

Ceftizoxime の抗菌活性とペニシリン結合蛋白親和性、外膜透過性 および β -ラクタマーゼに対する安定性との相関

信 貴 康 孝・高 乗 仁

若杉真美子・西 田 実

(藤沢薬品工業株式会社・中央研究所)

(昭和56年2月9日受付)

新しいセファロsporin誘導体, ceftizoxime (FK 749) およびその立体異性体, FR 14060 (ceftizoxime の7位の methoxyimino 基が *anti* 体である) の抗菌活性, ペニシリン結合蛋白 (PBP) 親和性, 外膜透過性および β -ラクタマーゼに対する安定性を *Escherichia coli* および *Enterobacter cloacae* を試験菌として比較した。ceftizoxime は FR 14060 より強い抗菌活性をもつが, 両者の外膜透過性およびセファロsporinaゼ型の β -ラクタマーゼに対する安定性においては, 明らかな差はみられなかった。しかし, 両化合物は PBP に対する親和性およびペニシリナーゼ型 β -ラクタマーゼに対する安定性に著しく相違がみられた。PBP 1a および 1bs に対する [14 C]-ペニシリン G の結合を 50% 阻害するのに必要な ceftizoxime の濃度は, *E. cloacae* および *E. coli* 両菌種において 3.2~1.0 μ g/ml 以下であった。一方, これらの PBPs に対して同様な効果を得るために必要な FR 14060 の濃度は ceftizoxime の 10 倍以上であった。ペニシリナーゼ型 β -ラクタマーゼは ceftizoxime より FR 14060 を速やかに分解するが, 前者の K_m 値が大きいために両薬剤の抗菌性はペニシリナーゼの存在に影響されなかった。これらの結果から ceftizoxime と FR 14060 の抗菌活性の差異は, 主に PBP の 1bs の関与する細菌細胞壁の架橋反応の阻害効果の差異に由来すると考えられる。

ceftizoxime (CZX, FK 749) が弱毒菌を含む各種のグラム陰性菌に対して強い抗菌活性をもつことはすでに報告した¹⁾。また近年の細菌細胞壁の生合成に関する研究から, β -ラクタム剤の標的部位はペニシリン結合蛋白 (Penicillin-binding protein, PBP) と呼ばれる一群の膜蛋白であることが明らかになった。とくに *E. coli* では, PBP の 1a と 1bs に結合する β -ラクタム剤が細菌を効果的に溶菌し, PBP の 3 に結合する β -ラクタム剤は細菌をフィラメント化するなど, 各 PBP の生理的役割が次第に解明されてきた²⁻⁴⁾。われわれは ceftizoxime の抗菌活性の特徴を検討する目的で, ceftizoxime とそれより抗菌力の劣る ceftizoxime の立体異性体, FR 14060 を作用機作の面から比較した。本報告においては, *E. coli* および *E. cloacae* を試験菌として用い, 両薬剤の PBP に対する親和性, 外膜透過性, β -ラクタマーゼに対する安定性などについて検討したのでその結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 抗生物質および試薬

ceftizoxime および FR 14060 は藤沢薬品工業(株)中

央研究所において合成されたものを使用した。cephaloridine は鳥居薬品工業(株)(東京)より購入した。【 14 C】ペニシリン G カリウム塩 (比活性: 56 mCi/mmol) は Radiochemical Centre (Amersham; イギリス) より購入した。X 線フィルム (X-Omat R) は Eastman Kodak 社 (Rochester; U. S. A.) より購入した。その他の試薬は全て市販の分析用純度のものを用いた。

2. 使用菌株

Escherichia coli DCO およびその透過性変異株 DC 2 は M. H. RICHMOND 博士 (Bristol 大; イギリス) より分与をうけた。その他は藤沢薬品工業(株)中央研究所保存の臨床材料由来の菌株である。

