

新経口用セファロsporin CS-807の細菌学的評価 第2報 CS-807の作用機作に関する研究

宇津井幸男・大屋 哲・土門春樹・矢島 努
坂尾規代美・塚田由実子・関根奈穂子・安田 紘
田島政三・岩田正之
三共株式会社 生物研究所

新経口用セファロsporin CS-807の抗菌機序を解明するため、その活性体 R-3763の作用機作に関して検討を行なったので以下にその概要を記述する。

1) R-3763は一部の cefuroxime を除く各種の penicillinase, cephalosporinase による加水分解に抵抗性を示し、 β -lactamase 安定性が高かった。また R-3763は β -lactamase 阻害活性が全般的に弱いため、酵素との親和性による不活化を受け難かった。さらに R-3763は β -lactamase の誘導産生を起こし難いものであった。

2) R-3763は *S. aureus* の penicillin-binding protein (PBP) 1, PBP 3 に高い結合親和性を示し、*E. coli* には PBP 1A, PBP 1Bs, PBP 3 などに CEX, CCL よりもはるかに高い親和性を保有していた。

3) R-3763は *E. coli*, *K. pneumoniae* に広い濃度域で filament 化を起こし、spheroplast 様構造や bulge 様構造の形成が認められた。さらに CEX, CCL よりも低濃度で高率に溶菌像が観察された。

4) R-3763はヒト血清と *E. coli* に対し協力的殺菌作用を発現し、さらに R-3763はヒト血清およびヒト白血球の共存下、協力的殺菌作用の増強が CEX, CCL と同程度に認められた。

CS-807は各種グラム陽性菌ならびにグラム陰性菌に強い抗菌力を発現し、対照に用いた経口 β -lactam 剤が無効の *C. freundii*, インドール陽性 *Proteus* 属菌, *M. organii*, *E. cloacae*, *S. marcescens* などにも抗菌活性を保有するエステル型の経口用セファロsporin 剤である¹⁾。その抗菌機序を解明するため、R-3763の Na 塩 R-3746を用いて① β -lactamase に対する安定性・阻害作用・誘導活性、②ペニシリン結合蛋白質との親和性、③細菌形態に及ぼす影響、④ヒト血清ならびにヒト末梢白血球との協力的殺菌作用などについて各種 β -lactam 剤と比較検討したので報告する。

I. 実験材料ならびに実験方法

1. 使用抗生剤

R-3746 (R-3763の Na 塩, lot 9, 三共), cephalixin (CEX, 塩野義製薬), cefadroxil (CDX, 万有製薬), cefaclor (CCL, 塩野義製薬), cephaloridine (CER, 日本グラクソ), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), cef-

metazole (CMZ, 三共), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefuroxime (CXM, 日本グラクソ), cefotaxime (CTX, ヘキスト・ジャパン), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), penicillin G (PCG, 明治製菓), ampicillin (ABPC, 明治製菓), amoxicillin (AMPC, 協和発酵) などを用いた。各抗生剤は力価に応じた重量補正を行なって使用した。

2. 使用菌株

β -Lactamase に対する各種実験には、三共生物研究所に与えられた臨床分離の β -lactamase 産生菌株のうちから、酵素学的性質の明らかにされているものを用いた。ペニシリン結合蛋白質への親和性の実験には、当研究所保存の *S. aureus* FDA 209 P JC-1 と *E. coli* NIHJ JC-2 とを使用した。細菌形態に及ぼす影響、ヒト血清ならびにヒト末梢白血球との協力的殺菌作用の実験には、当研究所に与えられた臨床分離の各種感性菌株の中から、前者には *E. coli* 3229 および *K. pneumo-*

niae 806 を、後者には *E. coli* 704 を用いた。

3. β -Lactamase の調製法

各供試菌株(嫌気性菌を除く)は trypticase soy broth (TSB, BBL) 100 ml にて 37°C 18 時間培養後、菌液を新鮮 TSB 2L に移植し 37°C 4 時間振盪培養した。なお一部の菌液には培養開始 2 時間後、inducer として 6-aminopenicillanic acid を 25 μ g/ml となるよう添加し培養を継続した。嫌気性菌 3 株は GAM ブイヨン(日水)を用い、37°C にて嫌気的条件下に培養を行なった。それぞれの培養菌液を冷却下に遠心(5,000G, 15分)集菌し、50 mM のリン酸緩衝液(pH 7.5)で 1 回遠心洗浄後、同緩衝液に再浮游し超音波処理(10 Kc, 5~10分)を行なった。破碎菌液の遠心上清から β -lactamase を精製し²⁻⁵⁾、得られた活性画分を -20°C で保存して以後の実験に供した。

4. β -Lactamase による加水分解速度の測定

各被験薬剤はリン酸緩衝液(50 mM, pH 7.5)を用いて 100 μ M に調製し、ペニシリンが基質の場合にはマイクロヨード法⁶⁾で、セフェム・オキサセフェムの場合には spectrophotometric assay (UV 法)^{7,8,9)}により、各基質の β -lactamase による加水分解速度を 30°C にて測定した。各薬剤の β -lactamase 安定性は penicillinase に対しては PCG の、cephalosporinase および cefuroximase^{10,11)} に対しては 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た。

5. β -Lactamase に対する阻害作用

被験薬剤の β -lactamase 阻害活性は、ABPC または CER の各々 100 μ M を基質とした時の β -lactamase の加水分解反応に対する薬剤の阻害定数 (Ki) を Lineweaver-Burk plot 法により算出した。

6. β -Lactamase 誘導活性の測定

構成的にはほとんど β -lactamase を産生せず、ABPC によって誘導産生される *E. cloacae* 1143, *P. vulgaris* 1417, *S. marcescens* 3494 を各々 20 ml の TSB で 37°C 18 時間培養後、全量を新鮮 TSB 400 ml に移植し、37°C にて 2 時間振盪培養した。これに R-3763, CEX, CDX, CCL, AMPC を 0.1, 1, 10 μ g/ml となるよう添加し、さらに 2 時間振盪培養を継続した。冷却下に遠心(5,000G, 15分)集菌した菌塊をリン酸緩衝液(50 mM, pH 7.5)に浮游し、超音波破碎(10 Kc, 5分)後の遠心上清を粗酵素液として実験に供した。粗酵素液の蛋白質量は LOWRY¹²⁾法を用いて、さらに β -lactamase 活性は CER を基質とした UV 法⁷⁻⁹⁾にてそれぞれ測定し、被験薬剤の β -lactamase 誘導能は単位蛋白質あたりの β -lactamase 活性で表わした。

