

## Fosfomycin の抗菌作用機構の解明に関する最近の知見

鶴岡 勉

明治製菓株式会社学術一部\*

(平成 10 年 12 月 14 日受付・平成 10 年 12 月 28 日受理)

Fosfomycin [FOM; (-)-(1R, 2S)-(1,2-エポキシプロピル) ホスホン酸] は、1969 年に論文として発表されて以来、世界の多くの国々で長い間臨床で使われている抗菌薬で、これまで類薬は見出されていない。日本では 1970 年代はじめに開発が始められ、1980 年に承認されて本格的な使用が開始された。最近、ホスホマイシンに関する基礎と臨床に関して数多くの報告がされている。その背景の 1 つとして、新しい経口薬ホスホマイシントロメタミン (fosfomycin tromethamine) のあいつぐ欧米での承認が考えられる。一方では、FOM がその生合成を阻害する、細菌の細胞壁ペプチドグリカンに関する新しい知見が、急速に集積している。この総説では、ホスホマイシンの抗菌作用機構についての最近の研究成果を中心に、抗菌特性や耐性など、本薬に関するトピックスを概説した。

**Key words:** fosfomycin, 作用機構, 抗菌特性, 耐性

1996 年 5 月の岡山県久保町ではじまった、一連の腸管出血性大腸菌感染症 (O 157 感染症) の集団発生事件は、社会に大きな衝撃を与えた<sup>1)</sup>。翌年以後、集団発生事例は減少したものの散発事例が続発している。これらの事件は多くの人々に対して、細菌感染症が依然として医療の大きな課題であるとの再認識をさせることとなった。

ところで、O 157 感染症の治療の多くの事例には、fosfomycin [FOM; (-)-(1R, 2S)-(1,2-エポキシプロピル) ホスホン酸] が投薬された<sup>2,3)</sup>。また、急遽出された厚生省の O 157 感染症の治療指針では、本薬は使用しうる経口薬として例示されている<sup>4,5)</sup>。さらに 1996 年の集団発生事例に対する事後調査で、O 157 感染症に対する本薬の初期投与による有用性が示唆されている<sup>6)</sup>。

一方、近年、FOM の新しい経口薬ホスホマイシントロメタミン (fosfomycin tromethamine) が、単純性尿路感染症を主な治療対象として、欧州諸国を中心に開発され発売となっている。また、当初、FOM の開発を断念したアメリカ合衆国でも、この新しい経口薬が 1997 年 4 月に発売となっている。以上のことは再び FOM に目を向かせる契機ともなった。

FOM は、1969 年に Hendlin らによって *Streptomyces fradiae* などの産生する抗菌抗生物質として発表された<sup>7)</sup>。本薬は低分子でありながら、その化学構造に安定なエポキシ環と CP 結合という 2 つの特徴をもつ (Fig. 1)。FOM は発表されて以来、1998 年の今年ではほぼ 30 年になるが、この間全世界の多くの国々で臨床開発され長い間使用され続けている。日本では 1970 年代はじめに開発が開始された後、1980 年に製造が承認され、それまでのスペインなどに引き続き、

本格的に臨床で使用されはじめた。以来、18 年となるが、Ca 塩が経口用、Na 塩が注射用と点耳用として使われている。化学構造のみでなく作用機構やそれにもとづく数々の特性をもつ FOM の類薬はこれまで見いだされておらず、本薬は数多くの抗菌薬の中で独自の地位を保ち続けている。

ところで、FOM の抗菌作用機構は、発見当初に Kahan ら<sup>8)</sup>によって、その基本的な部分が明らかにされている。その後も継続的に研究が続いているが、ここ数年来、FOM とその標的酵素との結合がより詳細に明らかにされ、その結合した結晶構造のデータが、1997 年 9 月に公表されるに至っている。このように FOM に関する研究が、初めて発表のあった時期に引き続き現在第 2 のピークを迎えている。近年、FOM がその生合成を阻害する、細菌の細胞壁ペプチドグリカン (bacterial cell wall peptidoglycan) に関する研究も、大きな進展を見せている<sup>9,10)</sup>。

FOM に関してこれまで多くの総説が書かれているが<sup>11~17)</sup>、本稿では、まず本薬の抗菌特性を述べた後、作用機構を中心に最近の研究成果、さらには本薬に対する耐性についてまとめ、またホスホマイシントロメタミンについて概説する。

### I. FOM の抗菌特性

FOM は、*Staphylococcus aureus* をはじめとするグラム陽性菌と *Escherichia coli* や *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性菌の両方に抗菌力をもつ、広範囲抗菌スペクトルを示す抗菌薬である<sup>18,19)</sup>。本薬は強い溶菌活性を示し殺菌的に作用する<sup>8,18)</sup>。一方では、FOM の抗菌力は培地の成分や好気・嫌気の影響される。

培地の成分の中で抗菌力の測定値に影響を与える物質

として、リン酸、NaCl、グルコース、グルコース 6-リン酸 (G 6 P) (Table 1), そしてサイクリック AMP (cAMP) が知られている<sup>18-22</sup>。日本化学療法学会標準法で定められている Mueller-Hinton 培地を用いると、FOM の抗菌力を低く評価する機会が多いが<sup>19,20</sup>, その理由の 1 つは、培地に添加されているリン酸やグルコースが、本薬に対する細菌の感受性を低下させるためと考えられている。一方、cAMP や一定の濃度範囲の G 6 P は感受性を増強する。ここで、G 6 P は FOM と必ずしも同時に存在する必要がなく、細菌に事前に接触させることで感受性は増強する。また、FOM に対する感受性は、通常感受性測定が行われる好気状態と比べて、嫌気状態で増強する<sup>22,23</sup> (Table 1)。NaCl は細菌の感受性を増強する場合<sup>17</sup>と感受性を低下させる場合<sup>20</sup>がある。

FOM の抗菌力測定法は、FOM MIC 測定小委員会法として、日本化学療法学会標準法とは別に定められている<sup>19</sup>。その理由として、以上に述べた培地成分の影響の他に、*in vitro* に元々存在し選択により容易に出現する FOM 特有の耐性菌の存在がある<sup>21</sup>。

FOM MIC 小委員会法では、少ない接種菌量を用い、判定用培地として Difco 製の nutrient agar が使われる。これは結果に干渉する元々存在する以上の耐性菌を極力排除して、また、耐性菌の増殖を抑制するためである。小委員会法は手間の問題はあっても、臨床での本格的な使用がはじまって以来、一定の評価を得続けている。一方、欧米では日本と事情が違うこともあり、G 6 P を加えた培地やペーパーディスクを用いて、FOM に対する細菌の感受性を測定している<sup>24-26</sup>。

以上に述べた FOM の特殊性は、その作用機構にある。

## II. ペプチドグリカン

FOM はペプチドグリカン生合成を阻害するが、そのペプチドグリカンは細胞壁の主成分であって、細菌の成長、分裂そして形態形成に対して重要な機能をもつ細菌に必須の構造物である (Fig. 2)。このものは、細胞質

膜 (cytoplasmic membrane) の外側に位置し、グラム陽性菌ではこの外側にタイコイン酸などが重層している。グラム陰性菌では細胞質膜の外側にある外膜 (outer membrane) との間のペリプラズム (periplasm) という空間にある。グラム陰性菌である *E. coli* のペプチドグリカンは、*N*-アセチルグルコサミン-*N*-アセチルムラミン酸-*L*-アラニン-*D*-グルタミン酸-*m*-ジアミノピメリン酸-*D*-アラニン-*D*-アラニン (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*m*-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala) を基本単位として、糖である GlcNAc-MurNAc が重合してできた縦糸と、末端のアミノ酸の *D*-Ala がはずれ、1 つ手前の *D*-Ala が隣の縦糸の *m*-A<sub>2</sub>pm と結合してできたシート状の網目構造を形成している (Fig. 2)。FOM は、このペプチドグリカンの生合成の第 1 段階を阻害する。

この生合成の制御に関して、*E. coli* を主な対象として、詳細な研究がなされつつある。その中心にあるのは、1,6-アンヒドロ-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*m*-A<sub>2</sub>pm[1,6-anhydro-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*m*-A<sub>2</sub>pm; anhMurNAc-トリペプチド (anhMurNAc-tripeptide)] の機能の解明である<sup>27,28</sup>。細菌の成長に伴って既にあるペプチドグリカんに、新しく合成されたペプチドグリカンのユニット GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*m*-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala が組み込みこまれる過程で、GlcNAc-anhMurNAc-トリペプチドが分解物として生成する<sup>27</sup>。

ペリプラズムで生成した本物質は、細胞質膜上の輸送系 AmpG を介して細胞質内に輸送された後、細胞質内で GlcNAc がはずれて anhMurNAc-トリペプチドとなる<sup>9</sup>。この anhMurNAc というタグをつけられたトリペプチドは、細胞質内でペプチダーゼによる分解を受けることがない。anhMurNAc を切り離す AmpD (アンヒドロ-*N*-アセチルムラミル-*L*-アラニンアミダーゼ) により、トリペプチド L-Ala-D-Glu-*m*-A<sub>2</sub>pm が遊離する<sup>29</sup>。このものは、リガーゼにより UDP-MurNAc に

Table 1. Effects of glucose 6-phosphate (G 6 P) and anaerobic conditions on the sensitivity of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 to fosfomycin in Mycin assay agar<sup>22</sup>

Fosfomycin (μg/ml)	G 6 P <sup>b</sup>	Inhibitory diameter (mm) <sup>a</sup>		
		aerobic	anaerobic box	GasPak jar
100	-	15.0	24.6	34.4
50	-	10.6	22.2	29.0
10	-	0	11.8	19.6
5	-	0	0	15.8
100	+	18.8	27.4	34.8
50	+	16.9	24.4	30.0
10	+	0	14.5	20.8
5	+	0	11.0	17.8

<sup>a</sup> Paper disc assay, <sup>b</sup> G 6 P, 100 μg/ml

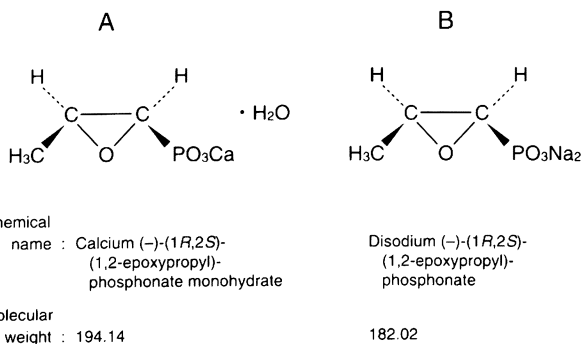


Fig. 1. Fosfomycin. Two kinds of salts are used in clinical practice in Japan. (A) Calcium salt for oral administration. (B) Disodium salt for injection and otic use.

