

新経口セフェム剤 ME 1207 の抗菌力及び β -ラクタマーゼ安定性について

田村 淳・岡本 一・三橋 進

エビゾーム研究所*

井 上 松 久

北里大学医学部微生物学教室

新経口用セフェム系抗生物質 ME 1207 の抗菌活性体 ME 1206 の抗菌力及び本剤の β -ラクタマーゼに関する安定性を ceftam (CFTM), cefixime (CFIX) 及び cefaclor (CCL) を対照薬として比較検討した。

1) ME 1206 の標準菌株に対する MIC 値はグラム陽性菌では CFTM 及び CCL より優れ、グラム陰性菌では CFTM 及び CFIX とほぼ同等で CCL より優れていた。

2) ME 1206 の β -ラクタマーゼ産生株に対する MIC 値は、CFTM 及び CFIX とほぼ同等であった。しかし *Citrobacter freundii* など一部に検討した薬剤全てに耐性を示す菌株が存在した。

3) ME 1206 の各種 β -ラクタマーゼに対する相対加水分解速度は、CFTM とほぼ同等で安定であったが、オキシミノセファロスポリナーゼにはやや不安定であった。

4) ME 1206 の β -ラクタマーゼ誘導能は、CFTM と同等に低かった。

5) ME 1206 の *Staphylococcus aureus* 及び *Klebsiella pneumoniae* の各ペニシリナーゼ産生株に対する増殖曲線に及ぼす影響を検討した。ME 1206 の殺菌力は CFTM 及び CCL とほぼ同等であったが、再増殖は CCL が著しかった。

Key word : ME 1207, ME 1206, 経口セフェム剤, β -ラクタマーゼ安定性, pivaloyloxymethyl ester 体

ME 1207 は明治製薬薬品総合研究所で開発された新規経口用セフェム系抗生物質で、抗菌活性体 ME 1206 の pivaloyloxymethyl ester 体である (Fig. 1)。

ME 1206 はグラム陽性菌群及びグラム陰性菌群に広範囲な抗菌スペクトルを有し、優れた *in vitro* 及び *in vivo* 活性を示す^{1,2)}。

今回、ME 1206 の β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力及び β -ラクタマーゼ安定性、誘導能などを検討したので報告する。

1. 実験材料と方法

1. 使用薬剤

ME 1206 (明治製薬), ceftam (CFTM : 富山化学), cefixime (CFIX : 藤沢薬品), cefaclor (CCL : 塩野義製薬), cephaloridine (CER : 塩野義製薬), cephalothin (CET : 塩野義製薬) 及び benzylpenicillin (PCG : 明治製薬) の各社より分与された力価の明かな標品を使用した。

2. 使用菌株

エビゾーム研究所保存の標準菌株及び臨床分離株を

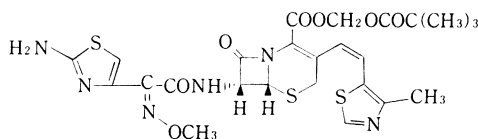
使用した。

3. MIC 測定

日本化学療法学会標準法³⁾に従った。すなわち、被験菌を 37℃ 一夜培養後、約 10⁶CFU/ml の菌濃度に希釈し、2 倍希釈系列の薬剤を含有する感受性測定用寒天培地 (STA, 日水) にマイクロプランター (佐久間) を用いて約 5 μ l を接種し、37℃、18~20 時間培養後、菌の発育が認められない最小の薬剤濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。なお、*Streptococcus pyogenes* には 5% 脱繊維馬血液添加 STA を使用した。

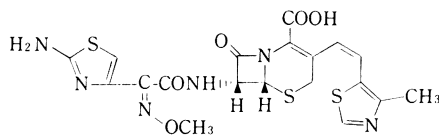
4. β -ラクタマーゼ安定性

β -ラクタマーゼ安定性は当研究所保存の部分又は完全精製標品を用いた。各基質は 100 μ M に調製し、加水分解速度は UV 法⁴⁾により測定し、ペニシリナーゼ (PCase) は PCG を、セファロスポリナーゼ (CSase) 及びオキシミノセファロスポリナーゼ (CXase) には CER をそれぞれ 100 とした相対加水分解速度で表した。ME 1206 の加水分解による吸光度減少 (ΔE) は、2.40 mM⁻¹·cm⁻¹ (測定波長 : 274 nm) であった。



ME1207

(-)-(6*R*,7*R*)-(2,2-dimethylpropionyloxy)methyl 7-[(*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(*Z*)-2-(4-methylthiazol-5-yl)ethenyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-ene-2-carboxylate



ME1206

(+)-(6*R*,7*R*)-7-[(*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(*Z*)-2-(4-methylthiazol-5-yl)ethenyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

Fig. 1. Chemical structures of ME1207 and ME1206.

