

Ceftizoxime (CZX) の各種 β -lactamase に対する安定性と結合親和性

横田 健・東 映子

順天堂大学医学部細菌学教室

Ceftizoxime (CZX, FK749) の各種 β -lactamase に対する安定性と結合親和性を他のセファロスポリン (CEP) 新誘導体のそれと比較した。CZX は V 型 β -lactamase にわずかに水解される以外は、他のいかなる型の酵素でも加水分解されなかった。酸測定法 (指示薬法) により K_i 値として示された β -lactamase との結合親和性から見ると、CZX は各種 β -lactamase に安定性が高いだけでなく、Ic, I, II および IV β -lactamase に親和性が低く、つまり結合しないことが明らかになった。とくに I, II, IV 型に対する親和性が低く、これらの β -lactamase を産生する菌には CZX は感受性菌に対するのと同程度の強い抗菌力を示した。その結果、大腸菌標準株に 51 種類の R (*bla*-TEM) プラスミッドを伝達しても CZX に対する感受性は変化がないが、6059-S, CMZ および CFX に対しては、それぞれ平均 10, 2, 4 倍の MIC 値の上昇が見られた。

はじめに

β -Lactam 抗生物質に対する細菌臨床分離株の耐性は主として菌の β -lactamase によることが知られている。しかし各種 β -lactam 薬間の交叉耐性は、 β -lactamase の種類と抗菌薬の多様性のためかなり複雑である。ある β -lactamase 産生菌の耐性度は、その酵素の V_{max} を抗菌薬の K_m で割ったものから想像されるとされているが¹⁾、このようにして計算された V_{max}/K_m は、 β -lactamase を菌体外酵素として産生するグラム陽性菌では耐性度によくあうが、それを表層酵素として作るグラム陰性菌では、しばしば V_{max}/K_m と耐性度との間に食い違いが認められる。

すでに著者らは TEM 型 β -lactamase 産生を支配する R-plasmid を持つ大腸菌は V_{max}/K_m が Ampicillin (ABPC), Sulbenicillin (SBPC), Carbenicillin (CBPC) の順に小さくなるのに、耐性度は逆に CBPC, SBPC に対するものほうが ABPC よりはるかに高い事実注目し、 β -lactamase 産生菌は、薬物の加水分解によるほか、薬物の酵素に対する結合親和性が高ければ、表層間隙に存在する β -lactamase に薬物が結合し、一種の目づまり状態を起して、薬物の作用点への到達をさまたげ、耐性化する機構もありうるという仮説を明らかにした²⁾。事実、新しく開発された β -lactamase に加水分解されない抗菌薬に対しても、ある種の β -lactamase 産生菌は依然として耐性であることも明らかにされている³⁾。

Ceftizoxime (CZX) は藤沢薬品工業株式会社で開発された注射用 cephalosporin (CEP) で、 β -lactamase 産生菌に対してもすぐれた抗菌力を示す。本報告は CZX と、他の β -lactamase に分解されない新しい CEP の、各種 β -lactamase に対する安定性と結合親和性を実際の抗菌力と比較検討したものである。

材料および方法

菌は *Enterobacter cloacae* Nek39, *Proteus vulgaris* 33, *Proteus mirabilis* JY10, pRK1(*bla*) を持つ *Escherichia coli* CSH2, *Klebsiella* 42 および pRE 45 (*bla*) を持つ *E. coli* CSH2 をそれぞれ Ia, Ic, I, II (TEM), IV および V (Oxacillin 水解酵素) 型 β -lactamase の原材料として使用した。50 株の *P. vulgaris* 臨床分離株と 19 株の臨床から得られた Cefoxitin (CFX) 耐性 *E. cloacae* は、順天堂大学医学部臨床病理学教室 小酒井教授および小栗氏から分与された。53 種の β -lactamase 産生を支配する R-plasmid は *E. coli* と *Klebsiella* の ABPC 高度耐性株から得た当教室保存のものである。