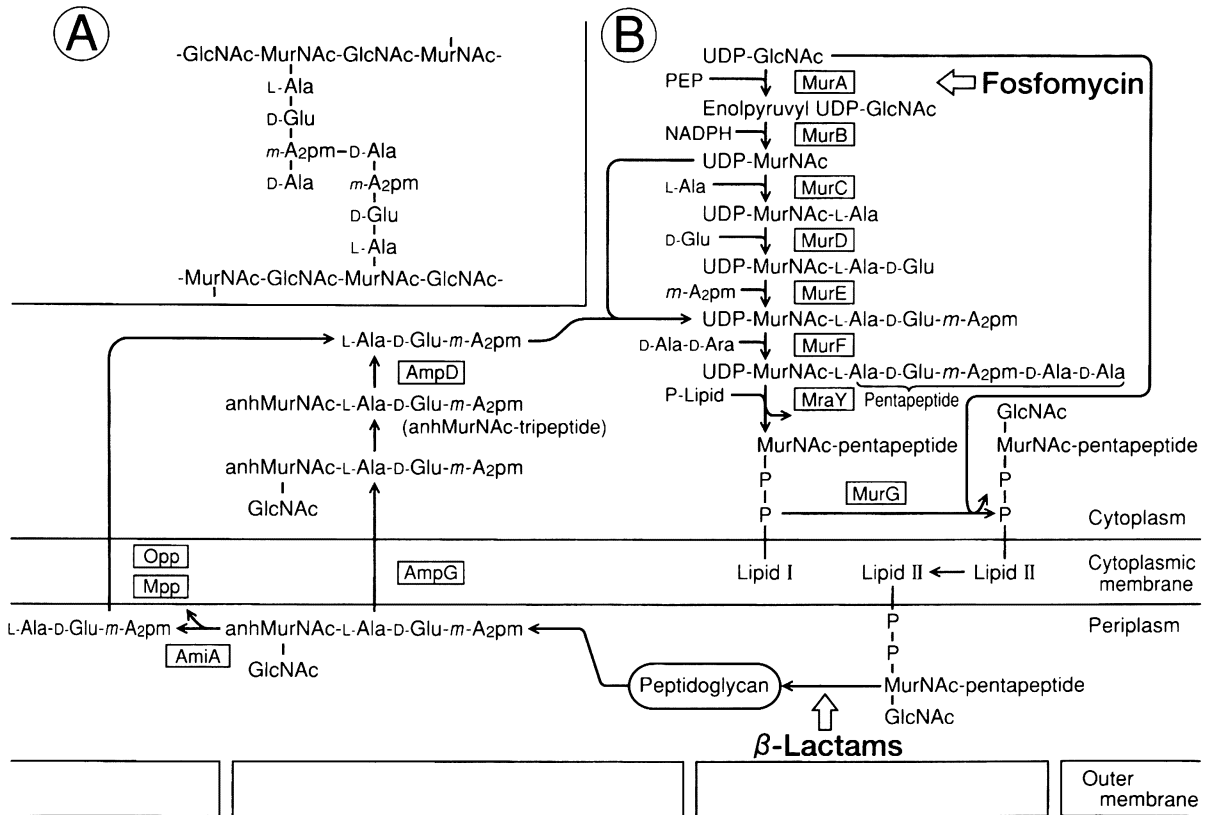


Fig. 2. Synthesis of bacterial cell wall peptidoglycan and inhibition by antibiotics. (A) Basic structure of peptidoglycan. (B) Peptidoglycan synthesis pathway, peptidoglycan recycling and sites at which fosfomycin and  $\beta$ -lactams inhibit the synthesis of peptidoglycan. (Based on Höltje, J-V, 1998<sup>9)</sup> and Nanninga N, 1998<sup>10)</sup>)

結合して<sup>30)</sup>, ペプチドグリカン生合成経路でリサイクルされる (peptidoglycan recycling)<sup>27,28)</sup>。以上のトリペプチドはペリプラズムでも生成し, 特定のペプチド輸送系 (Opp や Mpp) を介して細胞質内へ取り込まれリサイクルされる<sup>9,31,32)</sup>。細菌の増殖の1世代で, 合成されたトリペプチド全体の40%または50%がリサイクルされる<sup>28,31)</sup>。

anhMurNAc-トリペプチドは, 染色体に本来存在する *ampC* 産物である  $\beta$ -ラクタマーゼを誘導する活性をもつことが明らかとなっている<sup>28,29,33)</sup>。  $\beta$ -ラクタム薬を作用させた時, 細胞質内濃度が高まり  $\beta$ -ラクタマーゼ産生が起きることから, 近年, 細菌でのシグナル伝達物質としての位置づけがなされている<sup>34,35)</sup>。さらに, *Citrobacter freundii* や *P. aeruginosa* を含めた, グラム陰性菌の *ampC* を構造遺伝子とするクラスC  $\beta$ -ラクタマーゼの誘導についても, 同様な誘導機構が想定されている<sup>36)</sup>。

これまで, FOM は, その作用部位がペプチドグリカン生合成の最初の段階であることで, 最終段階を阻害する  $\beta$ -ラクタム薬 ( $\beta$ -lactams) と対比されてきている<sup>37)</sup>。  $\beta$ -ラクタム薬は, ペニシリン結合タンパク質 (PBP) に結合しそのトランスペプチダーゼ活性を阻害する<sup>38,39)</sup>。このPBPの酵素活性に対する  $\beta$ -ラクタム薬の阻害の

結果, anhMurNAc-トリペプチドの生成が促進される<sup>35,40~42)</sup>。 anhMurNAc-トリペプチドの量の増加の結果, 細胞質内での  $\beta$ -ラクタマーゼが誘導され,  $\beta$ -ラクタム薬の分解と言う細菌の防御的な反応が起きる<sup>35)</sup>。

細胞壁合成阻害薬は, 作用部位の違いでトリペプチド L-Ala-D-Glu-m-A2pm のリサイクルされるサイクルの外で阻害を示す FOM や cycloserine のグループと, そのサイクルの中に阻害部位のある  $\beta$ -ラクタム薬や vancomycin などのリポドサイクルで作用する抗菌薬のグループに, 区別して考える必要があるかも知れない。

### III. 作用部位への接近

FOM が細菌細胞質内にある作用部位に到達するためには, *E. coli* などグラム陰性菌の場合, まず外膜を通過する必要がある (Fig. 3)。外膜の物質透過孔であるポーリンを通過し得る分子の大きさとして, これまで中性の糖分子<sup>43)</sup>や種々の  $\beta$ -ラクタム薬<sup>44)</sup>の透過測定から, 分子量138の本薬の外膜の通過は容易であろう。

外膜の内側にある巨大分子であるペプチドグリカンは, 柔軟性がある<sup>45)</sup>に加え, 水分子と会合しており, このことによりペリプラズムはゲルの状態であると考えられている<sup>46,47)</sup>。一方, ペプチドグリカンの網目の大きさは, 最大で2~5 nm と計算されており, その結果を含め分子量50,000~55,000 Daの球状物質は通過し得

ると考えられている<sup>46,48</sup>。FOMはおそらくこの空間を濃度勾配にしたがって単純に拡散する。

ペリプラズムを通過したFOMは、細胞質膜にある2つの輸送系を介して、細胞質内に能動的に取り込まれる<sup>8,49</sup>。1つの系は、sn-グリセロール3-リン酸(G3P)を特異的に輸送するG3P輸送系(GlpT系)[G3P transport system(GlpT system)]で、G3Pの誘導で産生されるタンパク質GlpTが輸送担体である<sup>50,51</sup>。G3P輸送系には、これとは別に、細胞質内への輸送にさきだつて、ペリプラズムで特定の結合蛋白質と結合する必要のあるUgp系<sup>52</sup>が報告されている。GlpT系は、炭水化物とリン酸の化合物であるG3Pの炭水化物部分利用を主目的とした輸送系で、Ugp系は、G3Pのリン酸の部分を主に利用する輸送系として考えられている。FOMの輸送に関して、Ugp系との関連はこれまで知られておらず、GlpT系のみで説明されている。