7. Penicillin-binding proteins (PBPs) に対する結合親和性の検討

a) 膜画分の調製

TSB にて前培養した *S. aureus* FDA 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2 各 40 ml を 800 ml の新鮮 TSB に移植し、37°C 4 時間振盪培養した。冷却下に遠心(5,000G, 15分)集菌し、菌塊をリン酸ナトリウム緩衝液(10 mM, pH 7.0)にて 1 回遠心洗浄後、10 mM の MgCl₂ 加リン酸緩衝液(50 mM, pH 7.0)に浮游した。これを氷冷下に超音波破碎(10 Kc, 5~10分)し、冷却遠心(3,000G, 15分)後の上清を 2 回超遠心処理(100,000G, 30分)した。得られた膜画分を上記緩衝液に再浮游し、蛋白質量が 8 mg/ml (*S. aureus*) および 15 mg/ml (*E. coli*) となるように調製した。

b) 競合結合実験

PBPs に対する結合親和性は SPRATT らの原法を一部改変して実施した^{13,14)}。膜画分 30 μ l に 3 μ l の非放射性 R-3763, CEX, CCL, AMPC を 0.01~100 μ g/ml となるよう添加し、30°C 10 分間保温後 3 μ l の ¹⁴C-penicillin G (0.15 μ Ci, Amersham) を加えてさらに 30°C 10 分間処理した。サンプル中の細胞質膜を sarkosyl (東京化成)で可溶化し外膜成分を除去後、ポリアクリルアミド(10% acrylamide-0.06% bisacrylamide, 生化学工業)ゲル電気泳動を行ない蛋白を分離した。ゲルを酢酸(7%)-メタノール(10%)で固定後、増感剤(PPO, Merck)をしみこませ減圧下に加温乾燥した。乾燥ゲルを X 線フィルム(X-Omat, Kodak)と 70°C で 1 ヶ月間密着露光し、得られたフルオログラフィーから ¹⁴C-PCG の結合を 50% 阻止する薬剤濃度 (ID₅₀) をデンストメーター (CS-910, 島津製作所)を用いて算出した。

8. 位相差顕微鏡による形態観察

スライドガラス上に R-3763, CEX, CCL, AMPC を各々 0.01~12.5 μ g/ml 含有する heart infusion agar (HIA, 栄研)の薄層培地を作製し、これに対数増殖期の *E. coli* 3229, *K. pneumoniae* 806 を塗抹したカバーガラスを被覆後、パラフィンで封入した。各サンプルを 37°C にて培養下に倒立位相差顕微鏡 (MD-30, ニコン)を用い、薬剤の細菌形態に及ぼす影響を経時的に観察、写真撮影を行なった。

9. ヒト血清との協力的殺菌作用の検討

TSB を用い 37°C 18 時間培養した *E. coli* 704 を新鮮 TSB に接種し、37°C にて対数増殖期まで振盪培養した。冷却下に遠心(5,000G, 15分)集菌し、生理食塩水と basal medium of Eagle (BME, 日水)で 1 回ずつ遠心洗浄した。菌塊を BME に懸濁し (1 \times 10⁶ CFU/ml),

その1 mlに BME 1 mlを加え、さらに健康成人由来の新鮮血清1 mlと被験薬剤(R-3763, CEX, CCL)の各溶液1 mlをそれぞれ10%, 1/2 MICとなるよう添加した。各サンプルを37°Cで振盪培養し、経時的に菌液を分取、適宜希釈後 HIA による混釈法にて生残菌数を測定した。

なお MIC 測定には5%非働化モルモット血清含有 BME を使用し、 10^6 CFU/ml の最終接種菌量で37°C 18時間培養後、濁度増加の認められない薬剤の最小濃度($\mu\text{g/ml}$)を MIC とした。

10. ヒト白血球との協力的殺菌作用の検討

健康成人由来の血液からヒト末梢白血球(HPBL)を調製し、BME に 1.6×10^6 cells/ml となるよう浮遊させた。HPBL 含有 BME 1 ml(最終細胞数 4×10^6 cells/ml)にヒト血清1 ml(最終10%), 4%ゼラチン加 BME 1 ml, さらに被験薬剤(R-3763, CEX, CCL)の溶液0.5mlを1/2MICとなるように添加した。それぞれのサンプルに上記9. で調製した菌液0.5ml(最終菌量 5×10^6 CFU/ml)を加えそれらを37°Cにて緩やかに回転培養し、経時的に分取した菌液を適宜希釈後、HIA による混釈法で生菌数を調べた。

II. 実験成績

1. β -Lactamase 安定性, 阻害活性, 誘導活性

三橋らの分類による penicillinase(PCase), cephalosporinase(CSase), cefuroximase(CXase)^{10,11)}など15種の β -lactamaseの加水分解作用に対する被験薬剤の安定性を Table 1 に示した。R-3763は3種のPCaseにほとんど加水分解を受けず安定性が高かった。また7菌種の産生するCSaseによってもR-3763は加水分解を受け難く、対照に用いた経口用 β -lactam 剤 CEX を上回る良好な安定性を示した。*P. vulgaris* や *B. fragilis* の産生するCXaseによってR-3763は若干加水分解を受けたが、7 β 位にR-3763と同じ methoxyimino 基を有する CXM や CTX よりも安定性が良好であった。

ABPC あるいは CER を基質とする β -lactamaseの加水分解反応に対するR-3763の阻害活性を Table 2 に示した。R-3763は *C. freundii* GN7391株の産生する cephalosporinase に比較的強い阻害活性(Ki値 $0.42 \mu\text{M}$) がみられたが、CMZ, CTX, LMOX などに比べると弱いものであった。また *E. cloacae* IFO 12937, *M. morgani* 1510, *P. inconstans* 1704 の酵素に対しては若干の阻害活性を示したものの、この活性はCMZ, CTX, LMOX の1/10~1/100程度にすぎなかった。その他の β -lactamase に対しては阻害活性をほとんど持たず、従ってR-3763は各種 β -lactamase

Table 1 Hydrolysis by various β -lactamases

| Organism | Relative rate of hydrolysis (%) ^{a)} | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | R-3763 | CER | CEX | CEZ | CMZ | CTM | CXM | CTX | LMOX | PCG | ABPC |
| PCase type | | | | | | | | | | | |
| <i>B. cereus</i> (Calbiochem) | 0 | 0.3 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 108 |
| <i>E. coli</i> 609 | 0 | 100 | 0.4 | 14 | 0 | 12 | 1.6 | 0 | 0 | 145 | 850 |
| <i>S. marcescens</i> GN7647 | 1.3 | 46 | 0.1 | 8.4 | 0 | 1.6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 99 |
| CSase type | | | | | | | | | | | |
| <i>C. freundii</i> GN7391 | 1.7 | 100 | 24 | 288 | 0 | 0.8 | 0 | 0 | 0 | 2.8 | 0.1 |
| <i>P. inconstans</i> 1704 | 2.9 | 100 | 0.5 | 36 | 0 | 10 | 2.6 | 0 | 0 | 3.0 | 0.1 |
| <i>P. rettgeri</i> 1602 | 3.4 | 100 | 13 | 20 | 0 | 15 | 4.3 | 1.0 | 0 | 0.3 | 0 |
| <i>M. morgani</i> 1510 | 2.2 | 100 | 11 | 68 | 0 | 45 | 0.4 | 0 | 0 | 8.2 | 0.6 |
| <i>E. cloacae</i> IFO12937 | 1.0 | 100 | 22 | 237 | 0.3 | 21 | 0 | 0.1 | 0 | 6.3 | 0.4 |
| <i>S. marcescens</i> GN7647 | 5.6 | 100 | 4.3 | 645 | 0 | 56 | 0.5 | 0.6 | 0 | 2.5 | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> 5-1089 | 2.8 | 100 | 14 | 957 | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 27 | 9.5 |
| CXase type | | | | | | | | | | | |
| <i>P. vulgaris</i> 1427 | 12 | 100 | 113 | 403 | 0 | 231 | 241 | 26 | 0 | 21 | 24 |
| <i>P. vulgaris</i> GN7919 | 9.6 | 100 | 183 | 442 | 0 | 262 | 189 | 77 | 0 | 15 | 16 |
| <i>B. fragilis</i> GAI3025 | 9.1 | 100 | 6.6 | 59 | 0 | 30 | 37 | 23 | 0 | N.D. | 0 |
| <i>B. badius</i> GAI1834 | 7.4 | 100 | 3.4 | 29 | 0 | 2.0 | 46 | 5.4 | 0 | N.D. | 11 |
| <i>C. symbiosum</i> T-1 | 15 | 100 | 5.0 | 115 | 0 | 22 | 49 | 21 | 0 | 0.8 | 0 |

