グラム陰性桿菌の産生する不活化酵素に対する各種 β-lactam 系薬剤の安定性

吉 田 勇·小 川 正 俊·宮 崎 修 一 西 勝 恵 子·五 島 瑳 智 子 東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 55 年 11 月 15 日受付)

グラム陰性桿菌 10 菌種 15 株が産生する β -lactam 剤不活化酵素に対する各種 β -lactam 剤,すなわち Penicillin 系 9 剤,Cephalosporin 系 17 剤の安定性を検討し,次のような結果を得た。全般的には,Penicillin 系薬剤のうち, β -lactamase に不安定な薬剤は,PCG,ABPC,MZPC,APPC,PIPC で,比較的安定なものは,CBPC,SBPC,TIPC,MCIPC であったが,菌種菌株によってかなりの差が認められた。

Cephalosporin 系薬剤では、CER, CEX, CFT, CXD, CCL, CEZ が β-lactamase によってこわれ やすく、CFX, CMZ, CXM, CFS, CTX, CZX, 6059-S, CMX は安定性が高かった。CMD, CTM, CPZ は前記 2 群の中間的性状を示し、菌種菌株により安定性が異なった。

試験株のすべての不活化酵素に最も安定なのは、6059-S であった。1 種類の酵素にだけ分解される薬剤としては、CFX, CMZ, CXM, CZX があり、その他の薬剤は、2 種あるいはそれ以上の酵素によって分解された。

Penicillin, Cephalosporin などの β -lactam 系抗生物質は、毒性の少ない抗生物質として、大量投与も可能であるため、使用範囲はますます拡大している。しかし、グラム陰性桿菌の産生する β -lactam 剤 不活化酵素、すなわち β -lactamase に不安定な抗生物質では、耐性菌への対応がせまられていた。

これに対して、 菌の β -lactamase に抵抗する新しい Penicillin 系薬剤,Cephalosporin 系薬剤の開発が精力 的に行なわれ,すでに報告 1 ²されている薬剤も数多く ある。

それぞれの 報告 は、RICHMOND の分類 13) による β -lactamase 産生菌を用いているものが多いが、菌株はまちまちであり、また条件も必ずしも同一ではない。

我々は、新薬をも含めた Penicillin 系 9 剤、 Cephalosporin 系 17 剤について、同一酵素で、同時に実験することにより、薬剤間の酵素安定性を比較した。

I. 実験材料

1. 使用薬剤

i) Penicillin 系薬剤

Benzylpenicillin (PCG, 665 μg/mg, 萬有製薬) Ampicillin (ABPC, 911 μg/mg, 藤沢薬品) Carbenicillin (CBPC, 790 μg/mg, 藤沢薬品) Sulbenicillin (SBPC, 887 μg/mg, 武田薬品) Mezlocillin (MZPC, 925 μg/mg, 吉富製薬) Apalcillin (APPC, 854 μg/mg, 住友化学) Piperacillin (PIPC, 915 μg/mg, 富山化学) Ticarcillin (TIPC, 791 μg/mg, 藤沢薬品) Cloxacillin (MCIPC, 900 μg/mg, 東洋)

ii) Cephalosporin 系薬剤

Cephatoridin (CER, 910 μg/mg, 塩野義製薬)

Cephalexin (CEX, 900 μg/mg, 萬有製薬)

Cefatridine (CFT, 843 μg/mg, 萬有製薬)

Cefaclor (CCL, 960.6 μg/mg, 塩野義製薬)

Cefroxadine (CXD, 881 µg/mg, 日本チバガイギー)

Cefazolin (CEZ, 944 µg/mg, 藤沢薬品)

Cefamandole (CMD, 960 μg/mg, 塩野義製薬)

Cefuroxime (CXM, 971 μg/mg, 新日本実業)

Cefotiam (CTM, 820 µg/mg, 武田薬品)

Cefsulodin (CFS, 904 μg/mg, 武田薬品)

Cefoxitin (CFX, 938 μg/mg, 第一製薬)

Cefmetazole (CMZ, 953 µg/mg, 三共)

Cefoperazone (CPZ, 947 µg/mg, 富山化学)

Cefotaxime (CTX, 925 μg/mg, ヘキストジャパン)

Ceftizoxime (CZX, 857 μg/mg, 藤沢薬品)

6059-S (922 μg/mg, 塩野義製薬)

Cefmenoxime (CMX, 945 μg/mg, 武田薬品)

2. 使用培地

i)最小発育阻止濃度(MIC)測定用培地 普通ブイョン(NB, 栄研) 普通寒天培地(NA, 栄研)

ii) Penicillin 系薬剤力価測定用培地	
ポリペプトン(和光純薬)	0.7%
寒天 (DIFCO)	1.2%
iii) CER, CEX, CFT, CCL, CXD, CEZ, CMD	, CFX,
CMZ, CTX 力価測定用培地	
ハートインフュジョンブイヨン (HIB, 栄研)	2.5%
寒天	1.2%
iv) CPZ 力価測定用培地	
ポリペプトン	0.6%
肉エキス(極東)	0.15%
酵母エキス (DIFCO)	0.3%
ブドウ糖(和光純薬)	0.1%
寒天	1.2%
v) CTM, CFS, SCE-1365 力価測定用培地	
DST agar (OXOID)	
vi) CXM 力価測定用培地	
ポリペプトン	0.5%
肉エキス	0.3%
NaCl (和光純薬)	0.5%
クエン酸ナトリウム(和光純薬)	1.0%
寒天	1.2%
vii) CZX 力価測定用培地	
ポリペプトン	0.5%
肉エキス	0.3%
クエン酸ナトリウム	1.0%
寒天	1.0%
viii) 6059-S 力価測定用培地	
トリプトソイブイヨン(栄研)	3.0%
寒天	1.2%
3. 力価測定用菌株	
- N P P P P P P P P P P P P P P P P P P	CVD

