

## Cefadroxil の penicillin 結合タンパクへの親和性と $\beta$ -lactamase に対する安定性

横田 健・東 映子・関口玲子  
順天堂大学細菌学教室

新経口 Cephalosporin (CEPs) 剤, Cefadroxil の各種  $\beta$ -lactamase に対する結合親和性と安定性を調べるとともに,  $\beta$ -lactam 薬剤の作用点である Penicillin (PC) 結合タンパクに対する親和性を検討した。

Cefadroxil は, penicillinase (PCase) 型  $\beta$ -lactamase (RICHMOND 分類 II, III, IV, V) によっては ABPC の 1% 以下しか水解されず, Cephalexin (CEX) より安定性が高い。また cephalosporinase (CESase) 型  $\beta$ -lactamase のうち Ia には Cephaloridine (CER) の 4% 以下の水解率で, この場合も CEX より安定性が高い。*P. vulgaris* の産生する Ic 型  $\beta$ -lactamase (CESase) ではよく分解されるが, CEX より水解率は低い。

大腸菌の PC 結合タンパクに対して, Cefadroxil は Ia にもっとも高い親和性を示し, ついで 1b, 3, 2, 4 に結合する。

Cefadroxil は CEX より各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性が高く, かつ PC 結合タンパク, 特に 1b により強く結合するので, これらの性質が実際の抗菌力にどの程度反映するか興味深い。

### はじめに

すぐれた化学療法剤は, 明らかな選択毒性を有するとともに, 期待される薬物体内濃度を得るための投与方法が簡単であることが望ましい。Cephalosporin 誘導体 (CEPs) は, 細菌細胞特有の細胞壁合成を阻害するので, その作用は殺菌的であり, 人体細胞には作用点がないので, 選択毒性も著しい<sup>1)</sup>。しかしながらこの群の薬には, 経口投与で十分な血中濃度を与えるものが少なく, 大部分は注射剤である。

Cefadroxil (CDX) は数少ないCEPs経口剤で, Cephalexin (CEX) の 7-(R) 位のベンゼン核に OH 基をつけた新誘導体である。今回は, この Cefadroxil の細菌細胞壁合成酵素に対する阻害の強さをみるために, Penicillin (PC) 結合タンパク群として知られる murein-transpeptidase に対する結合親和性を他薬剤と比較して作用点に対する阻害度の強弱を見るとともに, 各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性を調べ, 現在の  $\beta$ -lactam 薬剤耐性菌における抗菌力を基礎的に検討することを目的として実験を進めた。

### 1. 研究方法

#### 1) PC 結合タンパクに対する各種 CEPs の結合親和性の比較

*Escherichia coli* NIHJ JC-2 を 5 ml の L-broth 中に 37°C 1 夜振とう培養し, その全量を 500 ml 坂口コルベン中に入れた 200 ml の新鮮 L-broth に全量接種し, さらに 37°C 4 時間振とう培養を行なった。このようにし

て得られた対数期後半の細胞を冷却遠心で集菌し, 氷冷した 0.01 M の Sodium phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗浄, 8 ml の 10 mM MgCl<sub>2</sub> 加 0.05 M の sodium phosphate buffer (pH 7.0) に再浮遊した。これを氷冷しながら, 10 Kc の音波破砕機で 30 秒 10 回処理し, 3,000 g 10 分間の冷却遠心により菌体破砕液を得た。この破砕液から 100,000 g 30 分超遠心により膜画分を得て, これを 8 ml の MgCl<sub>2</sub> 加 0.05 M の sodium phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗い実験に供した。

PC 結合タンパクに対する Cefadroxil, CEX, Cefazolin (CEZ), Cephaloridine (CER) および Cefatrizine (CFT) の <sup>14</sup>C-PCG に対する競合結合は, SPRATT<sup>2)</sup> による方法に準じた。すなわち, 20 mg protein/ml の膜画分 30  $\mu$ l に最終濃度 1, 5 または 25  $\mu$ g/ml になるように被験薬剤を加え, 30°C 10 分間反応させた後, 3  $\mu$ l の <sup>14</sup>C-PCG (0.15  $\mu$ Ci : 50  $\mu$ Ci/ml) を加えて, さらに 30°C 10 分間反応させた。内膜を sarkosil でとかし PC 結合タンパクを遊離させた後, 20,000 g 30 分遠心して外膜を除いた後, acrilamide slab 電気泳動を行ない, ゲルに 2,5-diphenyloxazole (PPO) を含ませて乾燥した。これを Kodak RP Royal "X-Omat" フィルムに密着し, -80°C 2 週間前後感光し, 蛍光ラジオオートグラフィで PC 結合タンパク群の電気泳動パターンを比較した。

