

Cefetamet (cefetamet pivoxil の活性原体) の試験管内抗菌力, PBP_s に対する 結合親和性および補体・M ϕ との協力的殺菌作用

横田 健・鈴木 映子・新井 京子

順天堂大学医学部細菌学教室*

新しい経口セフェム cefetamet pivoxil (CEMT-PI) の臨床効果を推定する基礎成績の一つとして, その活性原体 cefetamet (CEMT) の試験管内抗菌力, 作用点 penicillin-binding proteins (PBP_s) に対する結合親和性を測定するとともに, 本剤と生体感染防御の主役である補体およびマクロファージ (M ϕ) との協力作用の良否を検討した。 *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas cepacia*, ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* の 24~51 臨床分離株に対する本剤の MIC₅₀ は, それぞれ 50, >100, 100, 0.025, 0.39, 0.39, 0.2, 0.1, 0.2, 12.5, 0.39, 25, 0.78, 0.78, 0.2 および 25 μ g/ml で他の経口第 3 世代セフェムより抗ブドウ球菌作用が劣った。 *S. aureus* の PBP_s には本剤の結合は弱い, グラム陰性桿菌の PBP_s には cefixime (CFIX) と同程度に強かった。本剤の特徴は, 血清補体および M ϕ との協力的殺菌作用が顕著な点で, 1/8 MIC の本剤存在下でマウス培養 M ϕ は, *E. coli* の細胞を良く食菌, 消化した。

Key words : 内服用 cephem 系抗生物質, PBP_s, 血清補体との協力, M ϕ との協力作用

Cefetamet pivoxil (CEMT-PI) はプロドラッグ型の経口用セフェム系抗生物質である。本剤の臨床効果を推定する基礎研究として, 本剤の活性原体 cefetamet (CEMT) の試験管内抗菌力, 各種細菌のペニシリン結合蛋白 (PBP_s) に対する親和性および血清補体とマウス培養マクロファージ (M ϕ) との協力的殺菌作用を検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

CEMT の純末は日本ロシュ社から供与された。対照薬として cefaclor (CCL: 塩野義製薬), cefixime (CFIX: 藤沢薬品), ceftoram (CFTM: 富山化学), cefpodoxime (CPDX: 三共) および cefdinir (CFDN: 藤沢薬品) を使用した。

2. 使用菌株

順天堂大学付属病院中央検査室および東京都老人研究所付属病院臨床検査室で 1985 年~1987 年に臨床分離された 50 株の *Staphylococcus aureus*, 48 株の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 41 株の coagulase negative staphylococci (CNS),

50 株の *Streptococcus pyogenes*, 24 株の *Streptococcus pneumoniae*, 39 株の *Enterococcus faecalis*, 40 株の *Enterococcus faecium*, 51 株の *Escherichia coli*, 50 株の *Klebsiella pneumoniae*, 50 株の *Proteus mirabilis*, 35 株の *Proteus vulgaris*, 48 株の *Morganella morganii*, 27 株の *Providencia rettgeri*, 50 株の *Citrobacter freundii*, 50 株の *Enterobacter cloacae*, 50 株の *Serratia marcescens*, 50 株の *Pseudomonas aeruginosa*, 40 株の *Pseudomonas cepacia*, 50 株の *Xanthomonas maltophilia*, 26 株の ampicillin (ABPC) 耐性 *Haemophilus influenzae*, 27 株の *Acinetobacter calcoaceticus* および 40 株の *Bacteroides fragilis* を使用した。上記菌株のうち MRSA および ABPC 耐性 *H. influenzae* は, 過去 5 年間に臨床分離された菌株を教室で集積保存したものである。また PBP_s に対する本剤の結合親和性の検討には, 教室保存の *S. aureus* 209 P, *E. coli* NIHJ JC-2, *P. vulgaris* 33, *S. marcescens* 13 および *H. influenzae* ATCC 9334 を使用した。また本剤と補体およびマウス培養 M ϕ との協力作用の研究には, *E. coli* NIHJ JC-2 を用いた。

*〒 113 東京都文京区本郷 2-1-1

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法

日本化学療法学会法¹⁾に従い、平板希釈法で測定した。但し *S. pyogenes* は前培養に HI-broth (Difco) を、MIC 測定には 5% ヒツジ脱線維血液加 HI-agar を、*S. pneumoniae* はヒツジ血液-agar に平板培養した菌をかき取り、L-broth に 10^8 cfu/ml になるように浮遊したものを希釈し接種菌とし、MIC 測定はヒツジ血液-agar を使用した。*H. influenzae* は Fildes Extract 5% 加 HI-broth を前培養に使用し、Fildes Extract 5% 加 HI-agar を測定に用いた。*B. fragilis* は前培養に GAM ブイヨン (日水) を使用し、MIC 測定は GAM-agar (日水) を使ってガスバック法 (BBL) で嫌気培養した。

