

β-lactamase 測定法の臨床細菌への応用

(2) 臨床分離各菌種における β-lactamase 検出率

小川正俊・武藤弓子・吉田 勇・宮崎修一・五島瑛智子

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 検出を日常の臨床細菌検査へ導入することを目的とし、disk 法、slide glass 法、starch paper 法、nitrocefin spot plate 法について、多くの臨床分離株を用い有用性を検討した。

4 種の方法のうち、菌の培養に inducer として Penicillin G, Cephaloridine, Cefmetazole, Cefoxitin を添加した培地を用い、12.5 μg/ウェルの nitrocefin を用いた spot plate 法および disk 含有基質を Penicillin G または Cephaloridine をそれぞれ 15 mg/disk とした disk 法が陽性率が高かった。

β-lactam 抗生剤耐性菌株は、β-lactamase に起因するものだけではないため、菌種により β-lactamase 産生能と薬剤感受性は必ずしも強い相関が認められない。

しかし β-lactam 剤に耐性の菌が不活化酵素によるものか否かを簡単に知るために、以上の方法は日常検査に充分応用され得ると考えられた。

前報において β-lactamase 産生標準株の生菌および酵素を用いて β-lactamase 検出法の基礎的検討を行なった結果、感度が最も良いのは、nitrocefin を用いた spot plate 法であることが確かめられた。しかし基質としての nitrocefin が現在極めて入手し難いため、他の基質を用いた検出法を検討した結果、Penicillin G および Cephaloridine を基質とした disk 法により penicillinase, cephalosporinase の両酵素が高率に検出されることを報告した。

本報では、さらに β-lactamase 検出法の臨床的実用化を目標として、各菌種の多数株の生菌を用い、inducer についても検討し、簡単な β-lactamase の検出法を設定した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

Staphylococcus aureus 37 株, *Staphylococcus epidermidis* 24 株, *Streptococcus pneumoniae* 22 株, *Streptococcus pyogenes* 19 株, *Streptococcus faecalis* 20 株, *Escherichia coli* 30 株, *Klebsiella pneumoniae* 20 株, *Proteus mirabilis* 20 株, *Proteus vulgaris* 20 株, *Proteus morganii* 20 株, *Proteus rettgeri* 20 株, *Proteus inconstans* 20 株, *Serratia marcescens* 20 株, *Enterobacter cloacae* 20 株, *Citrobacter freundii* 8 株, *Haemophilus influenzae* 10 株, *Pseudomonas aeruginosa* 20 株, *Pseudomonas*

cepacia 20 株, *Pseudomonas maltophilia* 20 株, *Acinetobacter calcoaceticus* 20 株, *Alcaligenes faecalis* 8 株, *Achromobacter xylosoxidans* 10 株, *Flavobacterium meningosepticum* 7 株, *Bacteroides fragilis* 27 株を用いた。

2. 使用薬剤

Penicillin G(PCG)	1,554 u/mg
新日本実業	
Cloxacillin(MCIPC)	900 μg/mg
藤沢薬品工業	
Ampicillin(ABPC)	888 μg/mg
台糖ファイザー	
Carbenicillin(CBPC)	800 μg/mg
台糖ファイザー	
Cephaloridine(CER)	977 μg/mg
新日本実業	
Cefazolin(CEZ)	964 μg/mg
藤沢薬品工業	
Cephalexin(CEX)	900 μg/mg
萬有製薬	
Cephalotin(CET)	930 μg/mg
塩野義製薬	
Cefoxitin(CFX)	938 μg/mg
第一製薬	
Cefmetazole(CMZ)	935 μg/mg

Table 1 Comparison of inoculum size by β -lactamase detecting method

Organisms	No. of strains	β -lactamase positive strains (minimum positive inocula 10^9 cells/ml)						
		Disk method		Slide glass method		Starch paper method		Nitrocefin spot plate method
		Penicillin G	Cephaloridine	Penicillin G	Cephaloridine	Penicillin G	Cephaloridine	Nitrocefin
<i>S.aureus</i>	5	2	0	0	0	2	0	3
<i>K.pneumoniae</i>	5	2	2	0	0	1	0	4
<i>E.coli</i>	5	0	3	0	0	0	1	5
<i>P.morganii</i>	5	0	3	0	0	0	0	2
<i>P.reitgeri</i>	5	2	4	0	0	0	0	3
<i>E.cloacae</i>	5	0	4	0	0	0	0	5
<i>S.marcescens</i>	5	1	2	0	2	0	1	4

