

## 【原著・基礎】

大腸菌のペニシリン結合蛋白に対する  $\beta$ -ラクタム薬の親和性が MIC, 殺菌効果ならびに形態変化におよぼす影響について紺野 昌俊<sup>1)</sup>・旭 泰子<sup>2)</sup>・生方 公子<sup>2)a)</sup><sup>1)</sup>帝京大学\*<sup>2)</sup>同 医学部臨床病理<sup>a)</sup>現: (財) 微生物化学研究会付属微生物化学研究所

(平成 10 年 12 月 22 日受付・平成 11 年 3 月 11 日受理)

Penicillin-binding proteins (PBPs) については多くの研究があるが、臨床上にもたらす利点については十分に検討されていない。そのため、基本骨格の異なるいくつかの  $\beta$ -ラクタム薬を選び、大腸菌の PBPs に対する親和性を検討し、その相違が MIC や殺菌作用、ならびに菌の形態変化におよぼす影響について検討した。各種  $\beta$ -ラクタム薬の PBPs に対する親和性は、Spratt の方法に準じて行った [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin の結合阻止率 (Ir: %) で表現した。各種  $\beta$ -ラクタム薬の 1/32 xMIC から 32 xMIC までの 2 倍階段希釈液を大腸菌の膜画分に添加し、添加薬剤濃度と Ir との関係を検討すると、もっとも相関が高いのは PBP 1 B であるが、相関係数は Ir 10% で 0.4661, Ir 90% で 0.7569 という凹型の線形を示し、MIC を PBP 1 B に対する親和性のみで説明するには飛躍がありすぎる結果であった。このため、MIC 時点における各  $\beta$ -ラクタム薬の各 PBP に対する Ir を求め、それらと MIC との相関を調べた。相関係数は PBP 1 B において 0.8257 ともっとも高いが、その他の PBPs においても 0.5 以上の値が示され、各  $\beta$ -ラクタム薬の MIC は MIC 時点におけるすべての PBP に対する Ir によって説明されるべきであることが示唆された。このため、MIC を基準変数とし、Ir を説明変数とする重回帰分析を行った。その結果、MIC は [1B+4] と [3] ([ ] 内に示す文字または数字はそれに該当する PBP の Ir を示す) が有意に関与していることが示された。同様に、殺菌作用ならびに菌の形態に関する検討を、4 xMIC の  $\beta$ -ラクタム薬添加 2 時間培養後の成績をカテゴリー化して判別分析を行った。殺菌性については [4] が増すほどに殺菌性は増強し、[2+3] が増すほどに乏しくなることが有意であった。菌の形態変化については [3] が増すほどにフィラメント化し、[2] が増すほどに球状化することが有意であった。一方、bulge 形成については [4] と [1B] が増すほどに観察されることが有意であった。この結果、従来  $\beta$ -ラクタム薬の致死標的としての評価が低かった低分子 PBP に対する認識を新たにする必要があることに言及した。

**Key words:** penicillin-binding proteins, 多変量解析, 大腸菌, 殺菌作用, 形態変化

大腸菌の penicillin-binding protein (PBPs) と  $\beta$ -ラクタム薬との関係については、Spratt の研究<sup>1)</sup>が有名である。その後、各種細菌の PBPs についても検討され、細菌の形態や構造に関する研究、あるいは薬剤耐性に関する研究に活用されてきた。本邦においても、新規  $\beta$ -ラクタム薬の開発のたびごとに、その  $\beta$ -ラクタム薬の PBPs に対する親和性が披瀝されてきた。しかし、その多くは新規  $\beta$ -ラクタム薬の性格を特徴づけるに留まっており、その特徴が臨床上にいかなるメリットをもたらすのかについては研究を展開するに至っていない。また、それらの成績を積み重ね、より優れた  $\beta$ -ラクタム薬の開発に繋がる検討をした報告は少ない。

本研究においては、いままでに開発されてきた  $\beta$ -ラクタム薬の中から、その基本骨格に特徴を有するいくつかの薬剤を選び、大腸菌の PBPs に対する親和性を同時に検討し、その数量的な検討から臨床に関連する MIC や殺菌力、あるいは

菌の形態変化の上に、PBPs がいかなる役割を果たしているかを多変量的に解析し、以後の  $\beta$ -ラクタム薬の開発に役立てようとしたものである。

## I. 材料と方法

1. 使用した  $\beta$ -ラクタム薬

使用した  $\beta$ -ラクタム薬は、もっとも基本的な骨格を有する  $\beta$ -ラクタム薬として benzylpenicillin (PCG, 明治製菓株), さらには現在臨床で広く使用されているか、あるいは今後広く使用されると考えられる  $\beta$ -ラクタム薬の中から、広域ペニシリンとして ampicillin (ABPC, 明治製菓株), amoxicillin (AMPC, 塩野義製菓株) および piperacillin (PIPC, 富山化学工業株) の 3 剤, 7  $\beta$  側鎖にメトキシイミノ基を持たないセフェム系薬として cefotiam (CTM, 武田薬品工業株) と 7  $\alpha$  位にメトキシ基を有する cefmetazole (CMZ, 三共株),

メトキシイミノ基を持つ注射薬として cefotaxime (CTX, ハキストマリオンセル株), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業株) および ceftazopran (CZOP, 武田薬品工業株) の 3 剤, 経口セフェム系薬として cefaclor (CCL, 塩野義製薬株) とオキシイミノ基を有する cefdinir (CFDN, 藤沢薬品工業株) および cefditoren (CDTR, 明治製菓株) の 2 剤, カルバペネム系薬として imipenem (IPM, 萬有製薬株), panipenem (PAPM, 三共株) および biapenem (BIPM, 日本ワイスレグリー株) の 3 剤, それにペネム系薬の faropenem (FRPM, サントリー株) を加えた計 16 薬剤とした。また, これら薬剤の使用に際しては, BIPM は 1/15 M phosphate buffer (pH 7.2), IPM は 1/10 M 3-(N-morpholino) propansulfonic acid (pH 7.2), その他の薬剤は 1/10 M phosphate buffer (pH 7.0) で溶解した。

## 2. 使用菌株

用いた菌株は大腸菌 NIHJ-JC 2 株である。また, 大腸菌 NIHJ-JC 2 から得られた実験結果が, 臨床分離株においても共通に見られることを確認するために, ABPC に感受性を有する臨床分離の大腸菌 TK-705 株および TK-2241 株についても同様に検討した。

## 3. MIC 測定

16 薬剤に対する大腸菌の最小発育阻止濃度 (MIC) は, 日本化学療法学会感受性測定法<sup>2)</sup>に従って寒天平板希釈法により測定した。

## 4. 大腸菌の PBPs に対する $\beta$ -ラクタム薬の親和性の検討

大腸菌の膜画分は Spratt の方法<sup>1)</sup>に準じて抽出した。各  $\beta$ -ラクタム薬は前述した buffer を用い, 被験菌が被験薬に対して示す MIC を中心に, 1/32 xMIC から 32 xMIC に至る 2 倍階段希釈によるものを使用した。すなわち, それぞれの希釈薬 5  $\mu$ l を 50  $\mu$ l の膜画分 (4 mg protein/ml) 中に加え, 30°C で 10 分間保温後, 1 mM の [<sup>3</sup>H] benzylpenicillin 5  $\mu$ l を加え, さらに 10 分間保温した。その後, benzylpenicillin 120 mg/ml 12.5  $\mu$ l を加えて飽和させ, たちちに 20% sarkosyl 2.5  $\mu$ l を加えて反応を停止させた後, SDS-PAGE ならびに fluorography を行った。そして, その fluorogram から [<sup>3</sup>H] benzylpenicillin の結合阻止率 (Inhibitory ratio of binding of [<sup>3</sup>H] benzylpenicilli: Ir (%)) を求め, その Ir をもって大腸菌の各 PBPs に対する各薬剤の添加濃度における親和性と表現した。以下の記述においては, 特に断らない限り, 各 PBPs に対する各薬剤の親和性は単に Ir と表現する。また, 各 PBP における Ir は, [1 A], [1 B] 等と各 PBP に付せられた名称を [ ] 内に表示する場合もある。

## 5. 各種 $\beta$ -ラクタム薬添加後の生菌数

対数増殖期にある大腸菌の菌量がほぼ 10<sup>6</sup>/ml に達した時点において, それぞれの薬剤の 1 xMIC, 2 xMIC

および 4 xMIC を添加して 37°C で 2 時間培養し, 生菌数を測定した。3 回の繰り返し実験における平均値を求め, その昇順に従って隣接する薬剤間の実測値間の T 検定を行い, 有為の差が見られた薬剤間で区切ってランク付けを行った。

## 6. $\beta$ -ラクタム薬添加後における菌の形態変化

各  $\beta$ -ラクタム薬の 4 xMIC を含有させたミューラーヒントン寒天培地をスライドガラス上にシートし, その培地上に 5. の方法によって培養した大腸菌を滴下し, カバーガラスで覆い, 37°C, 2 時間培養後の菌の形態変化を位相差顕微鏡下で観察した。そして,  $\beta$ -ラクタム薬添加時に示される菌の形態変化の中, フィラメントを形成するものについては, 菌の長さを写真上にて 200 個計測し, その長さの有為の差が見られたものに従ってカテゴリーに分類した。また, 形態変化を生じた菌の中央部位に, Bulge の形成が全視野にわたって認められる薬剤と, 全視野を観察してもそれらしきものが僅かに認められる薬剤の 2 群に分類した。

## 7. 統計解析

各種  $\beta$ -ラクタム薬の 1/32 xMIC から 32 xMIC に至る 2 倍階段希釈の濃度段階において示された PBPs に対する Ir は, もっとも相関性を有する多項式に当てはめ, その式より各 PBP における [<sup>3</sup>H] benzylpenicillin の 0% 結合阻止率 (Ir 0) から 100% 結合阻止率 (Ir 100) に該当する薬剤濃度を算出した。また, 各薬剤が大腸菌に対して示す MIC 時点における各 PBP の Ir もこの式より算出した。

