

Cefroxadine (CGP 9000) の大腸菌に対する抗菌作用機作に関する研究

西野 武志・大脇 弘之・吉本 正

大槻 雅子・谷野 輝雄

京都薬科大学 微生物学教室

Cefroxadine (CGP 9000, CXD) の *Escherichia coli* K 12 に対する抗菌作用機作について比較薬として Cephalexin (CEX), Cefradine (CED) を用いて検討した。

増殖曲線におよぼす影響では、薬を作用させる時の菌量が高い場合に CXD は CEX, CED に比べ非常に優れた殺菌作用を示した。その時の形態変化を位相差顕微鏡により観察すると、CXD の 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 作用により菌は伸長化したが、CEX, CED に比べより速やかに溶菌した。CXD の 100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌は殆ど伸長化せずに Spheroplast 様構造を形成し溶菌した。一方 CEX, CED の 100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌は伸長化するのみで Spheroplast 様構造を観察することができなかった。走査型電子顕微鏡ではこのような形態変化を立体的に観察することができた。

Penicillin binding proteins について検討したところ CXD は CEX, CED に比べ 1B_s に対して強い親和性を有していた。

はじめに

Cefroxadine (CGP-9000, CXD) はスイス CIBA-GEIGY 社において開発された新しい経口用セファロスポリン系抗生物質である¹⁾。CXD の化学構造式は下図に示す如く Cephalexin (CEX), Cefradine (CED) に類似しており、その抗菌スペクトラムも CEX, CED 同様、グラム陽性菌群、陰性菌群に対し幅広く抗菌力を有する²⁾³⁾。CXD の作用は殺菌的であり、その殺菌および

溶菌作用が CEX に比べ優れていると報告されている。今回私どもはこの報告に興味を持ち、CXD の抗菌作用機作について、*E. coli* K-12 を用い、形態学および Penicillin binding proteins (PBPs) について検討を行った。また CXD は CED の 3 位の $-\text{CH}_3$ 基が $-\text{OCH}_3$ 基になった物質であり、 $-\text{OCH}_3$ 基の抗菌力に及ぼす影響を調べるために、さらに CEX の 3 位の $-\text{CH}_3$ 基が $-\text{OCH}_3$ 基になった CGP-3940 についても PBPs の面より検討を行った。

実験材料および実験方法

1. 使用菌株および使用薬

菌株としては *Escherichia coli* K-12 を用い、薬としては CXD, CEX, CED, CGP-3940 のいずれも力価の明らかかなものを用いて行った。なお *E. coli* K-12 に対する MIC はいずれの薬も 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬を含ませたフィルム寒天を作製し、一方対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天にかぶせ、パラフィンで封入した。この標本を 37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡 (日本光学) により観察した。

3. 走査型電子顕微鏡による観察

Tryptosoya broth (ニッスイ) を用いて前培養を行い、これを約 1% の割合で Heart infusion broth (ニッスイ

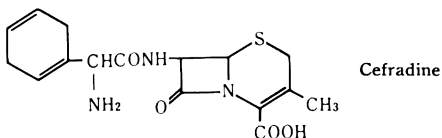
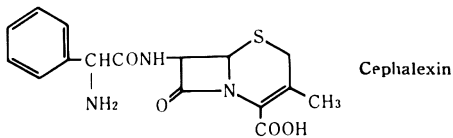
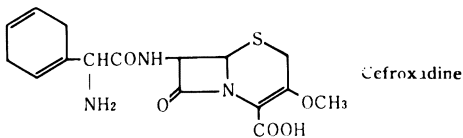


Fig. 1 Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12
90 min. 180 min.

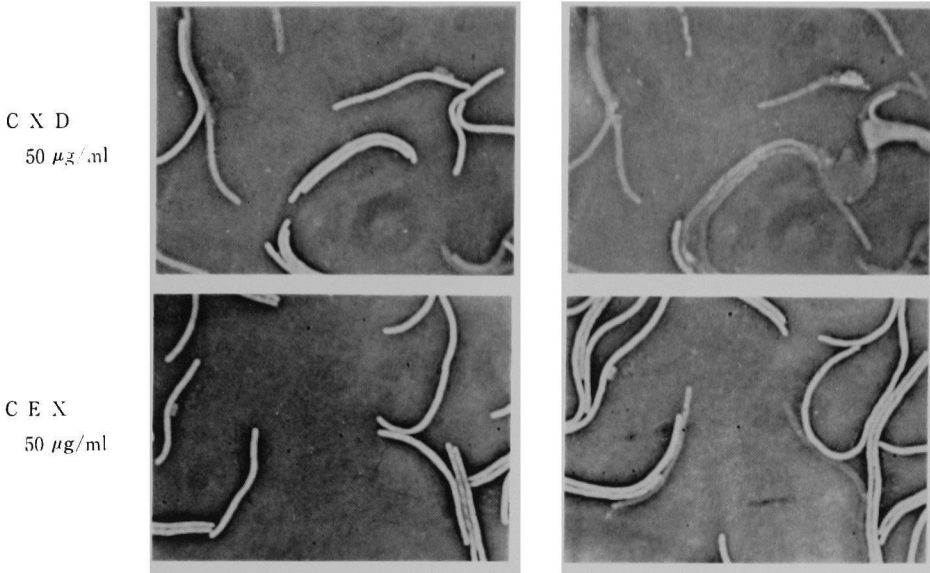
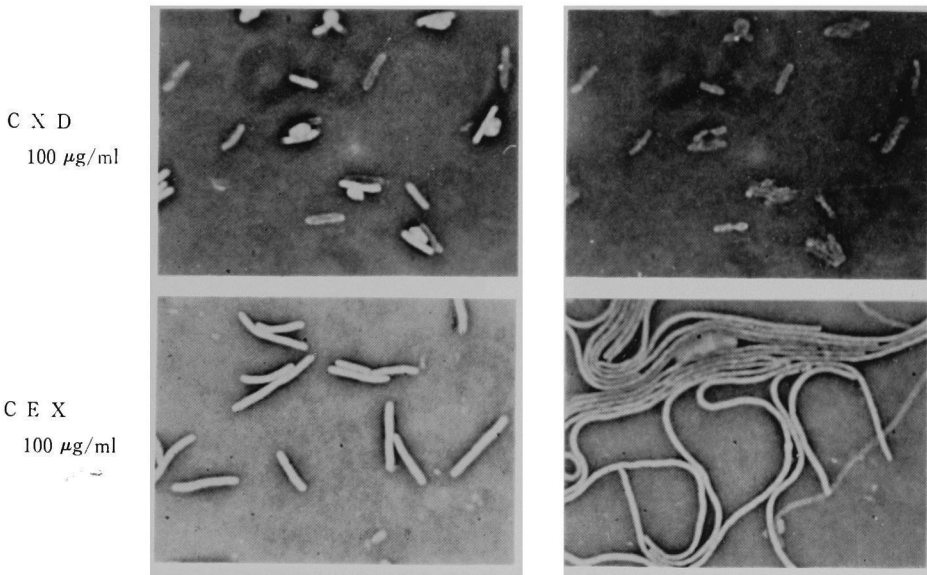


