

Proteus vulgaris に対する Cephem 剤の抗菌作用

南 新三郎・中島 博美・荒木 春美・松原 信之
渡辺 泰雄・保田 隆・才川 勇
富山化学工業株式会社総合研究所

三 橋 進
群馬大学医学部

(昭和60年1月31日受付)

Proteus vulgaris に対する cefoperazone (CPZ), cefotaxime (CTX), cefotiam (CTM), cefazolin (CEZ) の抗菌活性と β -lactamase 産生の関係について検討した。

試験した 20 株に対する抗菌力は CTX が最も優れ、次いで CPZ の順で CTM, CEZ は前二剤に比べ劣った抗菌活性を示した。*P. vulgaris* 産生の β -lactamase に対しては CPZ が最も安定で、次いで CTX, CEZ, CTM の順であった。約半数の株で CTX, CTM, CEZ によって β -lactamase が誘導されたが、CPZ は β -lactamase 誘導活性をほとんど示さなかった。CTX, CEZ, CTM の β -lactamase 産生菌に対する抗菌力は非産生菌に比べ劣る傾向が認められたが、CPZ では β -lactamase 産生と抗菌力との間には特に相関は認められなかった。

β -lactamase 産生株に対する殺菌作用を比較したところ、CTX の殺菌作用に一部反転現象が認められた。この反転現象は CTX による β -lactamase 誘導と誘導された β -lactamase による CTX の不活化に基づくことが推定された。

Proteus vulgaris は特異な基質特異性を示す誘導型 β -lactamase を産生する菌種の一つとして知られ^{1)~3)}、比較的 β -lactam 剤に耐性であるが、最近開発された β -lactamase に安定な薬剤^{4)~6)} に対して良好な感受性を示している。ところで *P. vulgaris* の β -lactam 剤に対する感受性と β -lactamase 産生の関係についての詳細な検討はまだまだ少ないように思われる。そこで今回、我々は cefotaxime (CTX), cefoperazone (CPZ), cefotiam (CTM), cefazolin (CEZ) を用いて *P. vulgaris* の薬剤感受性と β -lactamase 産生について検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

実験に供した株は、すべて当研究所保存の臨床分離株である。

2. 使用薬剤

Cefoperazone (CPZ, 富山化学工業), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業) を用いた。なお、薬液は用時調製した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法⁷⁾ に準じて行なった。ただし前培養は Brain heart infusion broth (BHIB, 栄研) を

用いた。接種菌液は前培養の 100 倍希釈液 (約 10^7 cells/ml) を用い、マイクロプランター (佐久間製作所) を用いて約 0.005 ml を接種した。

4. β -lactamase assay

β -lactamase 活性は UV 法⁸⁾ で測定した。各薬剤の測定波長および $\Delta\epsilon$ (分子吸光係数の差) は下記のとおりである。CPZ (273 nm, $\Delta\epsilon=7,700$), CTX (264 nm, $\Delta\epsilon=7,300$), CTM (276 nm, $\Delta\epsilon=8,800$), CER (260 nm, $\Delta\epsilon=10,200$)。酵素活性を unit で表わし、1 unit は 0.05 M Phosphate buffer (pH 7.0) 中 30°C で 1 分間に 1 μ mole の基質を加水分解するのに必要な酵素量とした。

5. β -lactamase の部分精製

P. vulgaris T-178 を CTX 10 μ g/ml 存在下に 2 時間増殖させ、集菌洗浄後、超音波破碎し、破碎後の遠心上清 (10,000 \times g, 30 分間) を粗酵素液として得た。これを MATSUBARA らの方法⁹⁾ に従って CM-Sephadex (C=50, Pharmacia) を用いて部分精製した。この精製により比活性は約 40 倍上昇した。

6. β -lactamase 誘導

既法⁹⁾ に従って行なった。すなわち、各薬剤を 10 μ g/ml になるように対数増殖期に加え、2 時間培養した後、

集菌した。0.05 M Phosphate buffer (pH 7.0) で1回洗浄後超音波破砕し、常法通り粗酵素液を調製した。この粗酵素液の β -lactamase 活性を CER (100 μ M) を基質とした UV 法で、また蛋白濃度を Lowry 法¹⁰⁾ でそれぞれ測定し、比活性を求めた。

