

## Ceftizoxime (CZX) の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合タンパク質に対する親和性と殺菌力の関係

横田 健・関口 玲子

順天堂大学医学部細菌学教室

ペニシリン結合蛋白 (PBP) は細菌細胞壁合成の最終段階に必要な酵素で、 $\beta$ -ラクタム薬の作用点であることが知られている。7-Z(2) 位にメトキシイミノ基を持ち、3 位側鎖の無い新しいセファロスポリン誘導体 (CEP), Ceftizoxime (CZX) は大腸菌およびコレラ菌の PBP のうち、1a, 1b および 3 に強い親和性を示した。PBP, 1b は菌細胞伸長時に必要なムレイン架橋酵素であり、CZX はこの 1b に最も強い親和性を示したので、この薬は強い殺菌作用を示すことが期待された。事実 CZX の殺菌作用は CEZ や Cefotaxime より強い。

さらに、MIC 以下の CZX 存在下で増殖した大腸菌はヒト血清と補体に殺菌され易くなり、またマウスの培養マクロファージに容易に食菌された。この現象は 7-Z(2) 位にメトキシイミノ基をもつ CEP に共通な性質であるが、CZX はこの点で Cefuroxime や Cefotaxime より強い。

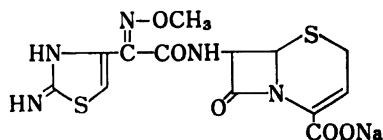
### はじめに

$\beta$ -Lactam 薬の抗菌力は、グラム陰性菌外膜の透過性<sup>1)</sup>、作用点である murein trans-peptidase に対する阻害効果<sup>2)</sup> および耐性菌のつくる  $\beta$ -lactamase に対する安定性<sup>3)</sup> の総合で決まることはよく知られている。

Ceftizoxime (CZX, FK 749) は藤沢薬品工業株式会で開発された新しい注射用 cephalosporin (CEP) で、Fig. 1 に示すとおり 7-Z(2) 位に methoxyimino 基を持ち、3 位に側鎖の無い特徴的な化学構造である<sup>4,5)</sup>。この抗菌薬はすぐれた抗菌力を持ち、とくに *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens*, indole 陽性 *Proteus* など既存の CEP の効き難いいわゆる日和見病原体を含め、グラム陰性桿菌に対する作用が強い<sup>4)</sup>。

CZX は他の CEP より殺菌力が優れているとされているので、この薬の penicillin 結合タンパク質 (PBP) に対する親和性を、大腸菌とコレラ菌を被検材料として検討した。

Fig. 1 Chemical formula of Ceftizoxime (CZX): Imino type



### 材料および方法

被検菌として *Escherichia coli* NIHJ JC-24<sup>6)</sup> および *Vibrio cholerae* E 2<sup>6)</sup> を使用した。液体培地としては

L-broth<sup>7)</sup> を用い、Mac CONKEY 寒天培地 (栄研化学) および感受性ディスク培地 (栄研) を平板として使用した。

本実験に使用した抗菌薬は、Cephaloridine (CER: 塩野義製薬株式会社), Cephalixin (CEX: 塩野義), Cefazolin (CEZ: 藤沢薬品工業株式会社), Cefoxitin (CFX: Merck 研究所), Cefmetazole (CMZ: 三共株式会社), Cefuroxime (CXM: Glaxo 研究所), Cefotaxime (CTX: Hoechst-Roussel), Ceftizoxime (CZX: 藤沢), 6059-S (塩野義) および Mecillinam (MPC: 武田薬品工業株式会社) である。

