

## Oxacephem 系抗生物質 6059-S のグラム陰性菌由来 $\beta$ -lactamase に対する安定性とその抗菌活性に及ぼす影響

村上和久・吉田 正

塩野義製薬株式会社研究所

Oxacephem 誘導体である 6059-S の各種グラム陰性菌に由来する  $\beta$ -lactamase に対する安定性を、吸光度法と bioassay 法で検討した。6059-S は、試験した 16 種類のすべての酵素で加水分解を受けることなく、染色体および R 因子由来のいずれの  $\beta$ -lactamase に対しても安定であることを明らかにした。

6059-S は、幅広い抗菌スペクトルを持ち、 $\beta$ -lactamase を産生する高度耐性菌に対しても強い抗菌活性を示した。この抗菌活性に対する特徴は、6059-S の  $\beta$ -lactamase 安定性に起因すると考えられた。

6059-S は、cephalosporinase 型の酵素の活性を強く阻害する性質があり、基質と同時に酵素溶液に加えられた場合、拮抗阻害を示した。この阻害形式は、透析によって酵素活性が回復することから可逆的であることが示された。しかし、酵素に 6059-S をあらかじめ作用させておくと、阻害は経時的に進行した。

### 緒 言

近年、 $\beta$ -lactam 薬に対する耐性菌の分離頻度が非常に高まっており、臨床上の重大な問題となっている。細菌の耐性獲得の機構で特に重要と考えられているのは、 $\beta$ -lactamase の産生であり<sup>1)</sup>、臨床分離の  $\beta$ -lactam 薬耐性菌の大部分は、高い比活性で  $\beta$ -lactamase を産生している。

グラム陰性菌の産生する  $\beta$ -lactamase は、非常に多様性に富んだ酵素群であり、その酵素的、物理化学的性質などに基づく分類法が提案されているが<sup>2)</sup>、その基質特異性によって次の 3 種に大きく分類することができる<sup>3)</sup>。i) Cephalosporin 類に対しより活性の高い cephalosporinase。ii) Penicillin 類に対しより活性の高い penicillinase。iii) 両者に対し同程度の活性を持つ酵素。

耐性菌に対する  $\beta$ -lactam 薬の抗菌力を改善するためには、これらの酵素に対する薬物の安定化が非常に重要な点であり、この安定化のためにこれまで種々の努力がなされてきた<sup>4-7)</sup>。本報告では、6059-S, 7 $\beta$ -[2-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)acetamido]-7 $\alpha$ -methoxy-3-[[[1-methyl-1H-tetrazol-5-yl-thio]-methyl]-1-oxa-1-dethia-3-cephem-4-carboxylic acid disodium salt] の  $\beta$ -lactamase に対する安定性、挙動について調べ、それらの抗菌力に対する寄与を検討したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 使用菌株

*E. coli* ML 1410, *E. coli* ML 1410 RGN 238, *K. pneumoniae* GN 69 は、千葉大学薬学部微生物薬品化学教室より分与された。*E. coli* W 3110 RTEM, *E.*

*cloacae* 214, *E. cloacae* 53 は、Eli Lilly 社より分与された。その他は、塩野義製薬研究所に保存されている臨床分離株を用いた。用いた菌株のうち、*E. coli* ML 1410 を受容菌とする R 因子伝達の方法<sup>8)</sup> から R 因子由来  $\beta$ -lactamase 産生菌であることが確認された菌は、*E. coli* W 3110 RTEM, *E. coli* ML 1410 RGN 238, *E. coli* 17, *K. pneumoniae* 30, *E. cloacae* 44, *E. aerogenes* 15, *C. freundii* 31, *S. marcescens* KL-50 であった。他の菌株については、この方法では R 因子を検出できなかった。

#### 2. 試験薬

6059-S (Shionogi, Lot. No. FW 12-73 F), Cefamandole (CMD, Eli Lilly), Cefoxitin (CFX, Merck-Sharp & Dohme), Cefuroxime (CXM, Glaxo), Cephaloridine (CER, Shionogi), Cephalexin (CEX, Shionogi), Cefazolin (CEZ, Fujisawa), Penicillin G (PCG, Nippon Kayaku), Ampicillin (ABPC, Meiji Seika), Sulbenicillin (SBPC, Takeda) を使用した。Nitrocefim (87/312) は、塩野義製薬研究所で合成されたものを用いた。

