

Ceftriaxone (Ro 13-9904)の β -lactamaseに対する 安定性、ペニシリン結合タンパク質に対する親和性、および補体ならびに マクロファージとの協力的殺菌作用

横田 健・関口 玲子・鈴木 映子

順天堂大学医学部細菌学教室

要 旨

ヒトにおける血中半減期が長いのを特徴とする ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)は、多くの β -lactamaseに安定であるが、plasmid支配のIII (TEM) 型および染色体性のIc型酵素では軽度水解された。作用点であるペニシリン結合蛋白 (PBP) に対しては、大腸菌、セラチア、コレラ菌において細胞伸長時に必要なムレイン架橋酵素と考えられるI_A, I_B, I_{A'} (コレラ菌), I_C (セラチア) によく結合するので、殺菌力に優れた薬剤と考えられた。しかしセラチアのPBPに対しては他の菌のそれに対するより親和性がやや低かった。CTRXは血清蛋白と高率に結合するため、試験管内では血清補体との協力的殺菌作用を立証することができなかったが、そのsub MIC存在下で大腸菌細胞は培養マウス・マクロファージによく食菌されるうえ、容易に殺菌、消化された。

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904)は7位側鎖に2-aminothiazolyl-2-methoxyiminoacetamidoをもち、3位にtriazinyl thiomethyl側鎖をもつ新しい第三世代cephemで、その特徴は血清タンパク質と高率に結合し、徐々に解離するためヒトにおける血中半減期が7時間以上に及ぶ点にある。本研究においてはCTRXのグラム陰性菌の産生する各種 β -lactamaseに対する安定性を調べるとともに、*Escherichia coli*, *Serratia marcescens* および *Vibrio cholerae* のペニシリン結合タンパク質 (PBP) に対する親和性を検討した。また20%ヒト非飽和血清および2%モルモット補体共存下における、CTRX 50%増殖阻止濃度の殺菌作用や、1~1.8MICのCTRX存在下におけるマクロファージ (M ϕ) の食菌、殺菌作用についても研究を進めた。

I. 材料および方法

1. 被検菌株

教室保存の *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* 13 および *V. cholerae* 569 B株を使用した。また標準 β -lactamase Type I_A, I_C, II, III (TEM), IV, およびVの産生菌として *Enterobacter cloacae* Nek 39, *Proteus vulgaris* 33, *Proteus mirabilis* JY 10, *E. coli* CSH 2 (pRK 1), *Klebsiella* sp. 42 および *E. coli* CSH 2 (pRE 45)を用いた。

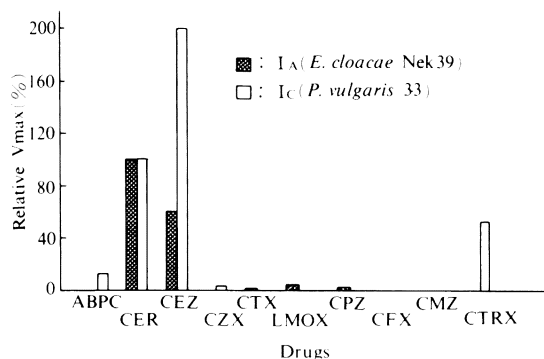
2. β -lactamase に対する安定性の検討

β -lactamase産生標準株を5 ml L-broth中で37℃一夜前培養し、その4 mlをL-broth 200mlに接種、KLETT光電比色計でNo66のフィルターを使用し、濁度がKLETT100になるまで37℃ 3.5~4時間振とう培養した。遠心集菌した菌細胞を氷冷した0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で一回洗浄し、同緩衝液6 mlに再浮遊した後、氷冷下で10kc, 30秒, 4回音波処理を行い、菌細胞を破壊した。この細胞抽出液を100,000g, 30分超遠心した上清を、 β -lactamase粗酵素液とした。CTRXの各種 β -lactamaseに対する安定性は、macroiodometry¹⁾による V_{max} 値として他の β -lactam抗生物質のそれと比較した。