7. *P. vulgaris* T-178 に対する殺菌作用、 β -lactamase 誘導および培養液中薬剤の安定性

BHIB で一夜培養した *P. vulgaris* T-178 を BHIB で約 10^8 cells/ml に希釈し、これを 50 ml ずつ三角フラスコ (200 ml) に分注した。各薬剤を 6.25 μ g/ml, 25 μ g/ml, 100 μ g/ml になるように添加し、37°C で振とう培養した。薬剤添加後、2, 4, 6 時間に培養液を採取し、生菌数、培養液中薬剤濃度および菌体中 β -lactamase 活性を測定した。培養液中薬剤濃度は Bioassay 法で測定したが、試料採取後直ちに等量の冷メタノールを加え、殺菌および酵素活性の不活化を行なった。また、菌体用 β -lactamase 活性測定は 5 ml の培養液を 1,000 \times g, 20 分間の遠心分離で集菌した菌体から常法により調整した粗酵素液を用い UV 法で行なった。

8. 薬剤濃度測定

CPZ, CTX および CTM は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を、CEZ は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするペーパーディスク法で測定した。標準曲線は 100 μ g/ml からの 2 倍希釈系列を BHIB で作製し、これに等量の冷メタノールを加えたものを用いた。なおメタノールを除去するためにディスクを 37°C のフラン器中に 30 分間放置し、その後寒天平板上に張り付けた。この方法では CPZ は 0.39 μ g/ml, CTX は 0.2 μ g/ml, CTM は 0.78 μ g/ml, CEZ は 1.56 μ g/ml まで測定可能であった。

II. 実験結果

1. 臨床分離 *P. vulgaris* の薬剤感受性

臨床分離の *P. vulgaris* 20 株に対する各薬剤の MIC 値を累積百分率で示した (Fig. 1)。CTX に対する感受性が最も良好で次いで CPZ の順で、CEZ, CTM には耐性を示す株が多く認められた。CTX の MIC₅₀ 値は 0.26 μ g/ml で 4 剤中最も小さな値を示したが、その MIC₉₀ 値は CPZ の 8.0 μ g/ml と同程度の 9.1 μ g/ml であり、やや幅広い MIC 分布を示した。

2. β -lactamase 産生

対数増殖期に各薬剤を 10 μ g/ml になるように加え 2 時間培養後の菌体中 β -lactamase 活性を測定し、薬剤無添加時と比較した (Table 1)。薬剤無添加の場合はいずれの株の β -lactamase 活性も検出限界以下であったが、CTX, CEZ, CTM の添加により約半数の株に活性の上昇が認められた。特に CTX および CTM 添加時にはそ

Fig. 1 Antibacterial activity of cephalosporins against *P. vulgaris* (20 strains)

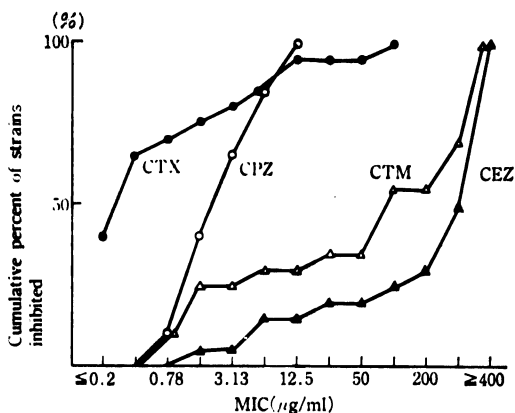


Fig. 2 Correlation between MICs and β -lactamase production

MIC	CTX	CPZ	CTM	CEZ
>400			●●●○	●●●●●○
400			●	●●●○
200				●
100	●		○	○
50				
25			●●○	○
12.5	●	●●		
6.25	○	●○	●	○
3.13	●	●●○		
1.56	●	●○○	○	○
0.78	○	●	○	
0.39	●●○			
≤0.20	●●○			

●: The strains showed the enzyme activity of more than 0.1 unit/mg of protein when induced by the drugs.