4. PBP に対する結合親和性の検討法

Spratt²⁾ 方法を改良した著者らの方法³⁾ で検討した。すなわち、*S. aureus* 209 P, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* 13, *P. vulgaris* 33 および *H. influenzae* ATCC 9334 の対数増殖期後期の菌を集め、10 mM MgCl₂ 加 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) の 8 ml で約 10×10^{10} cfu/ml の濃厚菌液を作った。これを BRANSON Sonifier (出力 50 W, 効率 20%, 120 秒 \times 10 回) で菌体を破碎し、3000 \times g, 20 分間冷却遠心して菌体を除いた後、その上清を 100,000 \times g, 30 分超遠心して膜画分を得た。同緩衝液で 1 回洗浄し、少量の緩衝液中に膜画分を 15 mg/ml protein になるように再浮遊した。30 μ l の膜画分に終末濃度 0.1~12.5 μ g/ml になるように非放射性 CEMT または CFIX を加え、30°C 10 分間反応後、3 μ l の ¹⁴C-benzylpenicillin (PCG: 373 μ g/50 μ Ci/ml: AMERSHAM) を加え、再度 30°C 10 分間反応させた。Sarkosyl と非放射性 PCG 添加で反応を止め、10,000 \times g, 冷却遠心して不溶画分を除いた。30 μ l の上清に bromphenol blue 加 SDS-buffer を 15 μ l 加え、100°C, 2 分間加熱した後、その全量を 10% acrylamide, 0.06% bis-acrylamide の平板ゲルで電気泳動した。ただし *S. aureus* には 8% acrylamide - 0.06% bis-acrylamide 平板ゲルを使用した。メタノールと酢酸で蛋白を固定した後、増感剤 2,5-diphenyl-oxazole (PPO) を浸み込ませ、減圧下でゲルを乾燥した。乾燥ゲルを KODAK X-Omat film と密着し、-80°C, 20 日間感光させて蛍光オートラジオグラフィを行った。

5. CEMT と血清補体との協力的殺菌作用の検討

E. coli NIHJ JC-2 を L-broth 5 ml 中で 37°C 一夜振盪培養した。新鮮 L-broth で 10,000 倍に希釈し、4 本の中試験管に 5 ml ずつ分注した。1 本を対照とし、2 本目にはこの菌の増殖に影響を及ぼさない最高補体量 (0.5 units/ml) と 20% 非働化ヒト血清を加えた。3 本

目には 5 時間後の生菌数が接種菌数の 50% となる CEMT (ID₅₀) を単独に加え、4 本目には補体、ヒト血清および ID₅₀ の CEMT を添加した。37°C で培養を続けながらそれぞれの 0, 1, 3, 5 および 24 時間目のサンプルをとり、HI-agar の平板塗布法で生菌数を測定した。

6. マウス培養 M ϕ との協力的食菌殺菌作用の検討法

M ϕ は 5 週令の ICR δ マウス腹腔内を 8 ml 10% fetal calf serum 加 F 12 培地 (日水) で洗って採取し低速遠心で集め、新鮮同培地中に 10^5 cells/ml になるように浮遊した。その 0.1 ml を、丸型カバースリップを沈めた FALCON multi dish (24 穴) に接種し、著者らの方法⁴⁾ で 20% L-CM (conditioned medium L-929) を加えて活性化した。*E. coli* NIHJ JC-2 の一夜振盪培養液を M ϕ の 50 倍量 (5×10^5 cfu/well) 接種した。一部の区画には CEMT を 1~1/16 MIC になるよう加えて培養した。*E. coli* 感染後、5 時間目にカバースリップを取り出し Saline G で軽く洗浄した後、メタノール固定してギムザ染色を行い光学顕微鏡で観察した。

II. 成 績

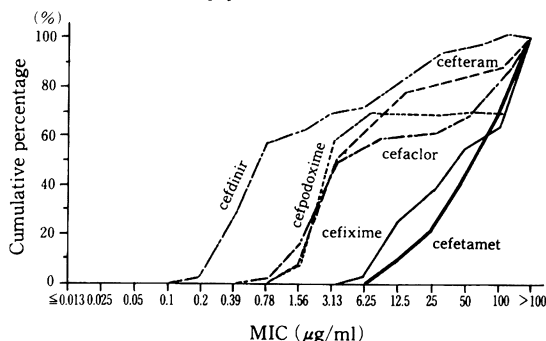
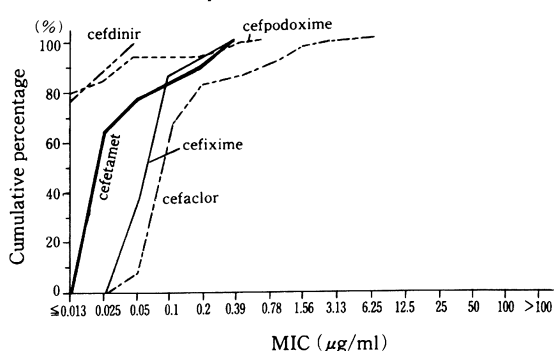
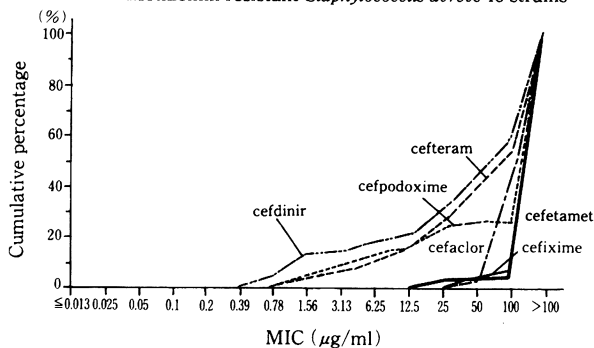
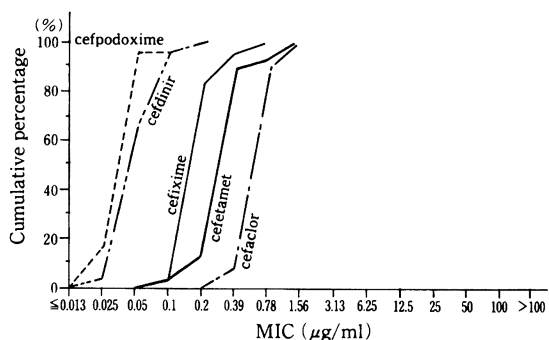
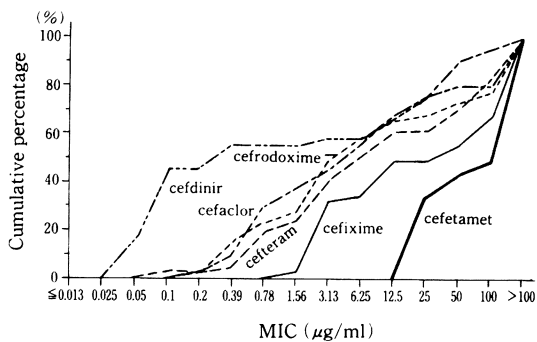
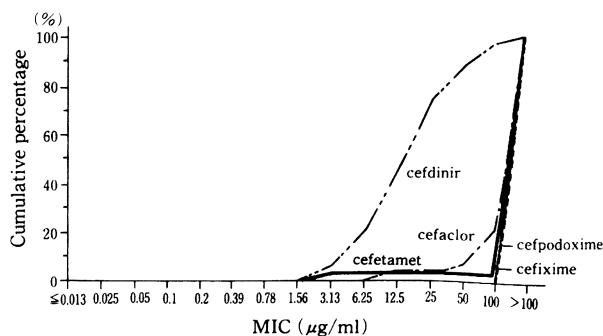
1. CEMT の試験管内抗菌力