3. PBP に対する親和性の検討

E. coli, *S. marcescens* および *V. cholerae* を10mlのL-brothで37℃、一夜振とう培養した。その全量をそれぞれ200mlの新鮮L-brothに接種し、37℃振とう培養を4時間行い対数増殖期後半の菌細胞を得た。冷却遠心で集めた菌細胞を一回0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、10mM MgCl₂加0.05Mリン酸緩衝液8 mlに再浮遊した。菌細胞の破壊は、*E. coli* と *S. marcescens* は氷冷下における10kc, 30秒10回の音波処理で、*V. cholerae* は10kc, 30秒5回の音波処理で行った。細胞破碎液からの膜画分の調製、およびPBPの検出法はSprattの原法²⁾を改良した方法³⁾で行った。CTRX, cefotaxime (CTX), および ceftazidime (CAZ) のPBPに対する競合結合は、

Fig. 1 Relative hydrolysis rates of various cepheids by cephalosporinase-type β -lactamases of gram(-) rods



0.008~625 μ g/mlの薬剤で、それぞれの菌の膜画分を30 $^{\circ}$ C、10分間処理した後、 14 C-benzyl penicillin (PCG)を結合させ、蛍光オートラジオグラフィーで検出した。

4. 補体との協力的殺菌作用の検討

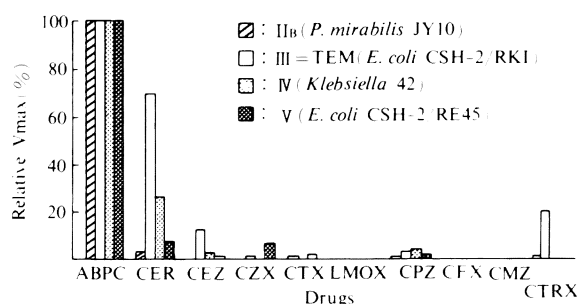
L-brothで*E. coli* NIHJ JC-2を37 $^{\circ}$ C一夜振とうして前培養を行い、それを希釈してCTRX種々の濃度を含む10mlの新鮮L-brothに 1×10^5 cells/ml接種した。37 $^{\circ}$ C一夜振とう培養後、Klett比色計で増殖濁度を測定し、薬剤無添加L-broth中の濁度の半分となる薬剤濃度を50%増殖阻止濃度(50%growth inhibitory doses: ID₅₀)とした。

補体とCTRXとの協力的殺菌効果を検討するには、既に報告したごとく、この菌の増殖に影響を与えない最高濃度の血清因子、すなわち20%ヒト非働化血清(Miles, USA)と2% (0.75U)新鮮モルモット補体添加または無添加のL-brothにID₅₀のCTRX, CZXまたはcefazolin (CEZ)を加え、総量10mlにしたものに、一夜前培養した*E. coli* NIHJ JC-2を 1×10^5 cells/ml接種し、37 $^{\circ}$ Cで振とう培養を続けながら、その一部を培養開始後3および5時間目にとり、生菌計算を平板法で行って、補体と薬剤の協力的殺菌作用を検討した。

5. 薬剤存在下における培養M ϕ の食菌殺菌作用の検討

M ϕ はICR、♂、6週齢マウスの腹腔を10% fetal calf serum加MCDB 103培地5 mlで洗い、その洗浄液を遠心して得た。Falcon multidish (Falcon, USA)各wellに凹型カバースリップを置き、 5×10^4 cells/mlのM ϕ 浮遊液0.2mlを加え、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂大気中で2時間保温後、同培地0.8mlを加え、さらに37 $^{\circ}$ C一夜CO₂培養を続けた。培地を除き、浮遊細胞を除去した後、L細胞培養上清(L cell conditioned medium: LCM) 20%加

Fig. 2 Relative hydrolysis rates of various cepheids by penicillinase-type β -lactamases of gram(-) rods



MCDB103培地1 mlを各wellに加え、2時間37 $^{\circ}$ C CO₂培養を行ってM ϕ を活性化した。これに*E. coli* NIHJ JC-2生細胞 1×10^6 cells/wellを加え、さらに1~1/8 MICのCTRXを添加し、CO₂培養を続けながら1~4時間目にカバースリップをとり出し、生理食塩水で洗浄後、methanolで固定し、giemsa染色して光学顕微鏡で観察した。電子顕微鏡には洗浄したカバースリップを2% glutaraldehydeで固定し、paradium platinum蒸気で蒸着し、日立走査電顕S-700型で観察した。