#### 3. $\beta$ -lactamase 標品の調製

(a) 粗酵素標品の調製：培地には乾燥ブイオン (日本水) を、緩衝液には 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

非誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌 (*E. coli* W 3110 RTEM, *E. coli* ML 1410 RGN 238, *E. coli* 6, *Klebsiella* sp. 363, *K. pneumoniae* GN 69, *E. aeroge-*

nes 10, *E. cloacae* 53, *E. cloacae* 92, *E. cloacae* 214, *S. marcescens* HIG) は, 37°C で 18 時間静置培養後, 4°C, 3,000 × g, 20 分間の遠心分離で集菌し, 緩衝液で一回洗浄後, 酵素活性に応じて適当量の緩衝液 (培養液の 1/4~1/32 量, 部分精製に用いる場合は, 1/150~1/300 量) に懸濁し, 氷冷下 2 分間超音波破碎した (Sonicator-150, 20 Kc., 大岳製作所)。

誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌 (*P. vulgaris* 31, *P. morgani* 8, *P. rettgeri* 5, *P. inconstans* 31, *C. freundii* 27, *P. aeruginosa* 30) は, 37°C 一夜静置培養した菌液を培地で 10 倍に希釈し, 37°C で 2 時間振とう培養した。PCG を *P. aeruginosa* 30 の場合最終濃度で 1,000  $\mu$ g/ml, 他の菌株の場合 100  $\mu$ g/ml 加え, 更に 2 時間振とう培養し, 同様に集菌し, 一回洗浄し, 超音波破碎した。

破碎した菌液を 4°C で 33,000 × g, 30 分間遠心分離し, その上清を無菌ろ過し, 使用するまで -78°C に凍結保存した。

(b) 部分精製標品の調製: *E. coli* W 3110 RTEM および *Klebsiella* sp. 363 の粗酵素標品は, DEAE-Sephadex A-25 カラムを用いて部分精製した。0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.0) に対して透析した粗酵素標品を, 同緩衝液で平衡化したカラムに添加した。同緩衝液 180 ml と 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.2) による濃度勾配で溶出される活性画分を集め, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し, 使用するまで -78°C に凍結保存した。

*E. coli* 6, *E. coli* ML 1410 RGN 238, *P. vulgaris* 31, *E. cloacae* 214, *E. cloacae* 53 の粗酵素標品は, CM-Sephadex C-50 カラムを用いて文献記載の条件で<sup>9)</sup> 部分精製した。0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.6) に対し透析した粗酵素標品を同緩衝液で平衡化したカラムに添加し, 同緩衝液で未吸着画分を洗い出した後, 同緩衝液 180 ml と 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.2) による濃度勾配で吸着画分を溶出し, 活性画分を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し, 使用するまで -78°C に凍結保存した。

#### 4. $\beta$ -lactamase 活性の測定

測定には 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

(a) Bioassay 法: Microtiter 用 U プレート上で酵素溶液を 2 倍系列希釈し, 各管の酵素溶液中に同量の試験薬溶液を最終濃度で 250  $\mu$ g/ml 加えた。37°C で 2 時間反応後, *E. coli* B を検定菌とする agar well 法で残存薬量を測定した。縦軸に残存薬物量を, 横軸に酵素希釈率の対数をプロットした作図から薬剤 50 %を

不活化する酵素量を求め, CER を基準にして各試験薬の相対加水分解速度を求めた。

(b) 吸光度法: Nitrocefin を基質として用いる場合は,  $\beta$ -lactam 環の開裂に伴う 490 nm での吸光度の増加を利用し<sup>10)</sup>, 他の薬物の場合は, 紫外吸収の減少を利用して酵素活性を測定した<sup>11,12)</sup>。吸光度の変化を加水分解基質量に換算する係数は次のようにして求めた。 $\beta$ -lactamase で水解され易い薬物の場合は, 活性の高い酵素標品で完全に水解された薬物と未分解のものとの差スペクトルから  $\Delta$ OD を求め, 係数を算出した。6059-S と CFX は,  $\beta$ -lactamase に安定であるので, 0.02 N NaOH で完全に水解して, 係数を求めた<sup>13)</sup>。