Table 2 Comparison of β -lactamase detection by disk method and nitrocefin spot plate method

Organisms	No. of test strains	β -lactamase positive strains		
		Disk method		Nitrocefin* spot plate method
		Penicillin G	Cephaloridine	
<i>S.aureus</i>	37	25(67.5)	0	12(32.4)
<i>S.epidermidis</i>	24	14(58.3)	0	0
<i>S.pneumoniae</i>	22	0	0	0
<i>S.pyogenes</i>	19	0	0	0
<i>S.faecalis</i>	20	0	0	0
<i>E.coli</i>	30	2(6.6)	27(90.0)	17(56.6)
<i>K.pneumoniae</i>	20	19(95.0)	15(75.0)	18(90.0)
<i>P.mirabilis</i>	20	7(35.0)	0	0
<i>P.vulgaris</i>	20	18(90.0)	17(85.0)	14(70.0)
<i>P.morganii</i>	20	9(45.0)	17(85.0)	14(70.0)
<i>P.reitgeri</i>	20	10(50.0)	9(45.0)	11(55.0)
<i>P.inconstans</i>	20	3(15.0)	9(45.0)	13(65.0)
<i>S.marcescens</i>	20	11(55.0)	20(100.0)	19(95.0)
<i>E.cloacae</i>	20	5(25.0)	18(90.0)	16(80.0)
<i>C.freundii</i>	8	8(100.0)	8(100.0)	8(100.0)
<i>H.influenzae</i>	10	4(40.0)	4(40.0)	4(40.0)
<i>P.aeruginosa</i>	20	12(60.0)	20(100.0)	15(75.0)
<i>P.cepacia</i>	20	1(5.0)	15(75.0)	16(80.0)
<i>P.maltophilia</i>	20	6(30.0)	12(60.0)	20(100.0)
<i>A.calcoaceticus</i>	20	1(5.0)	18(90.0)	20(100.0)
<i>A.faecalis</i>	8	4(50.0)	0	6(75.0)
<i>A.xylosoxidans</i>	10	5(50.0)	6(60.0)	9(90.0)
<i>F.meningosepticum</i>	7	7(100.0)	7(100.0)	7(100.0)
<i>B.fragilis</i>	27	1(2.7)	18(66.6)	20(74.0)
Total	462	194(42.0)	240(52.0)	259(56.0)

