

L-105 の各種 β -lactamase に対する安定性の評価

比留間良一・澤井哲夫

千葉大学薬学部微生物薬品化学研究室

酵素化学的性質の明らかにされている4種の penicillinase (PCase), 5種の cephalosporinase (CSase) をそれぞれ構成的に産生する9群^{1,2)}のグラム陰性菌群を用い, 新 cephalosporin 剤 L-105 の β -lactamase 産生菌に対する抗菌力 (MIC) より, L-105 の各種 β -lactamase に対する安定性の生菌体における評価を行った。さらに, 7種の精製 β -lactamase による L-105 の加水分解速度 (V_{max}), β -lactamase の L-105 に対する親和性 (K_m) について検討し, 次の結果を得た。

1) PCase 産生株に対する L-105 の MIC 値は PCase 産生量に影響されことなく低値を示し, L-105 は PCase にきわめて安定であった。CSase 産生株では高度産生株が低産生株に比較しやや高い MIC 値を示したが, 6.3 μ g/ml またはそれ以下であった。

2) L-105 は用いた7種の β -lactamase のなかで, *Proteus vulgaris* 由来の CSase (cefuroxime 分解型 CSase) によりもっとも高い加水分解を受けたが, その分解速度は cephaloridine の加水分解速度の1/5であった。他の PCase, CSase による加水分解速度は低く, とくに典型的な CSase に対してはきわめて安定であった。

3) 各種 PCase, CSase に対する親和性は cephaloridine に比べ比較的高く, K_m 値は 0.3~28 μ M であった。

4) L-105 の β -lactamase に対する挙動は構造類似体である cefmenoxime と類似の傾向を示した。

L-105, sodium (-)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate は, 日本レグリー社で開発された新しい cephalosporin 系抗生物質で, グラム陰性菌のみならずグラム陽性菌に対しても高い抗菌力を示し³⁾, Fig. 1 に示した化学構造をもつ。

今回, すでに報告¹⁾した β -lactam 抗生剤の各種 β -lactamase に対する安定性を評価するのに適した評価用

グラム陰性菌株を用い, L-105 の9種の β -lactamase に対する生菌体での安定性について検討した。さらに, 7種の精製 β -lactamase 標品を用いて, L-105 の β -lactamase による加水分解速度および β -lactamase との親和性を測定した。

I. 実験材料および方法

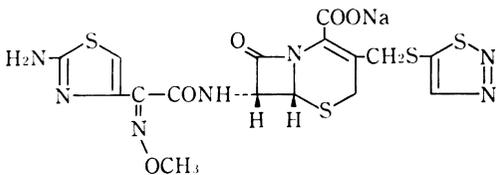
1. 使用菌株

PCase 産生株として *Escherichia coli* 4株 (type I PCase 産生株3株, type II PCase 産生株1株), *Klebsiella pneumoniae* 3株, *Proteus mirabilis* 3株, CSase 産生株として *E. coli* 3株, *Citrobacter freundii* 3株, *Enterobacter cloacae* 4株, *Proteus morganii* 3株, *Proteus vulgaris* 4株を用いた。これらの菌群はそれぞれ異なるタイプの PCase あるいは CSase を構成的に産生しており, 同じタイプの β -lactamase を産生し酵素産生量のみが異なる菌株群を1セットとしている。

2. 使用薬剤

L-105, penicillin G (PCG), ampicillin (ABPC), cephaloridine (CER), cefmetazole (CMZ), cefoperazone (CPZ), latamoxef (LMOX), cefmenoxime (CMX) を

Fig. 1 Chemical structure of L-105



sodium (-)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

Table 1 Relationship between penicillinase activity and levels of resistance to β -lactam antibiotics in penicillinase-producing bacteria

Organisms	Penicillinase activity (units/mg dry weight bacteria)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		PCG	ABPC	CER	CMZ	CPZ	LMOX	CMX	L-105
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	16.7	>1,600	>1,600	100	0.8	25	0.2	0.1	0.1
<i>E. coli</i> ML1410 RGN14	0.6	800	1,600	12.5	0.8	1.6	0.1	0.1	0.05
<i>E. coli</i> ML1410	< 0.003	50	6.3	3.1	0.8	0.1	0.1	0.1	0.05
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	0.025	200	400	3.1	0.8	0.2	0.1	0.4	0.8
<i>K. pneumoniae</i> GN69	1.11	800	800	12.5	0.8	1.6	0.2	0.1	0.1
<i>K. pneumoniae</i> GN118	0.047	50	50	6.3	0.8	0.4	0.1	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> GN69/2-1	< 0.01	12.5	1.6	6.3	0.8	0.2	0.2	0.1	0.1
<i>P. mirabilis</i> N-29	2.0	>1,600	800	100	1.6	50	0.1	0.1	≤ 0.025
<i>P. mirabilis</i> N-29/2	0.28	25	25	3.1	1.6	1.6	0.1	0.05	≤ 0.025
<i>P. mirabilis</i> N-29/5	0.01	12.5	1.6	6.3	1.6	1.6	0.1	0.05	≤ 0.025