試験薬としては、Ampicillin (ABPC, 武田薬品工業株式会社), Cephaloridine (CER, 塩野義製薬株式会社), Cefoperazone (CPZ, 富山化学株式会社), Cefazolin (CEZ, 藤沢), Cefoxitin (CFX, メルク万有製薬株式会社), Cefmetazole (CMZ, 三共株式会社), Cefotaxime (CTX, ヘキスト・ルセル株式会社), 6059-S (塩野義) および Ceftizoxime (CZX, 藤沢) を使用した。

1. β -Lactamase の調製

β -Lactamase 産生標準株を 5 ml の L-broth⁴⁾ で 37°C 1 夜振盪培養した。その 4 ml を 200 ml の L-broth に接種し Klett 光電比色計を使用して、濁度が Klett 100~150 にいたるまで、37°C でさらに 3.5~4 時間振とう培養した。遠心集菌し 1 回 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗い、これを同緩衝液 6 ml に再浮遊し

た。10 kc の音波処理を30秒、4回行い細胞を破壊し、100,000 g で30分間遠心した上清を β -lactamase の粗酵素として使用した。

2. β -Lactamase の測定

各 β -lactamase の V_{max} 値は macroiodo 法⁵⁾で測定した。各試験薬の K_i 値は ABPC または CER を基質とし、phenol red を用いる酸測定法で行なった⁶⁾。すなわち β -lactamase 活性は30°C で phenol red の変色による558 nm の吸光度の減少から追跡した。この反応追跡は1 ml cuvette の中に0.1 ml 試験薬溶液、1 ml の基質溶液、0.1 ml の0.0156% (w/v) phenol red および0.01 ml の β -lactamase 溶液(約50単位)を加え、手早く混合して、混合後1分目から酵素だけを欠く cuvette を reference として、Union SM401 型ダブルビーム光電比色計で自記追跡した。すべての反応液は、0.4 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) に溶かした後0.01 N 水酸化ナトリウム液で正確に pH 7.6 に補正したものを使用した。

3. 菌の感受性検査

各試験薬の最小発育阻止濃度(MIC)は、被検菌の L-broth 1夜培養液をそのままあるいは100倍に希釈して、薬物含有平板に1白金耳ずつ塗布し37°C で1夜培養して判定した。

成 績

1. CZX および他の新しく開発された cephalosporin に対する安定性

Fig. 1 に CZX その他の Ia および Ic 型 β -lactamase (CEPase 型)に対する安定性を、CER に対するそれを100とした相対的 V_{max} 値で示した。ここに見るとおり CER および CEZ はこれらの酵素によりよく加水分解をうけるが、すべての7-Z(2) methoxyimino および7- α methoxy cephalosporin 類と CPZ はこれらの酵素によってはほとんど分解されない。

いっぽう、ある種の PC ase 型 β -lactamase は Fig. 2 に示すとおり、CER や CEZ だけでなく新誘導体も破壊する。すなわち CPZ はその加水分解速度は遅いもののすべての PC ase 型酵素で分解される。また CZX は V 型により、CTX は III 型と V 型によりわずかながら破壊される。しかし、すべての7- α methoxy 誘導体すなわち6059-S、CFX および CMZ はどの型の PC ase によっても分解されなかった。

得られた成績は、薬物が過剰に存在する条件で測定される V_{max} 値からみるかぎり、7- α methoxy 誘導体がすべての β -lactamase に対してもっとも安定であることを示している。

Fig. 1 Relative rates of hydrolysis of Ceftizoxime (CZX) and other cephalosporins by the types Ia and Ic β -lactamases

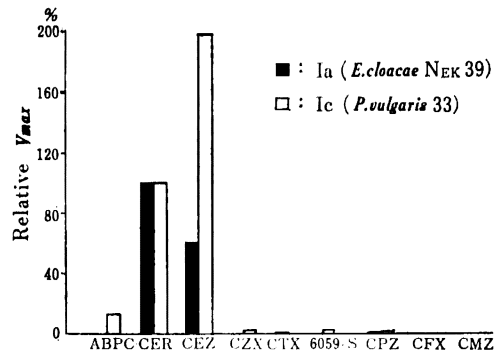
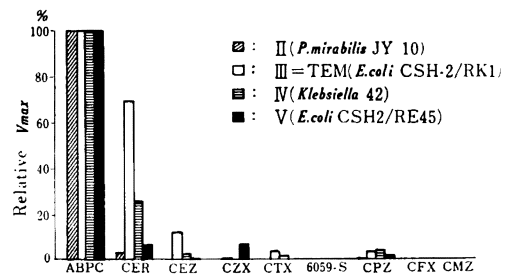


