

各種 β -lactam 剤に対する臨床分離大腸菌の感受性解析— β -lactamase 産生量と MIC の関係—

達 彦 二・武 藤 弓 子・五 島 瑳 智 子

東邦大学医学部微生物

(昭和 57 年 7 月 15 日受付)

Disk-agar diffusion 法を用いた基質特異性同定試験により、臨床分離株 100 株を β -lactamase 群に分類し、そのうち特に TEM 型 (35 株) および Chromosomal 型 (56 株) の β -lactamase 産生株の MIC 値を次の直線回帰式により算出した。

$$Y = aX + a'X' + b'$$

Y : MIC

X : TEM 型 β -lactamase 活性X' : Chromosomal 型 β -lactamase 活性 a, a', b' : TEM 型, Chromosomal 型に対する各抗生物質の定数値

β -lactamase 活性より算出した MIC 値は実験で求めた β -lactam 抗生物質 (Cefuroxime, Cefoxitin, Cefamandole, Cephalixin, Cephalothin, Cephaloridine, Cefazolin, Ampicillin および Carbenicillin) の MIC 値とよく相関した。

近年、数多くの β -lactam 抗生剤の開発はめざましく、これら薬剤の各種細菌での感受性スペクトルおよび抗菌力の強弱は複雑多岐となりつつある。しかも β -lactam 抗生剤の使用頻度の上昇に伴い、耐性菌の増加は著しく、臨床上重要な問題となっている。

β -lactam 抗生剤の主要耐性要因である β -lactamase の活性測定法については、種々の方法が知られているが、手技が複雑で臨床分離株の多数を定量的に測定するには困難である。そこで著者らは前報¹⁾において、 β -lactamase の基質特異性を簡便に、しかも定量的に測定できる Disk-agar diffusion 法を開発した。さらに本測定法の適用により同一基質特異性を示す酵素集団内においては、 β -lactamase 産生量と MIC 値との間に強い相関を認めたことを報告した。

本報告においては、前報より得られた回帰式を用いて得られた抗生剤の MIC 値と、実験により得られた MIC 値との相関を解析し、理論的に証明することを試みた。

I. 材 料 と 方 法

1. 使用菌株

β -lactamase 産生標準株として *E. coli* ML 1410 (RGN 823)²⁾, *E. coli* NIHJ JC-2¹⁾, その他は臨床分離大腸菌 100 株を使用した。

2. 使用薬剤および使用 disk

使用した薬剤は

Cephalothin (CET と略, 930 μ g/mg, 塩野義製薬)
Cephaloridine (CER と略, 910 μ g/mg, 新日本実業)

Cephalexin (CEX と略, 930 μ g/mg, 萬有製薬)
Cefazolin (CEZ と略, 944 μ g/mg, 藤沢薬品工業)
Cefamandole (CMD と略, 964 μ g/mg, 塩野義製薬)

Cefoxitin (CFX と略, 938 μ g/mg, 第一製薬)
Cefuroxime (CXM と略, 971 μ g/mg, 新日本実業)
Ampicillin (ABPC と略, 904 μ g/mg, 藤沢薬品工業)

Carbenicillin (CBPC と略, 792 μ g/mg, 台糖ファイザー)

使用 disk は CXM, CFX, CMD については東洋汙紙薄手 disk (径 8 mm) を用いて自製し、他は昭和薬品化学工業 1 濃度 disk (30 μ g/disk) を用いた。Cloxacillin は disk のみに使い、MCIPC と略した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法

日本化学療法学会標準法に準じて行なったが、培養液はトリプトソイブロス (栄研) で一夜培養後、約 10^6 cells/ml に希釈し接種した。

4. β -lactamase の調製

酵素産生量の検討にはトリプトソイブロスで一夜培養した菌液を同培地にて 10 倍希釈し、37°C, 4 時間振盪

培養ののち、菌体を 5°C において 3,500×g, 15 分間遠心分離により集めた。集めた菌体を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄したのち、同緩衝液に再懸濁し 20 kHz 超音波破砕器 (Ultrasonic 350 G 型, Ultrasonic 社, ヨーク, 英国) で氷冷下 2 分間破砕した。細菌破砕液は 3,500×g, 15 分間遠心分離し、上澄部を β -lactamase 粗酵素液とした。