i) Penicillin 系薬剤, CER, CEX, CFT, CCL, CXD, CEZ, CMD, CXM, CFX, CMZ, CZX力価測定用菌株 Bacillus subtilis ATCC-6633

ii) CPZ, CTX 力価測定用菌株

Micrococcus luteus ATCC-9341

iii) CTM, SCE-1365 力価測定用菌株

Proteus mirabilis ATCC-21100

iv) CFS力価測定用菌株

Pseudomonas aeruginosa NCTC-10490

v) 6059-S 力価測定用菌株

Escherichia coli 7437

4. 不活化酵素産生菌株

Citrobacter freundii GN-346

Proteus rettgeri GN-624

Proteus inconstans GN-627

Enterobacter cloacae No. 91

Escherichia coli No. 35

Proteus vulgaris GN-76

Pseudomonas aeruginosa No. 11

Proteus mirabilis GN-79

Escherichia coli ML-1410 RGN-823

Klebsiella pneumoniae GN-69

Escherichia coli ML-1410 RGN-238

Pseudomonas aeruginosa No. 47

Proteus vulgaris No. 9

Escherichia coli 121

Serratia marcescens No. 78

II. 実 験 方 法

1. MIC 測定法

日本化学療法学会標準法 14)に準じて、 β -lactam 剤不活化酵素産生株の MIC を測定した。

2. 酵素液の作製と実験方法

 β -lactam 剤不活化酵素産生菌株を NB, 500 ml で 37 °C, 16 時間振とう培養した後、培養液を冷却遠心器により、5°C, 10,000rpm で 20 分間遠心し、菌体を集める。

菌体を NB 20 ml に懸濁し、氷水で冷却しながら Sonicater (OHTAKE) により菌体を超音波破壊し、遠 心分離する。遠心上清をミリポアフィルターにより沪過 滅菌後 NB を加え 500 ml とし、粗酵素液とした。

粗酵素液を NB で 10 倍あるいは 100 倍に希釈し、作用酵素液とした。

作用酵素液 9.0 ml に、NB で $500 \mu\text{g/ml}$ としたそれぞれの薬剤液 1.0 ml を加えて終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ とし、 $37 ^{\circ}$ で作用させた。

それぞれの作用液を 0.5, 1, 2, 4 時間後にサンプリングし, 100°C, 1分の heat shock により酵素を不活化し, 薄層ディスク法により阻止円の直径を測定した。

検量線用には、100°C、20 分 heat shock し、酵素を不活化した作用酵素液を用い、 $50 \mu g/ml$ 、 $10 \mu g/ml$, $2 \mu g/ml$ の薬剤液を作製し、100°C、1 分の heat shock 後上記の方法により阻止円の直径を測定し、検量線を作製した。

III. 実験成績

1. In vitro 抗菌力测定

In vitro 抗菌力を調べた成績を Penicillin 系薬剤を Table 1, Cephalosporin 系薬剤を Table 2 に示した。

新しい Penicillin 系薬剤である MZPC, APPC, PI-PC, TIPC は他の Penicillin 系薬剤に比較すると抗菌力は強い。

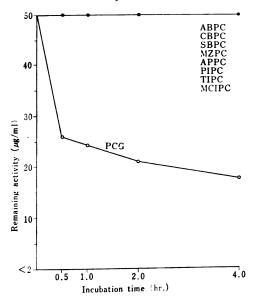
Cephalosporin 系薬剤では、既存の CER, CEX, CEZ, および経口の新薬である CFT, CXD, CCL などは抗菌

Table 1	Int	vitro	antibacterial	activity	of	penicillins
---------	-----	-------	---------------	----------	----	-------------

Drug	DCC	APPC	CDDC	2222	14700	ADDC	PIPC	TIPC	MCIPC
Strain	PCG	ABPC	CBPC	SBPC	MZPC	APPC	PIPC	TIFC	MCIFC
Citrobacter freundii GN-346	>3, 200	3, 200	200	200	50	200	100	200	400
Proteus rettgeri GN-624	3, 200	800	12. 5	3. 12	3. 12	12. 5	0.78	50	0.78
Proteus inconstans GN-627	1,600	400	12. 5	3. 12	50	12.5	1. 56	12. 5	25
Enterobacter cloacae No. 91	> 3, 200	3, 200	100	3. 12	12. 5	400	25	200	800
E. coli No. 35	800	200	50	12. 5	25	25	12. 5	0. 39	3. 12
Proteus vulgaris GN-76	400	400	200	1. 56	6. 25	12. 5	3. 12	12. 5	1,600
P. aeruginosa No. 11	>3,200	>3,200	800	400	1,600	50	400	800	> 3, 200
Proteus mirabilis GN-79	3, 200	>3, 200	>3, 200	>3, 200	800	1,600	800	>3,200	800
E. coli ML-1410 RGN-823	3, 200	>3,200	>3, 200	>3, 200	3, 200	3, 200	1,600	6. 25	3, 200
Klebsiella pneumoniae GN-69	400	800	3, 200	3, 200	25	50	25	50	200
E. coli ML-1410 RGN-238	200	800	3, 200	1,600	50	100	25	100	3, 200
P. aeruginosa No. 47	>3, 200	3, 200	400	200	100	6. 25	12. 5	200	>3, 200
Proteus vulgaris No. 9	1,600	3, 200	100	3. 12	6. 25	3. 12	1.56	200	1,600
E. coli 121	400	400	3, 200	3, 200	50	100	50	100	100
Serratia marcescens No.78	>3, 200	>3, 200	>3, 200	>3, 200	3, 200	>3,200	1, 600	>3, 200	> 3, 200

