

## Cefepime のセファロスポリナーゼ産生菌に対する抗菌力と セファロスポリナーゼとの相互作用について

平岡 聖樹<sup>#</sup>, 三 橋 進

エビゾーム研究所\*

<sup>#</sup>現 ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社社前臨床研究所

益吉 眞次

ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社東京研究所

井上 松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

Cefepime (BMY-28142, CFPM) の *Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* に対する抗菌力とこれらの菌が産生するセファロスポリナーゼ (CSase) との相互作用について、cefotaxime (CTX) と ceftazidime (CAZ) を対照として比較検討した。CFPM は  $1.56\mu\text{g/ml}$  で CTX 耐性 (MIC  $25\mu\text{g/ml}$  以上) の *E. cloacae* および *C. freundii* の臨床分離株 (それぞれ 25 株) の 90 % 以上の株を生育阻止した。また、両菌種の感受性株について cefoxitin により CSase を誘導して感受性を測定したところ、CFPM は CTX や CAZ と比較し CSase 誘導による MIC の上昇が小さかった。一方、CSase 誘導能を比較すると、CFPM は CTX と同程度かやや低く、CAZ はさらに誘導能が低かった。*E. cloacae* GN 7471 および *C. freundii* GN 7391 の精製 CSase を用いて加水分解反応および阻害反応を検討した結果、CFPM の両酵素に対する  $K_m$  および  $K_i$  は  $200\mu\text{M}$  以上で、CTX や CAZ と比較し顕著に大きく、親和性が低いことが明らかであった。この CSase に対する低親和性のため、CFPM は菌体内で標的酵素と反応するような低い濃度条件では、CSase により加水分解されにくく、CSase 産生による抗菌力への影響を受けにくいと考えられた。

**Key words :** Cefepime, 抗菌力, CSase, *E. cloacae*, *C. freundii*

Cefepime (BMY-28142, CFPM) はブリストル・マイヤーズ研究所株式会社東京研究所において合成された新規注射用セファロスポリン系抗生物質で、7 位側鎖に cefotaxime (CTX) と同様の  $\alpha$ -methoxyimino-aminothiazole 基を、3 位に N-methylpyrrolidinium 基を持つ。CFPM はグラム陽性菌のブドウ球菌やグラム陰性菌の緑膿菌を含む広い抗菌スペクトラムを有しており、*Enterobacter cloacae* や *Citrobacter freundii* などのセファロスポリナーゼ (CSase) を産生するグラム陰性菌に対して CTX や ceftazidime (CAZ) より強い抗菌力を示すことも知られている<sup>2)</sup>。

今回、我々は CFPM の *E. cloacae* と *C. freundii* に対する抗菌力とこれらの菌が産生する CSase との相互作用について検討したので報告する。

### I. 試験材料および方法

使用薬剤：CFPM (ブリストル・マイヤーズ研究所), CTX (ヘキストジャパン), CAZ (日本グラクソ), cefoxitin (CFX, 萬有製薬) および cephalothin (CET, 塩野義製薬) はそれぞれ力価の明らかな標品を使用した。

使用菌株：*E. cloacae* および *C. freundii* は 1985 年から 1987 年にかけて国内の数施設で分離され、エビゾーム研究所で保存している臨床分離株を使用した。CTX 耐性菌は CTX の MIC が  $25\mu\text{g/ml}$  以上の菌株についてそれぞれ 25 株を無作為に選び使用した。CSase 産生菌は当研究所保存株を使用した。

感受性試験：日本化学療法学会標準法に従い、寒天平板希釈法により最小発育阻害濃度 (MIC) を測定した。CSase を誘導したときの MIC は、培地に CFX (20

μg/ml) を添加して測定した。試験菌の培養には感受性測定用ブロス (STB, 日水) を、測定培地には感受性測定用寒天培地 (STA, 日水) をそれぞれ使用した。

セファロスポリナーゼ: *E. cloacae* GN 7471 および *C. freundii* GN 7391 の CSase を既報の精製法<sup>3,4)</sup>により分離・精製して使用した。精製酵素は SDS-ゲル電気泳動上で単一バンドを示し、95 %以上の純度と推定された。

セファロスポリナーゼ活性測定: CSase 活性の測定は、UV 法<sup>5,6)</sup>により CET (100 μM) を基質として、pH 7.0、30℃で測定した。酵素量は 1 分間に加水分解する基質のモル数 (μmol/min) で表わした。