酵素活性の測定はマイクロヨード法³⁾により, Cephaloridine 基質 (100 mM) を 30°C において 1 時間に 1 μ mole 分解する酵素量を 1 unit とした。

タンパク量の定量は Lowry 法⁴⁾によった。

5. β -lactamase の基質特異性の決定

臨床分離大腸菌の β -lactamase の基質特異性の決定は, Disk-agar diffusion 法によった¹⁾。すなわち CER 基質で 2.5 units の粗酵素液を, 正確に 45°C に調整した 1.2% 寒天ゲル (M/20 リン酸緩衝液, pH 7.0) 100 ml に混和した。これを抗菌検定板 (16×24 cm) に流し, 感受性 disk (CXM, CFX, CMD, CEX, CEZ, CER, CET, ABPC, CBPC および MCIPC) を 1 セットとして寒天上に置き, 37°C, 18 時間酵素反応させ, さらに *B. subtilis* ATCC 6633 の孢子 10⁸ spores/ml を含む Cephaloridine 定量用培地 (polypeptone 0.5%, ケン酸ナトリウム 1%, 肉エキス 0.3%, NaCl 0.5%, 寒天 1.2%, pH 6.5) を 40 ml 重層し, 37°C, 18 時間培養した。

酵素型は本法での β -lactamase 反応後の残存抗生物質活性を, 阻止帯長として測定し, この結果を標準 β -lactamase での阻止帯パターンと比較同定した (Fig. 1)。Disk-agar diffusion 法により, *E. coli* ML 1410 (RGN 823) および, *E. coli* NIHJ JC-2 由来の酵素と同一基質安定性プロフィールを示す β -lactamase をそれぞれ TEM 型, Chromosomal 型と称した。

6. 回帰式による MIC 値の算出

得られた β -lactamase 活性から MIC 値の算出はそれぞれ次式によった¹⁾。

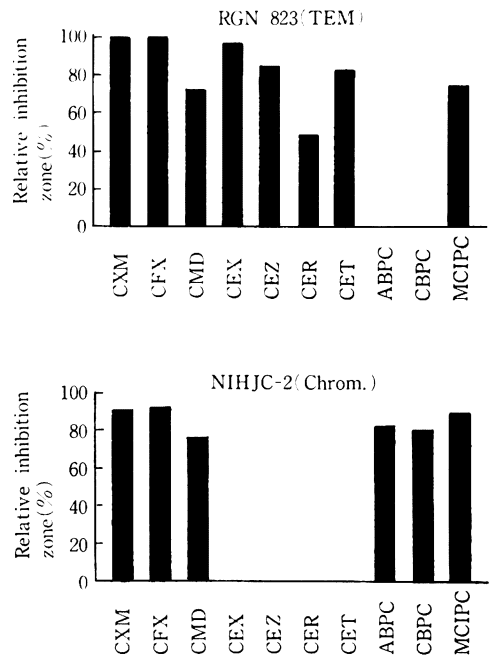
TEM 型; $Y=aX+b$ (1)

Chromosomal 型; $Y'=a'X'+b'$ (2)

ただし, X, X' : TEM 型, Chromosomal 型 β -lactamase の活性 (units/mg protein), Y, Y' : β -lactamase 産生菌の MIC 値 (μ g/ml), a, a', b, b' : TEM 型, Chromosomal 型に対する各抗生物質の定数値。

式 (1) における b 値は TEM 型酵素を産生しない菌株の耐性値であり, 通常多くの大腸菌は, TEM 型酵素産生の有無にかかわらず, Chromosomal な β -lactamase を併せもつと考えられる¹⁾ことから, (1) 式の b

Fig. 1 Stability profile of various β -lactam antibiotics against standard β -lactamases produced *E. coli*



The relative inhibition zone shows a relative rate of inhibition zone diameter of enzyme containing plate to that of enzyme free plate