酵素反応は, 30°C の水を循環させた日立ダブルビーム分光光度計 200-20 形のセルホルダー中に置いたキューベット中で行なった。キューベットは, 基質濃度により光路長 1 mm, 3 mm または 10 mm のものを用いた。あらかじめ 30°C に加温しておいた基質溶液に 1/10 量の酵素溶液を加えることにより, 反応を開始した。酵素阻害実験の場合は, 特にことわらない限り, 基質と阻害物質の混合液中にその 1/10 量の酵素溶液を加え, 反応開始後 5 分以内の加水分解速度を測定した。吸光度の変化を日立 200 形卓上記録計で記録し, 加水分解速度を算出した。LINEWEAVER-BURK plot から  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$  および  $K_i$  を算出した。なお, 部分精製標品を用いた場合は, 酵素安定化のため 0.001 % のセラチンを加えた。

#### 5. 6059-S 阻害の時間依存性

6059-S を部分精製した  $\beta$ -lactamase 標品中に加え, 30°C でインキュベートし, 経時的に 2 ml を取り出し, 1.1 mM Nitrocefin の 0.2 ml (最終濃度 100  $\mu$ M) 中に加え, 吸光度法で加水分解速度を測定した。用いた 6059-S の濃度は, Fig. 2 に記したとおりである。対照には, 6059-S の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液を加えた。

#### 6. 6059-S 阻害の透析による回復

$\beta$ -lactamase は部分精製標品を用いた。6059-S の最終濃度は, *E. coli* 6 の酵素の場合は 1  $\mu$ M, *E. cloacae* 214 の酵素の場合は 0.2  $\mu$ M を用いた。酵素と 6059-S の混合溶液を visking tube 中に入れ, 4°C で 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対し透析した。透析外液は, 24 時間毎に 2 回とりかえた。0 時間 (酵素と 6059-S を混合した直後), 24 時間, 48 時間透析後, 透析内液の  $\beta$ -lactamase 活性を CER 100  $\mu$ M を基質にして吸光度法で測定した。対照は, 6059-S の代わりに緩衝液を加える以外は同じ処理をした。

#### 7. 抗菌力の測定

日本化学療法学会標準法<sup>14)</sup>に従って最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

トリプトソイブイオン培地 (栄研) で一夜静置培養した菌液を、同培地で 1,000 倍に希釈した (約  $10^6$  cells/ml)。試験薬の 2 倍希釈濃度系列を含む感受性ディスク用寒天培地上に、菌液を接種装置で一白金耳 (約  $1 \mu\text{l}$ ) 点滴接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 18~20 時間培養後、MIC 値を判定した。

### 成 績

#### 1. $\beta$ -lactamase に対する安定性

Bioassay 法で測定した 6059-S の  $\beta$ -lactamase に

対する安定性を他薬と比較して Table 1 に示した。この方法では、6059-S の不活化は、まったく観察されず、この抗菌薬は、どの種類の  $\beta$ -lactamase に対しても安定であった。一方、CFX も  $\beta$ -lactamase に安定であったが、*E. coli* 6 と *E. cloacae* 92 の cephalosporinase には加水分解を受けた。試験した抗菌薬のうちでは、6059-S のみが、どの  $\beta$ -lactamase に対しても加水分解を受けなかった。