#### 1. 大腸菌およびコレラ菌の PBP 調製法

*E. coli* NIHJ JC-2 および *V. cholerae* E 2 の PBP は、SPRATT の方法<sup>2,8)</sup> に準じて調製した。被検菌を 10 ml の L-broth で 37°C 1 夜振盪培養し、その全量を 200 ml の L-broth に接種して、対数後期に至るまで約 4 時間 37°C で振盪培養した。遠心集菌し、0.01M のリン酸緩衝液 pH 7.0 で 1 回洗浄し、これを 8 ml の 0.05M リン酸緩衝液 pH 7.0 に再浮遊し、氷冷下で 10 kc, 30 秒の音波処理を 4 (コレラ菌) ~ 10 回 (大腸菌) 行い、菌細胞を破壊した。3,000 g, 15 分の遠心で未破壊細胞を除き、その上清中から 100,000 g 30 分の超遠心で膜面分を集めた。同じ緩衝液で膜面分を 1 回洗浄し、タンパク量が 15 ~ 20 mg/ml になるように濃厚な膜面分浮遊液をつくった。

#### 2. コレラ菌の PBP の解析

*E. coli* と *V. cholerae* の膜面分浮遊液 30  $\mu$ l に *E. coli* PBP の特定の画分に結合することが知られている

PC または CEP<sup>23</sup> 溶液 3  $\mu$ l を加え、30°C、10分間保温した。これに 3  $\mu$ l の <sup>14</sup>C-PCG 溶液 (1  $\mu$  mole/50  $\mu$  Ci/ml Radiochemical Centre) を加え、さらに 30°C 10分間保温し、反応を氷冷および 3  $\mu$ l の 20% sarkosyl と 60mg/ml の非放射性 PCG の等量混合液添加で止めた。室温に20分間放置後、外膜成分を除くため 30,000 g 60分間遠心した。その上清 30  $\mu$ l をとり 15  $\mu$ l の SDS (3%) -Tris-HCl buffer (0.2M, pH 6.8) -0.002% BPB と 5  $\mu$ l の  $\beta$ -mercapto-ethanol を加え、沸騰水中で2分間加熱した。急冷後その全量を10% polyacrylamide-SDS 平板電気泳動にかけ、増感剤として PPO を浸み込ませた後、ゲルを乾燥し、Kodak X-O mat フィルム<sup>24</sup>と密着させて、-80°Cで約20日間感光させて PBP を解析した。

### 3. 新抗菌薬の PBP に対する親和性の解析

CZX その他新抗菌薬に対する親和性は、前に記した <sup>14</sup>C-PCG に対する競合結合で調べた。すなわち各薬を最終濃度 0.5, 1.0, 5.0 または 25  $\mu$ g/ml になるように膜画分を加え、30°C 10分間保温後、<sup>14</sup>C-PCG を加え、電気泳動後の PBP 画分の消失を蛍光オートラジオグラフィーで検討した。

### 4. CZX の存在下における血清補体の殺菌作用の検討

*E. coli* NIHJ JC-2 を 10 ml の L-broth 中で 37°C 1 夜前培養した。これを新鮮 L-broth で 10,000 倍に希釈し、中試験管中に分割した。1 本に CZX, CTX または CEZ の 50% 増殖阻止濃度 (ID<sub>50</sub>) のものを、1 本に 20% ヒト血清および 2% モルモット補体、他の 1 本には薬剤と血清補体の両者を加えて、37°C で振盪培養を行った。培養開始後 1, 3, 5 時間目に一部をとり、適当に希釈して、その 0.1 ml を MAC CONKEY 平板上に塗り、37°C 1 夜培養して、生残菌数を colony forming units としで計算した。

