

## L-105 の抗菌力およびペニシリン結合蛋白に対する親和性の検討

紺野昌俊・生方公子・山下直子

松下真理・野々口律子

帝京大学医学部臨床病理学教室

臨床検査材料より分離された各種細菌を対象とし、L-105 の基礎的検討を行い、以下のような成績を得た。

1) *E. faecalis* の L-105 に対する感受性は、 $10^6$  CFU/ml の接種菌量で ABPC とほぼ同等の MIC を示したが、原液接種では大きく耐性側へ shift した。また、*E. faecium* および *E. avium* の 2 菌種においては、大部分の菌株が L-105 に耐性を示した。

2) メチシリン耐性の *S. aureus* およびコアグララーゼ陰性のブドウ球菌の L-105 に対する感受性は、 $10^6$  CFU/ml の接種菌量で cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX) に比べ若干優れた MIC を示した。原液接種では MIC は大きな変動を示した。

3) 臨床分離の *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens* および *M. morgani* の各 1 株より抽出した PBP に対して、L-105 の親和性を検討したが、いずれの菌株においても PBP-3 に対する親和性が高く、PBP-1B に対するその約 100 倍近い親和性を示し、MIC 以下の薬剤濃度を菌に作用させたときに示す著しくフィラメント化した細菌の形態変化と一致する結果であった。

L-105 は日本レダリー株式会社で合成、開発された新しい半合成セフェム系薬剤である。本薬は 7 位側鎖にアミノチアゾール・メトキシイミノアセタミド基を、3 位側鎖にはチアディアゾリル・チオメチル基を有し、化学構造上きわめて安定な物質である点に特徴がある。本報告では、主としてメチシリン・セフェム耐性のブドウ球菌と、いわゆる腸球菌に対する L-105 の抗菌力を他のセフェム系薬剤と比較した成績と、各種グラム陰性桿菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する L-105 の親和性を検討した結果について述べる。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

グラム陽性球菌については、1983年に臨床検査材料より分離されたメチシリン・セフェム耐性 (メチシリン耐性) の *S. aureus* 21株とコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 44株、および臨床検査材料分離株より無作為に選んだ *E. faecalis* 74株、*E. faecium* 29株、および *E. avium* 15株について、L-105 に対する感受性を ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), CMZ および CZX と同時に測定し、その比較検討を行った。同様に無作為に選んだ *E. coli* No. 9 株、*E. cloacae* No. 1 株、*M. morgani* No. 7 株、*S. marcescens* No. 2 株の各 1 株を PBP に対する親和性の検討に用いた。また、菌の形態変化の観察には *S. aureus*

209 P 株と *E. coli* NIHJ JC-2 株および CEZ 耐性の *E. coli* TK 9-27 株を用いた。

## 2. 抗菌力の測定

抗菌力の測定は、日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に従ったが、接種菌量を原液としたさいの MIC についても検討した。被験菌の前培養には Sensitivity broth (栄研)、感受性測定には Sensitivity test agar (栄研) を使用し、MIC は 32°C、24時間培養後における菌の増殖の有無から判定した。なお、腸球菌の抗菌力測定にさいしては、上記の培地中に綿羊脱繊維血液を 5% の割合に加えて使用した。

## 3. 菌の形態変化の観察

一夜前培養した被験菌を 10 ml の Sensitivity broth 中に 0.2 ml ずつ植え継いで 37°C で 2 時間培養後、Sensitivity broth で 10 倍に希釈し、その 1 白金耳を L-105 の他、cefmenoxime (CMX) と cephaloridine (CER) をそれぞれ単独で種々の濃度に含有した薄層寒天培地上へ広げ、カバーガラスで覆った後、37°C で培養し、3 時間後に位相差顕微鏡によってその菌の形態変化を観察し、比較検討した。

## 4. PBP に対する親和性の検討

上述した被験菌からの膜画分の採取は、SPRATT<sup>2)</sup>の方法に準じた。各 PBP に対する L-105 の親和性の強弱は、

Fig. 1 Susceptibility distribution of clinical isolates *E. faecalis*: 74 strains