このようにして得られた Ir や MIC 時点における Ir と MIC との関係, あるいは薬剤添加後に示される大腸菌の形態変化や殺菌性との関係については, 重回帰分析あるいは判別分析による解析を加えた。

## II. 結 果

### 1. 大腸菌の PBPs に対する $\beta$ -ラクタム薬の親和性

代表的な fluorography の結果を Fig. 1 に示す。 $\beta$ -ラクタム薬添加時の Ir は添加する各  $\beta$ -ラクタム薬の濃度に依存する。その Ir を Y 軸とし, 添加薬剤濃度を X 軸としてプロットすると, Fig. 2 の曲線が得られる。その曲線を多項式に当てはめると 3 次式が得られる。このようにして得られた多項式は, いずれの PBPs においても 0.9986 から 0.9122 の範囲内に収まる相関係数を示した。Fig. 3 はこのようにして得られた PBPs に対する各  $\beta$ -ラクタム薬の Ir を 1 つにまとめたものである。各薬剤によって示される Ir 0 から Ir 100 に至る曲線に特徴のあることが示されているが, たとえば PBP 1 B において ID 50 ([<sup>3</sup>H] benzylpenicillin の PBPs への結合を 50% 阻止する被験  $\beta$ -ラクタム薬の濃度) を Ir 50 の線が Ir 曲線と交叉する点における薬剤濃度から眺めれば, 約半数の  $\beta$ -ラクタム薬において  $\circ$ ,  $\triangle$  あるいは  $\square$  で記した MIC を上回っている濃度であることに気づく。

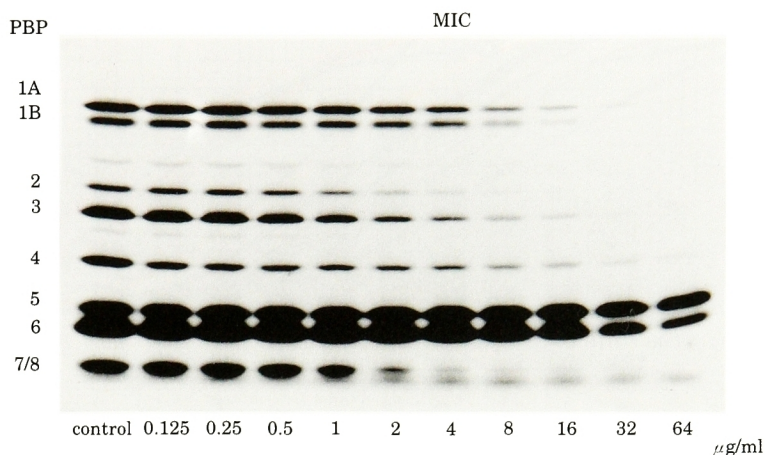


Fig. 1. Binding of ampicillin to the PBPs of *Escherichia coli*. PBPs were detected by the post-addition of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to membrane fractions of *E. coli* pretreated with two-fold diluted ampicillin.

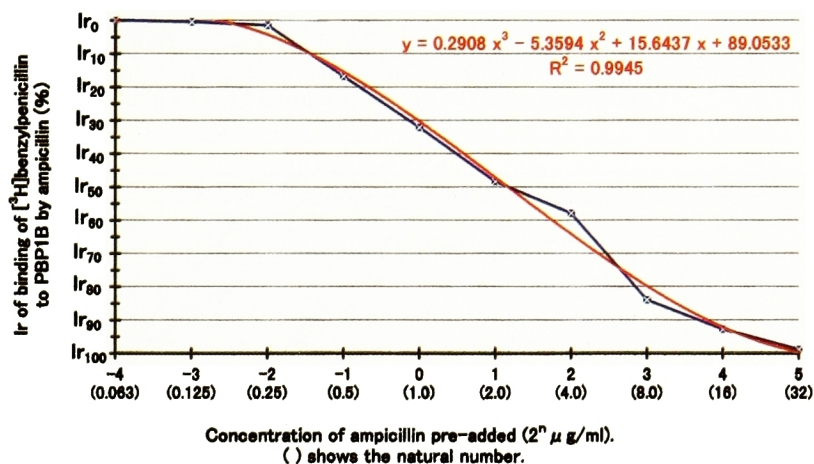


Fig. 2. Saturation curve of ampicillin to PBP 1 B of *Escherichia coli*. The density of the PBP band, which is shown in Fig. 1, was determined using a densitometer. The inhibitory ratio (Ir) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to PBP 1 B by ampicillin was represented by the rate of decrease in the PBP density compared to a control which was no addition of the drug. A red line represents the result of linear regression analysis.

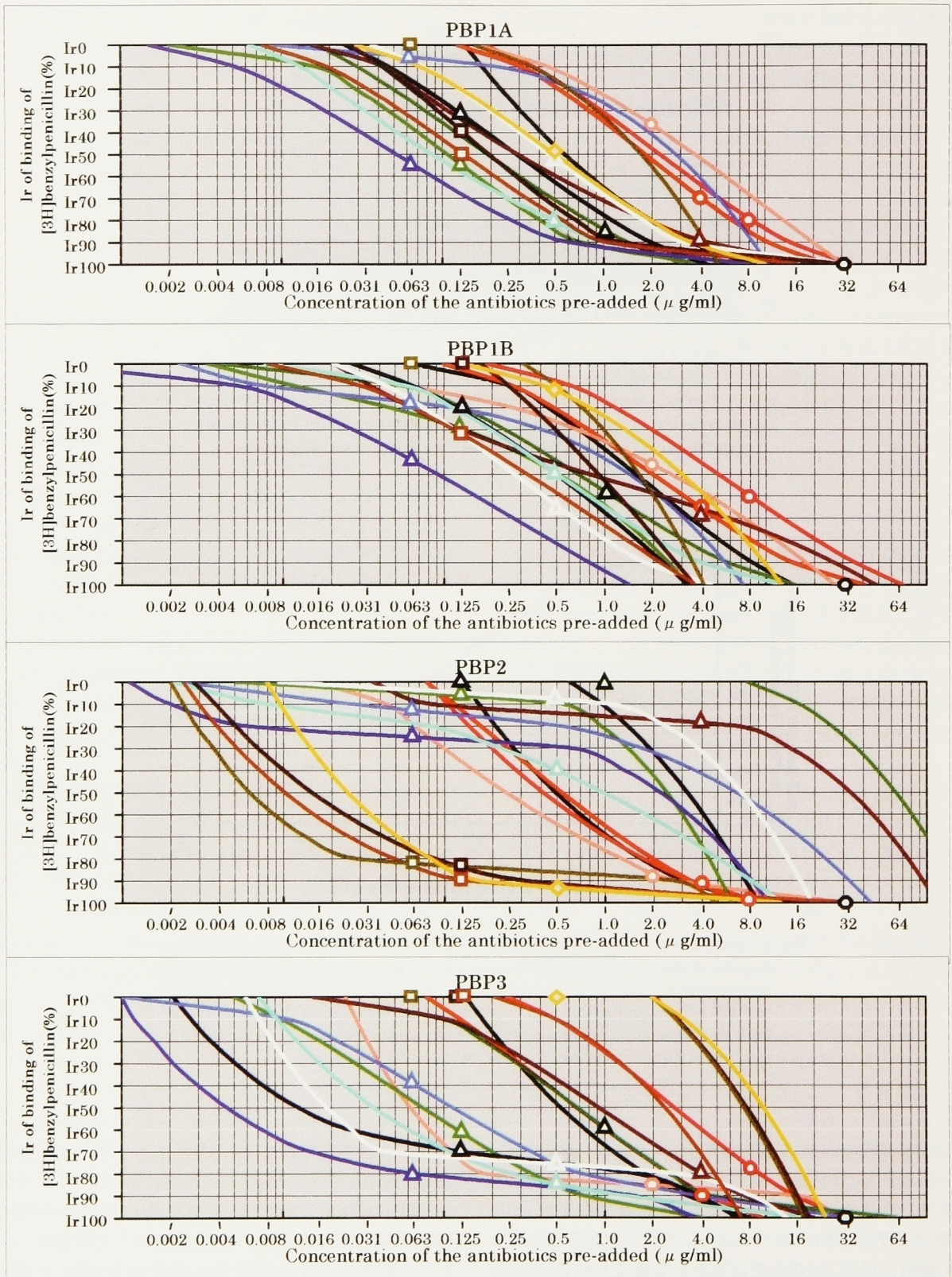
これらの多項式から得られた Ir 10 から Ir 90 の間に示される各β-ラクタム薬の薬剤濃度と MIC との関係調べた成績を Fig. 4 に示す。MIC との相関がもっとも高い PBP は PBP 1 B であるが、その相関係数は Ir 10 で 0.4661、以後 Ir 30 までは低下して再び上昇し、Ir 90 で 0.7569 となる。Ir 90 において示される薬剤濃度は、各β-ラクタム薬の MIC をはるかに上回っている (Fig. 3)。MIC を PBP 1 B に対する結合親和性のみで説明するには飛躍がありすぎるという結果であった。

## 2. MIC に関与する大腸菌の PBPs についての解析

上述した事実を踏まえ、MIC に関与する PBPs の役割を検討するため、MIC 時点における各β-ラクタム薬の PBPs に対する結合阻止率を求めた。その成績を Table 1 に示す。Table の最下段に示した数値は、各カラムに示される各β-ラクタム薬の Ir と MIC との相関係数を求めた値で、この値は PBP 1 B において 0.8257 ともっとも高く、次いで PBP 1 A の 0.7684、PBP 6 の 0.6797 と続き、PBP 3 や PBP 4 においても 0.5 以上の相関係数が得られた。

この相関係数からは、各β-ラクタム薬の大腸菌に対





Continued on following page

Fig. 3-1. Affinities of 16  $\beta$ -lactams to the PBPs of *Escherichia coli*. The inhibitory ratio (Ir) of binding of [ $^3\text{H}$ ]benzylpenicillin to each PBP by  $\beta$ -lactam antibiotics, which was obtained by linear regression analysis, is shown. The marks on each curve represent the position of the MIC of each  $\beta$ -lactam. (○: penicillins; △: cephemis; □: carbapenems; ◇: penem)



