

新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 :
 β -lactamase に対する安定性とペニシリン結合蛋白質への親和性

野村和秀・土肥正善・吉田 正
塩野義製薬株式会社研究所*

S-1108 は、プロドラッグ型の新規経口セフェム系抗生物質である。S-1108 は、腸管からの吸収後、抗菌活性体である S-1006 へと脱エステル化される。S-1006 は、cefuroxime 以外の各種グラム陰性菌の産生する cephalosporinase に対して親和性は高かったが、水解速度 (V_{max}) は小さく有意な加水分解は認められなかった。一方、penicillinase に対しては、*Klebsiella oxytoca* の酵素及び OXA-1 型の酵素によって水解が認められたが、調べた限り他の酵素には親和性は低く、安定であった。

S-1006 は、*Escherichia coli* K12 のペニシリン結合蛋白質(PBP)-3 に高い親和性を有し、PBP-1a, -1b, -2 にも親和性が認められた。また S-1006 は、*Staphylococcus aureus* ATCC25923 の PBP-1, -2, -3 に対しても $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以下の IC_{50} 値を示し、この値は、MIC 値とはほぼ相関していた。

key words : S-1108, S-1006, β -lactamase, penicillin-binding protein,
[^{14}C] penicillin G

S-1108 はプロドラッグ型の経口用セファロスポリン剤であり、経口投与後腸管から吸収される際に腸管壁エステラーゼによって脱エステル化され、生体内では S-1006 として抗菌活性を発揮する。活性体である S-1006 は一部菌種のグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対して広範囲な優れた抗菌活性を示す。この抗菌活性を解明する目的で、各種 β -lactamase 及びペニシリン結合蛋白質への親和性を調べたので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

S-1006 は、塩野義製薬研究所で合成されたものを使用した。cephaloridine(CER), cefaclor (CCL) は、塩野義製薬、cefotiam (CTM) は、武田薬品工業、cefixime (CFIX) は、藤沢薬品工業、penicillin G (PCG) は、明治製薬より購入した。cefteram (CFTM) は、富山薬品工業より購入したものを脱エステル化して用いた。[^{14}C] penicillin G ([^{14}C] PCG) は、Amersham International Ltd. の製品を使用した。その他の試薬は、市販の特級グレードのものを使用した。

2. 菌株

Klebsiella pneumoniae GN69 は、千葉大学微生物

物薬品化学教室より、*Enterobacter cloacae* 214, *Klebsiella oxytoca* SR537, *Escherichia coli* W3110 (RTEM) は、M. H. Richmond (マンチェスター大学、英国) より分与された。その他の菌株は、塩野義製薬研究所で保存されているものを使用した。

3. グラム陰性菌の β -lactamase 標品の調製
誘導型 β -lactamase である *Proteus vulgaris* SR 31 の酵素及び OXA-1 型を含むその他の非誘導型 β -lactamase は、carboxymethyl-セファデックス C-50 カラムクロマトグラフィーによって、部分精製した¹⁾。Rプラスミド由来の TEM-1 型 β -lactamase は、DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーによって、部分精製した。

4. β -lactamase 活性の測定

活性は、 β -lactam 環の開裂に伴う吸光度の減少を spectrophotometric assay によって測定し、加水分解速度を求めた²⁾。最大加水分解速度 (V_{max})、解離定数 (K_m) 及び阻害定数 (K_i) は、Lineweaver-Burk プロットから算出した³⁾。測定法は、2 ml の基質溶液に 0.2 ml の酵素溶液を加えて反応を開始して、30°C に保温した条件下で、日立ダブルビーム分光光度計 200-20 と付属の日立 200 型卓上記録計で吸光度の減少を記録し、加水分解速度を算出した。 K_i

*〒553 大阪市福島区鷺州 5 丁目12番 4 号

の測定には、阻害剤と基質の混合液 2 ml に、0.2 ml の酵素液を加えて反応させ、上述の方法により見かけの K_m を求めた。この見かけの K_m を阻害剤濃度に対してプロットし、グラフ上で K_i を求めた。

