

グラム陰性桿菌に対するフロモキシセフの抗菌機序

伊勢田 茂 光

Antibacterial Mechanisms of Flomoxef Against Gram-Negative Bacilli

Shigemitsu Iseda

(平成4年10月27日受付)

緒 言

有史以来、人類の死因のうち最も多いのは感染症であると言われている。現在でも発展途上国では多くの人命が感染症により奪われている。また、先進諸国においては死因の上位ではないが、感染症は様々な形で人々を苦しめていることには違いない。その極端な例がエイズである。エイズ患者はヒト免疫不全ウイルスにより直接生命を失うのではなく、その感染により免疫能が低下したため、日和見感染を起こし、そのために死亡する。その他の疾患においても、併発した感染症、特に日和見感染が直接の死因になっている例は多い。このことは口腔領域においても例外でなく、口腔領域の悪性腫瘍患者において日和見感染は頻繁に観察される。もちろん日和見感染以外の感染症も口腔領域において発生していることはいうまでもない。

以上のように人類を苦しめてきた感染症が劇的に減少したのは、抗生物質の出現によるところが大きい。1928年にフレミングにより発見され、1941年に実用化されたベンジルペニシリン以来数多くの抗生物質が開発され、感染症の治療に使用されてきた。その中でも高い選択毒性を持ち、副作用の少ないβ-ラクタム系抗生物質はベンジルペニシリンの発見以来最も多く使用されてきた抗生物質といえる。

ベンジルペニシリンの発見後、セファゾリン等の第一世代セフェム系抗生物質の開発をきっかけとし、数多くのセフェム系抗生物質が開発され、現在臨床の場で多くの抗生物質が使用されている。前述の日和見感染の原因菌の多くは、*Pseudomonas aeruginosa*, *Esche-*

richia coli, *Serratia marcescens* などのグラム陰性桿菌である。第一世代セフェム系抗生物質はグラム陽性菌に対する抗菌力が勝る反面、グラム陰性菌に対する抗菌力に弱点があった。そのためグラム陰性菌による感染症が増加し、ついで開発された第二および第三世代のセフェム系抗生物質はグラム陰性菌に対する抗菌力が重視された。しかし、グラム陽性菌に対する抗菌力が犠牲にされたため、これらの抗生物質の使用がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)^{1,2)} の出現の引き金になったと考えられている。

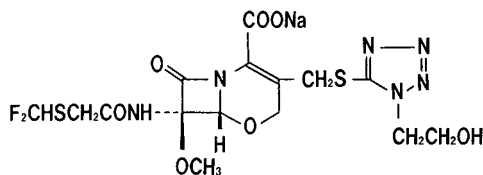


図1 フロモキシセフの構造。

フロモキシセフ (sodium(-)-(6R, 7R)-7-[2-(difluoromethylthio)acetamido]-7-methoxy-3-[(1-(2-hydroxyethyl)-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-8-oxo-5-oxa-1-azabicyclo[4, 2, 0]oct-2-ene-2-carboxylate)³⁾ は新しく開発されたオキサセフェム系抗生物質である。その構造式は図1に示す。その特徴としては7位にメトキシ基を有し、さらにフッ素を含む側鎖を有するところにある。この抗生物質は同じオキサセフェム系のラタモキシセフに比べ、グラム陽性菌に対しての抗菌力も優れているため、グラム陰性桿菌感染症の治療のために使用した場合も、MRSA 出現を引き起こすことが少ないとされている。

β-ラクタム系抗生物質の抗菌作用は、標的酵素への到達効率、標的酵素の感受性および分解酵素に対する

広島大学歯学部口腔細菌学講座 (主任: 杉中秀壽教授) 本論文の一部は1989年6月11日の広島大学歯学会総会において発表した。

る安定性の3因子により決定されると考えられる。これらのうちグラム陽性菌では困難な標的酵素の感受性の測定が、グラム陰性菌のうち細胞壁ペプチドグリカンが diaminopimelic acid (Dap) 型の菌では確立されている。従ってこれらのグラム陰性菌では上記3因子により、抗菌作用あるいは耐性機構の解析をすることが可能である。

そこで本研究では、日和見感染の原因となるグラム陰性桿菌に対するフロモキシセフの抗菌機序の検討を、標的酵素への到達性(この場合は外膜透過性)、 β -ラクタマーゼに対する安定性および標的酵素に対する阻害作用により行った。

材料ならびに方法

I. 材 料

1. 使用抗生物質

本実験に使用した抗生物質は、オキサセフェム系抗生物質であるフロモキシセフ、ラタモキシセフ(以上シオノギ製薬株式会社, 東京), 対照の β -ラクタム系抗生物質としてセフェム系の代表的抗生物質セファゾリン(藤沢薬品工業株式会社, 大阪), ペプチドグリカン架橋形成反応を調べるためのペプチドグリカン前駆体の抽出に際してバンコマイシン(シオノギ製薬株式会社, 東京), および β -ラクタマーゼの誘導のためにベンジルペニシリン(明治製菓株式会社, 東京)を用いた。