MIC (μg/ml) Inoculum size 10⁶ cells/ml

Fig. 1 (a) Enzymatic stability of penicillins Citrobacter freundii GN-346



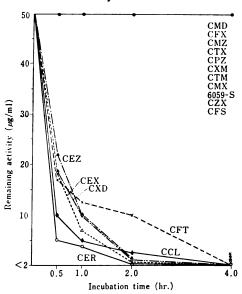
力が弱く、MIC 値は高値である。しかし、CTX, CPZ, CZX, 6059-S, CMX などの新しい誘導体の抗菌力は全体に強力であり、MIC 値は小さい。

2. 各菌体由来粗酵素による薬剤の不活化

i) Citrobacter freundii GN-346 (Fig. 1)

Penicillin 系: PCG だけが力価の低下を示したが, 他の ABPC, CBPC, SBPC, MZPC, APPC, PIPC, TIPC,

Fig. 1 (b) Enzymatic stability of cephalosporins Citrobacter freundii GN-346



MCIPC は力価の低下を示さず安定であった。

Cephalosporin 系: CER, CEZ, および経口の Cephalosporin である CEX, CFT, CXD, CCL はすみやかに力価が低下し、4時間後には、 $2\mu g/ml$ 以下にまで低下した。その他の Cephalosporin 系薬剤はすべて4時間後まで力価は変化せず、安定であった。

この菌の酵素は、Richmond type Ia に分類されてい

Table 2 In vitro antibacterial activity of cephalosporins

	CMX	20	0.39	0.78	6.25	≤0.2	≤0.2	800	0.39	≤0.2	≤0.2	0.39	100	0.39	≤ 0.2	12.5	/ml)
	6059 - S	6.25	≤0.2	3. 12	6.25	≦0.2	0.39	400	≤0.2	≤0.2	≤0.2	≤0.2	20	≤0.2	≤0.2	20	MIC (µg/ml)
	CZX	100	≤0.2	≤0.2	100	3. 12	≤0.2	3, 200	≤0.2	≤0.2	≤0.2	≤0.2	200	≤0.2	≦0.2	6.25	
	CPZ	25	12.5	6.25	3. 12	≦0.2	0.78	200	20	25	0.78	≤0.2	25	3. 12	0.78	400	e cells/
	CTX	20	≦0.2	0.39	6.25	0.39	1.56	1,600	≦0.2	≤0.2	≤0.2	≤0.2	100	1.56	≤0.2	20	size 10
	CFS	200	100	200	400	25	200	20	200	200	100	25	12. 5	400	12.5	>3, 200	Inoculum size 106 cells/ml
2	СТМ	3, 200	25	25	200	0.78	400	3, 200	100	≤0.2	≤0.2	≤0.2	3, 200	800	400	3, 200	I
Todown	СХМ	200	20	200	400	25	1,600	>3, 200	800	3.12	1.56	3. 12	3, 200	3, 200	1.56	>3, 200	
	CMZ	100	20	100	100	6.25	6.25	>3, 200	25	0.39	0.78	0.39	3, 200	3. 12	0.39	400	
624 14224	CFX	400	20	100	100	12.5	6.25	3, 200	12.5	0.78	1.56	0.78	3, 200	6.25	0.39	400	
1000	СМD	1,600	12.5	12.5	400	1.56	20	>3, 200	12.5	25	3.12	≤0.2	>3, 200	800	3. 12	>3, 200	
	CEZ	3, 200	1,600	>3, 200	>3, 200	25	800	>3, 200	100	25	1.56	1.56	>3, 200	>3, 200	3.12	>3, 200	
	CCL	3, 200	800	800	1,600	100	3, 200	3, 200	1,600	25	1.56	1.56	3, 200	3, 200	0.78	3, 200	
1	СХД	>3, 200	1,600	800	1,600	20	3, 200	>3, 200	100	12.5	3. 12	3. 12	>3, 200	>3, 200	3.12	>3, 200	
	CFT	1,600	200	200	800	400	400	3, 200	400	200	6.25	1.56	3, 200	400	12.5	1,600	-
	CEX	1,600	800	800	3, 200 1, 600	400	3, 200 3, 200	3, 200	400	6.25	6.25	6.25	3, 200	1,600 3,200	3. 12	3, 200	
	CER	800	1,600	1,600	3, 200	12.5	3, 200	>3,200 3,200	100	20	3.12	1.56	>3, 200	1,600	6.25	>3, 200 3, 200	
	Drug Strain	Citrobacter freundii GN-346	Proteus rettgeri GN-624	Proteus inconstans GN-627	Enterobacter cloacae No. 91	E. coli No. 35	Proteus vulgaris GN-76	$P.\ aeruginosa \ m No.\ 11$	Proteus mirabilis GN-79	E. coli ML-1410 RGN-823	Klebsiella pneumoniae GN-69	E. coli ML-1410 RGN-238	P. aeruginosa No. 47	Proteus vulgaris No. 9	E. coli 121	Serratia marcescens No.78	

Fig. 2 (a) Enzymatic stability of penicillins

Proteus rettgeri GN-624

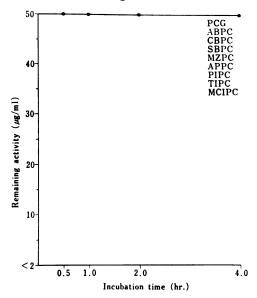
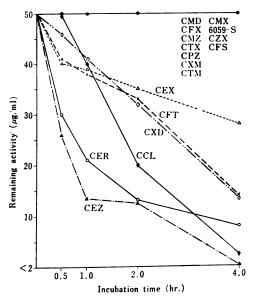


Fig. 2 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Proteus rettgeri GN-624



る¹⁸⁾。我々の実験においても type Ia に分類されたが、 PCG より CEX の方が若干分解されやすい結果が 得 ら れた。

ii) Proteus rettgeri GN-624 (Fig. 2)