5. *E. coli* 及び *Staphylococcus aureus* のペニシリン結合蛋白質 (PBP) に対する薬剤の結合親和性の測定

1) 膜画分の調製: *E. coli* K12 の場合は、1.5 l の L-broth (pH 7.2) に、同培地で一夜増殖させた菌液 100 ml を加え、37°C で 4.5 時間振とう培養した。菌体を 4°C で 4,500 xg, 10 分間の遠心により集め、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 1 回洗浄し、100 ml の 2 mM $MgCl_2$ を含む同じ緩衝液に懸濁して、水冷下で 4 分間超音波破碎した。4,500 xg, 15 分間の遠心で、未破碎の菌体を除いてから、上清を 100,000 xg, 30 分間の超遠心にかけて、沈澱を得、更に 2 回洗浄して膜画分を得た。これを、10 mM $MgCl_2$ を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して、蛋白濃度を 20 mg/ml に調製後、使用するまで -78°C に保存した。なお蛋白濃度は、牛血清アルブミンを標準にして lowry 法で測定した⁴⁾。

S. aureus ATCC 25923 の場合は、L-broth (pH 7.4) で 37°C、一夜培養した菌液 50 ml を 950 ml の同培地に加え、37°C で 3.5 時間振とう培養 (220 rpm) した。

菌体を 4,500 xg, 10 分間の遠心により集め、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) で洗浄後、10 mM $MgCl_2$ を含む同緩衝液に懸濁し、リゾスタフィン (Sigma) を最終濃度 20 μ g/ml になるように加えて、30°C、10 分間処理して溶菌させた。これを更に水冷下 6 分間超音波処理し、低速遠心により未破碎の菌を除いた上清から、*E. coli* の場合と同様に超遠心法に依って膜画分を集め保存した。

2) 親和性の測定: 50 μ l の膜画分 (10 mg 蛋白/ml) と 5 μ l の被検薬剤液を 30°C で 10 分間ブレインキュベート後、5 μ l の [¹⁴C] PCG (1.85 MBq/ml) を加えて、更に 10 分間インキュベートを続けた。5 μ l の 10% Sarkosyl を含む 60 mg/ml PCG を加え、室温に 30 分間放置して膜タンパク質を可溶化し、30,000 xg, 30 分間の遠心により不溶性画分を除いた。

ペニシリン結合タンパク質 (PBP) は、Spratt の方法に従って、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、フルオログラフィーで検出した⁵⁾。また [¹⁴C] PCG の各 PBP への結合を 50% 阻害するの

に必要な薬剤濃度 (IC_{50}) は、フルオログラムをデンストメトリックスキャニングで比色定量して求めた。

II. 結 果

1. β -lactamase に対する安定性

Table 1 に各種グラム陰性菌由来の β -lactamase に対する β -lactam 剤の安定性を示した。

S-1006 は、多くの cephalosporinase に対しては、安定であったが、*P. vulgaris* および *Bacteroides fragilis* の酵素には、CER のそれぞれ 13%、4.2% の V_{max} を示した。一方 penicillinase に対しては、*K. oxytoca* の酵素及び OXA-1 型の酵素によって水解が観察されたが、その程度は、対照に用いた薬剤と同じ程度かそれ以下であった。

次に β -lactamase に対する親和性を示した (Table 2)。

S-1006 は、cephalosporinase に対しては、*P. vulgaris* と *B. fragilis* の酵素を除いて非常に高い親和性を示した。cephalosporinase とは対照的に、penicillinase に対しては S-1006 の親和性は低く、CCL や CFIX と同程度であった。

2. PBP に対する親和性

E. coli K12 の PBP に対する S-1006 の親和性を CCL 及び CTM と比較した (Table 3, Fig. 1, 2, 3)。

S-1006 は、*E. coli* の PBP-3 に 0.025 μ g/ml 以下の IC_{50} 値と高い親和性を示した。PBP-1a, -1b にもそれぞれ約 1 μ g/ml の IC_{50} 値であった。また PBP-2 には対照薬剤よりも高い親和性を示した。

