

Cefadroxil の β -ラクタマーゼ産生菌に対する効果と β -ラクタマーゼ安定性

澤井哲夫・高橋郁子・山岸三郎
千葉大学薬学部微生物薬品化学教室

新経ロセファロスポリン, Cefadroxil について, グラム陰性菌の産生する各種 β -ラクタマーゼ安定性, および各菌種に対する抗菌活性を ABPC, CEX, CFT, CET, CER, CEZ を比較薬剤として測定した。Cefadroxil はRプラスミド支配のI型, II型ペニシラーゼ(産生菌: *E. coli*) および *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* のペニシラーゼにきわめて安定であり, その抗菌活性は菌のペニシラーゼ活性の増加によって全く影響を受けなかった。これに対し, *E. coli*, *P. morganii*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *Ent. cloacae*, *S. marcescens* では, セファロスポリナーゼ活性の増加に伴い Cefadroxil の抗菌活性の低下が観察された。Cefadroxil は各種 β -ラクタマーゼに対する安定性, 抗菌活性で CEX とほぼ同等の性質を示した。

Cefadroxil は米国プリストル研究所において開発された半合成セファロスポリンである¹⁾。本抗生物質は体内持続性においてすぐれた性質を持つ新経ロセファロスポリン剤と報告されている²⁾。

一方, β -ラクタム抗生物質の使用量の増大に伴い近年腸内細菌群を中心とするグラム陰性菌において常用 β -ラクタム抗生剤に対する耐性菌の分離頻度が急速に高まりつつある。これらの耐性菌の薬剤に対する耐性機構は主に β -ラクタマーゼによる薬剤の不活化である。グラム陰性菌の産生する β -ラクタマーゼはその酵素化学的性質, 産生様式できわめて多様な酵素群である^{3), 4)}。本研究では临床上, Cefadroxil の主要な対象であるグラム陰性菌の産生する10種の β -ラクタマーゼに対する本抗生物質の安定性を Ampicillin (ABPC), Cephalixin (CEX), Cefatrizine (CFT), Cephalothin (CET), Cephaloridine (CER), Cefazolin (CEZ) を比較薬剤として検討した。これらの β -ラクタマーゼに対する安定性の評価は当教室において用いられている8菌種の評価用標準菌株および代表的な β -ラクタマーゼの精製標品を用いて行なった。

I 実験材料および方法

1. 使用菌株およびその産生する β -ラクタマーゼ: 使用菌株は *Escherichia coli* 8株, *Klebsiella pneumoniae* 3株, *Citrobacter freundii* 3株, *Proteus mirabilis* 2株, *Proteus morganii* 3株, *Proteus vulgaris* 3株, *Enterobacter cloacae* 3株, *Serratia marcescens* 2株の計27株である。*E. coli* ML 1410, *E. coli* NIHJ JC-2 および *E. coli* のRプラスミド感染株以外はいずれも人病

単分離株またはそれに由来する当教室で分離された β -ラクタマーゼ産生に関する変異株である。*E. coli* ML 1410 RGN 823, *E. coli* ML 1410 RGN 14 および *E. coli* ML 1410 RGN 238 はいずれも ABPC 耐性Rプラスミド感染株であり, プラスミド支配のペニシラーゼ(PCase)を産生する。RGN 823, RGN 14 支配のPCaseはI型PCase^{5), 6)}であり, RGN 238 支配のPCaseはII型PCase⁶⁾である。その他の菌株の産生する β -ラクタマーゼはいずれも菌種特異的 β -ラクタマーゼである。*S. marcescens* を除き使用菌株の β -ラクタマーゼは構成的に産生される。*S. marcescens* のセファロスポリナーゼ(CSase)は誘導酵素である⁷⁾。

2. 使用薬剤: β -ラクタム抗生物質は ABPC (明治製薬), CEX (富山化学), CET (塩野義製薬), CER (鳥居薬品), CEZ (藤沢薬品), CFT および Cefadroxil (プリストル萬有製薬)を使用した。