### 5. CZX その他抗菌薬存在下における培養マウスマクロファージの食菌作用の検討

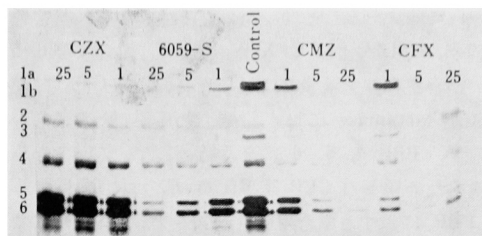
ddY,  $\delta$ , マウスに 1.5 ml の thioglycolate 培地を腹腔内注射し、2~3 日後に 3 ml の 10% 仔牛血清を含む F12 培地 (日本製薬株式会社) で腹腔を洗い、マクロファージ (M $\phi$ ) を採取した。細胞を遠心で集め 10% 仔牛血清、20% L 細胞培養液を加 F12 培地<sup>10)</sup> に細胞密度  $5 \times 10^4$ /ml になるように再浮遊した。その 0.4 ml を Lab Tek chamber slide の各区分に接種し、37°C 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 1 夜培養した。翌日浮遊細胞を含んだ培養液を除き、壁面に付着した M $\phi$  を培地で洗い、0.4 ml の  $2.7 \times 10^6$  個の *E. coli* NIHJ JC-2 細胞を含む F12 培地を加え、さらに培養を続けた。この時一部の区分に  $\frac{1}{2}$  MIC の CZX, CTX または CEZ を加えた。1, 3, 5 時間後に一部の chamber slide をとり出し培地を捨て、緩衝生

食水で軽く洗って methanol で固定した。これをギムザ染色し光学顕微鏡で観察した。

## 成 績

### 1. 大腸菌 PBP に対する CZX の結合親和性

Fig. 2 Competition of Ceftizoxime (CZX) and other cephalosporin derivatives to penicillin binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2



Footnote: Numbers mentioned under the name of drugs indicate amounts added in  $\mu$ g/ml to the membrane fractions 10 minutes before the addition of <sup>14</sup>C-Penicillin G.

Fig. 3 Densitometry of fluorographs of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 penicillin binding proteins that were pretreated with 1  $\mu$ g/ml of Ceftizoxime (CZX) or Cefotaxime (CTX) for 2 to 12 min before the addition of <sup>14</sup>C-Penicillin G

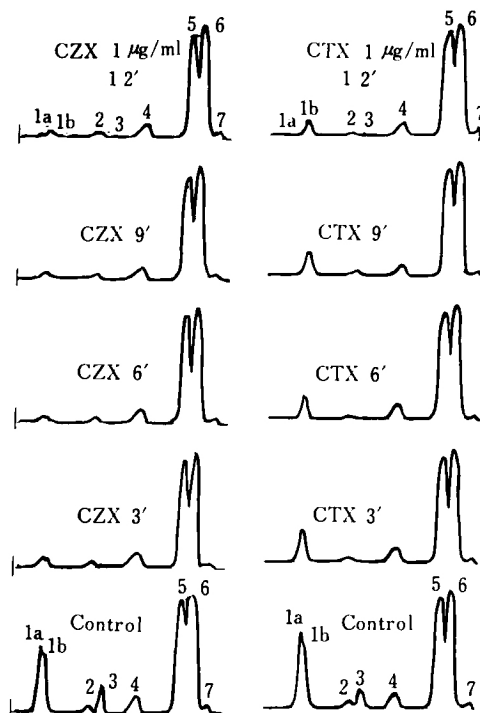


Fig. 2 に示すとおり CZX は, *E. coli* NIHJ JC 2 の PBP 1b に強い結合親和性を示し, 1a と 3 に対する親和性がそれに次ぐ。これに対し cephamycin 型の新誘導体すなわち 6059-S, CMZ および CFX は 1a と 3 に対する結合親和性が最も強く, 1b に対する親和性がそれにつぐ。

CZX は 7-Z(2)位に methoxyimino 基を持つ点で CTX と似ているが, Fig. 3 に示すとおり CZX のほうが 1b に対する親和性が強く, 2 に対しては CTX より弱い。

さらに興味あることは, 7- $\alpha$  位に methoxy 基を持つ 6059-S, CMZ および CFX が PBP 4, 5 および 6 にも強い結合親和性を示すのに対し, CZX や CTX は前者同様  $\beta$ -lactamase に対する安定性が高い<sup>5)</sup> のにもかかわらず, PBP 4, 5, 6 に全く結合しないことである。参考のため種々の CEP 誘導体の *E. coli* NIHJ JC-2 の PBP に対する結合親和性の強さを Table 1 にまとめた。