3. PBP に対する結合親和性の測定

E. coli NIHJ JC-2 および *E. cloacae* 58-5 の PBP に対する結合親和性の測定は SPRATT の方法^{2,3)} を若干修正した以下の方法で測定した。試験菌株を Antibiotic No. 3 broth (Difco 社製; Detroit, U. S. A.) 中で培養し, 対数増殖期の後期で集菌し, 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて一度洗浄してから同じ緩衝液に懸濁した。超音波破砕器 (トミー精工; 東京)

を用いて約半数の菌体を破碎した後、 $150,000 \times g$ で 30 分間超遠心分離により膜画分を沈殿として得た。10 mM の塩化マグネシウムを含む 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて一度洗浄した後、同じ緩衝液に最終蛋白濃度が 20 mg/ml となるように再懸濁した。

30 μ l の膜画分の懸濁液と 3 μ l の被験薬剤の水溶液をよく混合し、30℃ で 10 分間振盪して反応させた。さらに 3 μ l の [14 C] ペニシリン G カリウム塩の水溶液 (100 μ Ci/ml) を加えて、再び 30℃ で 10 分間振盪して反応させた。無標識のペニシリン G と Sarkosyl の混合液を加えて [14 C] ペニシリン G の結合を停止させ、細胞質膜の蛋白を Sarkosyl により可溶化し⁸⁾、可溶画分を 10% SDS-アクリルアミドのゲル中で分離した。ゲル板は BONNER および LASKEY⁹⁾ らの方法によってフルオログラフィー用に調製し、予備感光により増感させた X 線フィルムに重ね -35℃ で 70 日間感光させた。現像後、島津クロマト・スキャナー CS-900 (島津製作所; 京都) を用いて Densitometry を行ない、[14 C] ペニシリン G の結合量を 50% 減少させる被験薬剤の濃度 I_{50} ⁷⁾ を測定した。

4. β -ラクタマーゼに対する安定性

β -ラクタマーゼに対する薬剤の安定性は、恒温式のセル・ホルダーを備えた日立 200-20 型分光光度計 (日立製作所; 東京) を用いて直接紫外部の吸収の変化を測定して求めた。ソニック破碎された細胞懸濁液より Sephadex G-100 を用いたゲルろ過により β -ラクタマーゼを部分精製し、その適量を 150 μ g の薬剤および 200 μ mole のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に混和し、最終濃度を 3.0 ml として 37℃ のセル・ホルダーで保温した。 β -ラクタム環の加水分解速度は 260 nm における紫外吸収を経時的に測定することにより求めた。

5. ceftizoxime および FR 14060 の *E. cloacae* および *E. coli* 外膜の透過性

薬剤の外膜透過性の評価は次に述べる方法のいずれかによった。第 1 の方法はペリプラズム中に存在する β -ラクタマーゼ活性を利用して、 β -ラクタム剤の外膜中の拡散係数を求める方法であり、強力な β -ラクタマーゼ活性を有する *E. cloacae* 91 に対して用いた。測定法の原理は ZIMMERMANN ら⁷⁾ の方法を用い、 β -ラクタマーゼに安定な β -ラクタム剤に応用する改変法はわれわれが報告した⁸⁾。他の方法は *E. coli* DC 0 およびその透過性変異株である DC 2 に対する MIC の比を測定する方法である。その原理および測定方法は M. H. RICHMOND ら⁹⁾ および N. A. C. CURTIS ら¹⁰⁾ により報告されている。

6. 抗菌活性

抗菌活性の測定は寒天平板希釈法によった。試験菌を Trypticase soy broth (BBL; Cockeysville, U.S.A.) 中で 1 夜前培養し、滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈した。2 倍希釈系列の被験薬剤を含む Heart infusion 寒天培地 (Difco 社製) に、STEERS' replicator¹¹⁾ を用いて菌液を接種し、37℃ で 18 ないし 20 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

II. 結 果

1. 抗菌活性

Table 2 Stability to β -lactamases

Antibiotic	Relative rate of enzymatic hydrolysis	
	Cephalosporinase	Penicillinase
Ceftizoxime	0.50	<2.0
FR 14060	0.58	13
Cephalexidine	100	100

Values indicate the relative rate of hydrolysis. Hydrolysis was followed by direct ultraviolet absorption assay. The starting concentration of the antibiotic was 50 μ g/ml.

