

ブドウ球菌のセファゾリン (CEZ) 耐性菌株における β -ラクタメースの 関与とセフメタゾール (CMZ) 感受性に関する研究

笹津備規・小原康治・早坂 健・河野 忍

東京薬科大学第2微生物学教室

(昭和 57 年 2 月 20 日受付)

Cefazolin(CEZ) と Cefmetazole(CMZ) に対する感受性相関などから、CEZ に対する MIC 値の高い菌株に対し、CMZ がより低い MIC 値を示すこと、CEZ と CMZ がほぼ同じ MIC 値を示す菌株に対しては CMZ がより殺菌的に作用することがわかった。CEZ あるいは Penicillin G により CEZ 耐性を誘導することができたが、CMZ の抗菌作用はこの耐性誘導処理にかかわらず変化しなかった。

CEZ 耐性ブドウ球菌の MIC 値と、それらの菌の産生するペニシラーゼ活性との相関から、CEZ 耐性はペニシラーゼ産生と何らかの関連があると考えられる。

ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は種々の抗生剤に多剤耐性化し易いこと¹⁾、およびブドウ球菌の産生するペニシラーゼ (PCase) 活性は、そのペニシリン耐性レベルによく相関することなどはこれまでによく知られている²⁾。グラム陰性桿菌感染症に広く注射剤として用いられている Cefazolin(CEZ) にも、ブドウ球菌の耐性化が最近報告されるようになってきた³⁾。しかし CEZ 耐性機構についての解析はなされていない。しかも、セファロスポリン系抗生剤 (CEPs) に対するブドウ球菌の耐性化機構についての研究も少ない。松田ら⁴⁾は CEPs 耐性ブドウ球菌は Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET), Cephalexin (CEX) などにより、PCase 産生が誘導されるが、この誘導酵素と直接耐性レベルとの一致は認められなかったと述べている。また、横田⁵⁾は Cloxacillin(MCIPC) や CER に対して耐性のブドウ球菌について、その耐性機構はおそらくペニシリン結合蛋白の β -ラクタム抗生剤に対する親和性の低下の変異であろうと述べている。

われわれは CEZ 耐性のブドウ球菌について、ブドウ球菌の CEZ 耐性菌株における β -ラクタメースの関与と Cefmetazole(CMZ) の感受性に関して検討し、これら CEZ 耐性ブドウ球菌に対し CMZ が優れた抗菌作用を示すことを明らかにした。また、これらブドウ球菌の CEZ 耐性は菌の産生する PCase 活性と相関があることを見出した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

実験に使用した黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus*

aureus) は 1979 年から 1980 年にかけて得られた臨床分離菌株のうち、CEZ に対する MIC が 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株 40 株を用いた。また比較のために 1963 年頃分離された 2 菌株 (MS 258, MS 1477) をも使用した^{6,7)}。

2. 使用薬剤

Cefazolin(CEZ) は藤沢薬品工業の注射用セファメジン[®]を用いた。Cefmetazole(CMZ) は三共株式会社より分与された純末を、Penicillin G(PCG) は明治製菓より分与された純末を使用した。

3. 薬剤感受性の測定

日本化学療法学会標準法⁸⁾に準じ測定し、最小発育阻止濃度 (MIC; $\mu\text{g/ml}$) で示した。

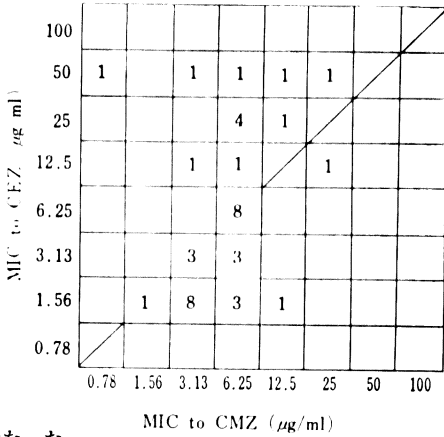
4. CEZ あるいは CMZ プロセス中の菌の増殖

Penassay broth(Difco) による 37°C、一夜培養液を新鮮培地に接種し、振盪培養により得た対数増殖期の培養菌液 (O. D. 0.7, 600 nm) を実験に用いた。前記培養菌液 0.3 ml を各 MIC 濃度の薬剤を含む 10 ml の Penassay broth に接種し、L 型試験管で振盪培養し、波長 600 nm における吸光度 (O. D.) を測定し、菌の増殖を調べた。

