

Cephem 系薬剤間の antagonism とグラム陰性菌における  $\beta$ -lactamase 誘導について

池田 文昭・高 乗 仁・西 田 実

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

五 島 瑳智子・桑 原 章 吾

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 57 年 10 月 9 日受付)

$\beta$ -lactamase を誘導的に産生する *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, Indole-positive *Proteus* spp. および *Pseudomonas aeruginosa* などの菌種において, Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin と第 3 世代 cephem 系薬剤との間には *In vitro* antagonism が認められた。特に第 3 世代 cephem 剤と cephamycin 類との antagonism は顕著であった。これらの現象は  $\beta$ -lactamase を構成的に産生する *Enterobacter cloacae* の変異株では認められない。またこれらの antagonism は強力な  $\beta$ -lactamase の inhibitor, carbapenem によって阻止された。Cefoxitin および Cefmetazole による *E. cloacae* の  $\beta$ -lactamase の誘導産生は Cephaloridine および Cefazolin よりも強力であった。

Cefoxitin が各種の  $\beta$ -lactam 剤の *In vitro* 抗菌活性を妨げることにについてはすでに報告されている<sup>1-5)</sup>。特に最近, Cefoxitin と他の  $\beta$ -lactam 剤との antagonism に関する C. C. SANDERS ら<sup>6)</sup>の研究結果は, この問題により鮮明な spot を当てた。一方, 現在第 3 世代 cephem 剤を含む多くの  $\beta$ -lactam 剤が臨床的に広範囲に应用されている。第 3 世代の cephem 剤の対象となる難治または複数菌の感染症においては, しばしば同一の患者に第 1 世代または第 2 世代の cephem 剤がさきに投与され, それらが無効であるケースに対して, その後第 3 世代の cephem 剤による治療が行なわれる。したがって, 第 3 世代の cephem 剤と第 1 および第 2 世代の cephem 剤との antagonism は, 上記の感染症の治療に影響を与える可能性がある。われわれはこのような観点から cephem 剤における antagonism の問題についての研究を行なった。

## I. 実験材料および実験方法

## 1. 使用薬剤

Cephaloridine (CER, Glaxo)

Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業)

Cefoxitin (CFX, Merck)

Cefmetazole (CMZ, 三共)

Cefotaxime (CTX, ヘキスト)

Ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業)

Latamoxef (LMOX, 塩野義製薬)

Cefoperazone (CPZ, 富山化学)

FR 26247 (新規 carbapenem 誘導体, 藤沢薬品工業, 中央研究所)

## 2. 使用菌株

この実験に用いた試験菌株は日本各地の病院より分与されたものである。

## 3. 感受性測定

MIC は寒天平板法を用いて測定した。cephem 系薬剤の相互作用を検討するため, Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin の各々一定量を Cefotaxime, Ceftizoxime, Cefoperazone および Latamoxef の 2 段階希釈濃度系列と同時に添加して平板を作製し MIC 測定に供した。

4.  $\beta$ -lactamase の誘導と酵素活性の測定

MINAMI らの方法<sup>7)</sup>に従って行なった。*Enterobacter cloacae* の一夜培養液を新鮮な Mueller Hinton broth で 10 倍希釈し 20  $\mu$ g/ml の濃度に各薬剤を加え, 37°C で 1 時間振盪した。その後集菌して 0.1 M リン酸 buffer (pH 7.0) で 1 回洗浄後, 超音波破壊してその上清を crude enzyme とした。酵素活性は Cephaloridine を基質として spectrophotometric method にて測定した。

蛋白定量は Bovine Serum Albumin を standard として LOWRY ら<sup>8)</sup>の方法で行なった。

## II. 結 果

1. Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin の第 3 世代 cephem 系薬剤の抗菌活性に及

Table 1 Antibacterial activity of third generation-cephemems in presence of CFX, CMZ, CER and CEZ against 12 strains of *S. marcescens*