3. 使用培地: 薬剤感受性測定には heart infusion agar (HI-agar, 栄研)を使用した。菌の前培養および菌液の希釈は Nutrient broth (N-broth, 栄研)を使用した。また β -ラクタマーゼ試料を得るための菌の大量培養は N-broth を用いて行なった。

4. 薬剤感受性測定: HI-agar を用いて寒天平板希釈法で測定した。薬剤濃度は3,200 μ g/ml を最高濃度とし, 以下順次2倍希釈を行ない最低薬剤濃度を0.4 μ g/ml とした。被験菌株の N-broth, 37°C, 18時間培養液(約 3×10^8 cells/ml)を N-broth で100倍に希釈し, その5 μ l をマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて薬剤含有平板に接種した。接種平板を37°C, 18時間培

Table 1 Relationship between penicillinase activity and levels of resistance to β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria

Organism	Penicillinase activity ^a (units/mg dry weight of bacteria)	MIC (μ g/ml)						
		Cefadroxil	CEX	CFT	CER	CET	CEZ	ABPC
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	16.7	12.5	12.5	25	25	25	12.5	>3,200
<i>E. coli</i> ML1410 RGN14	0.6	12.5	12.5	3.1	6.3	12.5	3.2	800
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	0.025	12.5	12.5	1.6	3.2	6.3	1.6	400
<i>E. coli</i> ML1410	<0.003	12.5	12.5	1.6	3.2	6.3	1.6	3.2
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	<0.003	12.5	12.5	1.6	3.2	3.2	1.6	3.2
<i>K. pneumoniae</i> GN69	1.11	12.5	6.3	1.6	6.3	6.3	3.2	400
<i>K. pneumoniae</i> GN118	0.047	12.5	3.2	0.8	3.2	3.2	1.6	25
<i>K. pneumoniae</i> GN69/2-1	<0.01	12.5	6.3	0.8	3.2	3.2	1.6	1.6
<i>P. mirabilis</i> GN79	0.73	25	50	12.5	50	25	50	3,200
<i>P. mirabilis</i> GN79/3	<0.006	25	50	12.5	12.5	25	50	6.3

Table 2 Relationship between cephalosporinase activity and levels of resistance to β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria

Organism	Cephalosporinase activity ^a (units/mg dry weight of bacteria)	MIC (μ g/ml)									
		Cefadroxil	CEX	CFT	CER	CET	CEZ	ABPC			
<i>C. freundii</i> GN346	24.2	1,600	3,200	200	200	800	400	200			
<i>C. freundii</i> GN346/16-10	4.0	800	1,600	200	100	800	200	100			
<i>C. freundii</i> GN346/16	0.067	12.5	12.5	1.6	3.2	12.5	1.6	3.2			
<i>E. coli</i> 255	0.72	1,600	1,600	400	50	1,600	100	400			
<i>E. coli</i> GN206	0.25	400	800	100	25	400	25	200			
<i>E. coli</i> 255/AM-7	0.003	6.3	6.3	0.8	3.2	1.6	1.6	3.2			
<i>P. morganii</i> 1510	2.68	800	1,600	200	400	3,200	200	400			
<i>P. morganii</i> 1510/3	0.07	100	100	25	100	400	50	50			
<i>P. morganii</i> 1510/9	0.006	125.	12.5	1.6	6.3	12.5	6.3	1.6			
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1	2.4	800	400	400	800	1,600	800	400			
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/3	0.03	25	12.5	3.1	200	200	50	25			
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/2	<0.01	12.5	6.3	0.8	3.2	3.2	3.2	1.6			
<i>S. marcescens</i> T-26 E1	>9.3 ^b	>3,200	>3,200	1,600	>3,200	>3,200	>3,200	400			
<i>S. marcescens</i> T-26 E1/1	0.05 ^b	50	100	12.5	50	50	50	6.3			
<i>Ent. cloacae</i> 363	24.9	3,200	3,200	800	400	>3,200	1,600	400			
<i>Ent. cloacae</i> 363/2	0.05	12.5	6.3	1.6	3.2	12.5	1.6	1.6			
<i>Ent. cloacae</i> 363/1	<0.01	6.3	3.2	0.4	1.6	1.6	0.8	0.4			

^a One unit of cephalosporinase activity is expressed as 1 μ mol cephaloridine hydrolyzed/min at 90°C and pH 7.0.