#### 2) $\beta$ -lactamase に対する安定性の検討

RICHMOND<sup>3)</sup> 分類 Ia, Ic, II, III (TEM), IV および V

(Oxacillin hydrolysing enzyme) の産生菌として, *Enterobacter cloacae* Nek 39, *Proteus vulgaris* GN 76, *P. mirabilis* GN 79, *E. coli* CSH 2 (RK1), *Klebsiella* sp. GN 69, および *E. coli* ML 1410 (RGN 238) を用いた。GN 番号が付されたものは, 千葉大学山岸教授から分与されたものである。被験菌の対数期後半の細胞を集め, 洗浄後 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) に再浮遊し, 氷冷しながら 10 Kc 音波破砕機で 30 秒 4 回処理し, 100,000 g 30 分間超遠心による上清を  $\beta$ -lactamase 粗酵素液として使用した。

マクロヨード法は Ross and O'CALLAGHAN の方法<sup>4)</sup>に従い, ミクロヨード法は YAMAMOTO and YOKOTA の変法<sup>5)</sup>, 酸測定法は RUBIN and SMITH による指示薬法<sup>6)</sup>で行なった。

Cefadroxil および CFT 1 分子の  $\beta$ -lactam 環が開裂されたときのヨード消費量は, 一定量の薬剤を過量の Ia 型  $\beta$ -lactamase で完全分解し, そのときのヨード消費量から実験的に算出した。なお, 薬剤の完全分解は, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 の芽胞を指示菌として bioassay により確認した。

紫外吸収法は O'CALLAGHAN ら<sup>7)</sup>の方法に準じたが, Union ダブルビーム光電比色計を使用し, 対照として薬剤だけを除いた反応液 (完全系と同量の酵素液を含む) を使用し, これと薬剤, 酵素を含む完全系との差スペクトルをリピートスキャンを使用して経時的に各薬剤固有の吸収スペクトルの変化をみた。この予備実験により, 分解前後で吸光度の変化の最も大きい波長を決定した。km 値の測定等薬剤分解の動力学検討は, 決定された波長における吸光度の経時変化を詳細に追って行なった。

km 値は, 基質濃度を変化させた時の反応初速度の変動を Lineweaver-bruk plot し, これから算出した。

## 2. 結 果

### 1) Cefadroxil の PC 結合タンパク群に対する結合親和性

調べられた CEPs の中では, CEZ がもっとも PC 結合タンパク群に親和性が強く, 各画分に対しては 1a, 3, 2, 1b の順に親和性が強い。CER は CEZ に近い態度を示すが, 2 に対する結合性が CEZ より低い。

経口 CEPs の代表薬剤である CEX は, 既存の CEPs の中でもっとも *E. coli* の PC 結合タンパクに対する親和性が悪く, 低濃度では 1a のみに結合し, 25  $\mu$ g/ml の高濃度でも 3 および 4 に若干結合するのみで, 1b にはほとんど作用しない。これに対して Cefadroxil は, PC 結合タンパクに対する親和性が CER や CEZ などの注射剤にはおとるものの, CEX に比べると 1a, 3 に対す

Fig. 1 Competition of cephalexin (CEX) and cefazolin (CEZ) for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*

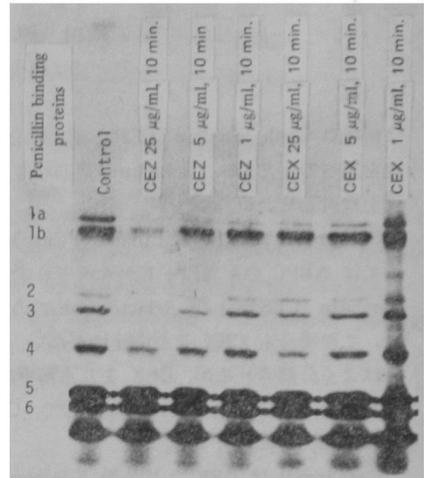
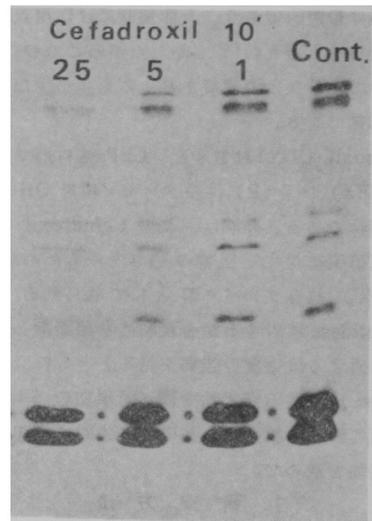