Fig. 2 Relative rates of hydrolysis of Ceftizoxime (CZX) and other cephalosporins by the types II, III (TEM), IV and V (Oxacillin hydrolyzing) β -lactamases



2. β -Lactamase 産生菌に対する新しい cephalosporin 類の MIC と安定性の食い違い

CPZ、CFX および CMZ の Ic 型 β -lactamase に対する高い安定性にもかかわらず、それを産生する *P. vulgaris* の臨床分離株のうちのあるものは Fig. 3 に示すとおり、依然としてある程度の耐性を示す。すなわち10%内外の株は25 μ g/ml 以上の CPZ、CFX および CMZ に対して耐性である。しかしこれらの株は例外なく0.1 μ g/ml 以下の CZX、0.39 μ g/ml 以下の6059-S または3.13 μ g/ml 以下の CTX によって完全に増殖が阻止された。両群の薬剤はともにこの菌の作る Ic 型 β -lactamase にきわめて安定で、加水分解を受けないことは注意するべきである。

この食い違いは Fig. 4 に示すとおり、 β -lactamase 産生を支配する R-plasmid をもった大腸菌でも認められる。この実験では53種類の異なった R (*bla*) plasmid が *E. coli* および *Klebsiella* の ABPC 高度耐性株か

Fig. 3 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *Proteus vulgaris* to Ceftizoxime(CZX) and other newly developed cephalosporins

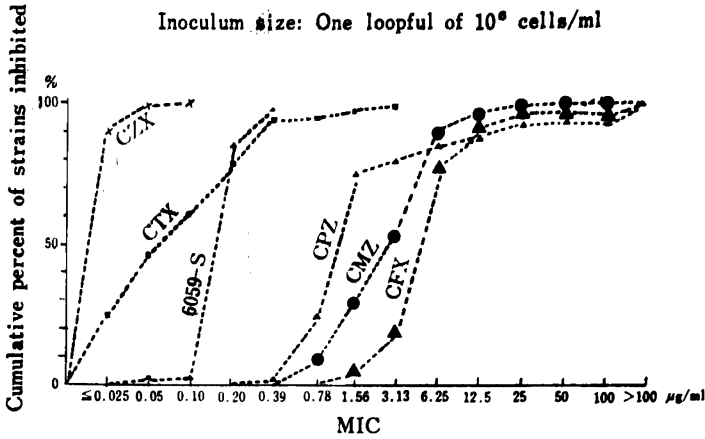


Fig. 4 Shift of sensitivity distributions of 53 subclones of *E. coli* CSH2 carrying various R(*bla*) plasmids to Ceftizoxime (CZX) and newly developed cephalosporins

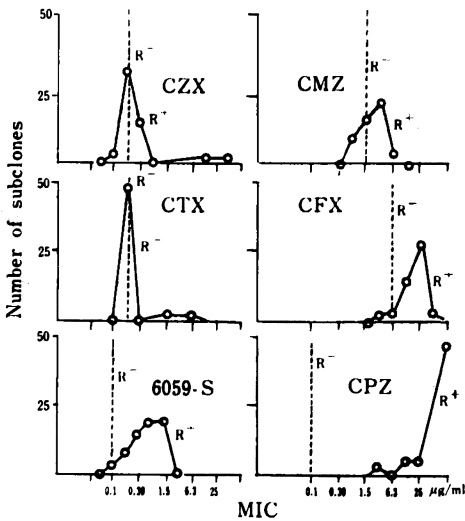
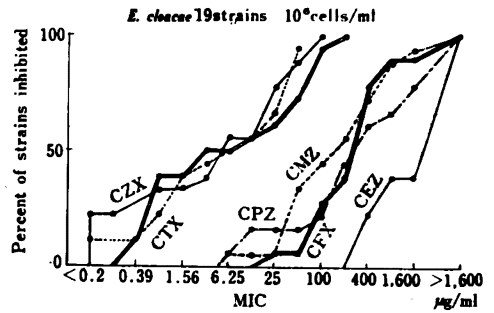