用いた。

3. 感受性測定法

日本化学療法学会標準法⁴⁾に準じて寒天平板希釈法にて MIC を測定した。培地は heart infusion agar を用い、接種菌液濃度は 10^6 cells/ml とし、 37°C で 18 時間培養後判定した。

4. β -lactamase 活性測定法

各菌株より抽出精製した β -lactamase²⁾ を酵素標品として用いた。

β -lactamase 活性は基質濃度を 100 mM とし、UV 法により測定した。反応は 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 中、 30°C で基質が完全に加水分解されるまで行った (酵素反応時間 2~40 分)。加水分解速度 (V_{\max})、Michaelis 定数 (K_m) は得られた酵素反応曲線より FUKAGAWA ら⁵⁾の方法により求めた。

II. 実験成績

1. β -lactamase 産生株に対する抗菌力

各種 PCase 産生株に対する L-105 の MIC 値は、いずれの菌株に対しても $0.8 \mu\text{g/ml}$ 以下と良好な抗菌力を示した。各菌株内の高度 PCase 産生株と低産生株の MIC 値を比較してもほとんど差がなく、L-105 は CMZ, LMOX, CMX と同様に、その抗菌力はグラム陰性菌の PCase 産生による影響をほとんど受けなかった。一方 CER, CPZ では *E. coli* ML 1410 群 (type I PCase = TEM 型 PCase 産生)、*P. mirabilis* 群 (carbenicillin 分解型 PCase 産生) の PCase 産生量増大に伴い顕著な抗菌力の低下がみられた。PCG, ABPC はいずれの菌株の PCase 産生株でも著しい抗菌力の低下が認められた (Table 1)。

CSase 産生株に対する L-105 の抗菌力は、他の cephalosporin 剤と同様に、高度 CSase 産生株で低下する傾向がみられた。L-105 の抗菌力の低下は、CMX と同様に、*E. cloacae* 群、*P. vulgaris* 群 (cefuroxime 分解型 CSase 産生) でもっとも大きかった。しかしいずれの菌株における CSase 高度産生株に対しても L-105 は $6.3 \mu\text{g/ml}$ 以下で増殖阻止効果を示した。CMX, LMOX の抗菌力は、*P.morganii* 群および *P. vulgaris* 群の高度 CSase 産生株ではほとんど低下しなかったが、他の菌種では CSase 産生量の増加に伴い抗菌力の低下がみられた。PCG, ABPC では PCase 産生株と同様に、高度 CSase 産生株において著しい抗菌力の低下がみられた (Table 2)。

2. β -lactamase による加水分解速度

精製 β -lactamase を用い、L-105 の加水分解速度 (V_{\max}) について検討した。

TEM 型および carbenicillin 分解型の 2 種類の PCase による相対的 V_{\max} 値 (PCG の V_{\max} を 100 とした) は 3 以下で、CPZ, CMX とほぼ同等の値であった。CSase による相対的 V_{\max} 値 (CER の V_{\max} を 100 とした) は、*P. vulgaris* 由来の CSase に対して L-105, CMX, CPZ でそれぞれ 20, 13, 9 と比較的高かったが、他菌種由来の CSase による相対的 V_{\max} 値は、L-105, CMX, CPZ いずれも 1 以下であり、L-105 は *P. vulgaris* CSase 以外のいわゆる典型的な CSase にはきわめて安定であった (Table 3)。

3. β -lactamase に対する親和性

酵素と基質との親和性を示すパラメーターである Michaelis 定数 (K_m) を 7 種の β -lactamase を用いて

Table 2 Relationship between cephalosporinase activity and levels of resistance to β -lactam antibiotics in cephalosporinase-producing bacteria

