYAMURA, YOSHIYUKI NITAHARA
and MICHINORI TERAQ

Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine

A new cephalosporin derivative, cefuroxime, was investigated on its stability to various β -lactamases obtained from gram-negative bacteria using three penicillins and three cephalosporins as reference samples.

The results obtained indicated that cefuroxime was less susceptible than other cephalosporins to hydrolysis by these β -lactamases except the one from *Proteus vulgaris* GN 76 (RICHMOND Type Ic) and behaved as competitive inhibitor of the enzymes.