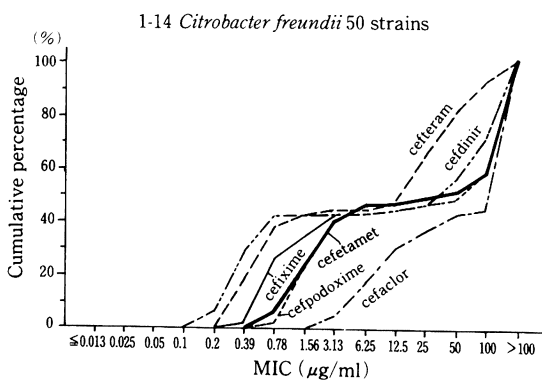
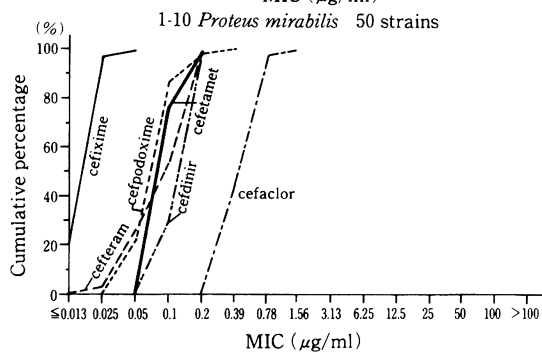
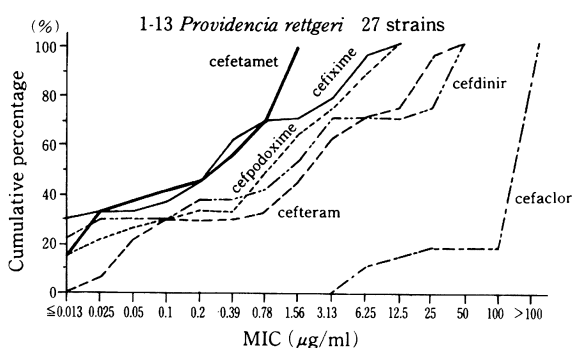
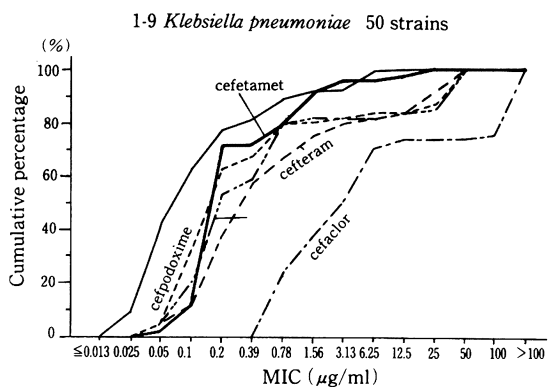
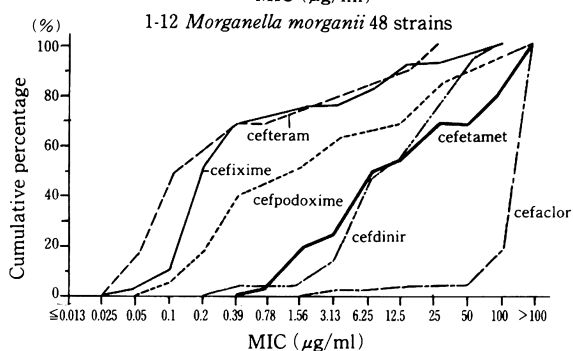
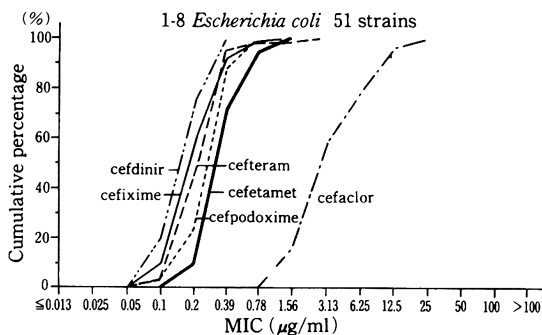
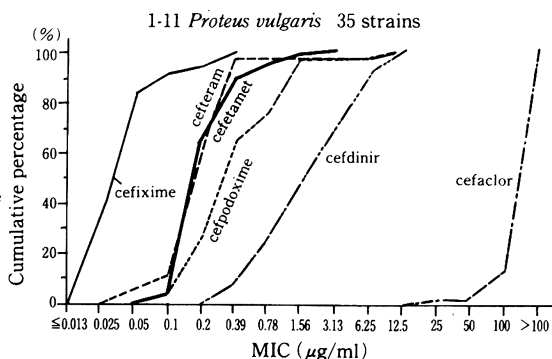
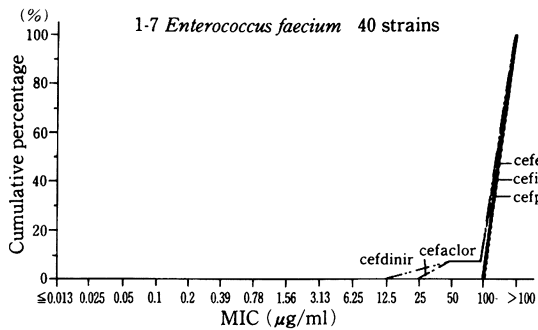
CEMT は *S. aureus* 50 臨床分離株に対し MIC₅₀ が 50 μ g/ml 以上で CFDN, CPDX, CFTM および CCL はもちろん CFIX よりもその抗菌力は Fig. 1-1 のとおり弱かった。MRSA 48 株に対しては全株 25 μ g/ml 以上の MIC で他の経口セフェム同様効力がない (Fig. 1-2)。CNS 48 株に対しても Fig. 1-3 のとおり CEMT の抗菌力は他剤よりかなり劣り、その MIC₅₀ は 100 μ g/ml であった。しかし Fig. 1-4 のとおり本剤の *S. pyogenes* 50 株に対する抗菌力は良好で、CCL や CFIX に優りその MIC₅₀ は 0.025 μ g/ml であった。*S. pneumoniae* 24 株に対する本剤の抗菌力も良好でその MIC₅₀ は Fig. 1-5 のとおり 0.39 μ g/ml であった。しかし *E. faecalis* に対しては Fig. 1-6 のとおり他剤同様 CEMT には抗菌力がない。*E. faecium* にも Fig. 1-7 のとおり本剤を含めて全ての経口セフェム剤は抗菌力を示さない。