Table 1 Antibacterial activity against gram-negative bacteria

Organism	MIC ^{a)} (μ g/ml)		
	Ceftizoxime	FR 14060	Cephalexidine
Non- β -lactamase producing strain			
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.025	0.78	6.25
<i>E. cloacae</i> strain 58-5	0.1	12.5	25
<i>K. pneumoniae</i> strain 20	≤ 0.003	0.2	3.13
β -lactamase producing strain			
<i>E. coli</i> strain 18 (Penicillinase)	0.025	0.39	6.25
<i>E. cloacae</i> strain 91 (Cephalosporinase)	100	400	>800

a) Minimum inhibitory concentration was determined by inoculating 10^8 cells/ml cell suspension onto heart infusion agar which was determined at 37℃ for 20 h

Table 3 *Enterobacter cloacae*^{a)} outer membrane permeability

Antibiotic	V_{max}	K_m or K_i (μM)	Approximate permeability coefficient
Ceftizoxime	0.0856 ^{b)}	0.404 ^{c)}	0.59 ^{d)}
FR 14060	0.0993	0.168	0.82
Cephaloridine	100	581	1

a) Strain 58-5

b) Relative rate of hydrolysis

c) K_i value was used as a substitute for K_m value of W. ZIMMERMANN *et al.*

d) Values indicate the ratio to permeability coefficient against cephaloridine

Table 4 Comparative antibacterial activity of cephalosporins against *Escherichia coli* DC0 and its permeability mutant

Antibiotic	MIC ^{a)} ($\mu g/ml$)		MIC ratio <i>E. coli</i> DC 0/ <i>E. coli</i> DC 2
	<i>E. coli</i> DC 0 ^{b)}	<i>E. coli</i> DC 2 ^{c)}	
Ceftizoxime	0.05	0.0125	0.25
FR 14060	1.56	0.39	0.25
Cephaloridine	3.13	3.13	1

a) See foot note a Table 1

b) Parent strain

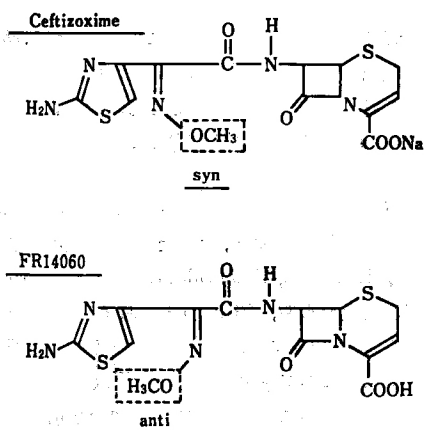
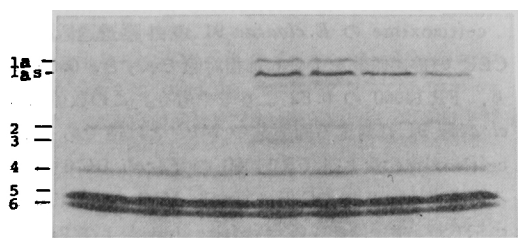
c) Permeability mutant of DC0 described by RICHMOND *et al.*

Fig.1 Structure of ceftizoxime and FR 14060

ceftizoxime と FR 14060 の抗菌活性を β -ラクタマーゼ産生または非産生のグラム陰性菌を試験菌株として比較した。Table 1 に示したように、ceftizoxime は β -ラクタマーゼを産生しない *E. coli* NIHJ JC-2, *E. cloacae* 58-5 および *Klebsiella pneumoniae* 20 に対して FR 14060 よりそれぞれ 32 倍, 128 倍および 64 倍強い抗菌活性を示した。ceftizoxime はまたペニシリナーゼを産生する *E. coli* 18 に対して FR 14060 より 16 倍強い抗菌活性を示した。一方、セファロスポリナーゼを産生する *E. cloacae* 91 に対しては ceftizoxime