2. 使用菌株

被験菌株として, *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* KM338, *Serratia marcescens* IFO12648 および *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 を用いた。また対照として代表的なヒト病原性グラム陽性球菌である *Staphylococcus aureus* FDA 209P を用いた。Uridine-5'-diphospho-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanine (UDP-MurNac-peptapeptide) の抽出に際しては *Bacillus megaterium* KM を用いた。

II. 培養条件

培地は全て trypticase soy broth (Becton Dickinson 以下 TSB と略す) を用いた。培養温度は 37°C で静置もしくは振盪培養を行った。菌体と培養上清の分離は遠心分離法 (6,000×g, 15分, 4°C) を用いた。

III. 抗菌力の測定

1. 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, 以下 MIC と略す) は液体希釈法により測定し

た。各抗生物質の2倍系列希釈を含む TSB 100 μ l に最終菌濃度約 10^6 集落形成単位 (colony forming unit)/ml の菌を接種し, 37°C で18時間静置培養し, 肉眼的に菌の発育を見ない最小の抗生物質濃度を MIC とした。

2. エチレンジアミン四酢酸存在下での抗菌力の測定
エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, 以下 EDTA と略す) 存在下での各抗生物質の MIC の測定を行った。まず EDTA の各被験菌に対する MIC を測定し, 1/2 MIC 濃度の EDTA を全ての培地に添加した条件で III. 1. 項と同様の方法で測定した。なお EDTA の各被験菌に対する MIC は以下の通りである; *E. coli* K12, 1,600 μ g/ml; *P. aeruginosa* KM338, 1,600 μ g/ml; *S. marcescens* IFO12648, 3,200 μ g/ml; *E. cloacae* ATCC 13047, 25,600 μ g/ml; *S. aureus* FDA 209P, 800 μ g/ml。

IV. β -ラクタマーゼ活性の測定

1. 粗酵素標品の調製

1/4 MIC 濃度のベンジルペニシリン添加培地にて培養した対数増殖期の菌を遠心にて集菌, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で懸濁した。その菌体を超音波破砕器 (UR150, 富永製作所, 東京) で破壊し, 12,000 ×g, 30分間, 4°C で遠心した上清を β -ラクタマーゼ粗酵素標品とした。タンパク量は Lowry 法⁴⁾ により測定した。

2. 活性の測定

マイクロヨード法⁵⁾ により測定した。粗酵素標品 (タンパク量, 5 mg/ml) 0.1 ml, 基質 (抗生物質, 0.2 mM) 0.1 ml および 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.8 ml を 30°C にて 10分間反応させた。0.15 M のタングステン酸ナトリウム 1 ml で反応を停止し, ヨードデンブンプン溶液 3 ml を加えて室温で20分間放置, その後波長 595 nm の吸収を測定した。反応前後での吸収の差を Δ OD, 係数は Δ OD=1.0 に相当するヨウ素デンブンプン試液中の I_2 濃度 (μ mol/3 ml), V は反応液に加えた酵素標品液量 (ml), F は分解基質のヨウ素消費当量とし, 係数 \times Δ OD/F/V/反応時間(分)により単位時間に分解された基質量を求め活性とした。

V. ペプチドグリカン架橋形成反応の測定

1. エーテル処理菌体の調製

エーテル処理菌体 (ether-treated bacterial cell, 以下 ETB と略す) は Vorsberg と Hoffmann-Berling⁶⁾ の方法に従い調製した。500 ml の TSB 中で振盪培養した菌を対数増殖期に集菌, 洗浄し 80 mM KCl, 40 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-

HCl) 緩衝液 (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 2 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 0.4 mM spermidine および 0.5 M sucrose を含む 5 ml の溶液に浮遊させた。この菌懸濁液に同量のエーテルを 0°C で加えて 1 分間ゆっくりと攪拌した後エーテル層を除き、遠心分離 (7,000×g, 8 分間) して得た沈渣を ETB とし、ペプチドグリカン架橋形成反応の酵素標品とした。

2. UDP-MurNAc-pentapeptide の調製

ペプチドグリカンの前駆体である UDP-MurNAc-pentapeptide の調製は Lugtenberg ら⁷⁾ および Moore らの方法⁸⁾ に準じて行った。*B. megaterium* KM を 91 の TSB 中で 37°C で振盪培養し、対数増殖期にバンコマイシン (最終濃度 20 mg/ml) を添加、さらに 60 分間振盪培養を行った。遠心分離 (8,900×g, 15 分間, 4°C) による集菌、生理食塩水による洗浄後、菌体を 60 ml の水冷した精製水に浮遊させ最終濃度 10% になるようトリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, 以下 TCA と略す) を加え 30 分間攪拌した。再び遠心分離し、沈渣に同様の TCA 処理を 2 度行った。それぞれの上清を集めて同量のエーテルによる抽出を 3 度行った。水層を 1N NaOH で中和後、残留エーテルを流気下にて除去し、減圧下で試料容量を約 5 ml にした。それを Sephadex G-10 カラム (3 cm×40 cm) を用い精製水を溶媒としクロマトグラフィーを行った。得られた 2 つの紫外線 (260 nm) 吸収画分のうち、ニンヒドリン反応および *N*-アセチルアミノ糖反応陽性の画分をさらに Dowex AG1 カラム (1 cm×10 cm) によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出は 0.01N HCl 中で NaCl の 0~0.3 M の濃度勾配で行った。2 つの紫外線吸収画分のうち再びニンヒドリン反応および *N*-アセチルアミノ糖反応陽性⁹⁾ の画分を Sephadex G-10 による再クロマトグラフィーを行い単一の紫外線吸収画分を得、アミノ酸分析により UDP-MurNAc-pentapeptide であることを確認し以下の実験に使用した。