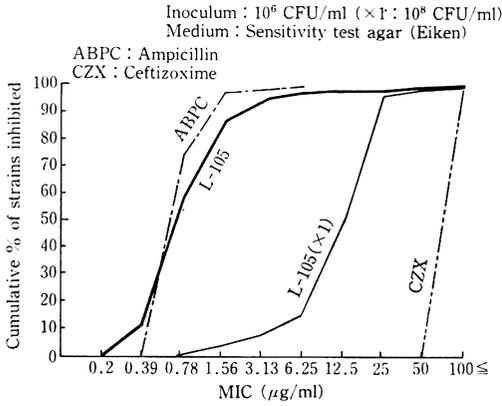


Fig. 2 Susceptibility distribution of clinical isolates *E. faecium*: 29 strains

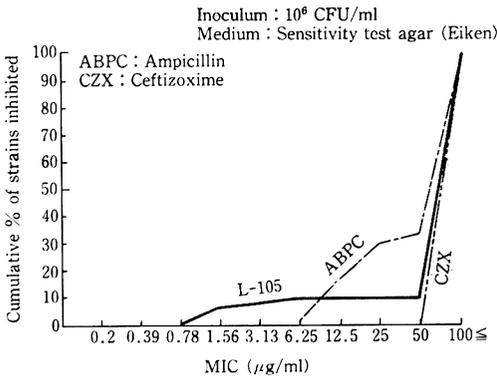


Fig. 3 Susceptibility distribution of clinical isolates *E. avium*: 15 strains

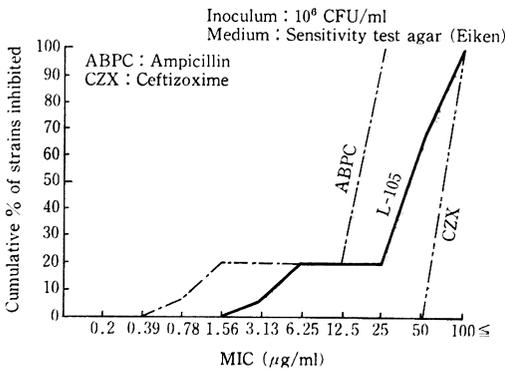


Fig. 4 Susceptibility distribution of clinical isolates *S. aureus*: 21 strains

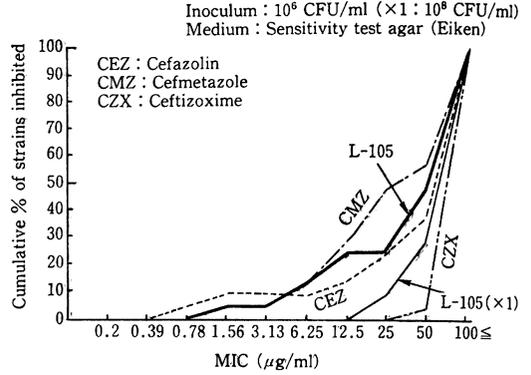


Fig. 5 Susceptibility distribution of clinical isolates Coag. neg. staphylococci: 44 strains

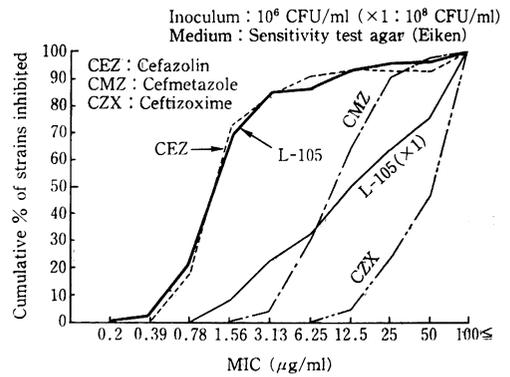
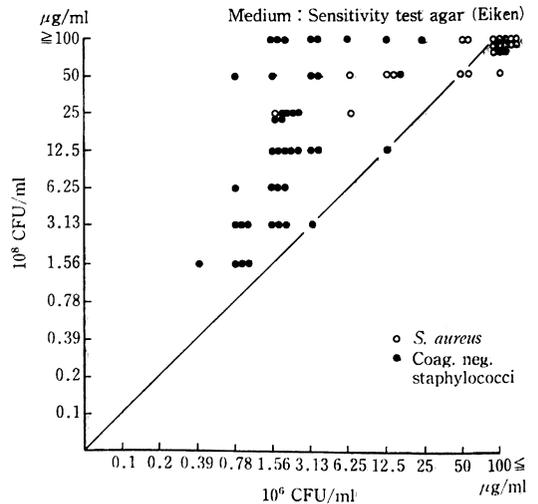


