

金属によるβ-ラクタム剤の分解

板東 香お里・加藤 信子・武藤 吉徳

田中 保知・渡辺 邦友・上野 一恵

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

(平成2年10月4日受付・平成3年1月17日受理)

Imipenemを含むMOPS KOH (pH 7.2) 緩衝液に亜鉛を添加したところ、imipenemの吸収極大である299 nmの吸収が減少した。亜鉛で処理したimipenemと*Bacteroides fragilis* GAI-30144のimipenem分解性β-ラクタマーゼで処理したimipenemの吸収スペクトルを比較したところ両者に差はみられず、亜鉛によるimipenemの変化もβ-ラクタム環の開裂を伴うものと考えられた。亜鉛はimipenemのほかpenicillin G, ampicillin, latamoxefもよく分解した。また、亜鉛のほかコバルト、マンガンもimipenemを含むいくつかのβ-ラクタム剤を分解した。

Key words : Zn イオン, β-ラクタム剤, 金属イオンによる分解

β-ラクタム抗生物質がβ-ラクタム環の開裂酵素であるβ-ラクタマーゼによって分解・失活することはよく知られており、今までにも多数の研究がなされてきている¹⁾。しかしながら、β-ラクタム剤を化学物質として考えるならば、薬剤の分解、失活には酵素によるもの以外にも他の物理化学的因子が大きく寄与することが予想される。たとえば、溶液状態では多くの薬剤が徐々にではあるが分解・失活していくことが知られている²⁾。このような薬剤の経時変化は、溶液のpHや緩衝液成分の組成などで影響を受けることから、これらの要因と薬剤の安定性との関連は以前から注目されてきている。ところが、特定の物理化学的因子とβ-ラクタム環の開裂反応との関連にまで注目した研究はほとんど報告されていない。

著者らは今までに*Bacteroides fragilis*のimipenem分解性β-ラクタマーゼについて検討してきたが、その過程で金属によるimipenemの非酵素的分解を観察した。ここでは、その現象について分光学的に検討した結果を報告する。

I. 材料と方法

抗生剤はpenicillin G (PCG, 萬有), ampicillin (ABPC, 台糖ファイザー), cephaloridine (CER, 塩野義), cefotaxime (CTX, 日本ロシユ), ceftizoxime (CZX, 藤沢), cefmetazole (CMZ, 三共), ceftioxin (CFX, 萬有), latamoxef (LMOX, 塩野義), imipenem (IPM, 萬有)を対象とした。金属としてはBa²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺およびZn²⁺の塩酸塩を用いた。また、金属塩を含めその他の試薬は市販の特級品

を使用した。

β-ラクタマーゼは、研究室保存の臨床分離株*B. fragilis* GAI-30144をGAMブイオンで対数増殖期後期まで嫌気培養し、超音波破碎後10,000×g 10分の遠心分離により得られる上清を粗酵素液として使用した。

薬剤分解速度の測定はβ-ラクタマーゼの活性測定に用いられるUV法¹⁾で行った。測定はShimadzu Double-Beam Spectrophotometer UV-150-02 (島津製作所)を用い反応液をセル温度コントローラー (島津温度プログラマKPC-5; 島津製作所)にて30℃に保ちながら行った。標準的な反応条件として100 mM MOPS-KOH (pH 7.2) 中、100 μMの薬剤に対する分解を測定した。また、各薬剤の測定波長は次のとおりであった; PCG 233 nm, ABPC 235 nm, CER 260 nm, CTX 264 nm, CZX 257 nm, CFX 270 nm, CMZ 275 nm, LMOX 275 nm, IPM 299 nm。このほか、PCGの分解について、I₂法にても検出を行った。方法は、SawaiらのRapid Fixed β-lactamase assayの変法³⁾に従った。

PCG, IPM, LMOXの吸収スペクトルおよび差スペクトルは、日立320形自記分光光度計を用い、酵素および1 mMのZn²⁺で30℃一夜処理した反応溶液を測定した。

II. 結果

1. β-ラクタム抗生物質のZn²⁺による分解

IPMを含む200 mM MOPS-KOH Buffer (pH 7.2)

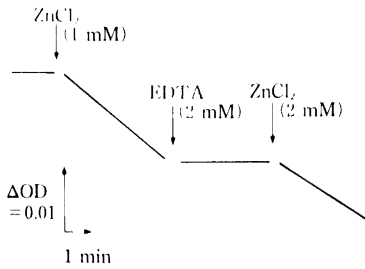


Fig. 1. Effect of zinc ions on the absorbance of imipenem solution.