5. β -ラクタマーゼ阻害活性

β -ラクタマーゼ阻害活性は、*Enterobacter cloacae* GN 7471 の CSase を用い、基質の CET の各濃度での加水分解反応に対する被験薬剤の阻害活性を測定し、Lineweaver-Burk plot より阻害定数 k_i 値を算出した。

6. β -ラクタマーゼ誘導能

β -ラクタマーゼを誘導産生する菌株 *E. cloacae* GN 5797, *Providencia rettgeri* GN 4430 及び *Proteus vulgaris* GN 76 株について行った。被験菌株を Brain heart infusion broth (BHI broth; Difco) 10 ml にて 37°C 一夜培養後、全量を BHI broth 200 ml に移植し、37°C 2 時間振盪培養した。これを L チューブに 10 ml 分注し、各薬剤を指定濃度となるように添加した。さらに 37°C 2 時間振盪培養後、冷却遠心集菌 (10,000 rpm, 10 分)、洗浄後、リン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.0) 2 ml に懸濁し超音波破碎し、未破碎菌体を除いた遠心上清を粗酵素液とした。粗酵素液の蛋白量は Lowry 法⁵⁾で測定し、 β -ラクタマーゼ活性は CER を基質としたマイクロード法⁶⁾で測定した。

7. ペニシリナーゼ産生株の増殖曲線に及ぼす影響

ペニシリナーゼ産生株の *Staphylococcus aureus* MS 16040 及び *Klebsiella pneumoniae* GN 69 株について、感受性測定パイオン (STB; ニッスイ) で培

養した対数増殖期の被験菌に指定濃度となるよう薬剤を添加し、37°C 24 時間振盪培養を続けた。その間、経時的に菌液を分取して生菌数を測定した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトル

ME 1206 の標準菌株に対する抗菌力 (MIC 値) を Table 1 に示す。

ME 1206 はグラム陽性菌及びグラム陰性菌に幅広い抗菌力を有していた。特に *S. aureus* に対しては、CCL 及び CFTM より優れた抗菌力を示した。ME 1206 はグラム陰性菌に対しても CFTM 及び CFIX とほぼ同等の強い抗菌力を示し CCL より明らかに優れていた。しかし *Pseudomonas aeruginosa* に対しては本剤及び対照薬剤全ての抗菌力は弱かった。

2. β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力

各種 β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌力 (MIC 値) を Table 2 に示す。

ME 1206 は各種 β -ラクタマーゼ産生菌に対し CCL よりはるかに優れた抗菌力を示したが、CFTM 及び CFIX と同様に *Citrobacter freundii*, *E. cloacae* など一部の CSase 産生菌は ME 1206 に対し耐性であった。

3. β -ラクタマーゼ安定性

ME 1206 の各種 β -ラクタマーゼに対する安定性を基質濃度 100 μ M の時の相対加水分解速度として求

Table 1. Antibacterial activity against standard strains

Organism	MIC (μg/ml)			
	ME1206	cefteram	cefixime	cefaclor
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.39	3.13	25	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.10	0.78	1.56	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.39	1.56	6.25	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	≤0.025	≤0.025	0.20	0.36
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.20	0.20	0.20	1.56
<i>Escherichia coli</i> K-12 C600	0.20	0.10	0.10	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	≤0.025	≤0.025	≤0.025	0.39
<i>Salmonella typhimurium</i> IID 971	0.20	0.20	0.05	0.78
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.39	0.20	≤0.025	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	≤0.025	≤0.025	≤0.025	1.56
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.20	0.20	0.05	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	≤0.025	≤0.025	≤0.025	0.78
<i>Serratia marcescens</i> IAM 1184	0.39	0.78	0.05	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.20	3.13	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	12.5	25	12.5	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	3.13	12.5	6.25	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1	12.5	25	25	>100
<i>Morganella morganii</i> IFO 3848	≤0.025	≤0.025	≤0.025	100
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0.20	0.10	≤0.025	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	≤0.025	≤0.025	≤0.025	12.5
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	≤0.025	≤0.025	≤0.025	12.5
<i>Providencia rettgeri</i> IFO 3850	3.13	1.56	0.39	3.13
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0.78	0.39	0.78	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.78	0.39	0.39	>100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	≤0.025	0.78	≤0.025