Fig. 6 Correllogram of MICs between  $10^6$  CFU/ml and  $10^8$  CFU/ml of inoculum size



膜画分(蛋白量:5 mg/ml)を50  $\mu$ l ずつ分注した小試験管に、被験薬の L-105 を最終濃度が 100  $\mu$ g/ml からの2倍階段希釈の濃度になるように添加して30°Cで10分間反応させた後、<sup>14</sup>C-benzylpenicillin (Amersham, 54 mCi/mmol) を最終濃度が 0.1 mM になるように加えてさらに30°C, 10分間反応させて検討した。反応終了後の種々の操作は既報<sup>2)</sup>の方法に従って行った。

## II. 結 果

### 1. 腸球菌の L-105 に対する感受性

*E. faecalis* に対する L-105 の MIC についての成績を Fig. 1 に示す。10<sup>6</sup> CFU/ml の接種菌量では L-105 は ABPC とほぼ同等の MIC の累積分布曲線を示した。しかし、接種菌量を原液接種にすると、ABPC では試験管で1管程度感受性が低下するだけで、その累積分布曲線はほとんど変動しないが、L-105 では試験管4管程度の感受性の低下がみられ、菌量によって MIC 値が著しく変動した。しかしながら、CZX の MIC と比較すると、L-105 のそれは明らかに優れた成績であった。

*E. faecium* および *E. avium* の L-105 に対する感受性成績を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。これらの菌種においては 10<sup>6</sup> CFU/ml の接種菌量においても ABPC と同様ほとんど抗菌力を有していないという成績であった。

### 2. メチシリン耐性ブドウ球菌の L-105 に対する感受性

Fig. 4 にはメチシリン耐性の *S. aureus* 21株に対する L-105 の MIC の累積分布曲線を示す。10<sup>6</sup> CFU/ml の接種菌量では 6.25~12.5  $\mu$ g/ml 程度の MIC を示す菌株もわずかながら存在したが、70%以上の菌株においては 25  $\mu$ g/ml 以上の MIC を示した。さらに原液接種では、すべての株が 25  $\mu$ g/ml 以上の MIC 値を示した。

メチシリン耐性のコアグラゼ陰性ブドウ球菌に対する L-105 の MIC の累積分布曲線を Fig. 5 に示す。10<sup>6</sup> CFU/ml の接種菌量では70%程度の菌株が 1.56  $\mu$ g/ml 程度の MIC を示し、対照とした CEZ とほぼ同等の成績を示した。しかも、CMZ や CZX に比して明らかに優れた感受性を示す成績であった。しかしながら、L-105 に対する感受性を原液接種で測定すると、65%以上の菌株が 6.25  $\mu$ g/ml 以上の MIC を示すようになり、接種菌量によって MIC 値は著しく変動した。

メチシリン耐性ブドウ球菌の L-105 に対する感受性は接種菌量によって著しく変動を示すので、その相関性を Fig. 6 に示した。大部分の菌株で MIC 値の変動が認められ、その変動幅は、平均すると試験管で4管、MIC 値に換算すると16倍の開きがみられるという成績であった。