3. 架橋ペプチドグリカン合成量の測定

架橋ペプチドグリカン合成量の測定は ETB を酵

素源とし、UDP-MurNAc-pentapeptide と Uridine-5'-diphosphate-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) を基質として、Mirelman らの方法¹⁰⁾ の変法¹¹⁾ により測定した。UDP-MurNAc-pentapeptide は前項の方法で調製したものを、UDP-GlcNAc は市販の UDP-[¹⁴C]-GlcNAc (11 GBq/mmol, NEN, Boston, MA, USA) を使用した。1 mM UDP-MurNAc-pentapeptide 10 μl, 34.4 μM UDP-[¹⁴C]GlcNAc 5 μl, 1 M tris-HCl buffer (pH 7.5) 10 μl, 1 M NH₄Cl 10 μl, 1 M MgCl₂ 5 μl, 20 mM 2-mercaptoethanol 5 μl および精製水 55 μl に ETB 100 μl を加え、37°C で 30, 60, 90 および 120 分間反応させた。反応後 1 ml の 4% sodium dodecyl sulphate (以下 SDS と略す) を加え、30 分間、80°C 以上で加熱し反応を停止させた。

反応液は冷却後、SDS 不溶性画分をメンブレン・フィルター (ポアサイズ 0.22 μm, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) 上に集め、2% SDS と精製水で洗浄した。この不溶性ペプチドグリカンの付着したメンブレン・フィルターを乾燥し、10 ml のトルエンシンチレーターを用いて、液体シンチレーションカウンター (LSC-903, ALOKA, 東京) にてその放射活性を測定した。

4. 抗生物質によるペプチドグリカン合成阻害の測定

前項の反応液中の 55 μl の精製水を、20 μl の 0, 0.1, 1.0, 10, 100 および 1,000 μg/ml (最終濃度, 0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 および 100 μg/ml) の抗生物質および 35 μl の精製水に変え、一定時間反応させた。反応後、SDS 不溶性画分の放射活性を測定し、抗生物質非存在下での活性を 100 とし、その値に対する放射活性の減少率をもって阻害活性とした。

結 果

表 1 にグラム陰性桿菌 4 種および対照に用いた *S. aureus* に対するフロモキシセフ、ラタモキシセフおよびセファゾリンの抗菌力を示す。フロモキシセフは *E. coli* に対しては使用した 3 剤中最も優れた抗菌力を示した。また対照のグラム陽性菌である *S. aureus* に対

表 1 グラム陰性桿菌に対する抗菌力

菌 株	最小発育阻止濃度 (μg/ml)		
	フロモキシセフ	ラタモキシセフ	セファゾリン
<i>E. coli</i> K12	0.05	0.1	1.56
<i>P. aeruginosa</i> KM338	3,200	50	51,200
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	1.56	0.39	6,400
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	400	25	6,400
<i>S. aureus</i> FDA 209P	0.2	3.13	0.39

表2 グラム陰性桿菌に対する各薬剤の MIC の EDTA 添加による変化

菌 株	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			
	EDTA (0.5 MIC)	フロモキシセフ	ラタモキシセフ	セファゾリン
<i>E. coli</i> K12	—	0.05	0.1	1.56
	+	0.012	0.1	0.78
		(4)	(1)	(2)
<i>P. aeruginosa</i> KM338	—	3,200	50	51,200
	+	50	12.5	3,200
		(64)	(4)	(16)
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	—	1.56	0.39	6,400
	+	0.39	0.1	100
		(4)	(4)	(64)
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	—	400	25	6,400
	+	100	25	800
		(4)	(1)	(8)
<i>S. aureus</i> FDA 209P	—	0.2	3.13	0.39
	+	0.2	3.13	0.39
		(1)	(1)	(1)

括弧内の数字は EDTA 存在下の MIC に対する EDTA 非存在下の MIC の割合を示す。

しては第一世代のセフェム系抗生物質であるセファゾリンよりも優れた抗菌力を示した。*S. marcescens* に対してはラタモキシセフには劣るものの、MIC は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり臨床的に使用可能と考えられる抗菌力を有していた。しかし、*P. aeruginosa* および *E. cloacae* に対してはそれぞれ 3,200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ と非常に高い MIC であった。

抗生物質の抗菌力に大きな影響を与えるグラム陰性桿菌外膜の透過性の検討を EDTA 添加による MIC の変化により検討した (表 2)。EDTA によるフロモキシセフの MIC の低下は *E. coli*, *S. marcescens* および *E. cloacae* では 1/4 であったが、*P. aeruginosa* においては 1/64 であった。ラタモキシセフでは *P. aeruginosa* および *S. marcescens* で 1/4, *E. coli* および *E. cloacae* では変化しなかった。第一世代のセフェム系抗生物質でグラム陰性菌に対する抗菌力の劣るセファゾリンでは感受性のある *E. coli* では 1/2 であったが、耐性を示す *P. aeruginosa*, *S. marcescens* および *E. cloacae* ではそれぞれ 1/16, 1/64 および 1/8 と MIC が大きく低下した。なお、対照として用いた外膜を持たないグラム陽性菌である *S. aureus* においてはいずれの抗生物質の MIC も EDTA 添加により変化しなかった。