Fig. 2 Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12
60 min. 150 min.



1) に接種し、37°Cで振とう培養を行った。培養約3時間後の対数期途上に薬を作用させ、1, 2, 4時間後に生菌数を測定すると同時に菌体を集菌し、電子顕微鏡の試料とした。すなわち1% Glutaraldehyde 溶液にて前固定を行い、KELLENBERGER らの方法⁴⁾に従って、1%

OsO₄ で本固定後、アルコール系列で脱水を行った。これを酢酸イソアミールに置換し、臨界点乾燥法⁵⁾により乾燥を行った。その後カーボン、金にて蒸着し走査型電子顕微鏡 JSM-35 (日本電子) で菌体の表面構造を観察した。

Fig. 3 Effect of CXD on viability of *E. coli* K-12

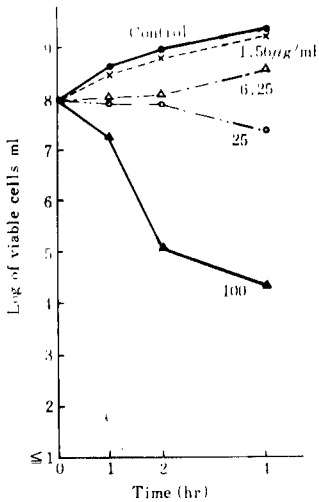


Fig. 4 Effect of CEX on viability of *E. coli* K-12

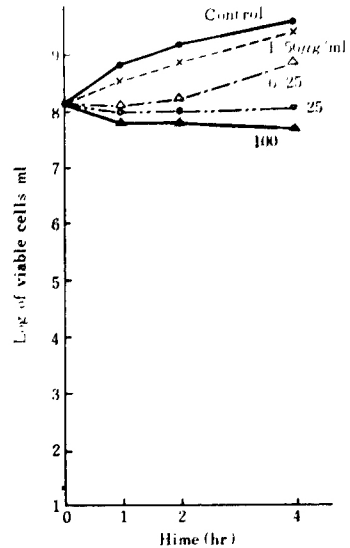
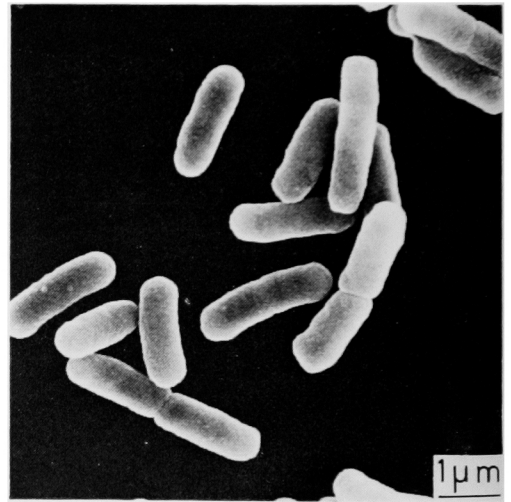


Fig. 5 Untreated *E. coli* K-12 cells observed by scanning electron microscope



K-12 を用いさらに詳細に検討を行った。

1. 位相差顕微鏡による観察

CXD, CEX の0.78 μg/ml 作用では, control と同様に増殖していく様子を観察することができた。CXD の3.13, 6.25, 12.5 μg/ml 作用では, CEX, CED と全く同様な形態変化を示し, 作用時間の経過とともに, 著しく伸長化した filament 状の細胞を観察することができ

6. Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性 SPRATT の方法⁶⁾⁷⁾に従って行った。すなわち *E. coli* K-12 を Heart infusion broth を用い37°Cで振盪培養し, 対数増殖期の後半 (O.D. at 660 nm=0.8) に遠心集菌した。これをリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, 超音波処理後, 超遠心にかけ約 20~30 mg protein/ml の膜面分を得た。この膜面分に CXD, CEX, CED あるいは CGP-3940 を加えて30°C10分間反応させる。10分後に ¹⁴C-Penicillin G を加え, さらに10分間30°Cで保温した。反応後ただちに Penicillin G と Sarkosyl を加えて, 反応を停止させるとともに細胞質膜を可溶化する。

