

新しい cephalosporin 誘導体 Ceftizoxime (CZX) の R-plasmid 保有および染色体由来耐性菌に対する 抗菌活性と β -lactamase に対する安定性

高 乗 仁・西 田 実
藤沢薬品工業株式会社中央研究所

Escherichia coli の Ampicillin (ABPC) 耐性臨床分離株に対する Ceftizoxime (CZX, FK 749) の抗菌活性を最近開発された他の cephalosporin 誘導体と比較した。R-plasmid 保有 ABPC 耐性株および染色体由来 ABPC 耐性株の両群に対して CZX は最も強い活性を示した。ABPC 感受性 *E. coli* に対する CZX の抗菌活性は ABPC 耐性 R-plasmid の導入によって低下しなかった。しかしながら R-plasmid の導入によって多くの試験菌株が, Cefoperazone および Cefamandole に対しては高度耐性を, Cefotiam に対しては中等度耐性を獲得した。

CZX は R-plasmid 由来の β -lactamase を含む penicillinase および cephalosporinase の両タイプの β -lactamase に非常に安定であった。 β -Lactamase に対する CZX の安定性は Cefoxitin, Cefmetazole および Cefotaxime と同程度で, Cefuroxime よりやや優れ, Cefotiam, Cefamandole および Cefoperazone より優れることが明らかになった。

はじめに

Cephalosporin 系抗生物質は一般に, グラム陽性および陰性菌の多くに抗菌活性をもち, かつ低毒性であるため, 他種の抗生物質より優れた抗菌剤である。しかし, 最近グラム陰性菌に対する cephalosporin 類の抗菌活性について, 次の2点が問題として挙げられるようになった。1点は臨床分離菌のうち, cephalosporin 類に感受性を示さない *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* および *Pseudomonas*¹⁾ などが徐々に増加していることである。もう1点は R-plasmid 保有の ABPC 耐性株における cephalosporin 耐性の程度の上昇で, それによる *E. coli* および *Klebsiella pneumoniae* を含む腸内細菌群における cephalosporin 中等度耐性株の増加傾向である²⁻⁴⁾。

本報では当研究所で新しく開発された cephalosporin 誘導体 CZX⁵⁾ について, 先に述べた cephalosporin 耐性菌, とくに R-plasmid 保有株に対する抗菌活性と β -lactamase に対する安定性について検討した。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

次の薬剤を使用した。Ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品), Cefotiam (CTM, 武田薬品), Cefamandole (CMD, Eli Lilly), Cefuroxime (CXM, Glaxo), Cefotaxime (CTX, Hoechst-Roussel), Cefmetazole (CMZ, 三共), Cefoxitin (CFX, Merck), Cefoperazone (CPZ, 富山化学), Cephaloridine (CER, Eli Lilly), Cefazolin (CEZ,

藤沢薬品), Penicillin G (PCG, 藤沢薬品), Ampicillin (ABPC, Beecham)。

2. 使用菌株

E. coli CSH2 (nal^r), ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* CSH2 17株および染色体由来 ABPC 耐性 *E. coli* 臨床分離株 12 株は順天堂大学医学部 横田教授から分与を受けた。ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* の臨床分離株 12 株は当研究所に保存中のものを使用した。また, 次の菌種の臨床分離株から 10 株の β -lactam 剤耐性株を選び, β -lactamase の調製に使用した。*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*。

3. 薬剤感受性の測定

試験薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は寒天平板希釈法で行なった。試験菌はスタンプ法で接種した⁶⁾。菌接種液は trypticase soy broth (BBL) で 1 夜, 前培養した原液を使用した。37°C で 20 時間培養後, 肉眼的にコロニーの発育を阻止した最小濃度を MIC と判定した。

4. 平均 MIC の算出法

得られた個々の MIC 値を次のように評点化する。

評 点	1	2	3	4	5	6	7	8	
MIC($\mu\text{g/ml}$)	>800	800	400	200	100	50	25	12.5	
	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	≤ 0.025

これらの評点の合計を菌株数で除して、平均評点を算出した。

平均評点から式(a)を用いて平均 MIC を求めた。

$$\text{平均 MIC} = 100 \times \left(\frac{1}{2} \right) \text{平均評点} - 5 \dots\dots(a)$$

5. β -Lactamase の調製

β -Lactamase の inducer として PCG を添加した heart infusion broth 中で、試験菌を 37°C で増殖させた。1 夜培養後、遠心分離によって集菌し、0.067M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 1 度洗浄した後、同じ緩衝液に懸濁させた。細菌懸濁液を 20 Kc で 20 分間音波処理し、菌体を破壊した。破碎菌液を遠心分離し、上清を Sephadex G 100 カラムによりゲルろ過し、0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。 β -Lactamase 活性画分はブールし、-20°C で保存した。