阻害定数 (Ki) の測定: CET (12.5~100 μM) を基質として適当な濃度の薬剤の存在下および非存在下で加水分解速度を繰り返し測定し、Lineweaver-Burk plot から最小 2 乗法により Ki 値を算出し、その平均値で示した。

加水分解反応の測定: 基質濃度 10~100 μM における加水分解初速度を上記の反応条件で繰り返し測定し、Lineweaver-Burk plot から最小 2 乗法により Km および Vmax を算出し、その平均値で示した。CEPM, CTX および CAZ は CET と比較し、CSase による加水分解を受けにくいので、これらの基質については CET と比べ 800~3,000 倍量の CSase を用いた。なお、各基質の ΔE (mM<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup>) および測定波長 (nm) はそれぞれ次の値を使用した。CFPM (ΔE: 9.12, 測定波長: 267), CTX (7.25, 264), CAZ (10.3, 265), CET (7.66, 262)。

CSase 誘導能の測定: *E. cloacae* GN 5797 および *C. freundii* GN 14289 を STB で 37℃ 1 夜前培養後、STB (20 ml) に 10 %接種し 37℃で 3 時間振盪培養した。培養液に薬剤を 1, 10 および 100 μg/ml になるように添加し、さらに 2 時間培養を続けた。培養後氷水中で冷却した後、菌を遠心分離し 50 mM リン酸塩緩

衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄した後、超音波破碎し遠心分離後、上清を試料とした。試料中の CSase 活性およびタンパク質濃度を測定し、酵素活性はタンパク 1 mg 当りの比活性で表現した。タンパク質濃度は Lowry らの方法<sup>7)</sup>で測定した。

II. 結 果

1. CTX 耐性 *E. cloacae* および *C. freundii* に対する抗菌力

CTX 耐性 (MIC 25 μg/ml 以上) の *E. cloacae* (25 株) および *C. freundii* (25 株) に対する CFPM, CAZ および CTX の MIC 測定結果を Table 1 に示す。両菌種の CTX 耐性菌は CAZ に対しても CTX と同程度の感受性を示し、いずれも 12.5 μg/ml 以上の MIC を示した。しかし、CFPM はこれらの菌株の 90 %以上の株に対し 1.56 μg/ml 以下の MIC を示し、CTX および CAZ と比較し 16~32 倍程度強い抗菌力を示した。これらの菌種の CTX 耐性菌は染色体性の CSase を多量にかつ半構成的に産生することにより耐性を獲得していることが知られている。そこで、CSase 産生と抗菌力の関係を明らかにするため、CSase の誘導能の強い薬剤として知られている CFX を培地に添加し、CSase を誘導したときの各薬剤に対する感受性の変化を調べた。

2. CSase 誘導による感受性変化

*E. cloacae* および *C. freundii* の感受性株について、CFX (20 μg/ml) を培地に添加あるいは無添加で MIC を測定した結果 (3 株の幾何平均値) を Table 2 に示す。20 μg/ml の CFX により CSase 活性は 3 株の平均で *E. cloacae* は 0.033 μmol/min/mg から 1.60 μmol/min/mg に、*C. freundii* は 0.058 μmol/min/mg から 0.23 μmol/min/mg にそれぞれ上昇した。CFX により CSase を誘導した時、*E. cloacae* および *C. freundii* に対する CTX の MIC はそれぞれ 8 倍および 62 倍に上昇し、CAZ の MIC はそれぞれ 10 倍および 40 倍に上昇した。一方、CFPM の MIC はそれぞれ

Table 1. Antibacterial activity of cefepime against cefotaxime resistant clinical isolates

Organism (no. of strains)	Antibiotic	MIC (μg/ml)		
		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>C. freundii</i> (25)	Cefepime	0.2~12.5	0.78	1.56
	Ceftazidime	12.5~200	50	100
	Cefotaxime	25~200	25	100
<i>E. cloacae</i> (25)	Cefepime	0.2~3.13	0.78	1.56
	Ceftazidime	12.5~100	50	100
	Cefotaxime	25~200	100	200

3.1 倍および 4 倍に上昇したにとどまった。このように、CFPM は CSase 産生量の増大による抗菌力の低下が小さく、CSase により抗菌力が左右されにくいことが確認された。