Table 2. Antibacterial activity against β-lactamase producing strains

Organism	Type of β-lactamase	MIC (μg/ml)			
		ME1206	cefteram	cefixime	cefaclor
<i>Escherichia coli</i> GN5482	CSase	0.78	0.78	12.5	>100
<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	CSase	100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	CSase	6.25	12.5	12.5	>100
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	CSase	12.5	50	12.5	>100
<i>Morganella morganii</i> GN5407	CSase	0.20	0.20	0.20	>100
<i>Providencia rettgeri</i> GN4430	CSase	0.20	0.05	≤0.025	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	CSase	25	100	50	>100
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	CXase	12.5	1.56	0.20	>100
<i>Pseudomonas cepacia</i> GN11164	CXase	1.56	3.13	0.39	12.5
<i>Xanthomonas maltophilia</i> GN12873	CXase	50	>100	>100	>100
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	CXase	0.39	1.56	0.05	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GN69	PCase	0.10	0.10	0.05	0.78
<i>Escherichia coli</i> W3630 Rms212	PCase (type I)	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Escherichia coli</i> W3630 Rms213	PCase (type II)	0.20	0.20	0.20	3.13
<i>Escherichia coli</i> ML1410 Rte16	PCase (type III)	0.20	0.20	0.20	3.13
<i>Escherichia coli</i> C Rms149	PCase (type IV)	0.20	0.20	0.20	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ML4259 Rms139	PCase (type IV)	12.5	50	12.5	>100

CSase : cephalosporinase

CXase : oxyiminocephalosporinase

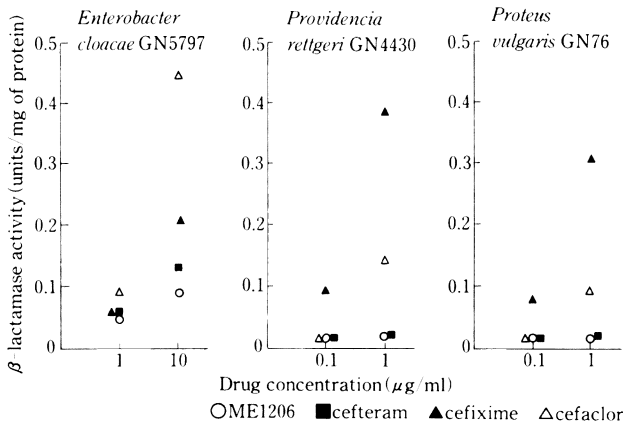
PCase : penicillinase

Inoculum size : 10⁶cells/ml

Table 3. Stability against β -lactamase

Enzyme source	Type of β -lactamase	Relative rate of hydrolysis*				
		ME1206	cefteram	cefixime	cefaclor	cephaloridine benzylpenicillin
<i>Serratia marcescens</i> GN10857	CSase	9.1	9.7	5.7	190	100
<i>Enterobacter cloacae</i> GN7471	CSase	<1.0	<1.0	<1.0	110	100
<i>Morganella morganii</i> GN5407	CSase	2.0	2.2	<1.0	230	100
<i>Providencia rettgeri</i> GN4430	CSase	20	13	2.9	76	100
<i>Proteus vulgaris</i> GN7919	CXase	4.3	25	1.3	230	100
<i>Pseudomonas cepacia</i> GN11164	CXase	64	63	1.6	270	100
<i>Klebsiella oxytoca</i> GN10650	CXase	1.6	8.3	<1.0	72	100
<i>Bacteroides fragilis</i> No.36	CXase	14	31	12	75	100
<i>Escherichia coli</i> W3630/Rms212	PCase (type I)	<1.0	<1.0	>1.0	5.7	100
<i>Escherichia coli</i> W3630/Rms213	PCase (type II)	47	85	1.7	34	100
<i>Escherichia coli</i> ML1410/Rte16	PCase (type III)	<1.0	<1.0	<1.0	24	100
<i>Escherichia coli</i> JM83/Rms433	PCase (type IV)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	100
<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/pl258	PCase (type V)	<1.0	<1.0	<1.0	9.6	100

*Relative rate of hydrolysis is expressed as the percentage of hydrolysis of cephaloridine or benzylpenicillin.