CEMT のグラム陰性桿菌に対する抗菌力は良好である。*E. coli* 51 臨床分離株に対する本剤の MIC₅₀ は Fig. 1-8 のとおり 0.39 μ g/ml であった。これは CCL よりかなり強く CPDX に近い抗菌力である。*K. pneumoniae* 50 株に対しても、CEMT の抗菌力は他の内服用第 3 世代セフェムとほぼ同様で Fig. 1-9 のとおりその MIC₅₀ は 0.2 μ g/ml であった。CCL よりかなり強い抗菌力である。*P. mirabilis* 50 株に対しては、

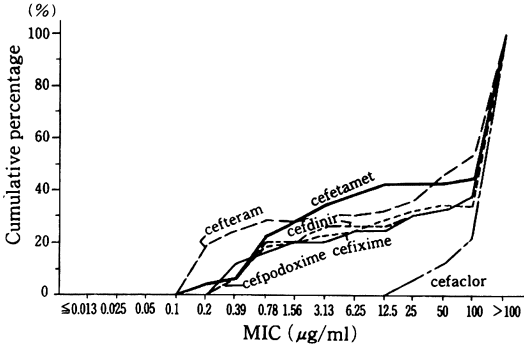
CEMTのMIC₅₀はFig. 1-10のとおり0.1 μ g/mlでCFIXには劣るが、CCLよりかなり強い抗菌力であった。*P. vulgaris* 35株に対してはFig. 1-11のごとく本剤のMIC₅₀は0.2 μ g/mlでCFIXには劣るものの、CCLはもちろんCFDNやCPDXより強い抗菌力を示した。*M. morgani*に対するCEMTの抗菌力はFig. 1-12のごとくCCLに優るもののCFIX, CFTMおよびCPDXに劣り、そのMIC₅₀は12.5 μ g/mlであった。*P. rettgeri*に対する本剤の抗菌力は試験薬剤中最

も良好で、そのMIC₅₀は0.39 μ g/mlでCCLにはもちろんCFTMやCFDNよりかなり強かった(Fig. 1-13)。*C. freundii* 50株は全ての試験薬剤に対し2峰性の分布を示し、本剤のMIC₅₀は25 μ g/mlであった(Fig. 1-14)。*E. cloacae* 50株に対する本剤の抗菌力はあまり良くない。それは本菌の約40%は6.25 μ g/ml以下のMICを示すが、残り60%は100 μ g/ml以上の高度耐性株だからである。この傾向は他の第三世代セフェムでも同様である(Fig. 1-15)。*S. marcescens* 50