次に、吸光度法で  $V_{\max}$ ,  $K_m$  を測定した (Table 2)。この場合、すべて部分精製標品を使用した。この方

Table 1 Stability of  $\beta$ -lactam antibiotics against  $\beta$ -lactamases

Source of $\beta$ -lactamase	Relative hydrolysis rate <sup>a)</sup>					
	6059-S	CFX	CXM	CMD	CEZ	ABPC
<i>E. coli</i> W3110 RTEM <sup>b)</sup>	<1	<1	3	93	66	200
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238 <sup>b)</sup>	<1	- <sup>c)</sup>	107	-	53	700
<i>E. cloacae</i> 53 <sup>b)</sup>	<1	<1	12	57	81	250
<i>Klebsiella</i> sp. 363	<1	<1	47	100	120	370
<i>K. pneumoniae</i> GN69	<1	<1	<1	23	22	370
<i>P. vulgaris</i> 31	<1	<2	107	66	120	53
<i>P. inconstans</i> 31	<1	<3	<1	<1	100	<1
<i>E. coli</i> 6	<1	6	<1	19	81	5
<i>P.morganii</i> 8	<1	<4	<1	18	170	10
<i>P. rettgeri</i> 5	<1	<1	2	3	81	<1
<i>E. aerogenes</i> 10	<1	<2	<1	3	62	1
<i>S. marcescens</i> HIG	<1	<4	<1	5	210	<2
<i>E. cloacae</i> 92	<1	2	<1	8	62	<3
<i>C. freundii</i> 27	<1	<3	<1	<3	120	<3
<i>P. aeruginosa</i> 30	<1	<1	<1	4	120	8

a) Hydrolysis rate was determined by bioassay and values were expressed as relative to an arbitrary value of 100 for CER.

b) Partially purified enzyme preparation was used.

c) Not determined

Table 2 Stability and affinity to  $\beta$ -lactamases

Source of $\beta$ -lactamase <sup>a)</sup>	Class <sup>b)</sup>	6059-S		CFX		CER		CEZ		PCG		ABPC	
		$V_{\max}$	Ki ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ <sup>c)</sup>	Km ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$	Km ( $\mu\text{M}$ )						
<i>E. coli</i> 6	Ib	<0.04	0.36	0.21	2.6	100	750	130	1,400	33	20	1.7	8.2
<i>E. cloacae</i>	Ia	<0.01	0.062	0.02	0.38	100	670	170	2,100	0.99	2.0	<0.1	-
<i>P. vulgaris</i>	Ic	<0.05	39	<0.05	-	100	170	440	240	9.1	11	11	7.1
<i>E. coli</i> W3110 RTEM	IIIa	<0.05	810	<0.05	-	100	790	14	500	73	22	160	72
<i>Klebsiella</i> sp. 363	IV	<0.03	>1,000	<0.03	-	100	180	60	29	160	70	180	130
<i>E. cloacae</i> 53	IVa	<0.04	150	<0.04	-	100	190	12	9.8	99	20	94	48

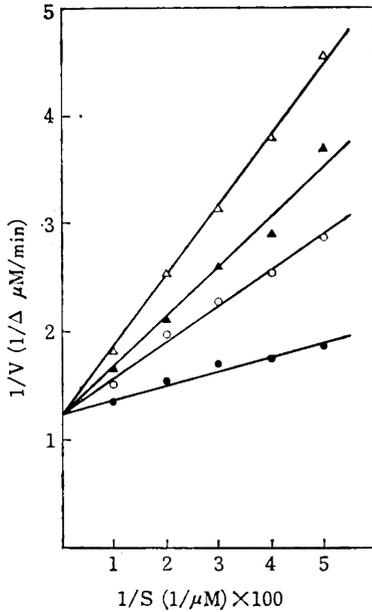
a) Enzyme preparations used were partially purified.

b) RICHMOND's class

c) Hydrolysis rates were determined by spectrophotometric assay at  $30^\circ\text{C}$  and values of  $V_{\max}$  are relative to an arbitrary value of 100 for CER.

