

## Cefotiam hexetil のペニシリン結合蛋白質に対する 結合親和性, およびマウス培養マクロファージ との協力的食菌・殺菌作用について

横田 健・新井京子・鈴木映子

順天堂大学医学部細菌学教室\*

経口用第二世代 cephem, cefotiam hexetil (CTM-HE) の活性原体 cefotiam (CTM) は *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus vulgaris* および *Haemophilus influenzae* の作用点 PBP に cefaclor (CCL) より高い結合親和性を示した。特にこれらの菌の生存に必須の PBP 画分に cefaclor より結合親和性が高いことは、本剤がこれらの菌に強い殺菌性を示す理由を裏付けている。Cefotiam のマウス培養 M $\phi$  との協力的食菌・殺菌作用は cephem 系抗生物質として平均的な強さを持っていた。

**Key words** : Cefotiam hexetil, PBP との親和性, マクロファージとの協力作用, 食菌作用, 殺菌作用

Cefotiam hexetil (CTM-HE, SCE-2174) は cefotiam (CTM) の 4 位カルボン酸をエステル化した新経口用 cephem である。腸管粘膜上皮細胞から吸収される時, esterase の作用で CTM が遊離され血中に現れる。CTM<sup>1)</sup> はグラム陽性菌および R plasmid の有無にかかわらず, 強毒グラム陰性桿菌に強い抗菌力を示すので免疫低下が著しくない患者では, 理想的な一次選択剤となる。したがってそのプロドラッグ CTM-HE は, 広い臨床応用が期待される。

本研究では CTM-HE の活性原体 CTM の強い殺菌力を, 作用点における効果から裏付けるため, 各種細菌のペニシリン結合蛋白質 (penicillin-binding proteins: PBPs) に対する結合親和性を検討した。又 CTM-HE の生体内効果を予測する一助として, マウス培養マクロファージ (M $\phi$ ) との協力的食菌・殺菌作用も調べた。

### 材料と方法

#### 1. 薬剤

CTM-HE の活性原体 CTM は武田薬品工業株式会社から供与された。対照薬として cefaclor (CCL: 塩野義製薬株式会社) を使用した。

#### 2. PBPs に対する CTM の結合親和性の検討法

PBPs に対する結合親和性は, Spratt の方法<sup>2)</sup> を

一部改変した著者らの方法で行なった<sup>3)</sup>。すなわち感受性 *Staphylococcus aureus* 209 P, *S. aureus* 108-1 (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* 19n, *Enterococcus faecalis* 1, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Proteus vulgaris* 33 および *Haemophilus influenzae* ATCC 9334 の対数期後期の細胞を 500 ml 振盪コルベンに 200 ml の次に示す液体培地を入れたもの 6 本 (計 1.2 l) から集めた。*E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* および *E. faecalis* には L-broth<sup>4)</sup> を, *S. pneumoniae* の培養には Trypticase Soy broth に 5% のウマ非働化血清を加えたものを, *H. influenzae* のそれには BHI-broth に 2  $\mu$ g/ml の NAD と 10  $\mu$ g/ml の Hemin を加えた培地を使用した。菌細胞を 0.01 M リン酸 buffer (pH7.0) で洗浄し, 8 ml の 10 mM MgCl<sub>2</sub> 加 0.05 M リン酸 buffer (pH7.0) に浮遊した。BRANSON SONIFIER で, *E. coli* および *P. vulgaris*, *H. influenzae*, *E. faecalis* は 20 kc, 効率 20%, OUTPUT 40 watts 2 分間 3 回, *S. aureus* は 2 分間 10 回, *S. pneumoniae* は 2 分間 2 回, 1 分間 1 回の間歇的超音波処理で破碎した。3,000 $\times$ G, 10 分間の冷却遠心で菌体を除き, その上清を 10,000 $\times$ G, 30 分間超遠心して膜画分を集めた。膜画分を 200  $\mu$ l の 10 mM MgCl<sub>2</sub> 加

