

## $\beta$ -Lactamase に対する Cefbuperazone の *in vitro, in vivo* 安定性

渡辺 泰雄・南 新三郎・松原 信之・能見 寿彦  
荒木 春美・保田 隆・高井 明・才川 勇  
富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和 60 年 4 月 25 日受付)

各種  $\beta$ -lactamase に対する Cefbuperazone (CBPZ) の *in vitro, in vivo* 安定性を Cefmetazole (CMZ), Cefotaxime (CTX) および Cefazolin (CEZ) と比較した。

*K. pneumoniae* Y-4 由来の penicillinase, *P. vulgaris* T-178 由来の cefuroximase に対して CBPZ は CMZ と同様に CTX, CEZ に比べ安定であった。また *E. cloacae* H-27, *C. freundii* GN 346 由来の cephalosporinase に対しては CBPZ は CMZ, CTX, CEZ に比べ安定であった。

Pouch 内感染ラットに各薬剤 100 mg/kg を i. v. 投与したときの血中および浸出液中濃度を測定した結果, *P. vulgaris* T-178 感染群の CTX を除いた各薬剤の血中濃度は感染菌による影響はほとんど認められなかった。一方, CBPZ の浸出液中濃度は非感染群と感染群間に差は認められなかったが, *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 感染群の CTX は非感染群に比べ低く推移した。また CMZ では *E. cloacae* H-27 感染群で, CEZ ではすべての感染群において薬剤の活性が認められなかった。この濃度の低下は感染菌由来の  $\beta$ -lactamase によって加水分解されたためと考えられ, *in vitro* の  $\beta$ -lactamase に対する安定性の成績が *in vivo* にも反映するものと思われる。

近年, Cefoxitin (CFX)<sup>1)</sup>, Cefmetazole (CMZ)<sup>2)</sup>, Cefotaxime (CTX)<sup>3)</sup> のように 7 $\alpha$  位にメトキシ基あるいは 7 位側鎖にメトキシミノ基を有する多くのセフェム剤が開発されており, 各種  $\beta$ -lactamase に対して高い安定性を示すことが知られている。Cefbuperazone (CBPZ)<sup>4)</sup> においても高い安定性を示すことが報告されているが, 著者らはさらに cephalosporinase (CSase) 高度産生株の培養液中およびその粗酵素液中における CBPZ の安定性を検討した結果, CFX, CMZ, Cefotetan, Cefazolin (CEZ) より優れていることを明らかにしている<sup>5)</sup>。

そこで, 今回 CBPZ, CMZ, CTX, CEZ を用い, *in vitro* での  $\beta$ -lactamase に対する安定性が生体内にどのように反映するかについて検討を加えたのでその成績を報告する。

### I. 材料および方法

#### 1. 使用薬剤

Cefbuperazone (CBPZ, 富山化学工業), Cefmetazole (CMZ, 三共), Cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), Cephaloridine (CER, 鳥居薬品), Ampicillin (ABPC, 富山化学工業) を使用した。なお, 薬液は用時調製した。

#### 2. 使用菌株

臨床分離株である *Enterobacter cloacae* H-27 (CSase 産生菌), *Citrobacter freundii* GN 346 (CSase 産生菌), *Proteus vulgaris* T-178 (CXase 産生菌) および *Klebsiella pneumoniae* Y-4 (PCase 産生菌) を用いた。

#### 3. $\beta$ -Lactamase の調製

Brain heart infusion broth (BHIB, Difco) で 37°C, 18 時間培養した菌液を新鮮な BHIB 31 に 10% になるように接種し, 37°C で振盪培養を行なった。3 時間後, インデューサーとして ABPC を 50  $\mu$ g/ml になるように添加し, さらに 2 時間振盪培養を行ない遠心 (10,000 g  $\times$  30 min) にて集菌した。なお *K. pneumoniae* Y-4 では ABPC の添加は行なわなかった。得られた菌体を 0.1 M phosphate buffer (p. b., pH 7.0) で 2 回洗浄し, 再び同 p. b. に懸濁した。次いで菌体を氷冷下で超音波破碎した後, 10,000 g  $\times$  30 min の遠心上清を粗酵素液とした。さらに精製は CM-セフアデックスカラムで行なった。

#### 4. $\beta$ -Lactamase 活性の測定法

マイクロオード法<sup>6)</sup>および UV法<sup>7)</sup>で行ない, 30°C, 0.05 M p. b. (pH 7.0) 中で 1 分間に 1  $\mu$  mole の基質を分解するのに必要な酵素量を 1 unit とした。