a) : The hydrolysis of PCG(PCase) or CER(CSase, CXase) is given a value of 100; 0, <0.1.

N.D.: Not determined.

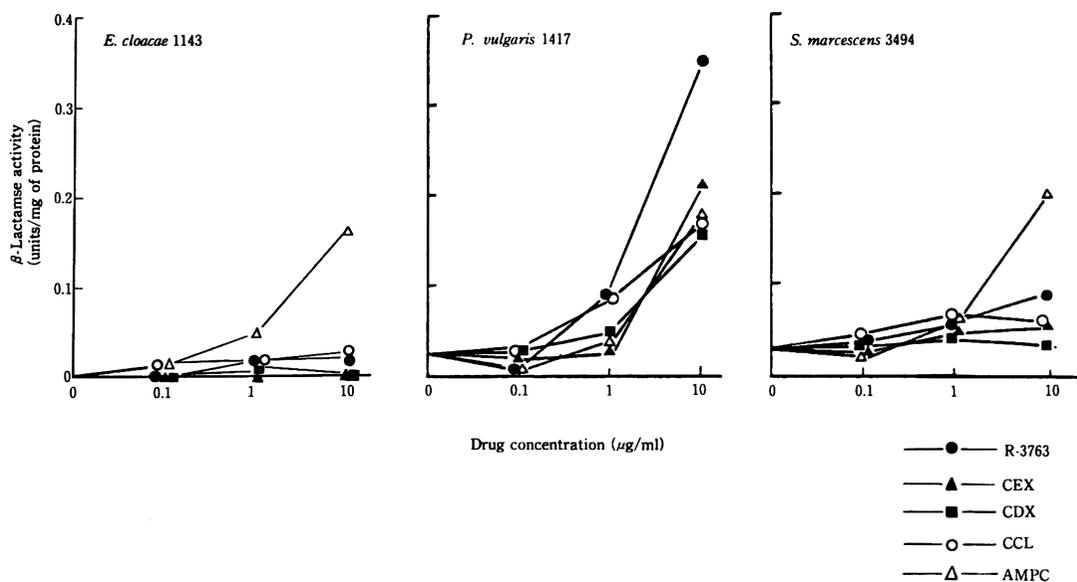
Table 2 β -Lactamase inhibitory activity

| Organisms | Ki value (μ M) ^{a)} | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-------|------|-------|-------|-------|-----|-------|
| | R-3763 | CER | CEX | CEZ | CMZ | CTM | CXM | CTX | LMOX | PCG | ABPC |
| PCase type | | | | | | | | | | | |
| <i>B. cereus</i> (Calbiochem) | >100 | - | - | - | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | - | - |
| <i>E. coli</i> 609 | >100 | - | - | - | >100 | - | >100 | >100 | >100 | - | - |
| <i>S. marcescens</i> GN7647 | >100 | - | - | - | >100 | N.D. | >100 | N.D. | >100 | - | - |
| CSase type | | | | | | | | | | | |
| <i>C. freundii</i> GN7391 | 0.42 | - | - | - | 0.044 | N.D. | 0.008 | 0.008 | 0.06 | - | 0.11 |
| <i>P. inconstans</i> 1704 | 17.3 | - | - | - | 0.014 | 5.2 | N.D. | N.D. | N.D. | - | 0.088 |
| <i>P. rettgeri</i> 1602 | >100 | - | - | - | 4.4 | 21 | N.D. | 0.047 | N.D. | - | 0.089 |
| <i>M. morgani</i> 1510 | 7.3 | - | - | - | 0.071 | - | 0.044 | 0.047 | 0.08 | - | 0.34 |
| <i>E. cloacae</i> IFO12937 | 5.5 | - | - | - | 0.18 | N.D. | 0.012 | 0.031 | 0.091 | - | 0.82 |
| <i>S. marcescens</i> GN7647 | >100 | - | - | - | 0.41 | - | 0.22 | 1.1 | 7.8 | - | 0.005 |
| <i>P. aeruginosa</i> 5-1089 | >100 | - | - | - | 0.037 | N.D. | 0.019 | 0.11 | N.D. | - | 0.70 |
| CXase type | | | | | | | | | | | |
| <i>P. vulgaris</i> 1427 | >100 | - | - | - | 3.2 | - | - | - | 48 | - | 3.2 |
| <i>P. vulgaris</i> GN7919 | >100 | - | - | - | 0.27 | - | - | - | >100 | - | 2.4 |
| <i>B. fragilis</i> GAI3025 | >100 | - | - | - | 0.07 | - | - | - | 0.09 | - | 1.0 |
| <i>B. bivius</i> GAI1834 | >100 | - | - | - | N.D. | N.D. | - | - | N.D. | - | N.D. |
| <i>C. symbiosum</i> T-1 | >100 | - | - | - | 0.03 | N.D. | - | - | 0.14 | - | 0.24 |

a) : Substrates : PCG (100 μ M) for PCase, and CER (100 μ M) for CSase and CXase.

- : No inhibition.

N.D. : Not determined.