これに SDS 溶液とメルカプトエタノールを加え, 沸騰水溶液中で2分間処理を行った。この試料を SDS ポリアクリルアミド スラブゲル電気泳動⁸⁾にて分離した後, フルオログラフィーで親和性の検討を行った。また, 50%阻害濃度を求めるために densitometer により処理した。

実験結果

E. coli の増殖曲線におよぼす影響について検討したところ, CXD を $10^7 \sim 10^8$ cells/ml の時点で作用させた場合, CEX, CED に比べ非常に優れた殺菌作用を示した。これらの結果は前報³⁾ですでに報告したが, 今回のような差がどのような理由に基づくものか, *E. coli*

Fig. 6 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 1 hour

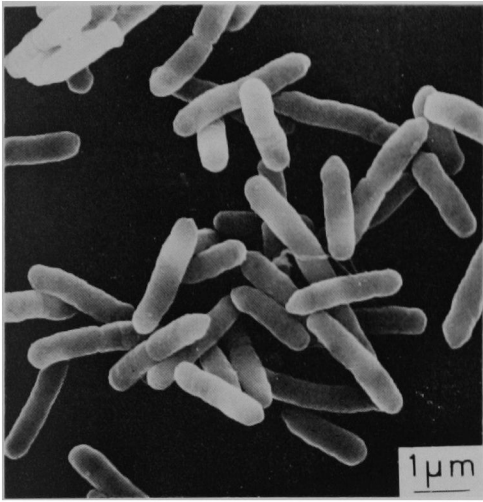


Fig. 7 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 2 hours

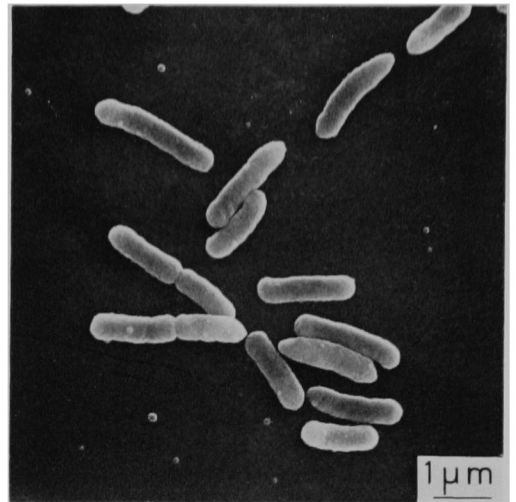


Fig. 8 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 4 hours

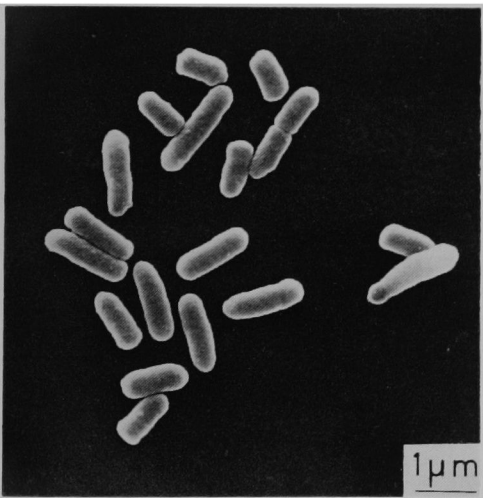
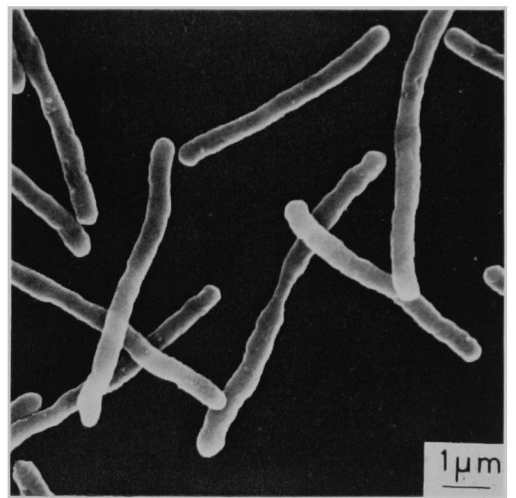


Fig. 9 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 1 hour



た。CXD の 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 作用では Fig. 1 に示すように菌は伸長化したが、CEX に比べより速やかに溶菌した。CXD の 100 $\mu\text{g/ml}$ 作用では Fig. 2 に示すように菌は殆ど伸長化せず、Spheroplast 様構造を形成し溶菌した。一方 CEX では、100 $\mu\text{g/ml}$ 作用でも filament 状の形態を示した。

このような形態変化の差をさらに詳細に観察するために、次に走査型電子顕微鏡により検討した。

2. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡試料作製時の生菌数の変化を Fig. 3, 4 に示した。CXD および CEX の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 作用では control と同様に増殖し、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では 2 時間後まで静菌的な作用を示したが、4 時間後に再増殖がみられた。CXD, CEX の 25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では両薬ともほぼ静菌的な作用を示した。100 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合 CXD では著明な殺菌作用を示したが、CEX では