\* 〒113 東京都文京区本郷 2-1-1

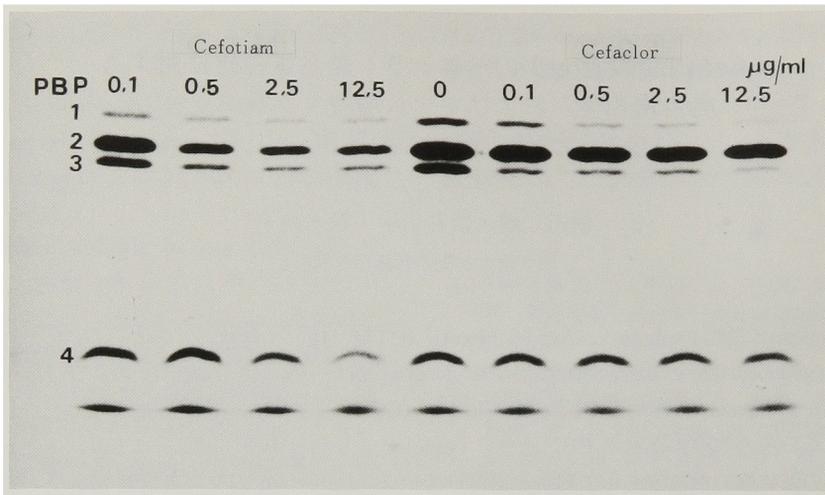


Fig. 1 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* 209P

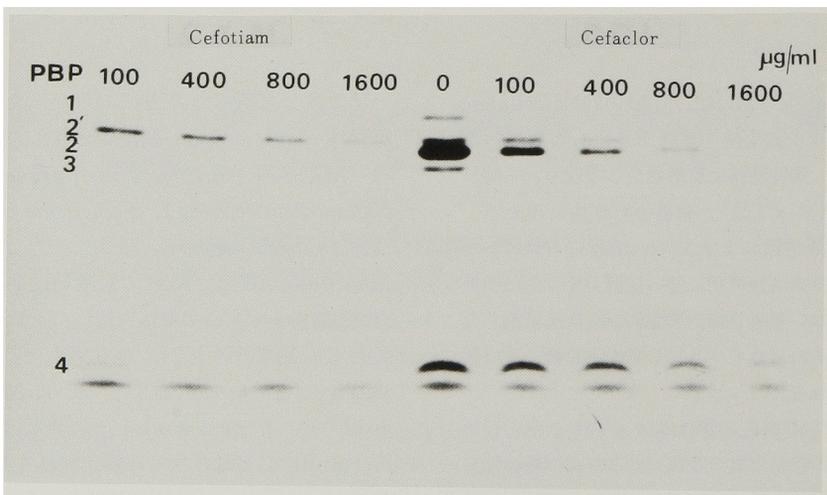


Fig. 2 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* 108-1

0.05 M リン酸 buffer に再浮遊し、超遠心で一回洗浄後同 buffer を使用して蛋白濃度が 15~20 mg/ml になるように膜画分の浮遊液を調製した。30  $\mu$ l の膜画分浮遊液に最終濃度の 11 倍の薬剤溶液を 3  $\mu$ l 加え、30°C 10 分間反応させた後、さらに 3  $\mu$ l の  $^{14}$ C-PCG 溶液 (0.15  $\mu$ Ci : 373  $\mu$ g/50  $\mu$ Ci/ml : AMERSHAM) と 30°C 10 分間反応させた。3  $\mu$ l の 60 mg/ml cold PCG 加 20% (w/v) salcocyyl 溶液を加え、室温に 20 分間静置して反応を止めるとともに、内膜成分を溶かした。10,000 $\times$ G, 30 分間の遠心で外膜その他の不溶画分を除き、上清 30  $\mu$ l に 15