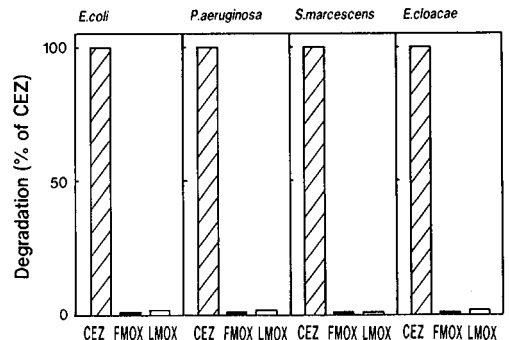


図2 グラム陰性桿菌の β -ラクタマーゼによる各薬剤の分解。
CEZ, セファゾリン; FMOX, フロモキシセフ;
LMOX, ラタモキシセフ

図2に各抗生物質の β -ラクタマーゼに対する安定性を示す。それぞれの菌をベンジルペニシリンで誘導し、得た酵素を各抗生物質に作用させ、対照抗生物質であるセファゾリンの分解量に対する百分率で示した。フロモキシセフ、ラタモキシセフともにいずれの菌の酵素によってもほとんど分解されなかった。

図3は β -ラクタム剤の標的酵素であるペプチドグ

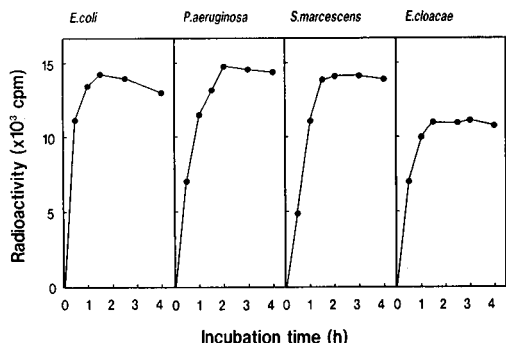


図3 グラム陰性桿菌における架橋ペプチドグリカン合成の経時的変化。

リカン架橋形成酵素の活性を示したものである。横軸に時間を、縦軸に SDS 不溶性画分に取り込まれた放射活性を示している。いずれの菌においても反応は直線的に進行し1時間30分ないし2時間でプラトーに達した。この結果より、抗生物質による阻害活性測定に用いる反応時間を1時間と決定した。

図4は *E. coli* の架橋形成反応に対する各抗生物質の阻害の程度を示している。いずれの抗生物質によっても、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 付近より濃度依存的に反応は阻害を受け、100 $\mu\text{g/ml}$ で80ないし90%阻害を示した。いずれの抗生物質による阻害パターンも似ており、反応を50%阻害する濃度 IC_{50} (表3, 以下同様) はフロモキシセフでは1.6 $\mu\text{g/ml}$, ラタモキシセフでは2.8 $\mu\text{g/ml}$, セファゾリンでは3.2 $\mu\text{g/ml}$ であった。

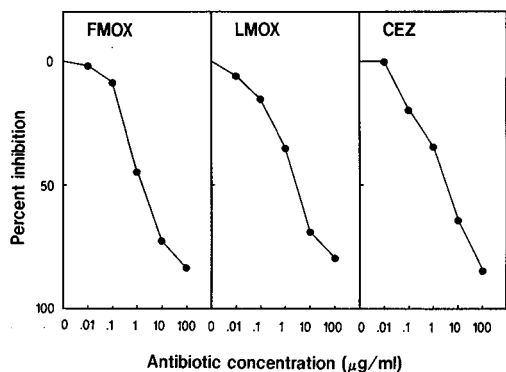


図4 *E. coli* K12 の架橋ペプチドグリカン合成に及ぼす各抗生物質の影響。
FMOX, フロモキシセフ; LMOX, ラタモキシセフ;
CEZ, セファゾリン

図5は *P. aeruginosa* の架橋形成反応に対する各抗生物質の阻害を示している。フロモキシセフおよびラタモキシセフでは低濃度でやや反応が促進された後、抗生物質濃度の増加と共に急激に阻害率は上昇し、10 $\mu\text{g/}$

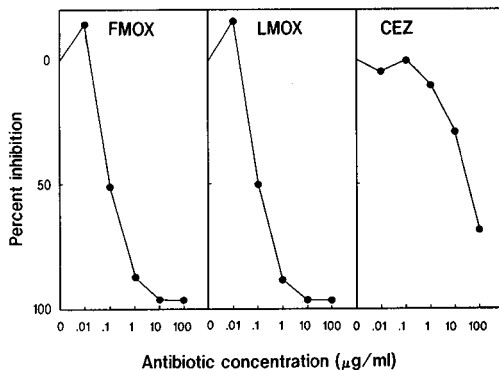


図5 *P. aeruginosa* KM338 の架橋ペプチドグリカン合成に及ぼす各抗生物質の影響。
FMOX, フロモキシセフ; LMOX, ラタモキシセフ;
CEZ, セファゾリン

ml ではほぼ完全に阻害された。セファゾリンでは1.0 $\mu\text{g/ml}$ から濃度依存的に阻害したが、100 $\mu\text{g/ml}$ でも完全な阻害は認められなかった。 IC_{50} はフロモキシセフは0.1 $\mu\text{g/ml}$, ラタモキシセフは0.1 $\mu\text{g/ml}$, セファゾリンは32 $\mu\text{g/ml}$ であった。