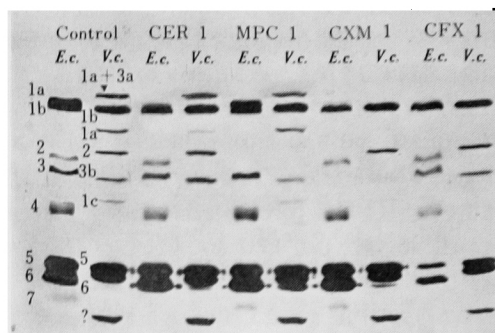
Table 1 Binding-affinities of various cephalosporins to the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2

Name of drugs	Strength to the penicillin-binding proteins
Cephaloridine	1a>1b=3>2=4>5,6
Cephalexin	1a>3=4>1b>2=5,6
Cefazolin	1a>1b=3>2=4>5,6
Cefoxitin	1a>5,6>1b>3>4>2
Cefmetazole	1a>3=1b=5,6>4>2
Cefuroxime	1a=3>1b>2=4>5,6
Cefotaxime	1a=3>1b>2>4=5,6
Ceftizoxime	1b>3>1a>2=4=5,6
6059-S	1a=3>1b=5,6>2=4

## 2. コレラ菌の PBP の解析とそれに対する CZX の結合親和性

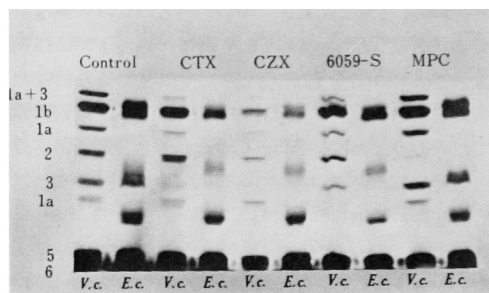
コレラ菌の PBP の解析は, 大腸菌の PBP の特定な画分に対し強い親和性をもつ既知の  $\beta$ -lactam 薬を使ってみた<sup>3)</sup>。すなわち, Fig. 4 に示すとおり 1  $\mu$ g/ml の CER でコレラ菌の膜画分を処理した後, <sup>14</sup>C-PCG を加えると, 上から 3 番目と 6 番目の放射能バンドが消失するか薄くなる。CER は *E. coli* PBP の 1a に強く結合するので, コレラ菌では上記の 2 画分が 1a に相当することになる。同様にして, *E. coli* PBP 2 に特異的に結合する MPC でコレラ菌の膜画分を前処理すれ

Fig. 4 Competition of various  $\beta$ -lactams to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *Vibrio cholerae* E2



Footnote: One microgram per ml each of Cephaloridine (CER), Pivmecillinam (MPC), Cefuroxime (CXM) and Cefoxitin (CFX) was added to the membrane fractions 10 min before the addition of <sup>14</sup>C-Penicillin G to erase the 1a, 2, 1a and 3, and 5 and 6 fractions of the both microbes, respectively.

Fig. 5 Competition of new cephalosporin derivatives and Pivmecillinam to penicillin binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *Vibrio cholerae* E2



Footnote: One microgram per ml each of Ceftizoxime (CZX), Cefotaxime (CTX), 6059-S, and Pivmecillinam (MPC) was added to the membrane fractions 10 min before the addition of <sup>14</sup>C-Penicillin G.

