

双極イオン構造を持つセフェム系薬の class C 型 β -ラクタマーゼ 産生緑膿菌に対する作用

井田 孝志¹⁾・蔵園 瑞代¹⁾・平野 文也¹⁾・井上 松久²⁾

¹⁾ 明治製菓株式会社薬品総合研究所*

²⁾ 北里大学医学部微生物

(平成 10 年 8 月 19 日受付・平成 10 年 10 月 30 日受理)

Cefepime (CFPM) をはじめとした双極イオン構造を有するセフェム系薬 (ceftazidime (CAZ) と比較検討した。class C 型 β -ラクタマーゼ非産生株や低度産生株に対する抗菌力は CZOP と CAZ がやや優れ、次いで CFPM, CPR の順であった。一方, class C 型 β -ラクタマーゼ高度産生株に対しては, いずれの薬剤も酵素産生量が高い株ほど MIC の上昇が認められたが, その上昇率は CFPM でもっとも低かった。class C 型 β -ラクタマーゼ高度産生株から抽出・精製した酵素を用いて各薬剤の阻害定数 (K_i 値) を測定したところ, CFPM がもっとも大きく, 次いで CZOP, CPR, CAZ の順であった。各薬剤の class C 型 β -ラクタマーゼ誘導能を測定したところ, 薬剤による大きな差は認められず, いずれの薬剤も 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の作用濃度で産生誘導が認められた。また, 耐性変異株の選択頻度は CFPM でもっとも低く, さきの K_i 値が小さな薬剤ほど耐性株が選択される頻度が高くなる傾向にあった。

Key words: cefepime, 緑膿菌, class C 型 β -ラクタマーゼ

双極イオン構造を持つ cefpirome, cefepime, ceftazidime はブドウ球菌から緑膿菌に至る広い抗菌スペクトルを示すことから“第 4 世代”のセフェム系薬と位置づけられている¹⁾。緑膿菌に対する *in vitro* 抗菌力は第 3 世代セフェム系薬の ceftazidime のそれとほぼ同等であり, 有効な抗菌薬に乏しい緑膿菌感染症にも重要な治療薬の 1 つとして用いられている。これらの薬剤はその化学構造的特徴から緑膿菌の外膜を比較的速やかに透過し, かつ, 染色体性の class C 型 β -ラクタマーゼによる加水分解を受けにくいという共通の性質を持っている²⁾。しかし, これらの性質は定性的, もしくは他の系統のセフェム系薬との比較試験から得られた知見であるため, これらの薬剤の間にもどの程度の作用の強弱が存在し, それが抗菌作用としてどのような意義を持つのかほとんど理解されていない。そこでわれわれはまずはじめに緑膿菌が産生する class C 型 β -ラクタマーゼに対する酵素学的検討を行い, 各薬剤の特徴を明らかにすると共にその意義についても考察した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

実験には *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAO4089 ならびに *P. aeruginosa* GN10362³⁾ とその class C 型 β -ラクタマーゼ高度産生変異株 (*P.*

aeruginosa GN10362 CR, *P. aeruginosa* GN10362 AR) を使用した。*P. aeruginosa* PAO4089 は β -ラクタム系薬に感受性化した class C 型 β -ラクタマーゼ非産生の変異株である⁴⁾。また, *P. aeruginosa* GN10362 CR ならびに *P. aeruginosa* GN10362 AR は *P. aeruginosa* GN10362 から ceftazidime (CAZ, 田辺製薬); 4 $\mu\text{g/ml}$ 含有寒天平板または aztreonam (AZT, エーザイ) 16 $\mu\text{g/ml}$ 含有寒天平板でそれぞれ選択した耐性変異株で, cephalothine (CET, 明治製薬) を基質とした際のこれらの class C 型 β -ラクタマーゼ活性はそれぞれ 0.18, 0.88 unit/mg protein であった。

2. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

力価の明らかな市販の cefepime (CFPM, プリストルマイヤーズスクイブ), cefpirome (CPR, 塩野義製薬), ceftazidime (CAZ, 武田薬品工業), ceftazidime (CAZ) を用いて MIC を測定した。MIC の測定は NCCLS の勧告⁵⁾ に準じて寒天平板希釈法により測定した。薬剤は滅菌蒸留水を用いて溶解・希釈し, 所定の濃度を含む希釈系列を感性感性ディスク用培地-N (SDA; 日水製薬) で作製した。被験菌は感受性測定用ブイヨン (STB; 日水製薬) の一夜培養液を buffered saline with gelatin (BSG) で希釈し, ミクロプランター (佐久間製作所)

で 10^4 CFU/spot となるように薬剤寒天平板に接種した。これを 35°C , 18 時間培養した後, MIC を判定した。

3. class C 型 β -ラクタマーゼ活性の測定

Antibiotic Medium 3 (Difco) 4.5 ml に被験菌株の一夜培養液を 0.5 ml 接種し, 37°C , 4 時間振盪培養した。これを 7,000 rpm で 20 分間遠心分離し, 菌体を集めたものを 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。これを遠心分離により上清を取り除いた後, 同リン酸緩衝液 1 ml に懸濁した。これを超音波破碎後, 12,000 rpm で 30 分間遠心した上清を粗酵素液とした。酵素活性は $100 \mu\text{M}$ の CET を基質に UV 法 (262 nm) で測定し, 1 分間に $1 \mu\text{M}$ の CET を分解する活性を 1 unit ($\Delta \epsilon$ 7.66) とし, 粗酵素液の蛋白量当たりの比活性 (unit/mg protein) で示した。

4. class C 型 β -ラクタマーゼ阻害定数 (K_i 値) の測定

既報⁶⁾に従い *P. aeruginosa* GN10362 AR から class C 型 β -ラクタマーゼを抽出・精製した。 K_i 値は被験薬剤存在下で CET の加水分解速度を測定し, Lineweaver-Burk plot から最小二乗法により算出した。

5. class C 型 β -ラクタマーゼ誘導能の測定

Antibiotic Medium 3 (Difco) 4.5 ml に *P. aeruginosa* GN10362 の一夜培養液を 0.5 ml 接種し, 37°C で 2 時間振盪培養した。これに前述の各薬剤ならびに対照の imipenem (IPM, 萬有製薬) を最終濃度で 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え, さらに 2 時間振盪培養した。粗酵素液の抽出, 酵素活性の測定は前述の通り実施した。

6. 自然耐性変異株の選択頻度

P. aeruginosa GN10362 の各種薬剤に対する耐性変異株の選択頻度を測定した。*P. aeruginosa* GN10362 を STB; 10 ml に接種し, 35°C , 4 時間振盪培養した。これを BSG で 10 倍希釈し, 各希釈菌液の 0.1 ml を MIC の 4 倍 (4 MIC) もしくは 8 倍 (8 MIC) の濃度を含む薬剤寒天平板に塗抹した。これを 35°C , 40 時間培養し, 各薬剤濃度で発育した集落 (変異株) の数をカウントした。さらにこれらの変異株の耐性を確認す

るため, 発育した変異株の中から無作為に選択した 20 株について同濃度の薬剤が含まれる寒天平板に塗抹培養し, 発育の有無をみた。自然耐性変異株の選択頻度は以下の式により算出した。