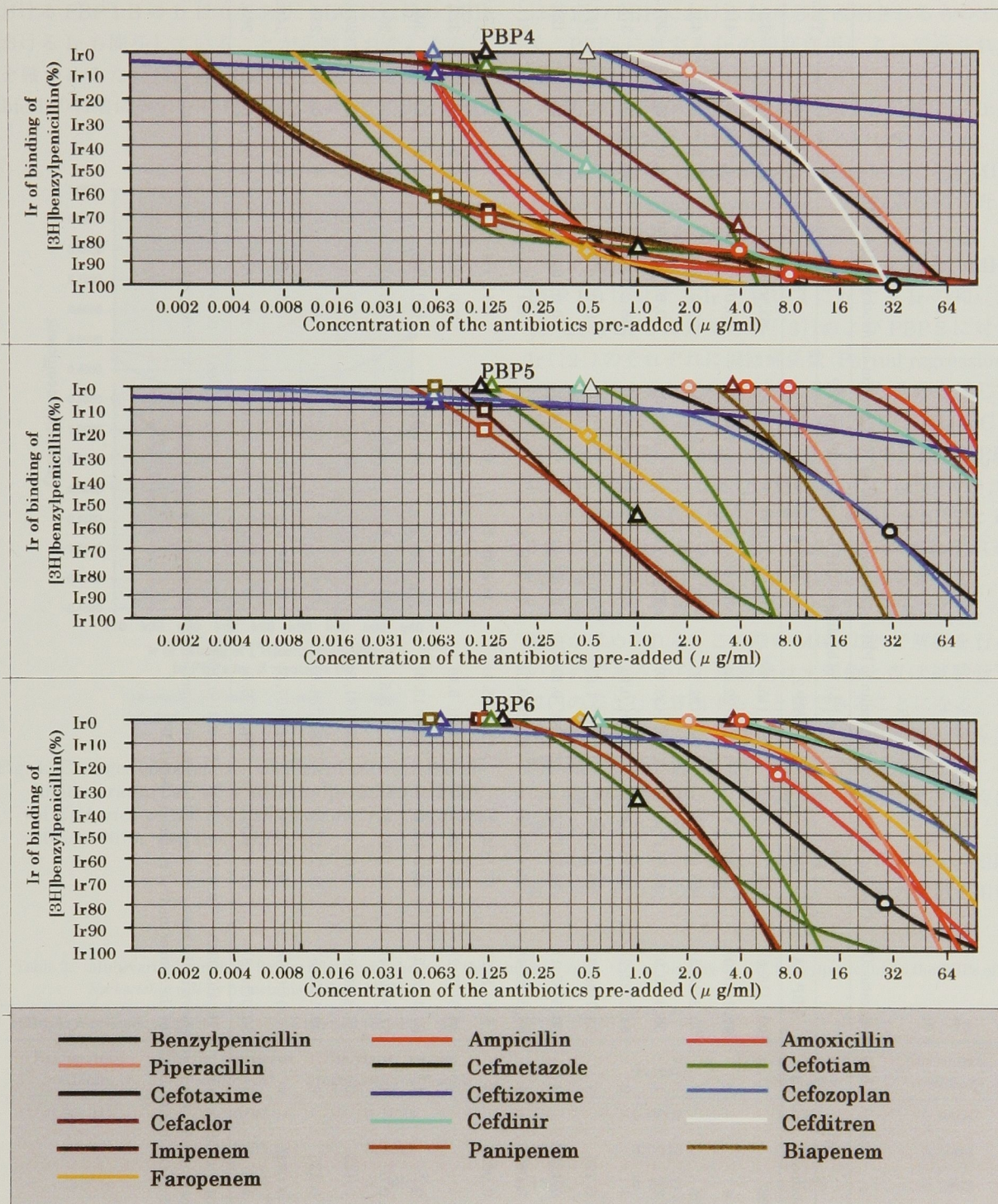


Fig. 3-2. Affinities of 16 β-lactams to the PBPs of *Escherichia coli*. The inhibitory ratio (Ir) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to each PBP by β-lactam antibiotics, which was obtained by linear regression analysis, is shown. The marks on each curve represent the position of the MIC of each β-lactam. (○: penicillins; △: cepheims; □: carbapenems; ◇: penem)

Table 1. Inhibitory ratio (Ir) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to PBPs of *Escherichia coli* by 16  $\beta$ -lactam antibiotics at their MICs

Antibiotic	MIC ( $\mu$ g/ml)	Log <sub>2</sub>	Ir (%) of binding of [ <sup>3</sup> H]benzylpenicillin to PBP										Total
			PBP 1 A	PBP 1 B	PBP 2	PBP 3	PBP 4	PBP 5	PBP 6				
Benzylpenicillin	32	5	100 (15.6) <sup>a)</sup>	100 (15.6) <sup>a)</sup>	100 (15.6) <sup>a)</sup>	100 (15.6) <sup>a)</sup>	100 (15.6) <sup>a)</sup>	94.6(14.8) <sup>a)</sup>	63.9(10.0) <sup>a)</sup>	81.0(12.7) <sup>a)</sup>	639.5		
Ampicillin	4	2	69.7(17.0)	65.5(15.9)	92.4(22.5)	88.4(21.5)	88.5(21.5)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	6.7(1.6)	411.3		
Amoxicillin	8	3	79.2(18.3)	59.9(13.8)	98.6(22.7)	76.9(17.7)	91.9(21.2)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	27.3(6.3)	433.7		
Piperacillin	2	1	36.4(13.9)	45.6(17.5)	86.1(33.0)	85.7(32.8)	7.5(2.9)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	261.3		
Cefmetazol	1	0	84.2(22.2)	57.9(15.3)	0.0(0.0)	59.4(15.7)	87.2(23.0)	55.2(14.6)	34.6(9.2)	378.6			
Cefotiam	0.125	-3	53.7(36.3)	29.2(19.8)	2.6(1.8)	60.9(41.2)	1.4(1.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	147.8			
Cefotaxime	0.125	-3	30.5(25.1)	20.8(17.2)	0.0(0.0)	70.0(57.7)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	121.3			
Ceftizoxime	0.0625	-4	53.8(25.4)	43.4(20.5)	22.2(10.5)	79.9(37.2)	8.3(3.9)	4.1(2.0)	0.0(0.0)	211.7			
Cefozopran	0.0625	-4	6.4(8.2)	17.5(22.2)	11.9(15.1)	38.8(49.1)	0.0(0.0)	1.1(1.4)	3.1(3.9)	78.9			
Cefaclor	4	2	88.9(27.2)	65.8(20.1)	16.3(5.0)	80.0(24.4)	76.2(23.3)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	327.1			
Cefdinir	0.5	-1	80.4(26.5)	49.8(16.4)	40.3(13.3)	85.3(28.1)	48.1(15.8)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	303.8			
Cefditoren	0.5	-1	51.9(25.4)	64.3(31.5)	7.1(3.5)	81.0(39.7)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	204.3			
Imipenem	0.125	-3	37.8(18.8)	0.0(0.0)	83.7(41.5)	0.0(0.0)	68.5(34.0)	11.5(5.7)	0.0(0.0)	201.5			
Pamipenem	0.125	-3	48.1(18.6)	31.2(12.1)	89.1(34.5)	0.0(0.0)	71.1(27.5)	19.0(7.4)	0.0(0.0)	258.5			
Biapenem	0.0625	-4	0.0(0.0)	0.0(0.0)	84.4(57.6)	0.0(0.0)	62.0(42.4)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	146.3			
Faropenem	0.5	-1	50.0(18.8)	12.4(4.7)	97.3(36.6)	0.0(0.0)	84.6(31.8)	21.5(8.1)	0.0(0.0)	265.8			

Correlation coefficient with MICs value 0.7684(0.0323) 0.8257(0.1501) 0.3862(-0.1556) 0.5950(-0.1579) 0.5730(0.0686) 0.3987(0.1651) 0.6797(0.6014)

Note: Figures in parentheses, which are shown in the rows excluding the bottom line, represent the relative Ir of binding in the drug. a) Relative Ir (%) is the Ir of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to each PBP divided by the sum of the Ir of binding to each PBP.



する MIC は, MIC 時点における PBP 1 B に対する各  $\beta$ -ラクタム薬の Ir のみで説明できそうであるが, Table 1 によると IPM や BAPM においては MIC 時点における PBP 1 B の Ir は 0 であり, MIC には他の PBP における Ir も関与していることが示唆された。そのことを確かめるために, 各 PBP 間の Ir の相対的な比を Table 1 の右端に示す Ir の総和から求め, その比と MIC

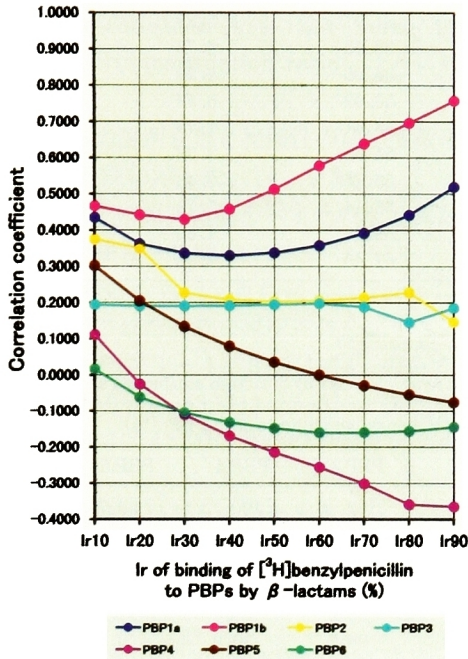


Fig. 4. Changes of correlation coefficient between the inhibitory ratio (Ir) of  $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin to PBP<sub>s</sub> of *Escherichia coli* by 16  $\beta$ -lactams, ranging from 10% to 90%, and their MICs.

