

Cefuroxime axetil (CXM-AX) の原体 CXM の試験管内抗菌力、  
ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する結合親和性、及び  
血清補体と培養マクロファージとの協力的殺菌作用

横田 健・鈴木映子・加藤尚代

順天堂大学医学部細菌学教室

CXM-AX の活性原体, CXM は *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*,  $\beta$ -streptococci, *S. pneumoniae*, R 因子保有 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, ABPC 耐性 *H. influenzae*, 及び *B. fragilis* の 24~59 臨床分離株に対し, MIC<sub>90</sub> はそれぞれ, 6.25, >100, 100, 0.05, 0.1, 6.25, 3.13, 1.56, >100, 100, 25, 25, >100, >100, >100, >100, 50, 0.78, 100 を示した。

作用点 PBP に対する結合親和性は, 感受性 *S. aureus*, *E. coli*, 及び *S. marcescens* では, CMZ と同程度の強さであったが, *P. vulgaris* の PBP には CMZ より強く, MRSA の特異画分 PBP 2' には CMZ より結合親和性が弱かった。CXM は, 血清補体との協力的殺菌作用は弱い, 白血球との協力的食菌・殺菌作用は強かった。

Cefuroxime axetil (CXM-AX) は, エステル型の経口用セフェム系抗生物質で, 腸管で吸収される時, 脱エステル化されて血中に Cefuroxime (CXM) が遊離される。本研究は CXM-AX の有用性を検討するための基礎実験として, 活性原体である CXM の試験管内抗菌力を調べ他の経口用セフェム系抗生物質と比較するとともに, 作用点ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する結合親和性を, 注射用第 2 世代セフェム, Cefmetazole (CMZ) と比較し, さらに血清補体との協力的殺菌作用, 及びマウス培養マクロファージとの協力的食菌・殺菌作用を検討したものである。

## I. 実験材料及び方法

### 1. 試験管内抗菌力の検討方法

CXM, Ampicillin (ABPC: 萬有製薬), Cefaclor (CCL: 塩野義製薬) の各種細菌 24~59 臨床分離株に対する試験管内最小発育阻止濃度 (MIC) は, 日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に従って測定した。すなわち被検菌を L-broth<sup>2)</sup> 5 ml 中で一夜 37°C 振盪培養し, グラム陽性菌は 100 倍に, グラム陰性菌は 1,000 倍に新鮮 L-broth で希釈して 10<sup>8</sup> cfu/ml の菌浮遊液を調製した。ただし *H. influenzae* は, FILDES EXTRACT を 5% 加えた HI ブイオンで,  $\beta$ -streptococci は HI ブイオンを使用して前培養した。*S. pneumoniae* は血液平板上に一夜 37°C 培養した菌体をかき取り, HI ブイオン中に均等に浮遊し, KLETT-SUMMERSON 比濁計で No. 66 フィルターを使い, KLETT 100 に調製した後同培地で 100 倍に

希釈した。

10<sup>6</sup> cfu/ml 菌浮遊液を, 倍々希釈濃度の薬剤を含む MUELLER-HINTON agar (MH: DIFCO) にマイクロプランターを使用して接種し, 37°C 一夜培養後の菌増殖の有無から MIC を求めた。 $\beta$ -streptococci, *S. pneumoniae* の MIC 測定には, HI 寒天にヒツジ脱繊維血液を 5% 加えたものを使用し, *H. influenzae* には HI 寒天に 5% FILDES EXTRACT (OXOID) を加えたものを使用した。

なお, 使用した臨床分離株は 1980 年から 1984 年の間に分離されたものである。

### 2. PBP に対する結合親和性の検討方法

$\beta$ -lactam 薬剤の作用点, PBP に対する結合親和性は, SPRATT の方法<sup>3)</sup>を一部改良して行なった。すなわち 200 ml の L-broth 中に培養した対数増殖期後半の被検菌細胞を音波破碎し, 遠心分画で求めた膜画分を少量の 0.01 M リン酸 buffer 中に 10~15 mg protein/ml 濃度に浮遊した。その 30  $\mu$ l に CXM を種々の濃度に加え, 30°C 10 分間前処理後, さらに 3  $\mu$ l (0.15  $\mu$ Ci) <sup>14</sup>C-PCG (AMERSHAM: 50  $\mu$ Ci/ $\mu$ moles) を加え 30°C 10 分間処理した後, 界面活性剤で細胞質膜を溶かし, 外膜を遠心で除いて, アクリルアミド平板電気泳動にかけた。酸で蛋白を固定し増感剤を浸み込ませた後, ゲルを乾燥してレントゲンフィルム (KODAK X-Omat) と密着し, -80°C 20 日間感光させて fluoroautography を行なった。