Fig. 5 Cumulative sensitivities of 19 clinical isolates of *E. cloacae* resistant to Cefoxitin against CZX and other newly developed cephalosporins



を支配していることが確認されているので、CPZ 以外のすべての薬剤は2つの例外を除き、まったく加水分解されないことを注意すべきである。

第3のMICとβ-lactamaseに対する安定性の食い違いは、CFX 耐性菌として選び出された19の *E. cloacae* 臨床分離株にみられる。Fig. 5に示すとおり、これらの株は25 μg/ml以上のCFXに耐性なばかりでなく、CMZおよびCPZにも耐性である。さらにその20%内外のものは25 μg/ml以上のCZX、CTXおよび6059-Sにも耐性を示した。これらのうちの高度耐性株を調べても新薬物を分解するような新しい型のβ-lactamaseは見出すことができず、さらにCEZを基質として使用したcrypticity valuesも、低度耐性株と高度耐性株の間

ら、接合により *E. coli* CSH2 に伝達され、その各薬物に対する感受性の変化が検討された。図のとおりCZX および CTX に対する感受性度は R-plasmid が伝達されても、R⁻の親株と変化がないが、6059-S、CFX および CMZ に対してはそれぞれ 10、4 および 2 倍耐性度が上昇している。53 種の R-plasmid のうち 51 種は III 型 (TEM) を、2 種は V 型の β-lactamase 産生

で差がみられないので、これら *E. cloacae* の耐性は Ia 型 β -lactamase の存在に由来するが、薬剤の加水分解以外の仕組みが考えられる。

以上3例の β -lactamase と薬剤の結合による目づまり耐性化の仮説は、Fig. 6 に示した実験からも支持される。すなわち先の19株の *E. cloacae* の CFX 耐性は、これらの菌の MIC 中央値の $\frac{1}{5}$ 量の β -lactamase 不可逆的阻害剤、PS-57) の添加によってある程度感受性化するという事実である。

Fig. 6 Change of cumulative sensitivities of 19 clinical isolates of *E. cloacae* by the addition of one fifth MIC of β -lactamase-inactivator against Cefoxitin

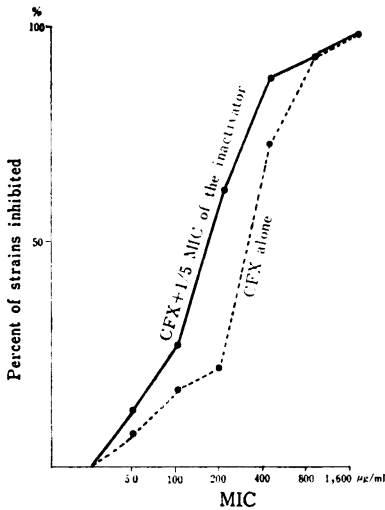


Table 1 Affinities of Ceftizoxime (CZX) and other newly developed cephalosporins to various types of β -lactamase

Enzymes		Specific activity	K_m^* (mM)	K_i in mM				
Type	Source			CZX	CTX	CFX	CMZ	6059-S
Ia	<i>E. cloacae</i> Nek 39	21.4	323	0.26	0.012	0.002	0.004	0.012
Ic	<i>P. vulgaris</i> 33	4.1	111	3,300	1,960	5.4	12.0	65.7
II	<i>P. mirabilis</i> JY 10	158.1	148	11,200	N. D. **	6,230	2,960	503
III	<i>E. coli</i> CSH2(pRK1)	1,200	54	15,500	23,300	3,160	960	158
IV	<i>Klebsiella</i> sp. 42	84.7	61	10,100	N. D.	5,100	1,200	36.3
V	<i>E. coli</i> CSH2(pRE45)	40.7	35	120	58.5	191	80	5.4

* K_m indicates for Ampicillin to the types II, III, IV and V β -lactamases, and for Cephaloridine to the types Ia and Ic β -lactamases.