Fig. 2 Competition of cefadroxil for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIH-JC 2



る結合力が強いばかりでなく, 1b, 2 および 4 に対する親和性も高い (Fig. 1 および 2)。CEPs 経口剤の中では, CFT が PC 結合タンパク群にもっとも強い親和性を示した。

2) Cefadroxil の  $\beta$ -lactamase による水解率の適正な測定法

Cefadroxil および CFT を Ia 型  $\beta$ -lactamase で酵素的に完全分解し、それらの水解産物 1 モルが何モルのヨードを消費するか検討すると Table 1 のごとく、Cefadroxil は 10.4 モル、CFT は 14.6 モルのヨードを消費することがわかった。この値は他の CEPs に比べてかなり高い。またこれらの薬剤は、 $\beta$ -lactam 環が開裂する前にも多量のヨードを消費することがわかり、上記の分解産物のヨード消費量は、分解物の総ヨード消費量から分解前の消費量を減じた値である。マクロヨード法は反応系中に 80  $\mu$ moles の多量のヨードを加えるので、分解前の薬剤が相当量ヨードを吸着してもこの方法による  $V_{max}$  値の測定が不正確になることはないが、マイクロヨード法では、160 nmoles という微量のヨードが反応系中に加えられるのにすぎないため、CFT では分解前に加えられたヨード量の 99% 以上を吸着し、Cefadroxil でも 70% 前後のヨードを  $\beta$ -lactam 環開裂前に消費してしまうことがわかったので、これらの薬剤の  $km$  値の測定をマイクロヨードで行なうことは不可能であることが明

らかになった (Table 2)。

酸測定法による Cefadroxil, CFT, CEX の  $km$  測定も試みたが、Fig. 3 に示すごとく、CER とちがい Cefadroxil や CEX の  $\beta$ -lactam 環の開裂に伴うプロトン放出は、側鎖から放出されると考えられる電子により干渉され、pH 変化が経時的直線性を示さないため、この方法も使えない。

そこで紫外吸収法による  $km$  測定を試みた。この場合、粗酵素中の  $\beta$ -lactamase の specific activity があまり高くない Ia 型等においては、酵素液をあまり薄められないのでそのタンパクその他の紫外吸収が無視できないことがわかった (Fig. 4)。そこで差スペクトル光電比色計を使用し、対照液として薬剤だけ除いた不完全反応系を用い、薬剤固有の紫外吸収の変化を正確に追跡した。Fig. 5 はその一例で、Cefadroxil 100  $\mu$ M に Ia 型  $\beta$ -lactamase 138 単位を加えたときの 2 分間ごとのリピートスキャンである。この図と一定量の薬剤を完全に分解したときの吸光度の変化から Cefadroxil 濃度の薄いときの各  $\beta$ -lactamase による加水分解初速度を正確に

Table 1 Iodine equivalents of cephalosporins

Drugs	Consumed mole of I <sub>2</sub>	
	Mole of hydrolysed cephalosporins	
CER	2.8	
CEZ	4.9	
CTZ	5.1	
CEX	3.4	
CET	2.5	
Cefadroxil	10.4	
CFT	14.6	

Fig. 3 Acidometric chart for cefadroxil and cephaloridine

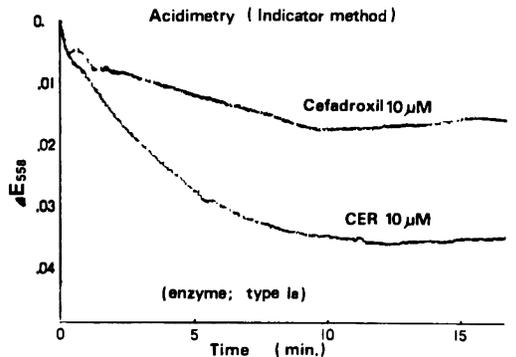


Table 2 Iodine consumption by oral-derivatives of cephalosporin before hydrolysis