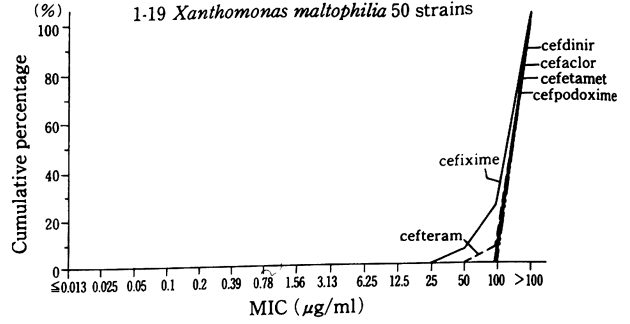
1-1 *Staphylococcus aureus* 50 strains1-4 *Streptococcus pyogenes* 50 strains1-2 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 48 strains1-5 *Streptococcus pneumoniae* 24 strains1-3 Coagulase negative *Staphylococcus* 41 strains1-6 *Enterococcus faecalis* 39 strains



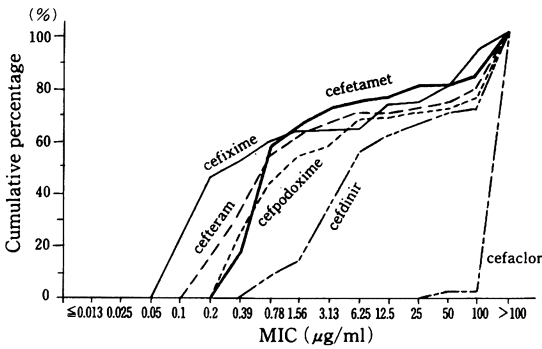
1-15 *Enterobacter cloacae* 50 strains



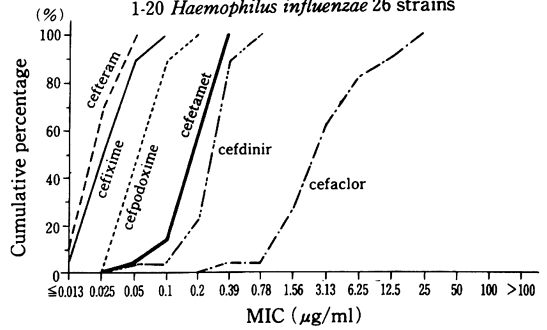
1-19 *Xanthomonas maltophilia* 50 strains



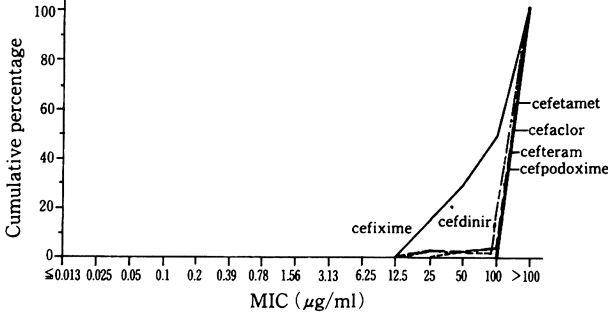
1-16 *Serratia marcescens* 50 strains



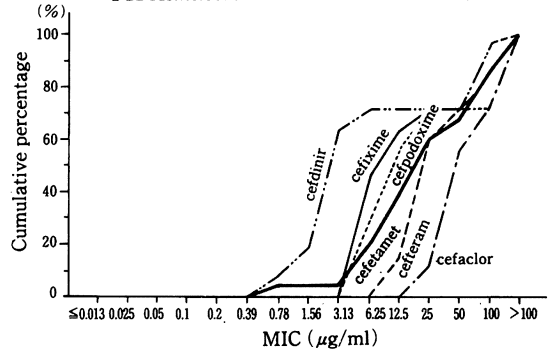
1-20 *Haemophilus influenzae* 26 strains



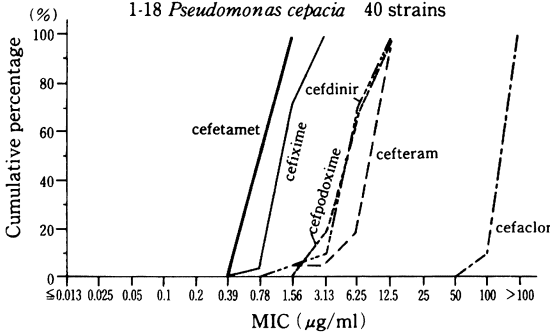
1-17 *Pseudomonas aeruginosa* 50 strains



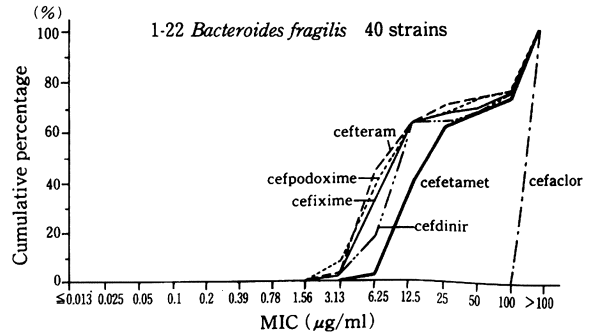
1-21 *Acinetobacter calcoaceticus* 27 strains