Decrease in optical density of imipenem by zinc ions was monitored continuously at 299 nm.

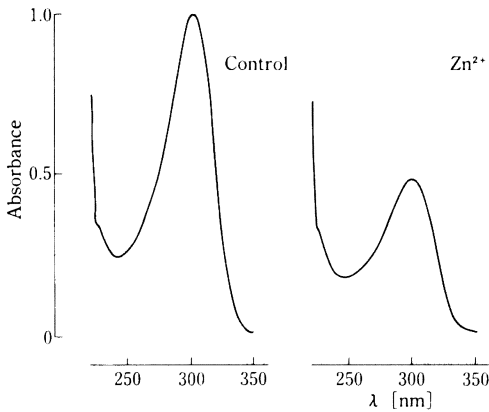


Fig. 2. Absorption spectra of imipenem solution.

Control: 100 μ M imipenem solution.

Zn^{2+} : after incubation with 1 mM $ZnCl_2$ at 30 $^{\circ}C$ for 1 hour.

に Zn^{2+} を添加すると Fig. 1 に示すような経時的な 299 nm における吸光度の減少がみられた。この減少は Zn^{2+} をキレート結合する EDTA の添加により停止し、さらに Zn^{2+} を追加することにより減少が再開した。したがって、 Zn^{2+} が IPM の吸光度変化を引き起こすと考えられた。この変化は IPM のほか LMOX, PCG などでもよく観察された。次に Zn^{2+} 処理前後の IPM, LMOX の吸収スペクトルを調べた。Fig. 2 にみられるように IPM では 300 nm 付近にみられる単一の吸収ピークが Zn^{2+} 処理により減少し、LMOX では (Fig. 3), 230, 270 nm 付近の 2 つのピークのうち 270 nm 付近の吸収ピークが減少した。これらの吸収スペクトル変化は *B. fragilis* 由来の β -ラクタマーゼ⁴⁾ による加水分解のスペクトル変化と同じであった。したがって、

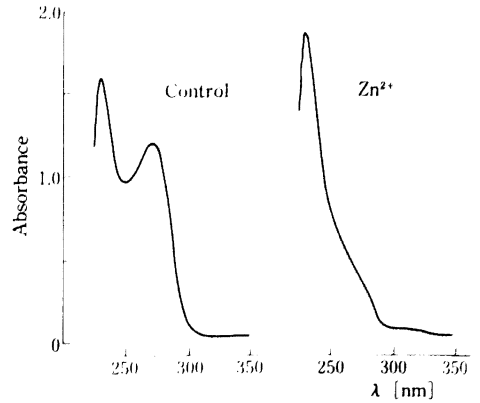


Fig. 3. Absorption spectra of latamoxef solution.

Control: 100 μ M latamoxef solution.

Zn^{2+} : after incubation with 1 mM $ZnCl_2$ at 30 $^{\circ}C$ for 22 hours.

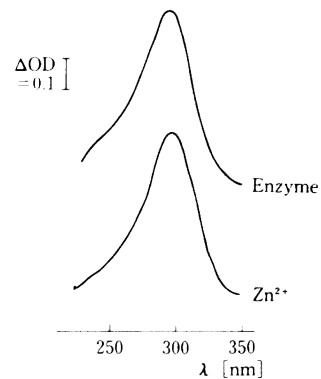


Fig. 4. Comparison of degradation product of imipenem between zinc and enzyme treatment.

Enzyme: Difference spectrum of imipenem solution before and after the treatment with enzyme.

Zn^{2+} : Difference spectrum of imipenem solution before and after the treatment with $ZnCl_2$.