$\mu$ l の SDS-buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8 ; 3% SDS ; 30% glycerol ; 0.002% bromophenol blue) と 5  $\mu$ l の  $\beta$ -mercaptoethanol を加えた。その 30  $\mu$ l を acrylamide 10%, bis-acrylamide 0.06% の slab gel に 100 V で電気泳動した。*S. aureus* の PBP は 8% acrylamide, 0.06% bis-acrylamide の特殊組成<sup>9)</sup> の slab gel を使用した。泳動された gel 上の蛋白を酢酸-methanol で固定し、増感剤 2, 5-diphenyloxazole (PPO) を dimethylsulfoxide (DMS) 中で浸み込ませ、水洗の後減圧乾燥した。乾燥した gel を KODAK RP Royal X-Omat film に

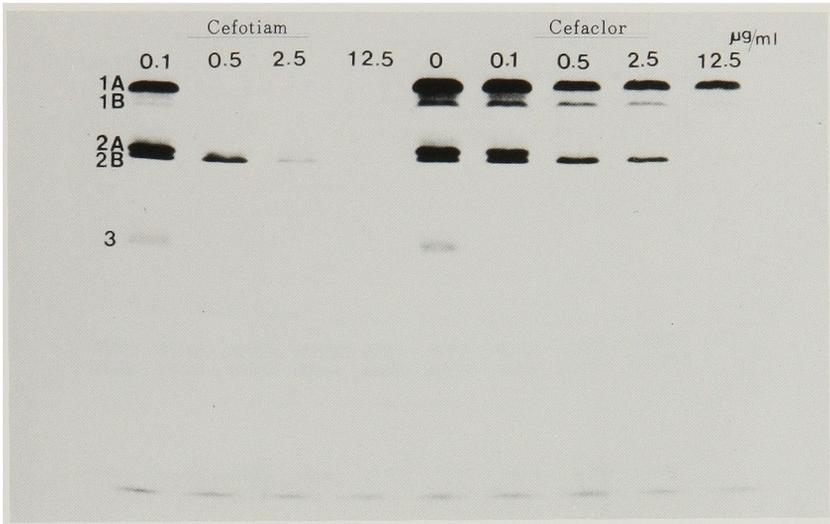


Fig. 3 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* 19n

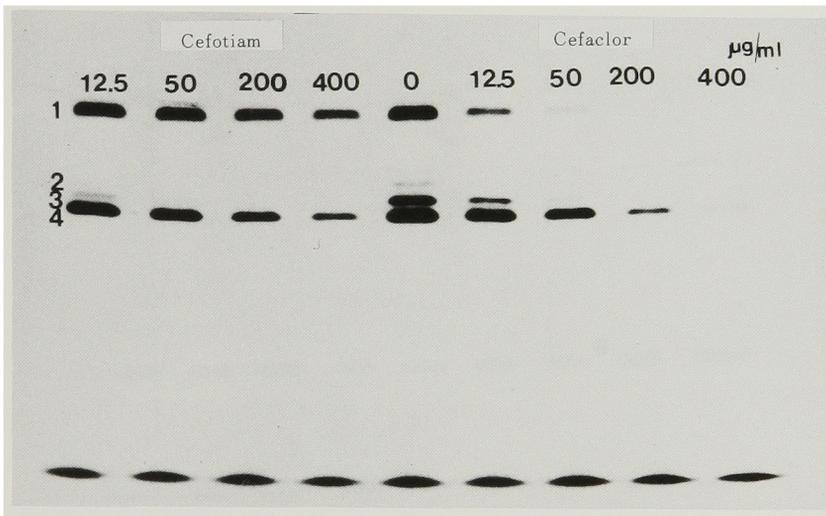


Fig. 4 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Enterococcus faecalis* 1

密着し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で 20 日間カセット中で感光させた。  
3. CTM とマウス培養 M $\phi$  との協力的食菌・殺菌作用

M $\phi$  は ICR ♂ 5 週齢マウスの腹腔を, 10% fetal calf serum 加 F 12 培地 (日水製薬株式会社) で洗って採取し, 同培地 5 ml 中に  $10^5$  cells/ml になるように浮遊させた。その 0.1 ml ( $10^4$  cells) をカバースリップを沈めた 24 穴 FALCON multi dish の各 well に接種し,  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  存在下で 30 分間静置後, 同培地 1 ml ずつを加えてさらに一夜  $\text{CO}_2$  培養