^b The value is that of specific cephalosporinase activity of the cells induced with benaypenicillin.

養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

5. β -ラクタマーゼ試料の調製: *E. coli* ML 1410 RGN 823 より PCase, *C. freundii* GN 346 および *P. vulgaris* GN 76/C-1 より CSase をそれぞれ抽出、精製した。菌体のソニケーター破砕液の遠心上清を粗酵素試料とし、PCase は DEAE-Sephadex, Sephadex G-75, CSase は CM-Sephadex, Sephadex G-75 をそれぞれ用いたイオン交換カラムクロマトおよびゲル濾過法により電気泳動的に単一な酵素蛋白標品を得た。

6. β -ラクタマーゼ活性測定法: 使用菌株の β -ラクタマーゼ活性値の測定は PERRRET の方法⁹⁾ または SARGENT の方法¹⁰⁾ の SAWAI らによる改良法¹⁰⁾ を用いた。精製 β -ラクタマーゼ試料を用いた薬剤の不活化速度の測定および Km 値の測定は pH-スタット法を用いた。pH-スタットは平沼精密 pH-スタット PS-11 型 (平沼製作所) を用い、酵素反応は 0.025 M KCl (pH 7.0) 中で行なった。

II 実験成績

1. Cefadroxil の PCase 産生菌に対する抗菌作用: グラム陰性菌で産生される PCase として R プラスミド支配の PCase, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* および *Aeromonas hydrophila* の菌種特異的 PCase が知られている^{11), 12), 13), 14)}。Tabl 1 に *A. hydrophila* 以外のこれら PCase 産生菌、非産生あるいはきわめて低い PCases 活性を持つ菌株に対する Cefadroxil と比較薬剤の MIC 値を示した。

E. coli ML 1410 RGN 823, *E. coli* ML 1410 RGN 14 は I 型 PCase を産生し、互に PCase 産生量のみが異なる菌株である。*K. pneumoniae*, *P. mirabilis* においても同一菌種の菌株は酵素化学的にはほぼ同一の PCase を産生し、その産生量のみが異なるものである。これら同一菌種内での PCase 活性値の異なる菌株間の MIC 値の差は、主に薬剤の PCase に対する安定性を反映すると考えられる。

ABPC は菌の PCase 活性の増加に伴い著しくその抗菌作用が低下した。CET, CER, CEZ, CFT のセファロsporin 剤でも ABPC ほど著しくないが I 型 PCase 産生菌, *K. pneumoniae* で同様の傾向が観察された。これに対し, Cefadroxil, CEX の MIC 値は菌の PCase 活性値の高低に影響されなかった。この結果は Cefadroxil, CEX がグラム陰性菌の PCase に対しきわめて安定であることを示唆している。しかし, PCase 非産生菌に対する MIC 値から, Cefadroxil と CEX は他の比較薬剤にくらべ *E. coli*, *K. pneumoniae* に対する基本的な抗菌力はやや低いと思われる。

2. Cefadroxil の CSase 産生菌に対する抗菌作用:

Table 2 に 6 菌種の評価用標準菌株の CSase 活性値、これら菌株に対する Cefadroxil および比較薬剤の MIC 値を示した。

Fig. 1 Kinetics of hydrolysis of cefadroxil and four β -lactam antibiotics by Type I penicillinase of R plasmid

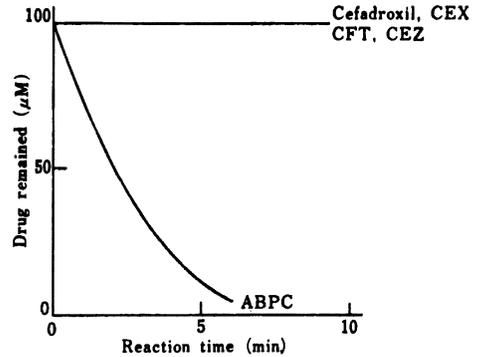


Fig. 2 Kinetics of hydrolysis of cefadroxil and four β -lactam antibiotics by cephalosporinase of *C. freundii*