図6は *S. marcescens* の架橋形成反応に対する各抗生物質の阻害を示している。フロモキシセフ、ラタモキシセフでは1 $\mu\text{g/ml}$ より阻害が認められたが、100 $\mu\text{g/ml}$ のフロモキシセフによっても50%以下の阻害しか認められず、 IC_{50} はフロモキシセフでは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上、ラタモキシセフでも40 $\mu\text{g/ml}$ と高い値となった。セファゾリンは63 $\mu\text{g/ml}$ であった。

図7は *E. cloacae* の架橋形成反応に対する各抗生物質の阻害を示している。フロモキシセフでは10 $\mu\text{g/ml}$ から阻害が認められたが、100 $\mu\text{g/ml}$ での阻害は50%程度、ラタモキシセフでは10 $\mu\text{g/ml}$ まですべて阻害

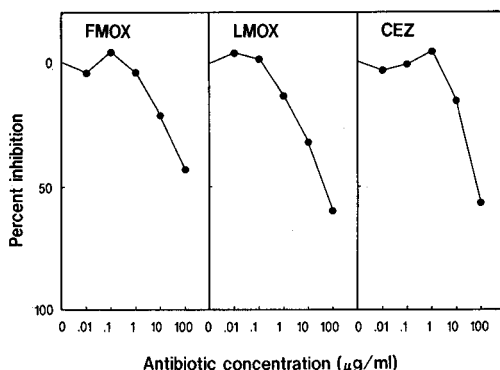


図6 *S. marcescens* IF012648 の架橋ペプチドグリカン合成に及ぼす各抗生物質の影響。
FMOX, フロモキシセフ; LMOX, ラタモキシセフ;
CEZ, セファゾリン

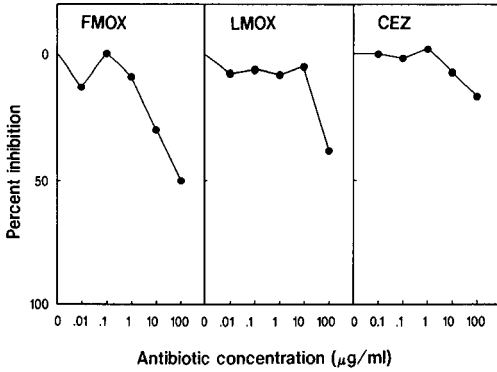


図7 *E. cloacae* ATCC 13047 の架橋ペプチドグリカン合成に及ぼす各抗生物質の影響。FMOX, フロモキシセフ; LMOX, ラタモキシセフ; CEZ, セファゾリン

効果はなく、100 μg/ml でも阻害率は50%以下であった。セファゾリンでは殆ど阻害効果は認められず、100 μg/ml でも20%程度の阻害にすぎなかった。IC₅₀は、フロモキシセフでは100 μg/ml であり、ラタモキシセフ、セファゾリンでは100 μg/ml 以上となった。

表3に4菌種に対する各抗生物質のMIC, EDTA添加によるMICの低下を指標とした外膜透過性, β-ラクタマーゼ安定性および標的酵素50%阻害に必要な抗生物質濃度を示した。

考 察

化学療法剤の急速な進歩により我々は感染症の苦しみから開放されるのではないかと考えられてきた。実際多くの感染症が化学療法剤のおかげで駆逐されつつあり、そのため感染症は化学療法剤の投与により簡単に処置できる疾患であるとの認識さえ与えてきた。しかし、近年の耐性菌、日和見病原体、クラミジア、リケッチアおよびウイルスなどによる感染症の増加により、我々は感染症に対する認識を根本から考え直さざるを得ない事態に追い込まれた。細菌の場合、より抗菌力の高い抗生物質の開発とそれに続く臨床応用が高度耐性菌の出現を招いた。起炎菌が明らかな場合は標的を定め、抗菌スペクトルの狭い抗生物質を用いる事が、常在細菌叢を乱さないという観点からも理想的である。しかし起炎菌が明らかでない場合や細菌検査前の初期治療における化学療法の場合は、スペクトルの