を続けた。翌日浮遊細胞を除き, 20% L-CM (conditioned medium of L-929)<sup>6)</sup> を添加した同培地 1 ml 中で 2 時間  $\text{CO}_2$  培養して M $\phi$  を活性化した。一夜 L-broth 中で振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を M $\phi$  の 50 倍量 ( $5 \times 10^5$  cfu/well) 接種した。同時に一部区画に 1~1/16 MIC の CTM を添加した。さらに  $\text{CO}_2$  培養を 5 時間行なった後, カバースリップを取り出し saline G で洗浄後 methanol 固定し, GIEMSA 染色して光顕像を観察した。

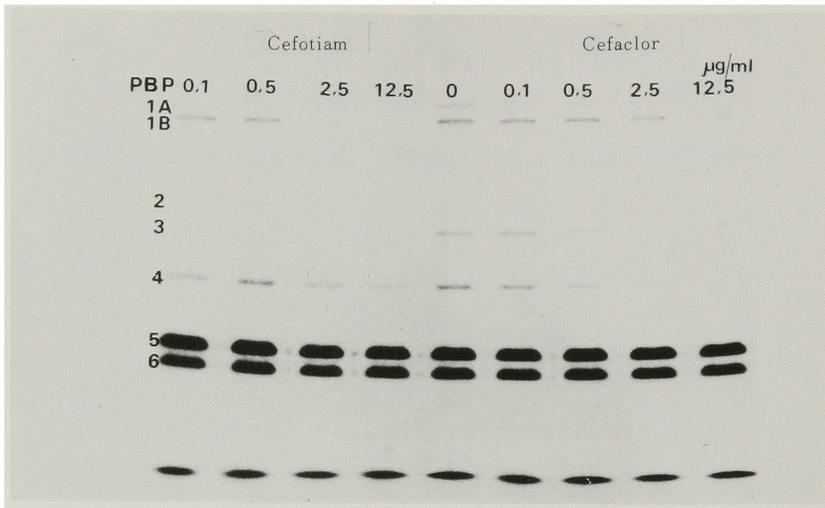


Fig. 5 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2

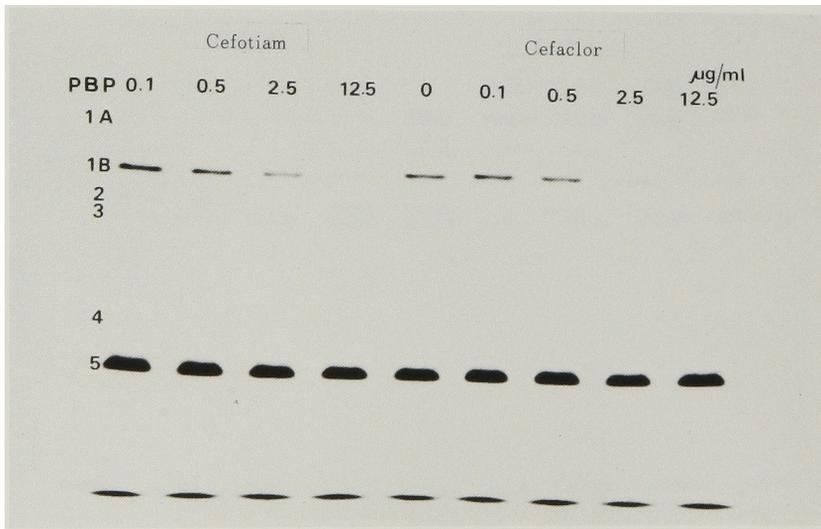


Fig. 6 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Proteus vulgaris* 33

## 成 績

### 1. CTM の PBPs に対する結合親和性

感受性 *S. aureus* 209P の PBP に対する CTM の結合親和性を、CCL のそれと比較すると fig. 1 のとおり PBP 1 および 2 に対する結合親和性が CTM の方が高い。これが CTM が CCL より強い抗ブドウ球菌作用を持つ理由である。しかし MRSA である *S. aureus* 108-1 では fig. 2 のとおり PBP2 に対しては CTM の方が CCL より高い結合親和性を持