Fig. 1 β -Lactamase inducing activity

との親和性が一般的に低い傾向が認められた。

被験薬剤の β -lactamase 誘導活性を測定した成績を Fig. 1 に示した。 *E. cloacae* 1143, *S. marcescens* 3494 に対し、R-3763 は CEX, CDX, CCL などと同様ほとんど β -lactamase 誘導活性を示さなかった。 AMPC は薬剤濃度の増大にともない、わずかながらも誘導活性の上昇がみられた。 *P. vulgaris* 1417 に対しては、各薬剤とも作用濃度の増大とともに若干 β -lactamase 誘導

活性の上昇が認められた。しかし誘導産生された酵素の活性は全般的に低い(0~0.3 units/mg of protein)のものであった。

2. PBP_s に対する結合親和性

S. aureus FDA 209P JC-1 と *E. coli* NIHJ JC-2 の PBP_s に対する R-3763 と ¹⁴C-PCG との競合結合実験の成績を Fig. 2, Fig. 3 に、さらに各薬剤の ID₅₀ 値を Table 3, Table 4 にまとめて示した。

Fig. 2 Fluorography showing competition of R-3763 for ¹⁴C-PCG binding to PBP_s of *S. aureus* FDA209P JC-1

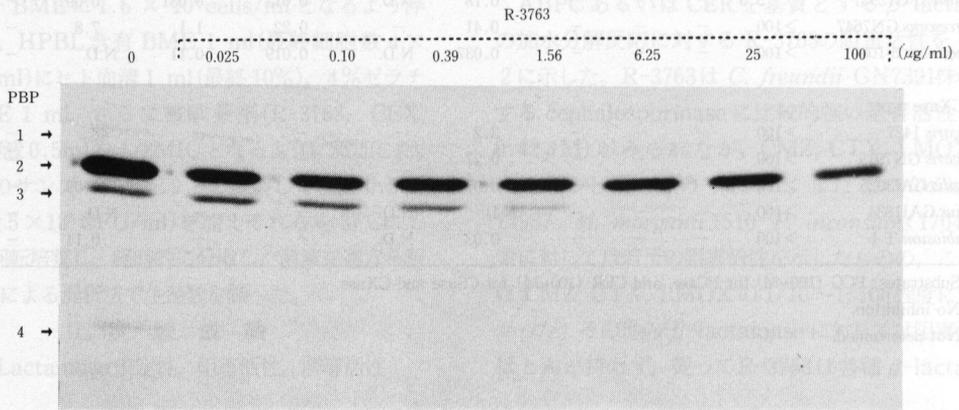
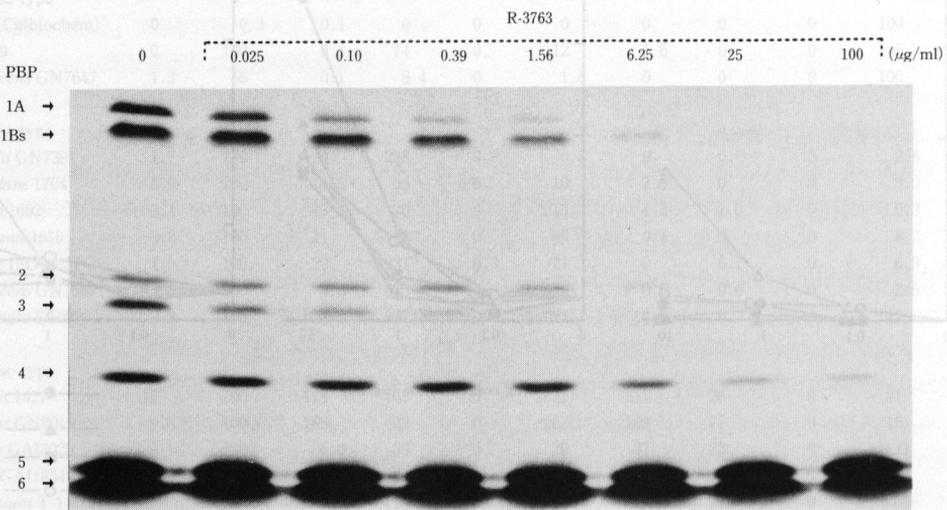


Fig. 3 Fluorography showing competition of R-3763 for ¹⁴C-PCG binding to PBP_s of *E. coli* NIHJ JC-2



a) The hydrolysis of PCG (Case) or CER (Case, CXase) is given a value of 100; 0 < 0.1.

ND: Not determined.

Table 3 Competition with ^{14}C -PCG for binding to PBPs of *S. aureus* FDA209P JC-1

| Antibiotics | ID ₅₀ ^{a)} for ^{14}C -PCG binding to PBPs | | | |
|-------------|---|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| R-3763 | 0.2 | 3.1 | 0.9 | 1.8 |
| CEX | 0.8 | 3.2 | 0.2 | 0.9 |
| CCL | 0.5 | 10.5 | 0.1 | 0.8 |
| AMPC | 0.1 | 0.2 | 0.05 | 0.1 |

a) : 50% inhibitory dose ($\mu\text{g/ml}$).Table 4 Competition with ^{14}C -PCG for binding to PBPs of *E. coli* NIHJ JC-2

| Antibiotics | ID ₅₀ ^{a)} for ^{14}C -PCG binding to PBPs | | | | | | |
|-------------|---|------|------|------|------|------|------|
| | 1A | 1Bs | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| R-3763 | 0.4 | 0.6 | 1.5 | 0.3 | 15.2 | >100 | >100 |
| CEX | 3.1 | >100 | >100 | 12.5 | 8.0 | >100 | >100 |
| CCL | 1.8 | 11.4 | 23.8 | 4.1 | 14.4 | >100 | >100 |
| AMPC | 0.8 | 12.5 | 0.1 | 3.2 | 0.2 | >100 | >100 |

a) : 50% inhibitory dose ($\mu\text{g/ml}$).

S. aureus に対し R-3763は PBP 1, PBP 3に結合親和性が高く, PBP 2, PBP 4にも比較的良好な親和性を保有していた。しかし Table 3に示す様に CEX, CCLも PBP 1, PBP 3への親和性が高かったが, *S. aureus*の増殖に必須な PBP画分の一つである PBP 2¹⁵⁻¹⁸⁾に対しては R-3763の方が高い親和性を示した。AMPCは被験薬剤の中でどの PBP画分に対しても最も小さい ID₅₀を示し親和性が高かった。

*E. coli*の PBPsに対する R-3763の結合親和性は PBP 3, PBP 1A, PBP 1Bsの順に高く, ID₅₀は Table 4に示す如く 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 以下の小さい値であった。また PBP 2にも比較的高い親和性を保有し, PBP 4には中等度の親和性を示したが PBP 5, PBP 6には他剤と同様全く親和性が認められなかった。CEXは PBP 1A, PBP 3, PBP 4に, また CCLは PBP 1A, PBP 1Bs, PBP 2, PBP 3, PBP 4などへの結合親和性が認められたが, その程度はどの PBPsに対してもおおむね中等度のものであった。AMPCは PBP 1A, PBP 2, PBP 4に高い結合親和性が認められたが PBP 1Bs, PBP 3に対する親和性は R-3763より低かった。