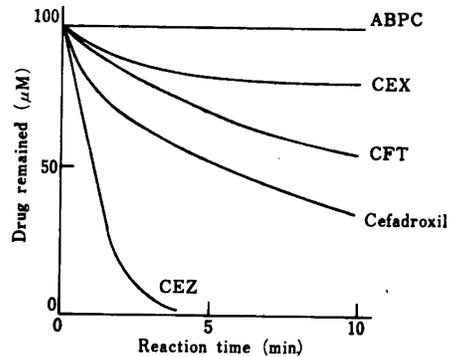
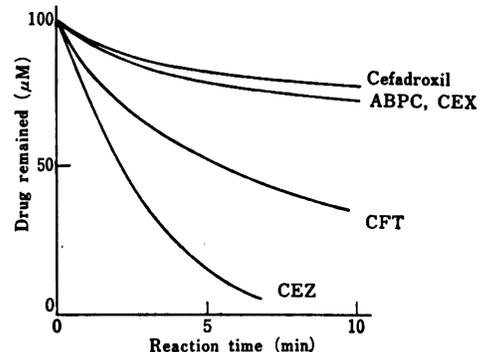


Fig. 3 Kinetics of hydrolysis of cefadroxil and four β -lactam antibiotics by cephalosporinase of *P. vulgaris*



これらの結果は Cefadroxil の抗菌作用は全比較薬剤と同様に菌の CSase 活性の増加に伴い著しく低下することを示している。またこれらの菌種に対しても Cefadroxil と CEX は他の比較薬剤にくらべ基本的抗菌力がやや低い様に思われる。

3. I型 PCase, *C. freundii* および *P. vulgaris* の CSase に対する Cefadroxil の安定性: 前述の評価用標準菌株を用いた結果から各種 β -ラクタマーゼに対する Cefadroxil の性質がほぼ明らかとなったが、更に本抗生物質の β -ラクタマーゼに対する安定性を精製酵素標品を用いて詳細に検討した。比較薬剤として CEX, CEZ, CFT, ABPC を用いた。グラム陰性菌の代表的 PCase として I型 PCase, 基質特異性で典型的な CSase である *C. freundii* の CSase, 比較的広い基質特異性を持つ *P. vulgaris* の CSase の3種の β -ラクタマーゼを用いた。生体内薬剤濃度に近い100 μ M での各薬剤の β -ラクタマーゼに対する安定性を Fig. 1, 2, 3 に示す。

I型 PCase に対しては Cefadroxil および他のセファロスポリン剤はきわめて安定であり、ABPC がほぼ完全に分解される条件下で全く分解が認められなかった (Fig. 1)。

CSase に対して CEZ が著しく不安定であった。*C. freundii* の CSase では CEZ がほぼ完全に分解される条件下で Cefadroxil は約60%の分解を受け、CEZ 以外の他の比較薬剤中で最も高い分解率を示した (Fig. 2)。

これに対し、*P. vulgaris* の CSase に対しては Cefadroxil は被験薬剤中最も安定であり、CEZ がほぼ完全に分解される条件下でその分解率は約20%であった (Fig. 3)。

C. freundii, *P. vulgaris* の CSase の Cefadroxil, CEX, CEZ に対する Km 値を測定した。*C. freundii* の CSase では Cefadroxil, CEX, CEZ の Km はそれぞれ 11 μ M, 18 μ M, 170 μ M であり、*P. vulgaris* の CSase ではそれぞれ 520 μ M, 790 μ M, 49 μ M であった。Cefadroxil と CEX は CSase に対する親和性においても互に類似した性質を示した。