つものの、MRSA 特有の PBP2' に対しては CCL の方が若干結合親和性が強かった。*S. pneumoniae* 19n の PBP では、PBP 1B, 1A および 2B に対する CTM の結合親和性は fig. 3 のとおり、CCL よりかなり高かった。しかし PBP 2B に対する結合親和性は両者に差がなかった。*E. faecalis* 1 の PBP には CTM が PBP2 に対する結合親和性で CCL に優る他は CCL の方が高い親和性を示した。とくに CCL が本菌の PBP 1 に CTM よりかなり強い親和性を示したことが特徴的である (fig. 4)。

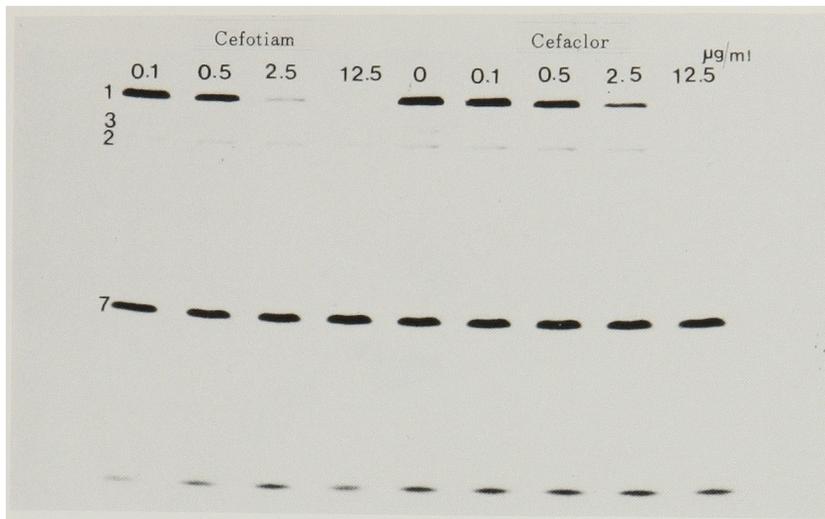


Fig. 7 Competition of cefotiam and cefaclor for penicillin-binding proteins of *Haemophilus influenzae* ATCC9334

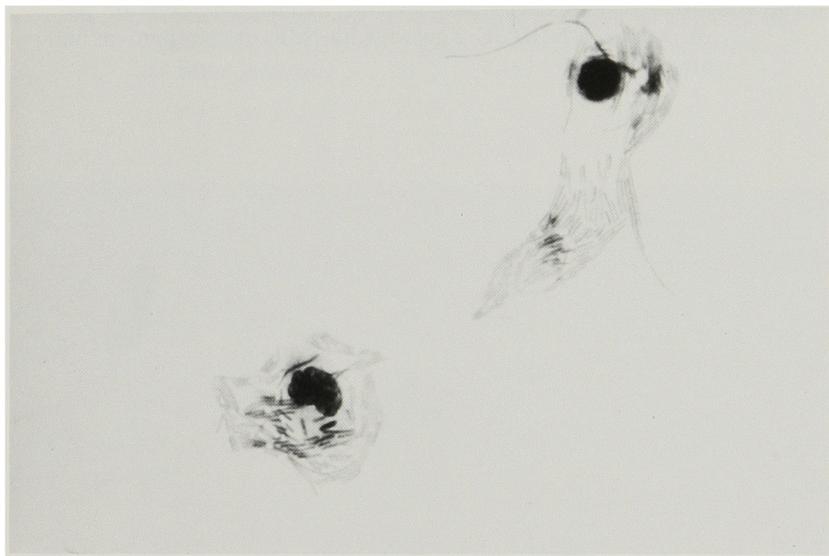


Fig. 8 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown without drugs, at 5h after infection