Table 1 Least-square line constants of TEM-like and chromosomal β -lactamase producers in *Escherichia coli*¹⁾

β -lactamase type Drug	TEM-like Least-square line ^{a)} ($Y=aX+b$)		Chromosomal Least-square line ^{a)} ($Y'=a'X'+b'$)	
	a	b	a'	b'
CXM	0.044	5.24	6.91	6.16
CFX	0.033	7.38	8.00	8.41
CMD	0.82	3.61	2.26	1.69
CEX	0.057	11.5	111.7	4.41
CEZ	0.73	-3.08	5.37	1.83
CER	0.89	9.41	9.47	3.21
CET	0.57	25.3	114.4	5.96
ABPC	>100	—	45.0	5.81
CBPC	>100	—	5.43	10.8

a) Least-square line was calculated from the formula; $Y=aX+b$, where "X" is specific β -lactamase activity using cephaloridine as the substrate (units/mg protein), "Y" is MIC value of agar dilution method inoculated at 10⁶ cells/ml (μ g/ml).

Fig. 2 Distribution of β -lactamase activities in TEM- and chromosomal-type β -lactamase-producers of *E. coli*

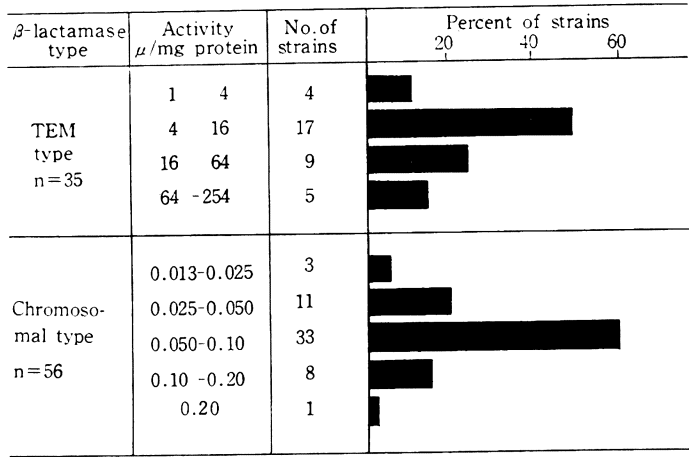
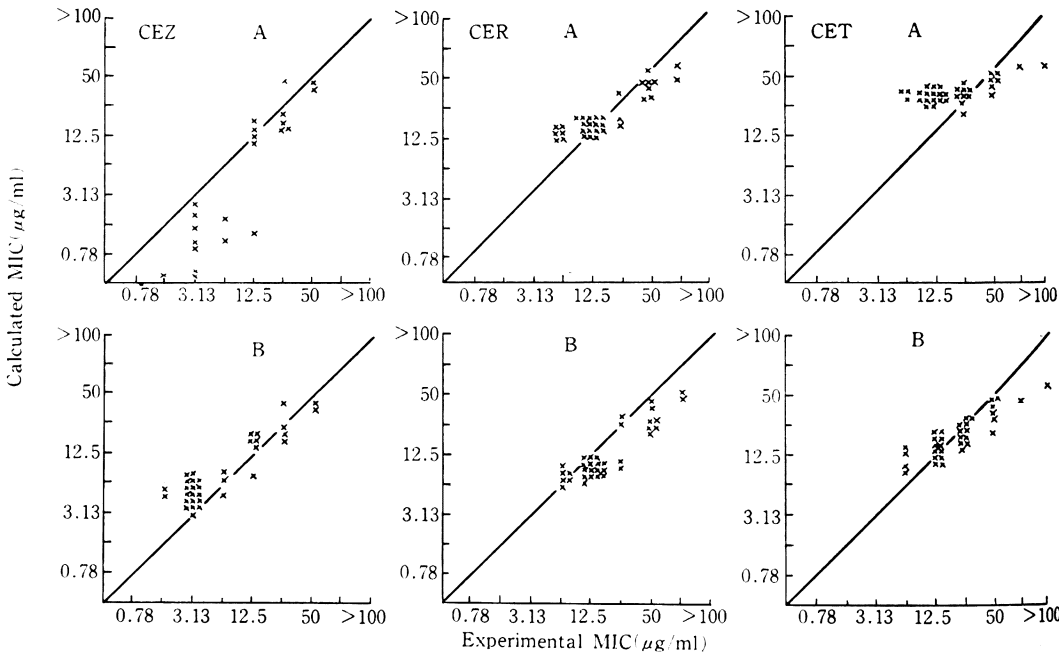