## 5. 粗酵素液中における薬剤の安定性

粗酵素液 9 容に 50  $\mu\text{g/ml}$  になるように各薬剤液の 1 容を添加した後、37°C でインキュベートし、経時的にサンプリングを行なった。採取後直ちに等量の冷メタノールを加え酵素反応を止めた後、遠心 (1,200 g  $\times$  10 min) 上清の薬剤濃度を Bioassay 法で測定した。

## 6. ラット無菌炎症 pouch の作製

体重 130~150 g の Wistar 系雄性ラットの背部皮内に 25 ml の空気を注入して pouch を作製し、これに 1% クロトン油を含有する綿実油 1 ml を注入して無菌的浸出性炎症を惹起した。炎症惹起翌日に空気を抜き、7 日あるいは 9 日後に実験に供した。

## 7. Pouch 内感染ラットにおける血清中、浸出液中濃度測定

CBPZ, CMZ および CTX 投与群では pouch 作製 9 日後、CEZ 投与群では 7 日後に 20% ムチンに懸濁した *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 および *K. pneumoniae* Y-4 をそれぞれ  $5 \times 10^8$  cells/pouch,  $3.5 \times 10^9$  cells/pouch,  $3.5 \times 10^9$  cells/pouch になるように接種した。1 時間後に各薬剤の 100 mg/kg をそれぞれ i.v. 投与し、経時的に頸静脈から血液、pouch から浸出液を採取した。血液は氷冷下に放置後、遠心 (1,200 g  $\times$  15 min) で血清を分離した。また、浸出液は採取後直ちに等量の冷メタノールを加え遠心 (1,200 g  $\times$  10 min) 分離を行なった。いずれも濃度測定まで氷冷下で保存した。

## 8. Pouch 内生菌数測定

Pouch 内生菌数の測定は、I.7 で採取した浸出液の一部を生理食塩水で適当に希釈し、Nutrient agar (NA, 栄研) 上に塗抹し、37°C 一夜培養後のコロニーをカウントした。

## 9. 薬剤濃度測定法

CBPZ は *K. pneumoniae* ATCC 10031, CMZ, CTX は *M. luteus* ATCC 9341, CEZ は *B. subtilis* ATCC 6633

を検定菌とするペーパーディスク法で濃度測定を行なった。標準曲線は血清の場合ラット血清 (pH 7.4 に調整) を、浸出液の場合 50% のメタノール含有 1/15 M p. b. (pH 7.0) で作製した。なお、ディスクはメタノールを除去するためフラン器中で 30 分間放置した後プレートにはりつけた。

## 10. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

各薬剤の 2 倍希釈系列を含む BHIB 中に BHIB で一夜培養した菌液を  $10^7$  cells/ml になるように接種し、37°C, 18 時間培養後 MIC を判定した。

## II. 結 果

1. 各種  $\beta$ -Lactamase に対する安定性

各菌株由来の  $\beta$ -lactamase に対する CBPZ の安定性を CER の加水分解速度を 100 とした相対加水分解速度で表わし、CMZ, CTX, CEZ と比較した。その結果を Table 1 に示す。

*E. cloacae* H-27 由来の CSase に対して、CBPZ は最も安定で、次いで CMZ, CTX であり、CEZ は CBPZ に比べ 5,000 倍以上劣っていた。*C. freundii* GN 346 由来の CSase に対しては、CBPZ, CTX > CMZ > CEZ の順に安定であった。*P. vulgaris* T-178 由来の CXase に対する CBPZ, CMZ の安定性は CTX, CEZ に比べ明らかに優れていた。また *K. pneumoniae* Y-4 由来の PCase に対しても CBPZ, CMZ は CTX, CEZ より優れた安定性を示した。

## 2. 粗酵素液中における薬剤の安定性

各粗酵素液中における薬剤の安定性を検討した成績を Fig. 1 に示す。

CBPZ は *E. cloacae* H-27 の粗酵素液中で 4 時間後若干活性の低下がみられたが、他の 3 菌種の粗酵素液中では活性の低下はほとんど認められなかった。CMZ は *P. vulgaris* T-178, *K. pneumoniae* Y-4 の粗酵素液中では安定であったが、*C. freundii* GN 346 の粗酵素液中では