GlpT系は、*glp* レギュロンの制御のもとにあることが知られている<sup>51</sup>。このレギュロンの中の*glpR*の産生するリプレッサー(repressor)による抑制を解除し、輸送担体であるタンパク質GlpTを産生するには、誘導物質G3PとcAMPが必要とされる。このcAMP形成には、グルコースなどの一連の炭水化物を輸送するホスホエノールピルビン酸(PEP):シュガーホスホトランスフェラーゼ系(phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system; PTS system)の酵素I(Enzyme I)とアデニル酸シクラーゼ(adenylate cyclase)が必要とされる<sup>53</sup>。一方、GlpTを産生する活性は、嫌気状態で好気状態に比べて増加する<sup>54</sup>。このことから嫌気状態では、GlpT系の活性が通常より昂進し、FOMの細胞質内への輸送促進が予想される。嫌気状態でのFOMの抗菌力増強作用の説明の1つになるかも知れない。

もう1つの系は、主にグルコース6-リン酸(G6P)などを輸送する糖リン酸輸送系(sugar phosphate transport system; UhpT system)<sup>55-57</sup>で、この系の作動には、G6Pによる細菌細胞の外側からの誘導が必須である<sup>58</sup>。*In vitro*での通常の実験に用いられる培地には、誘導に有効な量のG6Pは含まれていないためこの系は閉じており、特にG6Pを加えない場合のFOMの細胞質内への輸送は、Glp系を介してのみ行われている。

これまで述べてきたGlpT系とUhpT系は、*E. coli*で詳細に研究されており、細菌細胞質内リン酸濃度調節を行う、リン酸にリンクしたアニオン交換系(Pi-linked anion-exchange system)の一部として位置づけられている<sup>59</sup>。GlpT系は、細胞質内リン酸の細胞質外への輸送との交換反応で、細胞質外G3Pを細胞質内へ取り込むアンチポート輸送系である。培地のリン酸がFOMの抗菌力を減ずる理由は、このアンチポート輸送系の交換反応を低下させるためと考えられる。

ところで、FOMと細菌の接する場で、UhpT系を誘

導するのに有効なG6Pの量が存在するかについての検討例として、ヒト血清中に誘導に有効な4 $\mu$ g/mlのG6Pが検出されるとの報告がある<sup>60</sup>。また、O157感染症の場合、腸管内には出血による血清と血球によるG6Pの関与<sup>8,19,60</sup>が想定されるが、FOMの生体内での抗菌力増強を説明するためには、今後のより一層の検討が必要とされる。その際には、細菌感染部位局所での濃度の考察が必要とされよう。

これまで、GlpT系とUhpT系は、多くの菌種に分布していることが知られている<sup>59</sup>。実際に、FOMの細菌細胞質内への取り込み量は、*E. coli*で細胞外液の7倍(以上)と測定され(Table 2)<sup>49</sup>、また、*Salmonella typhimurium*で15倍以上<sup>8</sup>であることが知られている。これらの細胞質内に入ったFOMが標的酵素と反応する。

#### IV. 標的酵素への攻撃

ペプチドグリカン生合成の第1段階は、PEPのC-2とUDP-GlcNAcのC-3'の間にエーテル結合が生成する特殊な反応である。FOMは、この反応を触媒するUDP-GlcNAcエノールピルビルトランスフェラーゼ(UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase; MurA)を不可逆的に失活する<sup>8</sup>(Figs. 2, 3)。生物のPEPの関与する代謝で、エーテル結合の生成する別の反応としては、5-エノールピルビルシキミ酸3-リン酸シクターゼ(EPSPシクターゼ)の関与する反応が知られている<sup>8,61,62</sup>。EPSPシクターゼは、微生物と植物に存在するシキミ酸経路の中の1つの酵素として知られているが、FOMはこの酵素反応を阻害しない<sup>8</sup>。

PEPは解糖系の中心にあって、多くの重要な生体反応に関与する。しかしながら、PEPの関与する反応はこれまで述べた2つの例外を除いて、PEPのC-1のカルボキシル基の関与するエステル形成反応であって、FOMはこれらの反応を阻害しない<sup>8</sup>。以上のことがFOMの示す、ヒトと細菌の間での高い選択毒性の理由となっている。

*E. coli*のUDP-GlcNAcエノールピルビルトランスフェラーゼの産生遺伝子は、*E. coli*の染色体地図<sup>63</sup>の71.8分に位置し、*murA*<sup>64,65</sup>と命名された(Fig. 3)。*murA*

Table 2. Uptake of fosfomycin by *Escherichia coli* NIHJ JC-2<sup>64,49</sup>

Time (min)	Amount of fosfomycin in <i>Escherichia coli</i>	
	per bacterial cell pellet (mmol/kg)	per H <sub>2</sub> O of bacterial cell (mmol/kg)
0	0.00	0.00
5	0.36	0.61
10	1.0	1.7
20	2.4	4.1
40	4.0	6.8

\*Suspending medium: 1 mM fosfomycin



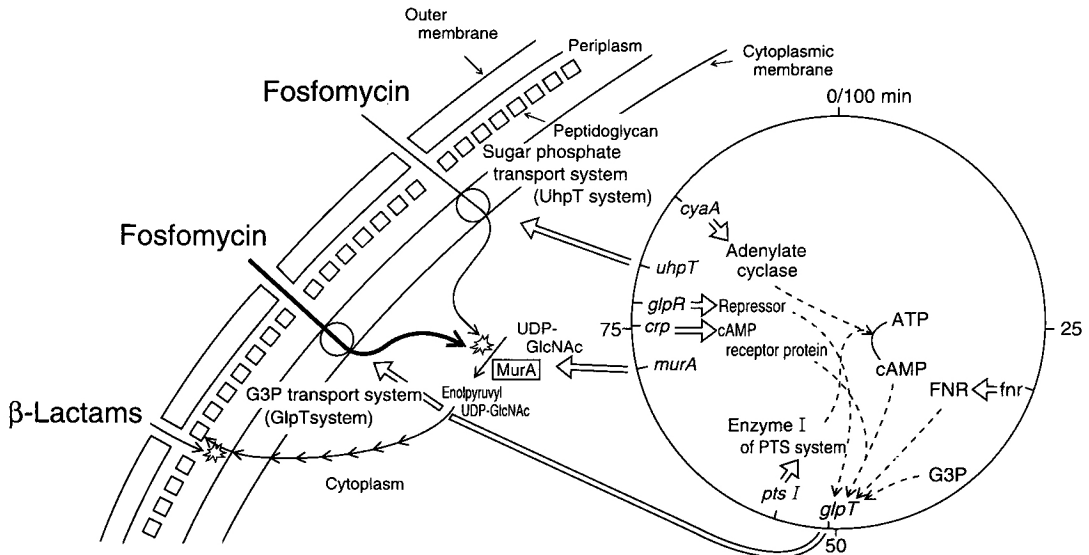


Fig. 3. Transport of fosfomycin to the target. Fosfomycin is transported by the *sn*-glycerol 3-phosphate (G 3 P) transport system (GlpT system) and the sugar phosphate transport system (UhpT system). The latter is usually closed but it opens in the presence of extracellular glucose 6-phosphate. Because the UhpT system has not been studied in as much detail as the GlpT system, concerning the transport of fosfomycin, only a basic outline is given in this figure.

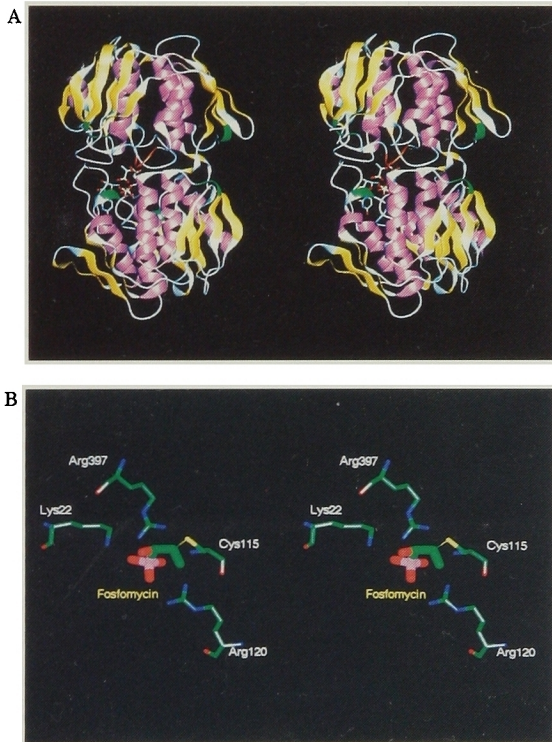


Fig. 4. Crystal structure of MurA-fosfomycin-UDP-GlcNAc complex (stereo representation). (A) Whole structure. The upper molecule in the deep cavity between two domains is fosfomycin bound to Cys 115, and the lower molecule is UDP-GlcNAc. (B) Fosfomycin in the catalytic site of MurA. [Prepared by Dr Takeuchi Y of Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., based on the protein data bank (PDB code: 1 UAE) published in September 1997]

は1,257-bpの読み取り枠をもち、これをもとに産生されるタンパク質の分子量は44,800 Daと計算される<sup>64)</sup>。また、*murA*と相同な遺伝子が、*Enterobacter cloacae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, そして *Acinetobacter calcoaceticus* に同定されている<sup>66)</sup>。

最近、*E. coli* より得られたUDP-GlcNAc エノールピルビルトランスフェラーゼ (MurA)-FOM-UDP-GlcNAc 複合体の結晶のX線構造解析の結果が報告され<sup>66)</sup>、その結晶構造のデータが、1997年9月に公表された (Fig. 4)。また一方、*E. cloacae* のMurA単独の結晶に関する結果が明らかとなった<sup>67,68)</sup>。両株由来のMurAに関してほぼ同様の知見が得られており、その構造は次のようにまとめられる。すなわち、MurAは、ペプチドのC末端とN末端を含むドメイン (domain) (Fig. 4 A の下の球状ドメイン) と、酵素活性に中心的な役割をもつ115番目のシステイン (Cys 115) を含むドメイン (Fig. 4 B の上の球状ドメイン) の2個の球状のタンパク質で構成される。ドメイン内の構造はほぼ同じで、それぞれ6個の $\alpha$ -ヘリックス構造と12個の $\beta$ -シート構造をもつ。