1-18 *Pseudomonas cepacia* 40 strains



1-22 *Bacteroides fragilis* 40 strains



株に対して CEMT は良好な抗菌力を示す。すなわち Fig. 1-16 のとおりその MIC₅₀ は 0.78 μg/ml で CCL よりはもちろん CFDN より強い抗菌力を示した。 *P. aeruginosa* 50 株には本剤を含め全ての経口セフェムは, Fig. 1-17 のとおり抗菌力を示さない。しかし *P. cepacia* 40 株には CEMT の抗菌力は強く, その MIC₅₀ は Fig. 1-18 のとおり 0.78 μg/ml であり, 被検薬剤中最も優れた抗菌力を示した。 *X. maltophilia* 50 株に対しては CEMT は他の薬剤同様抗菌力を示さない (Fig. 1-19)。 ABPC 耐性 *H. influenzae* にも CEMT の抗菌力は強く, Fig. 1-20 のとおり CFTM, CFIX および CPDX には劣るものの, その MIC₅₀ は 0.2 μg/ml で CCL や CFDN より抗菌力が強かった。 *A. calcoaceticus* 27 株に対する抗菌力は中等度で, その MIC₅₀ は Fig. 1-21 のとおり 25 μg/ml であった。 CCL より強く CFDN より弱い抗菌力であった。 嫌気性菌

B. fragilis 40 株に対しても CEMT の抗菌力は Fig. 1-22 のとおり中等度にとどまり, その MIC₅₀ は 25 μg/ml であった。

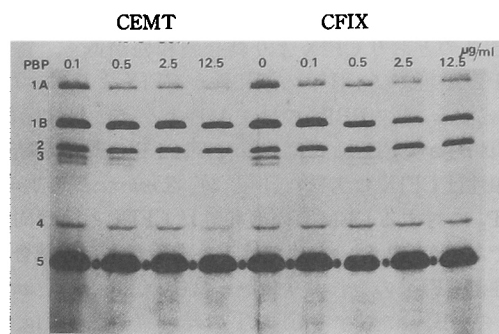


Fig. 4. Competition of cefetamet (CEMT) and cefixime (CFIX) for penicillin-binding proteins of *Proteus vulgaris* 33.

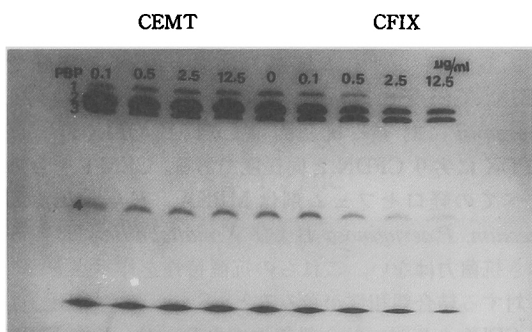


Fig. 2. Competition of cefetamet (CEMT) and cefixime (CFIX) for penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* 209P.

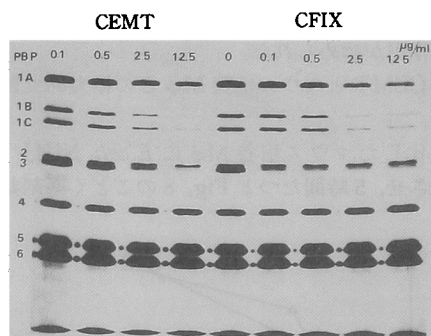


Fig. 5. Competition of cefetamet (CEMT) and cefixime (CFIX) for penicillin-binding proteins of *Serratia marcescens* 13.

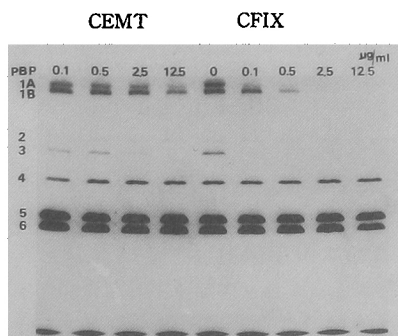


Fig. 3. Competition of cefetamet (CEMT) and cefixime (CFIX) for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* NIHJ JC-2.

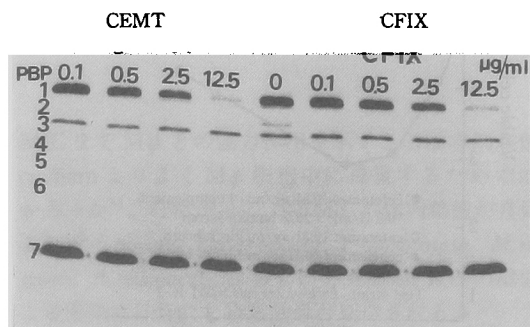


Fig. 6. Competition of cefetamet (CEMT) and cefixime (CFIX) for penicillin-binding proteins of *Haemophilus influenzae* ATCC 9334.

2. ペニシリン結合蛋白 (PBP_s) に対する結合親和性

CEMT の *S.aureus* 209 P の PBP_s に対する結合親和性を CFIX と比較すると全ての画分に對し、CFIX より結合親和性が低い (Fig. 2)。 *E.coli* の PBP_s にも Fig. 3 のとおり CFIX より結合親和性が低く、特に PBP 1 A および 1 B への親和性が CFIX より劣った。 *P.vulgaris* 33 の PBP_s では 1 A および 4 に対する結合親和性が CFIX より高かったが、1 B に対する結合親和性は CFIX に劣った (Fig. 4)。 *S.marcescens* 13 の PBP_s に対する CEMT の親和性は CFIX とほぼ同程度であるが、12.5 μg/ml では 1 A を除き本剤の結合親和性が CFIX のそれより強かった (Fig. 5)。 *H.influenzae* の PBP_s に対する CEMT の結合親和性は Fig. 6 のとおり CFIX とほぼ同程度であった。