II. 成 績

1. CTRXの β -lactamase安定性

CTRXは、Fig. 1に示すとおり*E. cloacae*等弱毒グラム陰性桿菌が染色体性に産生するIA型 β -lactamaseには全く加水分解されないが、*P. vulgaris*, *P. cepacia*, *Bacteroides fragilis*等が染色体性につくるIc型 β -lactamaseには、他の第三世代cephemより不安定で、ある程度水解される。*P. vulgaris*の臨床分離株の多くは β -lactamase産生量が低いので、この薬剤に感受性を示すものが多いが、*P. cepacia*や*B. fragilis*は酵素産生量の高いものが多いので、これらの菌に対してはCTRXの抗菌力は弱い。

Penicillinase (PCase)型 β -lactamaseに対するCTRXの安定性をFig. 2に他薬剤と比較した。CTRXは*P. mirabilis*のII型、5%以下のR因子のつくるV型(OXA型)および*Klebsiella*属のつくる染色体性IV型 β -lactamaseには加水分解されないが、95%以上のR因子が支配するIII(TEM)型 β -lactamaseには他の第三世代cephemより安定性が低い。

2. CTRXのPBPに対する親和性

CTRXは*E. coli* PBPに対してはFig. 3のごとくPBP 3, 1A, 1B, 2の順に結合親和性が高い。しかし

Fig. 3 Competition of CTRX for penicillin binding proteins of *E. coli* NIHJ JC-2

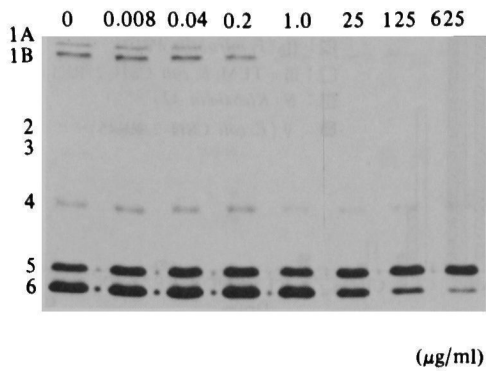


Fig. 4 Competition of CTRX for penicillin binding proteins of *S. marcescens* 13

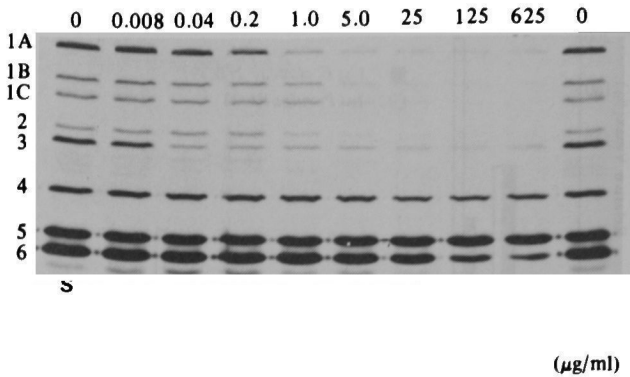


Fig. 5 Competition of CTRX for penicillin binding proteins of *V. cholerae* 569B

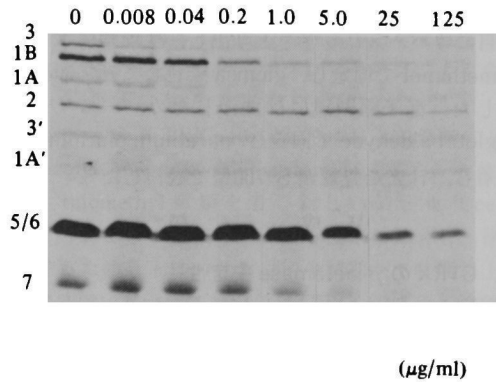


Fig. 6 Competition of various cephalosporin derivatives for penicillin binding proteins of *V. cholerae* 569B