Fig. 1 LINEWEAVER-BURK plots of the  $\beta$ -lactamase hydrolysis of CEX in the presence of 6059-S

Partially purified enzyme preparation of *E. coli* 6 was used. The concentration of 6059-S : 0.9  $\mu$ M ( $\Delta$ ), 0.6  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), 0.3  $\mu$ M ( $\circ$ ), 0 ( $\bullet$ )



法でも 6059-S の加水分解は、どの酵素に対してもまったく観察されなかった。一方、CFX は、*E. coli* 6 と *E. cloacae* 214 の cephalosporinase で加水分解され、Table 1 の結果とはほぼ一致していた。

## 2. $\beta$ -lactamase に対する阻害作用

Fig. 1 にその一例を示したように、6059-S は、基質と同時に酵素溶液に加えられた場合、酵素活性を拮抗的に阻害した。この阻害作用から  $K_i$  を求め Table 2 に示した。6059-S は、penicillinase に対しては大きな  $K_i$  値を示し、親和性の低いことがわかった。また、*Klebsiella* sp. 363 の酵素は、ほとんど阻害されなかった。一方、*E. coli* 6、*E. cloacae* 214 の cephalosporinase には他剤の  $K_m$  値と比較して非常に小さな値を示し、6059-S は、これらの酵素には強い親和性を持っていた。

6059-S と部分精製した 5 種類の  $\beta$ -lactamase とを 30°C であらかじめインキュベートする時、その時間を変えて酵素活性に及ぼす影響を調べた (Fig. 2)。どの  $\beta$ -lactamase の場合にも時間と共に阻害が進行したが、特に、*E. coli* 6、*E. cloacae* 214、*P. vulgaris* 31 の

Fig. 2 Time dependence of  $\beta$ -lactamase inhibition by 6059-S

Enzyme and substrate concentration : *E. cloacae* 53-150  $\mu$ M ( $\bullet$ ), *E. coli* W 3110 RTEM-500  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), *E. cloacae* 214-0.022  $\mu$ M ( $\circ$ ), *E. coli* 6-0.11  $\mu$ M ( $\blacksquare$ ), *P. vulgaris* 31-20  $\mu$ M ( $\Delta$ )

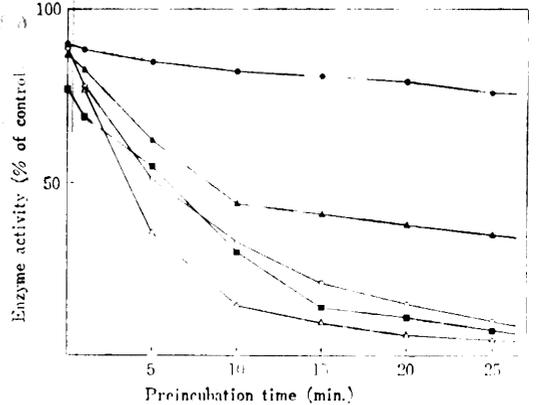


Table 3 Recovery of 6059-S inhibition by dialysis

Dialysis time (hours)	Enzyme activity (% of control)	
	<i>E. coli</i> 6	<i>E. cloacae</i> 214
0	2	4
24	22	38
48	56	69

cephalosporinase においてその程度が大きかった。*E. cloacae* 53 の  $\beta$ -lactamase では、阻害の進行がわずかに見られたにすぎなかった。

*E. coli* 6 と *E. cloacae* 214 の部分精製標品を用いて、6059-S による酵素活性阻害の透析による回復を調べた (Table 3)。48 時間の透析で、*E. coli* 6 の酵素で 56% が回復し、6059-S による阻害は可逆的であった。

## 3. $\beta$ -lactamase 産生菌に対する MIC

Table 4 に、 $\beta$ -lactamase を産生する高度耐性菌に対する 6059-S の MIC を他薬と比較して示した。*Klebsiella* sp. 363 と *E. cloacae* 53 を除く他の penicillinase 産生菌にはすべて R 因子があることが確認されているが、これらの菌も含めた多くの菌に対して、市販の  $\beta$ -lactamase (CEZ, CER, SBPC, ABPC) は無効であった。わずかに SBPC がいくつかの cephalosporinase 産生菌に対し有効であるにすぎなかった。