6. β -Lactamase 活性の測定

β -Lactamase 活性は恒温セルホルダーを備えた日立 200-20 形分光光度計で測定した。1 cm 幅の石英セル内で酵素液の一定量を基質 150 μg 、およびリン酸緩衝液 (pH 7.0) の 200 $\mu\text{ mole}$ とで最終量が 3.0 ml になるよう混合し、37°C で incubate する。 β -Lactamase の分解の速度は penicillin では 240 nm, cephalosporin では 260 nm における吸光度の変化によって測定した⁷⁾。各薬剤の分解速度は、cephalosporinase については CER の分解速度を、penicillinase については PCG の分解速度をそれぞれ 100 とした相対値で求めた。

結 果

1. ABPC 耐性の *E. coli* 臨床分離株に対する CZX の抗菌活性 (Table 1)

E. coli の ABPC 耐性臨床分離株は、染色体由来株と R-plasmid 保有株とに区別できる。これらの菌株に対する CZX の抗菌活性を、最近開発された cephalosporin および cephamycin 誘導体のそれと比較した。CZX は両タイプの耐性株に対して最も強い抗菌力を示し、R-plasmid 保有株に対する平均 MIC は 2.1 $\mu\text{g/ml}$ 、染色体由来株に対する平均 MIC は 1.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの耐性株に対する CZX の平均 MIC は感受性株に対する MIC と同等であった⁵⁾。一方、対照とした他の cephalosporin および cephamycin 誘導体は

Table 1 Antibacterial activity of Cefprozime against Ampicillin-resistant strains of *E. coli*

Antibiotic	Mean MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	R+ <i>E. coli</i>	C+ <i>E. coli</i>
Ceftizoxime	2.1	1.7
Cefotiam	5.6	9.4
Cefamandole	50	178
Cefuroxime	28	40
Cefotaxime	3.5	11
Cefmetazole	40	50
Cefoxitin	7.0	11
Cefoperazone	>800	>800
Cefazolin	25	47

Number of R+ and C+ strains: 12 strains each
R+: R-plasmid harboring strains (clinical isolates)
C+: Chromosomally resistant strains (clinical isolates)

Incubation: heart infusion agar, 37°C, 18~20 hr
Assay: 10⁸/ml, Stamp method

CZX と比較して R-plasmid 保有耐性株に対しては約 2 倍から 25 倍、染色体由来耐性株に対しては約 5 倍から 100 倍の高い MIC を示した。

2. CZX の抗菌活性に対する ABPC 耐性 R-plasmid の影響

Cephalosporin 誘導体の抗菌活性に対する ABPC 耐性 R-plasmid の影響を、*E. coli* CSH2 (親株) に対する cephalosporin 剤の活性と、R-plasmid 保有 *E. coli* CSH2 に対するそれとを比較することによって検討した。臨床分離の R-plasmid 保有株、*E. coli* (8 株) および *K. pneumoniae* (9 株) から *E. coli* CSH2 (標準株) に R-plasmid をそれぞれ導入した。Fig. 1 に *E. coli* CSH2 に対する各薬剤の MIC と、ABPC 耐性 R-plasmid を伝達された *E. coli* CSH2 の 17 株に対する MIC の分布を示した。検討した 9 薬剤のうち Cefoperazone の抗菌活性は R-plasmid によって最も強い影響をうけ、次に Cefamandole, Cefotiam の順に影響をうけた。Fig. 1 に示すように、R-plasmid を保有しない *E. coli* CSH2 に対しては、それぞれ Cefoperazone が 1.56 $\mu\text{g/ml}$ および Cefamandole が 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示したが、R-plasmid 保有 *E. coli* CSH2 に対しては両薬剤とも 65% の株が $\geq 400 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。R-plasmid を保有しない株に対する Cefotiam の MIC は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であったが、R-plasmid 保有株に対しての MIC は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ に広く分布した。また、Cefuroxime, Cefotaxime, Cefoxitin

Fig.1 Influence of introduced Ampicillin resistance plasmids on antibacterial activities of cephalosporins against *E. coli* CSH2