### 3. グラム陰性桿菌の PBP<sub>s</sub> に対する L-105 の親和性

Fig. 7-A には、*E. coli* No. 9 株から抽出した PBP<sub>s</sub> に対する L-105 の親和性を示す。本菌の L-105 に対する MIC は 0.1  $\mu$ g/ml (10<sup>6</sup> CFU/ml の菌接種時) であるが、L-105 はその濃度よりもはるかに低濃度の 0.006  $\mu$ g/ml 付近から PBP-3 に結合し始め、0.01  $\mu$ g/ml で PBP-3 をほぼ完全に飽和した。しかしながら、溶菌ともっとも関係の深い PBP-1A と PBP-1B に対しては MIC に相当する 0.1  $\mu$ g/ml の濃度で 50% 結合を示すという成績であり、0.39  $\mu$ g/ml でほぼ飽和した。つまり、PBP-3 と PBP-1A あるいは PBP-1B に対する親和性との間には著しい差異がみられた。L-105 のこのような結合状況は、同時に検討した CZX のそれとほぼ同等であった。

*E. cloacae* No. 1 株から抽出した PBP に対する L-105 の親和性の成績を Fig. 7-B に示す。この菌株の L-105 に対する MIC は 0.2  $\mu$ g/ml であったが、L-105 は PBP-3 に対しては、*E. coli* No. 9 株と同様に高い親和性を示し、PBP-1A あるいは PBP-1B に対する親和性との間に著しい差があることが認められた。

*S. marcescens* No. 2 株から抽出した PBP<sub>s</sub> に対する L-105 の親和性の成績を Fig. 7-C に示す。この菌株は L-105 に対して 0.78  $\mu$ g/ml の MIC を示していたが、PBP-3 に対しては 0.006  $\mu$ g/ml 以下の濃度から結合し始め、0.02  $\mu$ g/ml 付近で飽和状態に達するが、PBP-1A や PBP-1B などに対しては、かなり緩やかな結合状況を示し、MIC である 0.78  $\mu$ g/ml 濃度付近が 50% 結合点ではあるものの、これらの PBP<sub>s</sub> を完全に飽和させるには、さらに高濃度の薬剤が必要であることが認められた。しかしながら、それでも同時に行った CZX や LMOX のそれに比しては、L-105 の親和性のほうがやや優れている成績であった。

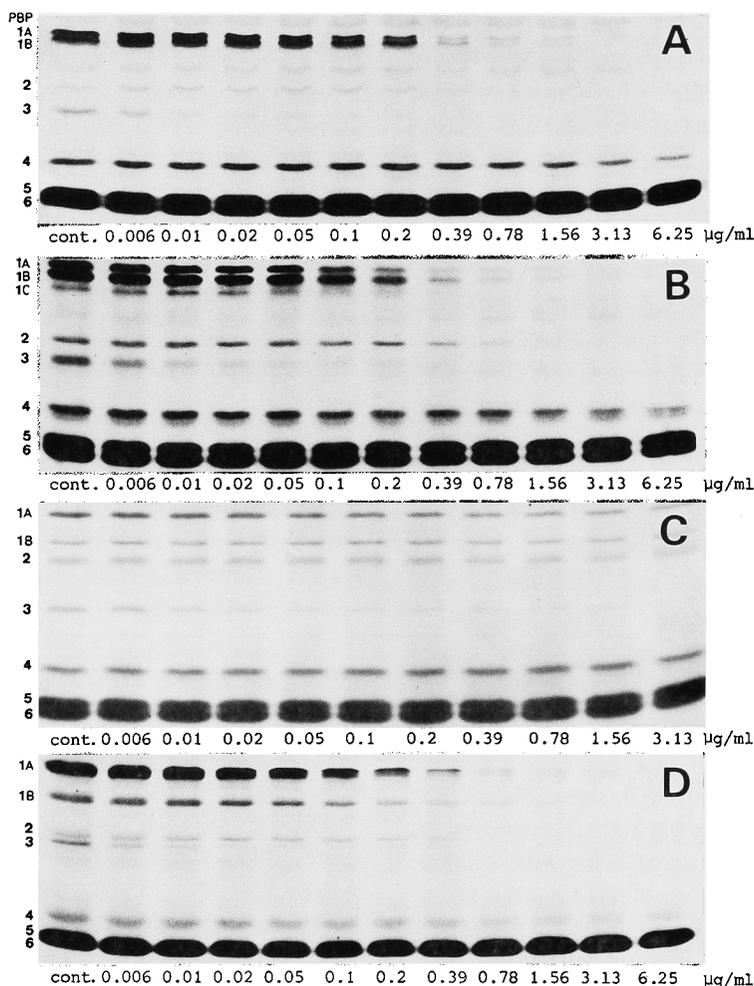
Fig. 7-D には L-105 の MIC が 0.1  $\mu$ g/ml である *M. organii* No. 7 株の PBP<sub>s</sub> に対する L-105 の親和性を示す。前述した成績と同じように、L-105 は PBP-1A や PBP-1B に対してよりも PBP-3 に対して著しく高い結合を示した。