Fig. 2. β -lactamase inducing activity.

めた結果を Table 3 に示す。

ME 1206 は各種 CSase に CFTM 及び CFIX と同様に安定であったが、*P. rettgeri* の CSase にはやや不安定であった。また各種 CXase に ME 1206 は CFTM と同程度にやや不安定であった。プラスミド性の各種 PCase に対して、ME 1206 は安定であった。ただし、II 型 PCase には加水分解された。

4. β -ラクタマーゼ阻害活性

E. cloacae GN 7471 株の精製酵素標品を用い、CSase に対する ME 1206 の阻害活性を測定した。ME 1206、CFTM 及び CFIX の K_i 値はそれぞれ 1.8, 1.6, 0.11 μ M であり、ME 1206 の CSase 阻害活性は CFTM と同等で CFIX より弱かった。

5. β -ラクタマーゼ誘導能

各種 β -ラクタマーゼ誘導産生株に対する ME 1206

の β -ラクタマーゼ誘導能を測定した。Fig. 2 に示すごとく、いずれの菌株に対しても ME 1206 の β -ラクタマーゼ誘導能は低く、その程度は CFTM と同等で CFIX 及び CCL より低かった。

6. ペニシリナーゼ産生株の増殖曲線に及ぼす影響

ペニシリナーゼ産生 *S. aureus* MS 16040 株の増殖曲線に及ぼす影響の結果を Fig. 3 に示す。ME 1206、CFTM 及び CCL の 6 時間までの殺菌力はほぼ同等であったが、いずれの薬剤も用量依存的な殺菌力の上昇はほとんど認められなかった。24 時間後に CCL で著しい再増殖が認められた。

ペニシリナーゼ産生 *K. pneumoniae* GN 69 株の増殖曲線に及ぼす影響の結果を Fig. 4 に示す。ME 1206 の殺菌力は CFTM とほぼ同等で、2 MIC

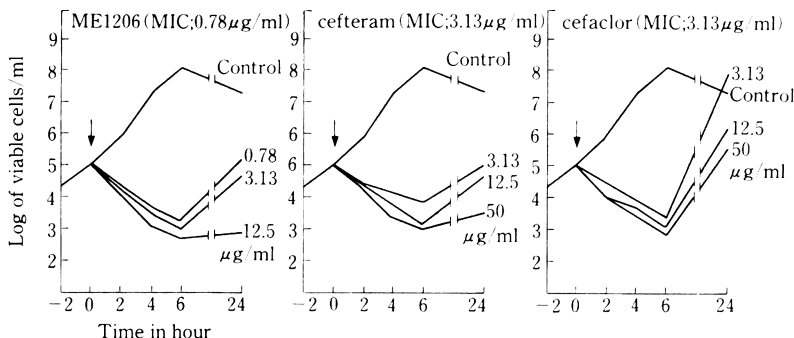


Fig. 3. Bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* MS16040 (penicillinase producing strain).

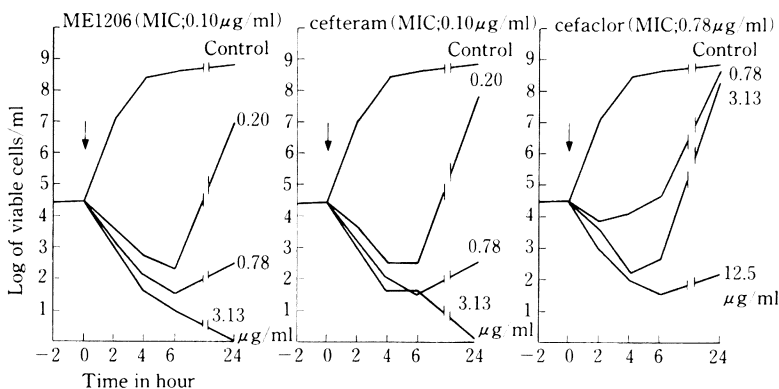


Fig. 4. Bactericidal activity against *Klebsiella pneumoniae* GN69 (penicillinase producing strain).

