

## β-lactamase に安定な β-lactam 系抗生物質のグラム 陰性菌に対する外膜透過能の新規評価法

高 乗 仁・信 貴 康 孝・西 田 実

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

(昭和 54 年 6 月 11 日受付)

β-lactamase に安定な β-lactam 系抗生物質の外膜透過能を評価するための新しい方法を考案した。この方法の原理は periplasm に存在する β-lactamase による基質の分解に対するこの種の β-lactam 剤の阻害活性を測定するものである。この方法を carbenicillin の外膜透過能の測定に応用し、R-plasmid 由来の ampicillin 耐性 *Escherichia coli* の carbenicillin に対する高度耐性は、carbenicillin の細胞外膜透過能が低いためであることを明らかにした。

### 序 文

グラム陰性菌は外膜と呼ばれる最外層の膜を有し、β-lactam 系抗生物質が内膜上に存在する標的酵素に到達する際、これが通過障壁として機能することは周知のとおりである。したがって β-lactam 剤の外膜透過能はグラム陰性菌に対する抗菌活性を決定する主要な因子の1つと考えられる。β-lactam 系抗生物質の外膜透過能を測定するため数種の方法が提唱されたが、最も信頼できるものとして、内膜と外膜との間に位置する periplasm に存在する β-lactamase の β-lactam 剤に対する分解活性を利用する方法が挙げられる<sup>1-4)</sup>。初期の論文では、膜透過性は生菌液を破碎することによって起る β-lactamase の薬剤に対する分解活性の変化を表わした Crypticity について論じられた<sup>1,2)</sup>。最近、ZIMMERMANN & ROSSELET は外膜を透過する薬剤の拡散速度は、薬剤の細胞内への拡散と periplasm 中の β-lactamase による分解とが均衡しているという仮定に基づいて測定できることを示し、この型式の評価法を改良した<sup>4)</sup>。しかし、この方法は β-lactamase に安定な新しい β-lactam 剤には適用できないという欠点を有している。本報では β-lactamase に安定な β-lactam 剤に適用できる方法として、ZIMMERMANN & ROSSELET によって提唱された方法を改良したので、以下に報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 使用菌株

*E. coli* CSH 2 (F<sup>-</sup>, nal, met B) と ampicillin 耐性 R-plasmid 保有株の *E. coli* CSH 2/RK 1 を使用した。両株とも順天堂大学医学部細菌学教室 横田 健 教授から分与をうけた。

#### 2. 使用薬剤

薬剤は、carbenicillin, ampicillin (CBPC, ABPC,

Beecham Research Laboratories), cephaloridine (CER, Glaxo Laboratories) を使用した。

#### 3. 薬剤感受性の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) はスタンプ接種による寒天平板希釈法によって測定した<sup>5)</sup>。接種液は Trypticase soy broth で1夜、前培養したものを100倍希釈して使用した。37°C, 20時間培養後、コロニーの発育阻止が肉眼的に判断できる最小濃度を MIC とした。

#### 4. 生菌液と破碎菌液の調製

使用菌株を Heart infusion broth 中で 37°C, 20時間増殖後、5,000×g, 10分間遠心分離することにより集菌する。0.01 M MgCl<sub>2</sub> を加えた 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で1度洗浄し、氷冷した同様の緩衝液に懸濁し 320 nm での吸光度を求める。この菌液の一部を超音波破碎処理装置 (トミー精工) を使用して、最大出力で5分間氷水中において音波処理を行う。生菌液の上清は 9,000×g で 10分間遠心分離した後、ミリポアフィルター (HA 0.45 μm) でろ過する。

#### 5. β-lactamase の調製

使用菌株を Heart infusion broth 中で 37°C, 20時間培養し、遠心分離によって集菌した後、0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で1度洗浄してから再懸濁させる。菌液を最大出力で5分間、音波処理した後 10,000×g で1時間遠心分離する。その結果得られた上清は Sephadex G 100 カラムに通してから 0.067 M リン酸緩衝液で溶出した。酵素画分はブールし、-20°C で保存する。この部分精製された酵素液を被検 β-lactam 剤の反応動力学定数の算出に使用した。

#### 6. β-lactamase 活性の測定

β-lactamase の活性は恒温セルホルダーを備えた日立 200-20 型分光光度計を使用し、直接分光光度法で測定

した。酵素液（生菌液，破砕菌液，菌液の上清または精製酵素液）0.1 ml は基質および阻害剤と 200  $\mu$ mole リン酸緩衝液とで最終量が 3.0 ml となるようにし，1 cm 石英セル内で混ぜ 37°C で incubate する。それぞれの反応成分は 37°C のウオーターバスで予め incubate する。基質の  $\beta$ -lactam 環の分解速度はペニシリンでは 240 nm，CER では 320 nm における紫外吸収の変化によって求めた。また生菌の  $\beta$ -lactamase 活性は漏出した酵素による上清液の活性を補正した。