** N. D.: Not done

3. CZX および新しく開発された cephalosporin 類の各種 β -lactamase に対する結合親和性

CZX およびその他の各種 β -lactamase に対する親和性は、PC ase に対しては ABPC, CEP ase に対しては CER を基質にしたときの各薬剤の K_i 値から検討された。7-Z(2) 誘導体、すなわち CZX と CTX はすべての型の PC ase に対し高い K_i 値、すなわち低い親和性を示したのに対し、CFX, CMZ および 6059-S はこれらの酵素に対して親和性がかなり高いことがわかった (Table 1)。

とくに CZX と CTX が III (TEM) 型 β -lactamase に対し親和性がきわめて低い (K_i 値が高い) のは注目に値する。つまりこれらの薬物は大多数の伝達性 ABPC 耐性 plasmid による酵素に安定なばかりでなく、ほとんど無関係に近いという事実である。この酵素学的な特性がこれら R-plasmid 伝達によっても *E. coli* 標準株の感受性が変化しない理由であろう。いっぽう、この III 型 β -lactamase に対しては CFX, CMZ, 6059-S の順に K_i 値が小さくなるが (親和性が高くなるが)、これはほぼこれら R-plasmid の伝達により上昇する耐性度の高さの逆の順序に近い。

K_i 値と MIC 値の逆相関は *P. vulgaris* の臨床分離株でも認められる。つまりこの菌の作る Ic 型 β -lactamase に親和性の低い (K_i 値の高い) CZX は例外なく強い抗菌力を示し、比較的高い親和性 (低い K_i 値) をもつ CFX や CMZ に対する耐性度は高く、中間の親和性を示す CTX や 6059-S に対する感受性は両者の中間に位置する。

最後に CZX および他の CEP は *E. cloacae* の作

る Ia 型 β -lactamase に強い親和性 (小さい K_i 値) を示す。これがこの菌のある株は依然としてこれらの薬にある程度の耐性を示す理由であろう。

考 察

CZX およびその他新しく開発された CEP 誘導体の β -lactamase 耐性菌に対する MIC と、その酵素に対する安定性と親和性が検討された。7-Z(2) methoxyimino CEP, すなわち CZX と CTX, および 7- α methoxy CEP, すなわち CFX, CMZ, 6059-S はすべての型の CEP ase には加水分解を受けない。しかし β -lactamase 産生菌のあるものは依然としてこれらの薬物に対してある程度の耐性を示す。これらの内で CZX が最も β -lactamase 産生菌に強い抗菌力を示すことがわかった。CZX が種々の β -lactamase に対して安定なばかりでなく、Ia 型以外のものに対しては結合親和性も低いことを考えると、 β -lactamase 産生菌に十分な抗菌力を示すためには、その酵素に対する加水分解されにくさとともに、結合親和性も低い必要があると想像される。この考え方は TEM 型 β -lactamase にほとんど結合されない CZX に対しては、*E. coli* CSH 2 に R (*bla*) plasmid を伝達しても感受性がまったく変わらないという事実からも支持される。これに対しこの酵素に安定ではあるが、よく結合する CFX, CMZ および 6059-S に対しては 2~10 倍の耐性上昇がみられた。

