

β -lactamase 測定法の臨床細菌への応用

(1) 各種 β -lactamase および生菌による測定法の感度

武藤 弓子・小川 正俊・吉田 勇・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 57 年 10 月 29 日受付)

β -lactamase 簡易測定法 4 法 (nitrocefin spot plate 法, disk 法, starch paper 法, slide glass 法) を β -lactamase 産生標準株の生菌および産生酵素を用いて感度を調べた結果, nitrocefin spot plate 法が最も感度が良かった。また disk 法の基質として Cephaloridine を用いることにより, Penicillin G の場合より, 10 倍以上感度が上昇した。

Richmond type I 型の酵素はその産生菌種により, 感度に大きな差が認められたが, 臨床分離耐性株のうち, 最も分布率の高い R プラスミド支配の III 型酵素は測定法間に感度の差が認められなかった。

各種 β -lactam 系の抗生剤の広汎な使用に伴い, 臨床分離耐性株の増加は著しい。 β -lactam 剤耐性は菌の産生する β -lactamase によるものが最も多く, 臨床細菌学的には, 薬剤感受性測定成績と同時にこの酵素産生の有無を知ることは臨床治療上有意義である。 β -lactamase 測定にはヨウ素法¹⁻³⁾, ヒドロキサム酸法^{8,9)}, バイオアッセイ法¹⁰⁾, 変色基質法¹¹⁾などが知られているが, これら測定法は手技が複雑であるため, 臨床分離株への適用は不適當である。そこで β -lactamase 簡易測定法として知られているヨウ素法の変法である slide glass 法¹²⁾ starch paper 法¹³⁾, disk 法, さらに変色基質法である nitrocefin を用いた nitrocefin spot plate 法¹¹⁾の 4 法について, 日常の臨床細菌検査での実用化を目標として, β -lactamase 産生標準株の生菌ならびに酵素を用い, 基礎的検討を行なった。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

本実験に使用した菌株および MIC 値を Table 1 に示した。MIC の測定は化学療法学会標準法に準じ, 接種菌量は 10^6 cells/ml で行なった。

2. 粗酵素液の調整

トリプトソイブロス (栄研) 中で 37°C , 一夜培養した菌を遠心して集菌し, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗浄したのち, 同 buffer に懸濁し, 超音波破碎したのち, $3,500 \times \text{g}$, 10 分間遠心し, 上清を一夜 4°C にて透析し, 内液を凍結乾燥した試料を粗酵素標品とした。

市販の酵素は *B. cereus* 由来の penicillinase (Sigma)

および *E. cloacae* 由来の cephalosporinase (Miles) を用いた。

3. β -lactamase の活性測定

酵素活性は Cephaloridine を基質として用い, ミクロヨード法⁹⁾で, 30°C , 1 時間に $1 \mu\text{mole}$ 水解する量を 1 unit とし, β -lactamase 量は mg 蛋白当りで表示した。蛋白量は Folin の方法により測定した。

市販の酵素は記されている活性で記した。

Table 1 Type of enzymes and MICs of strains

Strain No.	Type* of enzyme	MIC (10^6 cells)	
		Penicillin G	Cephaloridine
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	I a	50	3.13
<i>P. rettgeri</i> GN 624	I a	200	400
<i>P. inconstans</i> GN 627	I a	3,200	400
<i>S. marcescens</i> IID 619	I a	800	100
<i>E. cloacae</i> IID 977	I a	>3,200	800
<i>C. freundii</i> GN 346	I a	>3,200	400
<i>P. morganii</i> GN 125	I a	25	200
<i>P. vulgaris</i> GN 76	I c	400	400
<i>P. aeruginosa</i> P-32	I d	1,600	3,200
<i>P. mirabilis</i> GN 79	II b	>3,200	50
<i>E. coli</i> 121	III	400	6.25
<i>E. coli</i> ML1410(RGN823)	III	>3,200	50
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	IV b	1,600	12.5
<i>E. coli</i> ML1410(RGN238)	V a	800	3.13
<i>P. aeruginosa</i> 11		>3,200	>3,200

* Ref. 15

4. β -lactamase 簡易測定法

試料として粗酵素標品およびその培養菌体を用いた。

1) disk 法: Penicillin G を 15% ならびにブロムクレゾールパープルを 0.1% 含有したディスク表面に試料を塗抹し, 30 分後, 黄色に変化したものを陽性, 変化のないものを陰性とした。