$$\text{耐性変異株選択頻度} = A/B \times C/D$$

A; 薬剤寒天平板に発育した集落数

B; 薬剤寒天平板に塗抹した親株の菌数

C; 下記 D で選んだ株のうち, 同濃度の薬剤寒天平板に再度発育した株数

D; A より無作為に選んだ 20 株

ただし, A において集落数が 20 未満の場合, D の被験株数はその最大数とする。

II. 結 果

1. 抗菌力

Table 1 に各菌株に対する CFPM, CZOP, CPR, CAZ の MIC を示した。class C 型 β -ラクタマーゼ非産生株である *P. aeruginosa* PAO4089 と野生株である *P. aeruginosa* PAO1 ならびに *P. aeruginosa* GN10362 に対する MIC は CZOP がもっとも低く, 以下 CAZ, CFPM, CPR の順であった。一方, class C 型 β -ラクタマーゼ高度産生株である *P. aeruginosa* GN10362 CR, *P. aeruginosa* GN10362 AR に対する MIC はいずれの薬剤も酵素産生量が高い変異株ほど高かった。しかし, Fig. 1 に示した通り, class C 型 β -ラクタマーゼの量的影響を受ける程度は薬剤によって異なっており, CAZ では *P. aeruginosa* GN10362 と *P. aeruginosa* GN10362 AR に対する MIC の比が 64 倍であったのに対し, CPR, CZOP では 32 倍, CFPM では 16 倍であった。

2. class C 型 β -ラクタマーゼ阻害定数

Table 2 に *P. aeruginosa* GN10362 AR から抽出・精製した酵素に対する CET 加水分解の阻害定数 (K_i 値) を示した。CFPM の K_i 値は CAZ, CPR の約 4 倍, CZOP の約 2 倍であり, 緑膿菌の産生する class C 型 β -ラクタマーゼへの結合親和性が低いことが明らかとなった。

3. class C 型 β -ラクタマーゼ誘導能

Fig. 2 に各薬剤を 2 時間作用させたときの *P. aeruginosa* GN10362 における class C 型 β -ラクタマーゼの

Table 1. Antibacterial activities of cefepime, cefpirome, ceftazidime and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* strains produced various levels of class C β -lactamase

Organism	Enzyme activity ^{a)} (unit/mg protein)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		cefepime	cefpirome	ceftazidime	ceftazidime
<i>P. aeruginosa</i> PAO4089	ND	1	1	0.25	0.5
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.01	1	2	0.5	1
<i>P. aeruginosa</i> GN10362	0.02	2	2	1	1
<i>P. aeruginosa</i> GN10362 CR	0.18	16	32	16	32
<i>P. aeruginosa</i> GN10362 AR	0.88	32	64	32	64

^{a)} 1 unit $1 \mu\text{mol}$ of cephalotone hydrolyzed per min at 30°C and pH 7.0

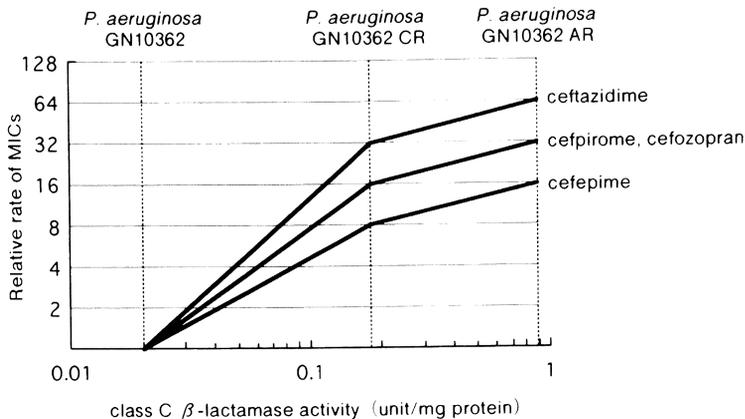


Fig. 1. Relationship between decrease of susceptibility and class C β -lactamase activity.

Table 2. Inhibitory kinetic parameters of various antibiotics against class C β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* GN1032 AR

Antibiotics	K_i (μ M) ^{a)}
Cefepime	174.8 \pm 13.6
Ceftiofime	48.7 \pm 9.8
Cefprozil	77.0 \pm 3.5
Ceftazidime	44.5 \pm 7.8

^{a)} avg \pm SD of several experiments

Table 3. Frequency of drug resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa* GN10362

Antibiotics	MIC ^{a)} (μ g/ml)	Mutational frequency with drug at:	
		4 MIC	8 MIC
Cefepime	2	2.6×10^{-7}	$< 7.1 \times 10^{-8}$
Ceftiofime	2	1.4×10^{-7}	6.5×10^{-7}
Cefprozil	1	1.6×10^{-6}	7.1×10^{-6}
Ceftazidime	1	1.4×10^{-6}	9.2×10^{-7}