Organisms	Cephalosporinase activity (units/mg dry weight bacteria)	MIC (μ g/ml)							
		PCG	ABPC	CER	CMZ	CPZ	LMOX	CMX	L-105
<i>E. coli</i> 255	0.72	>1,600	800	100	50	6.3	1.6	6.3	1.6
<i>E. coli</i> GN206	0.25	800	100	50	25	0.8	0.8	1.6	0.4
<i>E. coli</i> 255/L-7	0.003	25	6.3	3.1	0.8	0.2	0.1	0.1	0.1
<i>C. freundii</i> GN346	24.2	>1,600	800	400	100	12.5	6.3	3.1	6.3
<i>C. freundii</i> GN346/16-10	4.0	1,600	200	100	6.3	12.5	0.8	3.1	3.1
<i>C. freundii</i> GN346/16	0.067	25	0.8	3.1	0.8	0.1	0.05	0.1	0.1
<i>E. cloacae</i> 363	24.9	>1,600	400	800	800	12.5	6.3	6.3	6.3
<i>E. cloacae</i> 363/1-3	10.6	>1,600	400	800	800	6.3	6.3	6.3	6.3
<i>E. cloacae</i> 363/2	0.05	25	3.1	6.3	1.6	0.2	0.1	0.1	0.1
<i>E. cloacae</i> 363/1	< 0.01	6.4	0.8	3.1	0.8	0.2	0.05	0.05	0.05
<i>P. morganii</i> 1510	2.68	1,600	200	400	6.3	12.5	0.1	0.8	0.8
<i>P. morganii</i> 1510/3	0.07	200	50	50	6.3	1.6	0.1	0.2	0.1
<i>P. morganii</i> 1510/9	0.006	6.4	0.8	0.4	3.1	0.4	0.1	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1	2.4	400	800	1,600	3.1	50	0.2	1.6	6.3
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/1	1.8	400	400	1,600	3.1	25	0.2	0.8	1.6
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/3	0.03	200	200	400	3.1	25	0.2	0.8	0.8
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1/2	< 0.01	6.4	1.6	3.1	3.1	0.8	0.2	0.1	0.05

Table 3 Relative hydrolysis rate (V_{max}) of β -lactam antibiotics by seven kinds of β -lactamases

Enzyme source	β -lactamase type	$V_{max}^a)$				
		PCG	CER	CPZ	CMX	L-105
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	Penicillinase ^{b)}	100	104	1	0.3	1
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	Penicillinase ^{c)}	100	127	2	11	3
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1	Cephalosporinase ^{d)}	14	100	9	13	20
<i>P. morganii</i> 1510	Cephalosporinase	8	100	< 1	< 1	< 1
<i>C. freundii</i> GN346	Cephalosporinase	2	100	< 1	< 1	< 1
<i>E. cloacae</i> 363	Cephalosporinase	4	100	< 1	< 1	< 1
<i>E. coli</i> 255	Cephalosporinase	37	100	< 1	< 1	< 1

a) The relative values of V_{max} are expressed as the percentage of hydrolysis of PCG or CER.

b) Type I β penicillinase mediated by an R plasmid RGN823, which corresponds to TEM-2 penicillinase.

c) Type II penicillinase mediated by an R plasmid RGN238, which is an oxacillin-hydrolyzing penicillinase.

d) A cephalosporinase with a broad substrate profile.

測定した。

TEM 型 PCase および *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *E. coli* 由来の CSase の L-105 に対する K_m 値は 10~28 μ M, RGN823 支配の oxacillin 分解型 PCase および *P. morganii*, *C. freundii* 由来の CSase の L-105 に対する K_m 値は 3 μ M 以下であった。

CMX, CPZ の各 β -lactamase に対する K_m 値も

L-105 の K_m 値と大差なく、各種 β -lactamase に対する親和性では、L-105 は CMX, CPZ とほぼ同程度であった (Table 4)。

Ⅲ. 考 察

L-105 の PCase 産生株に対する MIC 値は PCase 産生量に影響されることなく低値を示した。とくに R プラスミド RGN823 は TEM 型 PCase の高度産生を支配

Table 4 Michaelis constant (K_m) of seven kinds of β -lactamases for five β -lactam antibiotics