### 7. 酵素の反応動力学定数

ミハエリス定数 ( $K_m$ )，基質分解の最大速度 ( $V_{max}$ ) と阻害定数 ( $K_i$ ) は反応速度の逆数 ( $1/v$ ) と基質濃度の逆数 ( $1/s$ ) をプロットし，Linerweaver-Burk プロット法により算出する。

### 実験成績

$\beta$ -lactamase 産生菌の periplasm 内における  $\beta$ -lactamase に安定な  $\beta$ -lactam 剤の濃度は次の手順によって測定した。基質に対する periplasm 中の  $\beta$ -lactamase 活性を被検  $\beta$ -lactam 剤が阻害することを利用したものである。この手順は (1) 基質の透過係数，(2) 被検  $\beta$ -lactam 剤の periplasm 中濃度，を測定する 2 つの段階から成り立っている。

(1) 基質の透過係数の測定：透過係数は ZIMMERMANN & ROSSELET の方法<sup>4)</sup>によって測定される。periplasm 中の基質濃度 ( $S_p$ ) はミハエリスメンテンの式を応用することによって求められる。

$$S_p = \frac{v_{\text{intact}} \cdot K_m}{V_{\text{max}} - v_{\text{intact}}} \quad (\text{A})$$

$v_{\text{intact}}$ ， $K_m$  そして  $V_{\text{max}}$  は，それぞれ生菌による  $\beta$ -lactam 分解速度，ミハエリス定数，最大速度である。さらに透過係数 ( $C$ ) は，薬剤が外膜を拡散してゆく速度と， $\beta$ -lactam の分解速度が等しいという仮定に基づいて次の式により導くことができる。

$$C = \frac{v_{\text{intact}}}{S_0 - S_p} \quad (\text{B})$$

$S_0$  は外液中の基質濃度である。

(2) periplasm 中の被検  $\beta$ -lactam 剤の濃度の測定：細菌を基質と被検  $\beta$ -lactam 剤の両剤と共に接触させた場合の periplasm 中の基質濃度 ( $P_p'$ ) は先に述べた  $C$  値を使って次の式から算出できる。

$$S_p' = S_0 - \frac{v_{\text{intact}}'}{C} \quad (\text{C})$$

$v_{\text{intact}}'$  は被検  $\beta$ -lactam 剤存在下での生菌による基質の分解速度であり，実験的に測定できる。被検  $\beta$ -lactam 剤が periplasm 中の  $\beta$ -lactamase による基質の分解を競合的に阻害すると仮定すると，競合的阻害を利用したミハエリス・メンテンの式から次の関係式が得られる。

$$v_{\text{intact}}' = \frac{P_p' \cdot V_{\text{max}}}{S_p' + K_{mapp}} \quad (\text{D}')$$

および

$$K_{mapp} = K_m \left( 1 + \frac{I_p}{K_i} \right) \quad (\text{E}')$$

これらの式は次のように変形できる。

$$K_{mapp} = \frac{S_p' (V_{\text{max}} - v_{\text{intact}}')}{v_{\text{intact}}'} \quad (\text{D})$$

および

$$I_p = \frac{K_i (K_{mapp} - K_m)}{K_m} \quad (\text{E})$$

$K_{mapp}$ ， $K_m$ ， $V_{\text{max}}$  と  $K_i$  はそれぞれみかけのミハエリス定数，ミハエリス定数，基質分解の最大速度，被検  $\beta$ -lactam 剤の阻害定数である。 $K_m$ ， $K_i$ ， $V_{\text{max}}$  の値は酵素液として菌破砕液を使用することによって実験的に測定できる。従って periplasm 中の被検  $\beta$ -lactam 剤の濃度は (D) 式から得られた  $K_{mapp}$  値を (E) 式に代入することによって求めることが可能である。

### ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* の periplasm 中の CBPC 濃度の測定

CBPC は  $\beta$ -lactamase に比較的高い安定性を有するため ZIMMERMANN & ROSSELET の方法は適用しがたい。そこで先に述べた方法を CBPC の *E. coli* 外膜透過能の評価のために用いた。ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* CSH 2 を種々の濃度の CBPC および 1 mM の CER (基質) と共に接触させた。periplasm 中の CBPC 濃度は先に述べた方法に従って測定した。そして ZIMMERMANN & ROSSELET の方法によって計算された ABPC および CER の periplasm 中濃度と比較した (Table 1)。CBPC は外膜透過性が悪く  $\beta$ -lactamase 阻害活性も比較的弱いため低い外液濃度では periplasm 中の CBPC 濃度は測定できなかった。一方，高い外液濃度での ABPC および CER の periplasm 中濃度はその吸光度が分光光度計の測定限界を越えるため測定が不可能であった。しかしながら 3 種の  $\beta$ -lactam 剤の periplasm 中濃度は 1 mM の外液濃度においては比較できた。CBPC の periplasm 中濃度と ABPC および CER

Table 1 Concentrations of the  $\beta$ -lactams in periplasm

Concentration in medium ( $\mu$ M)	Concentration in periplasm ( $\mu$ M)		
	carbenicillin	ampicillin	cephaloridine
25,000	22	ND*	ND
5,000	6.0	ND	ND
1,000	1.4	2.7	330
200	ND	1.8	55

\* Not determined.