表3 グラム陰性桿菌に対する各薬剤のMIC, 外膜透過性, β-ラクタマーゼによる分解およびペプチドグリカン架橋形成酵素阻害濃度

菌 株	最小発育阻止濃度 (μg/ml)		
	フロモキシセフ	ラタモキシセフ	セファゾリン
<i>E. coli</i> K12			
MIC (μg/ml)	0.05	0.1	1.56
外膜透過性	4	1	2
β-ラクタマーゼによる分解	-	-	+
IC ₅₀ (μg/ml)	1.6	2.8	3.2
<i>P. aeruginosa</i> KM338			
MIC (μg/ml)	3,200	50	51,200
外膜透過性	64	4	16
β-ラクタマーゼによる分解	-	-	+
IC ₅₀ (μg/ml)	0.1	0.1	32
<i>S. marcescens</i> IFO 12648			
MIC (μg/ml)	1.56	0.39	6,400
外膜透過性	4	4	64
β-ラクタマーゼによる分解	-	-	+
IC ₅₀ (μg/ml)	>100	40	63
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047			
MIC (μg/ml)	400	25	6,400
外膜透過性	4	1	8
β-ラクタマーゼによる分解	-	-	+
IC ₅₀ (μg/ml)	100	>100	>100

MIC, 最小発育阻止濃度; IC₅₀, 架橋形成酵素50%阻害濃度

広い抗生物質を用いる事になる。初期の抗生物質がグラム陽性菌に特に有効であったことから、その使用は反対にグラム陰性菌による感染症の増加をきたした。さらに、免疫機能の低下した個体、いわゆるコンプロマイズドホストにおいてはグラム陰性菌による日和見感染が多発したため、ピルレンスの低いグラム陰性菌に有効な抗生物質の開発に力が注がれた。ところが、それらの多くは逆にグラム陽性菌、特に黄色ブドウ球菌に対する抗菌力が劣っていたため、それらの臨床使用の開始は MRSA の出現の引き金となった。Okonogi¹²⁾ はセファマイシン系の抗生物質により MRSA が誘導されることを実験的に示している。

ラタモキシセフは最初に開発されたオキサセフェム系の抗生物質でグラム陰性菌には特に優れた抗菌力を示す^{13,14)}。しかし、グラム陽性菌に対する抗菌力が極めて弱いため、この抗生物質も MRSA 出現の引き金になるとの注意が促された。そこで、グラム陽性菌にも抗菌力を有するオキサセフェム系抗生物質であるフロモキシセフが開発された。フロモキシセフは黄色ブドウ球菌にも優れた抗菌力を示すが、これはペニシリン結合タンパク質 (PBP)^{15,16)} のうち PBP2 および PBP3 に対する高い親和性によると報告されている¹⁷⁾。しかし、グラム陽性菌に対する抗菌力のために、グラム陰性菌に対する抗菌力を犠牲にする事はできない。フロモキシセフは *E. coli*, *S. marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* および *Salmonella* 属等のグラム陰性桿菌にも優れた抗菌力を有し、十分臨床使用できる抗生物質である^{17,18)}。

そこでフロモキシセフのグラム陰性桿菌に対する抗菌機序を解明する目的で同じオキサセフェム系抗生物質のラタモキシセフおよび代表的なセフェム系抗生物質であるセファゾリンを対照薬とし、外膜透過性、 β -ラクタマーゼに対する安定性および標的酵素阻害活性についての検討を行った。

外膜の透過性の測定は EDTA 添加による感受性の変化を指標として行った。グラム陰性桿菌は外膜を有しており、様々な物質の透過の障害となっている^{19,20)}。グラム陰性桿菌に EDTA を作用させると、外膜からリポ多糖体—タンパク質複合体が遊離し²¹⁾、透過障害が消失する。従って、外膜により透過障害を受けている抗生物質に対するグラム陰性菌の感受性は、EDTA 添加により上昇する事となる^{22,23)}。フロモキシセフの外膜透過性は *E. coli*, *P. aeruginosa* において対照としたラタモキシセフおよびセファゾリンのいずれよりも劣っていた。特に *P. aeruginosa* では EDTA 添加により MIC が 1/64 と大きく減少しており、著しい透過障害の存在を示している。親水性の低分子物質はポーリ

ンタンパクにより形成される外膜のチャンネルを通過するとされており、外膜透過性は通過する分子の大きさや荷電に左右されるが、この菌では通過できる分子量が非常に低い事が糖を用いた実験で示されている^{24,25)}。フロモキシセフの外膜透過性は *S. marcescens* においてはセファゾリンよりはよくラタモキシセフと同程度であった。また、*E. cloacae* ではラタモキシセフよりは劣るもののセファゾリンよりは優れていた。

フロモキシセフはラタモキシセフと同様に用いた 4 菌種の産生する β -ラクタマーゼに対しセファゾリンに比べてはるかに安定であった。横田ら^{17,26)} の報告においてもフロモキシセフの β -ラクタマーゼに対する安定性は、ごく限られた例外を除き非常に優れている。

細菌はその表層に細胞壁を有しており、それを構成する主要な成分であるペプチドグリカンに細菌に特有な高分子物質である。ペプチドグリカンはそれぞれの細菌に固有の形態と強度を与えている。ペプチドグリカンはその合成の最終過程でグリカン鎖のペプチド側鎖同士の架橋形成が行われ強固な構造となる。その架橋反応を触媒するのがトランスペプチダーゼと呼ばれる酵素でペニシリンと結合する細菌細胞膜タンパク質、PBP の一つである。 β -ラクタム剤はこの酵素によるペプチドグリカン架橋形成酵素を阻害し、未架橋の脆弱なペプチドグリカンの生成を引き起こし、溶菌にいたらしめ、殺菌的に働くことされる²⁷⁾。さらに細胞壁溶解酵素系の活性化も溶菌の誘発に関与する事も示唆されている。従って、ペプチドグリカン架橋形成酵素阻害活性は β -ラクタム剤の抗菌活性における最も重要な因子である。この活性が低ければ、どんなに他の二つの因子、標的酵素への到達度および分解酵素に対する安定性、が優れていても抗菌活性を示す事はできない。