### 4. L-105 を作用させたさいの菌の形態変化

Fig. 8 に、*S. aureus* 209 P 株、*E. coli* NIHJ JC-2 株の標準株と、CEZ に 10<sup>6</sup> CFU/ml の菌液接種で 12.5  $\mu$ g/ml、原液接種で 100  $\mu$ g/ml の MIC を示す野外株 *E. coli* TK 9-27 株を用いて種々の濃度の L-105 を作用させたさいに観察される菌の形態変化を図にまとめたものを示す。

*S. aureus* 209 P においては、MIC よりもやや低い薬

Fig. 7 Competition of L-105 for penicillin-binding proteins of *E. coli* No. 9, *E. cloacae* No. 1, *S. marcescens* No. 2, and *M. morgani* No. 7 strains

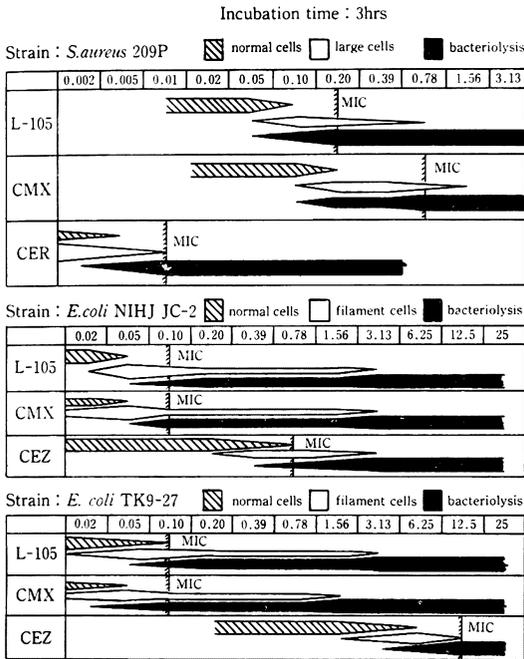


剤処理濃度域から隔壁形成が阻害された膨潤像が観察され、それと同時に溶菌していく像も観察されたが、その現象は対照とした CMX に比してやや優れているという成績であった。しかしながら、ブドウ球菌に対してもっとも殺菌作用の優れている CER に比較すると、溶菌現象が出現してくる薬剤濃度は、はるかに高濃度であるという成績であった。

*E. coli* NIHJ JC-2 株と CEZ 耐性の TK 9-27 株における形態変化は、いずれの菌株においても MIC 以下の薬剤濃度域において著しくフィラメント化した菌が観察され、しかも MIC 以上の濃度においても溶菌に至らないフィラメント化した菌が多く観察された。対照とした CMX でも、同様に幅広い薬剤濃度域にわたって溶菌には至らないフィラメント化された菌が見出されてお

り、NIHJ JC-2 株においては MIC は CEZ に比してはるかに優れているとはいうものの、フィラメント形成の end point は CEZ のそれとほぼ同じ濃度であるという結果であった。CEZ 耐性の TK 9-27 菌株においては、MIC は CMX と同様に良好な値を示し、形態変化もほぼ同じ濃度から始まるという結果であったが、フィラメント化が観察されなくなる濃度の end point も、また同じような濃度であり、その end point までの濃度幅はきわめて広いという結果であった。図には示さなかったが、この CEZ 耐性菌を L-105 で処理したさいの殺菌効果を経時的に観察すると、生菌数の減少はかなり緩やかであり、MIC の 2 倍の薬剤濃度での処理で 4 時間培養後に  $10^2$  CFU/ml 程度に菌数の減少を認めるといった結果であり、その経過は本薬の PBPs に対する