Table 2 Comparison of MICs and kinetic constants of the  $\beta$ -lactams

Antibiotic	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		Kinetic constants			
	R <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>	Vmax <sup>c</sup>	Km ( $\mu\text{M}$ )	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Km/Vmax <sup>d</sup>
carbenicillin	51,200	6.25	100	31	12	100
ampicillin	12,800	6.25	870	65	—	2.4
cephaloridine	100	3.13	1,410	970	—	222

a *E. coli* CSH2/RK1b *E. coli* CSH2

c, d: Expressed as percentage of the value for carbenicillin.

のそれらに対する比は、それぞれ 0.52 と 0.004 であった。一般に  $\beta$ -lactamase 産生菌の periplasm 中における  $\beta$ -lactam 剤の濃度がその薬剤のミハエリス定数の値を下まわってれば、その濃度は外液濃度にほぼ比例している。(V<sub>max</sub> ≫ v<sub>inact</sub>, S<sub>0</sub> ≫ S<sub>p</sub>) と仮定すると (A), (B) の式から S<sub>p</sub> = (K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub>) · C · S<sub>0</sub> の関係式が得られる。従って外液濃度を一定にした場合の periplasm 中濃度における薬剤間の比は、一定の periplasm 中濃度を与える薬剤の外液濃度の比に逆比例する。従って標的酵素の  $\beta$ -lactam 剤に対する感受性が等しい場合、試験菌株に対する MIC の比は外液濃度を一定にした時の periplasm 中濃度の比に逆比例する。Table 2 に *E. coli* の試験菌株に対する MIC と試験菌株の  $\beta$ -lactamase に対する被検薬剤の反応定数を示した。R-plasmid 保有株に対する CBPC, ABPC および CER の MIC は相違するが、R-plasmid を持たない親株に対するこれらの薬剤の MIC が同一であるので、標的酵素に対するこれらの薬剤の作用には著明な相違はないと考えられる。何故ならば、R-plasmid を持たない親株の periplasm 中濃度に関しては、薬剤間でほとんど相違しないと考えられるからである。これは (B) 式から得られる次の関係式から説明可能である。

$$S_p = S_0 - \frac{v_{\text{inact}}}{C}$$

すなわち親株の  $\beta$ -lactamase 活性は極めて低いので v<sub>inact</sub> = 0 とすると透過係数 C の値にかかわらず、S<sub>p</sub> = S<sub>0</sub> となり、いずれの薬剤についても periplasm 中濃度は外液中濃度とほぼ等しくなる。

plasmid 保有株に対する CBPC の MIC と ABPC および CER の MIC の比はそれぞれ 0.25 と 0.002 である。これらの比は単に R-plasmid 由来  $\beta$ -lactamase に対する各薬剤の安定性の相違によって説明できない。標的酵素に有効な低濃度では  $\beta$ -lactamase に対する  $\beta$ -lactam 剤の安定性は K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> によって求めることができる。従って、CBPC の K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> と ABPC および CER のそれに対する比はそれぞれ 0.024 と 2.2 であった。一方、MIC の比と、実験的に測定した periplasm

中濃度の比とは予想どおりよく一致した。この一致は本報に示した新規評価法の信頼性を示しているといえる。さらに CBPC は plasmid 由来  $\beta$ -lactamase に対して比較的高い安定性を有するにもかかわらず、periplasm 中濃度が低いということは CBPC の外膜透過能が低いことを示唆している。これらの結果から、ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* に対する CBPC の高度耐性はその低い外膜透過能と plasmid 由来の  $\beta$ -lactamase による分解作用が相乗的に働くためと説明できる。

