

## 6059-S の各種 $\beta$ -lactamase に対する安定性と Penicillin 結合蛋白に対する親和性

横田 健・関口玲子・東 映子

順天堂大学医学部細菌学教室

6059-S の Penicillin 結合蛋白 (PBP)——ムレイン架橋酵素群——に対する結合親和性および各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性と親和性を、他の  $\beta$ -lactam 薬剤と比較した。

6059-S は cephalosporinase-type (Ia および Ic 型) でも、penicillinase-type (II, III, IV および V 型)  $\beta$ -lactamase でも全く加水分解されない。また、その作用点である PBP では、*E. coli* の Ia, Ib, III, IV, V および VI 画分に結合するが、Ia と III に対する親和性が高く、他の 7 $\alpha$ -methoxy 誘導体より、Ib に対してもよく結合するので、強い殺菌作用が期待される。

6059-S は  $\beta$ -lactamase には安定であるが、それに対する  $K_i$  値が低い (親和性が高い)。その結果、III 型  $\beta$ -lactamase 産生を支配する R plasmid を大腸菌標準株に伝達すると、MIC 値が若干高くなるが、本来の抗菌力が強いので、実用上は支障がない。また、6059-S は接種菌量増加による MIC 上昇は比較的少ない。

### はじめに

6059-S は Cephalosporin 母核の S が O に変わり、7 $\alpha$  位に methoxy 基を持つまったく新しい薬剤で、塩野義製薬株式会社で開発された。本剤は各種細菌、特にグラム陰性桿菌にきわめてすぐれた抗菌力を示すだけでなく、現用の Penicillin (PC), Cephalosporin (CEP) 誘導体に対する耐性株、すなわち  $\beta$ -lactamase 産生菌にも感受性菌株と同じように強く働くことが明らかにされている。そこで、この薬剤の各種の  $\beta$ -lactamase に対する安定性と結合親和性、 $\beta$ -lactam 薬剤の作用点である Penicillin 結合蛋白 (PBP) に対する結合親和性を検討して、この新薬剤が  $\beta$ -lactamase 産生菌等に対する強い抗菌力を示す理由を明らかにしようとした。言うまでもなく Penicillin 結合蛋白は murein transpeptidases と考えられており、そのどの画分に強く結合するかにより、薬剤の殺菌力などの評価がある程度なうことが知られつつある<sup>1)</sup>。

### 材料および方法

標準  $\beta$ -lactamase 産生菌は千葉大学山岸教授より分与された *Enterobacter cloacae* Nek 39 (cephalosporinase: RICHMOND Ia 型<sup>2)</sup> 産生菌), *Proteus vulgaris* GN 76 (CEPase: Ic 型産生菌), *P. mirabilis* GN 79 (penicillinase: II b 型産生菌), *E. coli* CSH 2 (RK1) (PCase: III=TEM 型産生菌), *Klebsiella* sp. GN 69 (PCase: IV b 型産生菌) および *E. coli* ML 1410 (RGN 238) (PCase: Va 型産生菌) を使用した。Penicillin 結合蛋白は *E. coli* NIHJ JC-2 から調製した。53 種の R (*bla*) plasmid を持った *E. coli* CSH 2 の垂株は当教室山本が Ampicillin (ABPC) 耐性 *E. coli*

および *Klebsiella* 臨床分離株から接合により標準株に伝達したものである<sup>3)</sup>。また、18 株の Cefoxitin (CFX) 耐性 *E. cloacae* は順天堂大学中央臨床検査部小酒井教授および小栗氏から分与された。

使用した薬剤は、6059-S の他、Cephamycin 型の Cefmetazole (CMZ) と CFX, 7-Z (2)-methoxyimino cephalosporin 誘導体である Cefotaxime (CTX) と Ceftizoxime (CZX) および現用の対照薬剤として Cephalexin (CER), Cefazolin (CEZ) および ABPC である。

### 1. 各種薬剤の Penicillin 結合蛋白 (PBP) に対する結合親和性の検討法

200 ml L ブイヨン 37°C 培養から得た対数増殖後期の *E. coli* NIHJ JC-2 の菌細胞を 8 ml の 10 mM MgCl<sub>2</sub> 加 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7) に浮遊し、氷冷下で 10 Kc 30 秒音波処理を 10 回行ない細胞を破壊した。その 3,000 g 10 分遠心清から 100,000 g 30 分の超遠心を行ない膜画分を得た。同緩衝液で一回洗浄後少量の同緩衝液に再浮遊し、Lowry<sup>4)</sup> 法で蛋白量が 20 mg/ml になるように調整した。