Penicillin 系:この菌株の酵素に対し、すべてが安定であった。

Cephalosporin 系:もっとも力価の低下の著しかった

Fig. 3 (a) Enzymatic stability of penicillins

Proteus inconstants GN-627

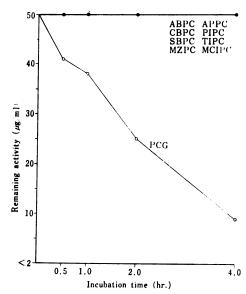
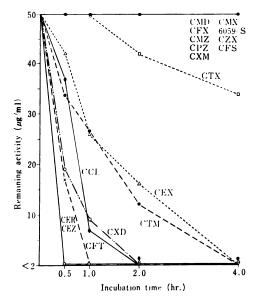


Fig. 3 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Proteus inconstants GN-627



のは CEZ で、次は CER、CCL で 4 時間後にはほとんど失活した。CXD、CFT、CEX は 2 時間後に残存力価が約 35 μ g/ml となったが 4 時間後には、CFT、CXDは 15 μ g/ml、CEX は 30 μ g/ml の残存力価を認めた。

この酵素も RICHMOND type Ia に分離されており¹²⁾, 我々の結果においても type Ia に分類された。しかし, PCGが分解されていない点が異なっており、また、CEZ

Fig. 4 (a) Enzymatic stability of penicillins Enterobacter cloacae No. 91

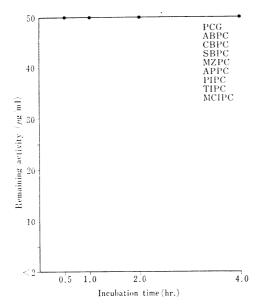
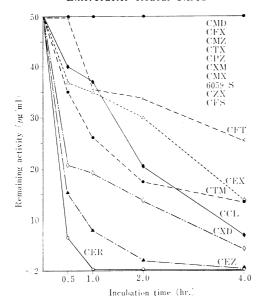


Fig. 4(b) Enzymatic stabilty of cephalosporins

Enterobacter cloacae No. 91



の方が CER より分解されやすい結果であった。

iii) Proteus inconstans GN-627 (Fig. 3)

Penicillin 系:力価の低下を示したのは、PCG だけであり、他の薬剤はすべて安定であった。

Cephalosporin 系: CER, CEZ, CFT は1時間後に, CXD, CCL は2時間後に完全失活し, CTM, CEX は4時間後に活性がゼロとなった。 CTX は1時間後までは

Fig. 5 (a) Enzymatic stability of penicillins E. coli No. 35

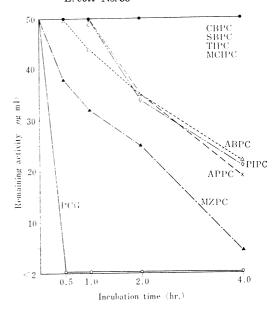
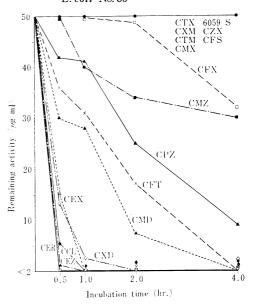


Fig. 5 (b) Enzymatic stability of cephalosporins E. coli No. 35



安定であったが、その後若干力価の低下をみた。他の9 剤はまったく力価の低下を認めなかった。

この菌の産生する酵素は RICHMOND type Ia に分類されており¹³⁾, 我々の結果においても type Ia に分類された。しかし, *Citrobacter freundii* GN-346, *Proteus rettgeri* GN-624 と異なり, CTM, CTX が分解されており, この点が異なっていた。

iv) Enterobacter cloacae No. 91 (Fig. 4)

Penicillin 系:すべて安定であった。

Cephalosporin 系: CER, CEZ は急速に失活したが、CXD, CTM, CCL, CEX, CFT は徐々に力価が低下した。その他の薬剤は力価の低下をまったく示さず安定であった。

この酵素は我々の実験結果より、RICHMOND type Ia に分類されたが、PCG が分解されておらず、また、CTM が分解されていることから、他の type Ia とは異なる酵素であると思われる。

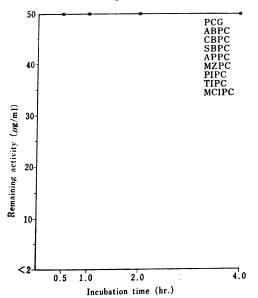
v) Escherichia coli No. 35 (Fig. 5)

Penicillin 系: PCG は 0.5 時間後に, 50 μg/ml から 2 μg/ml 以下に力価が低下し、 MZPC, APPC, PIPC, ABPC は力価の低下が徐々にみられた。 CBPC, SBPC, TIPC, MCIPC は安定であった。

Cephalosporin 系: CER, CEZ, CCL, CEX, CXD は すみやかに力価の低下がみられ、2時間後には完全に失 活した。CMD, CFT, CPZ は徐々に力価が低下し、 Cephamycin 系薬剤である CMZ, CFX も大きくはない が力価の低下を認めた。CTX, CXM, CTM, CFS, CZX, 6059-S, SCE-1365 は安定であった。

この菌株の産生する酵素は、RICHMOND type Ib と分類したが、type Ib では、ABPC が分解されないのでtype Id にあてはまる可能性もある。しかし、酵素産生量が少ないためとも考えられる。この酵素では、とくにCephamycin 系薬剤である CMZ, CFX が、速度は遅い

Fig. 6 (2) Enzymatic stability of penicillins Proteus vulgaris GN-76



が分解されるのが注目される点である。

vi) Proteus vulgaris GN-76 (Fig. 6)

Penicillin 系:すべて安定であった。

Cephalosporin 系: CEZ, CCL, CER, CTM, CFT, CXD が力価の低下を示したが、その程度は弱かった。その他の薬剤は安定であった。