フロモキシセフによるペプチドグリカン架橋形成反応の阻害活性は *S. marcescens* において IC₅₀ の値がやや劣るものの、ラタモキシセフとほとんど同程度であった。第一世代のセフェム剤であるセファゾリンと比較すると *P. aeruginosa* でははるかに低い値で阻害したが、他の 3 菌種では大きな差は観察されなかった。

β -ラクタム剤の標的酵素に対する作用の測定は 2 種類あり、PBP に対する放射性同位元素でラベルしたペニシリンの結合に対する阻害の程度からその抗生物質の親和性を測定する方法と、この実験で用いた架橋され SDS に不溶化したペプチドグリカン量により酵素活性を測定する方法とがある。後者のほうが酵素活性を直接測定するため抗菌力をよりよく反映するものと考え本実験において使用した。フロモキシセフの PBP に対する親和性は横田¹⁷⁾ らが報告しているが、

E. coli に対してはラタモキセフと同程度の結合親和性を示し、*S. marcescens* では PBP2 および PBP3 に対しラタモキセフよりもやや優れた結合親和性を示した。*E. coli* についてのこの結果は架橋形成酵素阻害実験の結果と一致するが、*S. marcescens* に関しては全く異なる結果となった。

表3に4種の菌に対する各抗生物質の最小発育阻止濃度、EDTAによりMIC減少の程度で示した外膜透過性、 β -ラクタマーゼによる分解の程度、およびIC₅₀で示したペプチドグリカン架橋形成反応阻害活性をまとめて示す。

E. coli に対してフロモキセフは外膜透過性がラタモキセフに比べて劣っているが、 β -ラクタマーゼ安定性、標的酵素に対する高い阻害効果により、抗菌力を発揮している。

P. aeruginosa に対しては標的酵素の阻害活性も高く、 β -ラクタマーゼにも安定であったが抗菌力はほとんど示さなかった。これは外膜透過性が非常に悪いためと考えられる。ラタモキセフではEDTAによるMICの減少が1/4であったのが、フロモキセフでは1/64であり、MICもラタモキセフの50 $\mu\text{g/ml}$ から3,200 $\mu\text{g/ml}$ と上昇している。

E. cloacae に対してフロモキセフは殆ど抗菌力を示さなかったが、これはこの抗生物質の標的酵素に対する阻害効果が非常に弱い事に起因していると思われる。ラタモキセフにおいても同様の現象が観察された。

S. marcescens では標的酵素に対する阻害活性が非常に悪いにも関わらず、1.56 $\mu\text{g/ml}$ と高い抗菌力を示している。Miyakeら²⁸⁾はセフェム系の抗生物質であるセフゾナムのグラム陰性桿菌に対する抗菌機序の検討の中で、セフゾナムもやはり*S. marcescens* に対しては、高いIC₅₀と低いMICを示しており、この菌に対してはさきに述べた3要因だけでは抗菌機序の説明が困難である。この現象の原因として考えられる第一点としては、*S. marcescens* の場合は他の菌種に比べごくわずかな架橋形成阻害によっても、致命的な影響を受ける可能性である。この場合には他の菌種の架橋形成阻害抗生物質濃度との比較は無意味となる。第二点としては、この研究で取り上げた3つの要因以外の因子の関与である。もし未知の要因が β -ラクタムによる殺菌作用に関与しており、他の菌種では3つの要因とパラレルに作用していれば矛盾は現れず、この菌においてのみ3つの要因と独立して作用すれば矛盾が生ずることとなる。現在のところ何が原因かは明かでない。*P. aeruginosa* においても、これら3つの因子だけでは β -ラクタムの抗菌機序が説明できないと

の報告もある²⁹⁾。細胞壁溶解酵素系等の他の因子に関する検討の必要性が示唆された。

結 論

新しく開発されたオキサセフェム系抗生物質であるフロモキセフに対し*E. coli* および*S. marcescens* は感受性を示し、*P. aeruginosa* および*E. cloacae* は耐性を示した。その機序を検討したところ、*P. aeruginosa* は標的酵素の感受性は高いが、外膜透過性が低いこと、*E. cloacae* は標的酵素の感受性が低いことが耐性の主因であった。*E. coli* は外膜透過性、標的酵素の感受性も高くフロモキセフに感受性を示した。*S. marcescens* は標的酵素の感受性が極めて低いにもかかわらずフロモキセフに感受性を示した。しかし、その理由は明らかにならなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導と論文の御校閲を賜った本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に心から謝意を表します。また、本論文の御校閲を賜った本学口腔外科第二講座下里常弘教授、歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝いたします。さらに、本研究の機会を与えていただくと共に、御支援を賜った恩師本学歯科補綴学第一講座津留宏道教授に厚く御礼申し上げます。また、測定方法を御教授いただいた本学小児歯科学講座岡田貢博士に深謝いたします。