Fig. 4, 5, 6, 7 に *S. aureus* ATCC 25923 の PBP に対する S-1006 及び対照薬剤の親和性を調べたフルオログラムを示した。

S-1006 は、*S. aureus* ATCC 25923 の PBP-1, -2, -3 に対して 0.2 μ g/ml 以下の IC_{50} 値を示した (Table 4)。また、PBP-4 に対しては、他の薬剤と同様に 25 μ g/ml まで親和性を示さなかった。CTM については、S-1006 とほぼ同様の阻害パターンを示した。CCL, CFTM は、S-1006, CTM に比べて PBP-2 に対する親和性が低かった。

III. 考 察

S-1108 の脱エステル体であり、抗菌活性体である S-1006 の抗菌作用機作の解明を目的として実験を行った。S-1006 は、*K. oxytoca* の酵素及び OXA-1 型酵素以外の penicillinase に対して V_{max} 値は十

Table 1. Stability of S-1006 to β -lactamases

Source of β -lactamase ^{a)}	Substrate specificity ^{b)}	Relative Vmax ^{c)}					
		S-1006	cephaloridine	cefteram	cefixime	cefaclor	cefotiam
<i>E. coli</i> SR6	C	<0.01 ^{d)}	100	0.065	0.045 ^{d)}	43	58
<i>E. cloacae</i> 214	C	<0.001 ^{d)}	100	0.017	0.0097 ^{d)}	21	8.9
<i>C. freundii</i> SR19	C	<0.001 ^{d)}	100	0.011	0.0031 ^{d)}	9.2	1.6
<i>P. aeruginosa</i> SR24-12	C	0.0046 ^{d)}	100	0.41	0.045	31	6.2
<i>P. vulgaris</i> SR31	C	13	100	95	5.0	800	200
<i>B. fragilis</i> V-283	C	4.2	100	- ^{e)}	12	33	- ^{e)}
<i>K. pneumoniae</i> GN69	P	0.031 ^{f)}	100	0.31 ^{f)}	<0.01 ^{f)}	8.0	9.8
<i>K. oxytoca</i> SR537	P	0.23	100	7.1	0.081	7.1	0.66
<i>E. coli</i> W3110 (RTEM) (TEM-1)	P	0.020 ^{f)}	100	0.16 ^{f)}	0.019 ^{f)}	22	20
<i>E. coli</i> ML1410 (RGN238)(OXA-1)	P	2.1	100	53	8.7	68	3.5

- a) Enzymes were partially purified, except in the case of *B. fragilis* V-283, in which the sonic extract was used.
 b) C and P stand for cephalosporinase and penicillinase, respectively.
 c) Hydrolysis rates were determined by spectrophotometric assay at 30°C. Vmax are relative to an arbitrary value of 100 for cephaloridine.
 d) The hydrolysis rate of the test compound at a concentration of 100 μ M was determined and value relative to the Vmax of cephaloridine was calculated.
 e) Not determined.
 f) Relative hydrolysis rates of test compounds and cephaloridine at a concentrations of 100 μ M were determined and relative values were calculated.

Table 2. Affinity of S-1006 for β -lactamases

Source of β -lactamase ^{a)}	Substrate specificity ^{b)}	Km (Ki) ^{c)} , μ M					
		S-1006	cephaloridine	cefteram	cefixime	cefaclor	cefotiam
<i>E. coli</i> SR6	C	(0.012)	750	4.9	(0.053)	47	410
<i>E. cloacae</i> 214	C	(0.0020)	670	1.8	(0.063)	100	110
<i>C. freundii</i> SR19	C	(0.0036)	1,200	1.5	(0.039)	210	32
<i>P. aeruginosa</i> SR24-12	C	(0.025)	690	13	1.2	230	90
<i>P. vulgaris</i> SR31	C	170	170	710	380	1,200	610
<i>B. fragilis</i> V-283	C	20	420	- ^{d)}	78	65	- ^{d)}
<i>K. pneumoniae</i> GN69	P	(920)	190	(6,000)	(1,300)	350	410
<i>K. oxytoca</i> SR537	P	120	190	1,500	390	360	22
<i>E. coli</i> W3110 (RTEM) (TEM-1)	P	(1,100)	790	(3,200)	(1,800)	1,600	2,100
<i>E. coli</i> ML1410 (RGN238)(OXA-1)	P	250	270	100	950	1,100	11