なぜ β -lactamase に安定なものうち結合親和性の低い薬が β -lactamase 産生菌により強い抗菌力を示すのか、その詳しいことはわからない。しかし著者が以前に提唱した表層間隙に存在する β -lactamase と薬物の結合による目づまり耐性化の仮説²⁾は、広く適用できるものと考えられる。 β -lactam 抗生物質に対するグラム陰性菌の耐性は、 β -lactamase 以外に、作用点の変化 (murein transpeptidase の変化) および外膜通過性の低下³⁾によっても起り得ることは知られている。しかし後 2 者の機構はわずかに *Pseudomonas aeruginosa* において外膜通過性低下による耐性化が知られているだけで、臨床分離株に対する成績はほとんどみられない。さらにこれらの機構は著者が今回使用した菌には考えにくいものと思われる。それは結合親和性との関係があまりに明らかなためである。もちろん β -lactamase に対する結合親和性に由来する耐性化の程度は、それによる加

水分解によるものに比べればはるかに低い。しかし酵素産生量が増加すれば結合親和性による耐性も高くなることを注意しなければならない。

新しく開発された注射用 CEP, CZX はその β -lactamase に対する結合親和性の低さから考えて、将来にわたり β -lactamase 産生菌に対する有力な治療薬となることが期待される。

文 献

- 1) POLLOCK, M. R.: Purification and properties of penicillinases from two strains of *Bacillus licheniformis*: A chemical, physicochemical and physiological comparison. *Biochem. J.* 94: 666~675, 1975
- 2) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11: 936~940, 1977
- 3) KOJO, H.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWANARA: Antibacterial activity of ceftizoxime (FK 749), a new cephalosporin against cephalosporin-resistant bacteria, and its stability to β -lactamase. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 16: 549~553, 1979
- 4) LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage ϕ 1. *Virology* 1: 190~206, 1955
- 5) ROSS, G. W. & C. H. O'CALLAGHAN: β -Lactamase assay. *Methods Enzymol.* 43: 69~85, 1975
- 6) RUBIN, F. A. & D. H. SMITH: Characterization of R factor β -lactamases by the acidimetric method. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 3: 68~73, 1973
- 7) OKAMURA, K.; M. SAKAMOTO, Y. FUKAZAWA, T. ISHIKURA & J. LEIN: PS-5, a new β -lactam antibiotic. III. Synergistic effects and inhibitory activity against a β -lactamase. *J. Antibiotics* 32: 280~289, 1979
- 8) RODRIGUES, W. J. & A. K. SAZ: Differential binding of penicillins by membrane fractions from penicillin-susceptible and-resistant *Gonococci*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 13: 589~597, 1978
- 9) RICHMOND, M. H. & A. C. CURTIS: The interplay of β -lactamases and intrinsic factor in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. *Ann. New York Acad. Sci.* 235: 553~567, 1974

STABILITY AND AFFINITY OF CEFTIZOXIME(CZX) AGAINST VARIOUS TYPES OF β -LACTAMASES

TAKESHI YOKOTA and EIKO AZUMA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

The stability of ceftizoxime(CZX) against types Ia, Ic, II, III(TEM), IV and V (oxacillin-hydrolyzing) β -lactamases was compared with those of other new cephalosporins as the relative V_{max} values measured by the macroiodometric method.

CZX was found to be nonhydrolyzable by the all types of β -lactamase except the type V that destroys the drug slightly. Furthermore, interrelationships were investigated between the MICs of CZX and other cephalosporins to β -lactamases-producing bacteria and the affinities of the drugs to the enzyme that were determined as the K_i values by modified acidometric method, since gram-negative bacteria producing β -lactamases as an epienzyme seemed to become resistant not only due to the hydrolysis of drugs but also depending upon unknown barriers directed by β -lactamases which does not destroy β -lactams but binds them and prevents passing through the periplasmic space to the sensitive site. It was revealed that CZX is not only stable but also possesses a large K_i value to the type III(TEM) β -lactamase, suggesting that the drug is indifferent from a majority of R(*bla*) plasmids coding the production of such kind of β -lactamase. In fact, the transfer of 51 different R(*bla*) plasmids to *Escherichia coli* CSH2 resulted in no change of the drug-susceptibilities from the plasmid-free parent strain. Whereas, the MICs of 6059-S and cefoxitin, which possess 100-fold and 5-fold higher affinities to the TEM-type β -lactamase, elevated to 10-and 4-fold, respectively, by the plasmid transfer, even though they are not hydrolyzed at all.