○: The strains showed the enzyme activity of less than 0.1 unit/mg of protein when induced by the drugs.

MIC was determined by agar dilution method using inoculum of one loopful of 10^7 cells/ml (μ g/ml).

れぞれ 2 株および 4 株に 10 倍以上の酵素活性の上昇が認められた。一方、CPZ 添加時にはわずかに 1 株に若干の活性の上昇が認められただけであった。

3. β -lactamase の基質特異性

CTX によって β -lactamase が誘導された 10 株の β -lactamase の基質特異性を調べた (Table 2)。CTX

Table 1 β -lactamase production in *P. vulgaris* (20 strains)

Inducers (10 μ g/ml)	Numbers of β -lactamase-producing strains with enzyme activity of		
	<0.1	0.1-1.0	>1.0
None	20	0	0
Cefoperazone	19	1	0
Cefotaxime	10	8	2
Cefotiam	9	7	4
Cefazolin	9	11	0

* β -lactamase activity (unit/mg of protein) of the sonic extracts from cells incubated with 10 μ g/ml of each cephalosporins for 2 hr. was determined by spectrophotometric method using cephaloridine as a substrate (100 μ M).

Table 2 Substrate profiles of β -lactamases from clinical isolates of *P. vulgaris* (10 strains)

β -lactamase-producing strains	Relative rates of hydrolysis (%) with*				
	Cefoperazone	Cefotaxime	Cefotiam	Cefazolin	Cephaloridine
<i>P. vulgaris</i>					
T-130	10	31	166	301	100(2.20) ^b
T-169	<25	39	204	382	100(0.42)
T-178	<25	49	292	400	100(0.34)
T-185	<25	15	138	308	100(0.15)
T-190	13	86	130	350	100(1.21)
T-247	<25	60	124	348	100(0.23)
T-266	<25	33	123	360	100(0.40)
T-268	<25	50	140	395	100(0.26)
T-269	25	30	133	288	100(0.82)
T-281	<25	<25	41	150	100(0.11)

* β -lactamase activity was determined by spectrophotometric method at 100 μ M of substrate concentration. Relative rates of hydrolysis are expressed as the percentage of cephaloridine hydrolysis.

^b Values in the parentheses are the specific activity (unit/mg of protein) of the sonic extracts used for enzyme assay.

10 μ g/ml で誘導した粗酵素を用い基質濃度 100 μ M の時の相対加水分解速度を求めた。T-281 株を除いた 9 株の β -lactamase の基質特異性は比較的類似していた。これらの酵素は CEZ, CTM, CER を良く加水分解し、次いで CTX の順で、CPZ は最も加水分解されにくい基質であった。T-281 株の β -lactamase は他の株とやや異なる基質特異性を示した。なおデータは示さなかったが CEZ および CTM で誘導した酵素の基質特異性はおおむね CTX で誘導した酵素の基質特異性と同一であった。

4. Cephem 剤に対する *P. vulgaris* T-178 株由来 β -lactamase の V_{max} , K_m

P. vulgaris T-178 株由来の部分精製酵素を用い、各薬剤に対する V_{max} , K_m を求めた (Table 3)。CTM に対する V_{max} 値が最も大きく、次いで CTX, CEZ の順で、CPZ に対しては 4 剤中最も小さな値を示した。 K_m

値は CPZ 以外の薬剤に対しては 110~270 μ M とおおむね類似した値を示したが、CPZ に対しては 13 μ M と小さな値を示した。

5. β -lactamase 産生と MIC 値

各薬剤の MIC 値と β -lactamase 産生との関係を Fig. 2 に示した。用いた 4 剤のうちの少なくとも 1 剤で、誘導された酵素活性が 0.1 unit/mg of protein 以上の株を β -lactamase 産生株とした。CEZ, CTM, CTX では β -lactamase 産生株に対する MIC 値は非産生株に比べより大きな値を示す傾向が認められたが、CPZ では他剤ほどその傾向が顕著でなかった。