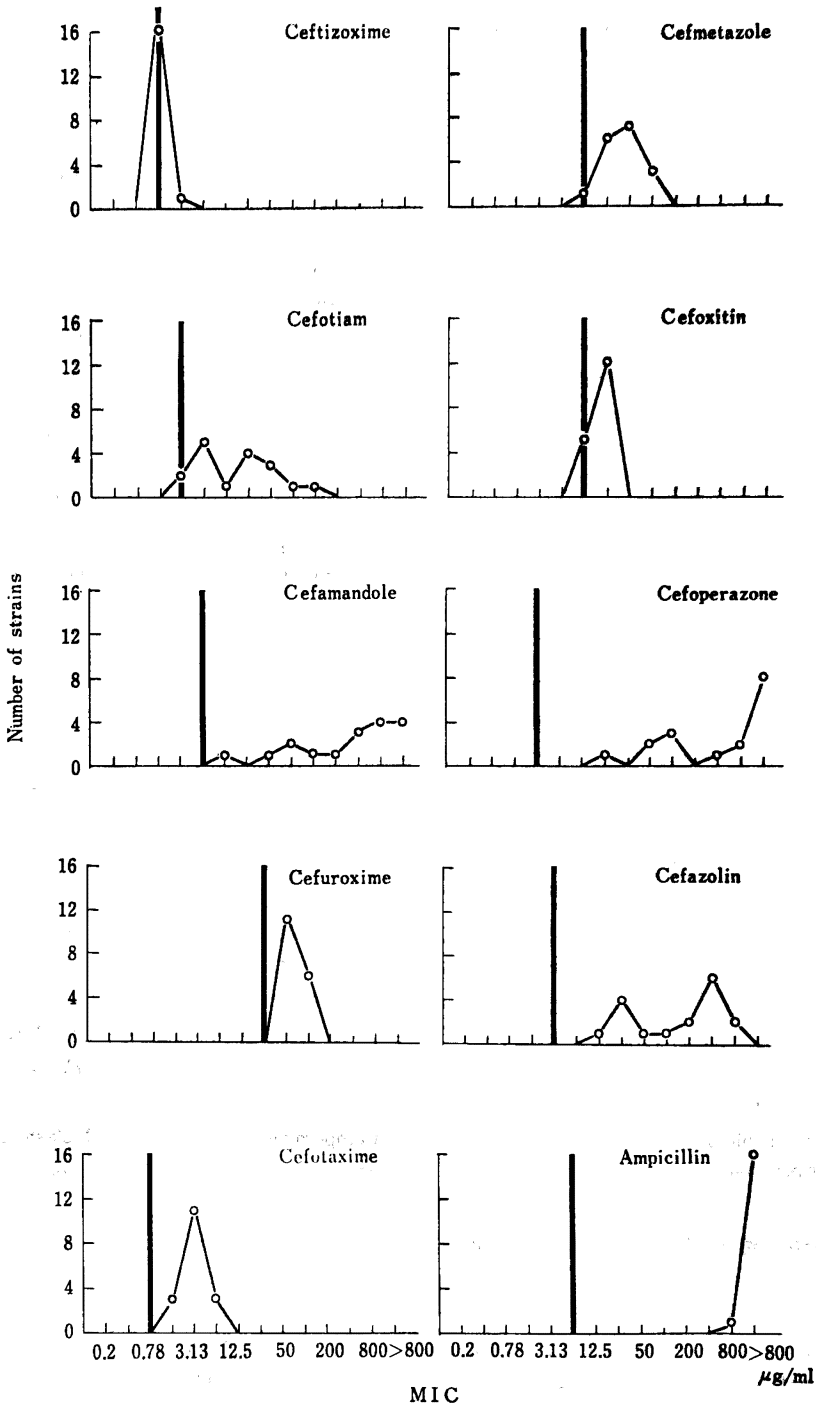


Table 2 Stability of Cefprozime to β -lactamase

Antibiotic ^{a)}	Relative rate of hydrolysis by each class of β -lactamase ^{b)}									
	Ia(1) ^{c)}	Ia(2)	Ib	Ic	Id	II	III	IV	V	<i>S. aureus</i>
Cefprozime	1.3	1.2	3.0	4.6	0.7	0.4	0.07	0.6	0.04	<1.0
Cefotiam	18.5	49.7	53	198	35	1.2	4.2	8.7	1.4	<1.3
Cefamandole	83.7	2.1	22	255	5.7	<0.2	13.7	26.5	2.0	9.3
Cefuroxime	1.0	0.2	0.9	163	1.9	0.6	0.2	1.5	0.05	<0.6
Cefmetazole	<0.1	0.4	<0.3	<1.1	<1.1	<0.3	0.2	<1.0	0.03	<1.6
Cefoxitin	<0.1	2.5	1.5	0.6	<0.4	<0.1	0.03	0.3	0.03	<0.5
Cefoperazone	65.2	3.1	6.3	176	30.7	0.2	12.9	14.8	1.3	6.1
Cefazolin	49.5	114	94	392	164	0.1	4.5	15.2	0.8	3.8
Cephaloridine	100	100	100	100	100	0.4	18.3	32.6	6.7	4.5
Penicillin G	<0.1	16.8	138	54.7	88.8	100	100	100	100	100

a) Substrate concentration: 50 μ g/ml.

b) Relative initial velocity: Cephaloridine=100 for cephalosporinase, Penicillin G=100 for penicillinase.