3. 細菌形態に及ぼす影響

各濃度の R-3763に2時間接触後の *E. coli* 3229の形態変化を Fig. 4に, さらに各薬剤の形態に及ぼす影響

を Fig. 5にまとめて示した。

R-3763は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC)~3.13 $\mu\text{g/ml}$ (16 MIC)の広い濃度範囲にわたって filament化を起し, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (8 MIC), 3.13 $\mu\text{g/ml}$ では filament化した細胞の溶菌像が観察された。また 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (32 MIC), 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (64 MIC)では若干の伸長化と spheroplast 様構造の形成が認められ, ほとんど全ての細胞が溶菌を起こしていた。CEX, CCLはそれぞれ 0.39 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC), 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (1/32 MIC)以下では分裂・増殖を許し, 形態変化への影響はほとんど認められなかった。また CEXは 0.78 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC)以上, CCLは 0.10 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC)以上の濃度域で filament化を起こしたが, 溶菌能は R-3763の方が優れていた。AMPCは 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以下では形態変化を起こさないものの, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC)~12.5 $\mu\text{g/ml}$ (2 MIC)の濃度域では short-filament化, 菌体中央部の膨化, spheroplast 様構造の形成などが観察され, 溶菌像も R-3763と同程度に認められた。

同様に *K. pneumoniae* 806の形態に及ぼす影響を Fig. 6, Fig. 7に示した。

R-3763は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC)~12.5 $\mu\text{g/ml}$ (64 MIC)の非常に広い濃度範囲で filament化を起し, そのうち 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (8 MIC)以上では bulge 様構造, spheroplast 様構造の形成が認められ溶菌像も高率に観

Fig. 4 Phase-contrast micrographs of *E. coli* 3229 exposed to R-3763 for 2 h

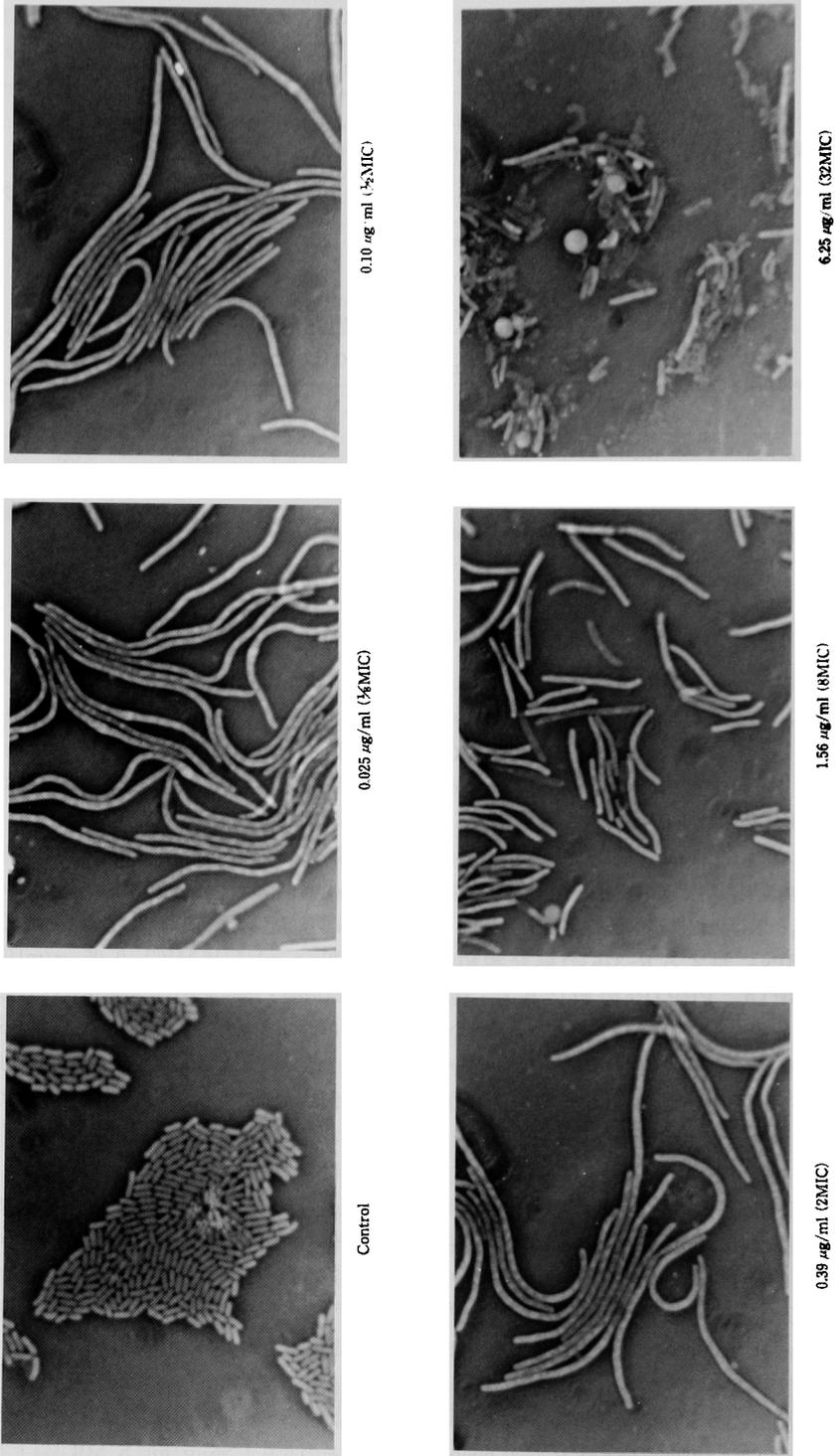
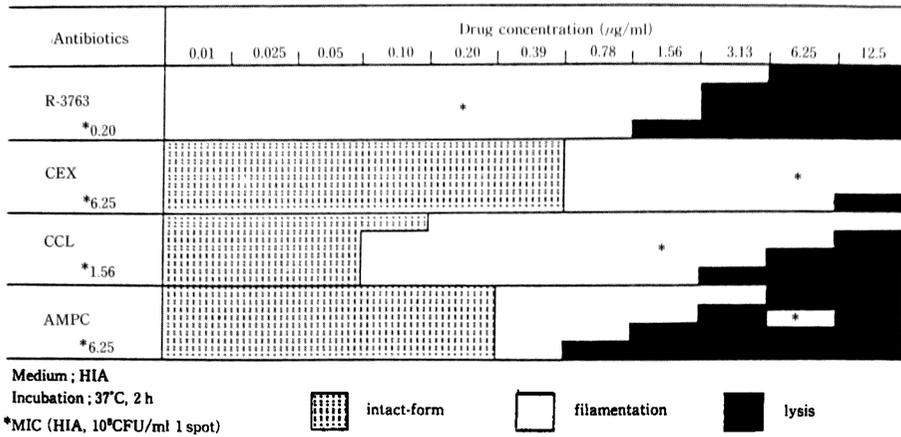


Fig. 5 Morphological alterations of *E. coli* 3229

察された。CEX, CCLはR-3763に比べ filament化の濃度域が狭く、溶菌能もR-3763に若干及ばなかった。

4. 血清との協力的殺菌作用および血清、白血球共存時の殺菌作用

R-3763, CEX, CCLとヒト血清との協力的殺菌作用をFig. 8に示した。血清単独ではほとんど増殖抑制作用はみられなかったが、抗生剤と血清との共存下では各薬剤(1/2 MIC)とも経時的に強力な殺菌作用を発現し、さらにR-3763とCEXとは24時間培養後の菌数増加がCCLに比べて少なかった。