活性中心の形成については次のように考察されている<sup>68)</sup>。すなわち、基質であるUDP-GlcNAcが2個の球状のタンパク質の接続部付近に結合する。その結果、Cys 115を含むドメインがもう一方のドメインに接近し、全体の分子のコンホメーションが変化することで、ドメインの接続部に活性中心が形成される。こうして形成された活性中心で、もう一方の基質であるPEPが、Cys 115やその周辺アミノ酸の関与のもと、UDP-GlcNAcと結

合する。FOMの場合は、Cys 115に結合しMurAを失活させる。

MurAについての研究と平行して、EPSPの構造研究が進行している。PEPの関与する反応の中で特殊な反応を行う、本酵素の2つのドメインからなる構造や各ドメインの基本構成は、MurAときわめて類似している<sup>69-71</sup>。以上の2つの酵素の類似性は起源を考える上で興味深い。

FOMはPEPのアナログとして酵素を失活させる。FOMのこの阻害反応はPEPとの立体化学構造上の類似性によるものではないことが、以前から指摘されている<sup>8</sup>。FOMとPEPの活性中心での分子の状態について、エネルギー計算にもとづく理論的考察から、次のようにまとめられる<sup>66,72</sup> (Fig. 5)。

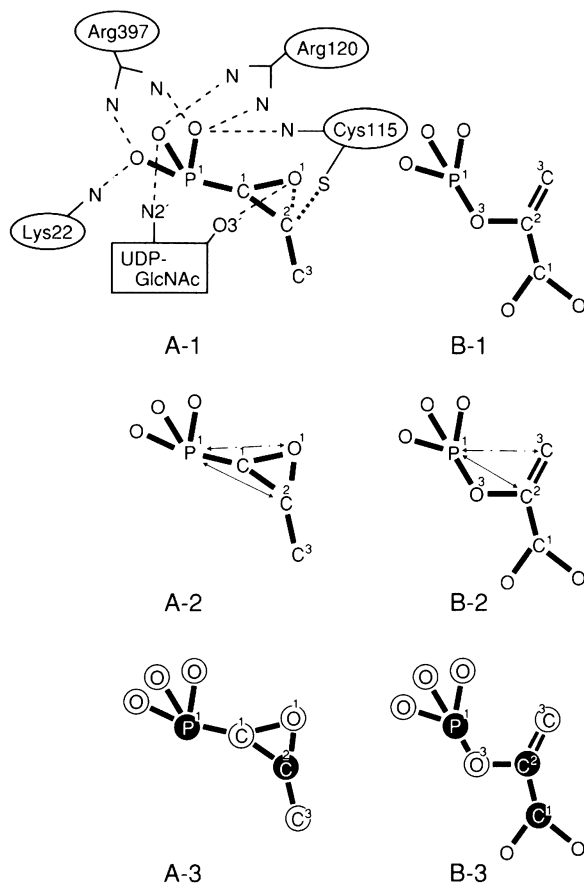


Fig. 5. Chemical structures of fosfomycin and phosphoenolpyruvate (PEP). Fosfomycin: A-1, A-2, A-3; PEP: B-1, B-2, B-3. Conceptual structure of fosfomycin and PEP in the catalytic site of MurA: A-1, B-1. Distances between the atoms: A-2, B-2. Net charge of each atom (black circle, positive; white circle, negative): A-3, B-3. In A-1, thin-broken lines show hydrogen bonds and thick-broken lines show the transition state which fosfomycin has been binding to Cys 115. The bond between O-1 and C-2 dissociates after binding of C-2 to S of Cys115. (Based on Smeyers Y G, et al., 1983<sup>72</sup> and Skarzynski T, et al., 1996<sup>66</sup>)

(1) 活性中心での配位は、両物質で良い一致を示す。すなわち、FOMのC-2~O-1, O-1~P-1, C-2~P-1の各原子間の距離と、PEPのC-2~C-3, C-3~P-1, C-2~P-1の各原子間それぞれの距離はほぼ同じである。

(2) 正味の電荷 (net charge) の分布は、FOMとPEPのC-2とP-1は陽性の状態、FOMのO-1とC-1, PEPのC-3とO-3, および両者のP-1に結合したOの電荷は陰性の状態であり、きわめて類似している。一方、FOMのC-3は陰性の状態であるのに対して、PEPのC-1は陽性の状態である。

以上のように、FOMとPEPは、酵素活性中心での分子の配位や正味の電荷の分布の状態から、MurAとの反応性においてきわめて類似していると考えられている<sup>8,66,72</sup>。その結果、FOMは標的酵素のCys 115のSH基とチオエーテル結合し<sup>8</sup>、PEPと酵素との反応を阻害する。

## V. FOMとPEPの違い

FOMのMurAへの結合は、Cys 115のSH基の求核性によるとされる<sup>73</sup> (Fig. 6の経路a)。このSH基の反応性により、本来の基質であるPEPが酵素活性中心で共有結合型ホスホラクチル-酵素付加物 (covalent phospholactyl-enzyme adduct) を形成すると考えられている (Fig. 6の経路b)。一方、Cys 115のSH基は、PEPのC-3にプロトンを供与する酸としての性質も想定されている。プロトンが供与された結果、PEPはUDP-GlcNAcと四面体型ケタール中間体 (tetrahedral ketal intermediate) を形成する。その後、リン酸の脱離が起こりエノールビルビルUDP-GlcNAcが生成する (Fig. 6の経路c)。この過程ではCys 115の塩基としての役割が予想されている。

エノールビルビルUDP-GlcNAc生成には、FOMの場合と異なり、PEPとMurAとの結合反応は必ずしも必須とは考えられていない<sup>73,74</sup>。それには*E. coli*のMurAのCys 115を他のアミノ酸に置換して行った検討結果が根拠となっている。すなわち、Cys 115の代わりにアスパラギン酸(Asp)にしても、同様のUDP-GlcNAcビルビルトランスフェラーゼ活性が得られるが、FOMによる失活は受けない。FOMは、*M. tuberculosis*に効果を示さないが、この細菌の酵素MurAの当該アミノ酸はAspである<sup>66,73</sup>。*E. coli*のMurAのCys 115をGluと置換した場合、きわめて低下しているものの活性はあるが、セリン(Ser)やAlaでは酵素活性はない。

## VI. FOM耐性

FOMに対する耐性菌の性質の研究は、開発の当初から感受性測定法の検討や作用機構の解明の一環として進められてきた (Fig. 7)。初期には、*E. coli*や*S. typhimurium*のホスホマイシン耐性菌として、*in vitro*で分離される株の解析から、(1) *murA*<sup>75</sup>, (2) *glpT*<sup>8,21,76</sup>, *glpR*<sup>76</sup>, *cyaA*<sup>76,77</sup>, *crp*<sup>76</sup>, *ptsI*<sup>21,77,78</sup>, そして(3) *uhp*<sup>57,76</sup>

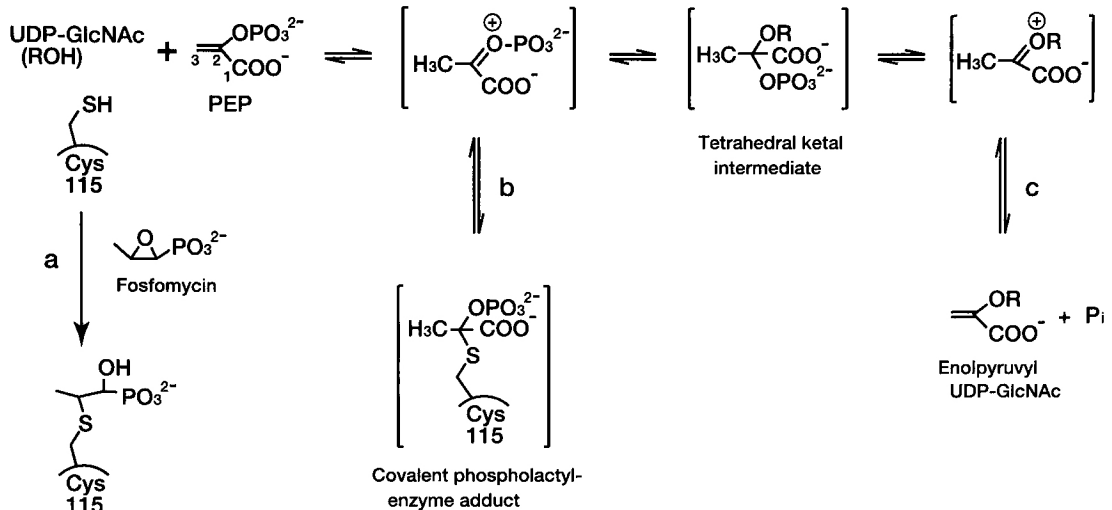


Fig. 6. Reaction pathway of UDP-GlcNAc pyruvyltransferase (MurA). (a) Fosfomycin inactivation. (b) Covalent phospholactyl-enzyme adduct formation. (c) Catalytic turnover by an addition-elimination mechanism. (From Kim D H, et al., 1996<sup>73)</sup>, modified)