UV assay, 37°C, 0.067 M potassium phosphate buffer (pH 7.0).

c) Class of β -lactamase

Source

Ia(1)	<i>Serratia marcescens</i> No. 78
Ia(2)	<i>Enterobacter cloacae</i> No. 91
Ib	<i>Escherichia coli</i> No. 35 (C ⁺)
Ic	<i>Proteus vulgaris</i> No. 9
Id	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 11 (C ⁺)
II	<i>Proteus mirabilis</i> No. 133
III	<i>Escherichia coli</i> No. 18 (R ⁺)
IV	<i>Klebsiella pneumoniae</i> No. 134
V	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 47 (R ⁺)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> No. 35

および Cefmetazole の抗菌活性に対する R-plasmid の影響は比較的弱い、R-plasmid の導入によりこれらの薬剤の抗菌力は $\frac{1}{2}$ から $\frac{1}{4}$ 程度に低下した。一方、ABPC 耐性 R-plasmid の伝達をうけた *E. coli* CSH2 に対する CZX の MIC は、plasmid を保有しない株に対する MIC とほとんど変わらなかった。この結果から、CZX の抗菌活性は ABPC 耐性 R-plasmid によって影響されないことが明らかになった。

3. β -Lactamase に対する CZX の安定性 (Table 2)
 β -Lactamase に対する CZX の安定性を 9 種の β -lactam 剤のそれと比較した。グラム陰性菌の臨床分離株から RICHMOND と SYKES の分類²⁾に従って、9 種のタイプの代表的な β -lactamase を調製した。さらに ABPC 耐性 *S. aureus* の β -lactamase も使用した。Class I は cephalosporinase type, class II, III, IV, V および *S. aureus* の酵素は penicillinase type である。Cephalosporinase type については CER の分解速度を penicillinase type については PCG の分解速度をそれぞれ 100 とした相対値で求めた各薬剤の分解速度を Table 2

に示した。CZX はすべての β -lactamase に対して Cefmetazole および Cefoxitin と同様、極めて安定であった。一方、Cefotiam は class I に分類されるすべての cephalosporinase によって明らかに分解され、また R-plasmid 由来酵素を含む 2, 3 の penicillinase にも若干分解された。Cefamandole や Cefoperazone は type I のほとんどの cephalosporinase に相当の分解を受け、前者は class Ia, Ib および Ic に、後者は Ia, Ic, Id によって分解された。また、Cefamandole や Cefoperazone は class III および IV の penicillinase によって CER と同程度に分解された。Cefuroxime では、ほとんどの β -lactamase に対する安定性は CZX と同等であったが、基質の分解について広いスペクトラムを有する class Ic の酵素によって急速に分解された。

CZX は cephalosporin 耐性グラム陰性菌である、*Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* および染色体由来耐性 *E. coli* などから産生される class I 酵素に対して非常に安定であった。また CZX はこれらの菌種に対して極めて強い抗菌

活性を示した。さらに R-plasmid 由来 β -lactamase に対しても CZX は非常に安定であった。この結果は CZX の抗菌作用が ABPC 耐性 R-plasmid の導入により、ほとんど影響をうけないことをよく説明している。