Enzyme source	β -lactamase type	K_m (μ M)				
		PCG	CER	CPZ	CMX	L-105
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823	Penicillinase	13	646	2	9	28
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238	Penicillinase	5	6	5	2	< 1
<i>P. vulgaris</i> GN76/C-1	Cephalosporinase	< 1	31	8	7	10
<i>P. morgani</i> i 1510	Cephalosporinase	< 1	45	11	6	3
<i>C. freundii</i> GN346	Cephalosporinase	< 1	14	15	< 1	2
<i>E. colacae</i> 363	Cephalosporinase	< 1	115	14	14	10
<i>E. coli</i> 255	Cephalosporinase	1	131	10	6	12

するRプラスミド¹⁾であり、このようなRプラスミド保持菌株に対する高い抗菌力は、L-105のPCaseに対する優れた安定性を示している。一方、CSase産生菌株に対するMIC値は酵素産生量の高い菌株でやや高い値を示したが、*E. coli*、*C. freundii*、*E. cloacae*、*P. morgani*i、*P. vulgaris*のいずれの菌群におけるCSase高度産生株に対してもL-105のMIC値は6.3 μ g/ml以下と良好であった。この値はCERなどのCSaseに不安定な従来のcephalosporin剤のCSase高度産生株に対するMIC値が100~1,600 μ g/mlであることを考慮すると、L-105はCSaseに安定な薬剤といえる。

*P. vulgaris*由来のCSaseは他のCSaseと異なり半合成penicillinやCXM、CMXを分解できるなど比較的広い基質特異性をもつCSaseであることが知られているが、CMXと構造の類似したL-105に対する V_{max} 値は他の β -lactam剤に比較して高い値を示している。さらに、検討した7種の β -lactamaseのL-105に対する親和性(K_m 値)でもCMXとの高い類似性がみられた。

以上の結果から、L-105はCMXと同様、グラム陰性菌の産生する β -lactamaseに比較的高い親和性を示すが、試験管内での β -lactamaseに対する安定性では

cefuroxime分解型CSaseを除き、今回検討した代表的なグラム陰性菌 β -lactamaseにきわめて安定と結論される。また生菌を用いた β -lactamase安定性試験から、L-105は、*P. vulgaris*CSaseを含む多くの β -lactamase産生による抗菌力低下が少なく、臨床上通常出現する程度の β -lactamase産生菌に対しては広く有効と推測される。

文 献

- 1) SAWAI, T.; T. YOSHIDA, K. TSUKAMOTO & S. YAMAGISHI: A set of bacterial strains for evaluation of β -lactamase-stability of β -lactam antibiotics. *J. Antibiotics* 34: 1318~1326, 1981
- 2) SAWAI, T.; M. KANNO & K. TSUKAMOTO: Characterization of eight β -lactamases of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 152: 567~571, 1982
- 3) 第33回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, L-105, 東京, 1985
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度(MIC)の測定法再改定について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 5) FUKAGAWA, Y.; T. TAKEI & T. ISHIKURA: Inhibition of β -lactamase of *Bacillus bicheniformis* 749/C by compound PS-5, a new β -lactam antibiotic. *Biochem. J.* 185: 177~188, 1980

EVALUATION OF THE β -LACTAMASE-STABILITY OF L-105 TO VARIOUS TYPES OF ENZYMES

RYOICHI HIRUMA and TETSUO SAWAI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

The stability of L-105 to β -lactamases was evaluated in nine groups of gram-negative bacteria which composed of constitutive producers of four kinds of penicillinases and five kinds of cephalosporinases, by means of inhibitory concentrations measured for the set of bacterial strains. Furthermore, the V_{\max} and K_m values of seven of the nine β -lactamases for L-105 were determined with purified enzyme preparations. The obtained results were summarized as follows:

1. L-105 showed low MIC values against all the penicillinase-producing bacteria tested and the MIC values were little affected by the penicillinase production in bacterial cells, suggesting excellent stability of L-105 to penicillinases. In the case of cephalosporinase-producing bacteria, the MIC values against high enzyme producers were somewhat higher than those against lower producers, but the highest MIC was 6.3 μg per ml.

2. L-105 was hydrolyzed by *Proteus vulgaris* cephalosporinase (cefroxime-hydrolyzing enzyme) at the highest rate among the seven purified β -lactamases tested, but the hydrolysis rate was one-fifth that of the cephaloridine-hydrolysis. L-105 showed high stability to six other β -lactamases, especially to common cephalosporinases.

3. The affinity of the seven β -lactamases with L-105 was high in comparison with cephaloridine, and the K_m values were distributed among 0.3 to 28 μM .

4. The kinetic behavior of the β -lactamases toward L-105 was similar to that toward cefmenoxime, an analogue of L-105.