5. β -ラクタメース活性の測定

測定に用いたサンプルは全培養液、培養液、および細胞破碎抽出酵素液 (粗酵素液) である。酵素活性の測定は PERRET のヨード法⁹⁾に準じて行ない、1 unit = 1 μmole of β -lactam antibiotic hydrolyzed/hr., pH 5.8, 37°C として示した。また基質特異性を調べる場合は 30°C で行なった^{10,11)}。蛋白定量は Lowry 法¹²⁾に従

Fig. 1 Correlation of MICs between CEZ and CMZ
(Strains for which MICs of CEZ are 1.56 $\mu\text{g/ml}$ or more)



い行なった。

6. 温度処理による薬剤耐性の除去

Penassay brothによる 37°C 一夜培養液一白金耳量を 10 ml の新鮮培地に接種し、L 型試験管で 42°C 一夜振盪培養した。同培養液を Heart infusion 寒天培地(栄研)に接種し、37°C 一夜培養した。形成された単コロニーをヨウジで薬剤含有平板に接種し、各コロニーの薬剤感受性の有無を調べた。

II. 実験成績

1. ブドウ球菌株の CEZ, CMZ に対する感受性相関

Fig. 1 に CEZ と CMZ の使用ブドウ球菌に対する MIC 値を示した。CEZ の MIC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株に対しては、CMZ がより低い MIC 値を示す傾向がみられた。

2. ブドウ球菌株の CEZ あるいは CMZ プロス中での菌の増殖

以後の実験に使用した CEZ に対し種々の MIC 値を示す代表菌株 (SA 8, SA 1, SA 71 及び SA 159) の CEZ, CMZ, PCG に対する MIC 値を Table 1 に示す。CEZ に対し種々の MIC 値を示す菌株につき CEZ の 1 MIC 濃度含有プロスあるいは CMZ の 1 MIC 濃度含有プロス中での菌の増殖を調べた。Fig. 2 から明らかのように、いずれの菌株も CEZ プロス中では lag time の違いはあるものの 6 時間以内に菌の増殖が認められたが、CMZ プロス中では菌の増殖は全く認められなかった。

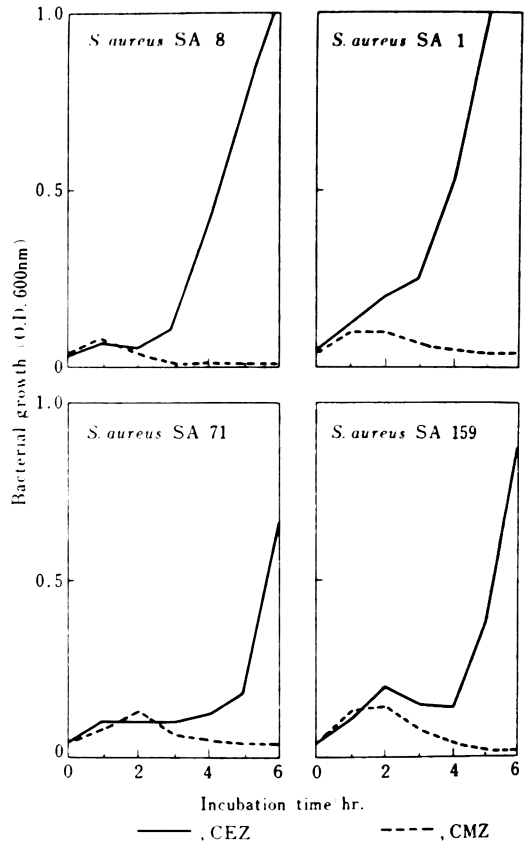
3. CEZ による β -ラクタメース産生の誘導

全培養液、培養液および粗酵素液を用い、CEZ あるいは PCG を基質として β -ラクタメース活性を測定した。また、各菌株の CEZ に対する MIC 値の 1/8 濃

Table 1 MICs of *S. aureus* strains used

<i>S. aureus</i> strains	MIC($\mu\text{g/ml}$)		
	CEZ	CMZ	PCG
SA 8	1.56	3.13	50
SA 1	6.25	6.25	50
SA 71	25	6.25	25
SA 159	50	12.5	100