PBP の検討は SPRATT<sup>5)</sup> の方法に準じて行なった。すなわち 30  $\mu$ l の膜画分に 3  $\mu$ l の水または 11, 55 および 275  $\mu$ g/ml の薬剤水溶液を加え 30°C 10 分保温した。これに 3  $\mu$ l の <sup>14</sup>C-PCG 液 (50  $\mu$ Ci/ $\mu$ mole/ml: The Radiochemical Center, Amersham) を加えさらに 30°C 10 分保温した。反応は氷冷と、3  $\mu$ l の 20% (w/v) sarcosyl と 60 mg/ml PCG の等量混合液の添加で停止した。その後室温に 20 分放置し、細胞質膜を

溶かした後 10,000 g 30 分遠心で外膜成分を除いた。その上清 30  $\mu$ l と 15  $\mu$ l の SDS 緩衝液 (0.2 M Tris 塩酸緩衝液: pH 6.8, 3% SDS, 30% glycerol と 0.002 % bromophenol blue で構成される) および 5  $\mu$ l の  $\beta$ -mercaptoethanol を混合し沸騰水中で 2 分間加熱し蛋白を遊離させた。その全量を 10% polyacrylamid 平板 gel にのせ、120 V で定電圧電気泳動を行なった。7% 酢酸, 50% methanol 液で蛋白を固定した後, gel をよく洗い余分な  $^{14}$ C-PCG を除いた。これに 2, 5-diphenyloxazole をしみ込ませた後乾燥し, Kodak "X-Omat" レントゲンフィルムに密着し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で 120 日間感光させて fluorography<sup>6)</sup> を行なった。

2.  $\beta$ -lactamase の測定法

標準  $\beta$ -lactamase 産生株を 5 ml の L ブイオンに接種し  $37^{\circ}\text{C}$  一液振盪培養した。その全量を 200 ml の新鮮 L ブイオンに植え,  $37^{\circ}\text{C}$  で 3~4 時間さらに振盪培養を続けた。対数増殖期後半の菌細胞を遠心集菌し, 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7) で一回洗浄後, 同緩衝液 6 ml に再浮遊して, 氷冷下で 10 Kc の音波処理を 30 秒 4 回行ない菌細胞抽出液を得た。これを 7,000 g および 105,000 g 60 分で 2 回遠心し, 完全透明となった上清を  $\beta$ -lactamase の粗酵素液として使用した。

6059-S その他薬剤の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性は macroiodometry<sup>6)</sup> によって測定し,  $V_{max}$  の比較値で表わした。この場合の基質 (薬剤) 濃度は 5 mM である。

各薬剤の各種  $\beta$ -lactamase に対する結合親和性は, ABPC, CER, CEZ 等加水分解をうけるものは acidimetry (indicator method)<sup>7)</sup> で測定した  $K_m$  値で, 6059-S その他水解されない薬剤のそれは同法により,

PCase では ABPC を, CEPase では CER を基質としたときの  $K_i$  値で示した。なお,  $K_m$  および  $K_i$  値はそれぞれ LINEWEAVER-BRUK プロットおよび DIXON プロットから求めた。

3. R (bla) plasmid 伝達による各種薬剤に対する感受性変化の検討法

異なる 51 の R (bla: TEM) および 2 つの R (bla: Va) を伝達した *E. coli* CSH 2 の亜株の 6059-S およびその他新薬剤に対する感受性分布を R<sup>-</sup> の親株のそれと比較した。MIC 測定は日本化学療法学会標準法に従い, 接種菌量は  $10^8$  cells/ml とした。

4. CFX 耐性 *E. cloacae* 臨床分離株の 6059-S その他に対する感受性の検討法

CFX 25  $\mu$ g/ml 以上耐性の *E. cloacae* 18 株につき 6059-S その他新薬剤に対する感受性分布を日本化学療法学会標準法で調べた。なお, CFX 高度耐性株と中等度耐性株を選び, その菌体抽出液を大量に使って, 6059-S や CFX が加水分解をうけるかどうか調べた。