RICHMOND type Ic に分類されている¹⁸⁾この酵素は、 我々の結果においても type Ic と分類したが、PCG、 ABPC が分解されない点が異なっており、CBPC、MCI-PC、CEX が分解されない点は一致していた。これは、 誘導せずに培養した菌体酵素を用いているため、酵素産 生量が少なかったためとも考えられる。

vii) Pseudomonas aeruginosa No. 11 (Fig. 7)

Penicillin 系: PCG は力価の低下が急速で, 0.5 時間 後には完全失活し、ABPC、MZPC は 4 時間後に残存力 価が 2 µg/ml 以下となった。APPC、PIPC も力価の低 下をみたが、CBPC、SBPC、TIPC、MCIPC は安定であっ た。

Cephalosporin 系: CER, CEZ, CFT, CXD, CCL, CEX, CTM は酵素作用後 0.5 あるいは1時間後には2 μg/ml 以下まで力価が低下した。 CPZ は4時間目に力価の低下を認めた。その他の薬剤, CMD, CFX, CMZ, CXM, CFS, CTX, CZX, 6059-S, CMX は安定であり、力価の低下はまったく認めなかった。

この株の産生する酵素は、RICHMOND type Id と分類された。

Fig. 6 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Proteus vulgaris GN-76

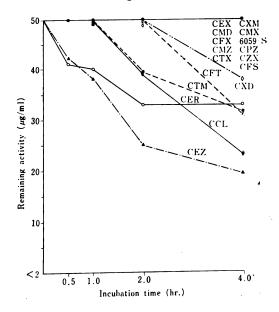


Fig. 7 (a) Enzymatic stability of penicillins

*Pseudomonas aeruginosa No. 11**

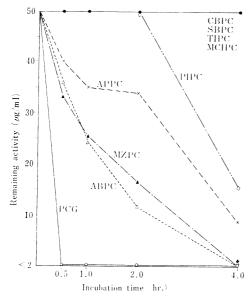
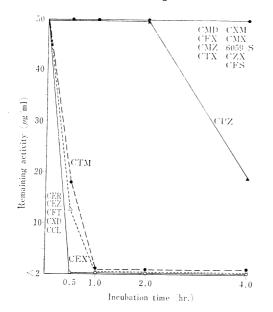


Fig. 7 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Pseudomonas aeruginosa No. 11



viii) Proteus mirabilis GN-79 (Fig. 8)

Penicillin 系: MCIPC 以外の薬剤はすべて急速に分解されたが、MCIPC だけは4時間まで安定であった。

Cephalosporin 系: CFS だけが 4 時間目に約 29 μ g/ml まで力価が低下したが、その他の薬剤はすべて安定であった。

この酵素は、 RICHMOND type IIb に分類されてい

Fig. 8 (a) Enzymatic stability of penicillins Proteus mirabilis GN-79

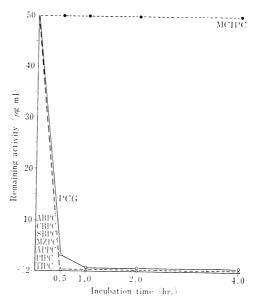
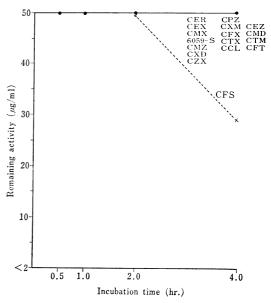


Fig. 8 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Proteus mirabilis GN-76



る 13)。 我々の実験においても、type IIに分類されたが、CBPC が分解されており、type IIa に分類される可能性もある。また Cephalosporin 系薬剤では、CFS[だけが分解されたことは興味深い。

ix) Escherichia coli ML-1410 RGN-823 (Fig. 9) Penicillin 系: MCIPC だけは力価の低下がゆるやかであり、その他の薬剤は急速に失活した。

Fig. 9 (a) Enzymatic stability of penicillins E. coli ML-1410 RGN-823

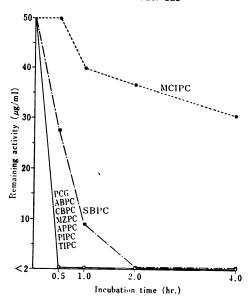
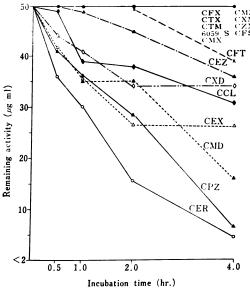


Fig. 9 (b) Enzymatic stability of cephalosporins E. coli ML-1410 RGN-823



Cephalosporin 系:薬剤によって分解程度(速度,量)に差があるが、最も分解されやすいのが CER であり、次に CPZ, CMD, CEX, CCL, CXD, CEZ, CFT の順に力価の低下がみられた。その他の薬剤はまったく分解されず安定であった。

この菌の産生する酵素は、RICHMOND type Ⅲ に分類されているが¹³、我々の実験においても type Ⅲ に分類

Fig. 10 (a) Enzymatic stability of penicillins Klebsiella pneumoniae GN-69

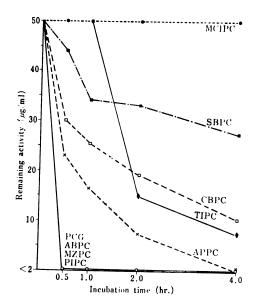
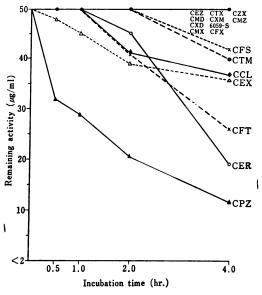


Fig. 10 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Klebsiella pneumoniae GN-69



された。しかし、MCIPC が分解されたこと、CBPC が よく分解されたことが少し異なっているが、酵素産生 量、および実験条件の差によるものと考えている。

x) Klebsiella pneumoniae GN-69 (Fig. 10)