Fig. 2 Bacterial growth in broth containing CEZ or CMZ



度の CEZ を添加した培地での培養により得た全培養液、培養液および粗酵素液についての β -ラクタメース活性もあわせて測定し Table 2 に示した。全培養液、培養液および粗酵素液のいずれにおいても、PCG を基質とした場合、CEZ 誘導処理したサンプルは非誘導処理サンプルに比べて β -ラクタメース活性の上昇を認めた。一方、CEZ を基質とした場合には β -ラクタメース活性はいずれも 0.2 units/ml 以下であった。また、それら β -ラクタメースの基質特異性は Table 3 に示した。この結果、CEZ 耐性ブドウ球菌株の β -ラクタメー

Table 2 β -lactamase activity

<i>S. aureus</i> strains	β -lactamase activity (units/ml) ^{a)}											
	CEZ hydrolyzed						PCG hydrolyzed					
	Whole culture		Filtrate		Crude extract		Whole culture		Filtrate		Crude extract	
	No ind	Ind ^{b)}	No ind	Ind	No ind	Ind	No ind	Ind	No ind	Ind	No ind	Ind
SA 8	0 ^{c)}	0	0	0	0	0	3.7	41.0	0.6	11.1	0	17.2
SA 1	0	0	0	0	0	0	3.6	51.7	0.4	7.5	0.3	21.4
SA 71	0	0	0	0	0	0	5.9	66.6	1.8	20.5	0	13.6
SA 159	0	0	0	0	0	0	4.6	69.6	0.5	13.3	0	51.2

a) 1 unit: 1 μ mole of β -lactam antibiotic hydrolyzed/hr., pH 5.8, 37°C

b) Cultures grown with CEZ (1/8 MIC)

c) 0; less than 0.2 units/ml

Table 3 Substrate specificity of β -lactamase to various β -lactam antibiotics in CEZ resistant *S. aureus*

<i>S. aureus</i> strains	Substrate specificity (%)					
	PCG	6 APA	ABPC	CEZ	CER	CMZ
SA 1	100	17	23	0	0	0*
SA 159	100	23	28	0	0	0
MS 1477	100	25	27	0	0	0
MS 258	100	36	26	0	0	0

* 0: less than 3(%)

Table 4 Comparison of β -lactamase induction by CEZ and CMZ

<i>S. aureus</i> strains	β -lactamase activity to PCG					
	Whole culture (units*/ml of culture)			Crude extract (units/mg protein)		
	No ind	CEZ ind	CMZ ind	No ind	CEZ ind	CMZ ind
SA 1	3.6	51.7	68.8	0	80.0	54.7
SA 159	4.6	69.6	79.0	1.0	122.9	126.7
MS 1477	0.6	48.3	88.8	0	64.5	105.3
MS 258	2.0	31.0	27.0	2.5	41.7	68.3

* 1 unit: 1 μ mole of β -lactam antibiotic hydrolyzed/hr., pH 5.8, 37°C

スは PCase 型であり、昔分離された PCG 耐性ブドウ球菌株の PCase の基質特異性とほぼ同じであった。さらに CMZ 誘導処理したサンプルにおいても PCase 活性を測定した。その結果 Table 4 に示したように CMZ も PCase のインデューサーになり得ることが判明した。

4. ブドウ球菌の PCase と CEZ 耐性との関係

ブドウ球菌の産生する PCase と CEZ に対する MIC の間の関連性について検討を行なった。ブドウ球菌 32 株について、各菌株の 1/8 MIC 濃度の CEZ を添加し

た培地での培養液より粗酵素液を得た。この粗酵素液について、PCG を基質とし PCase 活性値を測定し、蛋白量で補正することにより比活性値とした。各菌株の PCase 比活性値と CEZ の MIC 値との対応をみたのが Fig. 3 である。この図から MIC 値に比べ PCase 比活性値が非常に高い株が 1 株、逆に MIC 値に比べ PCase 比活性値が非常に低い株が 1 株存在していた。しかし残りの 30 株に関しては標準偏差を考慮すると、PCase 比活性値と CEZ の MIC 値の間には非常に明瞭

Fig. 3 Correlation between β -lactamase activity and MICs to CEZ (The circle (⊙) excludes Mean \pm S. D.)