Fig. 3 Correlograms of MICs between calculated and experimentally measured in TEM-like β -lactamase-producers of *E. coli*

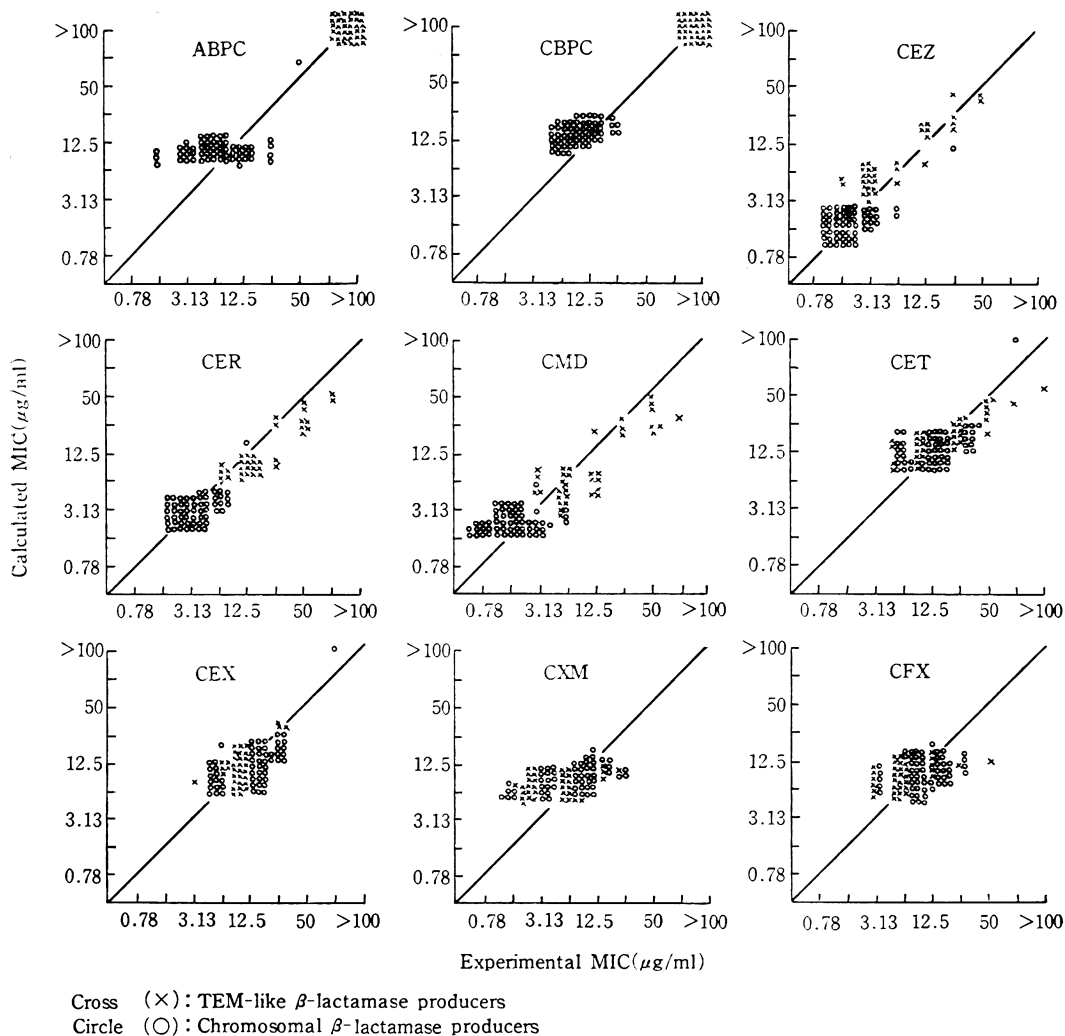


A: Calculated from formula (1), $Y=aX+b$
B: Calculated from formula (3), $Y=aX+a'X'+b'$
See the text another explanations.