3. CXM と血清補体の協力的殺菌作用の検討方法  
*E. coli* NIHJ JC-2 を 10 ml の L-broth 中で一夜 37 °C 振盪培養した。これを新鮮 L-broth で 10,000 倍に希釈し、5 ml ずつ中試験管に分注した。3 本一組としその 1 本に CXM 50% 増殖阻止濃度 (ID<sub>50</sub>: 5 時間後に生菌数が対照の 50% となる CXM の濃度) を加え、他の 1 本には 0.75 units/ml のモルモット補体と 20% ヒト非白血清を添加し、3 本目には CXM と補体及びヒト血清を加えた。37 °C 振盪培養を続け、培養開始後 1, 3, 5 及び 24 時間目にそれぞれの一部を取り出し、適当に対数希釈して平板法で生菌数を測定した。

4. CXM 存在下におけるマウス培養マクロファージ (Mφ) の食菌・殺菌作用<sup>4)</sup>

Mφ は ICR ♂ 4 週齢マウスの腹腔を 10% Fetal-Calf serum 加 F-12 培地 (日水製薬) で洗って採取し、同培地 5 ml で浮遊させた。洗浄後 10<sup>5</sup> cfu/ml の細胞浮遊液を作り、その 0.1 ml をカバースリップを沈めた FALCON multidish の各 well に接種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 37 °C 30 分静置後同培地を 1 ml ずつ加え一夜培養した。翌日浮遊細胞を除き、20% L-CM (conditioned medium of L-929)<sup>5)</sup> を添加した同培地と交換し、2 時間 CO<sub>2</sub> 培養を行なって Mφ を活性化した。各 well に一夜 37 °C で L-broth 中に振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を Mφ の 50 倍量 (5 × 10<sup>5</sup> cells/well) 接種した。一部の well には 1~1/16 MIC の CXM を加えて培養した。5 時間 CO<sub>2</sub> 培養を続けた後、カバースリップを取り出し Seline G で軽く洗浄後、メタノールで固定し、キムザ染色してその顕像を撮影した。

## II. 実験成績

### 1. CXM の試験管内抗菌力

48 株の *S. aureus* 臨床分離株に対し、Fig. 1 のごとく CXM は、ABPC には劣るが CCL や CEX より強い抗菌力を示した。しかしメチシリン・セフェム耐性 *S. aureus* (MRSA) には、Fig. 2 のとおり CXM の抗菌力は、CCL や ABPC より弱い。*S. epidermidis* 29 株に対しては、CXM は CCL や CEX と同程度の抗菌力である (Fig. 3)。β-streptococci 24 臨床分離株及び *S. pneumoniae* 38 株に対しては、Fig. 4 及び 5 のとおり CCL や CEX よりはるかに強い抗菌力を CXM は持ち、ABPC と同程度であった。

R 因子保有 *E. coli* に対しては、CXM は均一の優れた抗菌力を示す (Fig. 6)。染色体性に Penicillinase 型 (PCase) β-lactamase をつくる *K. pneumoniae* 47 株に対しては、Fig. 7 のとおり CXM は、ABPC や CEX よりも抗菌力が強く、一部見られる CCL 耐性株にも良好な抗菌力を示した。Fig. 8 のとおり CXM は、*P. mi-*

Fig. 1 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *S. aureus* to CXM, ABPC, CEX and CCL

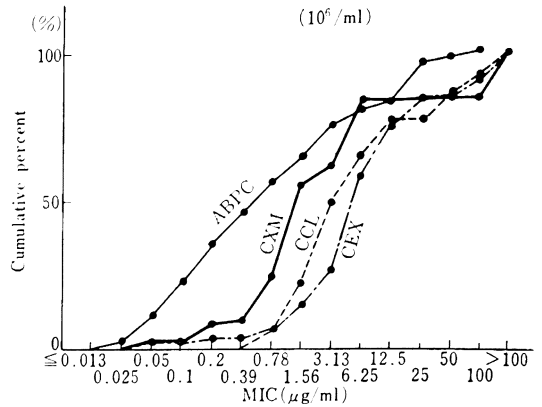


Fig. 2 Cumulative sensitivities of 59 clinical isolates of MRSA to CXM, ABPC and CCL

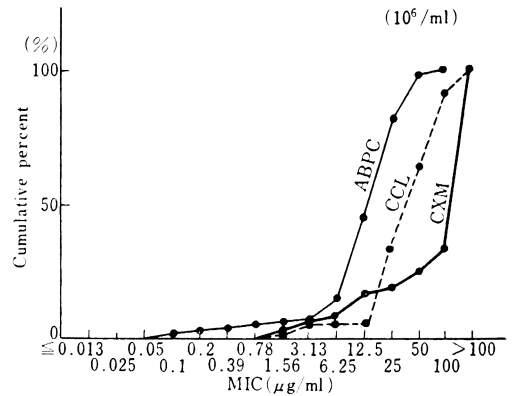


Fig. 3 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *S. epidermidis* to CXM, ABPC, CEX and CCL