Zn^{2+} は β -ラクタマーゼと同様に薬剤を加水分解していることが予想された。そこで、その点をさらに確認するために、 Zn^{2+} および β -ラクタマーゼによるスペクトル変化を差スペクトルで比較検討した。Figs. 3, 4, 5 は IPM と LMOX の β -ラクタマーゼおよび、 Zn^{2+} 処理後の差スペクトルを示している。IPM (Fig. 4) では、 β -ラクタマーゼおよび、 Zn^{2+} 処理ともに差スペク

トルの極大は約 300 nm でまったく同じスペクトル形であった。また、LMOX (Fig. 5) についても差スペクトル極大は、酵素と Zn^{2+} で同一の 270 nm を示しスペクトルの形も同じであった。PCG についても同様の結果が得られた。さらに、PCG について、 I_2 法で測定を行ったところ、 Zn^{2+} で処理した PCG 溶液において実際にヨウ素の消費がみられ、 Zn^{2+} による反応産物の生成速度は PCG 100 μ M に対して、2.14 μ mol/m mol Zn^{2+} /min と見積られた。これらの結果は、 Zn^{2+} が、 β -ラクタム剤に対して β -ラクタマーゼと同様な不活化、すなわち、 β -ラクタム環の開裂を伴う分解を引き起こしていることを強く示唆している。

2. 分解反応の Zn^{2+} 濃度依存性

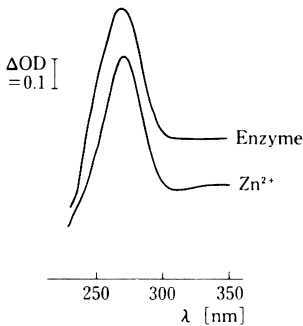


Fig. 5. Comparison of degradation product of latamoxef between zinc and enzyme treatment.

Enzyme: Difference spectrum of latamoxef solution before and after the treatment with enzyme.

Zn^{2+} : Difference spectrum of latamoxef solution before and after the treatment with $ZnCl_2$.

IPM の分解速度におよぼす Zn^{2+} 濃度の影響を Fig. 6 に示した。IPM の分解速度は調べた 0.2 から 5 mM の Zn^{2+} 濃度範囲で直線的に増加し、 Zn^{2+} 濃度と分解速度の間に比例関係が認められた。グラフの傾きから、 Zn^{2+} 1 mol 当りの IPM の分解速度は約 600 μ mol/min と推定された。

3. 各種金属による IPM の分解

Zn^{2+} の場合と同様に、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} などの二価金属イオンについて IPM の分解を調べた。Table 1 にそれぞれの分解速度と Zn^{2+} の場合を 100 % とした相対値を示した。調べた金属のうちで遷移元素に属する Co^{2+} 、 Mn^{2+} において Zn^{2+} に比べると速度は小さいが、IPM の分解がみられた。方、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} では測定できるほどの分解はみられ

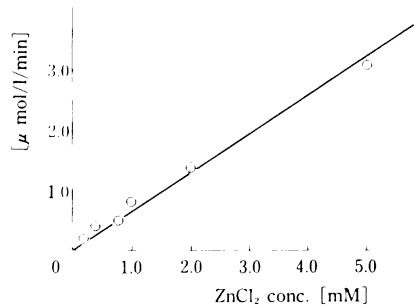


Fig. 6. Relationship between zinc concentration and decomposition velocity of imipenem.

Decomposition of imipenem was measured in a 2.5 ml medium containing 100 μ M imipenem and 100 mM MOPS-KOH (pH 7.2) with varying concentrations of $ZnCl_2$ as indicated.

Table 1. Decomposition of imipenem by several divalent cations

Metal	Decomposition of imipenem	
	(μ mol/m mol Zn^{2+} /min)	(%)
Zn^{2+}	0.6125	100
Co^{2+}	0.0475	7.8
Mn^{2+}	0.015	2.4
Mg^{2+}	ND	ND
Ca^{2+}	ND	ND
Ba^{2+}	ND	ND