濃度で6時間まで殺菌的であったが24時間後には再増殖した。また32MIC濃度の3.13 µg/mlでは24時間後に完全殺菌された。CCLは4MIC濃度の3.13 µg/mlでも著しい再増殖が認められた。

III. 考 察

ME 1207の抗菌活性体 ME 1206は、グラム陰性菌に加えて *S. aureus* などグラム陽性菌に対してもCCLに優る抗菌力を示した。ME 1206は第3世代経口セフェム剤のCFTM、CFIX、cefepodoximeなどに比較し、*S. aureus* に対する抗菌力が強いことが明らかにされている⁷⁾。ME 1207のマウス及びヒトの尿中回収率は約20%とやや低いが、血中濃度はCFTMとほぼ同等であり、マウス感染治療実験においては *in vitro* 抗菌力を反映した良好な治療効果を示す^{1,2)}。

今回、ME 1206のβ-ラクタマーゼに関する諸試験をCFTM、CFIX及びCCLを対照として実施した。

β-ラクタマーゼ安定性、阻害活性及び誘導能のいずれもCFTMとほぼ同等で、阻害活性及び誘導能でCFIXよりやや優れていた。

E. cloacae GN 7471株の産生するCSaseに対するME 1206のKi値は1.8 µMであり、やや高い結合親和性を示した。しかしながらME 1206はβ-ラクタマーゼ安定性の点で第1、第2世代のセフェム剤に比較し安定である為、*E. cloacae* *C. freundii* 等の菌種で多量のCSaseを産生する高度耐性菌を除き、これらの菌種にも臨床効果が期待されよう。

PCase産生株 *S. aureus* MS 16040株の増殖曲線に及ぼす影響では、ME 1206及びCFTMはCCLに比較し再増殖が遅かった。これはME 1206及びCFTMは *S. aureus* のPCaseに安定であるが、CCLは不安定である為と考えられた。

以上ME 1207は経口セフェム剤として、抗菌スペクトラム、*in vitro* 抗菌力、β-ラクタマーゼ安定性などの点で優れた性質を有しており、臨床での有用性が

期待される。

文 献

- 1) Sakagami K, Atumi K, Tamura A, Yoshida T, Nishihata K, Fukatsu S: Synthesis and oral activity of ME1207, a new orally active cephalosporin. *J Antibiot* 43: 1047~1050, 1990
- 2) Tamura A, Okamoto R, Yoshida T, Yamamoto H, Kondo S, Inoue M, Mitsuhashi S: In vitro and in vivo antibacterial activities of ME1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1421~1426, 1988
- 3) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 4) 井上松久, 平岡聖樹, 岡本了一 β -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: 239~275, 1988
- 5) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 192: 265~275, 1951
- 6) 澤井哲夫, 高橋郁子: β -ラクタマーゼ 活性測定法とその応用。 *蛋白質核酸酵素* 23: 391~400, 1978
- 7) 横田 健, 島田 馨: 第39回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。 ME1207, 東京, 1991

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND β -LACTAMASE STABILITY OF ME1207

Atsushi Tamura¹⁾, Ryoichi Okamoto¹⁾, Susumu Mitsuhashi¹⁾,
Matsuhisa Inoue²⁾

¹⁾Episome Institute

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

²⁾Department of Microbiology, School of Medicine, Kitasato University

We compared the antibacterial activity and β -lactamase stability of ME1206 (the biologically active product of ME1207, a new oral cephalosporin) with those of ceftam(CFTM), cefixime (CFIX) and cefaclor (CCL).

- 1) The antibacterial activity of ME1206 against standard strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria was as follows. ME1206 was more active than CFTM and CCL against Gram-positive bacteria, and it showed almost the same antibacterial activity of CFTM and CFIX against Gram-negative bacteria.
- 2) ME1206 was active against most of β -lactamase producing strains. Its activity was comparable to that of CFTM and CFIX. But a small number of resistant strains such as *C. freundii* strains existed.
- 3) The relative rate of hydrolysis of ME1206 by various kinds of β -lactamases was determined. ME1206 was stable against cephalosporinases (CSase) and penicillinases (PCase) but unstable against oxyiminocephalosporinases (CXase)
- 4) The β -lactamase inducing activity of ME1206 was very low and it was comparable to that of CFTM.
- 5) The time course of ME1206 bactericidal activity against PCase producing strains of *S. aureus* and *K. pneumoniae* was determined. The bactericidal activity of ME1206 was almost equal to that of CFTM and CCL. But in the case of CCL a more remarkable regrowth was detected.