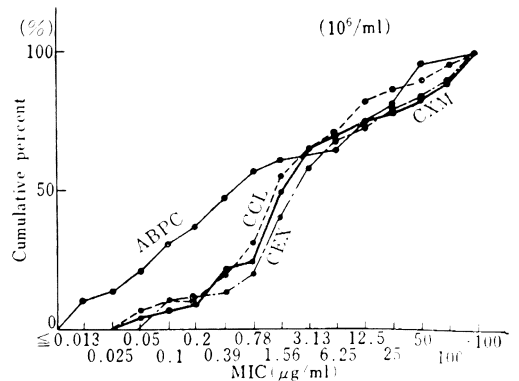


Fig. 4 Cumulative sensitivities of 24 clinical isolates of  $\beta$ -streptococci to CXM, ABPC, CEX and CCL

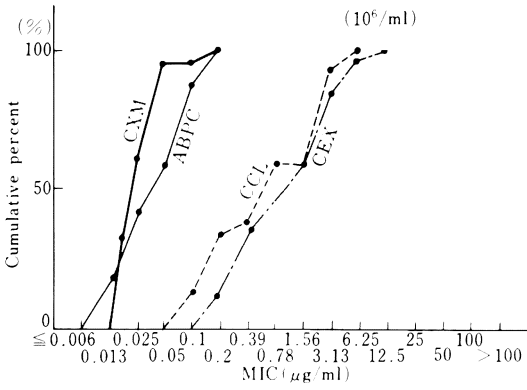


Fig. 5 Cumulative sensitivities of 38 clinical isolates of *S. pneumoniae* to CXM, ABPC, CEX and CCL

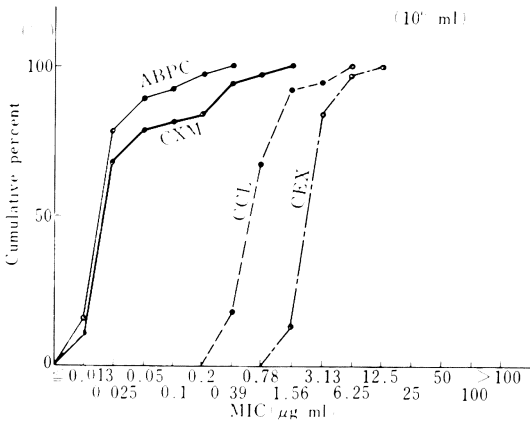


Fig. 6 Cumulative sensitivities of 51 subclones of *E. coli* carrying various R(bla) plasmids to CXM, ABPC, CEX and CCL

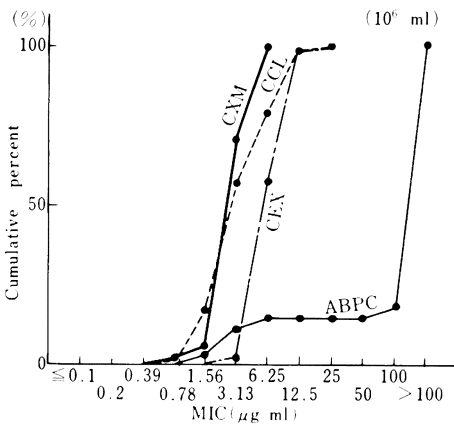


Fig. 7 Cumulative sensitivities of 47 clinical isolates of *K. pneumoniae* to CXM, ABPC, CEX and CCL

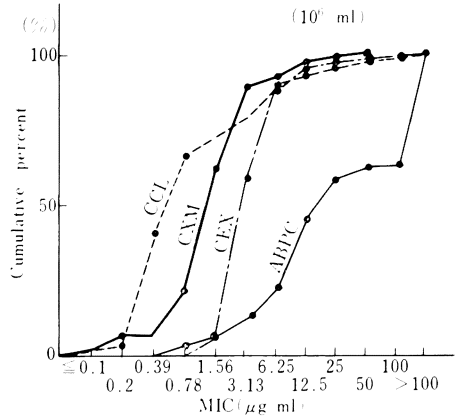


Fig. 8 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. mirabilis* to CXM, ABPC, CEX and CCL

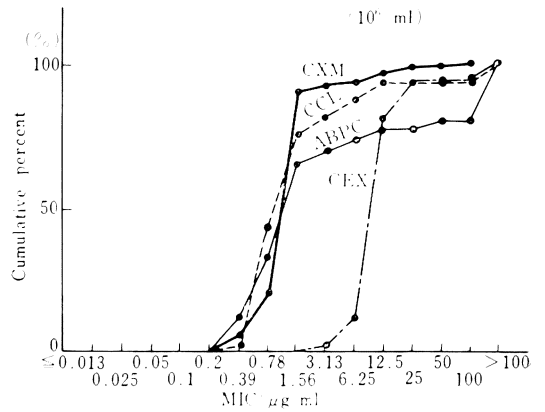


Fig. 9 Cumulative sensitivities of 41 clinical isolates of *P. vulgaris* to CXM, ABPC, CEX and CCL