5. 6059-S の  $\beta$ -lactamase 不活化作用の検討法

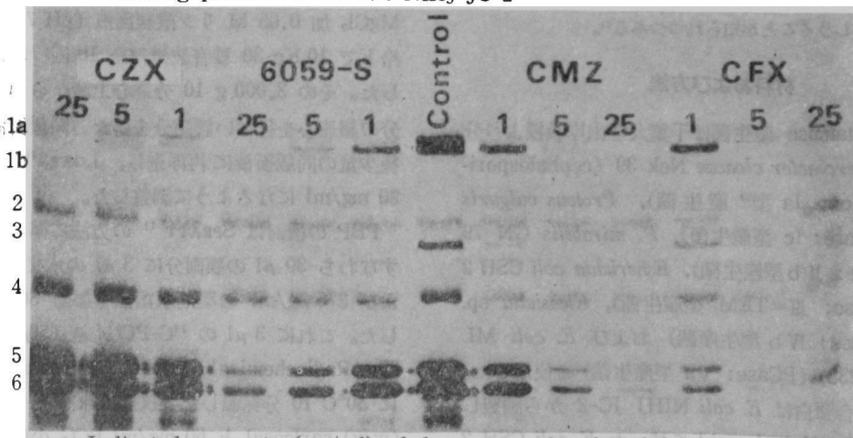
母核の clavulanic acid<sup>8)</sup> との類似性から, 6059-S が  $\beta$ -lactamase を不活化し, ABPC などと協力作用を示すかどうか, 両薬剤の濃度を種々に変えた薬剤含有 L ブイオンを使い, その協力作用の有無を検討した。

成 績

1. 6059-S の *E. coli* PBP に対する結合親和性

Fig. 1 に示すように 6059-S は *E. coli* PBP の 1a のところにもっとも高い親和性を示し, ついで 1b によく結合し, 2 と 5, 6 の親和性がそれにつぐ。詳しく調べると 6059-S は CMZ, CFX より 1b に対する親和性は

Fig. 1 Competition of 6059-S and other new cephalosporins for penicillin-binding proteins of *E. coli* NIHJ JC 2



Indicated amounts ( $\mu$ g/ml) of drugs were incubated for 10 min. at  $30^{\circ}\text{C}$  prior to the addition of  $^{14}$ C-PCG.

強く、4, 5 および 6 に対する親和性は弱いことがわかる。CZX よりも 1b に対する親和性は弱い、Ceph-mycin 系の他薬剤よりそれが強いので、6059-S はかなり殺菌性のすぐれた薬剤であることが想像された。

2. 6059-S の各種  $\beta$ -lactamase に対する安定性と結合親和性

Fig. 2 に示すように 6059-S は CEPase 型  $\beta$ -lactamase すなわち RICHMOND 分類による Ia, Ic 型にはまったく分解されない。また、PCase 型  $\beta$ -lactamase すなわち RICHMOND 分類 II, III (TEM), IV および V (oxacillin 水解酵素) 型にもきわめて安定で加水分解をうけない (Fig. 3)。CMZ, CFX もいずれの型の  $\beta$ -lactamase によっても分解されない、母核が CEP であっても 6059-S のように 1 位が O に変わっていても、7 $\alpha$  位に methoxy 基をもてば  $\beta$ -lactamase に対して高度に安定化することがうかがわれた。新薬剤に属する 7-Z (2) methoxyimino 誘導体も各種  $\beta$ -lactamase に安定であるが、それは oxacillin 水解酵素 (V 型) で若干加水分解をうけるので、 $\beta$ -lactamase に対する安定性の面からだけ考えれば 7 $\alpha$ -methoxy 誘導体のほうがすぐれたものと言える。

*E. coli* CSH 2 に R (*bla*) plasmid を伝達したときの感受性変化をみると、6059-S では R<sup>-</sup> 親株にくらべてピーク値が約 10 倍に上昇する。しかし、この薬剤はグラム陰性桿菌に対し強い抗菌力を示すので、R plasmid 伝達によるこの程度の耐性上昇はいまのところ実

用的にまったく問題はない (Fig. 4)。

CFX 耐性 *E. cloacae* に対する感受性分布も Fig. 5 に示すように CFX, CMZ よりはるかにまさり、大多数の株が 25  $\mu$ g/ml 以下の 6059-S で増殖が阻止された。