* : Substrate: nitrocefin
() : %

三 共

3. 感受性測定法

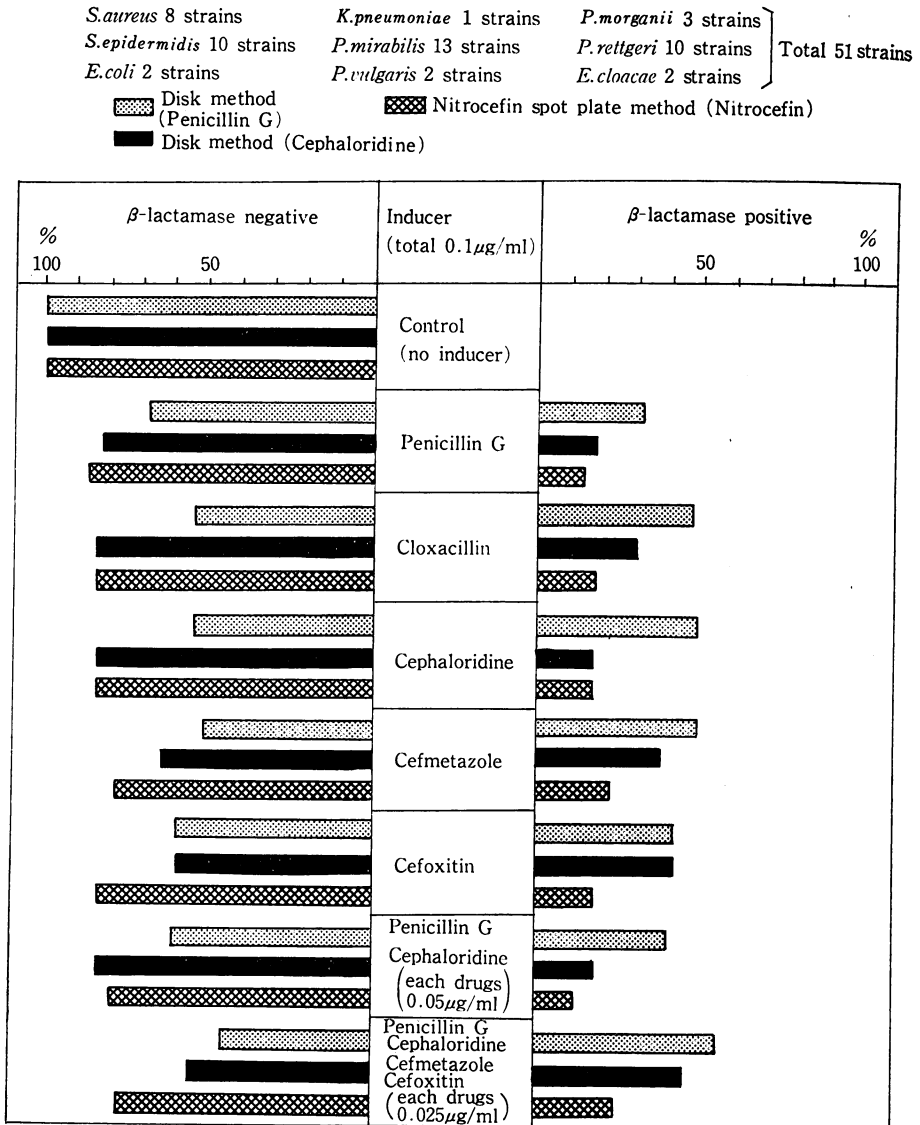
使用した菌株に対する各種薬剤の MIC 値は日本化学療法学会 MIC 測定標準法⁷⁾に準じた。

4. β -lactamase 検出法

前報¹⁻⁴⁾で述べた disk 法, slide glass 法, starch paper 法, nitrocefin spot plate 法を用いた。

試験菌はトリプトソイ 寒天 (栄研) を使用し, 37°C

Fig. 1 Effect of inducer on positive rate of disk method and nitrocefin spot plate method



にて一夜培養した。ただし *B. fragilis* は GAM 寒天 (日水) を使用し、嫌気性菌培養装置 (Forma 社) で培養した。*B. fragilis* では、培養菌体の pH が一般に酸性を示すために、陽性と判定される危険性がある。そこで 1/15M リン酸 buffer (pH 7.0) に菌体を懸濁して使用した。

5. induction 条件

トリプトソイ寒天培地 (栄研) に inducer として Penicillin G, Cloxacillin, Cephaloridine, Cefmetazole, Cefoxitin 各々 0.1 $\mu\text{g/ml}$ あるいは Penicillin

G + Cephaloridine 各々 0.05 $\mu\text{g/ml}$, total 0.1 $\mu\text{g/ml}$, および Penicillin G + Cloxacillin + Cephaloridine + Cefmetazole 各々 0.025 $\mu\text{g/ml}$, total 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を加え、試験菌を 37°C, 18 時間培養し、 β -lactamase 検出を行なった。

II. 実験成績

1. 生菌による各種 β -lactamase 測定法の感度の比較

標準株を含む教室保存株のうち *S. aureus* (5 株), *K. pneumoniae* (5 株), *E. coli* (5 株), *P. morganii* (5 株),

P. rettgeri (5株), *E. cloacae* (5株), *S. marcescens* (5株)を用いて, 接種菌量 10^8 cells/ml による4種の測定法の β -lactamase 検出率を Table 1 に示した。

S. aureus において, 感度が良く陽性率が高いのは nitrocefin を基質とした spot plate 法, Penicillin G を基質とした disk 法, starch paper 法であった。

K. pneumoniae では, nitrocefin spot plate 法, disk 法 (基質は Penicillin G および Cephaloridine), starch paper 法 (基質は Penicillin G) の順であった。

E. coli の場合, nitrocefin spot plate 法の陽性率が最も高く, 次いで Cephaloridine を基質とした disk 法, starch paper 法 (基質は Cephaloridine) であった。

P. morganii では disk 法 (基質は Cephaloridine)

が最も陽性率が高く, 次いで nitrocefin spot plate 法であった。

P. rettgeri の場合, disk 法 (基質は Cephaloridine), nitrocefin spot plate 法, Penicillin G を基質とした disk 法の順に陽性率が高く, slide glass 法, starch paper 法では検出率が低かった。