#### 考 察

グラム陰性菌の外膜に関する最近の研究で、溶質は porin と呼ばれるタンパクから構成される孔を介して外膜を透過し、またその透過は溶質の大きさと疎水性によって制限されていることが明らかにされた<sup>1-8)</sup>。また外膜透過に関し二階堂らは、porin 欠損変異株を使って CER が porin を介して透過するというを確認した<sup>9)</sup>。 $\beta$ -lactam 剤の外膜透過能を測定する種々の方法の中で、外膜透過性についての変異株や EDTA 処理菌が透過障壁を除去するために使用された<sup>10,11)</sup>。しかし、上記の菌で外膜透過性が上昇するのは、疎水性分子の透過を許すリン脂質層が生成することによると報告されているので<sup>12)</sup>、これらの菌が完全に透過障壁を除去されているとは考えられない。上記の試験菌に対する MIC や 50% 発育阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) は検討薬剤の疎水性に依存するため、MIC や IC<sub>50</sub> に関する変異株と親株の比、あるいは EDTA 処理菌と非処理菌の比は薬剤の外膜透過能の正確な指標とはなっていない。その他、放射性同位元素で標識した  $\beta$ -lactam 剤を利用する方法があるが、非特異的な吸着量が多く、結果の解釈は困難である。従って、ZIMMERMANN & ROSSELET によって提唱された方法は、薬剤の濃度、 $\beta$ -lactamase に対する安定性、標的酵素に対する親和力などは独立した定数である  $\beta$ -lactam 剤の透過係数を、量的に評価できるという点で他の方法より優れたものと考えられる<sup>4)</sup>。しかしこの方法は  $\beta$ -lactamase に安定な  $\beta$ -lactam 剤には適用できないという欠点を有しているため、その再検討を試み、新規評価法を確立した。この方法では  $\beta$ -lactamase に安定な  $\beta$ -lactam 剤

の periplasm 中濃度は算出できるがその透過係数は求められない。しかし  $\beta$ -lactam 剤の periplasm 中濃度はそのミハエリス定数を下まわっている場合、近似的に  $(K_m/V_{max}) \cdot C \cdot S_0$  と等しいので係数の概値は  $\beta$ -lactam 剤の安定性 ( $K_m/V_{max}$ ) を測定することによって求めることができる。この方法を ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* に対する CBPC の外膜透過能の評価に応用した。CBPC の plasmid 由来  $\beta$ -lactamase に対する安定性と plasmid 保有株が示す CBPC に対する高度耐性との矛盾についてはすでに指摘されているが<sup>13)</sup>、我々の実験により、plasmid 保有株の CBPC に対する高度耐性は、CBPC の *E. coli* 外膜透過能が低いためであるということが明らかになった。

#### 文 献

- 1) HAMILTON-MILLER, J. M. T. ; J. T. SMITH & R. KNOX : Interaction of cephaloridine with penicillinase-producing gram-negative bacteria. *Nature* (London) 208 : 235~237, 1965
- 2) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES : The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* 9 : 31~88, 1973
- 3) SAWAI, T. ; K. MATSUBA, A. TAMURA & S. YAMAGISHI : The bacterial outer-membrane permeability of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antibiotics* 32 : 59~65, 1979
- 4) ZIMMERMANN, W. & A. ROSSELET : Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 12 : 368~382, 1977
- 5) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法。 *Chemotherapy* 23 : 1, 1975
- 6) DECAD, G. & H. NIKAIDO : Outer membrane of gram-negative bacteria. XII. Molecular sieving function of cell wall. *J. Bact.* 128 : 325~336, 1976
- 7) NAKAE, T. : Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 877~884, 1976
- 8) NIKAIDO, H. : Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochem. Biophys. Acta* 433 : 118~132, 1976
- 9) NIKAIDO, H. ; S. A. SONG, L. SHALTIEL & M. MURMINEN : Outer membrane of *Salmonella*. XIV. Reduced transmembrane diffusion rates in porin-deficient mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 : 324~330, 1977
- 10) RICHMOND, M. H. ; D. C. CLARK & S. WOTTON : Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase-non-susceptible penicillins in *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 10 : 215~218, 1976
- 11) SCUDAMORE, R. A. ; T. J. BEVERIDGE & M. GOLDNER : Outer-membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to beta-lactam and other antibiotics in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 15 : 182~189, 1975
- 12) KAMIO, Y. & H. NIKAIDO : Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* 15 : 2561~2570, 1976
- 13) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA : Beta-lactamase directed barrier for penicillins and cephalosporins of *Escherichia coli* carrying R-plasmids. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11 : 936~940, 1977

## A NOVEL METHOD FOR EVALUATING THE OUTER MEMBRANE PENETRABILITY OF $\beta$ -LACTAMASE-STABLE $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTICS

HITOSHI KOJO, YASUTAKA SHIGI and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 532, Japan

A novel method is described which allows estimation of the outer membrane penetrability of  $\beta$ -lactamase-stable  $\beta$ -lactams by determining antibiotic concentrations in the periplasm. The method is based on measurement of the inhibiting activity of  $\beta$ -lactamase-stable  $\beta$ -lactams on the hydrolysis of a substrate by periplasmic  $\beta$ -lactamase. Application of the method to carbenicillin revealed that the high level of resistance to carbenicillin of an *E. coli* strain acquiring the plasmid encoding ampicillin resistance resulted from the poor ability of carbenicillin to penetrate the outer membrane of *E. coli*.