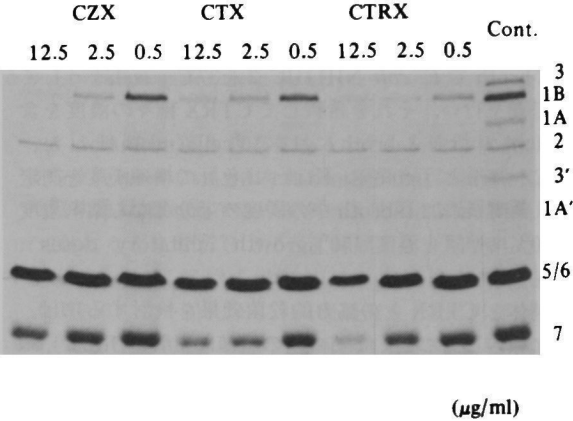
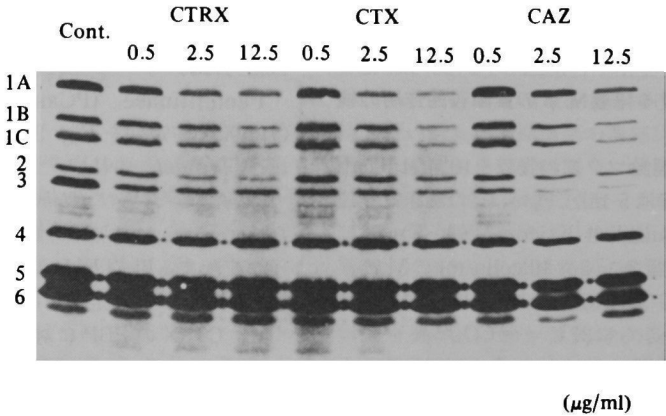


Fig. 7 Competition of various cephalosporin derivatives for penicillin binding proteins of *S. marcescens* 13



1.0 μ g/mlで最も重要な1A、1Bを含め、菌生存に必須なすべてのPBPに強く結合する。*S. marcescens* のPBPに対しては、Fig. 4のごとく2、1A、1C、1B、3の順に親和性が高い。*E. coli* のPBPに比べ、*S. marcescens*の方が結合性が低いので、この薬剤の抗菌力が*E. coli*に対して*S. marcescens*よりも強い理由が説明される。Fig. 5に*V. cholerae*のPBPに対するCTRXの競合結合の結果を示した。この場合は3、1A、1Bの順に結合親和性が高いが1.0 μ g/mlでPBP 2以外の画分には十分結合するので、大腸菌同様この薬剤が*V. cholerae*にも強い抗菌力を示す理由がわかる。一般に第

Table 1 Concentration of CTRX required reduce [¹⁴C] benzyl, penicillin binding by 50%

<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>S. marcescens</i> 13		<i>V. cholerae</i> 569B	
1A	0.1	1A	0.35	3	<0.008
1B	0.4	1B	4.0	1B	0.13
2	0.45	1C	2.1	1A	0.07
3	<0.008	2	35	2	>125
4	500	3	0.02	3'	0.1
5	>625	4	>125	1A'	>125
6	80	5	>125	5/6	12
		6	>125	7	20

(μ g/ml)

三世代cephemは、*Vibrio*に対する抗菌力が β -lactam 薬剤中では例外的に強いが、Fig. 6に示すとおり *V. cholerae* のPBPに対しては、CTXやCZXも高い親和性を示す。しかし、その中でもCTRXは特に低濃度で *V. cholerae* のPBPによく結合する。*S. marcescens* のPBPに対するCTRXの結合親和性をCTXおよびCAZと比較すると、Fig. 7のごとく、CTRXはCTXと同程度に強い結合親和性を示し、CAZよりも優れている。しかし、この菌に対する抗菌力はCTRXとCAZがCTXよりやや優れているので、CTRXはCTXより作用点における力が強いため、CAZはこの菌の外膜通過性がCTXより良好なため抗菌力に差がみられるものと考えられる。Table 1に三菌種のPBPに対するCTRXの競合結合実験をデンストメーターで測定して数量化した成績を示した。