との相関を求めた。Table 1 の ( ) 内にそれを示すが, 最下段には相対比と MIC との相関係数をも記した。この相関係数は PBP 6 を除くといずれも低い値で, MIC は特定の PBP における Ir 単独で説明されるものではなく, PBP<sub>s</sub> に対する Ir の相互作用によって示されることを裏付けるものであった。

相互作用を確かめるために, 各 PBP に対する Ir の他に, 各 PBP 間における Ir の差あるいは和を求め, これらを説明変数 (Explanatory variable) とし, MIC を目的変数 (Criterion variable) とする重回帰分析を行った。その結果を Table 2 に示す。

この分析から得られる重回帰式によると, MIC は PBP 1 B に対する Ir と PBP 4 に対する Ir の和 ([1 B+4]) と, PBP 3 に対する Ir ([3]) および PBP 2 に対する Ir ([2]) のそれぞれに偏回帰係数 (Partial regression coefficient) を乗じて和を求め, それから常数を減じて求めることができる。たとえば, ABPC の NIHJ-JC 2 に対する MIC は, Table 1 に示される PBP 1 B と PBP 4 に対する Ir, 65.5 と 88.5 の和 154.0 に Table 2 の [1 B+4] の偏回帰係数 0.0301 を乗じ, 同様に PBP 3 と PBP 2 に対する Ir, 88.4 と 92.4 (Table 1) にそれぞれの偏回帰係数, 0.0381 と 0.0173 (Table 2) を乗じて, これらの総和から常数 6.6675 を減ずれば, 2.9373 という理論値が求められる。この際の MIC は  $2^\circ$  で解析を行っているのであるから, 理論値は実測値とほぼ試験管 1 本以内の差として算出することができることになる。その精度は重相関係数として 0.9380, 自由度修正済み重相関係数として 0.9218 というものであった。また, これらの説明変数の中, [1 B+4] と [3] は推計学的に有意なものであった。

Table 2 の下段に有意な説明変数と 0.9 以上の相関係数を示すその他の変数を記した。これらの変数を用いて

Table 2. Multivariable analysis for the relationship between the inhibitory ratio (Ir) of binding of  $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin to the PBP<sub>s</sub> of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactams at their MICs

Multiple regression analysis		Criterion variable: MIC			N = 16	
Explanatory variable	Partial regression coefficient	Standard partial regression coefficient	F-value	F-test	Partial correlation coefficient	Correlation coefficient
[1 B+4] <sup>a)</sup>	0.0301	0.5764	20.1057	0.0007	0.7913	0.8404
[3] <sup>a)</sup>	0.0381	0.4959	17.3388	0.0013	0.7688	0.5946
[2] <sup>a)</sup>	0.0173	0.2603	4.1553	0.0642	0.5072	0.3863
Constant term	-6.6675					

Determination coefficient: 0.8798

Coefficient of determination adjusted for the degree of freedom: 0.8498

Multiple correlation coefficient: 0.9380

Multiple correlation coefficient adjusted for the degree of freedom: 0.9218

Probability: 0.0000

a): It means the inhibitory ratio (Ir) of  $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin in PBP<sub>s</sub> by  $\beta$ -lactams. Explanatory variable and other variables with correlation coefficient greater than 0.9.

[1 B+4]: [1 A+4] (0.9618), [4+6] (0.9223), [3+4] (0.9178)

[3]: [1 B+3] (0.9652), [1 A+3] (0.9175), [3+6] (0.9096)

Table 3. Decrease (%) in the number of viable cells of *Escherichia coli* after 2 h cultivation with  $\beta$ -lactam antibiotic at 4x MIC levelsInoculum size: 855.000  $\pm$  3.500

$\beta$ -lactam antibiotic	Experimental times			Mean	SD	t-test <sup>a)</sup>
	1 st	2 nd	3 rd			
Amoxicillin	0.23	0.12	0.12	0.16	0.07	
Benzylpenicillin	3.63	2.22	2.34	2.73	0.78	0.0133
Ampicillin	6.43	7.60	7.02	7.02	0.58	0.0016
Cefmetazole	23.39	16.37	17.54	19.10	3.76	0.0053
Imipenem	24.56	18.13	23.39	22.03	3.43	0.3758
Panipenem	28.07	23.39	31.58	27.68	4.11	0.1412
Cefaclor	31.58	26.90	37.43	31.97	5.27	0.3288
Faropenem	32.75	29.24	38.60	33.53	4.73	0.7223
Biapenem	35.09	32.75	40.94	36.26	4.22	0.4970
Cefotaxime	49.12	53.80	56.14	53.02	3.57	0.0063
Cefotiam	53.80	51.46	54.97	53.41	1.79	0.8740
Cefozopran	52.63	52.63	58.48	54.58	3.38	0.6240
Cefditoren	53.80	58.48	54.97	55.75	2.43	0.6520
Piperacillin	52.63	61.99	53.80	56.14	5.10	0.9106
Cefdinir	58.48	58.48	60.82	59.26	1.35	0.3636
Ceftizoxime	58.48	70.18	73.68	67.45	7.96	0.1539

a) : A t-test was performed for values in the upper rows.

Table 4. Inhibitory ratio (Ir) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to each PBPs of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics at 4x MIC levels

Antibiotics	MIC (%)		Ir of binding of [ <sup>3</sup> H]benzylpenicillin to each PBP (%)						
	$\mu$ g/ml	Log 2	PBP 1 A	PBP 1 B	PBP 2	PBP 3	PBP 4	PBP 5	PBP 6
Benzylpenicillin	32	5	100	100	100	100	100	99.7	100
Ampicillin	4	2	96.0	65.5	100	100	90.6	0.0	33.0
Amoxicillin	8	3	99.4	87.9	100	99.9	95.9	0.0	63.5
Piperacillin	2	1	68.2	71.7	98.0	91.0	32.2	11.8	6.6
Cefmetazol	1	0	100	84.2	0.0	88.0	89.7	91.2	69.6
Cefotiam	0.125	-3	84.1	49.5	9.0	85.2	10.0	0.0	0.0
Cefotaxime	0.125	-3	62.7	50.0	0.0	73.8	0.0	0.0	0.0
Ceftizoxime	0.0625	-4	79.0	68.5	23.9	82.8	11.4	6.0	0.0
Cefozopran	0.0625	-4	10.8	25.2	16.2	64.6	0.0	1.9	2.5
Cefaclor	4	2	99.0	82.3	32.2	98.6	95.7	0.0	0.0
Cefdinir	0.5	-1	95.5	78.7	62.4	91.7	73.3	0.0	0.0
Cefditoren	0.5	-1	82.4	91.6	17.2	84.8	8.4	0.0	0.0
Imipenem	0.125	-3	73.6	30.0	91.6	0.0	76.6	53.5	4.1
Panipenem	0.125	-3	78.0	58.4	94.6	10.1	82.3	52.9	11.8
Biapenem	0.0625	-4	4.7	0.0	85.9	0.0	73.8	0.0	0.0
Faropenem	0.5	-1	80.4	38.9	100	0.3	97.1	53.5	2.1

も重相関式を求めることができるが、その精度は Table 2 に示した精度より劣る結果であった。また、Table 1 には示さなかったが、1/2 xMIC 時点での重回帰分析では、採用された説明変数に MIC 時点でのそれと相違がなく、精度がやや劣るという結果であった。

### 3. 薬添加時の生菌数の測定

各  $\beta$ -ラクタム薬添加 2 時間後の生菌数の変化については、MIC の薬剤添加ではいずれの薬剤においても生菌の減少率に有為な差を見出すことはできなかった。2 xMIC の薬剤添加では AMPC と PCG との間に有為の差が見られたが、その他の薬剤間には有為な差を見出すことはできなかった。

4 xMIC の薬剤添加では Table 3 に示すように、複数の薬剤間に有為な差が見られた。そして、その減少率を

平均値と比較すると、生菌数が当初の菌数の 1/10 以下に減少する薬剤 (AMPC, PCG および ABPC) と、1/5 以下~1/10 未満である薬剤 (CMZ, IPM, PAMP, CCL, FRPM および BIPM) および 1/5 未満である薬剤 (CTX, CTM, CZOP, CDTR, PIPC, CFDN および CZX) の 3 群に分けられる。この 3 群をそれぞれカテゴリー 3、2 および 1 として判別分析を行った。

ただし、この際の添加薬剤濃度は 4 xMIC であるので、Table 4 に示すように 4 xMIC 時点における各  $\beta$ -ラクタム薬の PBPs に対する Ir を MIC 時点と同様にして求め、その際に得られる説明変数を用いて解析を行った。また、Table 1 には示していないが、念のために MIC 時点における Ir についても解析を行った。

結果は Table 5 に示す。カテゴリー 1 : 2 を判別する



有意な説明変数としては、PBP 4 に対する Ir([4])が採用されている。次いで PBP 2 と PBP 3 に対する Ir の和([2+3])が採用されている。カテゴリー 1 : 3 を判別する有意な説明変数としては、PBP 6 に対する Ir([6])と PBP 4 と PBP 5 に対する Ir の差([4-5])が採用されている。カテゴリー 2 : 3 を判別する有意な説明変数としては [2+3] が採用され、その他に PBP 1 B と PBP 6 に対する Ir の差([1 B-6])が採り上げられている。それぞれの判別式から得られた判別得点の精度を示す判別の中率 (hitting ratio), 誤判別の確率 (error probability), および相関比 (correlation ratio) は共に高いものであった。

また、これらの説明変数と相関性の高い変数はそれぞれの Table の下段に示した。[4] を除き、その他の説明変数で 0.9 以上の相関係数を示すその他の変数が見当たらないことが注目された。

MIC 時点における判別分析の結果は Table に示していないが、採用された有意な説明変数を記すと、カテゴリー 1 : 2 とカテゴリー 1 : 3 では [4] のみが共通して採用されており、2 : 3 では [2+3] が採り上げられている。基本的には 4 xMIC 時点の判別分析と大差は認められなかった。