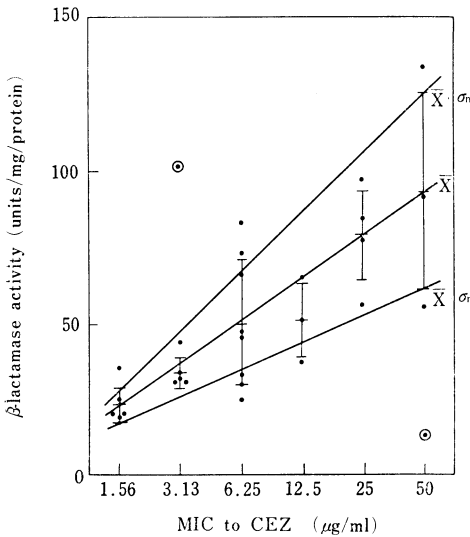


Table 5 Loss of resistance to PCG and CEZ in strain SA 159 after 42°C growth

No. of colonies tested	No. of colonies sensitive to CEZ (%)
1440	2(0.1)

な正の相関が認められることを示している。また、42°C 処理により PCG 耐性除去実験を行なった。得られた 2 コロニーは PCG(MIC: $\leq 0.1 \mu\text{g/ml}$), CEZ(MIC: $0.4 \mu\text{g/ml}$) 共に感受性であり、またこれら 2 コロニーには PCase 活性は全く認められなかった (Table 5)。このことから菌の産生する PCase は CEZ 耐性に何らかの関与をしていることが考えられる。

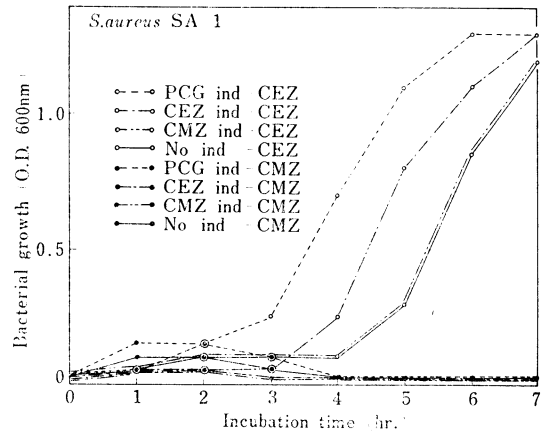
5. CEZ あるいは PCG 前処理による CEZ あるいは CMZ 感受性への影響

CEZ および CMZ のいずれにも、MIC $6.25 \mu\text{g/ml}$ を示す菌株 (SA 1) につき、PCG, CEZ あるいは CMZ で前処理した後の細胞の CEZ あるいは CMZ, 2 MIC 濃度含有ブロス中での菌増殖を見、Fig. 4 に示した。この図から本菌株は CEZ あるいは PCG 前処理により明らかに CEZ に対する感受性が低下することがわかった。この前処理による感受性の低下は PCG で、CEZ よりも著明に認められた。しかし、CEZ あるいは PCG 前処理のいずれも CMZ の感受性には影響を与えないことが示された。また、CMZ 前処理による CMZ 感受性の低下は全く認められなかった。

III. 考 察

ブドウ球菌株は PCase を産生しており、この PCase

Fig. 4 Effect of pretreatment with CEZ or PCG on the bacterial growth



は CEZ あるいは PCG により、その酵素活性を高められることが確認された。CEZ に対する MIC 値の異なる菌株を使用した本成績からは、ほとんどの菌株 (32 株中 30 株) の CEZ 感受性が PCase 産生量と相関するという新しい知見が得られた。しかし、CEZ を基質とした時は本実験測定条件下では β -ラクタメース活性はほとんど認められなかった。CEZ に対して耐性化する機構は PCase による抗菌作用点への到達阻害¹³⁾、ペニリン結合蛋白の変化や本 β -ラクタメース活性測定法の限界以下の微量の β -ラクタメース活性の存在などが考えられるかもしれない。CEZ の MIC が高く PCase 活性の低い菌株、逆に CEZ の MIC が低く PCase 活性の高い菌株がそれぞれ 1 株見出されたが、これらについての耐性化機構は、細胞表層構造の変化とか、酵素の誘導機構が異なっていることなどが考えられる。