Table 1 Stability of cephem antibiotics to  $\beta$ -lactamase

Cephem antibiotics	<i>E. cloacae</i> H-27		<i>C. freundii</i> GN346		<i>P. vulgaris</i> T-178		<i>K. pneumoniae</i> Y-4	
	Vr <sup>a)</sup>	MIC <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vr	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vr	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vr	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
CBPZ	<0.01	50	0.01	50	<0.01	100	<0.05	6.25
CMZ	0.04	100	0.10	200	<0.01	12.5	<0.05	6.25
CTX	0.10	50	0.02	100	23	400	0.32	3.13
CEZ	53	>400	60	>400	267	>400	10.9	>400
CER	100	>400	100	>400	100	>400	100	>400

<sup>a)</sup> Vr means a relative rate of hydrolysis, taking the CER hydrolysis as 100 (Substrate concentration: 100  $\mu\text{M}$ ).

<sup>b)</sup> Viable cell counts of inocula suspensions were approximately  $10^7$  cells/ml.

Fig. 1 Stability of cephem antibiotics in crude enzyme solution

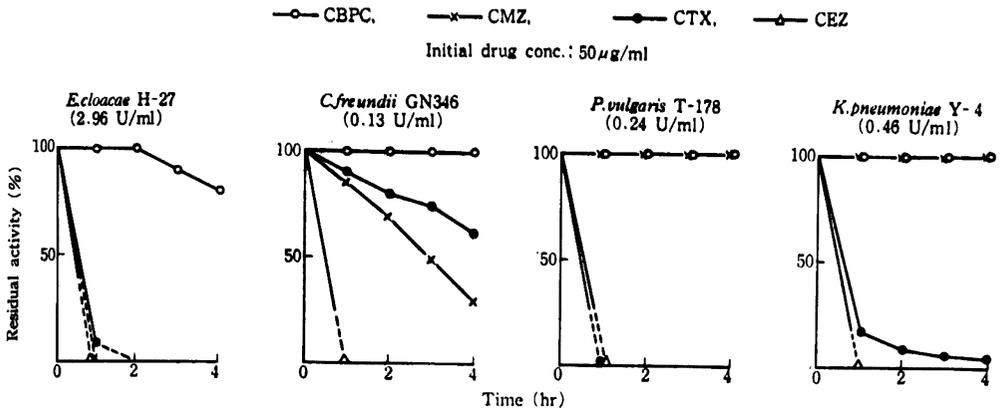
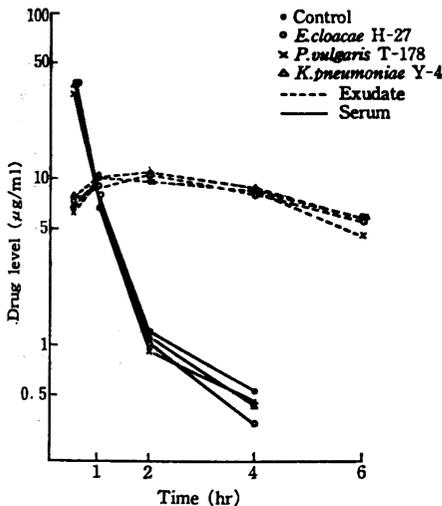


Fig. 2 Serum and exudate levels of CBPZ after 100 mg/kg i. v. administration to rats with infectious granuloma pouch

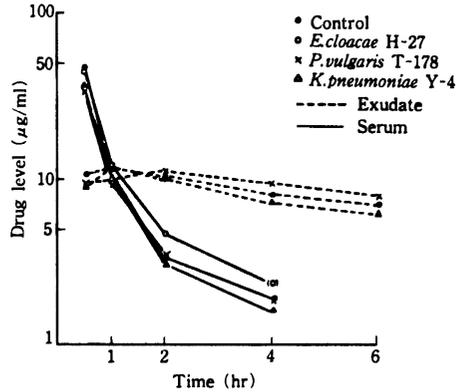


Each point represents the mean for three rats.