Penicillin 系: PCG, ABPC, MZPC, PIPC は 0.5 時間後には力価が 2 μg/ml 以下まで低下したが、APPC, TIPC, CBPC, SBPC は徐々に低下した。 MCIPC は安定

Fig. 11 (a) Enzymatic stability of penicillins E. coli ML-1410 RGN-238

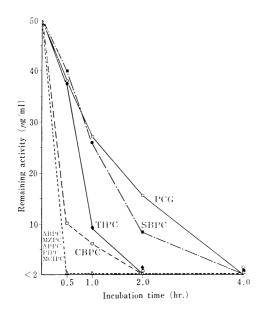
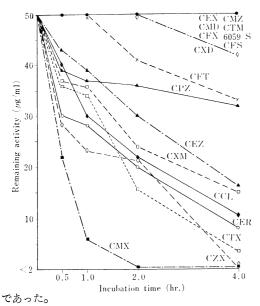


Fig. 11 (b) Enzymatic stability of cephalosporins E. coli ML-1410 RGN-238



Cephalosporin 系: CPZ が最も分解されや すく, その他分解されやすい順に, CER, CFT, CEX, CCL, CTM, CFSとなったが, その他の薬剤は安定であった。

この酵素は、RICHMOND type IV に分類されている¹³⁾。 我々の実験においても type IVに分類されたが、MCIPC が分解されない点が異なっていた。

Fig. 12 (a) Enzymatic stability of penicillins *Pseudomonas aeruginosa* No. 47

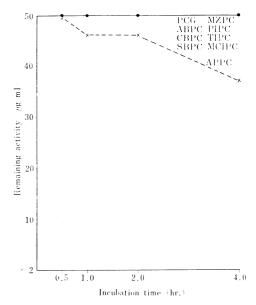
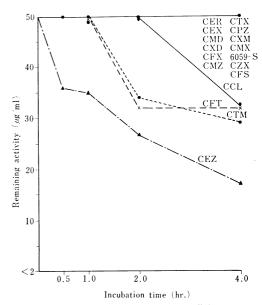


Fig. 12 (b) Enzymatic stability of cephalosporins

Pseudomonas aeruginosa No. 47



この酵素において、Cephalosporin 系薬剤のうちで、 最も分解されやすい薬剤が CPZ であった点は興味がも たれる。

xi) Escherichia coli ML-1410 RGN-238 (Fig. 11) Penicillin 系: すべての薬剤が、4時間後に2 µg/ml 以下まで力価が低下した。とくにABPC, MZPC, APPC, PIPC, MCIPC は0.5時間後にほぼ完全に失活した。

Fig. 13 (a) Enzymatic stability of penicillins Proteus vulgaris No. 9

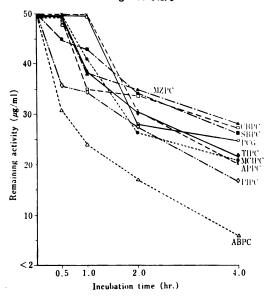
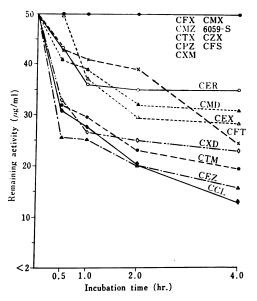


Fig. 13 (b) Enzymatic stability of cephalosporins Proteus vulgaris No. 9



Cephalosporin 系: 最も分解されやすいのが CMXで、次に分解されやすい順に、CZX, CTX, CER, CCL, CXM, CEZ, CPZ, CFT, CXD があった。CEX, CMZ, CMD, CTM, CFX, 6059-S, CFS は安定であった。

この酵素は、RICHMOND type Va に分類されているが10, 我々の実験においても type Va あるいは Vb に分類された。

Fig. 14 (a) Enzymatic stability of penicillins E. coli 121

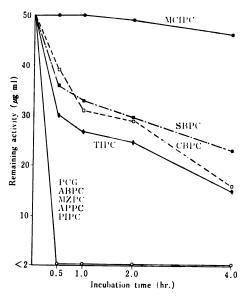
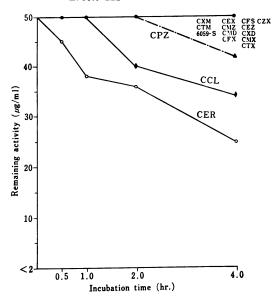


Fig. 14 (b) Enzymatic stability of cephalosporins E. coli 121



この株の産生する酵素においては非常に興味深い現象がおこっている。すなわち、Cephalosporin 系薬剤で、他の酵素に安定性の高い、CMX、CZX、CTX が最も分解されやすいことである。

xii) Pseudomonas aeruginosa No. 47 (Fig. 12)
Penicillin 系: APPC だけが若干分解されたが、その他は安定であった。

Cephalosporin 系:最も分解されやすいのは CEZ, その他力価の低下した薬剤に CTM, CFT, CCL があり, 他剤は安定であった。

この酵素は Richmond type V に分類したが、酵素 産生量が少ないため、はっきりとは分類できず、type I に分類される可能性もある。

xiii) Proteus vulgaris No. 9 (Fig. 13)

Penicillin 系:すべての薬剤に力価の低下がみられたが、そのカーブはゆるやかで、4時間後までに完全に失活したものはなかった。

Cephalosporin 系: Penicillin 系と同じく, 急速に力価の低下した薬剤はなかったが, CCL, CEZ, CTM, CXD CFT, CEX, CMD, CER はゆるやかなカーブで力価の低下がみられた。その他の薬剤は安定であった。

この酵素は、RICHMOND type V に分類 され たが、CEX が分解される点が異なっていた。分解される薬剤 すべてにおいて、分解される程度が弱く、酵素量など他の因子の影響が考えられる。