これらの株の中から CFX 3,200  $\mu$ g/ml の高度耐性

Fig. 3 Stabilities of 6059-S and other new cephalosporins against various penicillinase-type  $\beta$ -lactamases

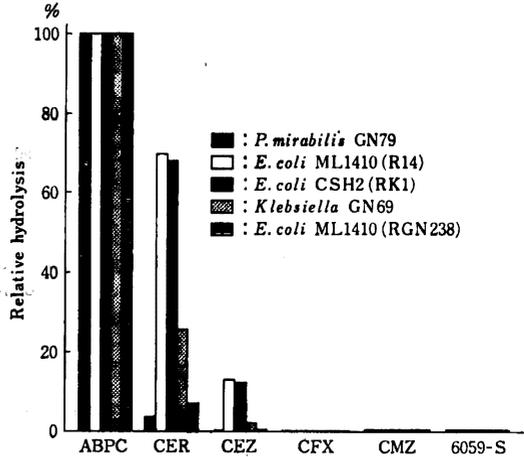


Fig. 4 Shift of sensitivity distributions of 53 subclones of *E. coli* CSH 2 carrying various R (*bla*) plasmids to 6059-S and other newly developed cephalosporins

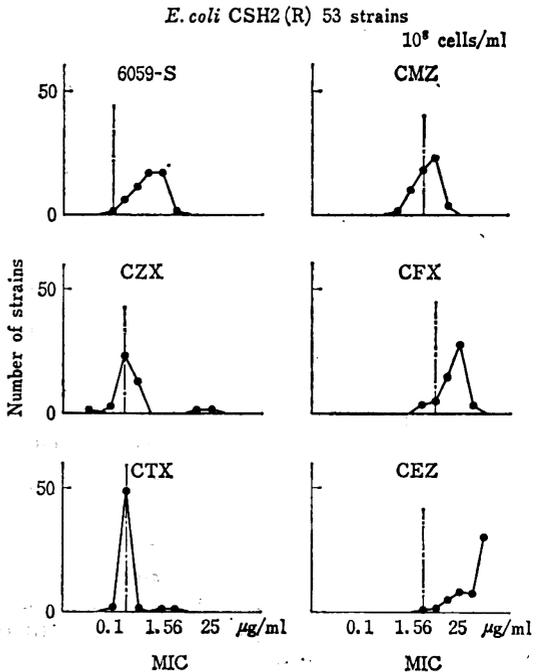


Fig. 2 Stabilities of 6059-S and new other cephalosporins against cephalosporinase-type  $\beta$ -lactamases (Ia and Ic)

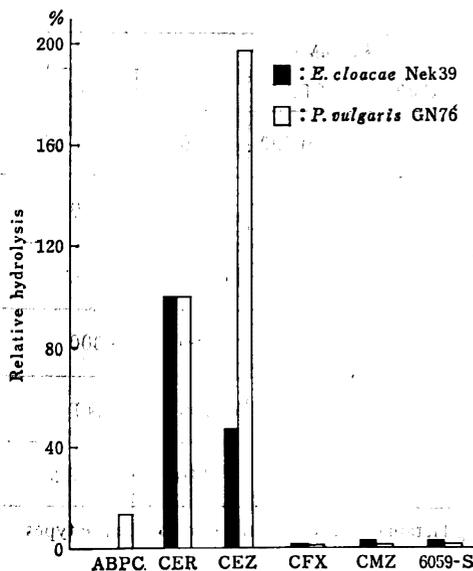
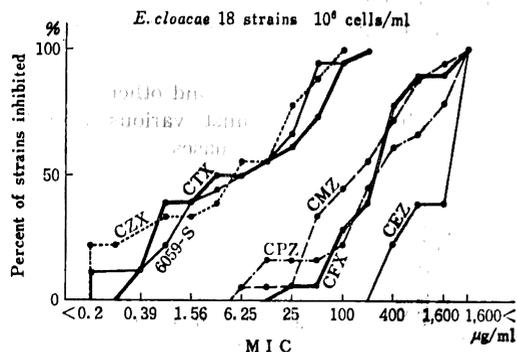


Fig. 5 Cumulative sensitivities of 18 clinical isolates of *E. cloacae* resistant to CFX against 6059-S and other newly developed cephalosporins