Fig. 8 Morphological changes of *S. aureus* 209 P, *E. coli* NIHJ JC-2 and TK 9-27 strains



親和性の特徴とはほぼ一致する成績であった。

### Ⅲ. 考 察

L-105は、その側鎖の化学構造上からも推測されるように、グラム陰性桿菌に対してはCMZ, CZXの結果から従来の第三世代セフェム系薬剤と同様に優れた抗菌力を示すことが示唆されているが、その理由としては、菌体内への薬剤の透過性が優れていることとともに、薬剤の致死的標的であるいくつかのPBPに対して本薬が高い親和性を示すことがあげられている。私たちが示した腸内細菌の4菌種から抽出したPBPに対するL-105の親和性に関する成績でも、いずれの菌種においてもPBP-3に対する親和性はきわめて高いことが示された。このことは、MICよりもはるかに低濃度域におい

ても、L-105の存在下で菌は隔壁形成が阻害され、著しく長いフィラメント化した菌として観察されるという形態変化によっても裏づけられた。しかしながら、溶菌するにはMICよりかなりの高濃度の薬剤を必要とし、溶菌に直接に結びつくPBP-1Bなどに対する親和性は、いずれの菌種においてもPBP-3に対する飽和濃度の約100倍ほど高い濃度を必要とした。このような各PBPに対するL-105の親和性と形態変化の特徴は、従来の第三世代セフェム系薬剤のそれと基本的には同じであると考えられる。

一方、L-105は今までの第三世代セフェム系薬剤に比し、グラム陽性球菌に対する抗菌力は優れていると考えられている。確かに私たちの成績でも、現在臨床上問題となっているメチシリン耐性のブドウ球菌や腸球菌に対しては、 $10^6$  CFU/mlの接種菌量の条件においては、従来のいわゆる第三世代のセフェム系薬剤のなかでは優れたMICを示すという結果であった。しかしながら、原液の接種菌量でMICを測定するとMIC値は耐性側にshiftしていた。

グラム陽性球菌に対する殺菌効果は、ブドウ球菌に本剤を作用させたさいに生ずる菌の形態変化から観察すると、ブドウ球菌に強い殺菌作用を有するCERより劣ったが、CMXより優れており、既存の第三世代のセフェム系薬剤より期待できると思われる成績であった。また腸球菌に対しては $10^6$  CFU/ml接種時のMICはABPCのそれと大差はなかったが、 $10^8$  CFU/ml接種時におけるL-105のMICはABPCに比してやや変動が大きかった。

### 文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) SPRATT, B.G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 2999~3003, 1975

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF L-105 AND ITS AFFINITIES TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS

MASATOSHI KONNO, KIMIKO UBUKATA, NAOKO YAMASHITA,

MARI MATSUSHITA and RITSUKO NONOGUCHI

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine

Fundamental examinations of L-105 on clinical isolates of various bacterial strains were carried out and the results are as follows:

1. The susceptibility to L-105, expressed as MICs, with  $10^6$  CFU/ml of *E. faecalis* was similar to that to ampicillin, but a great shifting to the resistant side was shown with the non-diluted inoculum size of *E. faecalis*. The majority of strains of *E. faecium* and *E. avium* showed resistance to L-105.

2. Against  $10^6$  CFU/ml inoculums of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, L-105 showed somewhat superior MICs to conventional third-generation cepheems. L-105 MICs against the non-diluted inoculum size showed a large change.

3. L-105 was examined for the affinity with PBPs extracted from one strain each of clinical isolate of *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, and *M. morgani*. In all of these strains, the affinity of L-105 for PBP-3 was as high as nearly 100-fold that for PBP-1B, which consistent with the morphological changes of cells to filamentation exposed to lower concentration than MIC of L-105.