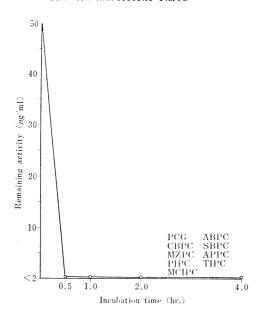
xiv) Escherichia coli 121 (Fig. 14)

Penicillin 系: PCG, ABPC, MZPC, APPC, PIPC は 急速に力価が低下し, 0.5 時間後にほぼ完全に失活し た。TIPC, CBPC, SBPC は徐々に力価が低下し, MCIPC はほとんど安定であった。

Cephalosporin 系: CER, CCL, CPZ が力価の低下を 示したが、その他の薬剤は安定であった。

この酵素は、RICHMOND type Nb あるいは Nc と分

Fig. 15 (a) Enzymatic stability of penicillins Serratia marcescens No. 78



類されたが、MCIPC の分解率が少ない点が異なっていた。

xv) Serratia marcescens No. 78 (Fig. 15)

Penicillin 系: すべてが急速に力価が低下し、0.5 時間後には $2 \mu g/ml$ 以下に至るまで失活した。

Cephalosporin 系: CER, CEZ, CFT, CMD, CXD, CCL, CPZ, CTM は 0.5 時間後には $2\,\mu g/ml$ 以下まで力価が低下し、CFS, CEX, CMX は、それよりもゆるやかなカーブで力価の低下が認められた。CFX, CMZ, CTX, CXM, CZX, 6059-S は安定であった。

この酵素は、非常に活性が高く、Penicillin 系薬剤は、すべての薬剤が0.5時間後には分解されてしまい、Cephalosporin 系薬剤も非常によく分解されるため、RICHMOND type にあてはめることはできなかった。

以上の RICHMOND type は Table 3 に示した。

IV. 考 察

本研究は菌の自然の状態での酵素を使用する意味で誘導をかけて酵素を取り出していない。

また、生物学的測定法によって薬剤の残存力価を測定しているので、失活は β -lactamase だけではなく他の因子、たとえば Penicillin 系では acylase の作用がある場合には、それらも含めた不活化を測定したことになる。

したがって、あらかじめ誘導の処理をした酵素を用いた場合、また測定法をヨード法などで行なった場合とでは異なる結果の出る可能性も考えられる。

Fig. 15 (b) Enzymatic stability of cephalosporins. Serratia marcescens No. 78

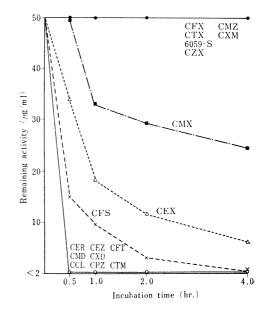


Table 3 RICHMOND type of enzyme producing gram negative bacilli

	RICHMOND type
Citrobacter freundii GN-346	Ιa
Proteus rettgeri GN-624	I a
Proteus inconstans GN-627	I a
Enterobacter cloacae No. 91	I a(2)
E. coli 35	Ιb
Proteus vulgaris GN-76	Ιc
Pseudomonas aeruginosa No. 11	Ιd
Proteus mirabilis GN-79	II Ъ
E. coli ML-1410 RGN-823	Ш
Klebsiella pneumoniae GN-69	N
E. coli ML-1410 RGN-238	V a
Pseudomonas aeruginosa No. 47	V(?)
Proteus vulgaris No. 9	v
E. coli 121	N borN c (?)
Serratia marcescens No. 78	(?)

Fig. 16 Chemical structure of penicillins

S. CH.

R-	COOH COOH
	R
PCG	€ -CH₂-
ABPC	(∑-сн− хн,
СВРС	COONA
SBPC	CH- SON
MZPC	CHISO:-N N-CONHCH-
APPC	N OH CONHCH-
PIPC	C,H,-N NCONHCH-
TIPC	S COONs
MCIPC	Q CH

酵素に対する安定性と構造についての関係において, Penicillin 系薬剤では、試験菌のほとんどの酵素に不安 定なものとして、PCG と ABPC があり、比較的安定な ものとして、CBPC、SBPC、TIPC、MCIPC、中間型とし て、MZPC、APPC、PIPC があった。

使用した薬剤の化学構造式は、Fig. 16, 17 に示したが、安定なものには carboxyl 基 -COO-あるいは sulfon 基 -SO₃- などの強酸性基があることが認められた。

Cephalosporin 系薬剤では,不活化されやすい薬剤と

Fig. 17 Chemical structure of cephalosporins

	R ₁	R ₂	R ₃	I	Rı	R ₂	Ra
CER	-сньЮ	Ç,L _{cur}	-н	CFS	сн "О со	O-CII-	-н
CEX	-CH ₁	О -сн-	-н	CFX	CH40CONH	"С и	-OCH3
CFT	CHS T	но-О-сн-	-н	CMZ	Cina i	N = CCH,8CH,	
CCL	-cı	O-cH-	-н	CPZ	CII.S N.N.	MIEN CONTR	H
CXD	-осн,	O-cH-	-Н	стх	симсоси	N J SH	-н
CEZ	сн, 5 сн	N=N N−CH,-	-H	czx	-н	HN S OH,	-н
CMD	CH ₂ S N CH ₂	О -сн-	-H	СМХ	N−N CH,S N,Ñ CH,S ĊH,	NT: NH. OH.	-н
СХМ	-CH ₁ OCONH ₂	<u>С</u> -8сн-	-н	6059-S	HO-CHCO	DCH.	Çi,
СТМ	CH,SIN	н. № ¶ ^S н. н.	-н				

して、CER、CEX、CFT、CCL、CXD、CEZ があったが、 これらの構造中には amino 基 -NH₈ などの塩基性基が 含まれている。

最も安定な 6059-S は、他の Cephalosporin 類と異なり1位が0原子で、7 位に methoxy 基 -OCH₈ がついており、また酸性基である carboxyl 基 -COO⁻ も R₂中に含まれている。