ば, その PBP のうち 4 番目の画分が消失するので, それがコレラ菌 PBP 2 であることがわかる。*E. coli* PBP の 1a と 3 に強い親和性をもつ CXM, その 4, 5, 6 にも結合する CFX も使い, 結局コレラ菌の PBP は Fig. 4 と 5 のとおり 1a と 3 の性質をもつものが 1 つ, 純粋な 1a の性格をもつものが 2 つ, 1b, 2, 3, 5, 6 および未知のものがそれぞれ 1 つずつの合計 9 画分存在することがわかった。

Table 2 Minimal growth inhibitory concentrations of Ceftizoxime (CZX) and other cephalosporins against *E. coli* NIHJ JC-2 and *V. cholerae* E 2

Name of drugs	MIC* to <i>E. coli</i> NIHJ JC-2	MIC to <i>V. cholerae</i> E2
Cephaloridine	6.25μg/ml	25μg/ml
Cephalexin	12.5	25
Cefazolin	3.13	12.5
Cefoxitin	1.56	6.25
Cefmetazole	1.56	6.25
Cefuroxime	6.25	0.78
Cefotaxime	0.1	0.05
Ceftizoxime	0.1	0.05
6059-S	0.1	0.39

\*The MICs were determined by the liquid medium dilution method (L broth) with  $2 \times 10^6$  cells per milliliter inoculum.

CZX は Fig. 5 に示すとおり、コレラ菌でも 1b, 1 a, 3 の PBP に強く結合し、1b に対する親和性は同類の CTX より強いことがこの菌でも確認された。参考のため Table 2 にこの実験に用いた薬剤のコレラ菌に対する MIC をまとめた。

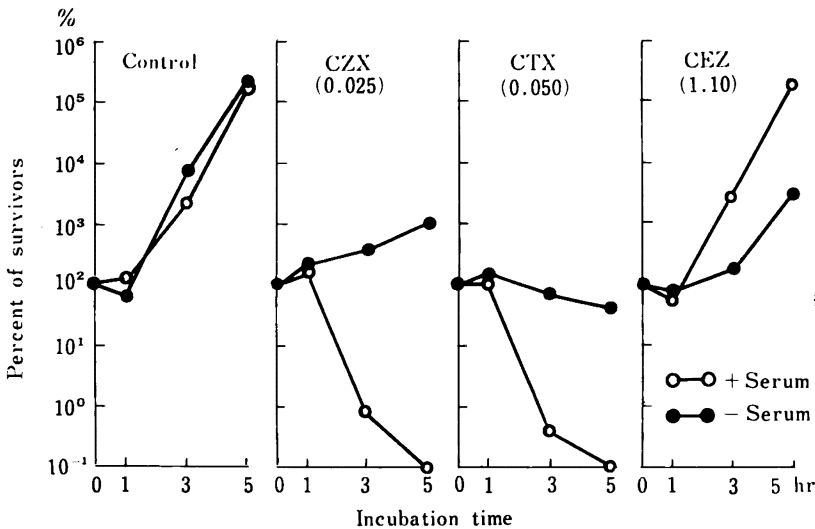
3. MIC 以下の CZX, CTX または CEZ 存在下における補体殺菌作用の変化

既に CZX の殺菌力は培地中より血液中で強いことが知られている<sup>4)</sup>ので、その MIC 以下の濃度の存在が血清補体による殺菌にどのように影響するか調べた。Fig. 6 に示すとおり、*E. coli* NIHJ JC-2 は20%ヒト血清、2%モルモット補体および0.025 μg/ml (ID<sub>50</sub>) の CZX を含んだ L-broth 中では急激に死滅するが、血清と補体だけを含んだ培地中では、むしろ生菌数は増加している。同量の CTX では菌の補体による殺菌効果の受け易さは見られないが、倍量の0.05 μg/ml にすると、CZX 同様補体に殺されやすくなる。一方、CEZ 1.10 μg/ml (ID<sub>50</sub>) 添加培地中では血清と補体を加えると、むしろ生菌数は増加した。