に (2) 式 Y' を代入し、
 $Y=aX+a'X'+b'$(3)
式 (3) を導入した。

TEM 型, Chromosomal 型酵素産生菌に対する回帰
定数 a, a', b, b' の値は Table 1 の値を用いた。
なお (3) 式適用の際, TEM 型酵素産生株中の

Fig. 4 Correlograms of MICs between calculated and experimentally measured in TEM- and chromosomal-type β -lactamase-producers in *E. coli*.



Chromosomal 酵素活性は高い TEM 型酵素活性に妨害され、分別定量できないため、本酵素産生量と MIC 値の相関が高く ($r=0.90$)、TEM 型酵素と相関の低い ($r=0.45$) CEX¹⁾ の MIC 値より (2) 式を適用し、Chromosomal 酵素産生量の推定を行なった。

II. 成 績

1. 臨床分離大腸菌の β -lactamase 産生量

Disk-agar diffusion 法¹⁾により酵素型の判明した臨床分離大腸菌 100 株のうち、TEM 型酵素産生株 35 株および Chromosomal 型酵素産生株 56 株の酵素産生量を Fig. 2 に示した。

β -lactamase の細胞破砕液蛋白量当りの比活性は、TEM 型酵素産生株では、3.4~108 unit/mg protein であるのに対し、Chromosomal 型酵素産生株では 0.013~1.5 unit/mg protein と低い値を示した。

2. TEM 型酵素産生株 MIC 値の計算値と実験値比較

TEM 型酵素産生株の個々の菌株について、その β -lactamase 産生量から回帰式を用い MIC 値を算出した結果を Fig. 3 に示した。TEM 型を独立に取り扱った (1) 式より算出した MIC 値を Fig. 3 の A に示し、さらに Chromosomal 型 β -lactamase を加味した (3)

式より算出した MIC 値を Fig. 3 の B に示し、実験により求めた MIC 値と比較を行なった。

用いた 9 薬剤 CET, CER, CEX, CEZ, CMD, CFX, CXM, ABPC, CBPC のうち、(1), (3) 式の差の顕著な CEZ, CER, CET を Fig. 3 に示した。(1) 式では MIC 値の低い領域において計算値と実験値のずれがみられたが、Chromosomal 型酵素による MIC 補正を行なった (3) 式の適用によりさらに計算値と実験値の高い一致をみた。

3. TEM 型, Chromosomal 型酵素産生株 MIC の計算値と実験値の相関

TEM 型酵素産生株で (1) 式より (3) 式の方が実験値との相関が高いことが判明したので、TEM 型および Chromosomal 型酵素産生株の計 91 株について (3) 式により算出した MIC 値と実験により求めた MIC 値とを比べた結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4 から明らかなように、使用した全薬剤 ABPC, CBPC, CEZ, CER, CMD, CET, CEX, CXM, CFX で実験式と回帰式からの計算値の差は小さく、各抗生物質ともほとんどの plot が $2 \pm 1.5 \times \text{MIC}$ 値以内の領域に分布しており、TEM 型, Chromosomal 型とも (3) 式によく適合することが認められた。

III. 考 察

β -lactamase 産生量と β -lactam 抗生剤の MIC 値とは何らかの相関性があることは知られていたが、多数の菌株集団についての解析がなかったため、前報¹⁾において大腸菌 100 株集団内で、 β -lactamase 産生量と MIC 値から、抗生剤ごとに回帰式を求めることにより、その相関性を解析した。