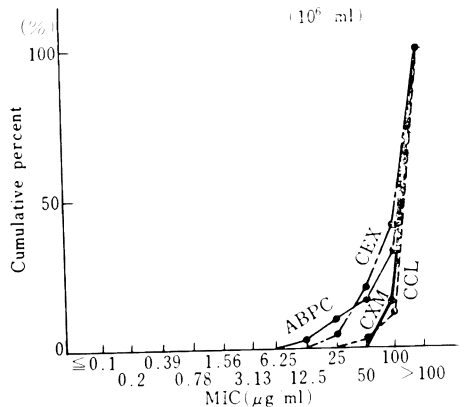


Fig. 10 Cumulative sensitivities of 54 clinical isolates of *M. morgani* to CXM, ABPC, CEX and CCL

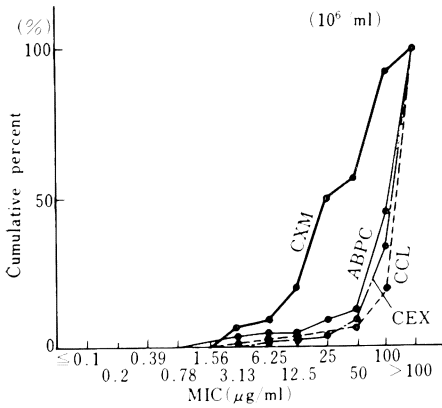


Fig. 11 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *P. rettgeri* to CXM, ABPC, CEX and CCL

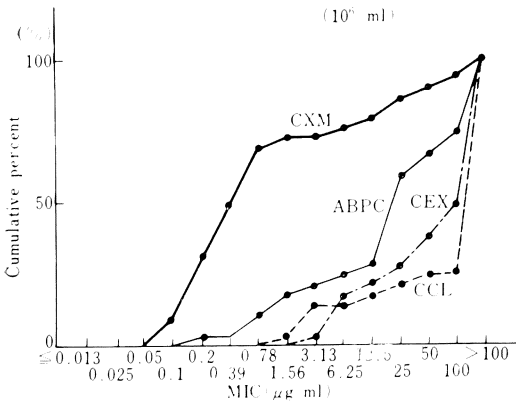


Fig. 12 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *C. freundii* to CXM, ABPC, CEX and CCL

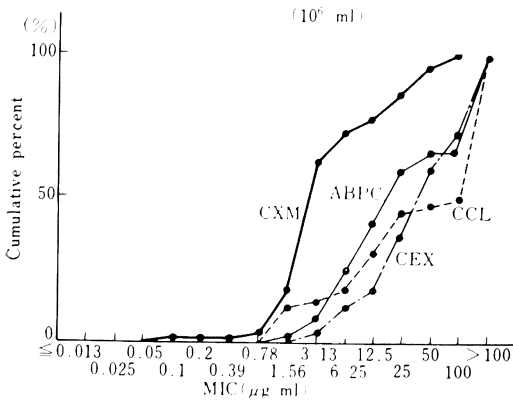


Fig. 13 Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to CXM, ABPC, CEX and CCL

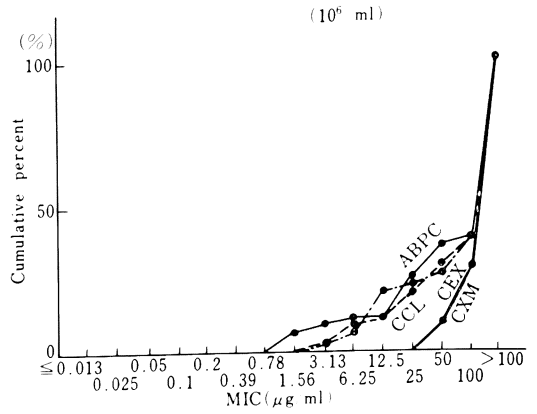


Fig. 14 Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *S. marcescens* to CXM, ABPC, CEX and CCL

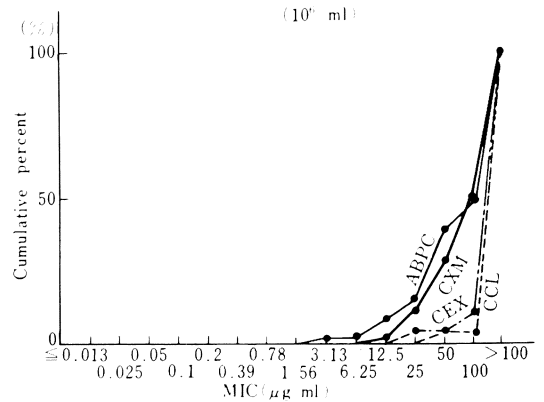


Fig. 15 Cumulative sensitivities of 49 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to CXM, ABPC, CEX and CCL

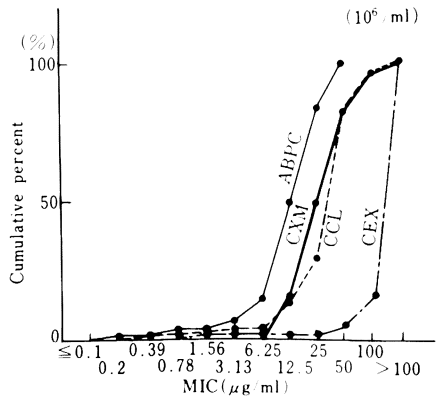




Fig. 16 Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to CXM, ABPC, CEX and CCL