4時間後に約30%に減少し、さらに *E. cloacae* H-27 の粗酵素液中では1時間以内に活性が消失した。CTX は *E. cloacae* H-27, *K. pneumoniae* Y-4 の粗酵素液中では2時間以内に、*P. vulgaris* T-178 の粗酵素液中では1時間以内に活性がほとんど消失したが、*C. freundii* GN346 の粗酵素液中では比較的安定であり、4時間後においても約60%の活性が残存していた。CEZ は最も不安定であり、いずれの粗酵素液中においても1時間以内に活性が消失した。

3. Pouch 内感染ラットにおける血中および浸出液中濃度

Fig. 3 Serum and exudate levels of CMZ after 100 mg/kg i. v. administration to rats with infectious granuloma pouch

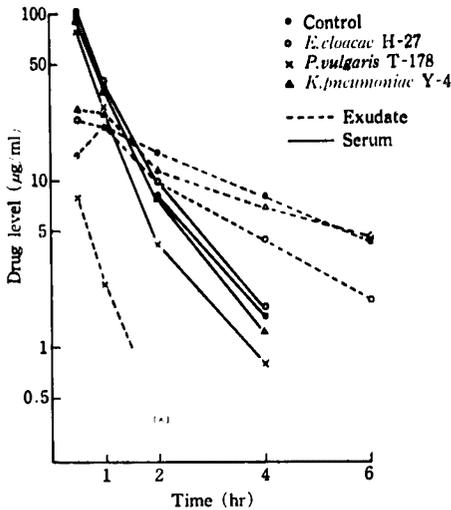


Exudate levels for *E. cloacae* H-27 were under the limit of assay. Each point represents the mean for three rats.

Pouch 内感染ラットに各薬剤の100 mg/kg を i. v. 投与したときの血中濃度および浸出液中濃度を測定した (Fig. 2, 3, 4, 5)。

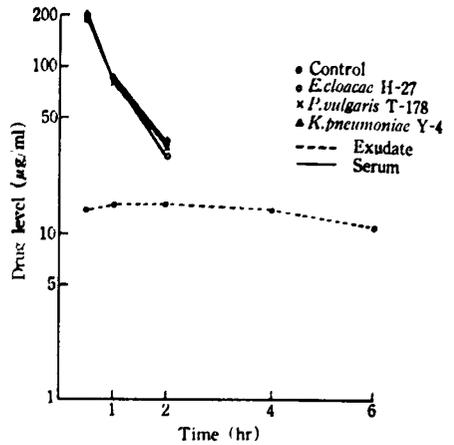
血中濃度推移は *P. vulgaris* T-178 感染群の CTX を除いていずれの薬剤ともに感染群、非感染群間に大きな差は認められなかった。一方、浸出液中濃度推移は CBPZ では感染群、非感染群間に差は認められなかったが、CMZ では *E. cloacae* H-27 感染群で、CEZ ではいずれの感染群ともに薬剤投与30分後から検出限界 (CMZ, CEZ とともに 3.13 μg/ml) 以下であった。CTX では *P. vulgaris* T-178 感染群で速やかに消失し、2時間後では検出限界 (0.39 μg/ml) 以下であった。また *E. cloacae* H-27 感染群では非感染群に比べ若干低く推移した。

Fig. 4 Serum and exudate levels of CTX after 100 mg/kg i.v. administration to rats with infectious granuloma pouch



Each point represents the mean for three rats.

Fig. 5 Serum and exudate levels of CEZ after 100 mg/kg i.v. administration to rats with infectious granuloma pouch



Exudate levels for *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 and *K. pneumoniae* Y-4 were under the limit of assay. Each point represents the mean for three rats.

4. Pouch 内生菌数

Pouch 浸出液中濃度測定時に生菌数も測定した。

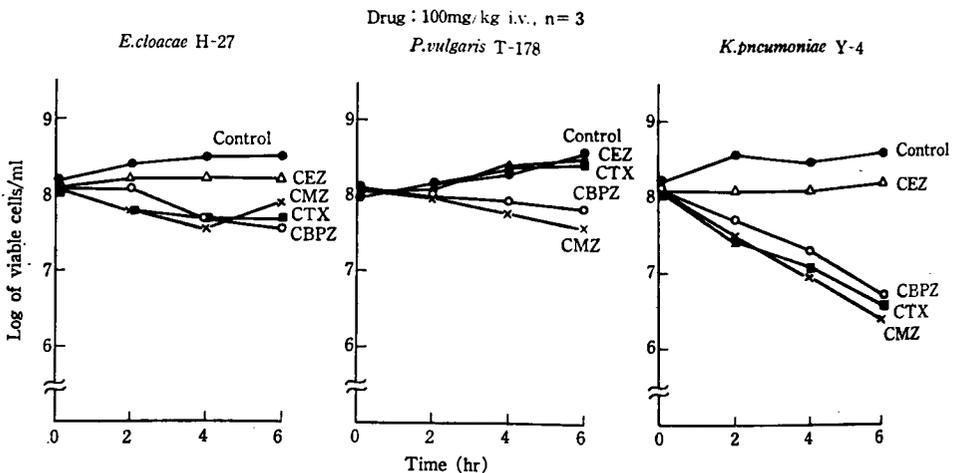
Fig. 6 に示すように、*K. pneumoniae* Y-4 の場合 CBPZ, CTX, CMZ は殺菌的に作用したが、CEZ ではその作用は認められなかった。*E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 感染群ではいずれも pouch 内濃度が MIC に達していないこともあり、各薬剤ともに殺菌的に作用しなかった。