- a) Enzymes were partially purified, except in the case of *B. fragilis* V-283, in which the sonic extract was used.
 b) C and P stand for cephalosporinase and penicillinase, respectively.
 c) Values in parentheses are inhibition constants.
 d) Not determined.

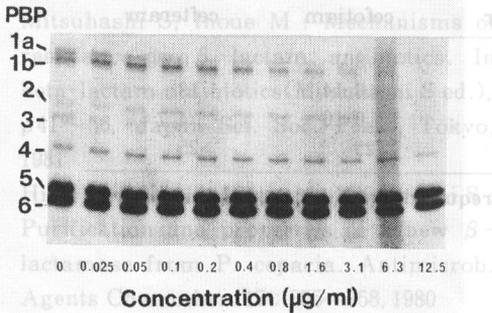
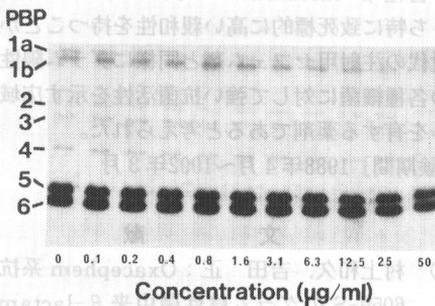
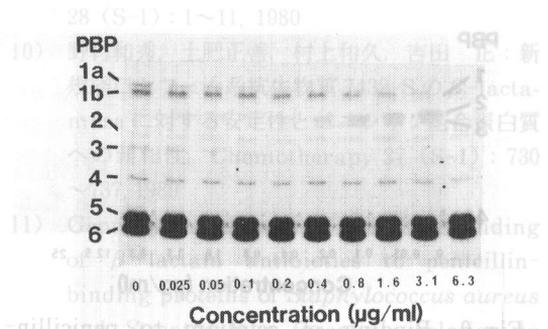
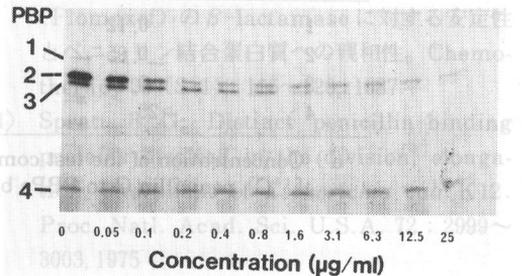
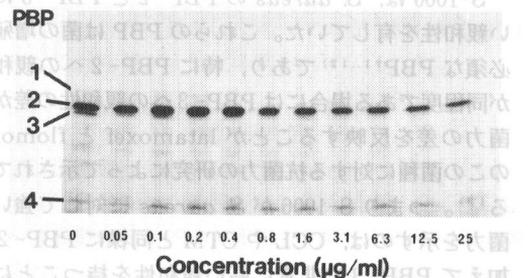
分に小さく、親和性も低かったのでこれらの酵素には非常に安定であると考えられた。事実、S-1006はABPC耐性の*E. coli*や β -lactamaseを産生する*S. aureus*に対しても、 β -lactamase非産生菌と同等の殺菌効果を示した⁶⁾。しかしながら代表的なグラム陰性菌の産生するcephalosporinaseに対しては、S-1006のVmax値は極めて小さいが、親和性が高い