Drugs	Adsorbed iodine ( $\mu$ mole)/ $\mu$ mole drugs	% of iodine adsorbed by drugs in		
		Iodine added	Macroiodometry	Microiodometry
			80 $\mu$ moles	0.16 $\mu$ mole
CER	18.19	/	0.57	30.2
CEX	48.73		1.52	81.0
Cefadroxil	47.50		1.48	79.0
CFT	60.15		1.88	100.0

Fig. 4 UV-absorption spectrum of crude  $\beta$ -lactamase (Ia) prepared from *Enterobacter cloacae*

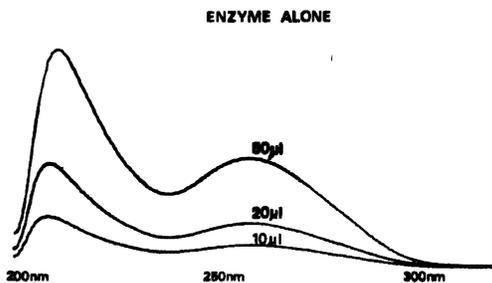
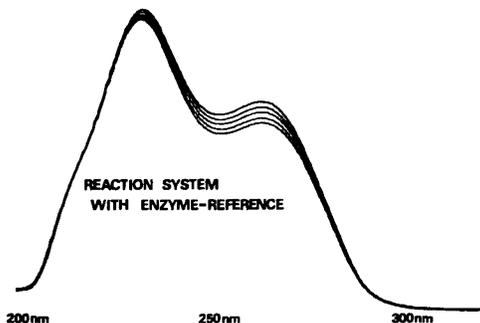


Fig. 5 UV-absorption spectrum of cefadroxil with the reference containing  $\beta$ -lactamase



追跡することができた。

3) Cefadroxil の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性

Cefadroxil は  $V_{max}$  値でみるかぎり, Iib, III, IVb および Va の penicillinase (PCase) 型  $\beta$ -lactamase によっては, Ampicillin (ABPC) に比べその 1% 以下しか水解されない。これに比し, CER は ABPC の 4~70%, CEX は 1~5%, CFT は 1~2% が PCase 型  $\beta$ -lactamase により水解された (Fig. 6)。

Cefadroxil は cephalosporinase (CESase) 型の  $\beta$ -lactamase に対してもかなり安定で, Ia 型に対して CER の 4% 以下の水解率であり, CEX の 10% より低かったが, CFT の 1% にはおよばなかった。特筆すべきは *P. vulgaris* が産生する Ic 型  $\beta$ -lactamase に対する安定性で, CER, CEX および CFT がそれぞれ 100, 146, 94 の相対水解率を示したのに, Cefadroxil のそれは 50 であった (Fig. 7)。

4) Cefadroxil の  $\beta$ -lactamase に対する親和性 (km 値の検討)

Fig. 6 Stability of cephalosporin-oral derivatives against Types II, III, IV and V  $\beta$ -lactamases (penicillinase)

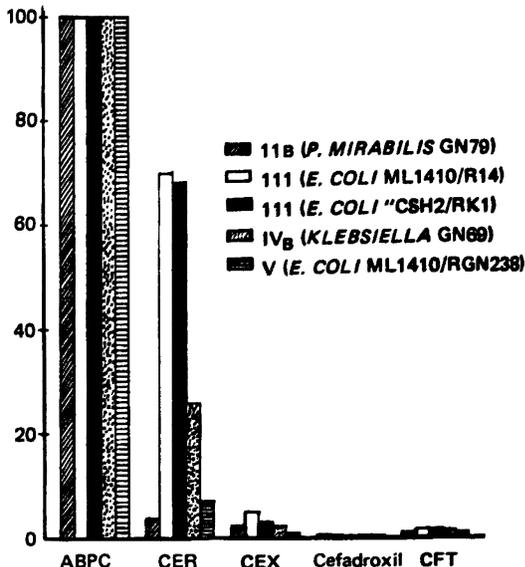
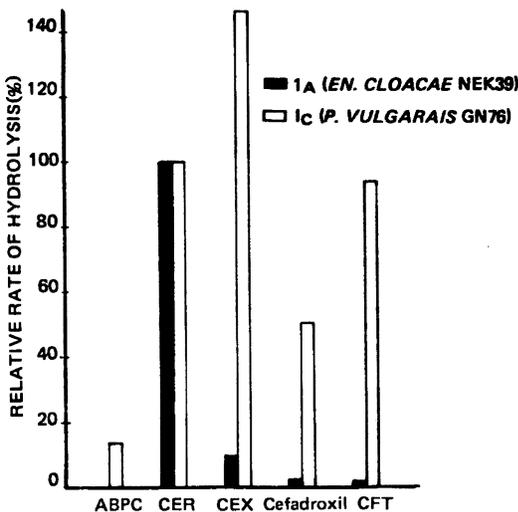