の変異株が耐性株として同定された。(1)は標的酵素である MurA が変化して FOM による阻害の低下した株, (2)は GlpT 系が作動せず, FOM を細胞質内へ輸送しなくなった株, (3)は UhpT 系の作動しない株で, *glpT* 変異株をもとにした二重変異株, として分離されている<sup>57,76)</sup>。一方, FOM 耐性菌は他薬と交差耐性を示さないことが明らかになっている<sup>13)</sup>。

臨床で使用を開始して2~4年後の1975~1977年に, スペインの病院で分離された FOM 耐性 *Serratia marcescens* が調べられた結果, それらの株の一部では耐性が伝達性の多剤耐性プラスミド上にあることが判明した<sup>79)</sup>。その後の同研究グループでの報告によると, スペインの河川の汚水より分離された FOM 耐性の *Klebsiella oxytoca*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris*, そして *C. freundii* の耐性遺伝子が多剤耐性プラスミド上にあった<sup>80)</sup>。汚水から分離された *Pseudomonas*, *Staphylococcus xylosum* および *Bacillus* でも, プラスミドによる耐性株が見出されている<sup>81)</sup>。臨床分離株では, *A. calcoaceticus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *E. coli*, および *S. marcescens* でプラスミドの関与した FOM 耐性株が報告されているが, この耐性の伝播は, プラスミドによる耐性の *S. marcescens* の最初に見出された都市が中心であって, 他の都市では FOM 耐性をコードしたプラスミドを持つ菌はあまり広がっていなかった<sup>81)</sup>。

この *S. marcescens* をはじめとするグラム陰性菌に見出された FOM 耐性はプラスミド上の遺伝子 *fosA* によって起きる<sup>82,83)</sup>。*fosA* を *E. coli* で発現させ耐性化機構を解析したところ, 細胞質内で FOM が失活されることが明らかとなった<sup>84,85)</sup>。*fosA* は 16,000 Da のタンパク質を産生し, このタンパク質は 2 量体でグルタチオン S-

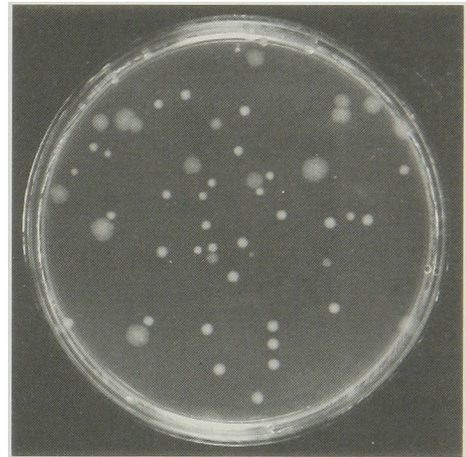


Fig. 7. Fosfomycin-resistant *Escherichia coli* B (*E. coli* B). Several types of fosfomycin-resistant cells frequently appeared *in vitro* when bacteria were cultured in medium containing fosfomycin. *E. coli* B was transferred repeatedly to fresh liquid culture media containing fosfomycin to concentrate resistant cells. These were then cultured in agar plates and two types of colonies were observed: the larger ones did not utilize *sn*-glycerol 3-phosphate (G 3 P) while the smaller ones did not use many carbohydrates including G 3 P.

トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase) の活性を示す<sup>86)</sup>。この酵素活性によりホスホマイシンの C-1 とグルタチオンのシステインの SH 基が共有結合する結果, FOM のエポキシ環が開裂して不活性化し抗菌力を失う<sup>86)</sup>。

臨床分離の *Staphylococcus epidermidis* の FOM 耐性株を調べたところ, この耐性遺伝子はプラスミド上にあったが, *fosA* とは異なる遺伝子 *fosB* であった<sup>87-89)</sup>。*fosB* のコードされたプラスミドをもつ *Staphylococcus*

属については、*S. epidermidis*に加えて、*S. aureus* など5菌種がフランスと日本の臨床分離株の中に見出されている<sup>88</sup>。産生されるタンパク質の計算から得られた分子量は16,345 Daであり、*fosA*の産生するタンパク質と48%の相同性を示して、同一の起源であることが示唆されている<sup>89</sup>。

日本における臨床分離の耐性菌についての検討では、*P. aeruginosa*<sup>90</sup>や*Klebsiella pneumoniae*<sup>91</sup>でFOM不活性化による耐性が報告されている。一方、FOMが薬剤排出系に関与することや、この系の昂進により本薬に耐性化することについてはこれまで報告されていない。日本の場合、臨床から分離される耐性菌の耐性機構は、GlpT系変異を中心とした輸送系の障害によるものが多いと思われるが<sup>92</sup>、今後の系統的な研究が必要とされる。ヨーロッパでの最近の報告でも、*fosA*や*fosB*のコードされた伝達性プラスミドによるFOM耐性は少ない<sup>83,93</sup>。

ところで、FOMを産生する*Pseudomonas syringae*の自己耐性の解析の結果、この菌株はFOMをリン酸化し抗菌力をなくす活性を示した<sup>94</sup>。この耐性を支配する遺伝子*fosC*は、約19,000 Daのタンパク質を産生する。このものはATPを使いFOMをリン酸化し不活性化するが、この不活性化FOMはアルカリホスファターゼで再活性化する<sup>94</sup>。

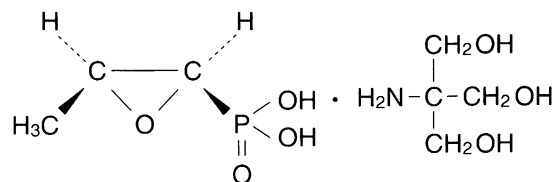
*fosA*をコードしたプラスミド保有FOM耐性菌は、非保有菌に比べてFOMを加えた後、溶菌しはじめる時期が遅れるが溶菌する<sup>95</sup>。このことから、FOMの場合には、薬剤耐性への不活性化機構の寄与の少ないことが指摘されている<sup>95</sup>。細菌の側から見て、細胞質内のグルタチオンを消費する不活性化機構に限界があるのかも知れない。

FOM耐性菌で実験動物における毒力(virulence)の低下が報告されている<sup>18,96-99</sup>。検討されたこれらのFOM耐性菌はGlpT系に傷害を有する株と考えられる。毒力の低下の理由として、GlpT系が正常に機能していない株は特定の条件下で増殖が抑制されるので<sup>96,100</sup>、生体内の嫌気環境下でFOM耐性菌が消失すると言う考え方があり<sup>96</sup>。また、一方ではG6PやcAMPがGlpT系に障害を有する株を強く感受性化することから<sup>21,77</sup>、生体内でこれらの物質が感受性化に有効な量存在するところでは、耐性菌がFOMに感受性化することも想像できる。

これまでの日本での事情を含めて、FOMに対する耐性は、使用されている国の多さと長い年月の割にはまだ進んでいない<sup>83,92,93,101,102</sup>。しかしながら、臨床と基礎の両面で、耐性菌に対する継続的な検討が必要とされる。

## VII. ホスホマイシントロメタミン

ホスホマイシントロメタミンは、1回の投与で治療を行うsingle-dose therapyを目的とした経口用のFOMのトロメタミン[トロメタモール(tromethamol)]塩で



Chemical name : (-)-(1*R*,2*S*)-(1,2-Epoxypropyl) phosphonic acid compound with 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (1:1)

Molecular weight : 259.20

Fig. 8. Fosfomycin tromethamine.

ある (Fig. 8)<sup>103</sup>。

本薬の開発や研究が単純性尿路感染症を主な対象に、イギリス<sup>104-107</sup>、ドイツ<sup>108</sup>、フランス<sup>109,110</sup>、オランダ<sup>111,112</sup>、ベルギー<sup>113,114</sup>、スウェーデン<sup>115</sup>、イタリア<sup>116-119</sup>、スペイン<sup>120</sup>、そしてアメリカ合衆国<sup>121</sup>などで行われ、これらの国々を含めた世界の多くの国々で開発が進み、また、あいついで発売されている。

ホスホマイシントロメタミンと、amoxicillin<sup>121</sup>、norfloxacin (NFLX)<sup>119</sup>、ofloxacin<sup>108</sup>、sulfamethoxazole・trimethoprim (ST; co-trimoxazole)<sup>108</sup>、そして trimethoprim<sup>104</sup>の1回投与との比較では、ホスホマイシントロメタミンは同等ないし優れた有用性を示した。ホスホマイシントロメタミン1回投与は、nitrofurantoin<sup>112</sup>、pipemidic acid 酸<sup>110,120</sup>、ST<sup>117</sup>、NFLX<sup>109,111,114,120</sup>、または amoxicillin/clavulanic acid<sup>105</sup>の1日複数回、複数日間投与との比較試験で、程度の差はあれ同等の有用性が各臨床試験で検証されている。ホスホマイシントロメタミンの使用は医療経済の面で有益であると、イタリア<sup>122</sup>やフランス<sup>123</sup>での調査で評価されている。

ホスホマイシントロメタミンでsingle-dose therapyが可能なる理由は、その体内動態の特性、安定性、そして抗菌活性にある。トロメタミン塩の経口吸収性はCa塩より高い<sup>124,125</sup>。すなわち、ヒトでのバイオアベイラビリティは、トロメタミン塩では34~<58%、Ca塩では10~30%、尿中回収率は、前者では35~60%、後者では18~29%である<sup>124</sup>。日本のCa塩での検討では、尿中回収率はやや高いがほぼ同様の結果が得られている<sup>126</sup>。血中半減期は、トロメタミン塩が4~8時間、Ca塩が3~5時間である。