Drug <sup>a</sup>	Mean MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>			
	CTX	CZX	LMOX	CPZ
None	2.70	1.04	14.0	47.2
CFX	19.8	6.25	15.7	159
CMZ	35.4	11.1	16.7	178
CER	14.0	5.57	17.7	189
CEZ	9.92	3.94	14.0	119

<sup>a</sup> Drug concentration: 20  $\mu\text{g/ml}$

<sup>b</sup> As determined by agar dilution

#### ぼす抑制効果

4種類の第3世代 cephem 系薬剤: Cefotaxime, Ceftizoxime, Latamoxef および Cefoperazone の臨床分離 *Serratia marcescens* (12株) に対する抗菌活性を、一定濃度の Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin の存在下で測定した。Table 1はそれらの結果を平均 MIC として示した。添加した 20  $\mu\text{g/ml}$  の Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin は *S. marcescens* のいずれの株の増殖にも全く影響を与えなかった。第3世代の各薬剤のこれらの試験菌株に対する活性は異なり、それらの活性は程度に差はあるが、共存する Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine, または Cefazolin によって抑制を受けた。Cefotaxime または Ceftizoxime の活性に対し、Cefazolin の影響は最も弱く、一方 Cefoxitin および Cefmetazole の抑制効果はより顕著であった。

#### 2. 第3世代 cephem 剤の抗菌活性に拮抗する cephem 剤濃度の影響

前項の結果から、第3世代 cephem 剤として Cefotaxime を選び、各種の濃度における Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine, および Cefazolin の antagonism を比較した。

*S. marcescens* を試験菌とした場合 (Fig. 1-a), Cefoxitin および Cefmetazole は 5~10  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度において Cefotaxime の活性を著しく抑制した。一方, Cephaloridine および Cefazolin の同濃度における阻害作用は軽度であった。しかし Cephaloridine および Cefazolin 両者の高濃度における作用は異なり、前者は濃度の増加とともに強い阻害効果を示したが、後者の影響は軽度であった。*E. cloacae* に対しても、Cefoxitin および Cefmetazole は Cefotaxime と強く拮抗したが、Cephaloridine および Cefazolin の拮抗作用は軽度であった (Fig. 1-b)。

#### 3. 各種の細菌における antagonism の出現頻度について

臨床分離の各種の細菌に対する Cefotaxime の MIC を、低濃度 (1/8 MIC) の Cefoxitin の存在下で測定した (Table 2)。それらの試験菌株に対する Cefotaxime の MIC が、Cefoxitin の共存によって4倍以上大きくなった場合を positive antagonism として、その頻度を求めた。penicillinase type の  $\beta$ -lactamase を誘導産生する *Staphylococcus aureus* では Cefoxitin と Cefotaxime の間には antagonism はみられなかった。また構成的に  $\beta$ -lactamase を産生する *Escherichia*

Fig. 1 Antibacterial activity of CTX in presence of CFX, CMZ, CER and CEZ at various concentrations