Table 4 Agar dilution MIC against gram-negative bacteria

Test organisms	MIC <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	6059-S	CFX	CEZ	CER	SBPC	ABPC
<b>CSase<sup>b)</sup></b>						
<i>E. coli</i> 6	0.78	50	25	25	100	400
<i>P. vulgaris</i> 31	0.20	3.13	800	1,600	12.5	800
<i>P. morgani</i> 7	0.20	6.25	400	400	100	400
<i>P. morgani</i> 8	0.20	12.5	400	800	25	200
<i>P. rettgeri</i> 5	0.10	100	1,600	800	3.13	200
<i>P. inconstans</i> 31	0.10	3.13	25	200	1.56	25
<i>E. cloacae</i> 214	25	800	>3,200	3,200	800	3,200
<i>E. cloacae</i> 92	12.5	800	1,600	800	400	1,600
<i>E. aerogenes</i> 10	6.25	200	1,600	800	400	1,600
<i>C. freundii</i> 27	0.20	400	400	200	12.5	200
<i>S. marcescens</i> HIG	0.20	6.25	800	400	6.25	25
<b>PCase<sup>b)</sup></b>						
<i>E. coli</i> 17 <sup>c)</sup>	0.39	6.25	25	200	>3,200	>3,200
<i>E. coli</i> W3110 RTEM <sup>c)</sup>	0.78	6.25	6.25	25	>3,200	>3,200
<i>K. pneumoniae</i> 30 <sup>c)</sup>	0.39	6.25	100	200	>3,200	>3,200
<i>Klebsiella</i> sp. 363	0.10	3.13	1,600	400	>3,200	>3,200
<i>E. cloacae</i> 53	0.39	12.5	1,600	1,600	>3,200	3,200
<i>E. cloacae</i> 44 <sup>c)</sup>	0.20	200	800	800	>3,200	3,200
<i>E. aerogenes</i> 15 <sup>c)</sup>	3.13	800	400	400	>3,200	1,600
<i>C. freundii</i> 31 <sup>c)</sup>	0.10	200	50	200	>3,200	>3,200
<i>S. marcescens</i> KL-50 <sup>c)</sup>	1.56	6.25	1,600	400	>3,200	1,600

a) Inoculum size was one loopful of  $10^6$  cells/ml.

b) CSase : Predominantly active against cephalosporins

PCase : Predominantly active against penicillins

c)  $\beta$ -Lactamase produced was mediated by R-plasmid.

一方、6059-S は、これらの菌の大部分に対し強い抗菌力を示した。しかし、cephalosporinase を産生する *E. cloacae* 214 および 92 に対しては、比較的高い MIC 値を示した。CFX については、cephalosporinase 産生菌にも、また penicillinase 産生菌にも高い MIC 値を示す菌があった。

### 考 察

Oxacephem 誘導体は、同じ側鎖を持つ cephalosporin 剤に比べ、一般に  $\beta$ -lactam 環の反応性が高いため  $\beta$ -lactamase に不安定であるが、一方、この高い反応性には、標的酵素に対する阻害活性を高める利点があると考えられている<sup>15)</sup>。6059-S は、Oxacephem 誘導体の共通の弱点である  $\beta$ -lactamase に対する不安定性を、二つの置換基、すなわち、7 $\alpha$ -methoxy 基と  $\alpha$ -carboxyl 基を導入することによって解決した  $\beta$ -

lactam 薬である<sup>15,16)</sup>。7 $\alpha$ -methoxy 基は、penicillinase および *P. vulgaris* の cephalosporinase に対して薬物を完全に (水解が検出できない程度) 安定化させる役割を果たしている。しかし、側鎖に  $\alpha$ -carboxyl 基を持たない場合には、他の cephalosporinase に対してもある程度安定化はするが、その効果は不完全で、吸光度法のような感度の高い方法を用いれば加水分解が観察される。 $\alpha$ -carboxyl 基は、逆に、7 $\alpha$ -methoxy 基で、完全には安定化できなかった cephalosporinase に対し薬物を完全に安定化するが、7 $\alpha$ -methoxy 基のない場合は、penicillinase と *P. vulgaris* の酵素に対しては感受性を示した<sup>15)</sup>。Bioassay 法と吸光度法という原理の異なる 2 つの酵素活性測定法で各種の菌種特異的、あるいは、R 因子由来  $\beta$ -lactamase による 6059-S の加水分解を測定したが、いずれの方法でも、どの酵素においても加水分解は観察されず、6059-S は  $\beta$ -

lactamase に非常に安定であった (Table 1, 2)。嫌気性菌の *B. fragilis* の  $\beta$ -lactamase も含め<sup>16)</sup>、これまでに 6059-S を加水分解する  $\beta$ -lactamase は見いだされていない。