Fig. 10 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 2 hours

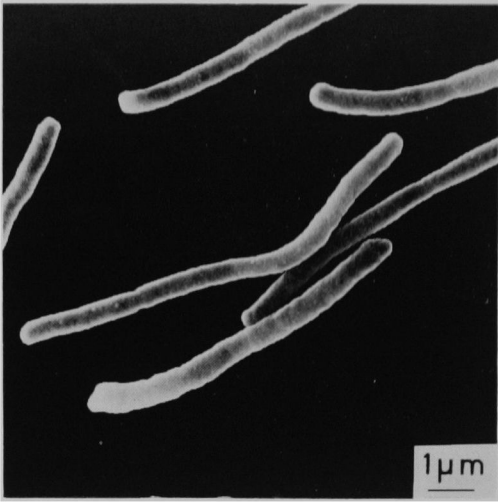


Fig. 11 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 4 hours

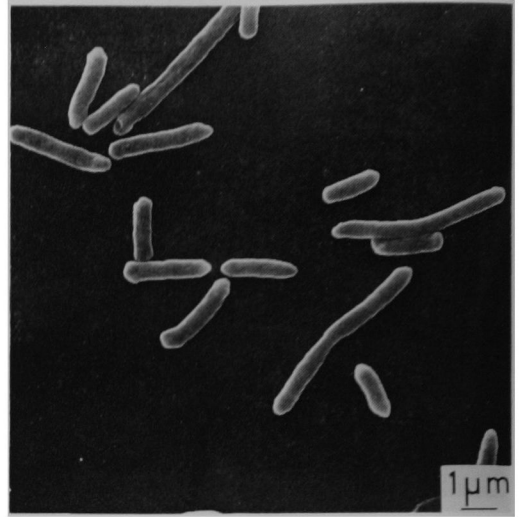


Fig. 12 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 1 hour

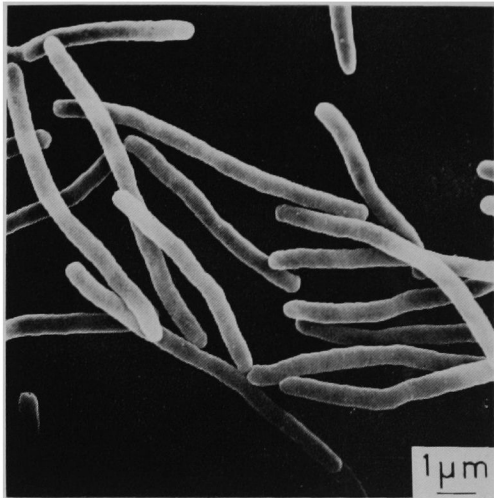
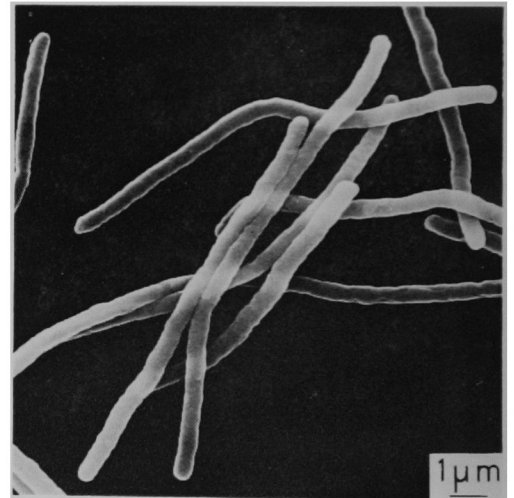


Fig. 13 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 2 hours



ほぼ静菌的な作用であった。

このような菌数変化時の形態変化を Fig. 5-29 に示した。

Fig. 5 は正常な *E. coli* K-12 の走査電顕像で、表面構造は smooth な桿状形態を示しており、分裂時にある細胞も観察することができた。Fig. 6, 7, 8 は CXD の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時

の走査電顕像で、正常菌と殆ど同様な桿状形態を示し、CXD による影響は認められなかった。

Fig. 9, 10, 11 は、CXD の 6.25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の走査電顕像で、菌体は filament 状になり、作用 4 時間後では再増殖により正常な桿状形態をした細胞も観察することができた。

Fig. 12, 13, 14 は CXD の 25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1,