#### 4. 薬剤添加時に見られる菌の形態変化

各  $\beta$ -ラクタム薬を大腸菌に添加した 2 時間後の形態変化を Fig. 5 に示す。これらの細菌の長径を計測した結果、形態変化は主として、a) 球状を呈する薬剤 (IPM, PAMP, BIPM および FRPP: カテゴリー 1), b) やや長い桿菌状を呈する薬剤 (PCG, ABPC, AMPC, CCL および CMZ: カテゴリー 2), および c) 長いフィラメントを形成する薬剤 (PIPC, CTM, CTX, CCL, CZX, CZOP, CFDN および CDTR: カテゴリー 3) に分類された。また、これらの形態変化に加え、細菌の分裂増殖が開始されると想定される菌体の中央部に d) 容易に観察される薬剤 (PCG, ABPC, AMPC, CMZ, CCL, CFDN, PIPM および FRPM: カテゴリー 2) と、e) bulge 形成が観察されにくい薬剤 (PIPC, CTM, CTX, CZX, CZOP, CDTR, IPM および BAPM: カテゴリー 1) とに分類された。

フィラメント形成に関する判別分析の結果を Table 6 に示す。この際の判別分析も 4 xMIC の薬剤添加時の Ir から得られた説明変数を用いたが、念のために MIC の薬剤添加時の判別分析も行っている。

カテゴリー 1 : 2 を判別する説明変数としては、[3] と [2] が有意であった。カテゴリー 1 : 3 を判別する有意な説明変数としては、PBP 3 と PBP 6 に対する Ir の差([3-6])と、PBP 3 と PBP 4 に対する Ir の差([3-

Table 5. Discriminant analysis of bactericidal action based on the inhibitory ratio (Ir) of binding [ $^3$ H]benzylpenicillin to each PBP by  $\beta$ -lactam antibiotics at 4 x MIC levels.

Criterion variable: Bactericidal action (based on the decrease (%) in viable cells after 2 h addition of  $\beta$ -lactams.)

Category 1: Decrease of the viable cells at start point to <1/2.

Category 2: Decrease of the viable cells at start point to  $\geq 1/2$  - <1/10.

Category 3: Decrease of the viable cells at start point to  $\geq 1/10$ .

N = 16

Category	Explanatory variable	Discriminant coefficient	Mahalanobis square distance	F-value	Probability
1:2	[4] <sup>a)</sup>	-0.3778	0.1853	76.7787	0.0000
	[2+3] <sup>a)</sup>	0.1844	10.6407	12.1807	0.0058
	Constant term	0.0753			
	Hitting ratio <sup>b)</sup> :100%	Error probability <sup>c)</sup> :0.42%		Correlation ratio:0.8907	
1:3	[6] <sup>a)</sup>	-0.4903	1.6999	49.0983	0.0002
	[4-5] <sup>a)</sup>	-0.1935	14.4196	9.9546	0.0160
	Constant term	23.9993			
	Hitting ratio <sup>b)</sup> :100%	Error probability <sup>c)</sup> :0.07%		Correlation ratio:0.9137	
2:3	[2+3] <sup>a)</sup>	-3.3611	0.3584	561.7481	0.0000
	[1 B-6] <sup>a)</sup>	1.6973	50.4010	34.6413	0.0011
	Constant term	459.1942			
	Hitting ratio <sup>b)</sup> :100%	Error probability <sup>c)</sup> :0.00%		Correlation ratio:0.9904	

a): It means the inhibitory ratio (Ir) of binding [ $^3$ H]benzylpenicillin to PBPs by  $\beta$ -lactams. Explanatory variable and other variables with correlation coefficient greater than 0.9.

[4] : [2+4] (0.9036), [4+6] (0.9034)

[2+3] :None

[6] :None

[4-5] :None

[1 B-6] :None

b): Hitting ratio is the value obtained by deducting the apparent error rate from 1.

c): The Z-value was obtained from the Mahalanobis square distance, and the probability corresponding to the Z-value was calculated by using the standard normal distribution.

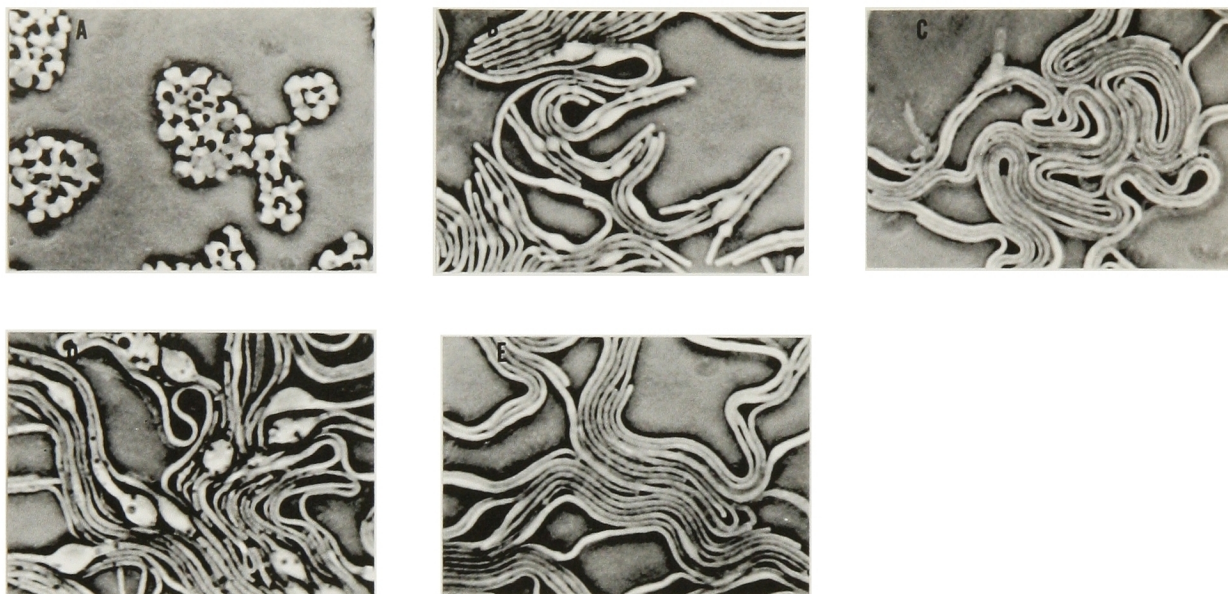


Fig. 5. Morphological changes of *Escherichia coli* after 2 hour cultivation at 37°C in the Mueller Hinton broth contained with  $\beta$ -lactams at 4 $\times$  MIC levels.

a): ovoid cells, b): slightly elongated cells, c): filamentous cells, d): bulge formed cells at cell division site, e): no bulge formation cells.

Table 6. Discriminant analysis of the morphological changes based on the inhibitory ratio (Ir) of binding of [ $^3$ H]benzylpenicillin to each PBP of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics at 4 $\times$  MIC levels (1)

Criterion variable: Morphological changes (based on the phase-contrast MICROscopic findings obtained after 2-h cultivation with the  $\beta$ -lactams)

Category 1: Ovoid cells

Category 2: A little elongated cells

Category 3: Elongated, filament-shape cells

N = 16

Category	Explanatory variable	Discriminant coefficient	Mahalanobis square distance	F-value	Probability
1:2	[3] <sup>a)</sup>	-8.0438	0.2561	1,192.8045	0.0000
	[2] <sup>a)</sup>	0.9814	293.8593	8.1380	0.0357
	constant term	318.0064			
Hitting ratio <sup>b)</sup> : 100%		Error probability <sup>c)</sup> : 0.00%		Correlation ratio: 0.9966	
1:3	[3-6] <sup>a)</sup>	-2.2227	30.1593	68.6424	0.0000
	[3-4] <sup>a)</sup>	-0.7425	84.2814	20.9075	0.0013
	constant term	80.8986			
Hitting ratio <sup>b)</sup> : 100%		Error probability <sup>c)</sup> : 0.00%		Correlation ratio: 0.9872	
2:3	[3-6] <sup>a)</sup>	-0.5569	2.3194	45.0112	0.0003
	[3] <sup>a)</sup>	-0.4563	28.1351	2.9004	0.1323
	[5-6] <sup>a)</sup>	-0.2149	27.4625	3.1137	0.1210
	[1A-1B] <sup>a)</sup>	0.2948	29.3530	2.5361	0.1553
	constant term	-14.9311			
Hitting ratio <sup>b)</sup> : 100%		Error probability <sup>c)</sup> : 0.07%		Correlation ratio: 0.9168	

a): It means the inhibitory ratio (Ir) of binding [ $^3$ H] benzylpenicillin to PBPs by  $\beta$ -lactams. Explanatory variable and other variables with correlation coefficient greater than 0.9.

[3] : [1B+3] (0.9588), [1A+3] (0.9065)

[2] : [2+4] (0.9125)

[3-4] : [1B-4] (0.9264)

[3-6] : None

b): Hitting ratio is the value obtained by deducting the apparent error rate from 1.

c): The Z-value was obtained from the Mahalanobis square distance, and the probability corresponding to the Z-value was calculated by using the standard normal distribution.