3. CSase 誘導能の比較

*E. cloacae* や *C. freundii* の CSase は誘導型であるため、薬剤自身の酵素誘導能も抗菌力を左右する要因と考えられる<sup>8)</sup>。そこで、各薬剤の酵素誘導能を 1~100 µg/ml の範囲で検討した。*E. cloacae* GN 5797 および *C. freundii* GN 14289 を 1, 10 および 100 µg/ml の薬剤の存在下で培養し、CSase 活性を測定した結果を Table 3 に示す。CTX は両菌株に対して CFX とほぼ同程度の酵素誘導能を示した。CFPM は *C. freundii* GN 14289 に対して CTX と同程度の CSase 活性誘導を示したが、*E. cloacae* GN 5797 に対して 10~100 µg/ml では、CTX よりやや低い CSase 活性を誘導した。しかし、CAZ と比較すると両菌株とも CFPM による酵素誘導量が多かった。また、これらの濃度は MIC と比較し高い濃度であるため、高濃度の薬剤により、脱抑制株が選択された可能性も考えられる。

4. CSase による加水分解反応速度定数および

CSase に対する阻害定数の測定

CFPM は CTX や CAZ と同様に *E. cloacae* や *C. freundii* の CSase による加水分解を受けにくい<sup>2)</sup>。しかし、酵素量を多くして試験するとこれらの薬剤の加水分解反応を検出することができる。そこで、CET のような易加水分解性の基質と比較し 800~3,000 倍の酵素を使用して、加水分解速度を測定し、Km と Vmax を求めた (Table 4)。また、CET を基質として測定した阻害定数 (Ki) も同時に Table 4 に示す。

*E. cloacae* GN 7471 および *C. freundii* GN 7391 の CSase に対する CFPM の Vmax はそれぞれ CET の Vmax の約 1/2,500 (*E. cloacae*) および約 1/400 (*C. freundii*) で加水分解されにくいことが確認された。ところが、CTX および CAZ の Vmax と比較すると、*E. cloacae* の CSase では CTX の約 16 倍および CAZ の約 6 倍、また、*C. freundii* の CSase では CTX の約 120 倍および CAZ の約 6 倍で、CFPM の Vmax はこれら 2 薬剤より大きかった。このことは、CFPM が高基質濃度では CTX や CAZ より加水分解を受け易いことを示している。一方、酵素と基質の親和性の指標である Km あるいは Ki をみると、CFPM のこれらの

Table 2. Decrease in antibacterial activity against *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* by induction of cephalosporinases

Organism	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Cefepime	Ceftazidime	Cefotaxime	Cephalothin
<i>E. cloacae</i>				
Not induced	0.10	3.1	5.0	>800
Induced <sup>b</sup>	0.31	31	40	>800
Ratio <sup>c</sup>	3.1	10	8.0	/
<i>C. freundii</i>				
Not induced	0.02	0.25	0.16	40
Induced <sup>b</sup>	0.08	9.9	9.9	500
Ratio <sup>c</sup>	4.0	40	62	12.5

<sup>a</sup> Geometric mean of 3 strains  
<sup>b</sup> Cephalosporinases were induced with cefoxitin (20µg/ml)  
<sup>c</sup> MIC ratio, induced/not induced

Table 3. Inducer activity for cephalosporinases of *Enterobacter cloacae* GN5797 and *Citrobacter freundii* GN14289

Organism	Inducer concentration (µg/ml)	Cephalosporinase activity (µmol/min/mg protein)			
		Cefepime	Ceftazidime	Cefotaxime	Cefoxitin
<i>E. cloacae</i> GN5797	0	0.045	0.045	0.045	0.045
	1	0.132	0.077	0.144	0.291
	10	0.572	0.097	0.798	0.948
	100	0.678	0.144	1.24	1.31
<i>C. freundii</i> GN14289	0	0.013	0.013	0.013	0.013
	1	0.013	0.014	0.034	0.035
	10	0.136	0.072	0.167	0.275
	100	0.283	0.153	0.292	0.392

Table 4. Hydrolysis and inhibition kinetic parameters against cephalosporinases from *Enterobacter cloacae* GN7471 and *Citrobacter freundii* GN7391

Antibiotic	CSase from <i>E. cloacae</i> GN7471			CSase from <i>C. freundii</i> GN7391		
	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Cephalothin	558	76		126	17	
Cefepime	0.22	260	>200	0.31	200	>200
Ceftazidime	0.034	17	31	0.051	6.8	37
Cefotaxime	0.013	—	0.08	0.0025	—	0.01

— :  $K_m$  values could not be obtained for cefotaxime, because the values were far smaller than the substrate concentrations used.