III. 考 察

一般にセフェム骨格の 7α 位にメトキシ基を有するか

あるいは 7 位側鎖にメトキシイミノ基を有するセフェム剤は各種 β-lactamase に対して安定であることが知られている<sup>1,2,3,4</sup>。我々は 7α 位にメトキシ基を有する CMZ, CFX が CSase によりその β-ラクタム環が加水分解されることを高速液体クロマトグラフィー、赤外線吸収スペクトルなどで証明し、β-lactamase に安定といわれている薬剤間においてもその安定性に差があることを報告している<sup>5</sup>。今回 CBPZ, CTX, CMZ および CEZ を用いて、*in vitro* で各種 β-lactamase に対する安定性および粗酵素液中の安定性を検討した結果、CBPZ は C

Fig. 6 Bactericidal effects of cephem antibiotics against various granuloma pouch infections in rats



MZ に比べ安定であることが確認され、さらにメトキシイミノ基を有する CTX よりも安定であることが明らかとなった。

通常、我々は CER あるいは Penicillin G の加水分解を基準とした相対加水分解速度で  $\beta$ -lactamase に対する安定性を議論しがちであるが、安定といわれている薬剤においても、 $\beta$ -lactamase 量によっては加水分解を受けることを常に考慮する必要がある。すなわち Fig. 2~5 に示した粗酵素液中における薬剤間の安定性の差は  $\beta$ -lactamase に対する相対加水分解速度の差のほかに、粗酵素液中の  $\beta$ -lactamase 量が影響しているものと考えられる。例えば CTX, CMZ の場合、*E. cloacae* H-27, *C. freundii* GN 346 由来の  $\beta$ -lactamase に対する相対加水分解速度にはさほど大きな差がないにもかかわらず、粗酵素液中での安定性に差があること、さらに比較薬剤中、最も安定な CBPZ においても *E. cloacae* H-27 粗酵素液中で若干活性の低下がみられることから、その安定性の差は粗酵素液中の  $\beta$ -lactamase 量 (*E. cloacae* H-27: 2.96 U/ml, *C. freundii* GN 346: 0.13 U/ml) に基づくものと考えられる。今回粗酵素液中での安定性の結果を示したが、培養液中においても同様の成績が得られている。

ところで、感染部位の薬剤濃度を測定することは、薬剤の投与量、投与方法、薬効を考える上で重要なことであるが、通常測定までの感染菌由来の  $\beta$ -lactamase による分解にはさほど注意は払われていないように思われる。この点を考慮して Boon ら<sup>8)</sup>は *S. aureus*, *B. fragilis* を用いた各種感染病巣部位の Amoxicillin (AMPC) 濃度を測定する際、PCase を阻害するクラブラン酸をサンプリング直後に加えて測定を行なっている。その結果、AMPC 単独群に比べ AMPC とクラブラン酸併用群の方が高い AMPC 濃度が得られたことを報告している。また山口ら<sup>9)</sup>は喀痰中 AMPC 濃度を測定した際、クラブラン酸存在下では高値が得られることを報告している。これらはいずれも感染病巣部位に存在する菌由来の  $\beta$ -lactamase が薬剤失活に関与していることを示唆するものである。この測定上の問題点をふまえて XERRI ら<sup>10)</sup>は Cefuroxime (CXM) と CEZ の感染病巣部位への移行性に及ぼす  $\beta$ -lactamase の影響について検討を行なっている。すなわち  $\beta$ -lactamase 産生菌を  $10^5$  個接種したマウス腹腔内感染モデルで CXM と CEZ 濃度を測定したところ、いずれも非感染群と類似した腹水中濃度を示したことを、また  $10^8$  個接種したラット paw 感染モデルでは CXM はさほど影響を受けなかったが、CEZ はいずれも検出限界以下であったことを報告している。このことは感染菌量が多くなると  $\beta$ -lactamase 量も

多くなるため、 $\beta$ -lactamase に不安定な薬剤の濃度が低下することを意味している。したがって  $\beta$ -lactamase に対する安定性の高い薬剤の使用は薬効面から有利であることは容易に推察されるところである。