2) slide glass 法: スライドガラス上にペニシリンヨード液 (Penicillin G 液 1.5 ml (50 万単位)+ヨード液 1 ml) を滴下し, その上に試料を塗抹したのち, 0.4 %可溶性デンプンを滴下し, 5 分後, 白色に変化したものを陽性とし, 変化のないものを陰性とした。

3) starch paper 法: デンプン処理 沄紙 (7 cm×2 cm) を Penicillin G 液 (リン酸 buffer 中 100 mg/ml) 中に 10 分間ひたしたのち, 沄紙をシャーレ内に広げ, 試料を塗抹する。30°C, 30 分後, ヨード試液 (I_2+KI) を滴下し, 白色に変化した場合を陽性, 変化のないものを陰性とした。

なお, 1), 2) および 3) の方法において, 基質を Penicillin G の代わりに Cephaloridine を用いて同様の実験を行なった。

4) nitrocefin spot plate 法: シャーレのウェル内に nitrocefin (新日本実業) 100 μ l (リン酸 buffer 中 0.25 mg/ml) を入れ, 試料を接種, かくはんし, 30 分後, 18 時間後に赤色に変化したものを陽性, 変化のないものを陰性とした。

II. 実験成績

1. Nitrocefin spot plate 法の各種酵素による感度

Fig. 1 に示すように, 各菌種から得られた粗酵素, Richmond type Ia, Ic, Id, IIb, III, IVb, Va の各酵素とも 3.4 unit 以下で 30 分反応させるとすべて陽性となった。横軸は陽性となった酵素の最少量である。

2. Disk 法, starch paper 法および slide glass 法の各酵素による感度

基質を Penicillin G で行なった場合, 上述の nitrocefin spot plate 法に比べ感度が鈍く, しかも酵素型により大きな差が認められた。すなわち disk 法の場合陽性を示すのは, 0.2~340 unit 以上, slide glass 法の場合は, 0.2~340 unit, starch paper 法の場合は, 2.2~750 unit の酵素量を要した。特に Ia 型酵素の場合, 測定法間のみならず Ia 型酵素を産生する菌種の違いにより感度に大きな差が認められた (Fig. 2)。

3. Disk 法における基質の検討

上述のように, Penicillin G を基質とした場合, cephalosporinase である Ia 型酵素の感度が極めて悪いことから, 基質を Cephaloridine に変えて disk 法での感度を調べた結果を Fig. 3 に示した。

特に, *P. rettgeri* GN 624 および *P. inconstans* GN 627 の Ia 型酵素では, 基質を Cephaloridine にすると, 陽性となるのに要する酵素量は Penicillin G の場合の約 1/10 となり, 明らかに感度が上昇した。