CSase に対する  $K_m$  と  $K_i$  は  $200 \mu\text{M}$  以上で, CTX の  $K_i$  が  $0.08 \mu\text{M}$  (*E. cloacae*) および  $0.01 \mu\text{M}$  (*C. freundii*), また, CAZ の  $K_m$  が  $17 \mu\text{M}$  (*E. cloacae*) および  $6.8 \mu\text{M}$  (*C. freundii*) であったのと比較し大きく, CFPM はこれらの CSase に対して親和性が顕著に低いことが示された。

### III. 考 察

CFPM は *E. cloacae* や *C. freundii* などの染色体性の  $\beta$ -ラクタマーゼ (CSase) を産生する菌種に対して同系の薬剤である CTX や CAZ より優れた抗菌力を示す。また, これらの菌種にみられる CTX 耐性菌 (MIC  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上, それぞれ 25 株) は CTX に対しても同時に耐性を示したが, CFPM に対しては感受性を示し, 両菌種とも 90 % 以上の株が  $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下の MIC を示した (Table 1)。これらの CTX 耐性菌は脱抑制的に多量の CSase を産生することが知られており<sup>9)</sup>, CFPM は CSase 産生による抗菌力への影響を受けにくいことが考えられる。事実, CSase をよく誘導することが知られる CFX の存在下で *E. cloacae* および *C. freundii* に対する抗菌力を測定すると, CFPM は CTX や CAZ と比較し酵素誘導による MIC の上昇の程度が顕著に小さかった (Table 2)。

*E. cloacae* や *C. freundii* の CSase 産生様式は本来誘導型で, 薬剤によりその誘導能が異なることも知られており, 抗菌力への影響も議論されている<sup>9)</sup>。CFPM の CSase 誘導能を調べた結果, CTX や CAZ と同程度で比較的誘導能の低い部類にはいると考えられた (Table 3)。CFPM の *C. freundii* や *E. cloacae* に対する MIC は低いことから, CFPM の抗菌力に及ぼす CSase 誘導能の影響は微弱であると考えられる。

CSase による加水分解反応と阻害反応を調べた結果, CFPM の  $K_m$  および  $K_i$  は CTX や CAZ の  $K_m$  あるいは  $K_i$  と比較し顕著に大きく, CSase に対する CFPM の親和性は低いと考えられる。この CSase に対する低親和性が CSase 産生菌に対する CFPM の優

れた抗菌力と関係していると考えられる。加水分解の  $V_{\max}$  を比較すると CFPM は CTX や CAZ より  $V_{\max}$  が大きく, 基質濃度が高い条件下では加水分解を受け易い。しかし, CFPM や CTX の *E. cloacae* や *C. freundii* の感受性菌に対する MIC はおよそ  $0.1 \mu\text{M}$  (約  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 程度で,  $\beta$ -ラクタム剤の細菌外膜を介した透過は外膜内外の濃度差に依存する単純拡散である<sup>10)</sup>ので, ペリプラズム内で標的酵素 (PBP) の阻害を発現する薬剤濃度は  $0.1 \mu\text{M}$  程度の非常に低い濃度と推定される。ペリプラズム内の CSase との反応もそのような低い薬剤濃度で起きていると考えられ, 低い基質濃度での加水分解速度が抗菌力を左右する一つの要因と考えられる<sup>11)</sup>。すなわち, CFPM は菌体内で薬剤が作用するような低い薬剤濃度では CSase の加水分解を受けにくいことにより説明できる。 $V_{\max}$  および  $K_m$  あるいは  $K_i$  を用いて推定した  $0.1 \mu\text{M}$  における CFPM の加水分解速度は, *E. cloacae* の CSase では CTX の約 1/90, CAZ の約 1/3, *C. freundii* の CSase では CTX の約 1/15, CAZ の約 1/5 で, 両薬剤と比較し CFPM は分解されにくいと考えられる<sup>12)</sup>。また, CAZ の加水分解速度は CTX より小さいにもかかわらず, CSase の影響を CTX と同程度に受ける。これは CAZ の外膜透過性が低く, 加水分解による抗菌力へ影響を相乗的に強めているためと考えられる<sup>11)</sup>。