RICHMOND らの説によれば、グラム陰性菌の  $\beta$ -lactamase 薬耐性には  $\beta$ -lactamase による加水分解と外膜透過障害とが相乗的に働いており、たとえ加水分解速度が小さくても外膜透過性が低い場合には、 $\beta$ -lactamase による加水分解のため耐性となることが考えられる<sup>17)</sup>。したがって、 $\beta$ -lactamase の影響を受けないためには、それらによって薬物がまったく水解されないことが望ましい。6059-S はこの条件をほぼ満足しており、 $\beta$ -lactamase 産生菌に対する高い抗菌力には、主にこの  $\beta$ -lactamase 安定性が寄与していると考えられる。ただし、*E. cloacae* 214 や *E. cloacae* 92 に対しては、これらの酵素によって水解されないにもかかわらず、比較的大きな MIC 値を示した。これらの場合には、外膜透過障害など他の要因が関係していることが考えられる。CFX も  $\beta$ -lactamase には比較的安定であったが、6059-S の  $\alpha$ -carboxyl 基に相当する置換基を持っていないため、上述したように、*P. vulgaris* 以外の cephalosporinase で、速度は小さくても加水分解されると考えられる。実際、CFX は、Table 1 や 2 に示されているように、水解速度は小さいが、*E. coli* 6, *E. cloacae* 92, *E. cloacae* 214 の cephalosporinase によって加水分解された。したがって、cephalosporinase 産生菌に CFX 耐性菌が多いという事実は、上述の  $\beta$ -lactamase と外膜透過障害との相乗効果のために加水分解速度が小さくても抗菌力が弱くなる場合があるという考えと一致している。CFX は penicillinase には完全に安定であると考えられるが、penicillinase 産生の 3 株は CFX に耐性であった (Table 4)。これら 3 株は、R 因子由来の penicillinase を産生することが確認されているが、染色体由来の cephalosporinase も少量産生し、これが外膜透過障害とあいまって CFX 耐性の原因となっていると考えられる。

6059-S は、 $\beta$ -lactamase を拮抗的に阻害するが (Fig. 1)、特に、cephalosporinase に対して強い親和性を示し、これらの酵素を強く阻害することが  $K_i$  値の小さいことから明らかである。この強い親和性は、これらの酵素に対し、薬剤を安定化させている  $\alpha$ -carboxyl 基を介して起こると考えられている<sup>15)</sup>。この阻害は、透析により回復するので、clavulanic acid の場合と異なり<sup>18)</sup>、可逆的な結合と考えられる。6059-S による阻害は、時間と共に進行した (Fig. 2)。この現象は、cloxacillin あるいは clavulanic acid による阻害でも観察されて

おり、 $\beta$ -lactamase 阻害においては、かなり一般的な現象のようである。

これを要するに、6059-S は、各種の  $\beta$ -lactamase に対して非常に安定な抗菌薬であり、この安定性が 6059-S のグラム陰性菌に対する広範囲の抗菌スペクトルと  $\beta$ -lactamase 産生菌に対する強い抗菌力に寄与していると考えられた。