Fig. 14 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 4 hours

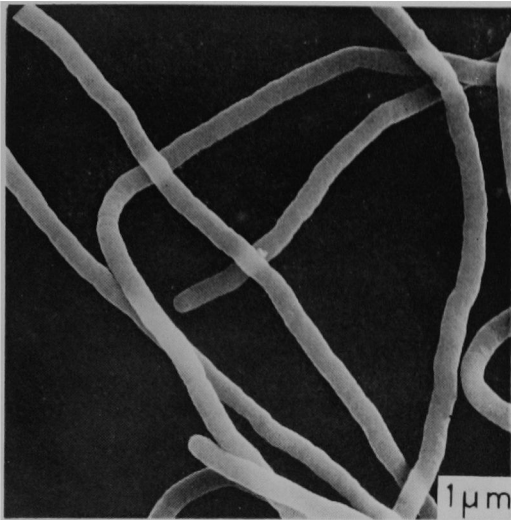


Fig. 15 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 1 hour

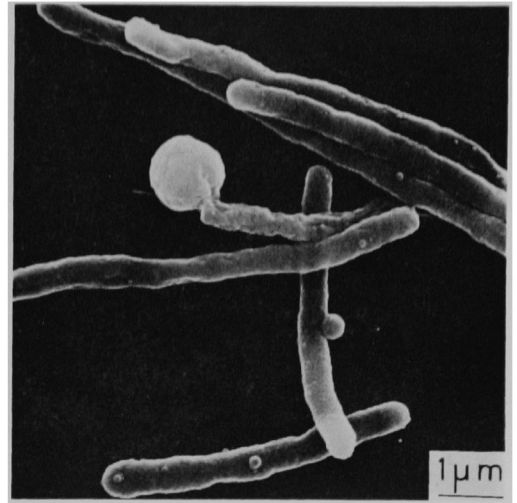


Fig. 16 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 2 hours

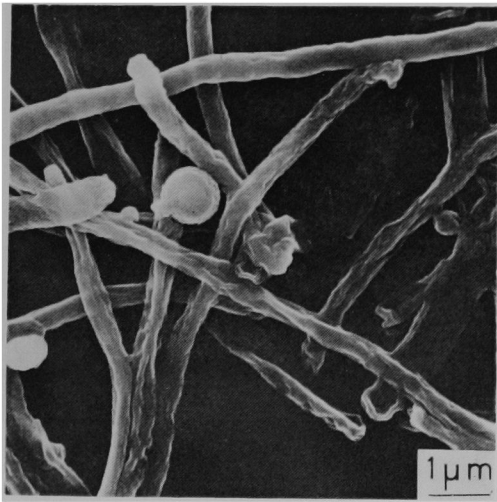
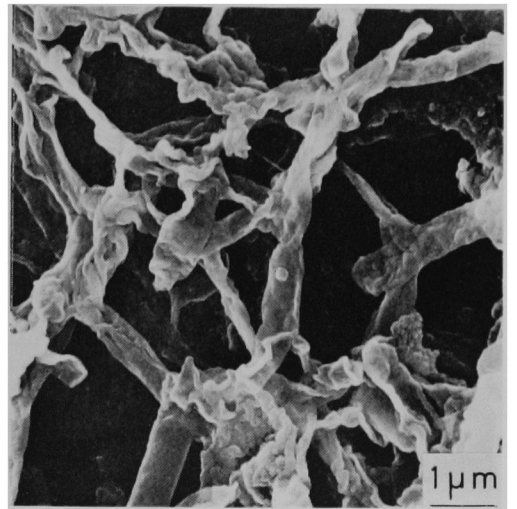


Fig. 17 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of CXD for 4 hours



2, 4 時間作用させた時の形態変化で、作用時間の経過とともに菌体は著しく伸長化し、filament 状の形態を示したが、表面構造には特に変化がみられなかった。

Fig. 15, 16, 17 は CXD の 100 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の形態変化で、菌体は少し伸長化して Spheroplast 様構造を形成し、作用 2, 4 時間

後では CEX 作用の場合と異なり多くの溶菌像を観察することができた。

次に CEX を作用させた時の形態変化を Fig. 18~29 に示した。Fig. 18, 19, 20 は CEX の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の走査電顕像で、CXD の場合と同様、この濃度では薬の作用が殆どみら

Fig. 18 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CEX for 1 hour

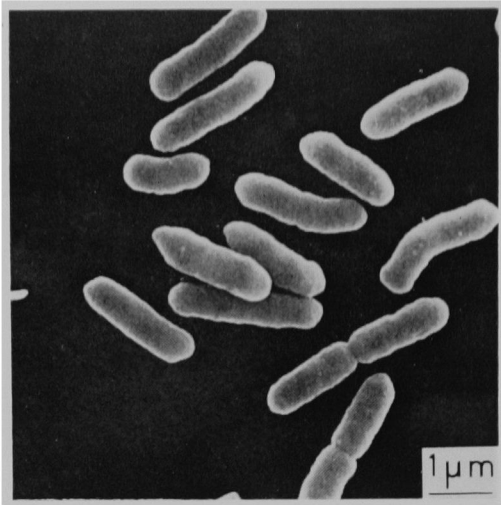


Fig. 19 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CEX for 2 hours

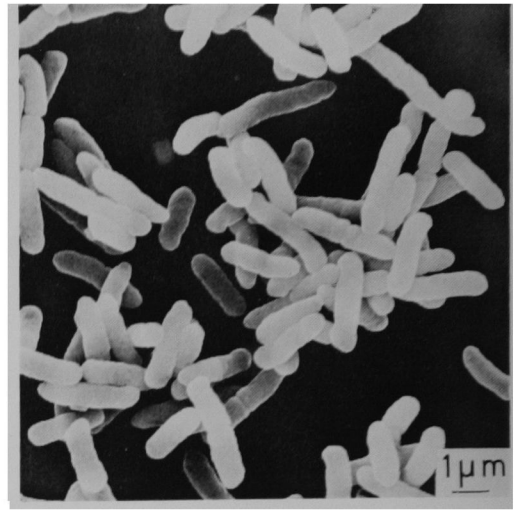


Fig. 20 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of CEX for 4 hours

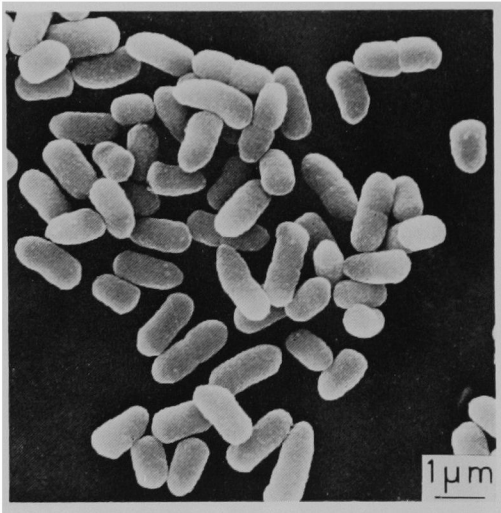
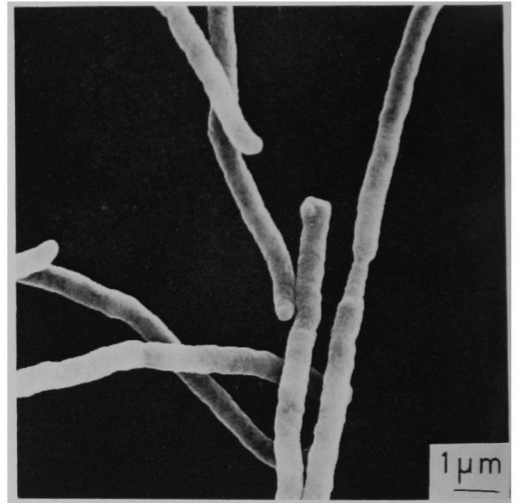