今回はこの回帰式の有用性をさらに確認するため、特に TEM 型酵素産生株を用い、Chromosomal 型酵素と TEM 型酵素の両者を産生する系で、新たな回帰式: $Y = aX + a'X' + b'$ を作成したところ、前報の $Y = aX + b$ 式よりも、さらに実験値との一致度を強めた。

このことから、菌の β -lactam 抗生剤の感受性パターンは、その菌の産生する β -lactamase の質および量に依存し、たとえば TEM 型酵素産生株では、ABPC, CBPC の高度耐性化とともに、酵素量に比例して、CER, CET, CMD が耐性化する。さらに Chromosomal 型酵素産生株では、CEX, CET, CEZ, CER の耐性化傾向が示された。

以上の成績から、逆に、菌の産生する酵素の基質特異性が決定できれば、薬剤の MIC 値から酵素産生量が算出できるのみならず、すべての薬剤の MIC 値を測定する必要はなく、他の薬剤の MIC 値の算出が可能であると考えられた。さらには、大腸菌の場合には、酵素の基

質特異性を決定しなくても、数種 (2, 3 種) の薬剤の MIC 値から、酵素の種類の推定および他の薬剤の MIC 値の算出も可能であることを示唆した。

このことは、本実験で用いた大腸菌に限らず、他の菌種においても、産生される β -lactamase ごとに類別しさえすれば、上記の回帰式が適用可能であり、菌種ごとの検討が必要であろう。その際に、大腸菌での β -lactamase の場合には、TEM 型および Chromosomal 型酵素とも β -lactam 抗生剤による誘導現象がほとんど認められず、酵素量の定量は比較的容易であった。しかし *S. aureus*, *Proteus*, *Pseudomonas* など多くの菌種では、 β -lactamase の誘導的産生が知られていることから^{5,6)}、本直線回帰法を適用する際には、適切な誘導条件の検討が必要である。これら臨床細菌での R 因子由来、染色体由来酵素の産生制御、酵素誘導機作には未知の点も多く、これらの解明は本法の適用を拡大するものと期待される。

臨床分離株における β -lactamase と耐性化の相関解析は β -lactam 抗生剤の臨床適用に際して、第一に β -lactam 抗生剤の複雑な感受性相関の解明が可能であること、第二に、薬剤耐性機作の違いによる disk 感受性試験のグループ化に理論的根拠を与えうると考えられる。

文 献

- 1) TSUJI, H.; Y. OHASHI, K. OKUMURA, A. TSUJI, Y. MUTO & S. GOTO: Quantitative analysis of β -lactamase production and multiple resistance to β -lactam antibiotics in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Chemotherapy* 28: 26~39, 1982
- 2) SAWAI, T.; K. TAKAHASHI, S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Variant of penicillinase mediated by an R-factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104: 620~629, 1970
- 3) NOVICK, R. P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962
- 4) LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 5) SYKES, R. B. & M. MATHEW: The β -lactamase of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 115~157, 1976
- 6) 沢井哲夫, 山岸三郎: β -ラクタマーゼベニシリノ/セファロsporin加水分解酵素。蛋白質・核酸・酵素 20: 1202~1213, 1975

CROSS RESISTANCE TO β -LACTAM ANTIBIOTICS BY USE
OF THE β -LACTAMASE PRODUCTION—MIC
REGRESSION LINE METHOD IN *ESCHERICHIA COLI*

HIKOJI TSUJI, YUMIKO MUTO and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University, School of
Medicine, Tokyo, Japan

By use of disk-agar substrate profile method, one hundred clinical isolates of *Escherichia coli* were classified into β -lactamase groups.

The isolates of the groups of TEM-like and chromosomal-like β -lactamase producers, 35 and 56 strains respectively, were calculated their MICs from the least regression line:

$$Y = aX + a'X' + b'$$

where Y : MIC, X : TEM-like β -lactamase activity, X' : chromosomal-like β -lactamase activity, a , a' , b' : constants for each antibiotics.

The calculated MICs show good relationship to experimental MICs for the β -lactam antibiotics used, cefuroxime, ceftiofur, cefamandole, cephalixin, cephalothin, cephaloridine, cefazolin, ampicillin and carbenicillin.