ので、比較的加水分解を受け易いと考えられた。このことは、代表的な誘導型cephalosporinase産生菌である*S. marcescens*、*M. morgani*の臨床分離株の一部にS-1006の抗菌力が弱いことと相関していた⁶⁾。*P. vulgaris*や*B. fragilis*の産生する染色体性の β -lactamaseは、三橋らの分類によればcefuroximase^{7, 8)}でありoxyiminocephalosporinに対

Table 3. Affinity of S-1006 for penicillin-binding proteins of *E. coli* K12

PBPs	IC ₅₀ ^{a)} (μ g/ml)		
	S-1006	cefaclor	cefotiam
1a	0.15	1.15	0.043
1bs	1.05	12.5	1.5
2	2.3	>50	>6.3
3	<0.025	1.7	0.07
4	12.5	0.87	6.3
5	>12.5	>50	>6.3
6	>12.5	>50	>6.3

a) Concentration of the test compound required to inhibit the binding of [¹⁴C] penicillin G to PBPs by 50%.

Fig. 1. Binding of S-1006 to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12.Fig. 2. Binding of cefaclor to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12.Fig. 3. Binding of cefotiam to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12.Fig. 4. Binding of S-1006 to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* ATCC25923.Fig. 5. Binding of cefaclor to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

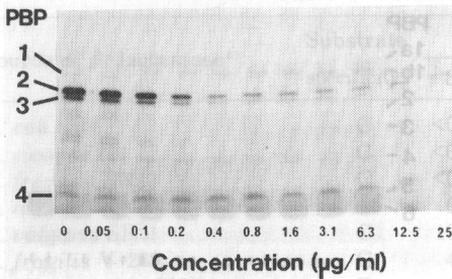


Fig. 6. Binding of cefotiam to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

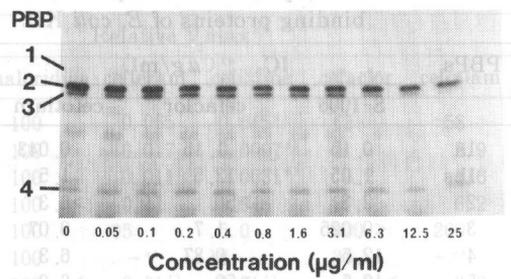


Fig. 7. Binding of ceftoram to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Table 4. Affinity of S-1006 for penicillin-binding proteins of *S. aureus* ATCC 25923

PBPs	IC ₅₀ ^{a)} (µg/ml)			
	S-1006	ceftacor	cefotiam	ceftoram
1	0.12	0.15	0.1	0.09
2	0.05	3.13	0.14	13
3	0.18	<0.05	0.16	4.7
4	>25	>25	>25	>25

a) Concentration of the test compound required to inhibit the binding of [¹⁴C] penicillin G to PBPs by 50%.

して活性が高い⁹⁾ことが報告されている。S-1006は、ceftizoximeやcefepodoximeのように7α位にmethoxyimino基を持たないにも拘らずこの酵素には加水分解を受けた。S-1006と同類の7位側鎖を持つceftibutenもこの酵素に水解された¹⁰⁾ことを考えると、cefuroximaseは7位側鎖全体を認識していると考えられた。

S-1006は、*S. aureus*のPBP-2とPBP-3に高い親和性を有していた。これらのPBPは菌の増殖に必要なPBP^{11, 12)}であり、特にPBP-2への親和性が同程度である場合にはPBP-3への親和性の差が抗菌力の差を反映することがlatamoxefとflomoxefのこの菌種に対する抗菌力の研究によって示されている¹³⁾。つまりS-1006が*S. aureus*に対して強い抗菌力を示すのは、CCLやCTMと同様にPBP-2に加えてPBP-3に非常に高い親和性を持つことによると考えられた。