Fig.2 Affinity of ceftizoxime and FR 14060 for penicillin-binding proteins of *Enterobacter cloacae* strain 58-5

(Concentrations of added cephalosporins to the membrane fractions corresponding to seven columns were, in turn from the left to the right, ceftizoxime 25 $\mu g/ml$, ceftizoxime 5 $\mu g/ml$, ceftizoxime 1 $\mu g/ml$, non (control), FR 14060 1 $\mu g/ml$, FR 14060 5 $\mu g/ml$ and FR 14060 25 $\mu g/ml$, respectively)

の抗菌活性は FR 14060 より 4 倍強いだけであった。

2. ceftizoxime および FR 14060 の β -ラクタマーゼに対する安定性

ceftizoxime の β -ラクタマーゼに対する安定性を FR 14060 と比較した。両化合物はセファロスポリナーゼに対して非常に安定で、かつ両者に差はみられなかった。それと対照的に、ペニシリナーゼに対する両薬剤の安定性には相当の差異がみられた。すなわち ceftizoxime

Table 5 Competition of ceftizoxime and FR 14060 for the PBPs of *E. cloacae* and *E. coli*

PBP	I_{50} binding conc. ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}			
	<i>E. cloacae</i> strain 58-5		<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	
	CZX ^{b)}	FR 14060	CZX	FR 14060
1 a	<1.0	2.0	<3.2	<3.2
1 bs	<1.0	13	<3.2	35
2	>25	>25	>80	>80
3	<1	<1	<3.2	<3.2
4	>25	>25	>80	>80
5	ND ^{c)}	ND	>80	>80
6	ND	ND	>80	>80

a) Values indicate the concentration of the antibiotic required to reduce [¹⁴C]-penicillin-G binding by 50%

b) Ceftizoxime

c) Not determined

はペニシリナーゼによっては分解されなかったが、FR 14060 は CER の約 1/10 程度分解された。

3. ceftizoxime および FR 14060 のグラム陰性菌外膜透過性

ceftizoxime の *E. cloacae* 91 の外膜透過係数は、CER の透過係数を 1 とした相対値で示すと、0.59 であり、FR 14060 の 0.82 よりやや劣る。この数値は *E. cloacae* 91 に対する両薬剤の MIC とは逆であった。ceftizoxime および FR 14060 の *E. coli* DC0 およびその透過性変異株 DC2 に対する MIC の比を Table 4 に示した。透過性変異株は ceftizoxime および FR 14060 に対して親株より感受性であったが、MIC 値の減少率においては両薬剤に差はみられず、*E. coli* の正常な外膜が薬剤の透過を妨げる程度は、両薬剤に対して同様であった。

これらの結果は、ceftizoxime と FR 14060 の *E. coli* および *E. cloacae* に対する抗菌活性の差異は細菌外膜の透過性が原因でないことを示している。

4. ceftizoxime および FR 14060 の PBP に対する結合親和性

Fig. 2 および Fig. 3 は [¹⁴C] ペニシリン G と結合している PBP のフルオログラムであるが、*E. cloacae* 58-5 および *E. coli* NIHJ JC-2 において明瞭な 7 本のバンドが認められ、CURTIS らの報告¹²⁾に従って、PBP 1 から 6 をそれぞれ同定した。*E. cloacae* の PBP に対しては ceftizoxime は 1a, 1bs および 3 に対して強い結合親和性を示し、それぞれの I_{50} 値は 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった (Table 5)。一方、FR 14060 の PBP 1a およ

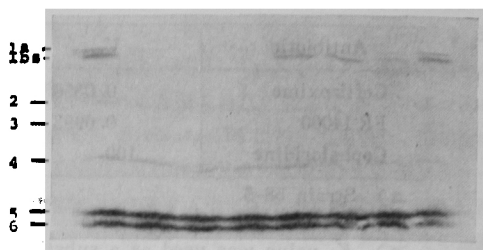


Fig. 3 Affinity of ceftizoxime and FR 14060 for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2