Fig. 7 Stability of cephalosporin-oral derivatives against the Type I  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase)



$\beta$ -lactam 薬剤耐性菌の耐性度は, POLLOCK<sup>9)</sup> が 1965 年すでに指摘したごとく, 産生する  $\beta$ -lactamase の  $V_{max}$  値に直接比例するわけではなく,  $V_{max}$  値の 1/2 の水解速度を与える薬剤濃度, すなわち  $k_m$  値で  $V_{max}$

Table 3 Affinity of cephalosporin-oral derivatives to various  $\beta$ -lactamases

Enzyme		Specific* activity	Km values by UV-assay			
Type	Source		CER	CEX	Cefadroxil	CFT**
Ia	<i>Ent. cloacae</i> Nek 39	21.4	370	476	120	317
Ic	<i>P. vulgaris</i> GN76	5.85	400	270	128	67
IIb	<i>P. mirabilis</i> GN79	158.	893	513	118	714
III	<i>E. coli</i> CSH2 (RK1)	996.	660	385	187	250
III	<i>E. coli</i> ML1410(R14)	177.	83	130	500	133
IVb	<i>Klebsiella</i> GN69	89.7	170	571	1739	247
Va	<i>E. coli</i> ML1410 (RGN238)	40.4	74	200	323	571
Wave length for the UV-assay (nm)			255	263	263	270
OD reduction (300 nmoles hydrolyzed)			0.83	0.63	0.64	0.32

\* Unit (60 min.)/mg protein, \*\*  $\mu$ M.

値をわった係数が、菌の実際の耐性度に平行することが多いことが知られている。これは菌の増殖に影響を与える MIC 近辺の薬剤濃度は  $\beta$ -lactamase の基質としてはかなり薄い濃度なので、もしある薬剤の km 値が大きければ、MIC 近くの濃度では Vmax に比べかなり遅い速度でしか分解されないため、このような  $\beta$ -lactamase を産生する菌は、酵素産生量あまり多くなければ、感受性菌に近い MIC にとどまることもある。

前述のように Cefadroxil, CEX 等の km 値を測定するにはマイクロヨード法も酸測定法も不相当であることがわかったので、km 値測定はすべて紫外吸収法で行なった。Table 3 に示すごとく、Cefadroxil の Ia 型  $\beta$ -lactamase に対する km 値は CEX より小さいが、この酵素によっては、Cefadroxil はほとんど水解されないの、あまり問題はない。Ic 型  $\beta$ -lactamase に対する km 値は比較的小さく、CER の 50% といえよく水解されるので、この種の  $\beta$ -lactamase 産生菌は Cefadroxil にも高い耐性を示すことになる。

R-plasmid 支配の III および V 型の PCase 型の  $\beta$ -lactamase に対しては、CEX と同等かまたは若干高い km 値を示した。しかし III および V 型を含め PCase 型  $\beta$ -lactamase に対して Cefadroxil はかなり安定なので、酵素産生量が少なければ、ABPC 耐性 plasmid をもつ大腸菌等にもこの薬剤はかなり強い抗菌力を示すことが考えられる。

### 3. 考 察

新経口 CEPs 剤 Cefadroxil の PC 結合タンパクに対する親和性を調べ、作用点における作用の強さを他剤と比較するとともに、代表的な  $\beta$ -lactamase に対する安定性を CEX 等と比べ、耐性菌における抗菌力の基礎的

検討を行なった。

$\beta$ -lactam 薬剤の抗菌力は、作用点における作用の強弱のみでなくグラム陰性桿菌においては外膜通過性の良否にも左右されるが、Cefadroxil は PC 結合タンパクに対する親和性の面からみれば、CEX より若干強い作用をもつようである。特に 1b に対し CEX より結合親和性が高いことは、Cefadroxil の殺菌力がわずかといえ CEX より強い可能性を示唆している。PC 結合タンパク 1a, 1b ともに細胞伸長に必要な murein 架橋酵素と考えられているが、松橋らによればこの目的に必要な本来の酵素は 1b であり、1a は 1b が不足したときの補助酵素であるという。一般に CEPs は 1a と、細胞隔壁 murein 合成に必要な 3 に親和性が高いが、1b に親和性の強い薬剤はより殺菌力がすぐれていることが期待される。著者らの研究により、1b を強くおさえる  $\beta$ -lactam 薬剤の低濃度の存在下で培養された菌は、補体や多形核白血球の殺菌作用をうけやすいことも知られているので、CEX と Cefadroxil の感染防禦実験の詳細な比較が望まれる。