またS-1006は*E. coli*の隔壁形成を担うPBP-3¹⁴⁾及びペプチドグリカン架橋形成酵素PBP-1a、

1b¹⁵⁾、桿菌としての形態維持に必須のPBP-2¹⁵⁾に高い親和性を有していた。S-1006を*E. coli*に作用させたとき菌が伸長、スフェロプラスト化を経て溶菌へと導かれることが位相差顕微鏡による形態変化の観察で報告されている⁶⁾が、この結果と各PBPに対するS-1006のIC₅₀値とは相関がみられた。以上S-1006は、各種β-lactamaseに対する高い安定性とPBPのうち特に致死標的に高い親和性を持つことから、第四世代の注射用セフェム剤と同様にグラム陽性及び陰性の各種細菌に対して強い抗菌活性を示す広域スペクトルを有する薬剤であると考えられた。

[試験期間] 1988年4月～1992年3月

文 献

- 1) 村上和久, 吉田 正: Oxacephem系抗生物質一部に6059-Sのグラム陰性菌由来β-lactamaseに対する安定性とその抗菌活性に及ぼす影響。Chemotherapy 28 (S-7): 132～138, 1980
- 2) Jasson J A T: A direct spectrometric assay

- for penicillin β -lactamase (penicillinase). Biochim. Biophys. Acta 99 : 171~172, 1965
- 3) Lineweaver H, Burk D: The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56 : 658~666, 1934
 - 4) 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
 - 5) Spratt B G : Properties of penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. 72 : 341~352, 1977
 - 6) 小松良英, 永田 弘, 元川清司, 亀田康雄, 野村和秀, 東山伊佐夫, 土肥正善, 吉田 正 : 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 41 (S-1) : 77~93, 1993
 - 7) Mitsuhashi S, Inoue M : Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In beta-lactam antibiotics (Mitsuhashi S ed.), p41~56, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1981
 - 8) Hirai K, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S : Purification and properties of a new β -lactamase from *P. cepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 17 : 355~358, 1980
 - 9) 益吉真次, 新井 進, 三橋進 : 新しいセファロスポリン cefotaxime の抗菌作用および β -lactamase にたいする態度。Chemotherapy 28 (S-1) : 1~11, 1980
 - 10) 野村和秀, 土肥正善, 村上和久, 吉田 正 : 新規経口セフェム系抗生物質 7432-S の β -lactamase に対する安定性とペニシリン結合蛋白質への親和性。Chemotherapy 37 (S-1) : 730~737, 1989
 - 11) Georgopapadakou N H, Liu F Y: Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* : relation to antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 18 : 834~836, 1980
 - 12) Curtis N A C, Hayes M V: A mutant of *Staphylococcus aureus* H deficient in penicillin-binding protein 1 is viable. FEMS Microbiol. Lett. 10 : 227~229, 1981
 - 13) 村上和久, 土肥正善, 野村和秀, 中本省三, 吉田 正 : Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の β -lactamase に対する安定性とペニシリン結合蛋白質への親和性。Chemotherapy 35 (S-1) : 115~120, 1987
 - 14) Spratt B G: Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 2999~3003, 1975
 - 15) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫 : ペニシリン結合蛋白質 - 理論と実際 -。Chemotherapy 27 : 827~840, 1979

S-1108, a new oral cephem antibiotic :
stability against β -lactamases and affinity for penicillin-binding proteins

Kazuhide Nomura, Masayoshi Doi and Tadashi Yoshida
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

S-1108 is an oral cephem antibiotic of the prodrug-type. S-1108 is de-esterified to an active form, S-1006, after being absorbed from the intestine. S-1006 showed high affinity for various cephalosporinases produced by gram-negative bacteria, except the enzyme of cefuroxime, but V_{max} values remained very small. S-1006 was hydrolyzed by penicillinases of both the *Klebsiella oxytoca* and OXA-1 type, but S-1006 showed very low affinity against the enzymes of other the gram-negative bacteria tested, so it was very stable against them.

S-1006 exhibited high affinity for the penicillin-binding protein(PBP)-3 of *Escherichia coli* K12 as well as affinity for PBP -1a, -1b and -2. In the case of affinity for the PBPs of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, S-1006 showed IC_{50} values of less than $0.2 \mu\text{g/ml}$ for PBPs-1, -2 and -3. This value correlated with the MIC value.