6. *P. vulgaris* T-178 株に対する殺菌作用

P. vulgaris T-178 株に対する各薬剤の殺菌作用を薬剤濃度 100 μ g/ml, 25 μ g/ml, 6.25 μ g/ml 作用時の生菌数変化で比較した (Fig. 3)。また、生菌数測定と同時に培養液中薬剤濃度、菌体中 β -lactamase 活性も測定した

Fig. 4 Residual activity of cephalosporins in the culture of *P. vulgaris* T-178

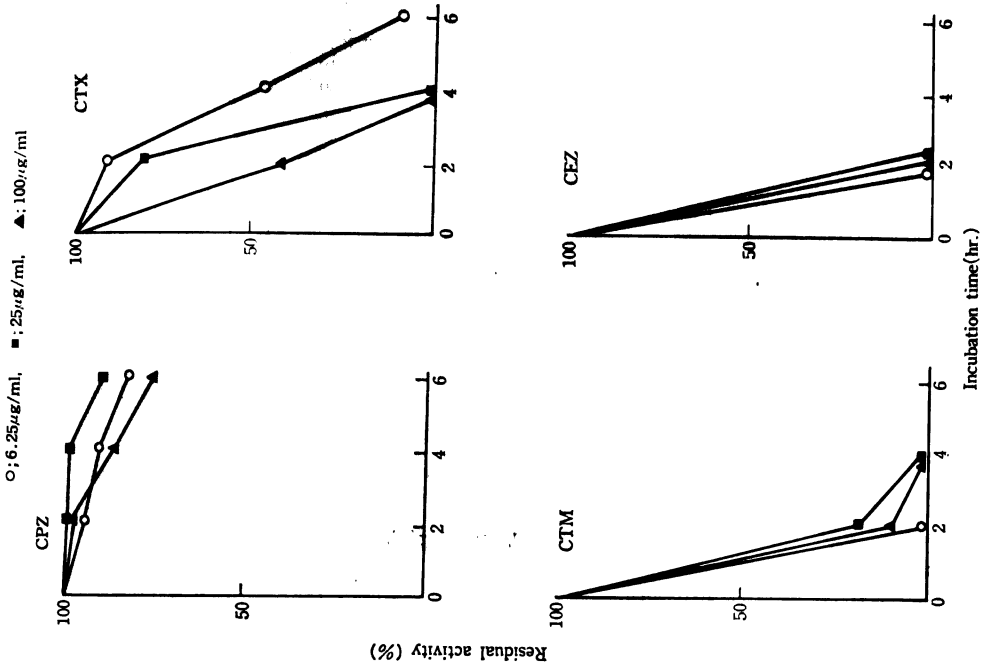


Fig. 3 Bactericidal activity of cephalosporins against *P. vulgaris* T-178

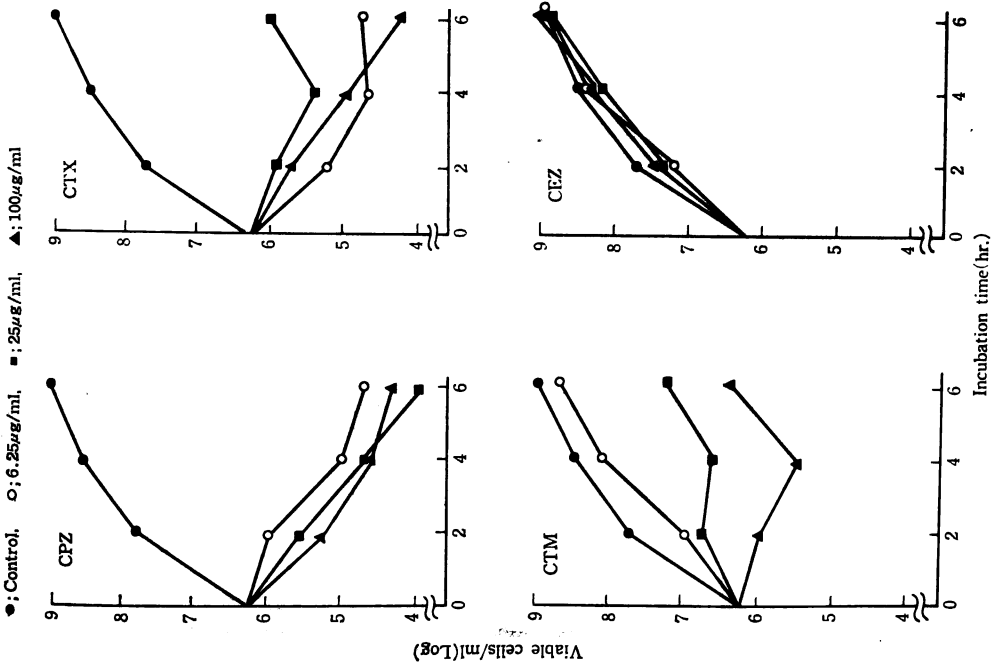


Table 3 Stability and affinity of cephalosporins for the purified β -lactamase from *P. vulgaris* T-178

Cephalosporins	V_{max}^a	$K_m(\mu M)^b$	MIC($\mu g/ml$) ^c