3. CTRX と補体の関係

一般に *E. coli* では、PBP 1 A と 1 B 両方に高い結合親和性を持つ β -lactam 薬剤は、自身の殺菌力が強いばかりでなく、補体との協力的殺菌作用も顕著なことが経験的に知られている^{3,4)}。CTRX も oxime 型 cephem 系抗生物質の1つとして上記の特徴を持つはずであるが、われわれの行った試験管内実験の結果では Fig. 8に示すとおり、殺菌力を示さない程度のヒト血清とモルモット補体が共存すると、ID₅₀のCTRXの殺菌力は低下する。これはCEZやCPZ同様血清タンパク結合率が高いために、薬剤の血清蛋白への吸着量がCZX等より多く薬剤濃度が血清添加によりID₅₀以下になるためと考えられ

Fig. 8 Synergy of bactericidal effect between the serum complement and 50% growth inhibitory concentrations of CTRX, CZX and CEZ

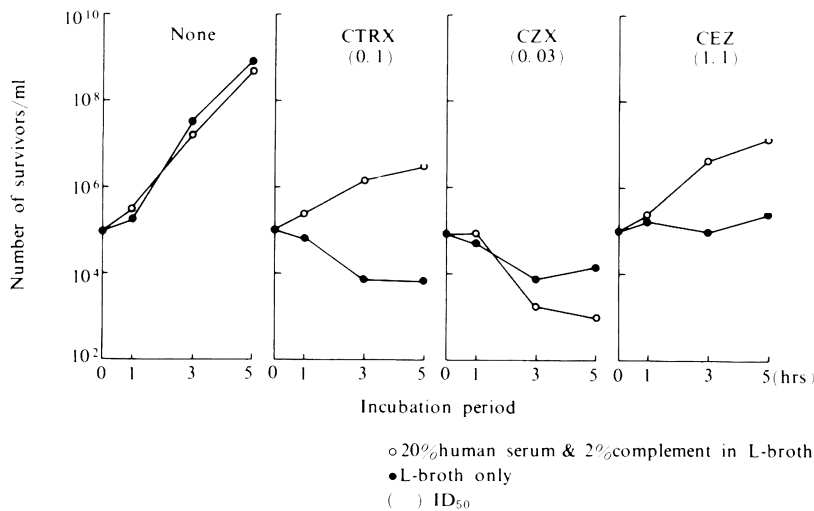


Fig. 9 Scanning electronmicroscopy of cultured mouse macrophages phagocytizing *E. coli* NIHJ JC-2 cells in the absence of drugs

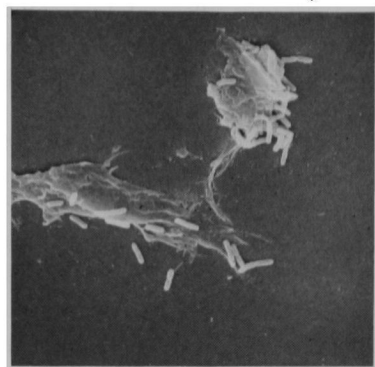


Fig. 10 Scanning electronmicroscopy of cultured mouse macrophages phagocytizing *E. coli* NIHJ JC-2 cells in the presence of MIC (0.05 $\mu\text{g/ml}$) of CTRX

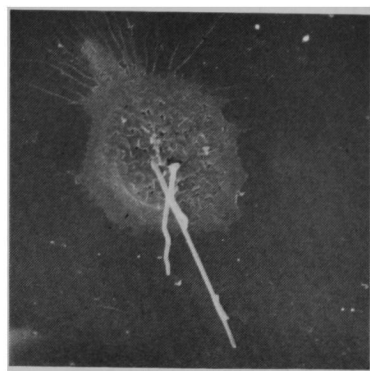
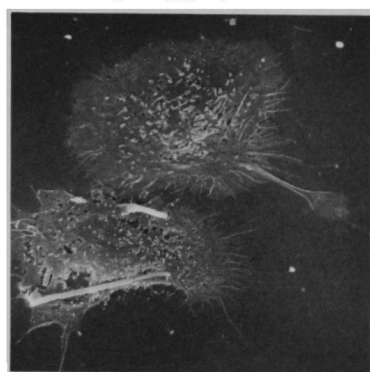
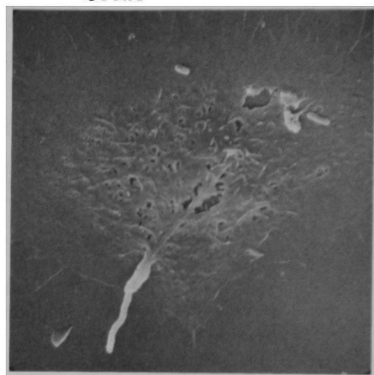