^{a)} MICs of antibiotics against *P.aeruginosa* GN10362

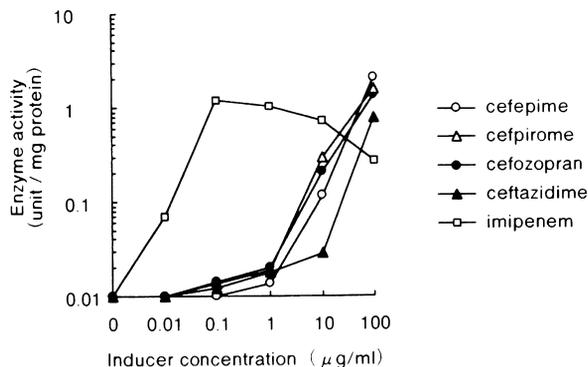


Fig. 2. Induction of class C β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* GN10362.

量的変動を活性で示した。CFPM, CZOP, CPR はいずれも 10 μ g/ml 以上の濃度で酵素量が数十倍から数百倍に上昇していた。CAZ では 10 μ g/ml 作用時における酵素量の上昇は 3 倍であり、CFPM, CZOP, CPR に比較して誘導能は低かった。しかし、CAZ の 100 μ g/ml 作用時には酵素量が 78 倍に上昇していた。IPM は 0.1 μ g/ml 作用時に誘導のピークが認められ、他の薬剤とは異なる class C 型 β -ラクタマーゼ誘導能を示していた。

4. 自然耐性変異株の選択頻度

Table 3 に *P. aeruginosa* GN10362 における耐性変異株の選択頻度を示した。4 MIC で選択した場合、CZOP, CPR, CAZ ではおおむね 10^{-6} の頻度で耐性変

異株が選択されたが、CFPM での選択頻度は約 10^{-7} であり他剤に比べ 10 倍程度低かった。8 MIC で選択した場合、CPR と CAZ では 10^{-7} , CZOP では 10^{-9} の頻度で耐性変異株が選択されたが、CFPR では耐性変異株は選択されなかった。

III. 考 察

緑膿菌の β -ラクタム系薬に対する耐性機構には、染色体性 class C 型 β -ラクタマーゼの構成的産生⁷⁾、プラスミドもしくはトランスポゾンに関連した class A 型⁸⁾, B 型⁹⁾, D 型¹⁰⁾ β -ラクタマーゼ産生能の獲得、さらに外膜透過孔の欠損¹¹⁾ や多剤排出蛋白¹²⁾ による薬剤蓄積量の減少などが知られている。現在、CAZ に耐性を示す臨床分離緑膿菌は約 20% と報告されているが¹³⁾、これらの多くは class C 型 β -ラクタマーゼの高度産生株と言われている⁷⁾。今回、CFPM をはじめとしたいわゆる第 4 世代セフェム系薬の緑膿菌に対する抗菌活性を比較するのに class C 型 β -ラクタマーゼに注目した理由の 1 つは、このような第 3 世代セフェム系薬耐性菌が無視できないまでに増加したためである。

緑膿菌の β -ラクタマーゼの影響がない状態での薬剤の抗菌力を「基礎抗菌力」と考えた場合、それは class C 型 β -ラクタマーゼ産生能を欠く *P. aeruginosa* PAO4089 に対する抗菌力を測定することによっておおむね把握することができる。その結果、CZOP の MIC がもっとも低く、次いで CAZ, CFPM, CPR の順であった。今回、この基礎抗菌力の差については検討して

いないが、おそらく外膜透過性や PBP 結合親和性が薬剤により若干異なるためではないかと考えられる。臨床から分離される緑膿菌の多くは class C 型 β -ラクタマーゼをわずかに産生する *P. aeruginosa* PAO1 や *P. aeruginosa* GN10362 のような株であるが、このような株に対しても CZOP は優れた抗菌力を示すが、CFPM との抗菌力の差は *P. aeruginosa* PAO4089 における差に比べて縮まる傾向にあった。