Cefoperazone	6.6	13	3.13
Cefotaxime	61.0	190	0.39
Cefotiam	235	270	200
Cefazolin	33	130	400
Cephaloridine	100(11.5) ^d	110	400

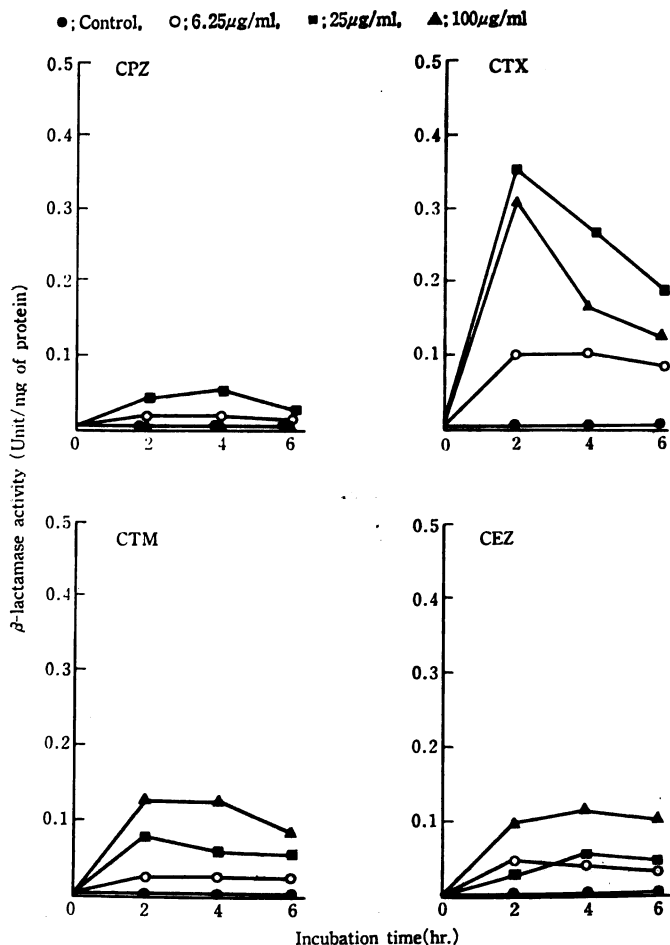
^a Relative rates of hydrolysis (V_{max}) are expressed as the percentage of V_{max} of cephaloridine.

^b K_m values were determined from Lineweaver-Burk plots using cephalothin as a substrate.

^c MICs against *P. vulgaris* T-178 were determined by agar dilution method using 10^5 CFU per spot.

^d The value in the parenthesis is the specific activity (unit/mg of protein) of the purified enzyme.