*E. coli* NIHJ JC-2 の PBP には, CTM の方が相対的に結合親和性は CCL より高い。fig. 5 のとおりとくに PBP 1A, 1B, 3 に対する CTM の親和性は CCL より強かった。*P. vulgaris* 33 の PBP に対しては CTM も CCL も fig. 6 のとおりほとんど同じ強さの結合親和性を示した。*H. influenzae* ATCC 9334 の PBP に対する CTM の結合親和性は, CCL

のそれよりも強かった (fig. 7)。とくに主要画分である PBP 1 に対する CTM の結合親和性が CCL より強かった。

2. マウス培養 M $\phi$  と CTM の協力的食菌・殺菌作用

*E. coli* をマウス培養 M $\phi$  に感染させると, M $\phi$  はよく食菌するが, 5 時間後には fig. 8 のとおり細



Fig. 9(a) Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1MIC of cefotiam, at 5h after infection

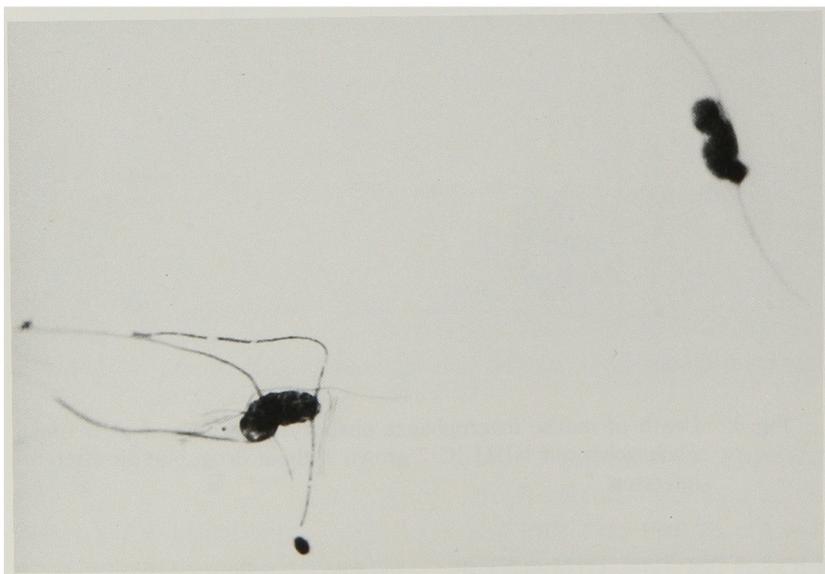


Fig. 9(b) Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2MIC of cefotiam, at 5h after infection

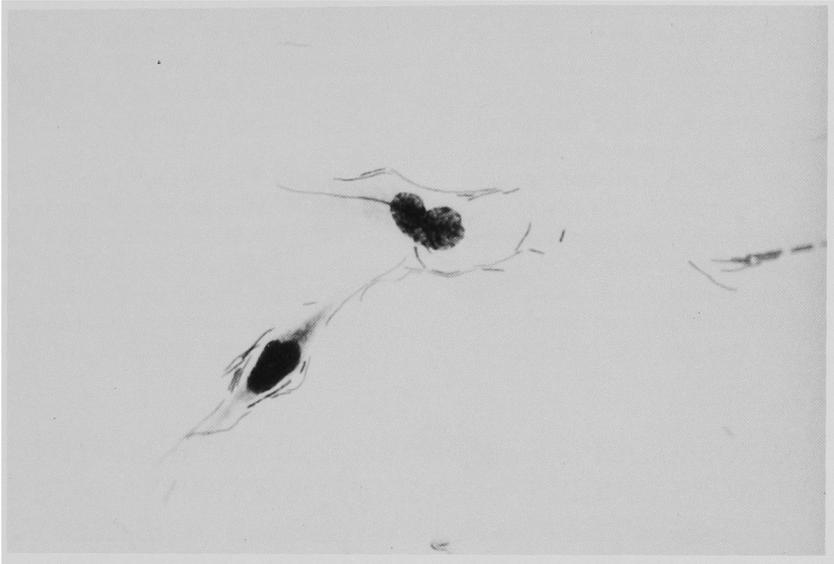


Fig. 9(c) Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1/4MIC of cefotiam, at 5h after infection