## 謝 辞

本実験に多大のご協力をいただいた弊社研究所 土肥正喜氏に深甚の謝意を表する。

## 文 献

- 1) NEU, H. C.: The role of  $\beta$ -lactamases in the resistance of Gram-negative bacteria to penicillin and cephalosporin derivatives. *Infect. Dis. Rev.* 3: 133~149, 1973
- 2) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microbiol. Physiol.* 9: 31~88, 1973
- 3) SYKES, R. B. & M. MATTHEW: The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 115~157, 1976
- 4) NAGARAJAN, R.; L. D. BOECK, M. GORMAN, R. L. HAMILL, C. E. HIGGINS, M. M. HOEHN, W. M. STARK & J. G. WHITNEY:  $\beta$ -lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2308~2310, 1971
- 5) STAPLEY, E. O.; M. JACKSON, S. HERNANDEZ, S. B. ZIMMERMAN, S. A. CURRIE, S. MOCHALES, J. M. MATA, H. B. WOODRUFF & D. HENDLIN: Cephamicins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics: I. Production by *Actinomycetes*, including *Streptomyces lactamdurans* sp. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 2: 122~131, 1972
- 6) O' CALLAGHAN, C. H.; R. B. SYKES, D. M. RYAN, R. D. FOORD & P. W. MUGGLETON: Cefuroxime—a new cephalosporin antibiotic. *J. Antibiot.* 29: 29~37, 1976
- 7) FU, K. P. & H. C. NEU: Beta-lactamase stability of HR 756, a novel cephalosporin, compared to that of cefuroxime and cefoxitin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 14: 322~326, 1978
- 8) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司, 村上和久: Cefaclor の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 27(S-7): 71~97, 1979
- 9) HENNESSY, T. D. & M. H. RICHMOND: The purification and some properties of a  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase) synthesized by *Enterobacter cloacae*. *Biochem. J.* 109: 469~473, 1968
- 10) O' CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY & A. H. SHINGLER: Novel method for detection of  $\beta$ -

- lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1 : 283~288, 1972
- 11) O' CALLAGHAN, C. H. ; P. W. MUGGLETON & G. W. ROSS : Effects of  $\beta$ -lactamase from Gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 57~63, 1969
- 12) JANSSON, J. A. T. : A direct spectrophotometric assay for penicillin  $\beta$ -lactamase (penicillinase). *Biochim. Biophys. Acta* 99 : 171~172, 1965
- 13) YOSHIDA, T., S. MATSUURA, M. MAYAMA, Y. KAMEDA & S. KUWAHARA : Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa- $\beta$ -lactam with an expanded antibacterial spectrum : Laboratory evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17 : 302~312, 1980
- 14) MIC 測定法改訂委員会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 22 : 1126~1128, 1974
- 15) YOSHIDA, T. : Structural requirements for antibacterial activity and  $\beta$ -lactamase stability of 7 $\beta$ -arylmethyl-amino-7 $\alpha$ -methoxy-1-oxacephem. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 289 : 231~237, 1980
- 16) 真山三賀雄, 永田 弘, 大瀬満寿代 : 6059-S の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 28 (S-7) : 139~162, 1980
- 17) RICHMOND, M. H. & N. A. C. CURTIS : The interplay of  $\beta$ -lactamases and intrinsic factors in the resistance of Gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235 : 553~566, 1974
- 18) FISHER, J.; R. L. CHARNAS & J. R. KOWLES : Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry* 17 : 2180~2184, 1978

## THE STABILITY OF 6059-S, 1-OXACEPHEM ANTIBIOTIC, AGAINST $\beta$ -LACTAMASES PRODUCED BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND ITS RELATION TO THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY

KAZUHISA MURAKAMI and TADASHI YOSHIDA  
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

The stability of 6059-S against  $\beta$ -lactamases produced by gram-negative bacteria was examined by both spectrophotometric assay and bioassay. 6059-S was not hydrolysed by 16 different  $\beta$ -lactamases employed in this study and found to be completely stable to either chromosomal and R-plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases.

6059-S is highly active against gram-negative organisms resistant to other  $\beta$ -lactam antibiotics and possesses extremely broad antibacterial spectra. It was considered that the advantageous properties in the antibacterial activity of 6059-S resulted from its highly stable nature against  $\beta$ -lactamases.

6059-S competitively inhibited activities of cephalosporinase type enzymes when it was added to the enzyme solution together with substrate. Furthermore, the inhibition appeared to be reversible by the observation that the enzyme activity was restored by dialysis. The inhibition, however, was revealed to be progressive with time.