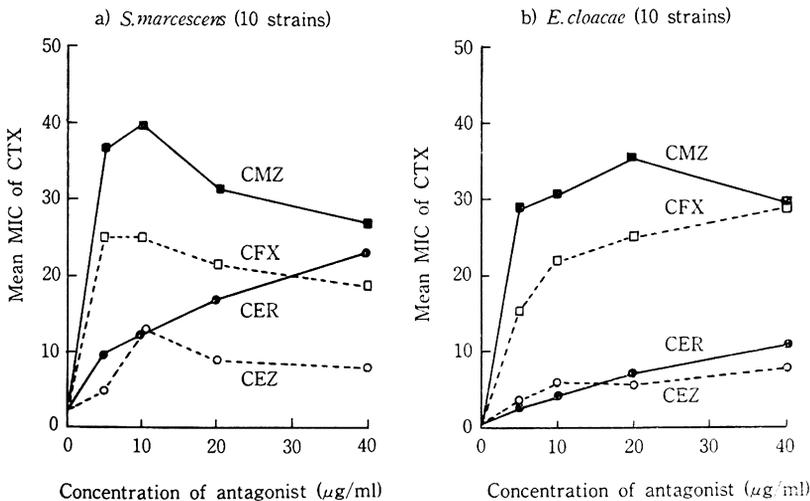


Table 2 Emergence of *in vitro* antagonism between CFX and CTX

Organism	No. of strains tested	% antagonism <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	0
<i>Escherichia coli</i>	19	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	0
<i>Proteus mirabilis</i>	20	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	19	12 (63%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	35	28 (80%)
<i>Citrobacter freundii</i>	33	26 (79%)
<i>Proteus vulgaris</i>	21	15 (71%)
<i>Morganella morganii</i>	21	14 (67%)
<i>Serratia marcescens</i>	27	15 (56%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	21(100%)

<sup>a</sup> Antagonism; 4 times or more increase of MIC values of CTX against test strains in presence of one-eighth the MIC of CFX for the indicated organisms.

Table 3  $\beta$ -lactamase induction in *E. cloacae* strains with CFX, CMZ, CER and CEZ

Strain	$\beta$ -lactamase activity <sup>b</sup>				
	Induced with				
	None	CFX	CMZ	CER	CEZ
<i>E. cloacae</i> 191	1.0	87	56	4.3	3.3
120	1.0	56	79	3.5	2.5
152	1.0	57	62	6.0	7.0
142	1.0	154	146	7.0	3.0
138	1.0	38	229	2.0	5.0
128	1.0	30	48	5.0	8.5

<sup>a</sup> Condition of  $\beta$ -lactamase induction; an overnight culture was diluted 10-fold into fresh medium (Mueller Hinton broth) containing 20  $\mu$ g/ml of each drugs and incubated with shaking at 37°C for 1 hour.

<sup>b</sup> Expressed as relative rate of CER hydrolysis.

*coli*, *Klebsiella pneumoniae* および *Proteus mirabilis* などでも拮抗作用は認められなかった。しかし、*Enterobacter* を含む誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌では、それぞれ高頻度に antagonism が認められた。

#### 4. *E. cloacae* における $\beta$ -lactamase 産生の誘導

Cefoxitin の存在下に、Cefotaxime に対する感受性が低下した *E. cloacae* 6株を任意に選び、各薬剤による  $\beta$ -lactamase の誘導産生を Cephaloridine を基質として測定した (Table 3)。Cefoxitin, Cefmetazole, Cephaloridine および Cefazolin などの 20  $\mu$ g/ml に

Table 4 Antibacterial activity of a third generation-cephem in presence of CFX against constitutive  $\beta$ -lactamase producing mutants of *E. cloacae*

Strain	MIC of CTX ( $\mu$ g/ml)	
	None	CFX <sup>a</sup>
<i>E. cloacae</i> 125	200	200
126	200	200
167	200	200
201	100	100
205	100	50
186	50	50
158	200	200

<sup>a</sup> Drug concentration: 20  $\mu$ g/ml

Table 5 Effect of  $\beta$ -lactamase inhibitor on antagonism in *E. cloacae*

Strain	$\beta$ -lactamase inhibitor <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml	MIC of CTX ( $\mu$ g/ml)	
		None	CFX <sup>b</sup>
<i>E. cloacae</i> 191	—	0.78	6.25
	+	0.39	0.05
120	—	0.78	25
	+	0.39	0.78
152	—	1.56	100
	+	3.13	3.13
142	—	0.39	25
	+	0.78	1.56
138	—	0.39	25
	+	0.39	0.78
128	—	0.39	6.25
	+	0.39	0.1

<sup>a</sup> Carbapenem derivative

<sup>b</sup> Drug concentration: 20  $\mu$ g/ml

*E. cloacae* が接触すると、 $\beta$ -lactamase の産生は例外なく誘導された。この場合、cephamycin type の2薬剤の誘導効果は極めて強く、Cefoxitin は非誘導時の30~154倍、Cefmetazole は48~229倍の酵素量を産生した。これに対して cephalosporin type の2薬剤の酵素誘導能は弱く、Cephaloridine で2~7倍、Cefazolin で2.5~8.5倍であった。