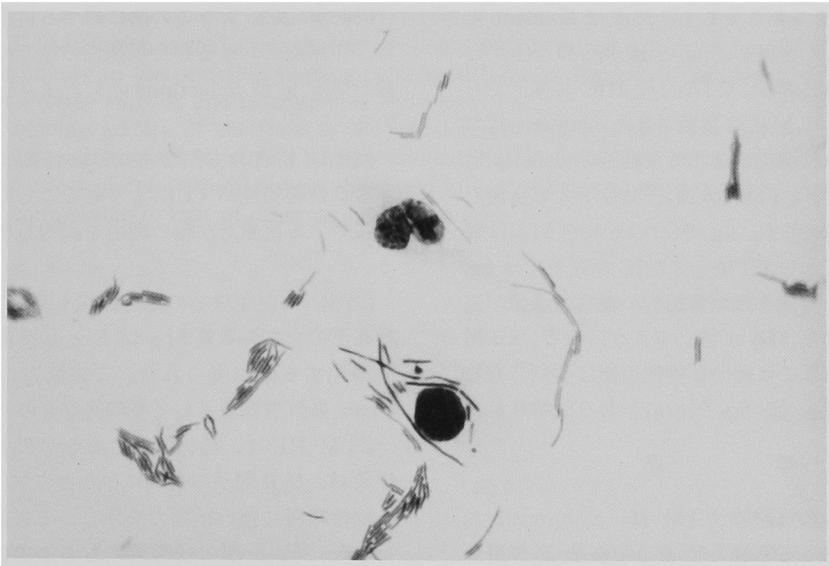


Fig. 9(d) Damaged mouse macrophages phagocytizing cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1/8MIC of cefotiam, at 5h after infection

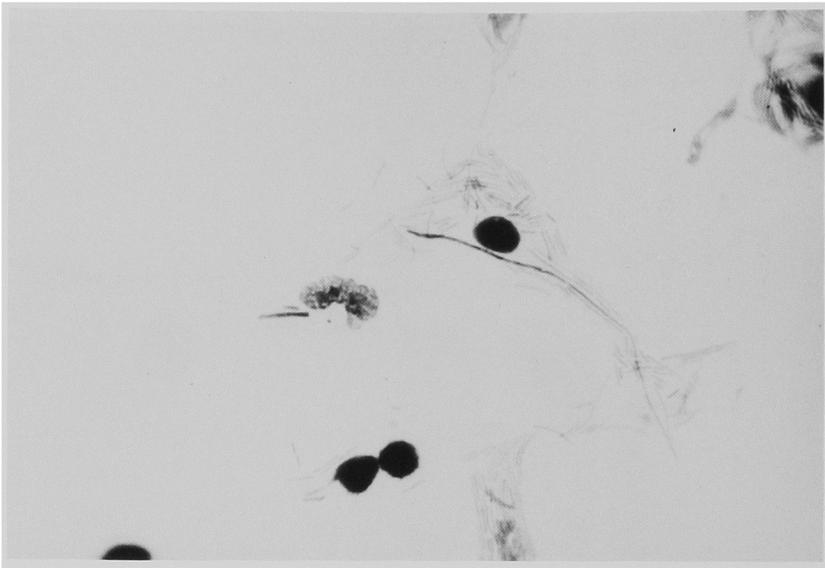


Fig. 9(e) Death of mouse macrophages phagocytizing cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1/16MIC of cefotiam, at 5h after infection