ところで、一方では、FOMのもつ化学的かつ生物学的にも安定な性質に加えて、FOM Ca塩は、比較的低い経口吸収性の結果、高い腸管内濃度が達せられるので<sup>127</sup>、日本では主要な腸管感染症に適応が認められ、その地位が再確認されつつある。



トロメタミン塩の水に対する溶解性の良いことや化学的安定性が、Ca 塩との体内動態の違いの理由であるとの推定もあるが<sup>103)</sup>、Ca 塩に関するヒトやイスでの基礎検討では必ずしもそうではない<sup>126)</sup>。一方、ホスホマイシントロメタミンを経口投与した後、血清中の FOM そのものとトロメタミンの濃度変化を調べた結果、その経過はほぼ同じであった<sup>103)</sup>。このことから、FOM とトロメタミンについては、イオン結合に加えて、水素結合も関与した 1 つの分子としての行動の可能性が示唆されている<sup>103)</sup>。

ホスホマイシントロメタミンの抗菌活性は FOM の Ca 塩や Na 塩と同じである<sup>24~26,128~134)</sup>。また、64~128  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの MIC を示す尿路感染細菌は、臨床効果と膀胱内での経時的な FOM の濃度変化から、ホスホマイシントロメタミンに感受性とされている<sup>25,26,134)</sup>。

### VIII. おわりに

感染症に対する最近の関心の高まりと期を一にして、FOM に関する知見も非常に多く蓄積し、これまでの抗菌薬の中で、FOM はその性質の最も研究され明確になりつつある薬剤の 1 つと言えよう。その背景の 1 つとしてのホスホマイシントロメタミンの欧米での開発、承認、そして発売は、この間の欧米における医療に対する経済的評価の変遷と連動していると思われる。

細胞壁のペプチドグリカン生合成と、細菌の成長、分裂そして形態形成の関係もここ数年急速に明らかになりつつある。その中であって、 $\beta$ -ラクタム薬は非常に多くの誘導体が合成され一番多く使われているが、その抗菌作用機構の中に  $\beta$ -ラクタマーゼを誘導する性質を内包している。しかしながら、膨大な知識や技術の蓄積の上に、種々の  $\beta$ -ラクタマーゼで分解されない  $\beta$ -ラクタム薬を生み出す努力も精力的に行われている。一方では、トリペプチド L-Ala-D-Glu-m-A<sub>2</sub>pm のリサイクルするサイクルの外のペプチドグリカン生合成のステップは、抗菌薬探索において新しい可能性を秘めているように思われる。

FOM についてはその広範な研究の中から、MurA を攻撃する以外の副次的な抗菌作用も明らかになりつつある<sup>135~137)</sup>。すなわち、FOM は細菌の宿主との最初の接触である接着 (adherence) を特異的あるいは非特異的に阻害する。こうした接着をはじめとする細菌の病原因子の研究は、抗菌薬の作用を含めて、急速に進んでいる<sup>138~141)</sup>。細菌の増殖の抑制に加えて、細菌の属性の変化をより明確にした抗菌薬が、21 世紀の薬剤として細菌感染症治療薬の一群をなすようになるかも知れない。

### 謝辞

本稿を終えるにあたり、本稿作成の機会を与えて下さり、また、ご指導頂きました帝京大学名誉教授 紺野昌俊先生に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 堺 宣道: O 157 事件: 食品保健行政の立場から。公開シンポジウム 現代社会と感染症—O 157 事件に学ぶ—講演集, p.27~32, 東京, 1997
- 2) 西村輝久, 楠本清明, 小林久和, 他: 座談会: 堺市における O 157 学童集団食中毒について (平成 8 年 10 月 26 日開催), 小児科診療 60: 1219~1226, 1997
- 3) 大島利夫: 腸管出血性大腸菌感染症における溶血性尿毒症症候群 (HUS) 合併の予期因子と合併予防のための早期集約的治療について。Jap. J. Antibiotics 50: 855~861, 1997
- 4) 一次, 二次医療機関のための O-157 感染症治療のマニュアル, 平成 8 年 8 月 2 日, 厚生省, 腸管出血性大腸菌感染症の診断治療に関する研究班 (班長: 竹田美文, 国立国際医療センター研究所長)
- 5) 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O 157 等) 感染症治療の手引き (改訂版), 平成 9 年 8 月 21 日, 厚生省, 腸管出血性大腸菌感染症の診断治療に関する研究班 (班長: 竹田美文, 国立国際医療センター研究所長)
- 6) Takeda T, Yoshino K, Uchida H, et al.: Early use of fosfomycin for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O 157 infection reduces the risk of hemolytic-uremic syndrome. In *Escherichia coli* O 157: H 7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains (Kaper J B, O'Brien A D ed.), p.385~387, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1998
- 7) Hendlin D, Stapley E O, Jackson M, et al.: Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. Science 166: 122~123, 1969
- 8) Kahan F M, Kahan J S, Cassidy P J, et al.: The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). Ann. N.Y. Acad. Sci. 235: 364~386, 1974
- 9) Höltje J-V: Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 181~203, 1998
- 10) Nanninga N: Morphogenesis of *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 110~129, 1998
- 11) 林 泉, 長谷川裕美: ホスホマイシナトリウム, カルシウム。Jap. J. Antibiotics 47: 861~868, 1994
- 12) ホスホマイシン—新たなる展開—(清水喜八郎監修; 泉 孝英, 橋本 一, 林 泉編集), 臨床医薬研究協会, 東京, 1995
- 13) 鶴岡 勉, 入子祥子, 高杉益充: ホスホマイシナトリウムの臨床薬理。化学療法の領域 12: 1873~1881, 1996
- 14) 鶴岡 勉, 岩沢博行, 入子祥子, 他: ホスホマイシナトリウムの物理的・化学的性質と製剤の安定性。化学療法の領域 12: 2075~2078, 1996
- 15) 朝野和典, 河野 茂: Fosfomycin。内科 79: 249~253, 1997
- 16) 大石和徳, 山領 豪, 中川喜代子, 他: ホスミン。Current Therapy 15: 1134~1138, 1997
- 17) 鶴岡 勉: 最近のホスホマイシン。明治製薬研究年報 No.36: 1~18, 1997
- 18) Hendlin D, Frost B M, Thiele E, et al.: Phosphonomycin III. Evaluation in vitro. Antimicrob. Agents Chemother.—1969, p.297~302, 1970
- 19) 五島瑳智子, 堂ヶ崎勲, 金子康子, 他: Fosfomycin

- の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 23: 1653~1661, 1975
- 20) Zimmerman S B, Stapley E O, Wallick H, et al.: Phosphonomycin IV. Susceptibility testing method and survey. *Antimicrob. Agents Chemother.*—1969 p. 303~309, 1970
  - 21) Tsuruoka T, Yamada Y: Characterization of spontaneous fosfomycin (phosphonomycin) resistant cells of *Escherichia coli* B *in vitro*. *J. Antibiotics* 28: 906~911, 1975
  - 22) Inouye S, Watanabe T, Tsuruoka T, et al.: An increase in the antimicrobial activity *in vitro* of fosfomycin under anaerobic conditions. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 657~666, 1989
  - 23) 出口浩一, 鈴木由美子, 石原理加, 他: ペロトキシン産生大腸菌 O-157 を含む感染性腸炎原因菌の薬剤感受性パターン. *Jap. J. Antibiotics* 50: 829~843, 1997
  - 24) Lerner S A, Price S, Kulkarni S: Microbiological studies of fosfomycin trometamol against urinary isolates *in vitro*. *In New Trends in Urinary Tract Infections. Int. Symp., Rome 1987* (Neu H C, Williams J D ed.), p. 121~129, Karger, Basel, 1988
  - 25) Barry A L, Fuchs P C: *In vitro* susceptibility testing procedures for fosfomycin tromethamine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1235~1238, 1991
  - 26) Wise R, Andrews J M: Fosfomycin trometamol: an *in vitro* study. *In New Trends in Urinary Tract Infections. Int. Symp., Rome 1987* (Neu H C, Williams J D ed.) p. 232~241, Karger, Basel, 1988
  - 27) Jacobs C, Joris B, Jamin M, et al.: AmpD, essential for both  $\beta$ -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol. Microbiol.* 15: 553~559, 1995
  - 28) Jacobs C, Huang L-j, Bartowsky E, et al.: Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for  $\beta$ -lactamase induction. *EMBO J.* 13: 4684~4694, 1994
  - 29) Høltje J-V, Kopp U, Ursinus A, et al.: The negative regulator of  $\beta$ -lactamase induction AmpD is a *N*-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 159~164, 1994
  - 30) Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J, Park J T: Identification of the *mpl* gene encoding UDP-*N*-acetylmuramate: L-alanyl- $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 178: 5347~5352, 1996
  - 31) Park J T: Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*: indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus. *J. Bacteriol.* 175: 7~11, 1993
  - 32) Park J T, Raychaudhuri D, Li H, et al.: MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl- $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J. Bacteriol.* 180:1215~1223, 1998
  - 33) Park J T: The convergence of murein recycling research with  $\beta$ -lactamase research. *Microb. Drug Resist.* 2: 105~112, 1996
  - 34) Lindquist S, Weston-Hafer K, Schmidt H, et al.: AmpG, a signal transducer in chromosomal  $\beta$ -lactamase induction. *Mol. Microbiol.* 9: 703~715, 1993
  - 35) Jacobs C, Frère J-M, Normark S: Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 88: 823~832, 1997
  - 36) Bennett P M, Chopra I: Molecular basis of  $\beta$ -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 153~158, 1993
  - 37) 鶴岡 勉: 抗菌作用機作。ホスホマイシン—新たな展開—(清水喜八郎監修; 泉 孝英, 橋本 一, 林 泉編集)p.28~33, 臨床医薬研究協会, 東京, 1995
  - 38) Izaki K, Matsushashi M, Strominger J L: Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 656~663, 1966
  - 39) Tamaki S, Nakajima S, Matsushashi M: Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5472~5476, 1977
  - 40) Kitano K, Tomasz A: Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 838~848, 1979
  - 41) Matsushashi M, Nakagawa J, Ishino F, et al.: Penicillin-binding proteins: their nature and functions in the cellular duplication and mechanisms of action of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. *In Beta-lactam antibiotics* (Mitsushashi S ed.) p. 203~223, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981
  - 42) Ghuysen J-M: Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 8: 45~60, 1997
  - 43) Nikaido H, Vaara M: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1~32, 1985
  - 44) 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
  - 45) Koch A L, Woeste S: Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 4811~4819, 1992
  - 46) Dijkstra A J, Keck W: Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* 178: 5555~5562, 1996
  - 47) Hobot J A, Carlemalm E, Villiger W, et al.: Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* 160: 143~152, 1984
  - 48) Demchick P, Koch A L: The permeability of the

- wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178: 768~773, 1996
- 49) 鶴岡 勉, 宮田愛子, 井上重治: *Escherichia coli*, 多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Staphylococcus aureus* における Fosfomycin 能動輸送. Jap. J. Antibiotics 48: 1935~1938, 1995
- 50) Koch J P, Hayashi S, Lin E C C: The control of dissimilation of glycerol and L- $\alpha$ -glycerophosphate in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 239: 3106~3108, 1964
- 51) Freedberg W B, Lin E C C: Three kinds of controls affecting the expression of the *glp* regulon in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 115: 816~823, 1973
- 52) Brzoska P, Rimmel M, Brzostek K, et al.: The *pho* regulon-dependent Ugp uptake system for glycerol 3 phosphate in *Escherichia coli* is *trans* inhibited by Pi. J. Bacteriol. 176: 15~20, 1994
- 53) Peterkofsky A, Gazdar C: Interaction of enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system with adenylate cyclase of *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 2920~2924, 1975
- 54) Wong K K, Kwan H S: Transcription of *glpT* of *Escherichia coli* K 12 is regulated by anaerobiosis and *fnr*. FEMS Microbiol. Lett. 94: 15~18, 1992
- 55) Weston L A, Kadner R J: Identification of Uhp polypeptides and evidence for their role in exogenous induction of the sugar phosphate transport system of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 169: 3546~3555, 1987
- 56) Kadner R J, Murphy G P, Stephens C M: Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 138: 2007~2014, 1992
- 57) Kadner R J, Winkler H H: Isolation and characterization of mutations affecting the transport of hexose phosphates in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 113: 895~900, 1973
- 58) Winkler H H: Compartmentation in the induction of the hexose-6-phosphate transport system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 101: 470~475, 1970
- 59) Maloney P C, Ambudkar S V, Anantharam V, et al.: Anion-exchange mechanisms in bacteria. Microbiol. Rev. 54: 1~17, 1990
- 60) Tsuboi I, Ida H, Yoshikawa E, et al.: Antibiotic susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O 157: H 7 isolated from an outbreak in Japan in 1996. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 431~432, 1998
- 61) Steinrücken H C, Amrhein N: 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* 2. Inhibition by glyphosate [*N*-(phosphonomethyl) glycine]. Eur. J. Biochem. 143: 351~357, 1984
- 62) Duncan K, Lewendon A, Coggins J R: The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. FEBS Lett. 170: 59~63, 1984
- 63) Berlyn M K B: Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 10: the traditional map. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 814~984, 1998
- 64) Marquardt J L, Siegele D A, Kolter R, et al.: Cloning and sequencing of *Escherichia coli murZ* and purification of its product, a UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. J. Bacteriol. 174: 5748~5752, 1992
- 65) Brown E D, Vivas E I, Walsh C T, et al.: MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 4194~4197, 1995
- 66) Skarzynski T, Mistry A, Wonacott A, et al.: Structure of UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-*N*-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. Structure 4: 1465~1474, 1996
- 67) Sack S, Dauter Z, Wanke C, et al.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase of *Enterobacter cloacae*. J. Struct. Biol. 117: 73~76, 1996
- 68) Schönbrunn E, Sack S, Eschenburg S, et al.: Crystal structure of UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase, the target of the antibiotic fosfomycin. Structure 4: 1065~1075, 1996
- 69) Maskell D J, Morrissey P, Dougan G, et al.: Cloning and nucleotide sequence of the *aroA* gene of *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol. 170: 2467~2471, 1988
- 70) Castellino S, Leo G C, Sammons R D, et al.: <sup>31</sup>P, <sup>15</sup>N, and <sup>13</sup>C NMR of glyphosate: comparison of pH titrations to the herbicidal dead-end complex with 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Biochemistry 28: 3856~3868, 1989
- 71) Stallings W C, AbdelMeguid S S, Lim L W, et al.: Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5046~5050, 1991
- 72) Smeyers Y G, HernandezLaguna A, von Carstenn-Lichterfelde C: Quantum mechanical calculations useful for determining the mechanism of action of fosfomycin. J. Pharm. Sci. 72:1011~1014, 1983
- 73) Kim D H, Lees W J, Kempell K E, et al.: Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. Biochemistry 35: 4923~4928, 1996
- 74) Skarzynski T, Kim D H, Lees W J, et al.: Stereochemical course of enzymatic enolpyruvyl transfer and catalytic conformation of the active site revealed by the crystal structure of the fluorinated analogue of the reaction tetrahedral intermediate bound to the active site of the C115A mutant of MurA. Biochemistry 37: 2572~2577, 1998
- 75) Venkateswaran P S, Wu H C: Isolation and characterization of a phosphonomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 110: 935~944, 1972
- 76) Alper M D, Ames B N: Transport of antibiotics

- and metabolite analogs by systems under cyclic AMP control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *J. Bacteriol.* 133: 149~157, 1978
- 77) Tsuruoka T, Miyata A, Yamada Y: Two kinds of mutants defective in multiple carbohydrate utilization isolated from *in vitro* fosfomycin-resistant strains of *Escherichia coli* K-12. *J. Antibiotics* 31: 192~201, 1978
- 78) Cordaro J C, Melton T, Stratis J P, et al.: Fosfomycin resistance: selection method for internal and extended deletions of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 128: 785~793, 1976
- 79) Mendoza C, Garcia J M, Llana J, et al.: Plasmid-determined resistance to fosfomycin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 215~219, 1980
- 80) Alvarez A M, Hardisson C, Mendoza M C: Dispersion of a gene that codifies fosfomycin resistance among plasmids from enterobacteriaceae isolated from sewage: *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 351~356, 1987
- 81) Terán F J, Suárez J E, Hardisson C, et al.: Molecular epidemiology of plasmid mediated resistance to fosfomycin among bacteria isolated from different environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 213~216, 1988
- 82) García-Lobo J M, Ortiz J M: Tn2921, a Transposon encoding fosfomycin resistance. *J. Bacteriol.* 151: 477~479, 1982
- 83) Suárez J E, Mendoza M C: Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 791~795, 1991
- 84) Llana J, Villar C J, Salas J A, et al.: Plasmid-mediated fosfomycin resistance is due to enzymatic modification of the antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 163~164, 1985
- 85) Arca P, Rico M, Braña A F, et al.: Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1552~1556, 1988
- 86) Arca P, Hardisson C, Suárez J E: Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 844~848, 1990
- 87) Etienne J, Gerbaud G, Courvalin P, et al.: Plasmid-mediated resistance to fosfomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 133~138, 1989
- 88) Etienne J, Gerbaud G, Fleurette J, et al.: Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomycin resistance gene *fosB*. *FEMS Microbiol. Lett.* 84: 119~122, 1991
- 89) Zilhao R, Courvalin P: Nucleotide sequence of the *fosB* gene conferring fosfomycin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 267~272, 1990
- 90) 小原康治, 小竹次郎, 大宮敬一, 他: 臨床分離緑膿菌のホスホマイシン不活化酵素. *Chemotherapy* 36: 905~910, 1988
- 91) O'Hara K: Two different types of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114: 9~16, 1993
- 92) Shimizu M, Nonomiya T, Shigenobu F, et al.: Fosfomycin resistance in *Escherichia coli* in Japan. *J. Antibiotics* 51: 889~892, 1998
- 93) Arca P, Reguera G, Hardisson C: Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 393~399, 1997
- 94) Carcía, P, Arca P, Suárez J E: Product of *fosC*, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomycin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1569~1573, 1995
- 95) León J, García-Lobo J M, Navas J, et al.: Fosfomycin causes transient lysis in *Escherichia coli* strains carrying fosfomycin-resistance plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3255~3260, 1985
- 96) Woodruff H B, Kahan F M, Wallick H, et al.: Fosfomycin, a cell-wall-active antibiotic not inactivated by episome-mediated enzymes. *In* *Microbial drug resistance* (Mitsuhashi S, Hashimoto H ed.) p. 539~559, University Park Press, Baltimore, 1975
- 97) 三橋 進, 田中徳満, 倉茂達徳: Fosfomycinの抗菌作用と感染防禦能. *Chemotherapy* 23: 1649~1652, 1975
- 98) Potužniková B, Schindler J: Fosfomycin resistant mutants of *Listeria monocytogenes* are not virulent for mice. *Microbios Letters* 8: 27~30, 1978
- 99) 笠井隆夫, 鶴岡 勉: *Escherichia coli* より分離された Fosfomycin 耐性株の病原性. *Jap. J. Antibiotics* 52: 34~40, 1999
- 100) Cozzarelli N R, Koch J P, Hayashi S, et al.: Growth stasis by accumulated L-a-glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 90: 1325~1329, 1965
- 101) 小原康治, 橋本 一: 臨床分離株を中心としたホスホマイシンの耐性機構. *Jap. J. Antibiotics* 49: 533~543, 1996
- 102) 橋本 一: 我が国における感受性サーベイランス。ホスホマイシン—新たなる展開—(清水喜八郎監修; 泉 孝英, 橋本 一, 林 泉 編集) p.99~102, 臨床医薬研究協会, 東京, 1995
- 103) Bella D D, Ferrari V: Monuril: historical background. *In* *New Trends in Urinary Tract Infections. Int. Symp., Rome 1987* (Neu H C, Williams J D ed.) p. 116~120, Karger, Basel, 1988
- 104) Davis R H, O'Dowd T C, Holmes W, et al.: A comparative double-blind randomised study of single dose fosfomycin trometamol with trimethoprim in the treatment of urinary tract infections in general practice. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 34~36, 1990
- 105) Cooper J, Raeburn A L, Brumfitt W, et al.: General practitioner study: fosfomycin trometamol versus amoxycillin clavulanate in acute urinary tract infections. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 24~26, 1990
- 106) Reeves D S: Treatment of bacteriuria in pregnancy