(Concentrations of added cephalosporins to the membrane fractions corresponding to eight columns were, in turn from the left to the right, non (control), ceftizoxime 3.2 $\mu\text{g/ml}$, ceftizoxime 16 $\mu\text{g/ml}$, ceftizoxime 80 $\mu\text{g/ml}$, FR 14060 3.2 $\mu\text{g/ml}$, FR 14060 16 $\mu\text{g/ml}$, FR 14060 80 $\mu\text{g/ml}$ and none (control), respectively)

び 1bs に対する結合親和性は ceftizoxime より弱く、 I_{50} 値はそれぞれ 2 倍および 13 倍以上も高い濃度であった。PBP 3 に対する結合親和性は両薬剤に差はみられず、PBP 2, 4, 6 に対する両者の結合親和性はかなり低かった。

E. coli NIHJ JC-2 の PBP に対しては *E. cloacae* 58-5 の場合と同様、ceftizoxime は PBP 1a, 1bs および 3 に対して強い結合親和性を示したが、FR 14060 は PBP 1a および 3 に対して強い結合親和性を示した。

III. 考 察

E. coli の PBP の 1a および 1bs は細菌の細胞壁の架橋反応に関与する酵素、すなわち peptidoglycan-transpeptidase および peptidoglycan-transglycosidase の両方の活性をもち、PBP の 1a および 1bs の両方に結合する β -ラクタム剤は、それらの酵素活性を阻害することによってスフェロプラストを形成し、溶菌に導くことが知られている¹³⁾。また PBP の 3 は細菌の septum 形成に必須である^{2,4)}。*E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Proteus rettgeri* および *Pseudomonas aeruginosa* もまたそれらの PBP の 1a, 1bs あるいは 3 が β -ラクタム抗生物質と結合した場合、同様の形態変化を示す¹²⁾。

本実験において、われわれは β -ラクタム剤のグラム陰性菌に対する抗菌作用に関与する主要な項目、PBP に対する結合親和性、 β -ラクタマーゼに対する安定性および外膜透過性などを測定し、ceftizoxime の抗菌作用の機作をその立体異性体との比較において総合的に検討した。

D. MIRELMAN および Y. NUCHAMOWITZ は、HR 756 (cefotaxime) の 7 位の methoxyimino 基が立体異性

となっている化合物は、元の HR 756 より transpeptidase に対する阻害作用が弱いことを、エーテル処理した *P. aeruginosa* X-48 を用いて示している¹⁴⁾。しかし彼らは、その菌の外膜透過性あるいは不活化酵素に対する安定性に関しては検討していないので、彼らの報告は抗菌活性の差異の原因の1つの可能性として、transpeptidase に対する阻害作用の差異を提示したにすぎない。

ceftizoxime とその立体異性体 FR 14060 の β -ラクタマーゼに対する安定性に関しては、両化合物ともセファロスポリナーゼに対して非常に安定であったが、ペニシリナーゼに対して、ceftizoxime は同様に安定であるのに、FR 14060 はやや不安定であるという成績が得られた。しかしながらペニシリナーゼに対する FR 14060 の K_m 値が大きいため、そのペニシリナーゼを産生する *E. coli* 18 に対して FR 14060 は感受性菌に対するのと同様の強い抗菌活性を示した。従ってペニシリナーゼに対する FR 14060 の安定性は本剤の抗菌力に殆んど影響を与えていないと考えられる。また細菌外膜透過性に関しては両化合物間で差異は認められなかった。

しかし、上記の成績とは対照的に、ceftizoxime と比較して FR 14060 は2種類のグラム陰性菌の PBP 1a および 1bs に対する結合親和性が顕著に低下していることが明らかになった。他の抗菌活性に関与する性状においては重要な差異は見当たらないので、ceftizoxime の抗菌活性は PBP の 1a および 1bs の両方の酵素活性の阻害によるもので、FR 14060 の抗菌活性の低下は、これらの酵素活性に対する阻害効果が弱いためと考えられる。ceftizoxime とその立体異性体間では、若干化合物の電子分布が異なるので、両化合物間の性状の差異を立体因子だけに帰することはできないが、ceftizoxime の立体異性体では標的酵素に対する親和性が低下することは、標的酵素と ceftizoxime の相互作用において、7 位側鎖の methoxyimino 基が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