4. MIC 以下の CZX 存在下におけるマウス培養マクロファージの大腸菌細胞食菌作用

*E. coli* NIHJ JC-2 の細胞は $\frac{1}{2}$ MIC の CZX が存在すると著明に長くなるが、Fig. 7 に示すとおり、マウスMφによく食菌される。CEP 処理により filament 状に伸びた菌細胞がMφによく取り込まれ、細胞内で破壊されることは興味深い。Filament 形成と共に菌体にふくみをつくる CEZ で同じ菌を処理しても、Fig. 8 に示すとおり CZX と同じようによく食菌される。これに対し CEP を加えないと、菌細胞の伸長は見られず、Fig. 9 のとおり多数のものが Mφ に食菌されるが、細胞内で増殖が見られ、長時間の培養により Mφ を破壊し

Fig. 6 Bactericidal effect of subinhibitory doses of Ceftizoxime (CZX), Cefotaxime (CTX), and Cefazolin (CEZ) in the presence and absence of human serum and guinea pig complement



てしまうこともある。

Fig. 7 Micrograph of mouse macrophages phagocytizing the cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 in the presence of  $\frac{1}{2}$  MIC of Ceftizoxime (CZX): 37°C for 5 hrs

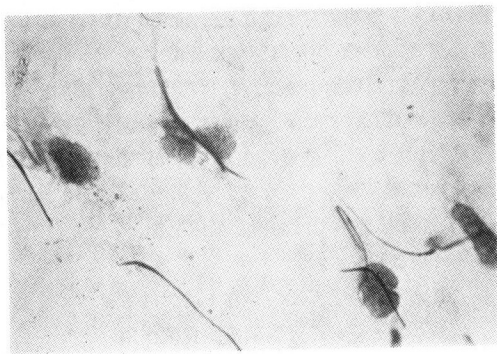


Fig. 8 Micrograph of mouse macrophages phagocytizing the cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 in the presence of  $\frac{1}{2}$  MIC of Cefazolin (CEZ): 37°C for 5 hrs

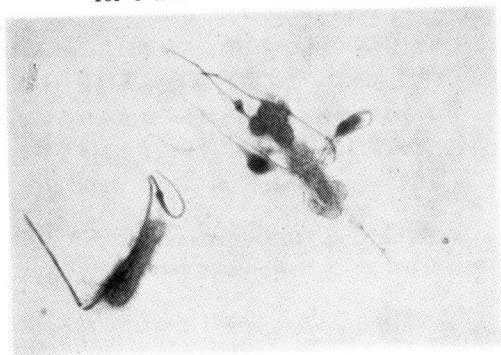
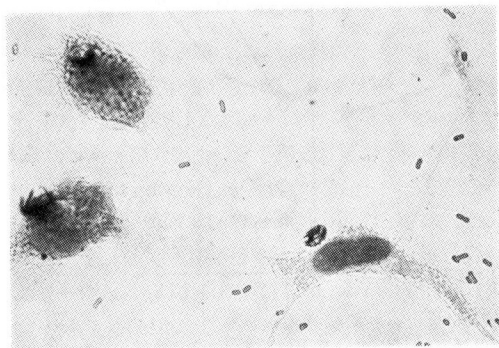


Fig. 9 Micrograph of mouse macrophages phagocytizing the cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 in the absence of drugs: 37°C for 5 hrs



## 考 察

新しく開発された注射用 CEP, Ceftizoxime (CZX) の *E. coli* および *V. cholerae* PBP に対する結合親和性を検討した。CZX は両細菌の PBP 1b に強い親和性を持つことが明らかにされた。*V. cholerae* では、電気泳動により、1b 画分が 1a 画分から離れたところに見られるので、この薬剤の 1b に対する高い親和性は、より明確に認めることができる。

CZX の PBP 1b に対する高い親和性は、この薬のもつ強い殺菌作用の 1 因と思われる。それは、PBP 1b が菌細胞の伸長時に不可欠な murein 架橋酵素であることが知られている<sup>11)</sup>からである。さらに CZX の MIC 以下存在下で増殖した菌は血清補体で殺菌されやすくなることも特筆に値する。これらの性質は 7-Z (2) 位に methoxyimino 基を持つ CEP の通性と考えられるが、この点で CZX は CXM や CTX より強い。