胞内で増殖し  $M\phi$  を破壊して遊出する。しかし 1 MIC の CTM を共存させると、 $M\phi$  は filament 化した菌細胞をよく食菌し、fig. 9(a) のとおり消化しつつある像が得られる。CTM 1/2 MIC 共存下でも fig. 9(b) のとおり  $M\phi$  に食菌された filament 状の菌細胞が殺菌され消化が進んで菌細胞の density 低下が認められる。CTM 1/4 MIC 共存下でも食菌した菌の消化が認められ、fig. 9(c) のとおり  $M\phi$  は破壊されない。しかし CTM 1/8 MIC 存在下では fig. 9(d) のとおり、食菌された菌細胞の細胞内増殖が進み、障害を受けた  $M\phi$  が目立つようになる。CTM 1/16 MIC 存在下では菌の細胞内増殖は薬剤非存在時と同様で、 $M\phi$  は fig. 9(e) のとおり破壊された。

#### 考 察

CTM-HE の活性原体 CTM は、*S. aureus*、*S. pneumoniae*、*E. coli* および *P. vulgaris* の作用点 PBP<sub>s</sub> に対し CCL より強い結合親和性を示した。とくに菌の生存に必須の *S. aureus* PBP<sub>2</sub>、*S. pneumoniae* PBP 1A、1B、2A、2B、*E. coli* の PBP 1A、1Bs、3 等に対し CCL に優る親和性を示すことは、この薬剤がこれらの菌に強い殺菌力を有する性質を裏付けたものと考えられる。*P. vulgaris* の

PBP<sub>s</sub> には、CCL と同程度の結合親和性であるが、CTM が CCL よりこの菌に対する抗菌力が強いのは、作用点における結合親和性の差ではなく、この菌の作る Ic 型  $\beta$ -lactamase に、より安定なためである。

MRSA 特有の PBP<sub>2'</sub> や *E. faecalis* の PBP に対する結合親和性が CCL より劣ることは、本剤の両菌に対する抗菌力が弱い理由を説明しうるものである。

CTM は白血球との協力作用も良好で、1/4MIC 存在下でマウス培養  $M\phi$  は *E. coli* 菌細胞をよく食菌消化する像が得られた。この協力の程度は cephem 系抗生物質として平均的なものと考えられる。

CTM-HE は、活性原体である CTM がグラム陰性菌および R 因子の有無にかかわらず、強毒のグラム陰性桿菌に強い抗菌力を示し、その抗菌域は *P. vulgaris* 等、一部の弱毒菌にもおよぶので CTM-HE の体内動態が良好であれば、免疫正常者および軽度の免疫不全患者における軽症および中等症の感染症に一次選択薬剤として有用性の高いことが期待される。

## 文 献

- 1) 土屋皖司・木田 誠・近藤正照・小野英男・野路弓子・武内真理子・西 武：新広域 cephalosporin, Cefotiam (SCE-963) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 27 (S-3) : 73~92, 1979
- 2) 横田 健・吉田玲子・鈴木映子・新井京子：L-105 の抗菌力,  $\beta$ -lactamase 安定性, penicillin 結合蛋白への親和性および補体・白血球との協力的殺菌作用。Chemotherapy 34 (S-3) : 17~33, 1986
- 3) SPRATT RG : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 2999~3003, 1975
- 4) LENNOX ES : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1 : 190~206, 1955
- 5) UTSUI Y, YOKOTA T : Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 28 : 397~403, 1985
- 6) NOZAWA RT, YOKOTA T : Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth) . Cell. Physiol. 100 : 351~364, 1979

CEFOTIAM HEXETIL, A NEW ORAL CEPHALOSPORIN ;  
BINDING AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS  
AND SYNERGISTIC EFFECT ON PHAGOCYTOSIS AND KILLING  
OF BACTERIA WITH CULTURE MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, KYOKO ARAI and EIKO SUZUKI

Department of Bacteriology, School of Medicine,  
Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Cefotiam (CTM), which is the active moiety of a new oral pro-drug, cefotiam hexetil (CTM-HE), showed high affinity to the penicillin-binding proteins (PBPs) of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *Haemophilus influenzae*.

The high binding affinity of cefotiam to the lethal target PBPs, which was superior to that of cefaclor, was consistent with its strong bactericidal activity against these pathogens.

Synergistic effect of cefotiam on phagocytosis and killing of bacteria with cultured mouse macrophages was comparable to that of other cephem antibiotics.