抗生剤とヒト白血球との協力的殺菌作用を検討した成績をFig. 9に示した。血清(HS)と白血球(HPBL)との存在のみでは静菌作用を示したにすぎなかった。R-3763は1/2 MIC単独添加によりCEX, CCLと同様、経時的に生菌数を減少させた。各抗生剤の1/2 MIC、血清および白血球の共存下では協力的殺菌作用の増強が認められ、特に1~2時間後の生菌数の減少が顕著に大きかった。またR-3763の白血球との協力的殺菌作用の増強効果は他剤とほぼ同程度であった。

III. 考 察

CS-807とその活性体R-3763は各種グラム陽性球菌およびグラム陰性桿菌、特に β -lactamase産生性の*C. freundii*、インドール陽性*Proteus*属菌、*M. morgani*, *E. cloacae*, *S. marcescens*にも抗菌活性を発現することがすでに報告されているが¹⁾、今回CS-807の抗菌機作の解明を目的として各種の実験を行なった。

R-3763は plasmid 由来の penicillinase ならびに染色体性の cephalosporinase に強い抵抗性を保有しており、さらにR-3763の β -lactamase 阻害活性は全般

的に弱く、酵素との親和性は低いものであった。それ故、R-3763は β -lactamaseの加水分解や β -lactamaseとの結合などによる不活化を受け難いものと考えられる。またR-3763は β -lactamase誘導活性がかなり低く、他の β -lactam剤との antagonism^{19,20)}を引き起こす可能性も少ないであろう。従って、対照に用いた経口用 β -lactam剤が抗菌力を持たない*C. freundii*、インドール陽性*Proteus*属菌、*M. morgani*, *E. cloacae*, *S. marcescens*などにR-3763が抗菌活性を保有するのは、R-3763の上記 β -lactamaseに対する良好な挙動を反映したものと考えられる。しかし*P. vulgaris*, *B. fragilis*の産生する β -lactamaseは三橋らの分類による cefuroximase^{10,11)}であり、これらの酵素は β -lactamase安定性の高い oxyimino cephalosporin^{21~23)}に対しても活性が強く、基質特異性の広い酵素群である。7 α 位に methoxyimino 基を有するR-3763も cefuroximase には若干加水分解を受ける傾向を示した。

R-3763は*S. aureus*の増殖に必須なPBP画分の一つであるPBP3^{15~18)}に高い結合親和性を保有し、また*E. coli*にはこの菌種に対する抗菌力の発現と関連性が高い^{24,25)}と考えられているPBP1A, PBP1Bs, PBP3などにCEX, CCLよりも高い結合親和性を示した。これらの事実は位相差顕微鏡を用いた形態変化の観察からも確認され、R-3763は*E. coli*に filament化を起こすとともに spheroplast 様構造の形成、さらには溶菌像がCEX, CCLよりも低濃度で高率に認められた。これらの実験結果はR-3763が*E. coli*の細胞壁 peptidoglycan 架橋形成反応の酵素^{26,27)}であるPBP1A,

Fig. 6 Phase-contrast micrographs of *K. pneumoniae* 806 exposed to R-3763 for 2 h