Fig. 21 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of CEX for 1 hour



れず、正常な桿状形態をした細胞を観察することができた。

Fig. 21, 22, 23 は CEX の 6.25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の走査電顕像で、1 時間後では分裂部位に相当すると思われる所に、Stretched construction がみられる細胞も一部認められたが、作用 2

時間後までは filament 状の形態を示した。4 時間後では再増殖により正常な桿状形態をした細胞も観察することができた。

Fig. 24, 25, 26 は CEX の 25 $\mu\text{g/ml}$ を 1, 2, 4 時間作用させた時の形態変化で、作用時間の経過とともに菌体は著しく伸長し、filament 状の形態を示した。

Fig. 22 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEX for 2 hours

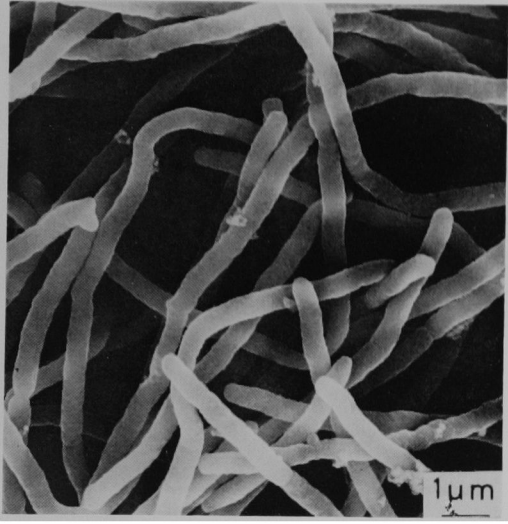


Fig. 23 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEX for 1 hours

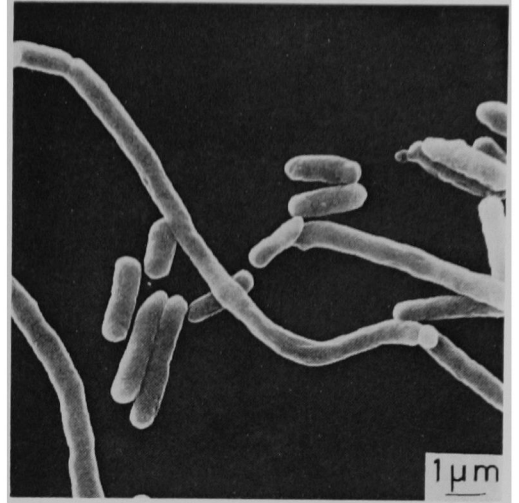


Fig. 24 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEX for 1 hour

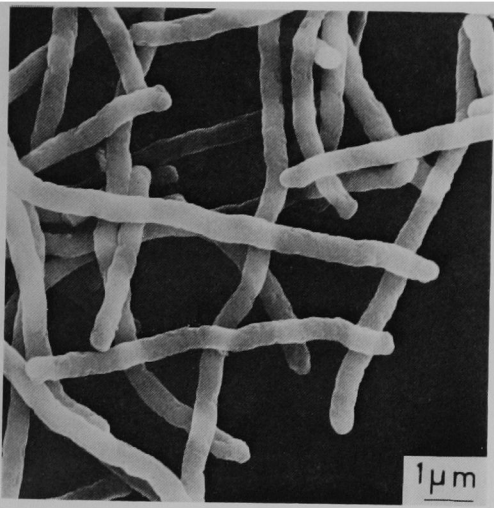


Fig. 25 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEX for 2 hours

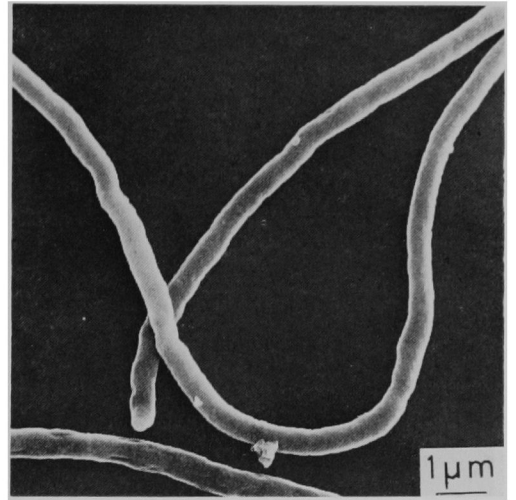


Fig. 27, 28, 29は CEX の100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を1, 2, 4時間作用させた時の形態変化で, 菌体は filament 状の形態を示し, 4時間後では溶菌像も認められたが, CXD作用時にみられたような Spheroplast 様構造を観察することができなかった。CED を作用させた場合は CEX作用と全く同様な形態変化を示した。CXD と CEX,

CED 間にみられたこのような形態変化の差をさらに詳細に検討するために, 次に Penicillin binding proteins に対する親和性について検討を行った。