Fig. 5 β -lactamase activity of *P. vulgaris* T-178 treated with cephalosporins



(Fig. 4 および Fig. 5)。

CTX, CPZ はいずれの濃度においても殺菌的に作用したが、殺菌作用の強さと薬剤濃度の間には明瞭な dose-response は認められなかった。特に CTX では 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時の生菌数減少が 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時よりも著しく、反転現象が認められた。一方、CEZ, CTM の殺菌作用は前二剤よりも明らかに劣り、CTM の 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加時にわずかに静菌的作用が認められた。

培養液中では CPZ が最も安定で 6 時間後の残存率は、いずれの濃度でも 75% 以上であった。CTX ではいずれの濃度でも時間とともに残存率が減少し、高濃度ほど大きな減少速度を示した。CTM および CEZ はいずれの濃度においても速やかに失活し、CEZ では 2 時間以内に、CTM では 4 時間以内にすべて検出限界以下となった。

菌体中 β -lactamase 活性は、CTX, CTM, CEZ のいずれの濃度においても上昇が認められた。菌体中酵素活性は 2~4 時間で最高に達し、CTX 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時に最も高値を示した。一方、CPZ では 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時に若干の活性の上昇が認められたが、他の濃度では薬剤無添加時とほとんど同程度の値を示した。

III. 考 察

細菌の β -lactamase 産生と β -lactam 剤感受性については、近年簡便な β -lactamase 検出法が開発されたことから、広範な検討がなされている¹¹⁻¹⁴⁾。 β -lactamase 産生と薬剤感受性との相関は、小川ら¹³⁾ および岡田ら¹⁴⁾の成績によれば *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* などで強い相関が認められるが他の菌種では必ずしも明らかではない。小川らはこの原因の一つとして β -lactamase 産生の有無よりもその産生量の多少が薬剤感受性と相関し、特に誘導的に β -lactamase を産生する菌種では β -lactamase 誘導も充分に考慮する必要があることを指摘している。

今回、我々は誘導型 β -lactamase 産生菌種の一つである *P. vulgaris* を用いて、 β -lactamase 誘導と薬剤感受性について検討した。 β -lactamase 産生株に対する CEZ, CTM, CTX の MIC 値は非産生株に比べ高値を示す傾向が認められたが、CPZ ではその傾向は顕著ではなかった。これは β -lactamase 産生株において CEZ, CTM, CTX 存在下では容易に β -lactamase 誘導が起こるが、CPZ では β -lactamase 誘導が起こりにくいことが原因と考えられた。代表的な β -lactamase 産生株である *P. vulgaris* T-178 株を用いた検討でも、CPZ は試験したいずれの濃度においても β -lactamase をほとんど誘導せず、培養液中でも安定で殺菌的に作用した。一

方、CTX ではその殺菌作用に反転現象が認められた。すなわち、6 時間後の生菌数を 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時と比較すると、6.25 $\mu\text{g/ml}$ の方が殺菌的であった。この結果は、25 $\mu\text{g/ml}$ 添加時に β -lactamase 誘導量が多く、さらに培養液中薬剤の残存率の減少も著しいことに基づくものと思われた。

CEZ, CTM 添加時でも CTX 同様 β -lactamase 活性が上昇し培養液中で極めて速やかに活性が失われ、いずれも *P. vulgaris* T-178 株に対し殺菌性を示さなかった。このように β -lactamase を誘導する薬剤は自らが誘導した β -lactamase によって不活化され、結果として非産生菌よりも産生菌に対する抗菌力が劣ったものと考えられる。

以上、本研究では誘導的 β -lactamase 産生菌に対する薬剤の抗菌性は、CPZ のような β -lactamase 誘導活性の低い薬剤では β -lactamase の影響を受けにくいことが明らかとなった。最近 β -lactam 剤間の拮抗現象が注目され、その原因の一つに β -lactamase 誘導が考えられている¹⁵⁾¹⁶⁾。また混合培養系での抗菌作用に対しても誘導型 β -lactamase が重要な働きをすることを我々は見出している¹⁷⁾ことから、今後、薬剤の誘導活性の差が混合感染や β -lactam 剤併用療法においてどのように反映するか興味を持たれる。