Fig. 1 Sensitivity of nitrocefin spot plate method

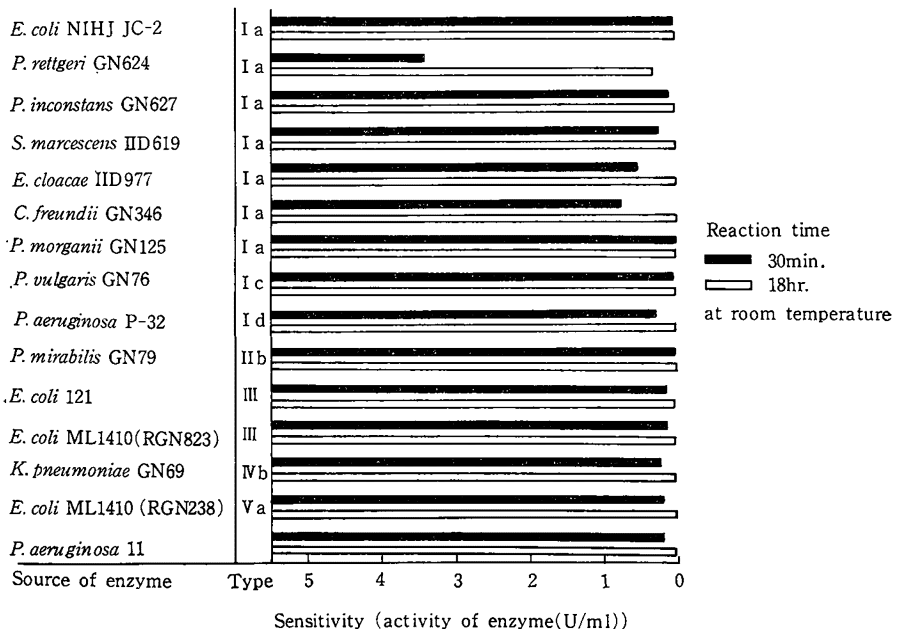


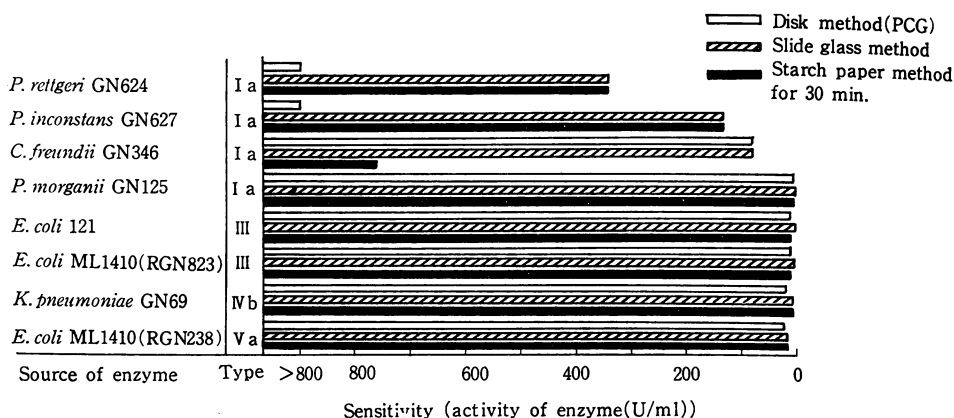
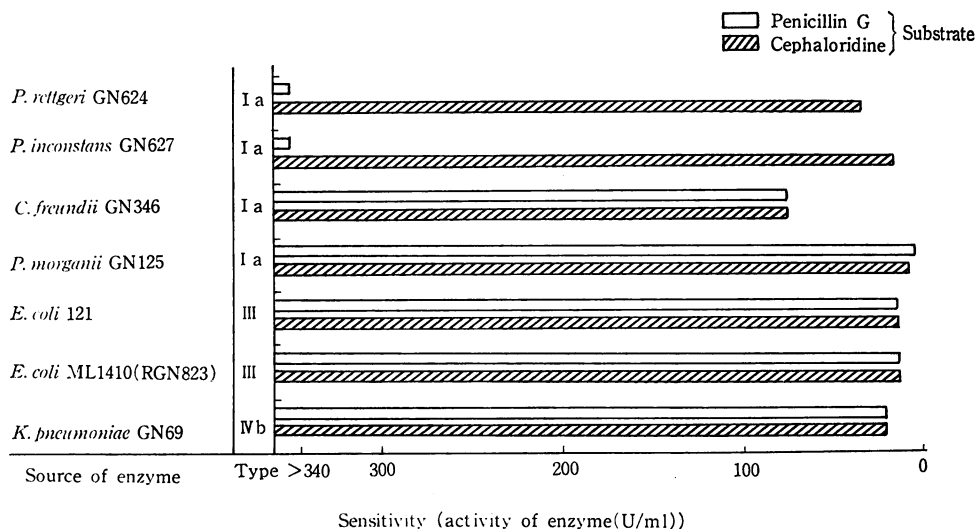
Fig. 2 Sensitivity of β -lactamase rapid detecting methods

Fig. 3 Sensitivity of disk method



4. Richmond type III型酵素の感度

Table 2 は *E. coli* 121 と *E. coli* ML 1410 (RGN 823) の 2 株の III 型酵素について、測定法の感度を比較した成績である。Nitrocefin spot plate 法の感度が最も良いが、他の測定法においても、測定法間および酵素由来株間の感度差は 10 倍以内であった。また disk 法の場合の基質が Penicillin G でも Cephaloridine でも感度に差がなく、このタイプの酵素はいずれの測定法でも検出しやすいことが示された。

5. 市販の酵素標品を用いた各種測定法の感度

現在、 β -lactamase 酵素標品として市販されている酵素を用いて 4 種の測定法の感度を比較した成績を Table

3 に示した。4 法のうち nitrocefin を基質とした nitrocefin spot plate 法が、他の測定法より 10 倍以上感度が良かった。また当然ではあるが、penicillinase の場合は Penicillin G, cephalosporinase の場合には Cephaloridine を基質とした方が感度は 10 倍以上良好となった。