ND: not detectable

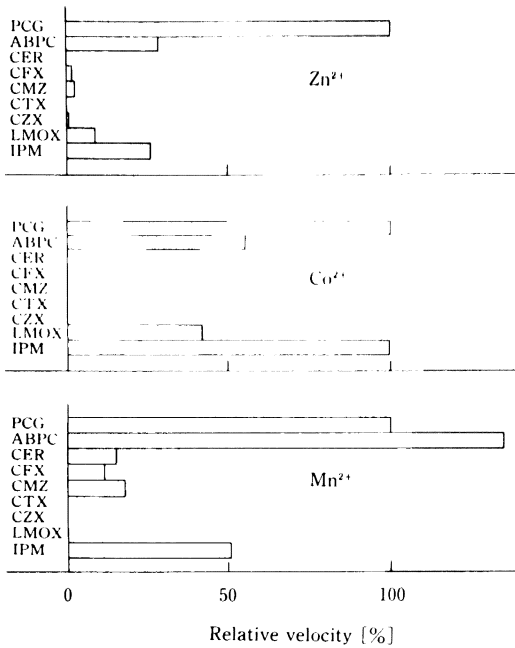


Fig. 7. Relative rates of decomposition of various beta-lactam antibiotics by zinc, cobalt, and manganese.

Each Rate of decomposition is expressed relative to penicillin decomposition as 100%. Abbreviations: PCG, penicillin G; ABPC, ampicillin; CER, cephaloridine; CFX, cefoxitin; CMZ, cefmetazole; CTX, cefotaxime; CZX, ceftizoxime; LMOX, latamoxef; IPM, imipenem.

なかった。また、 Co^{2+} では2~12 mM、 Mn^{2+} では8~12 mMの測定した範囲でそれぞれIPMの分解について直線性を示した。

4. Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} による各種 β -ラクタム剤の分解

Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} によるいくつかの β -ラクタム剤の分解パターンを、それぞれPCGに対する分解を100%としてFig. 7に示した。3種ともにPCG, ABPC, IPMの分解速度が他の薬剤に比べて高い点が共通していた。他の薬剤については金属種により様々であったが、 Mn^{2+} は Zn^{2+} や Co^{2+} でほとんど分解のみられないCER, CFX, CMZの分解速度が比較的大きく、一方、 Zn^{2+} , Co^{2+} で分解速度の大きいLMOXの分解がみられないという特徴を示した。

III. 考 察

著者らは亜鉛要求性メタロ β -ラクタマーゼ⁴⁾の酵

素活性をIPMの分解にもとづく299 nmにおける吸収の変化を指標として測定していた。この際、反応溶液に亜鉛を添加すると、 β -ラクタマーゼを添加していないにもかかわらず時間とともに吸光度が直線的に減少していくのが観察された。今回の研究で明らかにされたように、吸光度減少の速度は亜鉛を増加すると大きくなった。また、この減少はEDTAを添加すると停止し、さらに過剰量の亜鉛を添加すると再開することから亜鉛によるものと考えられた。ところで、亜鉛によるIPM, LMOX, PCGの吸収スペクトルの変化は、これらの薬剤を分解する β -ラクタマーゼによるものとまったく同じ形を示した。また、差スペクトルによる研究もこれらが同じであることを示した。一般に β -ラクタム剤の紫外光領域における吸収は、その多くが β -ラクタム環に由来することはよく知られている⁵⁾。 β -ラクタマーゼは、この β -ラクタム環を加水分解することにより薬剤のスペクトル変化を引き起こすと考えられる。したがって、本研究で示された亜鉛によるスペクトル変化と β -ラクタマーゼのそれが一致した事実は、亜鉛が β -ラクタム環の開裂を伴う薬剤の分解を触媒することを意味している。しかし、亜鉛と酵素の分解速度を比較すると、酵素の分子量および比活性を考慮した概算で、mol当りIPMとLMOXで約170,000倍、PCGで約70,000倍の差があり、酵素の方がはるかに効率よく分解を触媒する。このことは、亜鉛と β -ラクタマーゼの反応機構の差異を考える際に重要であり、今後さらに詳細な検討を必要とする。