- with single dose fosfomicin trometamol: a review. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 313~S 316, 1992
- 107) Greenwood D, Edwards R, Brown J, et al.: The comparative activity of fosfomicin trometamol against organisms isolated from infected urines. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 302~S 304, 1992
- 108) Naber K G, Thyroff-Friesinger U: Fosfomicin trometamol versus ofloxacin/co-trimoxazole as single dose therapy of acute uncomplicated urinary tract infection in females: a multicentre study. *Infection* 18 (Suppl. 2): S 70~S 76, 1990
- 109) de Jong Z, Pontonnier F, Plante P: Single-dose fosfomicin trometamol (Monuril) versus multiple-dose norfloxacin: results of a multicenter study in females with uncomplicated lower urinary tract infections. *Urol. Int.* 46: 344~348, 1991
- 110) Jardin A: A general practitioner multicenter study: fosfomicin trometamol single dose versus pipemidic acid multiple dose. *Infection* 18 (Suppl. 2): S 89~S 93, 1990
- 111) Boerema J B J, Willems F Th C: Fosfomicin trometamol in a single dose versus norfloxacin for seven days in the treatment of uncomplicated urinary infections in general practice. *Infection* 18 (Suppl. 2): S 80~S 88, 1990
- 112) Van Pienbroek E, Hermans J., Kaptein A A, et al.: Fosfomicin trometamol in a single dose versus seven days nitrofurantoin in the treatment of acute uncomplicated urinary tract infections in women. *Pharmacy World and Science*: 15, 257~262, 1993
- 113) Baert L, Billiet I, Vandepitte J: Prophylactic chemotherapy with fosfomicin trometamol versus placebo during transurethral prostatic resection. *Infection* 18 (Suppl. 2): S 103~S 106, 1990
- 114) Reynaert J, Van Eyck D, Vandepitte J: Single dose fosfomicin trometamol versus multiple dose norfloxacin over three days for uncomplicated UTI in general practice. *Infection* 18 (Suppl. 2): S 77~S 79, 1990
- 115) Jodal U: The role of fosfomicin trometamol in the management of urinary tract infections in pediatrics. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 317~S 320, 1992
- 116) Principi N, Corda R, Bassetti D, et al.: Fosfomicin trometamol versus netilmicin in children's lower urinary tract infections. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 41~45, 1990
- 117) Crottiolo P: Single-dose fosfomicin trometamol versus multiple-dose cotrimoxazole in the treatment of lower urinary tract infections in general practice. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 37~40, 1990
- 118) Selvaggi F P, Battaglia M, Grossi F S, et al.: Oral prophylaxis with fosfomicin trometamol in transurethral prostatectomy and urological maneuvers: literature review and personal experience. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 321~S 324, 1992
- 119) Selvaggi F P, Ditunno P, Traficante A, et al.: Fosfomicin trometamol (Monuril) versus norfloxacin in single dose for adult female uncomplicated UTIs—multicenter randomized, double-blind study. *Chemotherapy* 36 (suppl.1): 31~33, 1990
- 120) Cortés R, Pascual T, Arnal S L, et al.: Fosfomicina trometamol en dosis oral única *versus* ácido pipemídico y norfloxacin en el tratamiento de las infecciones urinarias bajas no complicadas. *Atención Primaria* 10: 1007~1012, 1992
- 121) Neu H C: Fosfomicin trometamol versus amoxicillin—single-dose multicenter study of urinary tract infections. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 19~23, 1990
- 122) Capri S, del Bono G P, Dellamano R: Cost-effectiveness comparison of single and multiple-dose antibiotic treatment of lower uncomplicated urinary tract infections. *J. Chemotherapy* 4: 171~175, 1992
- 123) Caron F, Humbert G: Short-term treatment of urinary tract infections: the French concept. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 286~S 290, 1992
- 124) Bergan T: Pharmacokinetic comparison between fosfomicin and other phosphonic acid derivatives. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 1): 10~18, 1990
- 125) Bergan T, Thorsteinsson S B, Albini E: Pharmacokinetic profile of fosfomicin trometamol. *Chemotherapy* 39: 297~301, 1993
- 126) 石沢孝之, 友野法子, 仲田武実, 他: Fosfomicin の消化管吸収に及ぼす溶解性と胃酸の影響. *明治製菓研究年報* 31: 17~21, 1992
- 127) 佐藤 肇, 中西好子, 鈴木博之, 他: Fosfomicin 内服による感染性腸炎に対する有用性の検討—*Campylobacter jejuni* 腸炎を中心に—. *小児科臨床* 37: 2189~2204, 1984
- 128) Greenwood D, Jones A, Eley A: Factors influencing the activity of the trometamol salt of fosfomicin. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5: 29~34, 1986
- 129) Greenwood D, Coyle S, Andrew J: The trometamol salt of fosfomicin: microbiological evaluation. *Eur. Urol.* 13 (Suppl. 1): 69~75, 1987
- 130) King A, Phillips I: Comparative in vitro activity of fosfomicin trometamol against urinary tract pathogens, *In New Trends in Urinary Tract Infections*. Int. Symp., Rome 1987 (Neu H C, Williams J D ed.) p. 242~249, Karger, Basel, 1988
- 131) Schito G C, Chezzi C, Nicoletti G, et al.: Susceptibility of frequent urinary pathogens to fosfomicin trometamol and eight other antibiotics: results of an Italian multicenter survey. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 291~S 295, 1992
- 132) Naber K G, Thyroff-Friesinger U: Spectrum and susceptibility of pathogens causing acute uncomplicated lower UTI in females and its correlation to bacteriologic outcome after single dose therapy with fosfomicin trometamol versus ofloxacin/co-trimoxazole. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 296~S 301, 1992
- 133) Greenwood D, Brown J, Edwards R: The Influence of anaerobiosis on the activity of fosfomicin trometamol. *Infection* 20 (Suppl. 4): S 305~S 309, 1992
- 134) Barry A L, Pfaller M A, Fuchs P C, et al.: Interpretive criteria and quality control parameters for determining bacterial susceptibility to fosfomicin

- tromethamine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 352~356, 1993
- 135) Klein U, Pawelzik M, Opferkuch W: Influence of  $\beta$ -lactam antibiotics, fosfomycin and vancomycin on the adherence (hemagglutination) of *Escherichia coli*-containing different adhesins. *Chemotherapy* 31: 138~145, 1985
- 136) Carlone N A, Borsotto M, Cuffini A M, et al.: Effect of fosfomycin trometamol on bacterial adhesion in comparison with other chemotherapeutic agents. *Eur. Urol.* 13 (Suppl. 1): 86~91, 1987
- 137) Hirota K, Murakami K, Nemoto K, et al.: Fosfomycin reduces CD-15 s-related antigen expression of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1083~1087, 1998
- 138) 鶴岡 勉: 細菌の接着と抗菌剤。明治製菓研究年報 No. 33: 21~31, 1994
- 139) Finlay B B, Falkow S: Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136~169, 1997
- 140) Shryock T R, Mortensen J E, Baumholtz M: The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 505~512, 1998
- 141) Baldwin T J: Pathogenicity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 47:283~293, 1998

## Recent progress in research regarding fosfomycin: the mechanism of action and other aspects

Tsutomu Tsuruoka

Medical Research Department, Pharmaceutical Division, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,  
4-16, Kyobashi 2-Chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8002, Japan

Fosfomycin [(-)-(1R, 2S) (1,2-epoxypropyl) phosphonate] is an antimicrobial agent, which exhibits a unique mechanism of action and has been used worldwide for many years. The paper that first described the discovery of this antibiotic appeared in 1969. In Japan, its development for clinical use was started in the early 1970's, and its approval was obtained in 1980; since then fosfomycin has been used to treat many patients. Various clinical and basic reports on fosfomycin have recently appeared. One reason for this interest could be the recent approval of a new salt of fosfomycin (fosfomycin tromethamine) for clinical use in Europe and the United States of America. Moreover, at present, new data about bacterial cell wall peptidoglycan, whose synthesis is inhibited by fosfomycin have rapidly accumulated. This article is a review of recent advances in research on the mechanism of action of fosfomycin, its antimicrobial characteristics, and resistance to this antibiotic. Moreover, an outline of fosfomycin tromethamine is presented.