III 考察および結論

Cefadroxil はグラム陰性菌の PCase にきわめて安定である。この性質はRプラスミド支配の PCase, 菌種特異的 PCase 産生菌に対する抗菌力によく反映し、最も高い PCase 活性値を示す ABPC 高度耐性菌に対する MIC は PCase 非産生株に対する MIC とその値に差が見られなかった。Cefadroxil は *E. coli*, *K. pneumoniae* の ABPC 耐性菌および他の腸内細菌種での R プラスミド支配の PCase のみを産生する ABPC 耐性菌にも有効な薬剤と考えられる。しかし、Cefadroxil は既に臨

床的に使用されている多くのセファロスポリン剤と同様に、グラム陰性菌の CSase によって分解を受ける。Cefadroxil は β -ラクタマーゼに対する性質、グラム陰性腸内細菌に対する抗菌活性で化学構造的に関連性の高い CEX とほぼ同等の性質を持つと考えられる。

文 献

- 1) BUCK, R. E. & K. E. PRICE: Cefadroxil, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 324~330, 1977
- 2) PFEFFER, M.; A. JACKSON, J. XIMENS & J. P. MENEZES: Comparative human oral clinical pharmacology of cefadroxil, cephalixin and cephadrine. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 331~338, 1977
- 3) 澤井哲夫, 山岸三郎: β -ラクタマーゼ, ペニシリン/セファロスポリン加水分解酵素。蛋白質核酸酵素 20: 1202~1213, 1975
- 4) 山岸三郎, 澤井哲夫: グラム陰性菌の β -lactamase について。日本細菌学雑誌 30: 615~629, 1975
- 5) SAWAI, T.; K. TAKAHASHI, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Variant of penicillinase mediated by an R factor in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 104: 620~629, 1970
- 6) YAMAGISHI, S.; K. O'HARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI: The purification of penicillin β -lactamase mediated by transmissible R factor in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 66: 11~20, 1969
- 7) 澤井哲夫, 菅野雅元, 山岸三郎: *Serratia marcescens* の産生するセファロスポリナーゼの精製とその性質。日本細菌学雑誌 33: 316, 1978
- 8) FERRET, C. J.: Iodometric assay of penicillinase. *Nature (London)* 174: 1012~1013, 1954
- 9) SARGENT, M. G.: Rapid fixed-time assay for penicillinase. *J. Bact.* 95: 1493~1494, 1968
- 10) SAWAI, T.; I. TAKAHASHI & S. YAMAGISHI: Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 910~913, 1978
- 11) MATSUMOTO, H.; T. SAWAI, T. TAZAKI, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Characterization of the chromosomally mediated penicillinase in *Klebsiella pneumoniae*. *Japan. J. Microbiol.* 16: 169~176, 1972
- 12) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & MITSUHASHI: Penicillinase of *Klebsiella pneumoniae* and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R factors. *J. Bact.* 115: 1045~1054, 1973
- 13) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Drug resistance of enteric bacteria. XIV.

Comparison of β -lactamases in Gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. Japan. J. Microbiol. 12: 423~434, 1968
14) SAWAI, T.; K. MORIOKA, M. OGAWA & S. YAM-

AGISHI: Inducible oxacillinhydrolyzing penicillinase in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. Antimicrob. Agents & Chemother., 10: 191~195, 1976

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFADROXIL AGAINST β -LACTAMASE-PRODUCING BACTERIA AND β -LACTAMASE STABILITY OF THE ANTIBIOTIC

TETSUO SAWAI, IKUKO TAKAHASHI and SABURO YAMAGISHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Cefadroxil, a new oral cephalosporin antibiotic, was investigated for its β -lactamase stability and antibacterial activity against β -lactamase-producing strains of Gram-negative bacteria including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. morganii*, *P. vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. Cefadroxil was very stable to penicillinase and its antibacterial activity against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* was not affected by production of high penicillinase activity in those organisms. The antibacterial activity of cefadroxil against *E. coli*, *P. morganii*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *S. marcescens* and *Ent. cloacae* was lowered with increasing cephalosporinase activity in those organisms. The results indicated that cefadroxil was similar in anti-bacterial activity and β -lactamase stability to cephalixin.