4])が採用されている。カテゴリ 2 : 3 の有意な説明変数としては [3-6] が採用されている。この判別式の精度を示す判別の中率, 誤判別の確率および相関比も高いものであった。また, これらの説明変数と相関性の高い変数は Table 6 の下段に示した。

一方, MIC 時点における判別分析では, カテゴリ 1 : 2 で [4], [2-3], [2+4] および [3-5] と多数の変数が説明変数として採り上げられており, カテゴリ 1 : 3 では [2-3], カテゴリ 2 : 3 では [4+5] のみが説明変数として採り上げられていた。この際の説明変数は  $4 \times \text{MIC}$  でのそれとかなり異なっていたが, それぞれのカテゴリに PBP 2, PBP 3 および PBP 4 が多く関与していることは共通していた。

Bulge 形成に関する判別分析を Table 7 に示す。有意な説明変数として [4] が採用され, その他に [1 B] も有意な説明変数として採り上げられている。この精度を示す判別の中率, 誤判別の確率および相関比もかなり高いものであったが, 前 2 者の判別分析の精度に比してはやや低いものであった。これらの説明変数と相関性の高い変数は Table 7 の下段に示してある。また, Table 7 には示さなかったが, MIC 時点での判別分析においては [4] のみが有意な説明変数であった。

### III. 考 案

細菌の細胞壁合成に関与する PBPs の機能については, Spratt<sup>1)</sup>による PBPs の検出法が確立して以来, PBP の欠損株や特定の PBP に親和性を示す  $\beta$ -ラクタム薬等を用いての遺伝生化学的な研究が行われてきた。それらの業績の多くは総説<sup>3-6)</sup>として紹介されているが, 臨床との関連において論ぜられた論文は少ない。

細胞壁合成に関与する PBPs の機能は大きくは 2 つに分けられる。1 つはペプチドグリカンの糖鎖を繋いで

いく transglycosylase (TGase) と transpeptidase (TPase) であり<sup>7-13)</sup>, もう 1 つは架橋されたペプチド末端に作用する D-alanine-carboxypeptidase (CPase) と DD-endopeptidase (EPase) である<sup>14-16)</sup>。PBP 1 A, PBP 1 B および PBP 3 は TGase と TPase の 2 機能を有し<sup>7-11, 13)</sup>, PBP 2 は TPase のみの機能を有するとされている<sup>12)</sup>。さらには,  $\beta$ -ラクタム薬の主たる作用は分子量の大きい PBP 1 A, PBP 1 B, PBP 2 および PBP 3 (HMW PBPs) の TPase を阻害することにあるとされている。ことに PBP 1 B を阻害することが細菌に致命的な障害を与え, 溶菌に至らしめると重視されている<sup>7, 11, 19-22)</sup>。その反面, カルバペネム系薬の中には PBP 1 A の TGase を阻害するという報告<sup>23)</sup>もあるが, その致死的影響については確認するに至っていない。

分子量の小さな PBPs (LMW PBPs) のうち, PBP 4 は CPase と EPase の 2 機能<sup>15, 16)</sup>を有し, PBP 5 および PBP 6 は CPase の機能<sup>14, 17, 18)</sup>を有するとされている。しかし, これらの LMW PBPs は, それらが欠損している菌株においても生存可能なことから, 生死に直接かわりがない補助的な役割をしていると解され<sup>15, 16, 19, 24)</sup>,  $\beta$ -ラクタム薬の主たる作用標的として評価されていない。

また, 各種  $\beta$ -ラクタム薬を作用させた際の PBPs に対する特異的な親和性と形態変化の特徴から, PBP 1 A および 1 B は細胞壁の側壁合成を, PBP 3 は細胞の分裂時に必要な中隔壁の合成を, PBP 2 は桿菌の形状を保つ機能に関与していると考えられている<sup>20-22)</sup>。

一方,  $\beta$ -ラクタム薬の主たる作用点は PBP 1 B<sup>7, 11, 19-21)</sup>であるとされながらも, 第 3 世代セフェム系薬は PBP 3 に選択的に強い親和性を示し, MIC を良好にしている<sup>13, 25, 26)</sup>。ただし, その際の菌は中隔壁を欠いてフィラメントを形成し, 殺菌性は必ずしも優れた結果を示さな

Table 7. Discriminant analysis of the morphological changes based on the inhibitory ratio (Ir) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to each PBP of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics at  $4 \times \text{MIC}$  levels. (2)

Criterion variable: Bulge formation (based on the phase-contrast MICROscopic findings obtained after 2-h cultivation with the $\beta$ -lactams)					
Category 1: No bulge formation in the equatorial region					
Category 2: Bulge formation in the equatorial region					
Category	Explanatory variable	Discriminant coefficient	Mahalanobis square distance	F-value	Probability
1:2	[4] <sup>a)</sup>	-0.1682	1.1103	35.3126	0.0000
	[1 B] <sup>a)</sup>	-0.1093	7.5897	7.0848	0.0196
	constant term	16.55899			
Hitting ratio <sup>b)</sup> : 100%		Error probability <sup>c)</sup> : 3.24%		Correlation ratio: 0.7957	

a): It means the inhibitory ratio (Ir) of binding [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to PBPs by  $\beta$ -lactams. Explanatory variable and other variables with correlation coefficient greater than 0.9.

[4] : [2+4] (0.9036), [4+6] (0.9034)

[1 B] : [1 A+3] (0.9038)

b): Hitting ratio is the value obtained by deducting the apparent error rate from 1.

c): The Z-value was obtained from the Mahalanobis square distance, and the probability corresponding to the Z-value was calculated by using the standard normal distribution.

い<sup>25</sup>。その片側で、カルバペネム系薬剤はPBP 2とPBP 4に強い親和性を示すが、PBP 3に対しては必ずしも優れた親和性を示さない<sup>23,27</sup>。しかし、MICは第3世代セフェム系薬と同様に良好な成績を示している。

このような $\beta$ -ラクタム薬の大腸菌のPBPに対する作用の相違は、各 $\beta$ -ラクタム薬が有する化学構造に由来するに違いないが、この際、基本骨格の異なる $\beta$ -ラクタム薬数種ずつを選び、大腸菌に対する結合親和性の相違を同時に比較し、MICや殺菌効果あるいは菌の形態変化におよぼす影響をあらためて検討することが必要と考えた。その理由は、いままでに個々の $\beta$ -ラクタム薬について検討されてきたことを同時に検討することが、今後の $\beta$ -ラクタム薬の開発に役立つと考えたからである。

通常、 $\beta$ -ラクタム薬の親和性はアイソトープラベルされたbenzylpenicilinのPBPへの結合を50%阻止する被験 $\beta$ -ラクタム薬の濃度(ID 50)で表現される<sup>1</sup>。今回、われわれが行った実験においても、上述した評価法を視野にいれながら、MICを中心とした2倍階段希釈による一定の濃度幅の被験 $\beta$ -ラクタム薬を大腸菌の膜画分に加えて、<sup>3</sup>H]benzylpenicillinの結合を阻止する率(結合阻止率: Ir)を求め、各種 $\beta$ -ラクタム薬のPBPに対する親和性を論じようとしたものである。これに似た手法を用いた論文にはTomaszらの論文<sup>28</sup>がある。ただ、彼等が対象とした細菌は肺炎球菌である。また、細菌の膜画分を用いた実験ではなく、生菌を培養した中での $\beta$ -ラクタム薬と<sup>3</sup>H]benzylpenicillinの相互作用を見たものである。しかしながら、彼等が示したfluorographyによるIrの変動は、添加した $\beta$ -ラクタム薬の濃度に依存しており、われわれが示したFig. 2と同様な曲線を示している。しかし、彼らはそれ以上に統計的解析を加えていない。

われわれが測定した各 $\beta$ -ラクタム薬が示すIr曲線を図にまとめると興味深い(Fig. 3)。ある意味では各 $\beta$ -ラクタム薬のPBPに対するkineticsとも思われる濃度依存的な曲線として眺めることもできる。恐らく、これらの曲線は反応速度等を考慮に入れた解析が可能であれば酵素反応式としても描けるものと思われる。本研究においては、そのような反応速度を考慮して、1/2 x MIC時点におけるIrを説明変数とする解析も行ったが、MIC時点におけるそれとの間に大きな相違を見出すに至らなかった。

一方、従来から $\beta$ -ラクタム薬の主たる作用点はPBP 1 B<sup>7,11,19-21</sup>にあるといわれていることから、各種 $\beta$ -ラクタム薬が各PBPに対して示すIr 10からIr 90に至る添加薬剤濃度とMICとの関係を調べた。その相関係数は確かにPBP 1 Bにおいて高い値を示すものの(Fig. 4)、Ir 50においてもっとも高い値を示すものではなかった。

むしろ、視点を変えて $\beta$ -ラクタム薬が示すMIC時点でのIrそのものを検討すると、PBP 1 BにおけるIrがMICともっともよく相関する(Table 1)。しかし、カルバペネム系薬の中にはその値が0のものもあり、MICをPBP 1 Bに対するIrのみで説明するのは適切でないと考えられた。また、PBP 1 B以外のPBPにおいてもMICと0.5以上の相関係数を示すことが示され、 $\beta$ -ラクタム薬の大腸菌に対するMICは、それぞれの $\beta$ -ラクタム薬が有するPBPに対する結合親和性の相互作用によって表現されるのが妥当と考えられた。

そのため、PBPに対する各 $\beta$ -ラクタム薬の相互作用を解析することを目的として、MIC時点でのPBPに対するIr、あるいは各PBP間のIrの和または差を説明変数とし、MICを目的変数とする重回帰分析を行った(Table 2)。とり上げられた有意な説明変数[1 B+4]および[3]の偏回帰係数は正の値である。つまり、[1 B+4]および[3]の値が高い $\beta$ -ラクタム薬ほど、MICは高い値、すなわち良好でなくなることになる。このことは『PBP 1 Bsは $\beta$ -ラクタム薬の主たるtargetで、PBP 1 Bsを阻害すると容易に溶菌する』こととも、『PBP 4以下のLMW PBPは細菌の生存に直接関与しない補助的な役割をしている』こととも矛盾しているように見える。また『第3世代セフェム系薬においてPBP 3に強い親和性を有することがMICを良好にしている』という説とも反するよう見える。以下に、この一見矛盾することに対する考察を加える。