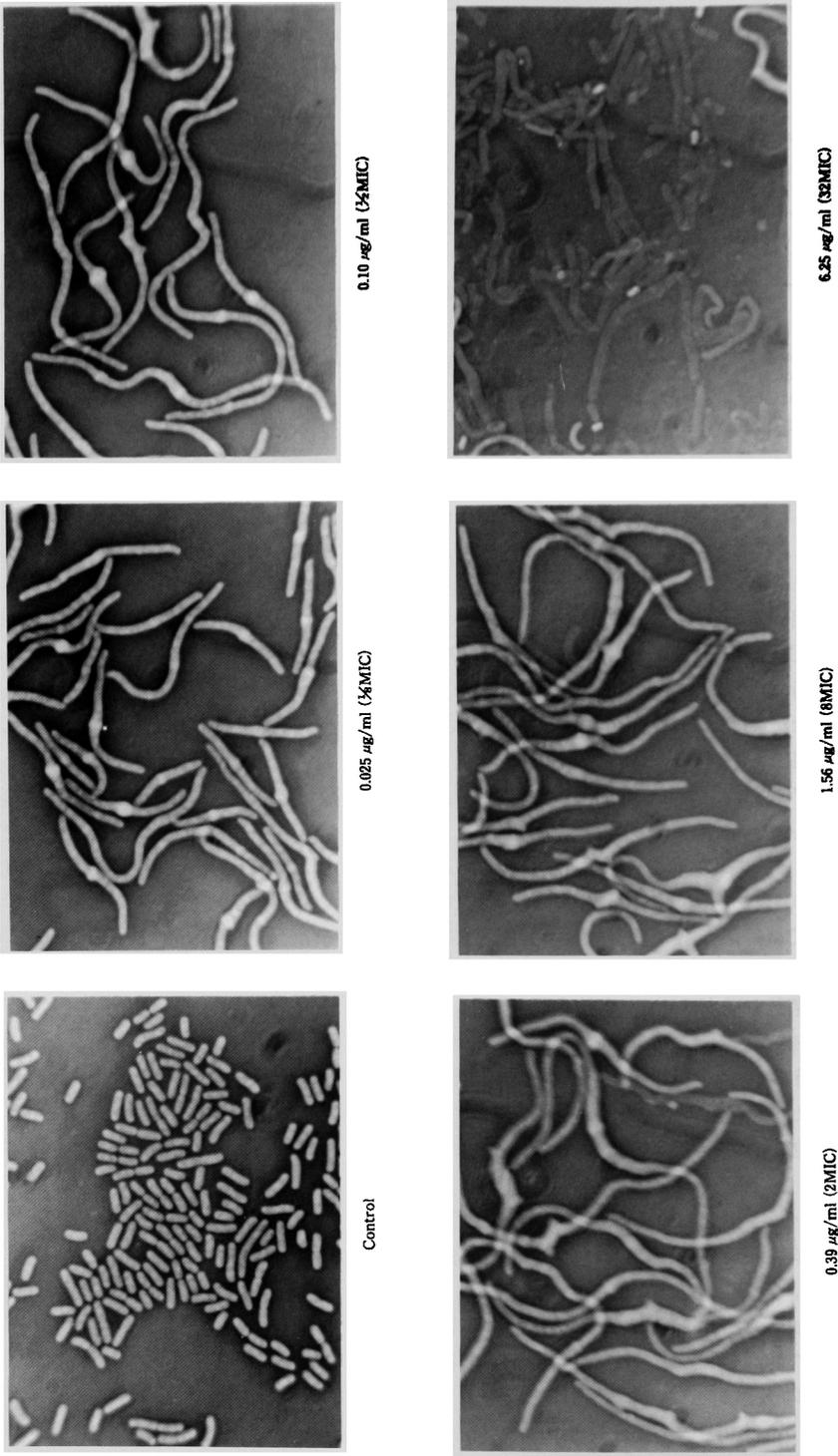


Fig. 7 Morphological alterations of *K. pneumoniae* 806

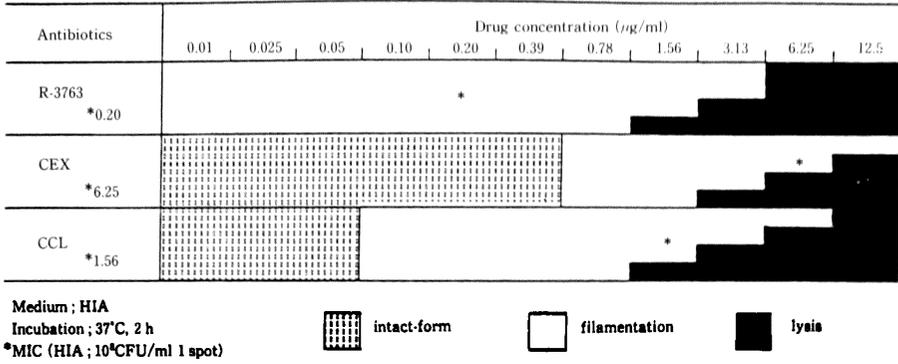
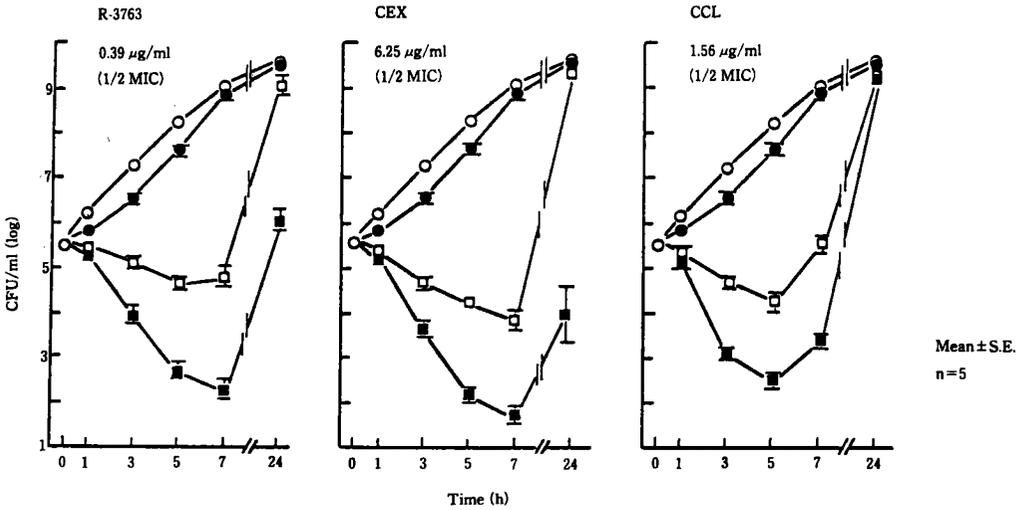
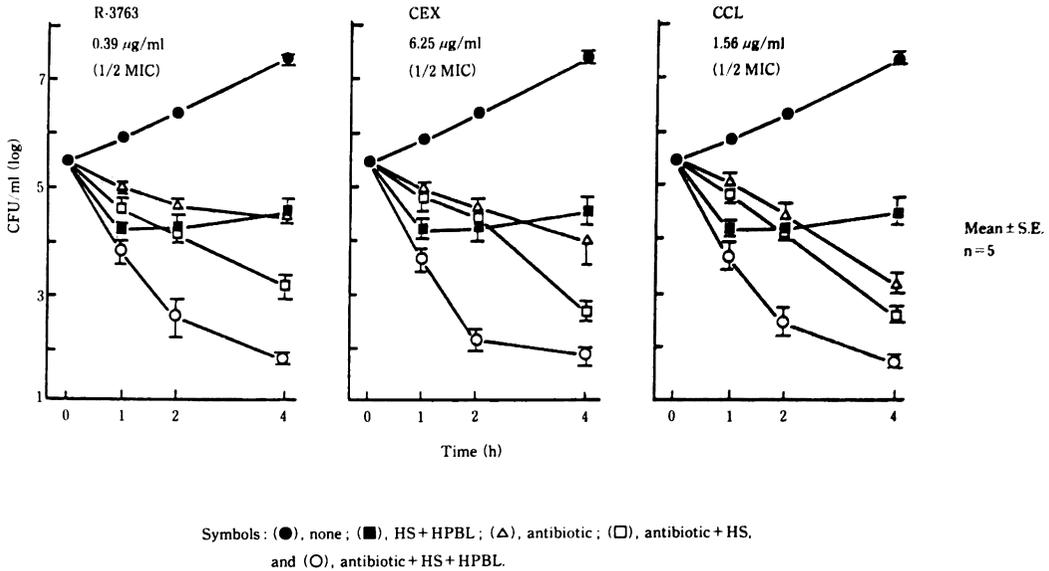


Fig. 8 Bactericidal activity against *E. coli* 704 by co-existence of human serum



Symbols: (●), no antibiotic with human serum;
(○), no antibiotic with inactivated human serum;
(■), antibiotic with human serum, and
(□), antibiotic with inactivated human serum.

Fig. 9 Bactericidal activity against *E. coli* 704
by co-existence of human leukocyte



PBP 1Bsとの親和性が他剤よりも高く、それらの酵素反応をより強く阻害するため、細胞壁の合成が不完全に行なわれ、その結果 spheroplast 様構造や溶菌などの形態変化が顕著に現われたものと推察される。また R-3763は *K. pneumoniae* に対しても *E. coli* と同様の形態変化、溶菌・殺菌能を示しており、おそらくはこの菌種に対しても *E. coli* の PBPs と類似の機能を有する PBP 群への結合親和性が高いものと推測される。

外膜透過性の良否に関しては未検討であるが、第三世代セファロsporinは一般的に外膜透過性は低いものの優れた抗菌力を保有する²⁸⁻³⁰⁾ことが知られている。CTX, ceftizoxime, cefmenoxime, cefixime などと同一の 7 α 側鎖を有し、それらと構造類似の R-3763も第三世代セファロsporin剤と同様の外膜透過機構を持ち、優れた抗グラム陰性菌活性を発現したものと思われる。

R-3763の強力な抗菌活性は各種 β -lactamase に対する高い安定性、致死的作用点 PBPs との高い親和性、鋭い溶菌・殺菌効果などが反映されたものであろう。さらに R-3763は生体防禦機構と良好な協力的殺菌作用を発現するので、経口吸収性の高い CS-807³¹⁾は生体内効果が十分期待できる経口用 β -lactam 剤と考えられる。