#### 5. *E. cloacae* の構成型 $\beta$ -lactamase 産生変異株に対する Cefoxitin の影響

*E. cloacae* の7株から自然変異によって構成的に  $\beta$ -lactamase を産生する株を選択し、それらの変異株に対する Cefotaxime の MIC を 20  $\mu$ g/ml の Cefoxitin の存在下で測定した (Table 4)。これらの変異株は、

Cefotaxime に耐性 (MIC ; 50~200  $\mu\text{g/ml}$ ) であったが, Cefoxitin の存在により, この値は変化しなかった。構成型  $\beta$ -lactamase 産生株に対しては, Cefotaxime と Cefoxitin の間に antagonism は認められなかった。

#### 6. Antagonism に対する $\beta$ -lactamase inhibitor の影響

cephalosporinase type の  $\beta$ -lactamase に, 非可逆的に不活化作用を示す carbapenem 誘導体の antagonism に対する影響を検討した (Table 5)。実験は *E. cloacae* への Cefotaxime の抗菌活性に対する Cefoxitin の antagonism が  $\beta$ -lactamase inhibitor, carbapenem によって阻害されるかどうかを検討した。6 株の *E. cloacae* を試験菌株としたが, Cefotaxime と Cefoxitin の antagonism は carbapenem によって例外なく消失した。この結果は, この種の antagonism は試験菌によって産生された  $\beta$ -lactamase に由来するものであることを示唆する。

### III. 考 察

cephalosporinase type の  $\beta$ -lactamase を誘導的に産生する *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, Indole-positive *Proteus* spp. および *P. aeruginosa* などの菌種において, 第 1, または第 2 世代 cephem 剤と第 3 世代 cephem 剤との間に *In vitro* antagonism が生じることを確認した。この antagonism は構成的に  $\beta$ -lactamase を産生する *Enterobacter* の変異株では生じない。また Cefoxitin を含む 4 薬剤の酵素誘導能と antagonism が相関することなどが明らかになった。Cefoxitin と  $\beta$ -lactamase との antagonism に関しては, すでに多くの研究がある<sup>1-6)</sup>。特に antagonism の機作に関しては, Cefoxitin によって  $\beta$ -lactamase 産生が誘導され, 酵素による  $\beta$ -lactam 剤の不活化が一因とされている。しかし第 3 世代の cephem 剤および抗 *Pseudomonas* 活性をもつ  $\beta$ -lactam 剤などの  $\beta$ -lactamase に安定な薬剤との antagonism については,  $\beta$ -lactam-derived barrier mechanism によると推定されている<sup>9)</sup>。すなわち inducer としての Cefoxitin によって, periplasmic space 内の  $\beta$ -lactamase level が上昇し, 酵素と薬剤との結合により, target proteins への薬剤の移行が妨げられる。このような barrier mechanism による antagonism の説明は, permeability barrier が欠損している *S. aureus* では antagonism が生じないという事実によっても支持される。われわれの実験成績から Cefoxitin を含む 4 種の cephem 剤は低濃度においても, 代表的な第 3 世代の cephem 剤と程度の差はあるが, 拮抗的に作用することを示した。最近,