MICとは一定の条件のもとに菌を薬剤存在下で培養したとき、肉眼的に菌の増殖が認められない最小薬剤濃度である。一方、 $\beta$ -ラクタム薬の主たる作用点は細胞壁の合成を阻害することであり、対数増殖期にある菌に対して殺菌的に働く。つまり、 $\beta$ -ラクタム薬が示すMICには細菌の分裂増殖を阻止する面と、殺菌に至らしめる二面があることになる。しかし、殺菌には細胞壁の合成を未完に終わらせ、その部位を脆弱にし、浸透圧の差によって溶菌せしめることが必要である。細胞壁が脆弱になる個所は、既存の細胞壁より細胞壁の合成が盛んな分裂開始の細胞壁面において顕著である。そのことは、フィラメント化された大腸菌の中央部位においてbulgeが形成され、その部位より崩壊して溶菌に至ることが、位相差顕微鏡ならびに電子顕微鏡下で観察されることから明らかである<sup>27</sup>。

そのことを考慮すれば、[3]が中隔形成を阻害することにより菌の分裂増殖の阻止にかかわっていることは容易に推定できる。しかし、[3]が溶菌に直接かかわっているかについては、もう少し考察を加える必要がある。なぜなら、フィラメントを形成した菌が溶菌に至るには、その前提にbulgeの形成がなければならぬからである。そのことはPBP 3に良好な親和性を有する $\beta$ -ラクタム薬のすべてが、一様に容易にbulge形成をする



とは限らないことからもうかがえる。

PBP 3 については多くの研究がある<sup>29-35)</sup>。諸家の報告は Nanninga<sup>5)</sup> の総説に委ねるが、要するに Divisome と呼ばれる蛋白集団があり、それらの相互作用によって最終的に細胞膜は切断されるが、その切断点と接する細胞壁に鋭角な刻み込み (constriction) を入れる機能については、化学的な反応がどれだけ関与しているのか、細胞膜の切断において生じた細胞壁間のストレスに対する物理的な現象がどれだけ関与しているのか、まだ議論の余地があるということである。この間において PBP 3 も PBP 1 B も細胞間隙にあって Divisome の一端を担っているが、細胞壁面の分裂開始にいかなる役割を担っているのか詳らかではない。ただ、PBP 3 と PBP 1 B との間には Divisome にかかわる他の蛋白と同様に相互作用があるという報告<sup>36)</sup>もある。いずれにしても、PBP 3 の機能が抑制されれば中隔の形成が抑制され細胞の分裂増殖が抑制されるに違いないが、溶菌に繋がる細胞分裂開始部位に直接的な機能を有していないことも確かなようである。

溶菌に繋がる細胞分裂部位の細胞壁合成には [1 B+4] が関与していると考えるのが妥当なようである。そのことは PBP 1 B が殺菌にかかわる  $\beta$ -ラクタム薬の主用な作用標的であることから<sup>7,11,19,21)</sup>肯ける。しかし、[1 B+4] として関与しているとはいかなることであろうか。PBP 4 は CPase と Epase<sup>15,16)</sup>の 2 機能を有しているが、細菌の生存に直接かわりないものとして<sup>15,16,19,24)</sup>重要視されていない。反面、[1 B+4] が有意な説明変数としてとり上げられたからには、PBP 1 B と PBP 4 の間に重要な相加的作用があるとも考えられる。つまり、機能は異なっているけれども、その総合として細胞壁面の合成は未完に終わるということである。もちろん、未完に終わる細胞壁は分裂に際して生ずる新しい細胞壁面にもっとも顕著なはずである。いずれにしても、新しく生ずる細胞壁の分裂に必要な constriction の部位には PBP 1 B のみならず、PBP 4 も強く関与していることが MIC に関する重回帰分析の上からは示唆される。

その殺菌作用をさらに確かめる目的で、4 xMIC の薬剤添加後の菌数の減少率から判別分析 (Table 5) を行った。カテゴリー 1 : 2 においては [4] と [2+3] が関与している。[4] の判別係数は負の値であり、[2+3] のそれは正の値である。つまり、[4] の値が大きければ溶菌に傾くし、[2+3] の値が大きければ静菌に傾くことになる。このことは重回帰分析による解析結果と矛盾しない。PBP 4 は正しく細胞分裂部位における新しい細胞壁面合成の仕上げの段階に関与していると示唆される。その機能が阻害されれば細胞壁は脆弱になり容易に溶菌する。このことは  $\beta$ -ラクタム薬の抗菌作用は細菌の対数増殖期において見られるという theory と矛盾しない。

殺菌効果のカテゴリー 1 : 2 において正の値を示した [2+3] は、カテゴリー 2 : 3 では負の値となっている。つまり、[2+3] はカテゴリー 2 に属する  $\beta$ -ラクタム薬の特性ということになる。カテゴリー 2 にはカルバペネム系薬やペネム系薬、さらには CCL や CMZ といった初期のセフェム系薬が属している。PBP 3 の機能が阻害されれば長いフィラメントを形成する<sup>13,25,26)</sup>。PBP 2 は桿菌の形状を保つ機能に関与している<sup>20-22)</sup>。つまり、[2+3] の持つ意味は細菌の中隔形成が阻害されても、細菌の長軸を保つ酵素が阻害されても、菌の分裂は遅延して新生される細胞は少なく、そのことから PBP 4 の機能も発揮されずに、殺菌の速度もまた鈍くなるものと解される。

殺菌効果の判別分析 1 : 3 においては [6] と [4-5] が説明変数として採用されている。結果の項に記した如く、MIC 時点における判別分析では [6] に代わって [4] が採用されている。Table 1 と Table 4 によると、カテゴリー 1 と 3 に属する薬剤間に格段の差が見られる Ir は PBP 4 と PBP 6 である。殺菌性に関してはいままであまり重要視されなかった LMW PBPs に対する認識を新たにすることがありそうである。

そのような目で、あらためて Table 1 の右端に示す各 PBP の総和を見ると、カテゴリー 1 に属する第 3 世代セフェム系薬を含む  $\beta$ -ラクタム薬では総和の値が小さい。また、相対比として ( ) の中に示した値は PBP 3 において特異的に大きい。つまり、さきに見矛盾するとして指摘した『第 3 世代セフェム系薬において PBP 3 に強い親和性を有することが MIC を良好にしている』ということは、第 3 世代セフェム系薬の大腸菌の PBPs に対する Ir が総じて低いことと、PBP 3 に対する Ir のみが選択的に高いことが MIC を良好にしている key になっているということである。

もう 1 つ考察を加えなければならぬことがある。それは、殺菌効果のカテゴリー 1 : 3 においては [4-5] もまた有意な説明変数として採用されていることである。PBP 4 が有する意味についてはすでに考察した。PBP 5 もまた PBP 4 と同様に C<sub>p</sub>ase としての機能を有している。しかし、この判別式からは [4-5] の値が大きいかほど菌数の減少に関与することになる。つまり、[4] は単独でも菌数の減少に関与するのであるから、[4-5] からは PBP 5 には PBP 4 と拮抗的に働く機能があるとも解される。拮抗が適当でないなら、PBP 5 は PBP 4 が担当している細胞分裂部位とはかわりのない部位において細胞壁合成の補助的な働きをしていることになる。

殺菌効果のカテゴリー 2 : 3 の [2+3] と [1 B-6] の関係についても同様な考察が可能である。すなわち、ここでは [2+3] の値が大きければより殺菌効果が見られ、[1 B-6] の値が大きければ殺菌効果がやや抑制されて

いる。また、このことは、カテゴリー 1 : 2 において [2+3] は静菌的に働くとしたこととも一見矛盾する。[2+3] の値を Table 1 から求めると、カテゴリー 3 に属するペニシリン系薬の方が大きな値となる。しかし、もう 1 つの説明変数 [1B-6] では逆に低い値となる。つまり、[1B] の値に比し [6] の値が大きければ [2+3] との兼ね合いにおいて、より溶菌し易いということになる。もう 1 つ言い換えれば、PBP 6 には PBP 1B が作用する部位とは異なるところで機能する補助機能があることになる。

[2+3] の値が大きい際には [2] と [3] のいずれかの大きさに従って、フィラメントを形成するか球形 (ovoid) となるはずである。この形態変化からは、その部位においても細胞壁の合成が細胞分裂開始部位ほどではないとしても行われていることが示されている。PBP 6 はそのような部位での細胞壁合成にかかわる補助的な働きをしているとも考えられる。つまり、溶菌作用の強い  $\beta$ -ラクタム薬においては、細胞分裂部位のみならず、細胞が正常に伸展していく部位においても作用することが、速やかな溶菌作用に繋がるのかも知れない。

菌の形態変化からは  $\beta$ -ラクタム薬の MIC にかかわる 2 つの側面がうかがえる。1 つはフィラメント形成に伴い菌の分裂が抑制される面である。もう 1 つは殺菌につながる bulge 形成の面である。フィラメント形成に関する判別分析においては、カテゴリー 1 : 3 および 2 : 3 において [3-6] が共通な説明変数として採用されている。つまり、[3] の値が [6] の値に比して大きければ大きいほど長大なフィラメントを形成する。殺菌作用にかかす考察において PBP 6 は PBP 3 か PBP 2 のいずれかがかかわる細胞壁合成に補助的機能を有しているかもしれないと述べたが、同様な思考をすれば PBP 6 は PBP 3 がかかわる中隔壁合成とは別な部位の補助的機能を有することになる。すなわち、PBP 6 は PBP 2 の細胞壁合成にかかわる補助的機能を有しているとも考えられる。

また、カテゴリー 1 : 3 においては有意な説明変数として [3-4] も関与している。PBP 4 の機能に関してはすでに考察した。Table 1 よりカテゴリー 1 と 3 に属する  $\beta$ -ラクタム薬の [3-4] の値を求めると、その値が大きいほど長大なフィラメントを形成することになる。言い換えれば、細胞の分裂部位における細胞壁合成の補助的機能が阻害されないほど、長いフィラメントが形成されることになる。そして、そのことがフィラメント形成時に見られる bulge 形成とも関係してくる。

Bulge 形成には [4] と [1B] が関与している。共に判別係数は負の値である。[4] または [1B] の値が大きいほど短時間で bulge を形成することになる。bulge 形成は細胞が新たに分裂増殖するために用意した constriction の部位に生ずることはすでに述べた。つま