株と 400  $\mu\text{g/ml}$  の中等度耐性株を選び、その菌体抽出液を多量に使って CFX, 6059-S が加水分解されるのをみたのが Table 1 である。CEPase に比較的安定な Cephalexin (CEX) が十分加水分解されるような条件下 (この場合 CER は CEX の 10 倍の早さで水解される) でも、どちらの菌株の抽出液も 6059-S, CFX はほとんど破壊しなかった。

6059-S は母核構造が clavulanic acid に似ているが、III型  $\beta$ -lactamase 産生菌および I型  $\beta$ -lactamase 産生菌に対し ABPC および CEZ と特に協力作用を示さず、 $\beta$ -lactamase に対する不可逆的不活化作用はないものと思われる。

Table 2 に 6059-S その他新しい CEP 誘導体の  $K_i$  値を比較した。CEPase, Ia 型に対する  $K_i$  値はすべ

Table 1 Stabilities of 6059-S and CFX against a large amount of  $\beta$ -lactamase prepared from *E. cloacae* moderately and highly resistant to CFX

Strain of enzyme source		Induction	Relative $V_{max}$			
#	MIC of CFX		CEX	CER	CFX	6059-S
NS3	3,200*	-	100	1,035	2.46	0.41
		+	100	1,030	0.72	0.41
NS1	400	+	100	1,035	0.94	0.47

\* Expressed as  $\mu\text{g/ml}$

Table 2 Affinities of 6059-S and other newly developed cephalosporins to various types of  $\beta$ -lactamases

Enzyme		Specific activity	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )					
Type	Source		$K_m^*$	6059-S	CMZ	CFX	CZX	CTX
Ia	<i>E. cloacae</i> Nek 39	21.4	323	0.0036	0.004	0.002	0.26	0.012
Ic	<i>P. vulgaris</i> GN 76	4.1	111	65.7	12.0	5.4	3,330	1,860
IIb	<i>P. mirabilis</i> GN 79	158.1	148	503	2,960	6,230	11,200	N.D.
III	<i>E. coli</i> CSH 2 (RK 1)	1,200	54.0	158	960	3,160	15,500	23,300
IVb	<i>Klebsiella</i> GN 69	84.7	61	36.3	1,200	5,100	10,100	N.D.
Va	<i>E. coli</i> ML 1410 (RGN 238)	40.4	35	5.4	80	191	120	58.5

\*  $K_m$  indicates for ampicillin to the types II, III, IV and V  $\beta$ -lactamases, and for cephaloridine to the types Ia and Ic  $\beta$ -lactamases.

ての薬剤が小さく、結合親和性が高いことを示している。CEPase, Ic型に対しては、6059-Sは7-Z(2) methoxyimino誘導体よりは小さいものの、CMZやCFXよりは大きい $K_i$ 値を示し、この酵素を産生する*P. vulgaris*には水解されないだけでなく $\beta$ -lactamaseに対する結合親和性も低いのですぐれた抗菌力を示すものと考えられた。PCase, II, III, IVおよびV型に対しては6059-Sは他の薬剤よりも小さな $K_i$ 値を示し、比較的結合親和性が高いことがわかった。

### 考 察

6059-Sは強い抗菌力をもつ広域 CEP 類似薬剤で、特にグラム陰性菌に対する効力がすぐれている。作用点であるPBPに対する結合親和性を*E. coli*を使って調べたところ、CEPの一般的性質である1aと3に対する高い結合親和性が認められたのみならず、1bにもかなり強く結合することがわかった。PBPに対する高い結合親和性はすぐれた murein transpeptidases 阻害効果を意味すると考えられるので、この薬剤が同系統とも言うべきCMZやCFXより、1bに対する親和性が高いことは、他のものより強い抗菌力をもつ理由のひとつとも考えられた。1bは菌細胞の伸長時に必要な murein 架橋酵素であり<sup>9)</sup>、これを強くおさえるものは殺菌力にもすぐれているとも言われるのでこの成績は価値が高い。