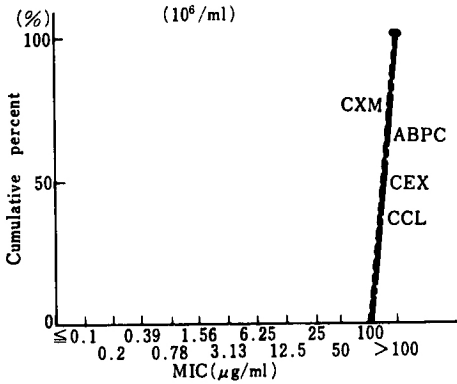
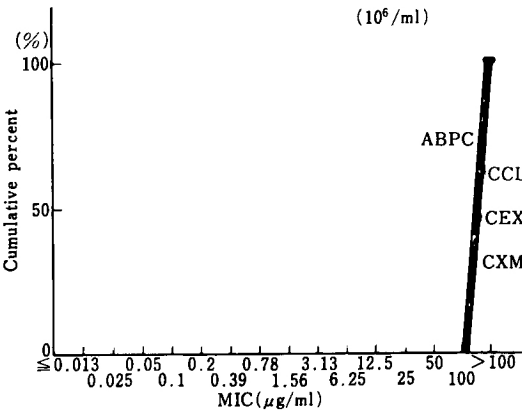


Fig. 17 Cumulative sensitivities of 29 clinical isolates of *X. maltophilia* to CXM, ABPC, CEX and CCL



*rabilis* にも良好な抗菌力を示すが、Ic 型  $\beta$ -lactamase を産生する *P. vulgaris* に対する力は、Fig. 9 のとおり対照薬剤同様弱い。染色体性に Ia 型  $\beta$ -lactamase を作る *M. morgani* 54 株には、Fig. 10 のとおり CXM は対照薬剤より抗菌力が強いものの、その力は中等度にとどまる。しかし *P. rettgeri* 29 株に対しては、Fig. 11 のとおりかなり強い抗菌力を示した。Fig. 12 のとおり CXM は *C. freundii* には、相当強い抗菌力を持つが、*E. cloacae* 及び *S. marcescens* には Fig. 13 及び 14 のごとく、対照薬剤同様抗菌力は弱い。ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に対しては、CXM は *A. calcoaceticus* に CCL 程度の中等度の抗菌力を示す (Fig. 15) ほかは、Fig. 16 及び 17 のとおり *P. aeruginosa* や、*X. maltophilia* にはほとんど抗菌力を示さない。

ABPC 耐性 *H. influenzae* に対し CXM は、対照薬剤よりはるかに強い抗菌力を示し、24 株全部が 0.78  $\mu$ g/

Fig. 18 Cumulative sensitivities of 24 clinical isolates of ABPC resistant *H. influenzae* to CXM, ABPC, CEX and CCL

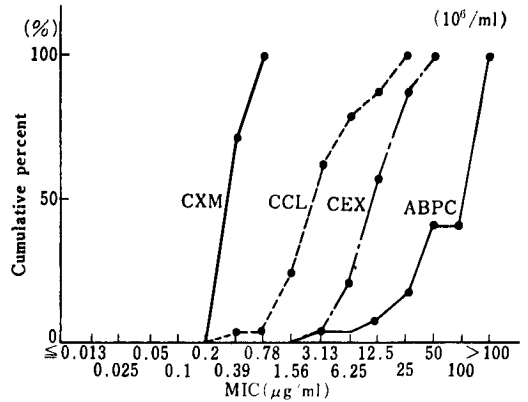


Fig. 19 Cumulative sensitivities of 51 clinical isolates of *B. fragilis* to CXM, ABPC, CEX and CCL

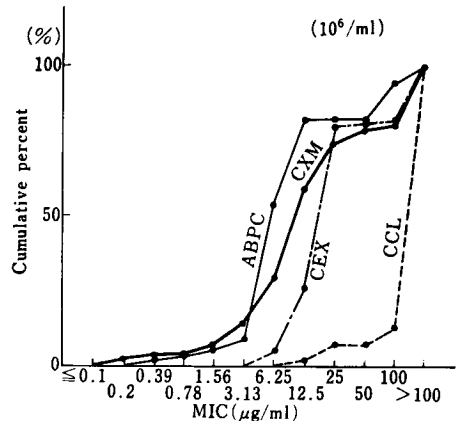
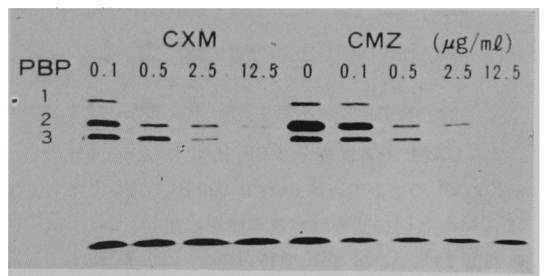