6. 標準株の菌体を用いた各種測定法の感度

酵素を用いた場合の結果と同様、菌体を用いた場合にも nitrocefin spot plate 法が最も感度が良く、他の測定法は nitrocefin spot plate 法に比べ感度が悪かった。また III, IV b 型酵素由来株は 4 種のいずれの測定法でも陽性であった。一方、I a, I d 型酵素産生株である

Table 2 Sensitivity of β -lactamase rapid detecting methods by Richmond type III enzyme

Source of enzyme	Disk method		Slide glass method	Starch paper method	Nitrocefin spot plate method	
	Penicillin G	Cephaloridine			30 min.	18 hr.
<i>E. coli</i> 121	13.1	13.1	1.31	13.1	0.131	0.0131
<i>E. coli</i> ML 1410 (RGN 823)	12.7	12.7	1.27	12.7	0.127	0.0127

Sensitivity (activity of enzyme (U/ml))

Table 3 Sensitivity of β -lactamase rapid detecting methods by penicillinase of *B. cereus* or cephalosporinase of *E. cloacae*

Methods	Substrates	Enzymes		Cephalosporinase ^a of <i>E. cloacae</i>	
		Penicillinase ^a of <i>B. cereus</i>		Penicillin G	Cephaloridine
		Penicillin G	Cephaloridine		
Disk method		5	500	50	0.5
Slide glass method		5	500	50	0.5
Starch paper method		50	500	50	0.5
Spot plate nitrocefin method			0.5 ^b		5 ^b

a. Sensitivity was indicated by unit/ml

b. Substrate was nitrocefin.

Table 4 Sensitivity of β -lactamase rapid detecting methods by β -lactamase standard strains

Strain	Richmond type of enzyme	Disk method		Slide glass method	Starch paper method	Nitrocefin spot plate method		
		Penicillin G	Cephaloridine			30 min.	18 hr.	18 hr. *
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	I a	—	—	—	—	—	+	+
<i>P. rettgeri</i> GN 624	I a	—	—	—	—	—	—	+
<i>P. inconstans</i> GN 627	I a	—	+	—	—	—	+	+
<i>S. marcescens</i> IID 619	I a	—	+	—	—	—	+	+
<i>E. cloacae</i> IID 977	I a	—	+	+	—	+	+	+
<i>C. freundii</i> GN 346	I a	—	+	—	+	+	+	+
<i>P. morganii</i> GN 125	I a	—	+	—	—	—	+	+
<i>P. vulgaris</i> GN 76	I c	—	—	—	—	—	+	+
<i>P. aeruginosa</i> P-32	I d	—	—	—	—	—	—	+
<i>P. mirabilis</i> GN 79	II b	+	+	—	—	+	+	+
<i>E. coli</i> 121	III	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ML 1410 (RGN 823)	III	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	IV b	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ML 1410 (RGN 238)	V a	+	+	—	—	—	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 11		—	—	—	—	—	+	+

+ Positive, — Negative

* Induction by penicillin G or cloxacillin.

P. rettgeri GN 624, *P. aeruginosa* P-32 はいずれの測定法でも陰性であったが、前培養の培地に Penicillin G (0.1 μ g/ml) または Cloxacillin (0.1 μ g/ml) を加えて培養した菌では spot plate nitrocefin 法の 18 時間後の成績のみ陽性となり、他の方法では陰性であった。これは培地中の Penicillin G または Cloxacillin により β -lactamase が誘導され産生量が増加したためと

考えられる。

III. 考 察

β -lactamase 簡易測定法 4 法のうち、当然ではあるが、nitrocefin spot plate 法が最も感度が良かった。さらに disk を用いた nitrocefin 法の方が簡便であることから臨床的有用性は高いと考えられる。他の 3 種の測定法のうち、disk 法は最も操作が簡単であり、しかも

Penicillin G と Cephaloridine の両基質をそれぞれ用いることにより cephalosporinase および penicillinase の両酵素の検出が可能となることが示唆された。

臨床分離株のうち、耐性が問題となるのは菌種特異的な染色体性の耐性とプラスミド性の耐性である。グラム陰性桿菌のうち *P. mirabilis* と *Klebsiella* のあるもの以外は、染色体性 β -lactamase を産生する¹⁴⁾。またブドウ球菌の penicillinase はミニプラスミド、*P. mirabilis* の penicillinase はミニプラスミドあるいは R プラスミドに支配されることから¹⁴⁾、ブドウ球菌と *P. mirabilis* 以外の菌種では、 β -lactamase 産生量が問題となる。しかもこの染色体性の β -lactamase の一つである I a 型酵素の場合、産生する菌種により、同一測定法においても感度が異なること (Fig. 2, Fig. 3) から、本法での検出可能な β -lactamase 量と MIC 値の関係は多くの臨床分離株を用いて検討する必要がある。