KUCK ら<sup>9)</sup>および R. V. GOERING ら<sup>10)</sup>はそれぞれ Cefoxitin と他の  $\beta$ -lactam 剤との antagonism を *in vivo* において観察し, これらの薬剤を臨床的に併用することに問題を提議している。しかし現実には第 1 または第 2 世代の cephem 剤による治療に抵抗した感染症に第 3 世代の cephem 剤が投与されることはそれほど珍しくない。したがって, この種の antagonism の化学療法に対する影響を全く無視することはできないかもしれない。*S. marcescens* についての本報の結果 (Table 1, Fig. 1 および Table 3) から明らかとなり, Cefoxitin 以下の各薬剤と第 3 世代の各薬剤との *In vitro* antagonism の強さは, 両群の薬剤の組合せによってかなり相違する。しかし同一の 7 位側鎖をもつ aminothiazole type の cephem 剤 Cefotaxime と Ceftizoxime の *S. marcescens* に対する平均 MIC 値は 2.70  $\mu\text{g/ml}$  および 1.04  $\mu\text{g/ml}$  で両薬剤のこの菌種に対する活性は多少異なるが, 両薬剤にそれぞれ Cefoxitin が共存すると Cefotaxime では約 7 倍, Ceftizoxime では約 6 倍平均 MIC が上昇する。さらに Cefotaxime および Ceftizoxime と Cefoxitin 以外の cephem 剤との antagonism の強さ (MIC の上昇率) は比較的類似する。これは, *S. marcescens* の Cefoxitin-induced  $\beta$ -lactamase (Richmond type 1) に対する両薬剤の stability と affinity がほぼ等しいためであろう。しかし各  $\beta$ -lactam 剤との antagonism の結果として変化した Ceftizoxime の MIC 値は, Cefotaxime の MIC 値より常に低値であった。したがって, この種の antagonism が実際に, *In vivo* で確認されたとすれば *S. marcescens* による感染に対して, 酵素の誘導能をもつ薬剤が事前に投与された場合, 両薬剤の治療効果に相違が生じる可能性が考えられる。

### 文 献

- 1) CHATTOPADHYAY, B. & I. HALL: Antagonism between cefoxitin and cefuroxime. *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 490~491, 1979
- 2) FU, K. P. & H. C. NEU: The role of inducible  $\beta$ -lactamases in the antagonism seen with certain cephalosporin combinations. *J. Antimicrob. Chemother.* 7: 104~107, 1981
- 3) GRIMM, V. H.: Bacteriological antagonism between acylureido-penicillins and cephalosporins. *Arzneim. Forsch.* 30: 999~1000, 1980
- 4) SANDERS, C. C. & W. E. SANDERS, JR.: Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 792~797, 1979
- 5) WATERWORTH, P. H. & A. M. EMMERSON: Dis-

- sociated resistance among cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 497~503, 1979
- 6) SANDERS, C. C.; W. E. SANDERS, JR. & R. V. GOERING: *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 968~975, 1982
- 7) MINAMI, S.; A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 382~385, 1980
- 8) 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
- 9) KUCK, N. A.; R. T. TESTA & M. FORBES: *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of combinations of beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 634~638, 1981
- 10) GOERING, R. V.; C. C. SANDERS & W. E. SANDERS, JR.: Antagonism of carbenicillin and cefamandole by cefoxitin in treatment of experimental infections in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 963~967, 1982

## ANTAGONISM OF CEPHEM ANTIBIOTICS AND $\beta$ -LACTAMASE INDUCTION IN GRAM-NEGATIVE BACILLI

FUMIAKI IKEDA, HITOSHI KOJO and MINORU NISHIDA

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

SACHIKO GOTO and SHOGO KUWABARA

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine, Tokyo, Japan

Cefoxitin, cefmetazole, cefazolin and cephaloridine antagonized the *in vitro* antibacterial activity of third generation cephem antibiotics against most of bacteria possessing inducible cephalosporinase, such as *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, Indole positive *Proteus* spp and *Pseudomonas aeruginosa*. The extent of antagonism varied among cephem antibiotics tested, and the ability of cefoxitin and cefmetazole to antagonize was more potent than those of cefazolin and cephaloridine. No antagonism with cefoxitin was found in the mutant strains of *E. cloacae* possessing constitutive  $\beta$ -lactamase. Cefoxitin-induced antagonism in strains of *E. cloacae* was inhibited by a carbapenem derivative, the  $\beta$ -lactamase inhibitor.