Fig. 20 Competition of CXM and CMZ for penicillin-binding proteins of *S. aureus* 209 P



ml で増殖阻止された (Fig. 18)。

嫌気性菌 *B. fragilis* に対する CXM の抗菌力は CCL よりはるかに強く、Fig. 19 のとおり ABPC と CEX の中間に位置する。

Fig. 21 Competition of CXM and CMZ for penicillin-binding proteins of *S. aureus* 108-1

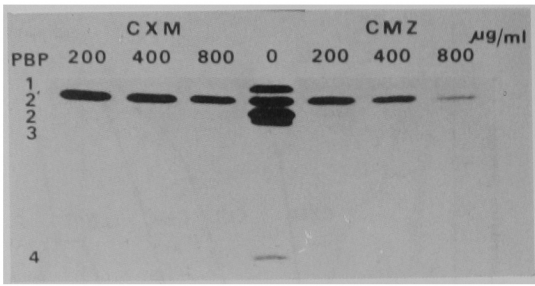


Fig. 22 Competition of CXM and CMZ for penicillin-binding proteins of *E. coli* NIHJ JC-2

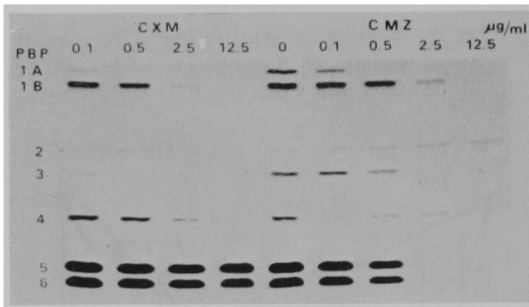
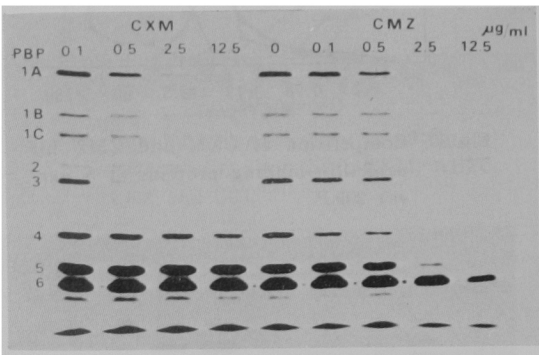


Fig. 23 Competition of CXM and CMZ for penicillin-binding proteins of *S. marcescens* 13



2. CXM の各種細菌 PBP に対する結合親和性

Fig. 20 のとおり、*S. aureus* 209 P の PBP に対しては CMZ と同程度の結合親和性を示す。しかし MRSA に対しては、CMZ がその特異画分 PBP 2' にある程度の結合親和性を持ち抗菌力を保持しているのに対し、CXM は MRSA 特異画分への結合親和性が低いため、この種の菌への抗菌力は弱い (Fig. 21)。

グラム陰性菌の PBP に対する結合親和性は一部の

Fig. 24 Competition of CXM and CMZ for penicillin-binding proteins of *P. vulgaris* 33

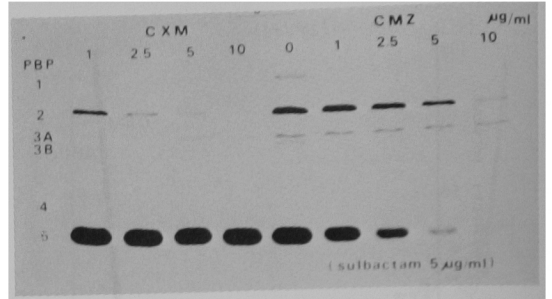
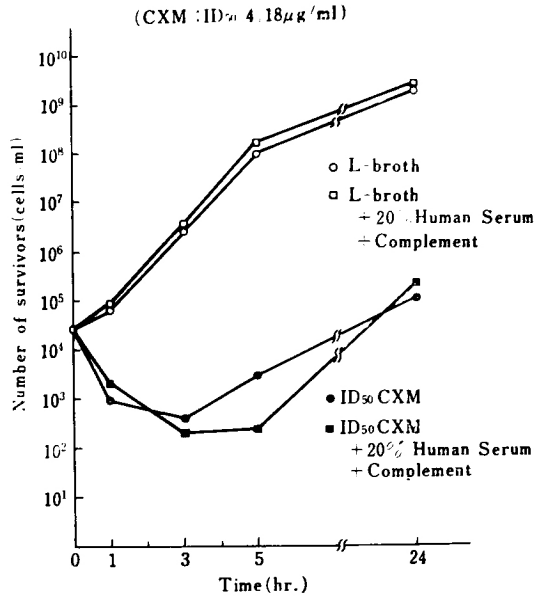


Fig. 25 Change of viable cell numbers of *E. coli* NIHJ JC-2 in the presence of ID<sub>50</sub> CXM with or without 20% human serum and 0.75 units/ml guinea pig complement



ものを除き CMZ と同程度である。すなわち *E. coli* NIHJ JC-2 の PBP (Fig. 22), *S. marcescens* 13 の PBP (Fig. 23) に対しては、CMZ とほぼ同程度の結合親和性であり、*P. vulgaris* 33 のそれに対しては、Fig. 24 のとおり CMZ より若干結合親和性が高い。