E. cloacae では, nitrocefin spot plate 法および Cephaloridine を基質とした disk 法の陽性率が高かった。

S. marcescens では, nitrocefin spot plate 法が最も陽性率が高く, 次いで disk 法 (基質は Cephaloridine), slide glass 法 (基質は Cephaloridine), starch paper 法 (基質は Cephaloridine), disk 法 (基質は Penicillin G) であった。

Table 3 Correlation between β -lactamase production in disk method and drvg-sensitivity by agar dilution method

Organisms	No. of strains	Antibiotics	MIC (μ g/ml) breakpoint*	β -lactamase negative strains		β -lactamase positive strains	
				Resistant strains (%)	Sensitive strains (%)	Resistant strains (%)	Sensitive strains (%)
<i>S. aureus</i> ***	35	Penicillin G	0.19	33.0	66.9	77.0	33.0
		Ampicillin	0.39	40.0	60.0	92.0	8.0
		Carbenicillin	3.12**	60.0	40.0	88.0	12.0
<i>H. influenzae</i> ***	10	Penicillin G	0.19 (0.78)**	0 (33.3)	100 (66.7)	50 (100)	50 (0)
		Ampicillin	0.39 (1.56)**	0 (0)	100 (100)	50 (100)	50 (0)
		Carbenicillin	3.12**	0	100	0	100
<i>E. coli</i> ***	35	Penicillin G	1.56 (100)**	100 (7.0)	0 (93.0)	100 (100)	0 (0)
		Ampicillin	12.5	7.0	93.0	71.5	28.5
		Carbenicillin	25	14.2	85.8	71.5	28.5
		Cephaloridine	12.5	0	100	85.7	14.3
		Cephalothin	25	14.0	96.0	57.1	42.9
<i>P. rettgeri</i> ***	20	Penicillin G	1.56 (100)**	100 (43.0)	0 (57.0)	100 (80.0)	0 (20.0)
		Ampicillin	12.5	100	0	100	0
		Carbenicillin	25	0	100	60.0	40.0
		Cephaloridine	12.5	100	0	100	0
		Cephalothin	25	100	0	100	0
<i>S. marcescens</i> ***	20	Penicillin G	1.56	100	0	100	0
		Ampicillin	12.5	100	0	100	0
		Carbenicillin	25	0	100	100	0
		Cephaloridine	12.5	100	0	100	0
		Cephalothin	25	100	0	100	0
<i>B. fragilis</i> ****	27	Penicillin G	1.56 (100)**	100 (88.0)	0 (12.0)	100 (44.0)	0 (56.0)
		Ampicillin	12.5	100	0	100	0
		Carbenicillin	25	11.0	89.0	33.0	67.0
		Cephaloridine	12.5	100	0	100	0
		Cephalothin	25	33.3	66.7	100	0

* Breakpoints of NCCLS (1981)

** Breakpoints of Toho university

*** Substrate : Penicillin G

**** Substrate : Cephaloridine

2. 臨床分離株を用いた nitrocefin spot plate 法と disk 法の感度の比較

前述の生菌を用いた陽性率の比較から、最も感度の高い nitrocefin spot plate 法と disk 法について各菌種の臨床分離株の陽性率を比較した成績を Table 2 に示した。

Penicillinase 産生菌である *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* では nitrocefin spot plate 法よりも Penicillin G を基質とした disk 法の方が陽性率が高かった。

P. vulgaris, *P. morganii*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *A. calcoaceticus*, *B. fragilis* では disk 法の基質を Cephaloridine にすることにより nitrocefin spot plate 法とほぼ同程度の陽性率が得られた。

3. inducer の検討

nitrocefin spot plate 法および disk 法において β -lactamase 陰性と判定された株を用い、inducer の効果を検討した。

使用した菌株は臨床から分離された *S. aureus* 8 株, *S. epidermidis* 10 株, *E. coli* 2 株, *K. pneumoniae* 1

株, *P. mirabilis* 13 株, *P. vulgaris* 2 株, *P. morganii* 3 株, *P. rettgeri* 10 株, *E. cloacae* 2 株で、すべて disk 法, nitrocefin spot plate 法において陰性を示した株である。