り、多変量解析においてこの部位に有意に関与する PBP こそ、溶菌に関してもっとも重要な key を握っていることになる。今後、そのことを直接確かめる研究が望まれる。

以上を総合すると大腸菌の PBP については、次のことが言える。大腸菌の細胞壁合成に関与する主要な機能が PBP 1A と PBP 1B にあることは、従来の見解と変わらない。しかし、菌の分裂増殖に関与する PBP として PBP 1B が強く関与していることが示唆された。おそらく PBP 1B は菌が分裂する際に必要な constriction に強く関与していると考えられる。PBP 2 が桿菌の形状を保つ機能を有していることと、PBP 3 が細胞壁の中隔形成に関与する機能を有していることは、従来の見解と変わらない。ここで重要なことは PBP 4 が果たす機能を重要視することであろう。PBP 4 の機能は PBP 1B に対応して細菌の分裂増殖に際して生じた新しい界面の細胞壁合成にもっとも活性化した役割を果たしていると考えられる。そして、PBP 4 の機能を強く阻害する  $\beta$ -ラクタム薬を見出すことが、殺菌性の強い  $\beta$ -ラクタム薬の開発に繋がると考えられる。しかしながら、MIC が良好である  $\beta$ -ラクタム薬の開発を考慮すれば、[1B+4] の値が小さいことも 1 つの条件となる。

このように  $\beta$ -ラクタム薬の MIC と殺菌性の関係には、二律背反する現象が見られる。このことを考慮すれば、これらが多変量解析による究極の  $\beta$ -ラクタム薬とは、PBP 4 に対して強い親和性を有する片側で、PBP 1B と PBP 3 に対する親和性は PBP 4 のそれよりも低い  $\beta$ -ラクタム薬を見出すことになると考えられる。またその際には、全 PBP に対する Ir の総和が低いことも絶対必要な条件となる。

このことは大腸菌 NIHJ-JC 2 に限らず、臨床分離株 TK-705 株および TK-2241 株においても同様な結果であった。そのため、本論文においては重複を避けて、大腸菌 NIHJ-JC 2 において得られたデータのみを記した。

## 文 献

- 1) Spratt B G: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. *Eur. J. Biochem.* 72: 341~352, 1977
- 2) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy.* 29: 76~79, 1981
- 3) Waxman D J, Strominger J L: Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 825~869, 1983
- 4) Matsushashi M, Wachi M, Ishino F: Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res. MICrobiol.* 141: 89~103, 1990
- 5) Nanninga N: Morphogenesis of *Escherichia coli*. *MICrobiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 110~129, 1998
- 6) Massova I, Mobashery S: Kinship and Diversifica-



- tion of bacterial penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *AntiMICrob. Agents Chemother.* 42: 1~17, 1998
- 7) Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhashi M: Purified penicillin-binding proteins 1 Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1379~1380, 1979
  - 8) Ishino F, Mitsui K, Tamaki S, et al.: Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1 A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 287~293, 1980
  - 9) Matsuhashi M, Ishino F, Nakagawa J, et al.: Enzymatic activities of penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* and their sensitivities to  $\beta$ -lactam antibiotics. in  *$\beta$ -Lactam antibiotics—Mode of action, new developments, and future prospects* (Salton M R J, Shockman G D, ed.), p.169~184, Academic Press, New York, London, 1981
  - 10) Matsuhashi M, Nakagawa J, Ishino F, et al.: Penicillin-binding proteins: their nature and functions in the cellular duplication and mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. in *Beta-lactam antibiotics* (Matsuhashi S ed), p.203~223, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981
  - 11) Nakagawa J, Matsuhashi M: Molecular divergence of a major peptidoglycan synthetase with transglycosylase-transpeptidase activities in *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1 Bs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29: 1546~1553, 1982
  - 12) Ishino F, Park W, Tomioka S, et al.: Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J. Biol. Chem.* 261: 7024~7031, 1986
  - 13) Ishino F, Matsuhashi M: Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 905~911, 1981
  - 14) Spratt B G, Strominger J L: Identification of the major penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase 1 A. *J. Bacteriol.* 127: 660~663, 1976
  - 15) Matsuhashi M, Takagaki Y, Maruyama I N, et al.: Mutants of *Escherichia coli* lacking in high penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2976~2979, 1977
  - 16) Iwaya M, Strominger J L: Simultaneous deletion of D-alanine carboxypeptidase 1 B-C and penicillin-binding component IV in a mutant of *Escherichia coli* K 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2980~2984, 1977
  - 17) Matsuhashi M, Tamaki S, Curtis S J, et al.: Mutational evidence for identity of penicillin-binding protein 5 in *Escherichia coli* with major D-alanine carboxypeptidase 1 A activity. *J. Bacteriol.* 137: 644~647, 1979
  - 18) Amanuma H, Strominger J L: Purification and properties of penicillin-binding protein 5 and 6 from *Escherichia coli* membranes. *J. Biol. Chem.* 255: 11173~11180, 1980
  - 19) Izaki K, Matsuhashi M, Strominger J L: Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 656~663, 1966
  - 20) Spratt B G: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2999~3003, 1975
  - 21) Tamaki S, Nakajima S, Matsuhashi M: Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1 Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5472~5476, 1977
  - 22) Suzuki H, Nishimura Y, Hirota Y: On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutations of *Escherichia coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 664~668, 1978
  - 23) Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, et al.: Studies on the mechanism of action of imipenem (*N*-formimidoylthienamycin) *in vitro*: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J. Antibiotics* 37: 394~400, 1984
  - 24) Matsuhashi M, Murayama I N, Takagi Y, et al.: Isolation of a mutant of *Escherichia coli* lacking penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase 1 A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2631~2635, 1978
  - 25) 横田 健: 作用機序。  $\beta$ -ラクタム系薬 (上田 泰, 清水喜八郎編), p.4~17, 南江堂, 東京, 1987
  - 26) 紺野昌俊: 形態変化。  $\beta$ -ラクタム系薬 (上田 泰, 清水喜八郎編), p.48~59, 南江堂, 東京, 1987
  - 27) 生方公子, 杉浦 睦, 紺野昌俊: カルバペネム系抗菌薬, biapenem の *in vitro* 抗菌活性について。 *Chemotherapy* 42: 20~25, 1994
  - 28) Williamson R, Hakenbeck R, Tomasz A: *In vivo* interaction of  $\beta$ -lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *AntiMICrob. Agents Chemother.* 18: 629~637, 1980
  - 29) Bi E, Lutkenhaus J: Cell ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *nature* (London) 354: 161~164, 1991
  - 30) Nanninga N: Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol. MICrobiol.* 5: 791~795, 1991
  - 31) Hale C A, de Boer P A: Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* 96: 1~20, 1997
  - 32) Begg J K, Donachie W D: Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and

- division mutants. *J. Bacteriol.* 163: 615~622, 1985
- 33) Taschner P E, Ypenburg N, Spratt B G, et al.: An amino acid substitution in penicillin-binding protein 3 creates pointed polar caps in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 4828~4837, 1988
- 34) Cook W R, Rothfield L I: Early stages in the development of the *Escherichia coli* cell-division site. *Mol. MICrobiol.* 14: 485~495, 1994
- 35) Wientjes F B, Nanninga N: On the role of the high molecular weight penicillin-binding proteins in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Res. MICrobiol.* 142: 333~344, 1991
- 36) Höltje J V: Molecular interplay of murein synthase and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *MICrob. Drug Resist.* 2: 99~103, 1996

## Effects of affinities of the $\beta$ -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* to their MICs, bactericidal action, and morphological changes

Masatoshi Konno<sup>1</sup>, Yasuko Asahi<sup>1</sup> and Kimiko Ubukata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The working group for penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, 1-19-10 Sugamo, Toshima-ku, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Institute of MICrobial Chemistry

Although the relationship between  $\beta$ -lactam antibiotics and penicillin-binding proteins (PBPs) has been frequently investigated, their clinical benefits have not yet been elucidated. In the present study, the affinities of several  $\beta$ -lactam antibiotics, having different fundamental structures, to PBPs of *Escherichia coli* were determined in order to investigate the effects of these antibiotics on MIC, bactericidal action, and morphological changes. The affinity of  $\beta$ -lactam antibiotics to PBPs was represented by the inhibitory ratio (Ir: %) of binding of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin to the PBPs of *E. coli*, using the method described previously by Spratt. Two-fold diluted  $\beta$ -lactam antibiotics from 1/32 MIC to 32 MIC were added to membrane fractions of *E. coli*. The correlation between the concentrations of the antibiotics pre-added and Ir was the highest for PBP 1 B. The correlation coefficient was 0.4661 at an Ir of 10% and 0.7569 at an Ir of 90%, showing a concave linear pattern. The MIC seems difficult to explain in terms of the affinity of  $\beta$ -lactams to PBP 1 B alone. Thus, Ir of each  $\beta$ -lactam to each PBP at their MIC points was obtained in order to determine the correlation between Ir and MIC. The correlation coefficient was the highest with 0.8257 for PBP 1 B, and with 0.5 or higher for other PBPs, suggesting that MICs of  $\beta$ -lactams can be explained by the Irs for all PBPs at their MIC point. Multiple regression analysis was conducted using MIC as a criterion variable and Ir as an explanatory variable. The results indicated that MIC was significantly correlated with Irs to PBP 1 B plus PBP 4, Ir to PBP 3, and PBP 2. Similarly, discriminant analysis of bactericidal action and morphological changes was conducted by categorizing the results obtained after 2 hour cultivation with each 4 MIC of  $\beta$ -lactams. Whereas bactericidal action increased as Ir to PBP 4 increased, it significantly decreased as Irs to PBP 2 plus PBP 3 increased. Significant filamentous formation and ovoid formation of the cells occurred in proportion to increases in Ir to PBP 3 and to PBP 2, respectively. On the other hand, significant bulge formation was seen with increases in both Ir to PBP 4 and to PBP 1 B. These results suggest that awareness of low-molecular weight PBP, which has not been evaluate as a target of  $\beta$ -lactams at this time, is required for the development of  $\beta$ -lactams.