このように CFPM は CTX や CAZ のような第 3 世代セフェム剤に耐性である CSase 高産生菌に対しても優れた抗菌力を持っているが, CFPM のこの特徴が臨床成績にどのように反映されるか期待される。

### 文 献

- 1) Naito T, Aburaki S, Kamachi H, Narita Y, Okumura J, Kawaguchi H : Synthesis and structure-activity relationships of a new series of cephalosporins, BMY-28142 and related compounds. *J Antibiot* 39 : 1092~1107, 1986
- 2) Masuyoshi S, Hiraoka M, Inoue M, Tomatsu K, Hirano M, Mitsunashi S : Comparison of the in

- vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cefepime (BMY-28142) with ceftazidime, ceftazidime, cefotaxime and cefmenoxime. Drug Exptl Clin Res 15 : 1~10, 1989
- 3) Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S : Purification and properties of cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18 : 853~857, 1980
  - 4) Tajima M, Takenouchi Y, Sugawara S, Inoue M, Mitsuhashi S : Purification and properties of chromosomally mediated  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* GN 7391. J Gen Microbiol 121 : 449~456, 1980
  - 5) Ross G W, Chanter K V, Harris A M, Kirby S M, Marchall M J, O'Callaghan C H : Comparison of assay technique for  $\beta$ -lactamase activity. Anal Biochem 54 : 9~16, 1973
  - 6) 井上松久, 平岡聖樹, 岡本了一 :  $\beta$ -ラクタマーゼの検査法……酵素の活性測定と基質特異性の求め方. 検査と技術 16 : 239~243, 1988
  - 7) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265~275, 1951
  - 8) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S : Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18 : 382~385, 1980
  - 9) Lindberg F, Normark S : Contribution of chromosomal  $\beta$ -lactamases to  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteria. Rev Infect Dis 8 (Suppl 3) : S 292~304, 1986
  - 10) Yoshimura F, Nikaido H : Diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob Agents Chemother 27 : 84~92, 1985
  - 11) Hiraoka M, Inoue M, Mitsuhashi S : Hydrolytic rate at low drug concentration as a limiting factor in resistance to newer cephalosporins. Rev Infect Dis 10 : 746~751, 1988
  - 12) Hiraoka M, Masuyoshi S, Mitsuhashi S, Tomatsu K, Inoue M : Cephalosporinase interactions and antimicrobial activity of BMY-28142, ceftazidime and cefotaxime. J Antibiot 41 : 86~93, 1988

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEFEPIME AGAINST CEPHALOSPORINASE-PRODUCING BACTERIA AND INTERACTIONS WITH CEPHALOSPORINASES

Masaki Hiraoka<sup>1)</sup>\*, Shinji Masuyoshi<sup>2)</sup>, Matsuhisa Inoue<sup>3)</sup>, Susumu Mitsuhashi<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Episome Institute,

2220 Kogure, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan

\*Present address : Preclinical Research Laboratories, Bristol-Myers Research Institute

<sup>2)</sup>Tokyo Research Center, Bristol-Myers Research Institute

<sup>3)</sup>Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University

The antibacterial activity of cefepime (CFPM, BMY-28142) against *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* and interactions of CFPM with these bacteria's cephalosporinases were studied in comparison with cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ). CFPM showed superior activity against CTX-resistant (MIC  $\geq 25$   $\mu$ g/ml) strains of *E. cloacae* and *C. freundii* to those of CAZ and CTX : more than 90 % of these strains were inhibited by CFPM at 1.56  $\mu$ g/ml. In the presence of an inducer for cephalosporinase, the antibacterial activities of CTX and CAZ against susceptible strains were reduced much more than that of CFPM, indicating that the activity of CFPM is less affected by cephalosporinase-production than those of the other two agents. On the other hand, the ability of CFPM to induce cephalosporinase activity of *E. cloacae* and *C. freundii* strains was equal to or somewhat lower than that of CTX and higher than that of CAZ. In hydrolysis and inhibition studies, CFPM showed much higher  $K_m$  and  $K_i$  values for cephalosporinases of *E. cloacae* GN 7471 and *C. freundii* GN 7391 than did CTX and CAZ. This low affinity of CFPM for cephalosporinases is likely to confer stability against the enzymes at the low concentrations expected in the bacterial cells and, therefore, contribute to the antibacterial activity of CFPM against cephalosporinase-producing bacteria.