最後に、研究遂行上惜しみない御協力をいただいた口腔細菌学講座三宅洋一郎助教授を始め教室員各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Jevons, M.P.: "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br. Med. J.*, 1, 124-125, 1961.
- 2) Brumfitt, W. and Hamilton-Miller, J.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Eng. J. Med.* 320, 1188-1196, 1989.
- 3) Tsuji, T., Satoh, H., Narisada, M., Hamashima, Y. and Yoshida, T.: Synthesis and antibacterial activity of 6315-S, a new member of the oxacephem antibiotic. *J. Antibiotic.* 38, 466-476, 1985.
- 4) Lowry, O.H., Rosebrough, J.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 5) Novick, R.P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.*, 83, 236-240, 1962.
- 6) Vosberg, H.P. and Hoffmann-Berling, H.: DNA synthesis in nucleotide-permeable *Escherichia coli* cells. I. Preparation and properties of ether tre-

- ated cells. *J. Mol. Biol.* **58**, 739-753, 1971.
- 7) Lugtenberg, E.J.J., van Schijndel-van Dam, A. and van Bellegem, T.H.M.: In vivo and in vitro action of new antibiotics interfering with the utilization of *N*-acetyl-glucosamine-*N*-acetyl-muramyl-pentapeptide. *J. Bacteriol.* **108**, 20-29, 1971.
 - 8) Moore, B.A., Jevons, S. and Brammer, K.W.: Peptidoglycan transpeptidase inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 513-517, 1979.
 - 9) Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F.: A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylaminic sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-966, 1955.
 - 10) Mirelman, D., Yashouv-Gan, Y. and Schwarz, U.: Peptidoglycan biosynthesis in a thermosensitive division mutant of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **15**, 1781-1790, 1976.
 - 11) Takata, N., Suginaka, H., Kotani, S., Ogawa, M. and Kosaki, G.: β -lactam resistance in *Serratia marcescens*: Comparison of action of benzylpenicillin, apalcillin, cefazolin and ceftizoxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 397-401, 1981.
 - 12) Okonogi, K., Noji, Y., Kondo, M., Imada, A. and Yokota, T.: Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 637-645, 1989.
 - 13) Yoshida, T., Matsuura, S., Mayama, M., Kaneda, Y. and Kuwahara, S.: Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa- β -lactam with an expanded antibacterial spectrum: laboratory evaluation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 302-312, 1980.
 - 14) Neu, H.C., Aswapokee, N., Fu, K.P. and Aswapokee, P.: Antibacterial activity of a new 1-oxa cephalosporin compared with that of other β -lactam compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 287-292, 1979.
 - 15) Spratt, B.G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, **72**, 341-352, 1977.
 - 16) Suginaka, H., Blumberg, P.M. and Strominger, J.L.: Multiple penicillin-binding components in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 5279-5288, 1972.
 - 17) 横田 健, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代: 新しい oxacephem, 6315-S (Flomoxef) の試験管内抗菌力, β -lactamases 安定性, 作用点ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する安定性, および血清補体と白血球との協力的食菌・殺菌作用. *Chemotherapy* **35** (S-1), 33-42, 1987.
 - 18) 伊予部志津子, 久保田たみ子, 三橋 進: 6315-S (Flomoxef) の in vitro および in vivo 抗菌活性. *Chemotherapy* **35** (S-1), 22-32, 1987.
 - 19) Nikaido, H. and Nakae, T.: The outer membrane of gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **20**, 163-250, 1979.
 - 20) Leive, L.: The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **235**, 109-129, 1974.
 - 21) Rogers, W.W., Gilleland, H.E. and Eagon, R.G.: Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediamine tetraacetic acid. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 743-748, 1969.
 - 22) Weiser, R., Asscher, A.W. and Wimpenny, J.: In vitro reversal of antibiotic resistance by ethylenediamine tetraacetic acid. *Nature (London)*, **219**, 1365-1366, 1968.
 - 23) Hamilton-Miller, J.M.T.: Effect of EDTA upon bacterial permeability to benzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 688-691, 1965.
 - 24) Yoneyama, H., Akatsuka, A. and Nakae, T.: The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a barrier against the penetration of disaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 106-112, 1986.
 - 25) Yoneyama, H. and Nakae, T.: A small diffusion pore in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.*, **157**, 33-38, 1986.
 - 26) 村上和久, 土肥正善, 野村和秀, 中本省三, 吉田 正: Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の β -Lactamase に対する安定性とペニシリン結合蛋白質への親和性. *Chemotherapy* **35** (S-1), 115-120, 1987.
 - 27) Izaki, K., Matsuhashi, M. and Strominger, J.L.: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls XIII. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: Penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 3180-3192, 1968.
 - 28) Miyake, Y., Okada, M., Iseda, S. and Suginaka, H.: Effect of ceftazidime on peptidoglycan cross-linking reactions in gram-negative bacilli. *Chemotherapy (Basel)*, **38**, 17-20, 1992.
 - 29) Suginaka, H., Kotani, S., Takata, N. and Ogawa, M.: Effect of cefotaxime (HR-756) on biosynthesis of cell wall peptidoglycan in *Pseudomonas aeruginosa* KM388 and *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.*, **8**, 79-82, 1980.