3. CXM と血清補体との協力的殺菌作用

CXM は Fig. 25 のとおり、菌の増殖に影響しない最高の補体濃度と ID<sub>50</sub> の本剤を加えてもそれほど強い協力的殺菌作用は出ない。

4. CXM とマウス培養 Mφ との協力的食菌・殺菌作用

CXM と血清補体との協力的食菌・殺菌作用は強くな

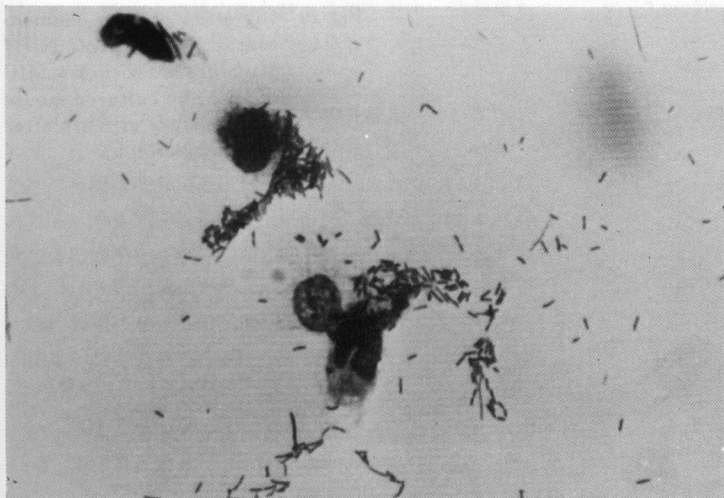


Fig. 26 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown without drugs at 5 hrs after the incubation

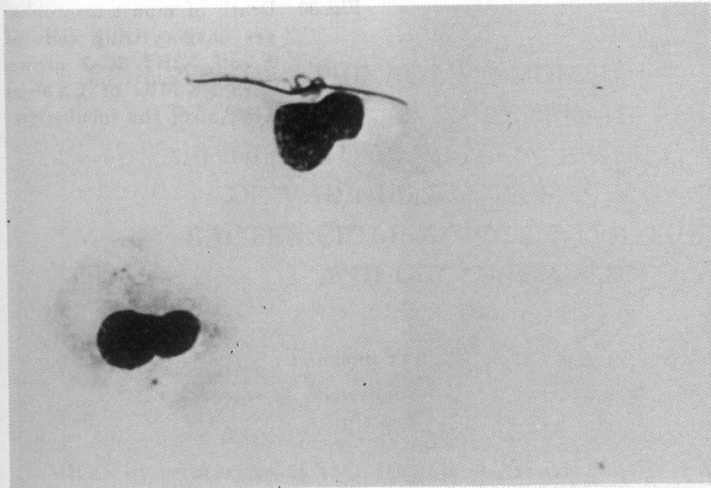


Fig. 27 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1 MIC of CXM by cultured mouse macrophages at 5 hrs after the incubation

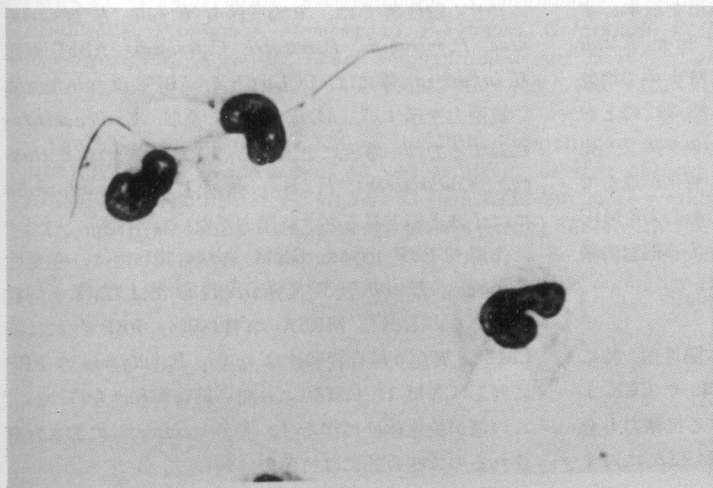


Fig. 28 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2 MIC of CXM by cultured mouse macrophages at 5 hrs after the incubation

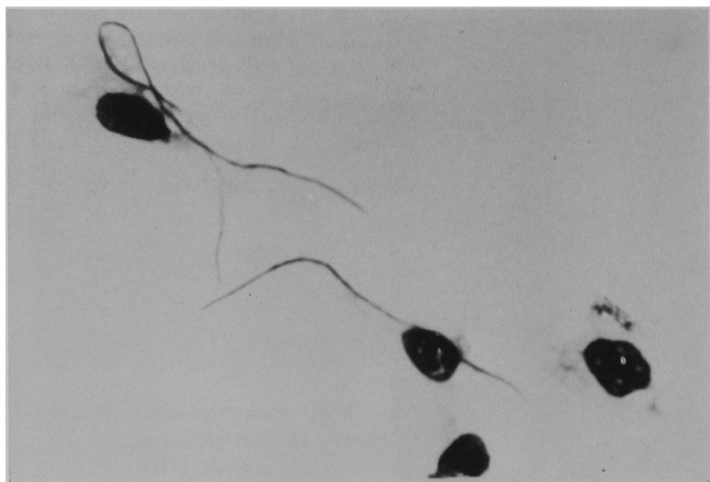


Fig. 29 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/4 MIC of CXM by cultured mouse macrophages at 5 hrs after the incubation