3. PBPs に対する親和性

SPRATT の方法⁸⁾⁷⁾により, ^{14}C -Penicillin G に対して CXD, CEX, CED および CGP-3940 をモル比で0.2

Fig. 26 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 25 μ g/ml of CEX for 4 hours

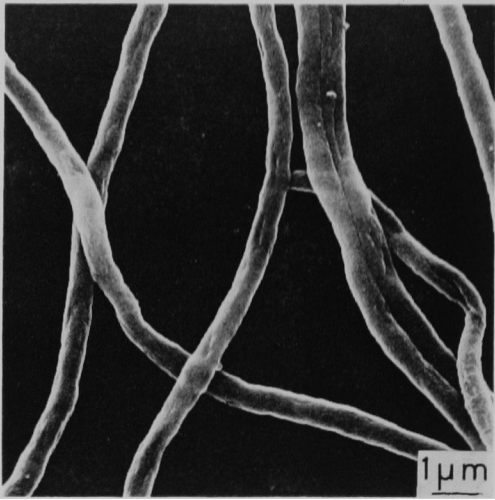


Fig. 27 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 μ g/ml of CEX for 1 hour



Fig. 28 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 μ g/ml of CEX for 2 hours

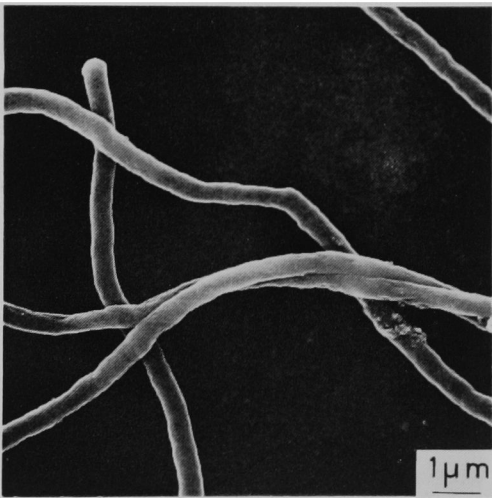
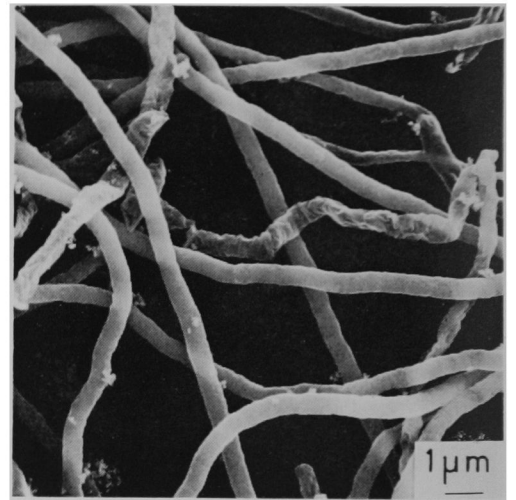


Fig. 29 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 100 μ g/ml of CEX for 4 hours



倍, 1 倍, 5 倍, 25 倍に加えて検討を行った。その結果は Fig. 30, 31 に示すように CXD, CGP-3940 の方が CEX, CED に比べ PBP 1Bs, 1A に対して優れた親和性を有していた。Fig. 30, 31 の結果を densitometer で処理し, 50% 阻害濃度を求めたのが Table 1 であり, これからも 1Bs に対する CXD, CGP-3940 の親和性が

CEX, CED に比べ優れていることが判る。

考 察

今回私どもは新しく合成された経口用セファロsporin系抗生物質 CXD の *E. coli* K-12 に対する抗菌作用に興味を持ち, CEX, CED を比較薬として検討を

Fig. 30 Fluorography showing competition of CXD and CED for ¹⁴C-labeled penicillin G binding in *E. coli* K 12

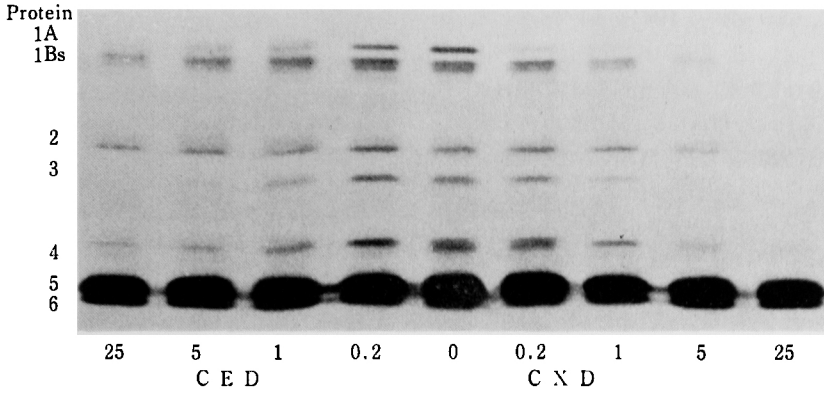


Fig. 31 Fluorography showing competition of CGP-3940 and CEX for ¹⁴C-labeled penicillin G binding in *E. coli* K-12