一方、class C 型 β -ラクタマーゼ高度産生株に対する各薬剤の抗菌力をみたところ、いずれの薬剤も酵素産生量が多い株ほど高い MIC を示していた。しかし、その MIC の上昇率は薬剤によって異なっており、CAZ の MIC が 64 倍上昇した場合に CPR、CZOP の上昇率は 32 倍、CFPM の上昇率は 16 倍であった (Fig. 1)。Livermore¹⁴ は β -ラクタマーゼ産生量の異なる臨床分離緑膿菌について CAZ と CFPM の MIC を比較したところ、酵素の増加に伴う MIC の上昇は CFPM よりも CAZ で顕著であったと報告している。また、蔵園ら¹⁵ は本邦で分離された緑膿菌 50 株について CAZ と CFPM の感受性相関をみたところ、感受性菌では CAZ の抗菌力がやや優れ、耐性菌では逆に CFPM の抗菌力が優れているという結果を示している。これらの報告はいずれも臨床分離株を材料に得られた結果であるが、今回われわれが実験的に作製した変異株を用いた試験においても同様の結果が得られており、CFPM は CAZ 耐性を示す class C 型 β -ラクタマーゼ産生緑膿菌に対してもある程度の抗菌力を示すことが明らかになった。また、今回の結果からさらに CFPM が CZOP や CPR に比べても MIC の上昇率が低かったことから、これらの薬剤の中でもっとも class C 型 β -ラクタマーゼの影響を受けにくいことが示唆された。 β -ラクタマーゼの酵素反応の中でも MIC に大きな影響をおよぼす要因の一つに酵素と薬剤の結合親和性の問題がある¹⁶。そこで実際に CFPM の K_i 値を他剤と比較したところ、本剤の結合親和性は他剤の 1/2~1/4 であり、このことが class C 型 β -ラクタマーゼを高度産生株に対する CFPM の MIC の上昇率が低い理由と考えられた。

耐性菌の増加が問題となっている昨今、抗菌剤の特徴は「耐性菌の選択」という面からも評価されなければならない。外来耐性遺伝子の獲得を除き緑膿菌のセフェム系薬への耐性化は class C 型 β -ラクタマーゼの量的変化によるものであり、その原因には薬剤による酵素の誘導とその産生量を制御している遺伝子の変異の 2 つが考えられている。前者については今回の検討結果から CFPM、CPR、CZOP の 3 剤において顕著な違いは認められず、いずれの薬剤も高濃度で作用させなければ class C 型 β -ラクタマーゼの誘導は認められなかった。しかし、後者について検討したところ、耐性変異株が選択される頻度は薬剤によって異なり、そ

の頻度は CFPM でもっとも低かった。Fung-Tomec ら¹⁷ は緑膿菌における CFPM の耐性変異株の選択頻度が CAZ などに比べて低いのは CFPM に耐性を獲得するには第 2, 第 3 の変異が必要なのではないかと考察している。今回われわれが得た結果は彼等の知見とおおむね一致していたが、CFPM と CAZ の耐性変異株の選択頻度の差が 10~100 倍と小さかったこと、さらに得られた変異株は耐性度の差はあるものの CFPM と CAZ の間で交叉耐性 (データ未発表) が認められたことから、CFPM 耐性変異株の選択頻度が低い理由を 2 段階の変異で説明するにはさらに検討が必要であると考えられた。このように薬剤によって耐性変異株の選択頻度が異なる詳細な理由はいまだ明らかにされていないが、class C 型 β -ラクタマーゼへの結合親和性が低い薬剤ほど耐性変異株の選択頻度が低いことから酵素への結合親和性が重要な要因の 1 つであることは間違いないと思われる。