IPMの分解は亜鉛のほかコバルト、マンガンでも観察された。一方、分解する β -ラクタム剤の傾向としてはいずれもPCG, ABPC, IPMをよく壊し、そのほか亜鉛、コバルトではLMOXもよく分解した。今回検討した2種の金属イオンのうち、 β -ラクタム剤分解活性を示したこれら3種の金属は電子的に活性に富む遷移元素あるいはそれに準ずる元素である⁶⁾。これらの金属は溶液中でそれ自身、あるいはヒドロキシリオンをともなった形で、アミノ酸エステルやその他のカルボニル基質の加水分解を触媒し得ることが知られている⁷⁻⁹⁾。したがって、本研究で明らかにされた β -ラクタム剤の分解にも類似の反応機構が予想される。今回検討した β -ラクタム剤のうち、PCG, ABPC, IPM, LMOXが分解されやすくCERなどはほとんど分解されないという傾向は、 β -ラクタム環に隣接する構造の違いによる β -ラクタム環の不安定性¹⁰⁾を反映しているであろう。また、バッファー種をTris-HClに変えるとCER, CZX, CTXなどにも亜鉛での分解がみられることから、pHの違いや溶媒成分との相互作用

が金属による β -ラクタム剤の分解に大きく影響する可能性も考慮する必要がある。

ところで、亜鉛、コバルト、マンガンはいずれも生体の微量必須元素であり、亜鉛、マンガンは多くの酵素の補酵素として、コバルトはビタミン B_{12} の一部として重要な役割を担っている¹¹⁾。なかでも亜鉛は濃度が比較的高く、血中で約8.8 mg/l (134 μ M)、腎臓で55 mg/l (841 μ M)程度存在することが知られている¹¹⁾。したがって、このような体内に存在する金属が人体に投与された β -ラクタム剤の分解に関与する可能性は充分考えられる。一方、薬剤感受性測定用の培地中にも亜鉛等が存在すると考えられるので、MIC測定に対する金属の影響も予想される。今後、 β -ラクタム剤の安定性や組織濃度、あるいは β -ラクタム剤を用いる *in vitro* の感受性その他の試験の設定を考える上で、これら金属イオンの影響については充分な注意が必要と思われる。

文 献

- 1) Neu H: Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. pp 575~789 In Lorian V (ed) Antibiotics in laboratory medicine 2nd ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore 1986
- 2) Rippere R A Updated by Jhonson R: Chemical and physical properties of Antibiotics-Prepara-

tion and controle of antibiotics susceptibility disks and other devices containing antibiotics. pp 877~907 In Lorian V (ed) Antibiotics in laboratory medicine 2nd ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore 1986

- 3) Sawai T, Takahashi I, Yamagishi S: Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 910~913, 1978
- 4) 板東香お里, 武藤吉徳, 加藤直樹, 渡辺邦友, 上野一恵: *Bacteroides fragilis* の Zn 要求性 β -ラクタマーゼ. 嫌気性菌感染症研究 19: 97~104, 1989
- 5) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J.* 139: 789~790, 1974
- 6) Larsen E M 著, 森 正保 訳: 遷移元素. 化学同人, 京都, 1971
- 7) Jones M M, Hix J B: *Inorganic biochemistry.* Elsevier Scientific Publishing Co., 1, 1973
- 8) Buckingham D A, Engelhardt L M: Metal hydroxide promoted hydrolysis of carbonyl substrates. *J Am Chem soc.* 97: 5915~5917, 1975
- 9) Woolley P: Models for metal ion function in carbonic anhydrase. *Nature.* 258: 677~681 1975
- 10) 横田 健: 抗生物質の構造活性相関. 代謝 23: 779~788, 1986
- 11) 山根 登: 微量元素. 産業図書, 東京, 1977

DEGRADATION OF β -LACTAM ANTIBIOTICS BY METAL IONS

Kaori Bandoh, Michiko Katoh, Yoshinori Muto,

Yasunori Tanaka, Kunitomo Watanabe and Kazue Ueno

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine,

40 Tsukasamachi, Gifu 500, Japan

Addition of zinc to MOPS-KOH (pH 7.2) buffer containing imipenem (IPM) caused a distinct decrease of absorbance at 299 nm. The degradation product of IPM by zinc showed the same absorption spectrum as IPM hydrolysate by metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis* GAI-30144. These observations suggest that zinc caused non-enzymatic hydrolysis of the β -lactam ring under these conditions. Penicillin G, ampicillin, and latamoxef were also decomposed by zinc. Besides zinc, cobalt and manganese were also observed to cause decomposition of some β -lactams.