Cefadroxil は *P. vulgaris* の産生する Ic 型 CES ase を除き、比較的稳定性が高い。しかし耐性菌の耐性度は、Vmax 値で比較した薬剤の分解率だけで説明できるわけではなく、酵素産生量や薬剤の酵素に対する km 値にも左右されることは前述のとおりである。Cefadroxil が III 型  $\beta$ -lactamase に 200  $\mu$ M 内外という低い km 値を示すことは、たとえ Vmax 値が低くとも  $\beta$ -lactamase に対する結合親和性は高いということになり、Carbenicillin (CBPC) や Sulbenicillin (SBPC) と同じように、比較的水解されにくい薬剤でも  $\beta$ -lactamase 産生量が多いときは、薬剤のそれに対する結合親和性が高いと耐性

菌が出やすいということになるかもしれない。いずれにしても Cefadroxil は、 $\beta$ -lactamase に対する態度からみるかぎり CEX よりも安定性の面で若干すぐれているようにみえるので、各種  $\beta$ -lactamase 産生菌の CEX と Cefadroxil の詳細な感受性試験が重要となろう。

最後に経口 CEPs 剤の酵素学的検討に、マイクロロード法や酸測定法が不適當であるという所見は重要で、正しい各薬剤の  $\beta$ -lactamase に対する安定性の比較は、異なった種々の方法で検討を進め、そのうちでもっとも適当な方法を見いだしておこなうべきであるとする著者らの考え方を裏づけるものである。

#### おわりに

Cefadroxil は CEX に比べ、作用の面でも  $\beta$ -lactamase 安定性の面でも若干すぐれているという成績が得られた。これが実際の抗菌力に反映するかどうか興味ある点である。

#### 引用文献

- 1) 横田 健:  $\beta$ -lactam 薬剤の抗菌力とくに  $\beta$ -lactamase に対する安定性について。Chemotherapy 27: 211~221, 1979
- 2) 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
- 3) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES:  $\beta$ -lactamase 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
- 4) ROSS, G. W. & C. H. O'CALLAGHAN:  $\beta$ -Lactamase assays. In Methods in Enzymology. J. H. Hash, Ed. Vol. 43: 73~76, Academic Press, New York, N. Y., 1975
- 5) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11: 936~940, 1977
- 6) RUBIN, F. A. & D. H. SMITH: Characterization of R factor  $\beta$ -lactamases by the acidimetric method. Antimicrob. Agents & Chemoth. 3: 68~73, 1973
- 7) ROSS, G. W. & C. H. O'CALLAGHAN:  $\beta$ -Lactamase assays. In Methods in Enzymology. J. H. Hash, Ed. Vol. 43: 80~81, Academic Press, New York, N. Y., 1975
- 8) POLLOCK, M. R.: Purification and properties of penicillinase from two strains of *Bacillus licheniformis*: a chemical, physicochemical, and physiological comparison. Biochem. J. 94: 666~675, 1965

## CEFADROXIL: ITS AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS AND ITS STABILITY TO $\beta$ -LACTAMASES

TAKESHI YOKOTA, EIKO AZUMA and REIKO SEKIGUCHI

Department of Bacteriology, Juntendo University School of Medicine

Investigations were carried out on the stability and affinity of cefadroxil to various types of  $\beta$ -lactamases and on the binding affinity to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*.

Cefadroxil was hydrolyzed by the penicillinase-type  $\beta$ -lactamases (RICHMOND classification, II, III, IV and V) only at less than 1% of ABPC, indicating that the drug is more stable than CEX.

Furthermore, cefadroxil was hydrolyzed by Ia cephalosporinase-type'  $\beta$ -lactamase only at less than 4% of CER. Although the drug was hydrolyzed by the Ic cephalosporinase'  $\beta$ -lactamase, it was more stable than CEX.

Cefadroxil was found to demonstrate the most strong affinity to the penicillin-binding protein Ia of *E. coli* first, followed by 1b, 3, 2, and 4 in order.

Cefadroxil is thus more stable than CEX against various types of  $\beta$ -lactamases and more strongly binds to the penicillin-binding proteins of *E. coli*, and it may be interesting to pursue further an interrelationship between the above properties and the actual antibacterial activity.