Fig. 1 に示したように inducer として培地中に Penicillin G, Cloxacillin, Cephaloridine, Cefmetazole, Cefoxitin を加えて培養した菌体を用いた結果, Cefmetazole, Cefoxitin が最も inducer としての効果が高く、 β -lactamase 陽性率が最も高くなった。しかし Penicillin G, Cephaloridine, Cefmetazole, Cefoxitin の 4 剤を同時に inducer として使用することにより、単剤よりも陽性率が高くなることが認められた。

4. β -lactamase 産生性と薬剤感受性との相関

これまでの実験で disk 法は操作が簡単であり、inducer に Penicillin G, Cephaloridine, Cefmetazole, Cefoxitin の 4 剤併用を用いれば、最も高い陽性率を示すことが認められたので、この方法を用いて β -lactamase 産生性と薬剤感受性との相関について検討した。

通常ディスク法（薬剤感受性）で用いられているように、感受性を感性、耐性に分ける MIC の breakpoint (NCCLS-National Committee for the Clinical Labo-

Table 4 The detection of β -lactamase in clinical isolates

Case No.	Bacteri- uria count	Urine			Deposite			Isolated cell			Antibiotic disk								Organism	
		Disk method		Nitrocefin spot plate method	Disk method		Nitrocefin spot plate method	Disk method		Nitrocefin spot plate method	PCG	MCIPC	ABPC	CBPC	CER	CET	CEX	CEZ		
		PCG	CER		PCG	CER		PCG	CER											
1	10 ⁵	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>P.morganii</i>	
2	>10 ⁶	—	—	—	±	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	<i>S.faecalis</i>
								+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	10 ³	—	—	—	±	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>S.marcescens</i>	
4	10 ²	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>P.aeruginosa</i>	
5	10 ³	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	<i>Enterobacter</i>	
								—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
6	10 ³	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>P.aeruginosa</i>	
7	10 ⁶	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	<i>E.coli</i>	
8*		—	—	—				+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	<i>K.pneumoniae</i>	
9*		—	—	—				—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	<i>P.aeruginosa</i>	
10*		—	—	—				—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	<i>P.aeruginosa</i>	
11**		—	—	—				—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>P.aeruginosa</i>	

* : Sputum
** : Pus
Disk method (+ : positive; — : negative)
Antibiotic disk (±, # : sensitive; +, — : resistant)

ratory Standards) に基づいて, β -lactamase 非産生株, 産生株の比率を比較した成績を Table 3 に示した。

β -lactamase 産生株の中で各種抗生剤に耐性の株の比率は, *S. aureus* では Penicillin G 77.0%, Ampicillin 92.0%, Carbenicillin 88.0%, *H. influenzae* では Penicillin G 100%, Ampicillin 100%, *E. coli* では Ampicillin 71.0%, Carbenicillin 71.0%, Cephaloridine 85.7%, *S. marcescens* では Carbenicillin 100%, *B. fragilis* では Cephalothin 100% を示した。

5. 臨床材料および分離菌 β -lactamase 検出と薬剤感受性

臨床材料から直接 β -lactamase の検出ができれば, 臨床的に抗生剤選択の有効な手段となりうるために, 臨床材料として尿, 喀痰, 濃汁の 11 検体を用いて β -lactamase 検出の成績を Table 4 に示した。

直接 β -lactamase を検出できる検体は 11 検体中 2 検体と少なく, 菌を分離した生菌を用いた場合に, 11 検体中 9 検体と β -lactamase 検出が増加した。

β -lactamase が検出された株は, Penicillin, Cloxacillin, Ampicillin, Carbenicillin, Cephaloridine, Cephalothin, Cephalexin, Cefazolin に対して耐性がみられた。

III. 考 察

前報の酵素の結果と同様, 手技が簡単である disk 法は, 臨床分離株においても優れた感度を示した。しかも disk 法は基質に Penicillin G または Cephaloridine を用いることにより, penicillinase, cephalosporinase のどちらかを産生する菌株かを判定できる利点をもつ。さらに基質として他の抗生剤を使用すれば, 現在行なわれている感受性ディスクに代わり得る可能性もあるが, 薬剤の安定性という点からすべての薬剤を実用化することは不可能であると考えられる。