考 察

ABPC 耐性を伝達する R-plasmid は penicillin 類に対する高度耐性をグラム陰性菌に与える。しかしながら、cephalosporin 類に対してはこれらの plasmid の或る種のものがグラム陰性菌に中等度耐性を与えるだけで、cephalosporin 耐性の観点からはこのタイプの R-plasmid は重要視されていなかった。ところが cephalosporin 類に中等度耐性を与える ABPC 耐性 R-plasmid 保有株の臨床における分離頻度が最近、増加の傾向を示し始めた。この現象は ABPC 耐性 R-plasmid が腸内細菌に広範に拡散したことと、plasmid 由来 β -lactamase 産生のレベルが上昇したことによると考えられる。本報では上記の ABPC 耐性 R-plasmid 保有株に対する抗菌活性を、最近開発された一連の cephalosporin 系抗生物質について検討した。Cefoperazone, Cefamandole, Cefotiam の抗菌活性は ABPC 耐性 R-plasmid の導入によって、CER 等の既存の cephalosporin 剤と同程度に低下した。Cefoperazone や Cefamandole の抗菌活性は Cefazolin よりも明らかに大きく低下した。一方、methoxyimino cephalosporin 誘導体の抗菌活性は cephamycin 誘導体と同じく、ABPC 耐性 R-plasmid によってほとんど影響をうけなかった。とくに CZX の抗菌活性は plasmid に全く無関係であることが明らかになった。先に述べた抗生物質のうち、CZX は ABPC 耐性 R-plasmid 保有 *E. coli* に対して最も強い抗菌力を示した。このような ABPC 耐性 R-plasmid に対する CZX の特性は R-plasmid 由来 β -lactamase に対する CZX の顕著な安定性によって説明できる。しかしながら、Cefoxitin においては R-plasmid 由来 β -lactamase に対し極めて安定であるにもかかわらず、R-plasmid 保有株に対する抗菌力は劣っているという不一致が認められた。これは、われわれの成績によれば Cefoxitin の細菌外膜透過能が比較的低いためと考えられる⁹⁾。

Enterobacter spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* および indole 陽性 *Proteus* spp. などの cephalosporin 剤に対する耐性は、主にそれらの株の産生する cephalosporinase によって生ずると考えられている。cephamycin 誘導体はこれらの cephalosporin 耐

性株の β -lactamase に非常に安定であることが示された。しかし、その安定性から予想されるほどの抗菌力は認められなかった。一方、CZX は β -lactamase に対し cephamycin 誘導体と同じく非常に安定であったが、cephalosporin 耐性菌に対する抗菌力は強く、cephamycin 誘導体との間に明らかな差が存在した⁵⁾。これらの菌株に対する CZX と cephamycin 誘導体との抗菌力の相違は外膜透過能および標的酵素に対する活性の比較検討によって明らかにされるものと考えられる。

文 献

- 1) GOTO, S.: Gram-negative bacilli: Its resistance and the microbisme substitut'. Japan. J. Bacteriol. 31: 32, 1976
- 2) DATTA, N. & P. KONTOMICHALOU: Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature 208: 239~241, 1965
- 3) MATSUMOTO, F.; M. OHMORI & K. SHIBA: The drug sensitivities of gram-negative bacilli isolated from urinary tract infections from 1972 with particular reference to cephalosporins and aminoglycosides. Chemotherapy 24: 1431~1435, 1976
- 4) OOKA, T.; H. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI: Comparison of penicillinase produced by R factors isolated from ampicillin-resistant gram-negative bacteria. Japan. J. Microbiol. 14: 123~128, 1970
- 5) 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
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度測定法. Chemotherapy 23:1~2, 1975
- 7) SAMUNI, A.: A direct spectrophotometric assay and determination of MICHAELIS constants for the β -lactamase reaction. Anal. Biochem. 63: 17~26, 1975
- 8) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The β -lactamase of gram-negative bacteria and their possible physiological role. p.31~85. In A. H. ROSE and D. W. TEMPEST (ed.) Advance in microbial physiology. vol. 9. Academic Press Inc., New York
- 9) KOJO, H.; Y. SHIGI & M. NISHIDA: *Enterobacter cloacae* outer membrane permeability to ceftizoxime (FK 749) and five other new cephalosporin derivatives. J. Antibiotics 33(3): 317~321, 1980

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFTIZOXIME (CZX), A NEW
CEPHALOSPORIN AGAINST BACTERIA WHOSE RESISTANCE
IS MEDIATED BY PLASMID OR CHROMOSOMAL GENES AND
STABILITY OF THE ANTIBIOTIC TO β -LACTAMASE

HITOSHI KOJO and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

Antibacterial activity of ceftizoxime against ampicillin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* was compared with those of other newly developed cephalosporins. CZX was the most active against strains possessing R-plasmids specifying ampicillin resistance and those whose resistance was chromosomally determined.

The susceptibility of ampicillin-sensitive *E. coli* to CZX was not decreased by transduction of ampicillin-resistance specifying plasmids. However, most of the transconjugants acquired a high level of resistance to cefoperazone and cefamandole and a moderate level to cefotiam.

CZX was highly stable to both penicillinase and cephalosporinase type β -lactamases including R-plasmid mediated β -lactamase. Its level of resistance to β -lactamases was comparable to cefoxitin, cefmetazole and cefotaxime, slightly superior to cefuroxime and much superior to cefotiam, cefamandole and cefoperazone.