本論文の要旨は第 29 回日本化学療法学会東日本支部総会 (1982, 仙台) において発表した。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S. & M. INOUE: Mechanisms of resistance of β -lactam antibiotics. pp. 41~56, In S. MITSUHASHI (ed) Beta-lactam antibiotics. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981
- 2) 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
- 3) MATSUBARA, N.; A. YOTSUJI, K. KUMANO, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Purification and some properties of a cephalosporinase from *Proteus vulgaris*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 185~187, 1981
- 4) 南 新三郎, 松原信之, 村岡拓己, 倉茂達徳, 三橋 進: Cefoperazone の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 28 (S-6): 1~13, 1980
- 5) 益吉真次, 新井 進, 三橋 進: 新しいセファロスポリン, cefotaxime の抗菌作用および β -lactamase に対する態度。Chemotherapy 28 (S-1): 1~11, 1980
- 6) 熊野克彦, 三上秀忠, 井上松久, 三橋 進: T-

- 1982 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 30 (S-3) : 1~19, 1982
- 7) 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
- 8) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem. J. 139 : 780~781, 1974
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 遠 彦二, 武藤弓子, 五島達智子 : 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。Chemotherapy 31 : 196~201, 1983
- 12) 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 : 462~467, 1983
- 13) 小川正俊, 武藤弓子, 吉田 勇, 宮崎修一, 五島達智子 : 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。Chemotherapy 31 : 468~474, 1983
- 14) 岡田 淳, 駒瀬登志子, 三辺武右衛門, 橋 由季子, 小林章男, 青木 辰, 玄香昭夫, 木村博子, 森 伴雄, 清瀬 剛, 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
- 15) KUCK, N. A.; R. T. TESTA & M. FORBES: *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of combinations of Beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 19 : 634~638, 1981
- 16) 南 新三郎, 中島博美, 熊野克彦, 渡辺泰雄, 保田 隆, 高井 明, 才川 勇 : Piperacillin と β -lactam 剤の *in vitro* 併用効果。Chemotherapy 33 : 293~303, 1985
- 17) 南 新三郎, 能見寿彦, 荒木春美, 渡辺泰雄, 保田 隆, 高井 明, 才川 勇, 三橋 達 : β -lactamase 産生菌と大腸菌との混合培養系における Cephem 剤の大腸菌に対する殺菌効果。第 32 回日本化学療法学会総会, 札幌, 1984

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CEPHALOSPORINS AGAINST *PROTEUS VULGARIS*

SHINZABURO MINAMI, HIROMI NAKASHIMA, HARUMI ARAKI,
NOBUYUKI MATSUBARA, YASUO WATANABE, TAKASHI YASUDA,
ISAMU SAIKAWA and
SUSUMU MITSUHASHI*

Research Laboratory, Toyama Chemical Co. Ltd, Toyama and

*School of Medicine, Gunma University, Maebashi Japan

The correlation between antibacterial activity of cephalosporins against *Proteus vulgaris* and β -lactamase production was investigated using four cephalosporins, i. e., cefoperazone (CPZ), cefotaxime (CTX), cefotiam (CTM), and cefazolin (CEZ).

A half of the tested strains produced β -lactamases which were induced by CEZ, CTM, and CTX, and showed almost the same substrate profiles. Against the hydrolysis by these β -lactamases, CPZ was the most resistant, followed by CTX. CTM and CEZ were easily hydrolyzed by these enzymes. β -lactamase-producing *P. vulgaris* were more resistant to CEZ, CTM, and CTX than non- β -lactamase-producers. CPZ hardly induced β -lactamase production for these inducible strains and its antibacterial activity was not affected by β -lactamase production differing from other drugs.

Although CPZ and CTX acted bactericidally against a β -lactamase-producing *P. vulgaris*, CTX was inactivated in the culture of this strain. Because of this inactivation, the bactericidal activity of CTX did not respond to the increase of the concentration.