今回、われわれは第 4 世代セフェム系薬について有効性と耐性菌の選択の両面から検討し、薬剤はそれぞれ異なる特徴を有することを明らかにした。このことは抗菌薬の適正使用を考える上で重要な意味を持っているものと思われる。しかし、はじめに述べた通り、緑膿菌の β -ラクタム系薬耐性化には class C 型以外の β -ラクタマーゼや薬剤の排出なども問題になりつつある。これらの耐性因子と抗菌薬の相互作用については今後の課題であるが、これらの問題を解決することにより、より適切な抗菌薬を用いることができると思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、実験ならびに論文執筆にご助力を賜りました明治製菓 (株) 薬品総合研究所の村瀬えるみ氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Jones N R, Baquero F, Privitera G, et al.: Inducible β -lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. Clin. Microbiol. Infect. 3: S7~S20, 1997
- 2) Nikaido H, Liu W, Rosenberg E Y: Outer membrane permeability and β -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporinase containing methoxyimino substituents. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 337~342, 1990
- 3) Murata T, Minami S, Yasuda K, et al.: Purification and properties of cephalosporinase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antibiotics 34: 1164~1170, 1981
- 4) Matsumoto H, Terawaki Y: Chromosomal location of the genes participating in the formation of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. in Drug Resistance in Bacteria (Mitsuhashi S ed.), p. 207~211, Japan Scientific Societies press, Tokyo, 1982
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial sus-

- ceptibility testing for bacteria that grow aerobically, 2nd ed. Approved standard. NCCLS document M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villa nova, Pa. 1993
- 6) Tajima M, Takenouchi Y, Sugawara S, et al.: Purification and properties of chromosomally mediated β -lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391. *J. Gen. Microbiol.* 121: 449~456, 1980
 - 7) Williams R J, Livermore M A, Lindridge A A, et al.: Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 17: 283~293, 1984
 - 8) Mugnier P, Dubrous P, Casin I, et al.: A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2488~2493, 1996
 - 9) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 147~151, 1991
 - 10) Danel F, Hall L M C, Gur D, et al.: OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1881~1884, 1995
 - 11) Buscher K H, Cullman W, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 703~708, 1987
 - 12) Masuda N, Sakagawa E, et al.: Outer membrane protein responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 645~649, 1995
 - 13) 長野 馨, 木村美司, 東山伊佐夫, 他: 種々の臨床分離株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。その2 1994年度分離グラム陰性菌について。日化療会誌 44: 610~625, 1996
 - 14) Livermore D M: β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microb. Rev.* 8: 557~584, 1995
 - 15) 蔵園瑞代, 川畑敏枝, 村瀬えるみ, 他: Imipenem/cilastatin 耐性緑膿菌に対する cefepime の有効性。日化療会誌 43: 1036~1040, 1995
 - 16) Watanabe N, Hiruma R, Katsu K: Comparative in-vitro activities of newer cephalosporine cefclidin, cefepime and cefpirome against ceftazidime-or imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 633~641, 1992
 - 17) Fung-Tomc J, Huczko E, Pearce, M, et al.: Frequency of in vitro resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefepime, ceftazidime and cefotaxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1443~1445, 1988

Antibacterial activity of dipolar ionic cephalosporins against class C β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

Takashi Ida¹⁾, Mizuyo Kurazono¹⁾, Fumiya Hirano¹⁾
and Matsuhisa Inoue²⁾

¹⁾ Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Japan

²⁾ Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

In vitro antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* producing various levels of chromosomal class C β -lactamase were studied with dipolar ionic cephalosporins of cefepime (CFPM), cefpirome (CPR) and ceftazidime (CAZ) in comparison with ceftazidime (CAZ). The activities of CZOP and CAZ against non-or low-class C β -lactamase-producing *P. aeruginosa* were superior to those of the other two agents. The MIC values against *P. aeruginosa* of high level production of class C β -lactamase increased with CPR, CZOP and CAZ, however, CFPM was relatively less affected with increased β -lactamase production. The effects of these antibacterials on the potentiation of class C β -lactamase production were tested, and the activities of induction of these agents were found to be lower than of imipenem. Furthermore the affinity of CFPM to the purified class C β -lactamase was the lowest of all the agents tested. CFPM also showed no selection of drug-resistant mutants at $\times 8$ MIC, whereas, the drug-resistant mutants could be isolated at $\times 8$ MIC of CPR, CZOP or CAZ.