今回 CBPZ の *in vitro* での  $\beta$ -lactamase に対する安定性が *in vivo* にも反映していることが明らかとなったが、CBPZ の  $\beta$ -lactamase に対する安定性が  $\beta$ -lactamase に対して安定といわれている他のセフェム剤と比べてどのように位置づけされるか、また *in vivo* での安定性が複数菌感染、compromised host の感染などにどのように反映するかは今後の検討を要するところである。

## 文 献

- 1) ONISHI, H. R.; D. R. DAoust, S. B. ZIMMERMAN, D. HENDLIN & E. O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Resistance to beta-lactamase inactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 38~48, 1974
- 2) TAJIMA, M. & S. MITSUHASHI: CS-1170, antibacterial activity and resistance to hydrolysis by  $\beta$ -lactamase. *Chemotherapy* 26: 21~26, 1978
- 3) FU, K. P. & H. C. NEU: Beta-lactamase stability of HR 756, a new cephalosporin, compared to that of cefuroxime and cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 322~326, 1978
- 4) TAI, M.; Y. FUKUOKA, A. YOTSUJI, K. KUMANO, M. TAKAHATA, H. MIKAMI, T. YASUDA, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-1982, a new semisynthetic cephamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 728~734, 1982
- 5) MINAMI, S.; N. MATSUBARA, A. YOTSUJI, H. ARAKI, Y. WATANABE, T. YASUDA, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: Inactivation of cephamycins by various  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *J. Antibiotics* 37: 577~587, 1984
- 6) NOVICK, R. P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962
- 7) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780~781, 1974
- 8) BOON, R. J.; A. S. BEALE, K. R. COMBER, C. V. PIERCE & R. SUTHERLAND: Distribution of amoxicillin and clavulanic acid in infected animals and efficacy against experimental infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 369~375, 1982
- 9) 山口恵三, 張 景弘, 田中 光, 伊藤直美, 藤田紀代, 重野芳輝, 泉川欣一, 広田正毅, 那須勝斎, 藤 厚, 原 耕平, 中富昌夫, 堤 恒雄, 北島

洋子, 菅原和行, 餅田親子, 林 愛: BRL 25000 (Clavulanic acid-Amoxicillin) の基礎的・臨床的研究。Chemotherapy 30 (S-2): 338~348, 1982

10) XERRI, L.; P. ORSOLINI, E. ERANI & R. BROGGIO: Experimental infections for the evaluation of  $\beta$ -lactamase resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 201~203, 1982

## IN VITRO AND IN VIVO STABILITIES OF CEFBUPERAZONE TO VARIOUS $\beta$ -LACTAMASES

YASUO WATANAKO, SHINZABUROU MINAMI, NOBUYUKI MATSUBARA,  
TOSHIHIKO NOUMI, HARUMI ARAKI, TAKASHI YASUDA,  
AKIRA TAKAI and ISAMU SAIKAWA  
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd. Toyama, Japan

*In vitro* and *in vivo* stabilities of cefbuperazone (CBPZ) to various  $\beta$ -lactamases were compared with cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX) and cefazolin (CEZ).

The stabilities of CBPZ were superior to CTX and CEZ against penicillinase derived from *K. pneumoniae* Y-4 and cefuroxime derived from *P. vulgaris* T-178. Furthermore, CBPZ was also more stable to cephalosporinases produced by *E. cloacae* H-27 and *C. freundii* GN 346 than CMZ, CTX and CEZ. These results were well reflected by the stabilities of each drug in crude  $\beta$ -lactamase solution. When single doses of 100 mg/kg of CBPZ, CMZ, CTX and CEZ were intravenously administered to rats with granuloma pouch infected by *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 or *K. pneumoniae* Y-4, the serum levels of each drug were not largely affected by the three infectious organisms, except those of CTX for *P. vulgaris* T-178. Although CBPZ in granuloma pouch were hardly affected by the three infectious organisms CTX for *P. vulgaris* T-178 and *E. cloacae* H-27 were apparently lowered, and CMZ for *E. cloacae* H-27 and CEZ for three infectious organisms were not detected at any measured points, presumably as a result of hydrolysis by the bacterial  $\beta$ -lactamase at the site of infection.

These results, therefore, showed that the stabilities of CBPZ were superior to CMZ, CTX and CEZ against various  $\beta$ -lactamases *in vivo*, as well as *in vitro*.