文 献

- 1) 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 & Chemother.* 16: 540~548, 1979
- 2) 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: 2999~3000, 1975
- 3) SPRATT, B. G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. *Eur. J. Biochem.* 72: 341~352, 1977
- 4) CURTIS, N. A. C., D. ORR, G. W. ROSS & M. G. BOULTON: Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 16: 533~539, 1979
- 5) FILIP, C., G. FELTCHER, J. L. WULFF & C. F. EARHART: Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* 115: 717~722, 1973
- 6) 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
- 7) ZIMMERMANN, W. & A. ROSSELET: Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 12: 368~372, 1977
- 8) KOJO, H., Y. SHIGI & M. NISHIDA: *Enterobacter cloacae* outer membrane permeability to ceftizoxime (FK 749) and five other new cephalosporin derivatives. *J. Antibiot.* 33: 317~321, 1980
- 9) RICHMOND, M. H., D. C. CLARK & S. WOTTON: Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase-nonsusceptible penicillins and cephalosporins in *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 10: 215~218, 1976
- 10) CURTIS, N. A. C., C. BROWN, M. BOXALL & M. C. BOULTON: Inhibition of *Escherichia coli* K-12 by β -lactam antibiotics with poor antibacterial activity: Interaction of permeability and intrinsic activity against penicillin-binding proteins. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 15: 332~336, 1979
- 11) STEERS, E., E. L. FOLTZ & B. S. GRAVES: An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* (Washington, D. C.) 9: 307~311, 1959
- 12) CURTIS, N. A. C., D. ORR, G. W. ROSS & M. G. BOULTON: Competition of β -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: Comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 16: 325~328, 1979
- 13) NAKAGAWA, J., S. TAMAKI & M. MATSUHASHI:

Purified penicillin-binding proteins 1 Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. Agric. Bio. Chem. 43 : 1379~1380, 1979

14) MIRELMAN, D. & Y. NUCHAMOWITZ : Biosyn-

thesis of peptidoglycan in *Pseudomonas aeruginosa* : Comparison of the inhibitory effects of cefotaxime, its *anti* isomer, and the *syn* S-oxide compound. Antimicrob. Agents & Chemoth. 17 : 115~119, 1980

DIFFERENCES BETWEEN CEFTIZOXIME AND ITS STEREO-ISOMER IN ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND AFFINITY FOR PENICILLIN-BINDING PROTEINS

YASUTAKA SHIGI, HITOSHI KOJO, MAMIKO WAKASUGI and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

A new cephalosporin derivative, ceftizoxime (FK 749, *syn*) and its *anti* isomer, FR 14060 were compared in antibacterial activity, outer membrane permeability, stability to β -lactamases and affinity for penicillin-binding proteins using *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *Enterobacter cloacae* strain 58-5 as the test organisms. Although ceftizoxime was superior in antibacterial activity to FR 14060, no marked differences between the two agents were found in outer membrane permeability and stability to cephalosporinase. However, the affinity for penicillin-binding proteins (PBPs) and stability to penicillinase of ceftizoxime and FR 14060 differed significantly. Concentrations of ceftizoxime required to reduce [14 C] penicillin-G binding by 50% were below 1 μ g/ml for PBP 1a and lbs of *E. cloacae* strain 58-5 and below 3.2 μ g/ml for PBP 1a and lbs of *E. coli* NIHJ JC-2. A more than ten-fold higher concentration of FR 14060 was required for 50% reduction of [14 C] penicillin-G binding to PBP 1bs of the strains tested. Ceftizoxime was several-fold more stable than FR 14060 to penicillinase, but the antibacterial activity of both drugs against penicillinase-producing *E. coli* was as strong as against non-penicillinase-producing *E. coli* because of the large K_m value of FR 14060. These results indicate that the difference between the two compounds in antibacterial activity is likely to be mainly due to differences in their abilities to inhibit peptidoglycan-polymerization.