ある種の CEP 存在下で増殖した長い filament 状の菌細胞が Mφ によく食菌されることも、興味ある知見と思う。長い filament 状の菌細胞は Mφ の大きさを越えるため、食菌されないのではないかという俗説が信じられているが、filament 状の菌細胞が食菌されるかどうかは、その大きさではなくて、どの程度細胞壁が傷害されているかによるように考えられる。

他の興味ある点は、CZX など 7-Z (2) methoxyimino 体がコレラ菌に強い抗菌力をもつ点である。同菌の PBP に対する結合親和性は他の群の CEP と大差ないので、これらのものはコレラ菌外膜の通過性が良いのであろう。

結論として CZX は生体内殺菌力が優れているので、各種細菌感染症、とくにグラム陰性菌のそれに有用な抗菌薬となるであろう。

## 文 献

- 1) RICHMOND, M. H.; D. C. CLERK & S. WOTTON: Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase-non-susceptible penicillins and cephalosporins on *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10:215~218, 1976
- 2) SPRATT, R. 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:  $\beta$ -Lactamases of gram-negative bacteria and their physiological possible role. In *Advances in Microbial Physiology.* (A. H. ROSE & TEMPEST, D. W.) 9: 31~85, Academic Press, New York, 1973
- 4) KAMIMURA, T.; Y. MATSUMOTO, N. OKADA, Y. MINE,

- M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Ceftizoxime (FK 749), a new parenteral cephalosporin: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16: 540~548, 1979
- 5) KOJO, H.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Antibacterial activity of ceftizoxime (FK 749), a new cephalosporin, against cephalosporin-resistant bacteria, and its stability to  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16: 549~553, 1979
- 6) YOKOTA, T. & S. KUWAHARA: Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-deficient mutants of *Vibrio cholerae*. *J. Bact.* 120: 106~113, 1974
- 7) LENNOX, E. S.; Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage  $\phi$ 1. *Virology* 1: 190~206, 1955
- 8) SPRATT, R. G. & A. B. PARDEE: Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254: 516~517, 1975
- 9) BONNER, W. M. & R. A. LASKEY: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83~88, 1974
- 10) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA: Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of newborn hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). *Cell. Physiol.* 100: 351~364, 1979
- 11) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI: Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1b and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5472~5476, 1977

CEFTIZOXIME (CZX), A NOVEL CEPHALOSPORIN WITH  
HIGHT AFFINITY FOR PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1b  
OF *ESCHERICHIA COLI* AND *VIBRIO CHOLERA*  
(BIOTYPE *EL TOR*)

TAKESHI YOKOTA and REIKO SEKIGUCHI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

Penicillin-binding proteins (PBP) are elucidated as the target enzymes of  $\beta$ -lactam drugs, which are necessary for the final biosynthetic step of murein in the bacterial cell wall. Ceftizoxime (CZX), a novel cephalosporin possessing the methoxyimino radical on the 7-Z(2) position and no side chain on the 3 position, manifests strong affinities to the 1a, 1b and 3 fractions of PBP of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Since the 1b fraction has been understood as an essential enzyme for the murein-biosynthesis required for cell-elongation and CZX is the most potent inhibitor for the 1b fraction ever known, its bactericidal activity is expected to be significant. In fact, the drug exhibits stronger bactericidal effect on *E. coli* cells than cefazolin (CEZ) and cefotaxime (CTX). Furthermore, it was demonstrated that *E. coli* cells grown in the presence of a subinhibitory dose of CZX are easily killed by the complement in mammalian sera and easily phagocytized by cultured macrophages derived from mice. Although that phenomenon is common in the 7-Z(2)-methoxyimino derivatives of cephalosporin, CZX is more prominent than cefuroxime and CTX in this respect.