6059-Sは調べられたかぎりでは、I型からV型にわたるいかなる型のCEPase, PCaseにも加水分解されない。これはこの薬が $\beta$ -lactamase産生菌によく作用することの大きな理由である。しかし、著者らはすでに水解されない薬剤でも $\beta$ -lactamaseに対する結合親和性が高ければ、それが表層酵素として存在するグラム陰性桿菌では、酵素と薬剤の結合により、一種の目づまり状態が起り、薬剤が作用点に到達しなくなって耐性化する仕組みもありうることを明らかにしている。6059-SはPCase型 $\beta$ -lactamaseに対して $K_i$ 値でみるかぎり、比較的強い結合親和性をもつ( $K_i$ 値が小さい)ので、この目づまりによる耐性上昇がある程度懸念された。事実TEM型 $\beta$ -lactamase産生を支配するR-plasmidを*E. coli* CSH 2に伝達すると、この酵素によっては6059-Sはまったく水解されないにもかかわらず、平均10倍の耐性上昇が認められる。しかし、6059-Sのグラム陰性桿菌に対する抗菌力が0.1  $\mu\text{g/ml}$ 以下という強いものなので、目づまりにより10倍程度上昇して、MICが1  $\mu\text{g/ml}$ に変化しても実用的には支障はない。

多くの $\beta$ -lactam薬剤に対する結合親和性の高いIa

型CEPaseを作る*E. cloacae*に対しても、相当程度良好な抗菌力を示し、CMZやCFXよりすぐれた成績を示すのは、この薬剤の本来の抗菌力が強いこと、目づまりによりある程度耐性が上昇しても、実的にはさしつかえない程度にとどまるためである。

6059-Sの体内動態が他の $\beta$ -lactam薬剤よりすぐれ、高い血中濃度と長い半減期をもつことを考えあわせると、この薬剤は種々の感染症、とくにグラム陰性桿菌によるそれに対し、すぐれた化学療法剤となることが期待される。

### 文 献

- 1) SPRATT, B. 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
- 2) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES:  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible role. In Advances in Microbial Physiology. A. H. ROSE & D. W. TEMPEST, Eds. Vol 9: 31~85, Academic Press, New York, N. Y., 1973
- 3) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11: 936~940, 1977
- 4) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
- 5) BONNER, W. M. & R. A. LASKEY: A film detection method for tritiumlabelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83~88, 1974
- 6) RICHMOND, M. H.:  $\beta$ -lactamase (*Escherichia coli* R<sup>+</sup>TEM). Methods Enzymol. 43: 672~677, 1975
- 7) RUBIN, F. A. & D. H. SMITH: Characterization of R factor  $\beta$ -lactamases by the acidimetric method. Antimicrob. Agents & Chemoth. 3: 68~73, 1973
- 8) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid: A beta-lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11: 852~857, 1977
- 9) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI: Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein 1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5472~5476, 1977

6059-S, ITS STABILITY AND AFFINITY TO VARIOUS  $\beta$ -LACTAMASES  
AND THE AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS  
OF *ESCHERICHIA COLI*

TAKESHI YOKOTA, REIKO SEKIGUCHI and EIKO AZUMA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University.

The stability and affinity of 6059-S against various types of  $\beta$ -lactamases were compared with those of other  $\beta$ -lactam antibiotics, together with the affinity to penicillin-binding protein (PBP) of *E. coli* NIHJ JC 2. It was found that 6059-S is completely nonhydrolyzable either by cephalosporinase-type (types Ia and Ic of RICHMOND classification) or by penicillinase-type (types II, III, IV and V)  $\beta$ -lactamases. Although 6059-S was confirmed to be quite stable to  $\beta$ -lactamases, its  $K_i$  values to the enzymes were rather low indicating that the drug possesses a high binding affinity to  $\beta$ -lactamases. In fact, the transfer of 53 different R (*bla*) plasmids to the CSH 2 strain of *E. coli* resulted in 10-fold increase of the MICs by 6059-S in average. This evidence, however, will not interfere the clinical value of the drug because of its marked antibacterial activity. Another word, the 10 times increase of MICs is much lower than the ordinary serum level of 6059-S.

Competitive binding experiment of 6059-S with  $^{14}\text{C}$ -penicillin G to PBP of *E. coli* indicated that the drug possesses high binding affinities to the Ia, Ib, III, IV, V and VI fractions. Since 6059-S shows higher binding affinity to the Ib fraction that has been believed to be an essential crosslinking enzyme of the cell wall murein, than other 7- $\alpha$ -methoxy derivatives, its strong bactericidal activity is expected.