CMZ や Cefoxitin はグラム陰性桿菌の β -ラクタメース産生のインデューサーとなることが報告されている^{14,15)}。Table 4 に示したように、CEZ 耐性ブドウ球菌の PCase 産生に関しては CMZ のインデューサー能が CEZ と同様に認められた。しかし CMZ, CEZ あるいは PCG で PCase 産生量を高めた細胞と無処理細胞を比較した場合、CMZ の菌増殖抑制効果に差は認められなかったという実験結果から CMZ 感受性は PCase の関与を受けないものと思われる (Fig. 4)。これらのことから、CMZ は CEZ 耐性ブドウ球菌に優れた抗菌活性を示したものと思われる。また、Fig. 1 に示した菌株のうち、CEZ に対する MIC が、 $1.56 \mu\text{g/ml}$ ないし $6.25 \mu\text{g/ml}$ といった菌株は CMZ と同じかあるいは低い MIC 値を示しているが、これらの菌株に対して試験管内抗菌作用形式としては CMZ が CEZ に比べ、はるかに殺菌的に働いていることも本実験成績から示され

た。

CEPs 抗生剤が多用されている現在、今後本実験に使用したような CEZ 耐性ブドウ球菌株がより増加することが予測される。このような CEZ 耐性ブドウ球菌由来 PCase は RICHMOND ら¹⁰⁾や根橋ら¹¹⁾の PCG 耐性ブドウ球菌由来 PCase とは基質特異性が異なっていた。1960 年代に分離された PCG 耐性菌株は CEZ にも耐性であった。これらの菌株は当時特殊な PCG 耐性菌株であったかもしれない。しかし、これらの菌株由来 PCase と今回分離された CEZ 耐性ブドウ球菌由来の PCase とは、ほぼ同じ基質特異性をもっていた。これは、これら CEZ 耐性ブドウ球菌が臨床的に選択され増加してきたことを示唆しているかもしれない。このような CEZ 耐性菌株に対しても CMZ は優れた抗菌作用を示した。

文 献

- 1) 三橋 進編：薬剤感受性測定法。薬剤耐性菌（三橋 進），1～21 頁，講談社サイエンティフィック，1980
- 2) 澤井哲夫： β -ラクタム系抗菌剤に対する耐性機構。臨床と細菌 6：245～252，1979
- 3) 小酒井 望：最近の感染症の原因菌と耐性の現況。東京都医師会雑誌 33：535～548，1980
- 4) 松田真人，浜洲泰久，花村敏嗣，浜尾 晃，中澤昭三：臨床分離セファロsporin系抗生物質耐性ブドウ球菌の産生する β -lactamase の精製，ならびにその性質に関する研究。Chemotherapy 23：2558～2563，1975
- 5) 横田 健： β -ラクタマーゼの臨床細菌学的考察。Chemotherapy 26：848～851，1978
- 6) HASHIMOTO, H.; K. KONO & S. MITSUHASHI: Elimination of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* by treatment with acriflavine. J. Bacteriol. 88: 261～262, 1964
- 7) KONO, M.; K. O'HARA, M. HONDA & S. MITSUHASHI: Drug resistance of staphylococci. XI, Induction of chloramphenicol resistance by its derivatives and analogues. J. Antibiotics XXII: 603～607, 1969
- 8) MIC測定法改訂委員会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76～79, 1981
- 9) PERRET, C. J.: Iodometric assay of penicillinase, Nature (London) 174: 1012～1013, 1954
- 10) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microbiol. Physiol. 9: 31～88, 1973
- 11) 根橋敏行，山本達男，横田 健：Ceftazole の各種 β -lactamase に対する安定性。Chemotherapy 24: 635～644, 1976
- 12) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265～275, 1951
- 13) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 936～940, 1977
- 14) MINAMI, S.; A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 382～385, 1980
- 15) NEU, H. C: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by gram-negative beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 170～176, 1974

STUDIES ON PARTICIPATION OF β -LACTAMASE AND
SENSITIVITY TO CEFMETAZOLE (CMZ)
IN CEFAZOLIN (CEZ)-RESISTANT STRAINS OF
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

MASANORI SASATSU, KOJI O'HARA, TAKESHI HAYASAKA
and MEGUMI KONO

Department of Microbiology, Tokyo College of Pharmacy,
Tokyo, Japan

Correlation between sensitivity to cefazolin (CEZ) and that to cefmetazole (CMZ) in *Staphylococcus aureus* was investigated. It was indicated that CMZ gave lower MICs against the strains with higher MICs for CEZ and that CMZ exerted a stronger bactericidal effect on the strains with similar MICs for CEZ and CMZ. Although CEZ-resistant strains were induced by treatment with CEZ or penicillin G, the treatment had no influence upon the antibacterial activity of CMZ.

MICs were correlated with penicillinase activities produced in CEZ-resistant strains, suggesting some relation between acquisition of the resistance and production of the enzyme.