文 献

- 1) SUGAWARA, S.; M. IWATA, M. TAJIMA, T. MAGARIBUCHI, H. YANAGISAWA, H. NAKAO, J. KUMAZAWA & S. KUWAHARA: CS-807, a new orally active cephalosporin. I. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. Program Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 26 th. abstr. no. 592, 1986
- 2) TAJIMA, M.; Y. TAKENOUCI, S. SUGAWARA, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Purification and properties of chromosomally mediated β -lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391. J. Gen. Microbiol. 121: 449-456, 1980
- 3) OHYA, S.; Y. FUJII-KURIYAMA, M. YAMAMOTO & S. SUGAWARA: Purification and some properties of β -lactamases from *Proteus rettgeri* and *Proteus inconstans*. Microbiol. Immunol. 24: 815-824, 1980
- 4) TAJIMA, M.; S. MASUYOSHI, M. INOUE, Y. TAKENOUCI, S. SUGAWARA & S. MITSUHASHI: Purification and properties of β -lactamase from *Serratia marcescens*. J. Gen. Microbiol. 126: 179-184, 1981
- 5) TAJIMA, M.; Y. TAKENOUCI, S. OHYA & S. SUGAWARA: Purification and properties of β -lactamase from *Serratia marcescens*. J. Gen. Microbiol. 126: 179-184, 1981

- AWARA: Purification and properties of β -lactamase from *Proteus vulgaris*. Microbiol. Immunol. 26: 531-534, 1982
- 6) NOVICK, R. P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. Biochem. J. 83: 236-240, 1962
- 7) O'CHALLAGHAN, C. H.; P. W. MUGGLETON & G. W. ROSS: Effects of β -lactamase from Gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. In Antimicrob. Agents Chemother. Ed., G. L. Hobby, p. 55~63, American Society for Microbiology, Maryland, 1969.
- 8) ROSS, G. W.; K. V. CHANTER, A. M. HARRIS, S. KIRBY, M. J. MARSHALL & C. H. O'CHALLAGHAN: Comparison of assay technique for β -lactamase activity. Anal. Biochem. 54: 9-16, 1973
- 9) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139: 780-789, 1974
- 10) HIRAI, K.; S. IYOBE, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Purification and properties of a new β -lactamase from *P. cepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 355-358, 1980
- 11) MITSUHASHI, S.; M. INOUE: Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In beta-lactam antibiotics. Ed., S. Mitsuhashi, p. 41-56, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1981
- 12) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951
- 13) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 2999-3003, 1975
- 14) UTSUI, Y.; T. YOKOTA: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 397-403, 1985
- 15) CURTIS, N. A. C.; M. V. HAYES, A. W. WYKE & J. B. WARD: A mutant of *Staphylococcus aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity *in vitro*. FEMS Microbiol. Lett. 9: 263-266, 1980
- 16) GEORGOPADAKOU, N. H.; F. Y. LIU: Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 834-836, 1980
- 17) CURTIS, N. A. C.; M. V. HAYES: A mutant of *Staphylococcus aureus* H deficient in penicillin-binding protein 1 is viable. FEMS Microbiol. Lett. 10: 227-229, 1981
- 18) WYKE, A. W.; J. B. WARD, M. V. HAYES & N. A. C. CURTIS: A role *in vivo* for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 119:389-393, 1981
- 19) SANDERS, C. C.; W. E. SANDERS, Jr. & R. V. GOERING: *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 968-975, 1982
- 20) 池田文昭, 高乗 仁, 西田 実, 五島磋智子, 桑原章吾: Cephem系薬剤間の antagonism とグラム陰性菌における β -lactamase 誘導について。Chemotherapy 31: 304-308, 1983
- 21) 益吉真次, 新井 進, 三橋 進: 新しいセファロスポリン Cefotaxime の抗菌作用および β -lactamase に対する態度。Chemotherapy 28(S-1): 1-11, 1980
- 22) 高乗 仁, 西田 実: 新しい cephalosporin 誘導體 Ceftizoxime (CZX) の R-plasmid 保有および染色体由来耐性菌に対する抗菌活性と β -lactamase に対する安定性。Chemotherapy 28(S-5): 99-103, 1980
- 23) 小此木研二, 久野光造, 木田 誠, 三橋 進: Cefmenoxime (SCE-1365) の β -lactamase 安定性。Chemotherapy 29(S-1): 188-193, 1981
- 24) CURTIS, N. A. C.; D. ORR, G. W. ROSS & M. G. BOULTON. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 533-539, 1979
- 25) NOZAKI, Y.; A. IMADA & M. YONEDA: SCE-963, a new potent cephalosporin with high affinity for penicillin-binding proteins 1 and 3 of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 20-27, 1979
- 26) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫: ペニシリン結合蛋白質—理論と実際—。Chemotherapy 27: 827-840, 1979
- 27) NAKAGAWA, J.; S. TAMAKI & M. MATSUHASHI:

- Purified penicillin binding protein 1Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1379-1380, 1979
- 28) NISHIDA, M.; Y. SHIGI: The role of permeability and affinity for penicillin binding proteins in the antibacterial activity of the third generation cephalosporins. In new beta-lactam antibiotics: A review from chemistry to clinical efficacy of the new cephalosporins. Ed., H. C. Neu, p. 65-81, College of Physicians of Philadelphia, Philadelphia, 1982
- 29) KOJO, H.; Y. SHIGI & M. NISHIDA: *Enterobacter cloacae* outer membrane permeability to ceftizoxime(FK749) and five other new cephalosporin derivatives. *J. Antibiot.* 33: 317-321, 1980
- 30) 松本佳巳, 高乗 仁, 上村利明, 峯 靖弘, 五島瑳智子, 西田 実, 桑原章吾: 新経ロセファロスポリン, Cefixime(CFIX)の作用機作に関する研究. *Chemotherapy* 33(S-6): 123-133, 1985
- 31) 第35回 日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, CS-807抄録集, 1987

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CS-807, A NEW ORALLY ACTIVE CEPHALOSPORIN II. ANTIBACTERIAL MECHANISM

YUKIO UTSUI, SATOSHI OHYA, HARUKI DOMON, TSUTOMU YAJIMA,
KIYOMI SAKAO, YUMIKO TSUKADA, NAOKO SEKINE, HIROSHI YASUDA,
MASAZO TAJIMA and MASAYUKI IWATA
Biological Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo

To elucidate the excellent antibacterial activity of CS-807, a new oral cephalosporin, we investigated its mechanism of action, compared with those of several β -lactam antibiotics.

1) R-3763, the active compound of CS-807, was highly resistant to hydrolysis by both penicillinases and cephalosporinases derived from various species of bacteria, but scarcely inhibited the hydrolyzing activity of the enzymes on the substrate.

R-3763 showed low β -lactamase inducing activity against organisms possessing inducible cephalosporinase similar to those of cephalixin(CEX), cefadroxil(CDX), cefaclor(CCL) and amoxicillin(AMPC).

2) R-3763 showed high affinity for PBPs 1, 3 of *S. aureus*, and PBPs 1A, 1Bs, 3 of *E. coli* compared with CEX and CCL.

3) R-3763, at a wide range of concentrations, induced filamentous forms in *E. coli* and *K. pneumoniae* cells, and spheroplast-and/or bulge-like structures were observed.

Cell lysis after exposure to R-3763 was found to be more marked than that after exposure to CEX and CCL.

4) R-3763 showed the synergistic effect with human serum on its bactericidal activity against *E. coli*, and moreover bactericidal activity was enhanced by co-existence of human leukocyte.