試験菌株の酵素の大部分に安定な薬剤のうち、CTX、CZX、CMX、CXM においては、 R_2 中に methoxyimino 基 =N-O-CH₃ がついており、この基によって安定性が高まっていると思われる。しか し一方、 Escherichia coli ML-1410 RGN-238 の産生する酵素にはこの 基のある薬剤が最も不安定であることから、同一菌種でも不活化酵素の性状が多岐にわたることが推察される。

また、他の安定な薬剤では、CFX、CMZ は7位にmethoxy基 -OCH。が結合しており、CFS は sulfon 基-SO₃-によって安定性が増加していると考えられる。

本研究は、生物学的測定法によって薬剤の残存力価を 測定しているが、ミクロヨード法などを使用した他の報 告 $^{15^{-17}}$ とかなり一致しており、不活化の主力が β -lactamase であることが推察された。

また、MIC と酵素に対する安定性の間には明確 な 相 関性が認められず、抗菌力には酵素の安定性 だけ で な く、薬剤の透過性や殺菌力の強弱などが大きく影響する と考えられる。

酵素の分類については、RICHMOND の分類では type Ia とされても、我々の実験結果においては、PCG、CTM

などの安定性に差がみられる場合もあり、誘導を加えた 酵素との差の可能性も考えられる。

薬剤の種類が増加している現在、これまでの分類法では分け切れない酵素を有する菌株が野外株に存在することが、以上の実験からもうかがうことができた。今後、新しい β -lactam 剤が増加するにつれ、酵素の基質特異性についても詳細な検討が必要となるであろう。

謝 辞

稿を終るにあたり、貴重な菌株を分与いただいた、群 馬大学医学部徴生物学教室に深謝致します。

文 献

- Neu, H. C.: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by gram-negative Beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 170~176, 1974
- 2) 田島政三, 三橋 進: CS-1170 の抗菌作用について。Chemotherapy 26, S-5, 21~26, 1978
- 宮村定男, 仁田原義之, 寺尾 通 徳: Cefuroxime に対する β-lactamase の作用。Chemotherapy 27, S-6, 66~68, 1979
- 4) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 逵 彦二: グラム陰性菌の産生する β-lactamase に対する Cefuroxime の安定性と抗菌力への影響: Chemotherapy 27, S-6, 70~75, 1979
- 5) Neu, H. C. & K. P. Fu: In vitro antibacterial activity and β -lactamase stability of SCE-129, a new cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 15:646 \sim 650, 1979
- 6) King, A.; K. Shannon & I. Phillips: In vitro antibacterial activity and susceptibility of Cefsulodin, an antipseudomonal cephalosporin, to Beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 165~169, 1980
- 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) MOUTON, R. P.; G. P. A. BONGAERTS & M. VAN GESTEL: Comparison of activity and Beta-

- lactamase stability of Cefotaxime with those of six other cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 16:757~760, 1979
- Kojo, H.; M. Nishida, S. Goto & S. Kuwahara: Antibacterial activity of Ceftizoxime (FK 749), a new cephalosporin, against cephalosporinresistant bacteria, and its stability to βlactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 16:549~553, 1979
- 10) Fu, K. P. & H. C. Neu: Antibacterial activity of Ceftizoxime, a β-lactamase-stable cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 583~590, 1980
- 11) Yoshida, T.; S. Matsuura, M. Mayama, Y. Kameda & S. Kuwahara: Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa-β-lactam with an expanded antibacterial spectrum: Laboratory evaluation. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 302~312, 1980
- 12) 横田 健: β-lactam 薬剤の抗菌力 とくに β-lactamase に対する安定性について。Chemotherapy 27, 2, 211~221, 1979
- 13) Richmond, M. H. & R. B. Sykes: The β-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In Advances in Microbial Physiology. A. H. Rose & D. W. Tempest, Eds. 9, 31~85, Academic Press, New York, N. Y., 1973
- 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) 山岸三郎, 沢井哲夫: グラム陰性菌の β-lactamase について (その分類を中心として)。 日本細 菌 学 雑誌 30:615~629, 1975
- 16) Neu, H. C. & K. P. Fu: Cefaclor: In vitro spectrum of activity and Beta-lactamase stability Antimicrob. Agents Chemother. 13:584~588, 1978
- 17) 小此木研二,木田 誠,米田雅彦,三橋 進: Cefotiam (SCE-963)のβ-lactamase に対する 態度および細菌細胞外膜透過性。Chemotherapy 27, S-3, 94~105, 1979

STABILITIES OF VARIOUS β -LACTAM ANTIBIOTICS TO THE INACTIVATING ENZYMES PRODUCED BY GRAM NEGATIVE BACILLI

ISAMU YOSHIDA, MASATOSHI OGAWA, SHUICHI MIYAZAKI,

KEIKO NISHIKATSU and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

Stabilities of β -lactam antibiotics (9 penicillins and 17 cephalosporins) to the inactivating enzymes produced by 15 strains of 10 gram negative bacilli, were investigated and the following results were obtained.

Among penicillins, the drugs that were inactivated by many β -lactamases were PCG, ABPC, MZPC, APPC and PIPC. CBPC, SBPC, TIPC and MCIPC were comparatively stable to the many β -lactamases. But their observed many varieties in the enzymes produced by different strains.

Among cephalosporins, the drugs that were inactivated by many β -lactamases were CER, CEX, CFT, CXD, CCL and CEZ. CFX, CMZ, CXM, CFS, CTX, CZX, 6059-S and CMX were almost stable. CMD, CTM and CPZ had the stabilities between the former and the latter, and showed the different stabilities to the various inactivating enzymes.

6059-S was completely stable to the all inactivating enzymes. The drugs that were inactivated by only one enzyme were CFX, CMZ, CXM and CZX. Other β -lactam antibiotics were inactivated by two or more inactivating enzymes.