Fig. 11 Scanning electronmicroscopy of cultured mouse macrophages phagocytizing *E. coli* NIHJ JC-2 cells in the presence of 1/2MIC (0.025 $\mu\text{g/ml}$) of CTRX



る。しかし、生体内では補体量も多く(平均70U/ml), CTRXの濃度も高いうえ、 ID_{50} を上まわる持続時間が長いので、この試験管内実験の成績だけから、本剤の生体内効果を評価することはできない。しかし血清蛋白結合率以外の条件が同一であれば(実際にはそのような例はないが)、結合率の低い薬剤の方が補体との協力的殺菌作用は強い理屈になるであろう。

4. CTRXとM ϕ の協力的食菌殺菌作用

CTRXの1/2MIC存在下でも、filament化した細胞はM ϕ によく食菌され消化される(Fig. 9, 10, 11)。

III. 考 察

抗菌力の面から考えると、CTRXはすでに開発された第三世代cephemに比べ、Ic型およびIII(TEM)型 β -lactamaseにやや安定性が低いが、*S. marcescens*および*V. cholerae*の作用点(PBP)に対する親和性は他のものより高いので、その点で価値あるものと考えられる。また血清タンパク質との結合率が高いため、補体との協力的殺菌作用は試験管内で立証できなかった。しかしsub MIC存在下でもM ϕ とは良好な協力的食菌作用が認められるので、その生体内効果も第一、第二世代cephemに比べれば良好と考えられる。この薬剤の最大の特徴は、生体内における長い血中半減期にあるので、それと抗菌力とを考えあわせると、臨床的には良好な治療効果が得られることが期待される。しかし、血清タンパク質との高い結合率は、薬物がハフテンとして薬剤アレルギーを誘発する危険性もなしとしないので、この点の詳細な研究が望まれる。

文 献

- 1) ROSS, G. W. & C. H. O' CALLAGHAN : β -Lactamase assay. Methods Enzymol. 43 : 69~85, 1975
- 2) SPRATT, R. 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
- 3) 横田 健, 関口玲子 : Ceftizoxime (CZX)の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合タンパク質に対する親和性と殺菌力の関係。Chemotherapy 28 (S-5) : 44~49, 1980
- 4) 横田 健, 関口玲子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365)の各種 β -lactamase およびペーシリン結合タンパク質に対する親和性とその抗菌力との関係。Chemotherapy 29 (S-1) : 32~41, 1981

CEFTRIAXONE (Ro 13-9904), ITS STABILITY TO β -LACTAMASES,
AFFINITIES TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS (PBPs)
OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA, AND THE SYNERGY
WITH THE COMPLEMENT AND MOUSE CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, REIKO SEKIGUCHI and EIKO SUZUKI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

A long-acting 3rd generation cephem antibiotic, ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) was confirmed to be stable against various types of β -lactamases, except the type III (TEM) encoded by plasmids in gram-negative bacilli and the type IC controlled by the chromosones of *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacteroides fragilis* etc., by which the antibiotic was hydrolysed in some extent.

CTRX was found to possess a high binding affinity to the penicillin-binding proteins (PBPs) IA, IB, Ic and 3 fractions of *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Vibrio cholerae*, which have been understood as essential cross-linking enzymes for the murein biosynthesis required for the cell-elongation. This fact may indicate that the antibiotic is highly bactericidal. Since the antibiotic has a high binding capacity to the serum proteins, it was difficult to demonstrate the synergy of the bactericidal effect with the serum complement *in vitro*. However, cells of *E. coli* were well engulfed and digested by mouse cultured macrophages in the presence but not in the absence of sub MIC of this antibiotic.