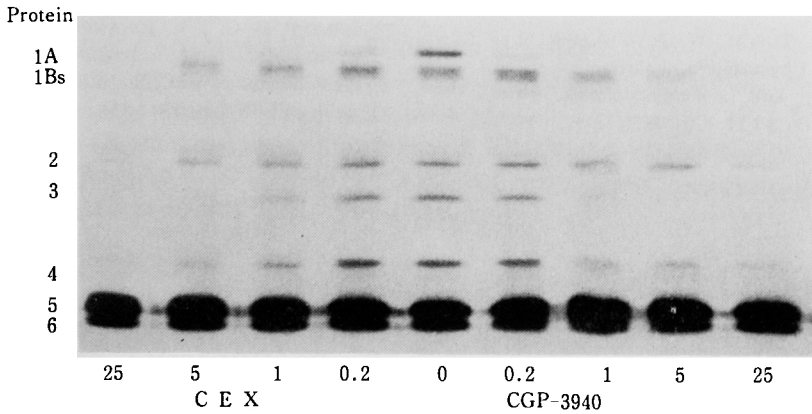


Table 1 Competition of antibiotics with ¹⁴C-labeled penicillin G for binding to PBPs in cytoplasmic membranes of *E. coli* K-12 *in vitro*

PBP	Concentration* of			
	Cefro-xadine	Cefradine	Cephalexin	CGP-3940
1A	<0.20	0.23	<0.20	<0.20
1Bs	2.9	>25	5.6	2.8
2	4.2	>25	7.9	9.0
3	0.6	0.9	0.52	0.25
4	1.4	2.3	0.68	0.74
5/6	>25	>25	>25	>25

* Concentration as a molar ratio to ¹⁴C-labeled penicillin G required for 50% inhibition binding of labeled penicillin G.

行った。増殖曲線におよぼす影響では、CXD は CEX、CED に比べ優れた殺菌作用を示し、その時の形態変化を位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡で観察すると、CXD の 100 μg/ml 作用により菌体はあまり伸長化せずに Spheroplast 様構造を形成し、溶菌した。一方 CEX の 100 μg/ml 作用では菌は filament 状の形態を示し、Spheroplast 様構造を観察することができなかった。このような抗菌力の差はどのような理由に基づくものか、一般的に β-lactam 抗生物質のグラム陰性桿菌に対する抗菌作用は、1) β-lactamase に対する安定性、2) 菌体外膜の透過性、3) Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性、4) 自己融解酵素 (Autolytic enzyme) との関連性、これら 4 つの因子が相互に関連して抗菌力を示すものと考えられる。CXD の β-lactamase に対す

る安定性は CEX と同様の傾向を示すと報告されており、今回私どもが行った PBP_s に対する親和性では、CXD の方が CEX, CED に比べ 1Bs や 1A に対して優れた親和性を有していた。PBP 1A, 1Bs は殺菌力に関係があると考えられており、この差が CXD の優れた殺菌作用に関与するものと思われるが、それ以外の因子、外膜透過性や自己融解酵素との関連性も注目され、現在さらに検討を行っている。

また CGP-3940 についても現在さらに研究を進めているが、CXD と同様な作用、すなわち CEX, CED に比べ優れた殺菌作用を示し、PBP_s についても 1Bs に対する親和性が CEX, CED より強いことが判明した。CEX, CED の 3 位の側鎖は $-CH_3$ 基であり、CXD, CGP-3940 はいずれも 3 位に $-OCH_3$ 基を有している。この $-OCH_3$ 基の存在が細菌細胞をより殺菌および溶菌されやすくするものと考えられる。

文 献

- 1) ZAK, O. ; W. TOSCH, W. A. VISCHER & F. KRADOLFER : Comparative experimental studies on 3-methoxy and 3-methylcephems. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 3 : 11~20, 1977
- 2) ZAK, O. ; W. A. VISCHER, C. SCHENK, W. TOSCH, W. ZIMMERMANN, J. REGÖS, E. R. SUTER, F. KRADOLFER & J. GELZER : CGP-9000 : A new orally active, broad-spectrum cephalosporin. *The J. of Antibiotics* 21 : 653~655, 1976
- 3) 西野武志, 吉本 正, 谷野輝雄 : 新しい経口セファロsporin系抗生物質Cefroxadine(CGP-9000)に関する細菌学的研究。 *Chemotherapy* 28(S-3) : 51~71, 1980
- 4) KELLENBERGER, E. ; A. RYTER & J. SECHAUD : Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 671~678, 1958
- 5) HORIDGE, G. A. & S. L. TAMM : Critical point drying for scanning electronmicroscopic study of ciliary motion. *Science* 163 : 817~818, 1969
- 6) SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 : 2999~3003, 1975
- 7) SPRATT, B. G. ; V. JOBANPUTRA & U. SCHWARZ : Mutants of *Escherichia coli* which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. *FEBS Lett.* 79 : 374~378, 1977
- 8) 林健志, 大場義樹 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。蛋白質・核酸・酵素 17 : 304~311, 1972

STUDIES ON MECHANISM OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFROXADINE (CGP-9000) ON *ESCHERICHIA COLI*

TAKESHI NISHINO, HIROYUKI OHWAKI, TADASHI YOSHIMOTO,

MASAKO OHTSUKI and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The mechanism of antibacterial activity of Cefroxadine (CGP-9000, CXD) on *Escherichia coli* K-12 was studied with reference to Cephalexin (CEX) and Cephadrone (CED).

The antibacterial activity of CXD was much superior to those of CEX and CED when an inoculum size was large. The morphological change of the organism was observed by a phase contrast microscope. At concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CXD made the bacteria elongated and showed by far stronger bacteriolytic activity than CEX or CED. At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the organism was not almost elongated, but showed a Spheroplast-like structure and was then lysed. On the other hand, the bacteria exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEX or CED did not exhibit a Spheroplast-like structure, showing only elongation. These morphological changes were observed stereoscopically by a scanning electron microscope.

Studies on penicillin binding proteins revealed that CXD had stronger affinity to 1Bs than CEX and CED.