一方、R プラスミド支配の III 型酵素の場合には、4 測定法のいずれにおいても、その感度に大きな差がなかったことから (Table 3)、臨床問題となる伝達性 R プラスミド支配の β -lactamase はこれらの方法で検出可能であることが示唆された。このことは酵素の結果のみならず、生菌を用いた場合も同様であったことから、臨床分離株における有用性がさらに拡大されと考えられる。

しかしながら、これらの方法により β -lactamase 検出を臨床分離株に適用する際に注意すべきことは、抗菌剤に対する MIC 値が相当高いにもかかわらず、 β -lactamase 産生が陰性となる菌種が存在することである。この原因として、薬剤が細胞外膜を透過しにくい場合¹⁴⁾ また菌の β -lactamase 産生に誘導を必要とする場合等が考えられる。特に、*P. aeruginosa* の場合、 β -lactamase 産生に誘導を必要とすることが知られていることから¹⁴⁾、多くの臨床分離株を用いて酵素の誘導産生の条件検討が必要と考えられる。この点については次報で報告する。

文 献

- 1) PERRET, C. J.: Iodometric assay of penicillinase. *Nature* 27: 1012~1013, 1954
- 2) SARGENT, M. G.: Rapid fixedtime assay for penicillinase. *J. Bacteriol.* 95: 1493~1494, 1968
- 3) NOVICK, R. P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962
- 4) BOXER, G. E. & P. M. EVERETT: Colorimetric determination of benzylpenicillin. *Anal. Chem.* 21: 670~673, 1949
- 5) DALE, J. W. & J. T. SMITH: The purification and properties of the β -lactamase specified by the resistance factor R-1818 in *Escheri-*

chia coli and *Proteus mirabilis*, *Biochem. J.* 123: 493~500, 1971

- 6) HOU, J. P. & J. W. POOL: Measurement of β -lactamase activity and rate of inactivation of penicillins by a pH-stat alkalimetric titration method. *J. Pharm. Sci.* 61: 1594~1598, 1972
- 7) LABIA, R.; J. ANDRILLON & F. LEGOFFIC: Computerized microacidimetric determination of β -lactamase michaells-menten constants. *FEBS Letters.* 33: 42~44, 1973
- 8) O'CALLAGHAN, C. H.; P. W. MUGGLETON & G. W. ROSS: Effects of β -lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. *Antimicrob. Ag. Chemother.* — 1968, 57~63, 1969
- 9) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. 139: 789~790, 1974
- 10) 住木諭介: 抗生物質 (上巻), p. 122. 東大出版会
- 11) O'CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY & A. H. SHINGLER: Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1: 283~288, 1972
- 12) ROSENBLATT, J. E. & A. M. NEUMANN: Laboratory Suggestions, A rapid slide test for penicillinase. *A. J. C. P.* 69: 351~353, 1978
- 13) ODUGBEMI, T.; S. S. HAFIZ & M. G. MCENTEGART: Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: detection by starch paper technique. *British Medical Journal* 20: 500, 1977
- 14) SYKES, R. B. & M. MATTHEW: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 115~157, 1976
- 15) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In *Advances in Microbial Physiology*. Eds A. H. ROSE & D. W. TEMPEST. Academic Press, London and New York, 9: 31~88, 1973

AN APPLICATION OF β -LACTAMASE RAPID DETECTING METHODS TO CLINICAL MICROBIOLOGY

(1) THE SENSITIVITY OF THE METHODS IN VARIOUS β -LACTAMASE AND ITS VIABLE CELLS

YUMIKO MUTO, MASATOSHI OGAWA, ISAMU YOSHIDA and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

In the four β -lactamase detecting methods (nitrocefin spot plate method, slide glass method, disk method and starch paper method), the sensitivity of nitrocefin spot plate method was the best in various β -lactamase and its viable cells. In the disk method, the sensitivity increased to 10 fold by cephaloridine substrate compared to penicillin G substrate.

It was observed that the sensitivity of Richmond type I enzyme changed depending on the sources of the enzymes. On the other hand, there was no difference between the four methods in Richmond type III, so that the detection of Richmond type III enzyme mediated by R plasmids may be useful for the clinical.