3. CEMT と血清補体との協力的殺菌作用

E.coli NIHJ JC-2 は Fig. 7 のとおり 0.5 units/ml の補体ではほとんど増殖が影響されない。これに ID₅₀ の CEMT を共存させると、補体と本剤との強い協力的殺菌作用が認められた。

4. CEMT とマウス培養 Mφ との協力的食菌殺菌作用

活性化したマウス培養 Mφ に *E.coli* NIHJ JC-2 を感染させ、5 時間たつと Fig. 8 のごとく薬剤非存在

下では *E.coli* が Mφ 細胞中で増殖し、細胞を破壊して遊出する。これに 1 MIC の CEMT を共存させると Fig. 9-1 のごとく薬剤の影響で filament 化した菌細胞はよく食菌消化され、Mφ は健常にとどまる。添加する CEMT の量を 1/2 MIC に下げても Fig. 9-2 のごとく filament 化した細胞は良く食菌消化され、Mφ 細胞内に菌細胞の消化を終えたことを示す大きな食空胞がみられる。さらに CEMT の量の 1/4 MIC に低下させても Fig. 9-3 のごとく filament 化した菌細胞はよく食菌消化される。本剤と Mφ との協力的作用は Fig. 9-4 および Fig. 9-5 のとおり 1/8 MIC および 1/16 MIC の低濃度でも明らかに確認された。

III. 考 察

CEMT はその抗菌特性からみると、*S.aureus* および CNS に対する抗菌力が CCL, CFTM, CPDX および CFDN よりかなり弱く、CFIX に比較しても若干劣る抗菌力である。しかしグラム陽性球菌でも *S.pyogenes* や *S.pneumoniae* には CCL より強い抗菌力で CPDX, CFDN より若干弱い抗菌力にすぎない。グラム陰性菌に対する抗菌力はおしなべて良好で CFIX, CPDX に近い強い抗菌力を示す。しかし *M.morganii* に対する抗菌力は CFTM, CFIX および CPDX に劣り CFDN と同程度である。CEMT を含めすべての経口セフェム剤は MRSA, *E.faecalis*, *E.faecium*, *P.aeruginosa* および *X.maltophilia* にはみるべき抗菌力はない。これらの抗菌特性を作用点 PBP_s に対する結合親和性からみると、*S.aureus* の PBP_s には CFIX より弱い結合親和性であり、*E.coli* の PBP_s にも CFIX より若干結合親和性が低く、*S.marcescens*, *P.vulgaris* および *H.influenzae* の PBP_s には CFIX に近い結合親和性を示し、MIC を良く反映している。

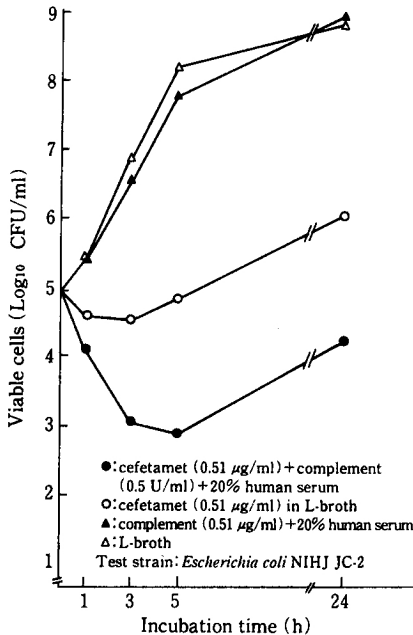


Fig. 7. Synergy of bactericidal effect with serum complement.

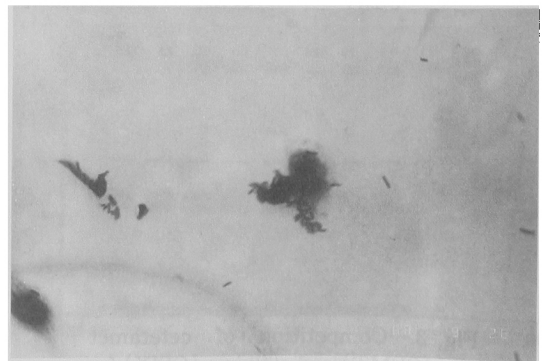
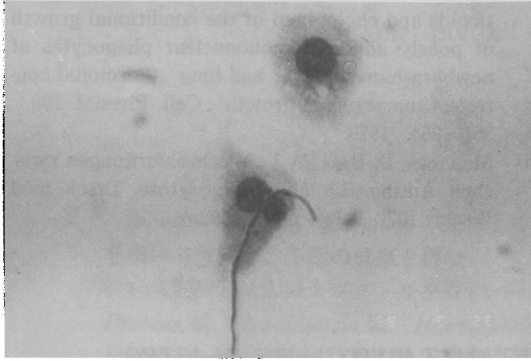
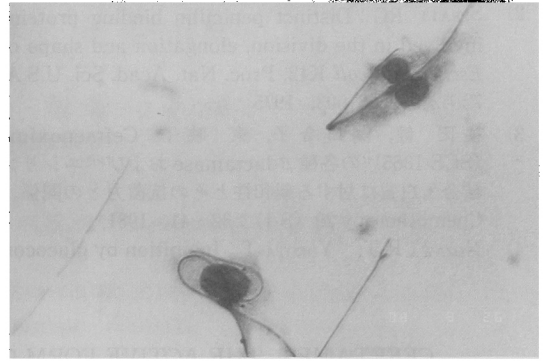