Fig. 30 Death of mouse macrophages phagocytizing cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/8 MIC of CXM at 5 hrs after the incubation

いが、マウス培養 Mφ とは良好な協力作用を示す。すなわち Fig. 26 のとおり、Mφ に食菌された *E. coli* NIHJ JC-2 の細胞は、食菌 5 時間後には Mφ 中で増殖し、細胞を破壊して遊出するが、Fig. 27, 28, 29 のとおり、CXM が 1~1/4 MIC 共存すると、フィラメント化した細胞がよく Mφ に食菌され、しかも消化が進んでゴースト化している像がよく見られる。しかし 1/8 MIC になると、Fig. 30 のとおり食菌した *E. coli* の細胞内増殖が認められる。

### III. 考 察

CXM-AX の活性原体 CXM は、グラム陽性菌、特にレンサ球菌や肺炎球菌に対して既存の CCL や CEX より強い抗菌力を示す。又 *S. aureus* に対する抗菌力も全体的に CCL や CEX より強い。しかし MRSA に対する抗菌力は弱い。

グラム陰性菌では、R 因子保有 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, ABPC 耐性 *H. influenzae* 等には、CCL, CEX, ABPC よりかなり強い抗菌力を示すが、*M. morgani* 及び *A. calcoaceticus* に対する力は中等度にとどまる。又 *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* 及び *X. maltophilia* には、ほとんど見るべき抗菌力がない。

作用点 PBP に対し CXM の結合親和性は、感受性 *S. aureus*, *E. coli* 及び *S. marcescens* では CMZ と同程度である。しかし MRSA の特異画分 PBP 2' には、CMZ と異なり結合親和性はない。*P. vulgaris* の PBP に対し CXM は CMZ より高い結合親和性を持つが、この菌が染色体性にする Ic 型 β-lactamase に加水分解されるので総合的には抗菌力は弱い。

CXM は血清補体との協力的殺菌作用は顕著ではない

が、培養 M<sub>φ</sub> との協力的食菌・殺菌作用は、注射用を含めセフェム系抗生物質の中では良好なグループに入ると結論された。

以上を総合すると、CXM-AX の良好な経口吸収と合わせ、免疫正常者に多いグラム陽性及び陰性の強毒菌感染症の治療には有用な経口セフェム剤となることが期待される。又白血球との協力作用が強い点も CXM の良好な生体内効果をうかがわせるものとして評価できる。しかし MRSA に抗菌力がない点や、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に対する力が弱いことは、患者対象を選ぶ上で注意が必要であろう。

#### 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) LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P 1. Virology 1 : 190~206, 1955

3) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 : 2999~3003, 1975

4) 横田 健, 関口玲子, 東 映子: Cefmenoxime (SCE-1365) の各種  $\beta$ -lactamase およびペニ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

5) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA: Inhibition by glucocorticoids and choeragen of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (Hormonal control of macrophage growth). Cell. Physiol. 100 : 351~364, 1979

## CEFUROXIME, THE ACTIVE MOIETY OF CEFUROXIME-AXETIL: ITS *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY, BINDING AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS (PBPs) OF VARIOUS BACTERIA, AND SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECT WITH THE COMPLEMENT AND CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, EIKO SUZUKI and NAOYO KATO

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

MIC<sub>50</sub> of cefuroxime (CXM), that is the active moiety of the oral prodrug, cefuroxime axetil (CXM-AX), for 24 to 59 clinical isolates of *S. aureus*, methicillin- and cephem-resisant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*,  $\beta$ -streptococci, *S. pneumoniae*, *E. coli* carrying R plasmids, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, ampicillin-resistant *H. influenzae*, and *B. fragilis* were 6.25, >100, 100, 0.05, 0.1, 6.25, 3.13, 1.56, >100, 100, 25, 25, >100, >100, >100, >100, 50, 0.78 and 100  $\mu$ g/ml, respectively.

The binding affinity of CXM to the PBPs, the sites of action of sensitive *S. aureus* 209P, *E. coli* NIHJ JC-2, and *S. marcescens* 13 was as strong as that of cefmetazole (CMZ). CXM bound more strongly to the PBPs of *P. vulgaris* 33 than CMZ but more weakly to the PBPs of MRSA than CMZ. CXM manifested only weak synergy of bactericidal effect with the serum complement, but the synergy with cultured mouse macrophages was found to be strong showing that the macrophages engulfed well *E. coli* cells and digested rapidly in the presence of higher than 1/4 of MIC of CXM.