本研究の結果, disk 法において β -lactamase 産生性と薬剤感受性との間に相関がみられた菌種は *S. aureus*, *H. influenzae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *B. fragilis* にすぎず (Table 3), 他の菌種では強い相関がみられなかった。このことは菌種により産生される β -lactamase の基質特異性の違いと, 薬剤により外膜透過性に差があることに起因すると考えられる。一方岡田⁹⁾らは, 市販されている Beta-Lactam Reagent Disk (Marion Laboratories 社製, β -lactamase 活性の測定法は pH 法) を用い, β -lactamase 産生の有無および薬剤感受性の関連について検討し, β -lactamase 産生株は Beta-Lactam Disk で 60% にみられ, 薬剤感受性との一致率でみると, *H. influenzae* (98.3%), *B. fragilis* (96.6%), *P. mirabilis* (94.1%), *S. aureus* (89.6%), *E. coli* (80.6%)

%, *E. cloacae* (67.3%) であったと述べている。

本測定法はすべての菌種において β -lactamase 産生性と薬剤感受性との間に必ずしも強い相関がみられないので, β -lactamase の検出は各薬剤を基質として行なうことが正しいと考えられるが, 現時点では, 本測定法をすべてのグラム陰性桿菌に適用する臨床的有用性は少ないと考えている。

グラム陰性桿菌の β -lactam 剤に対する感受性は β -lactamase 産生の有無ではなく, その産生量の多少に起因するため, β -lactamase 高度産生株, 低度産生株をチェックできる方法が望ましい。 β -lactamase 高度産生株は nitrocefin spot plate 法および Penicillin G を基質とした disk 法の両測定法において陽性と判定される株に多く認められた。また *S. aureus* では nitrocefin spot plate 法による β -lactamase 産生性と MIC の相関を比較すると, ディスク法よりも MIC 値との相関が強い薬剤も一部みられた。

いずれにしても臨床検査における β -lactamase 検出は菌が分離された時点で行ない, β -lactamase 産生株であった場合は, 加水分解されにくい薬剤を選択すればよい。一方 β -lactamase 非産生株であった場合, この時点で β -lactam 剤の中から目的に応じて選択すればよい。しかし菌種の同定, 薬剤感受性の結果が得られた時点で第二次の抗生剤選択をする必要がある。すなわち β -lactamase 非産生で耐性の株の場合には, 耐性を示した薬剤は除外しなければならない。

文 献

- 1) 武藤弓子, 小川正俊, 吉田 勇, 五島達智子: 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。Chemotherapy 31: 45~50, 1983
- 2) O'CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY & A. H. SCHINGLER: Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents Chemother. 1: 283~288, 1972
- 3) ROSENBLATT, J. E. & A. M. Neumann: Laboratory suggestions a rapid slide test for penicillinase. A. J. C. P. 69: 351~353, 1978
- 4) ODUGBEMI, T.; S. HAFIZ & M. G. MCENTEGART: Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*, detection by starch paper technique. British Medical Journal 20: 500, 1971
- 5) 日本化学療法学会, MIC 小委員会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法, 1968 年制定, 1974 年改訂。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 6) 岡田 淳, 駒登登志子, 三辺武右衛門, 橘由季子, 小林章男, 青木 阪, 玄番昭夫, 木村博子, 森伴雄, 清瀬 闊, 猪狩 淳, 小栗豊子: 臨床材料より分離された各種細菌の β -lactamase 活性に

ついて。第 30 回日本化学療法学会総会，東京，
1982

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

(2) THE SENSITIVITY OF THE METHODS IN MANY CLINICAL ISOLATES

MASATOSHI OGAWA, YUMIKO MUTO, ISAMU YOSHIDA,
SHUICHI MIYAZAKI and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

We investigated the availability of β -lactamase rapid detecting methods(disk method, slide glass method, starch paper method and nitrocefin spot plate method) in order to make use of the methods to clinical microbiology.

Nitrocefin spot plate method (nitrocefin 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and disk method (substrate was penicillin G or cephaloridine) showed a higher sensitivities than other methods when penicillin G, cephaloridine, cefmetazole and cefoxitin were added to bacterial cultures in order to induce β -lactamase production.

In some species, there was a relationship between the β -lactamase production and drug-sensitivities. Therefore, above four methods were useful to detect the β -lactamase production of clinical isolates.