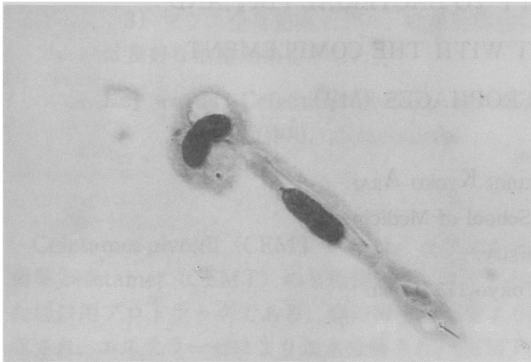
Fig. 8. Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown without drugs, at 5h after infection.



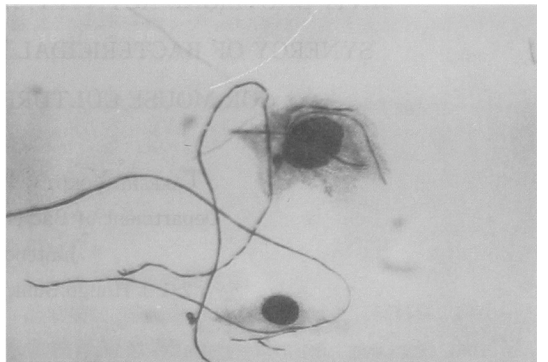
9-1 1 MIC



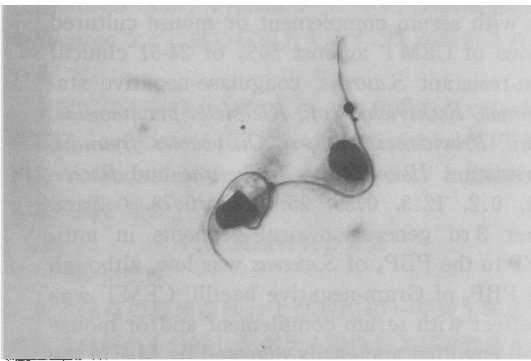
9-4 1/8 MIC



9-2 1/2 MIC



9-5 1/16 MIC



9-3 1/4 MIC

Fig. 9. Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 grown with 1/16 MIC of cefetamet, at 5h after infection.

本剤の大きな特長は生体の感染防御機構の主役を占める血清補体およびM ϕ との良好な協力作用である。特にマウス培養M ϕ と1/16 MICの本剤添加でも明らかな協力的食菌作用が認められることは特質に値する。一般に1/8 MICの薬剤添加でもM ϕ と明らかな協力作用を示す抗菌剤はnew-quinolon, carbapenemおよびmonobactamに限られる。これらの薬剤はcephemよりM ϕ 細胞中への透過がよいことが原因と想像される。CEMTがcephem中では例外的に1/16

MICまでM ϕ との協力作用を示すことは本剤が他のcephemよりよくM ϕ 細胞中に浸透するためではなからうか⁵⁾。したがって、CEMTの体内動態が良好であれば*S.aureus*, Enterococci, *P.aeruginosa*, *M.morganii*, *A.calcoaceticus* および *B.fragilis* 以外の細菌による感染には優れた臨床効果が期待される。

文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981

- 2) 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 : 2,999-3,003, 1975
- 3) 横田 健, 関口 令子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365) の各種 β -lactamase およびペニシリン結合蛋白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
- 4) NOZAWA R T, YOKOTA T : Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of newborn hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). Cell. Physiol. 100 : 351-364, 1979
- 5) MILATOVIC D, BRAVENY I : Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Phagozytose. Dtsch med Wschr. 107 : 1974-1979, 1982

CEFETAMET, THE ACTIVE FORM OF CEFETAMET PIVOXIL; ITS *IN VITRO*
ANTI-BACTERIAL ACTIVITY, AFFINITY TO BACTERIAL PBP_s, AND
SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECT WITH THE COMPLEMENT
OR MOUSE CULTURED MACROPHAGES (M ϕ)

TAKESHI YOKOTA, EIKO SUZUKI, KYOKO ARAI
Department of Bacteriology, School of Medicine,
Juntendo University,
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Cefetamet pivoxil (CEMT-PI) is an oral cephem antibiotic of prodrug-type. We investigated the *in vitro* activity of the active form, cefetamet (CEMT), its affinity to bacterial penicillin-binding proteins (PBP_s), and synergy of bactericidal effect with serum complement or mouse cultured macrophages (M ϕ). Minimal inhibitory concentrations of CEMT against 50% of 24-51 clinical isolates (MIC₅₀) of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S.aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas cepacia*, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and *Bacteroides fragilis* was 50, 100, 100, 0.25, 0.39, 0.2, 0.1, 0.2, 12.5, 0.39, 25, 0.78, 0.78, 0.2 and 25 μ g/ml, respectively. CEMT was inferior to other 3rd generation oral cepheims in anti-staphylococcal activity. The binding affinities of CEMT to the PBP_s of *S.aureus* was low, although they were as strong as those of cefixime against the PBP_s of Gram-negative bacilli. CEMT was shown to manifest prominent synergy of bactericidal effect with serum complement and/or mouse cultured M ϕ . Living cells of *E.coli* NIHJ-JC 2 were well engulfed and easily digested by M ϕ in the presence of higher than 1/8 MIC of CEMT.