

Escherichia coli 1U591 の β -ラクタマーゼに対する
Carumonam と Aztreonam の安定性

有沢幹雄・関根 譲・丸山博巳
日本ロシュ研究所

Escherichia coli 1U591 は carumonam (CRMN) および aztreonam (AZT) に感性で、それぞれの薬剤の MIC は、0.1 および 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、この時の各々の薬剤の sub-MIC で生育している菌液を用い、更にその MIC を測定するという同様の操作を繰り返していくと、CRMN の場合、5 回継代で MIC は 0.1 から 3.13 $\mu\text{g/ml}$ への上昇にとどまったのに対し、AZT の場合、同じ 5 回継代で MIC は 0.78 から 3,200 $\mu\text{g/ml}$ へと急上昇し、高度耐性となった。そこで、この MIC 上昇と β -ラクタマーゼ比活性の相関を調べたところ、CRMN では β -ラクタマーゼの比活性に全く変化が認められなかったのに対し、AZT では 5 回継代でその比活性は 75 倍の上昇が認められた。その比活性の上昇の経時的変化は MIC 上昇のそれと平行していた。この AZT 耐性および酵素比活性は、薬剤非添加培地中で 7 回継代培養しても変化せず、 β -ラクタマーゼが構成的に産生されていることを示唆した。次に、精製 β -ラクタマーゼで基質特異性を調べたところ、100 μM での 2 薬剤の加水分解速度は AZT が cephaloridine の 2.4%、CRMN は測定限界以下 (< 0.01%) であり、本酵素が AZT を CRMN の数十倍以上の速度で分解することが分かった。これらの結果は、*E. coli* 1U591 の AZT に対する急速な耐性獲得が、AZT 分解 β -ラクタマーゼ産生の上昇により起こることを示している。

序 文

Carumonam (CRMN)^{1,2)} は、単環 β -ラクタムを有する新規合成スルファゼシン誘導体であり、化学名は disodium (+)-(Z)-[[[1-(2-amino-4-thiazolyl)-2-[[[(2S, 3S)-2-(carbamoyloxymethyl)-4-oxo-1-sulfonato-3-azetidiny] amino]-2-oxoethylidene] amino] oxy] acetate である。我々は本剤と、同じ単環性 β -ラクタム aztreonam (AZT) との比較評価実験中³⁾、臨床分離株 *Escherichia coli* 1U591 が AZT に対してのみ耐性を獲得することを見出した。そこでこの耐性獲得とその発現機構について研究したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 使用薬剤

CRMN, AZT および cefuroxime (CXM) は Hoffman-La Roche 社 (スイス) より入手した。Nitrocefin は英国グラクソ社より恵与された。その他の薬剤は次の各社から購入した。Penicillin G (PCG, 明治製菓), ampicillin (ABPC, 東洋製

造), cephaloridine (CER, 塩野義製薬), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), cefotiam (CTM, 武田薬品), cefoperazone (CFP, 富山化学), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン/日本ルセル)。

2. 使用菌株

E. coli 1U591 は尿路感染症患者より分離された株である。菌の鑑別はエンテロチューブ〈ロシュ〉を用い、S.T. COWAN の同定手びき⁴⁾をも参考に行った。本菌の生化学反応は次の通りで *Citrobacter diversus* との類似点も認められたが、アドニット反応は陰性であった。グルコース(+), グルコースからのガス発生(+), リジンデカルボキシラーゼ(-), オルニチンデカルボキシラーゼ(+), H₂S(-), インドール(+), ラクトース(+), ズルシット(+), フェニルアラニンデアミナーゼ(-), ウレアーゼ(-), クエン酸(-), アドニット(-)などの生化学的性状を示した。

E. coli GN5482, *Citrobacter freundii* GN7391 は群馬大学医学部三橋教授, *Klebsiella oxytoca* 1082E はグラクソ社 (英国) より分与された。 *Proteus*

vulgaris 5D63-1は臨床分離株である。

3. MIC測定および継代培養

96穴マイクロテストプレート(ヌンク社)を用いた。まず2倍連続希釈した薬剤を含むSensitivity Test Broth (STB) (日水)で37°C, 18時間培養を行いMICを求めた。継代培養を実施した場合は, 前実験で1/2 MICを示したウェルの菌を滅菌楊枝で新しく調製した薬剤含有培地に接種し, 2回目の培養を行った。同様の方法で順次継代培養を繰り返した。

4. β -ラクタマーゼ活性測定

β -ラクタマーゼ活性はO'CALLAGHANらの方法⁵⁾に従って分光分析を行った。酵素精製は基質として100 μ MのCERを用い以前の報告⁶⁾通りA₂₆₀の減少速度により酵素活性を測定して進めた。

継代培養中の菌体 β -ラクタマーゼ比活性の測定は, 次の方法で行った。ウェルに増殖した菌液0.05 mlを6 mlのBrain Heart Infusion (BHIB)培地(栄研)に接種し, 37°C約3時間振盪培養した。培養終了時に培養液の濁度を660 nmで測定した後, 培養液を50 mM 燐酸緩衝液(pH 7.0)で2倍希釈し, 超音波破碎(TOMY, Model UR-200P)して粗酵素液とした。次にNitrocefin (100 μ M)を基質として培養液1 ml当りの酵素活性(A₄₈₂/min)を求め, この値を先に測定した濁度で割って比活性を算出した。したがって比活性の単位はA₄₈₂/min/A₆₆₀で表わした。

5. β -ラクタマーゼ誘導

E. coli 1U591をBHIBでA₆₆₀が約0.5になるまで37°C振盪培養で増殖させた後2 mlずつ試験管に分注した。薬剤0.1 mlを添加し, 37°Cでさらに60分振盪培養しA₆₆₀で濁度を測定した。全培養液中の β -ラクタマーゼ活性は, 前述の継代培養実験の β -ラクタマーゼ活性測定と同じ方法でnitrocefinを基質として求めた。

6. *E. coli* 1U591の産生する β -ラクタマーゼの精製

あらかじめAZT含有培地で7回継代培養した*E. coli* 1U591をAZT 800 μ g/ml添加のSTB培地で1晩培養した。この前培養液50 mlを2.4 LのTrypto-Soy broth (栄研)に接種し37°CでA₆₆₀=1になるまで振盪培養した。菌体をフレンチプレスで破碎し, 遠心で得た上清を次の方法で順次精製した。先ず上清をstreptomycin処理し, 遠心, 除核酸

Table 1 Change in susceptibility of six independent colonies of *E. coli* 1U591 by transfer through sublethal concentration of CRMN or AZT

Drugs	Number of transfer*			
	0	1	2	3
CRMN	0.22** (0.2~0.39)	0.24 (0.1~0.39)	0.31 (0.2~0.78)	0.31 (0.1~0.78)
AZT	1.70 (1.56~3.13)	>800 (800~>800)	—	—

*: 0=no transfer

** : geometric mean MIC in μ g/ml

() : MIC range of six clones of *E. coli* 1U591

— : not done

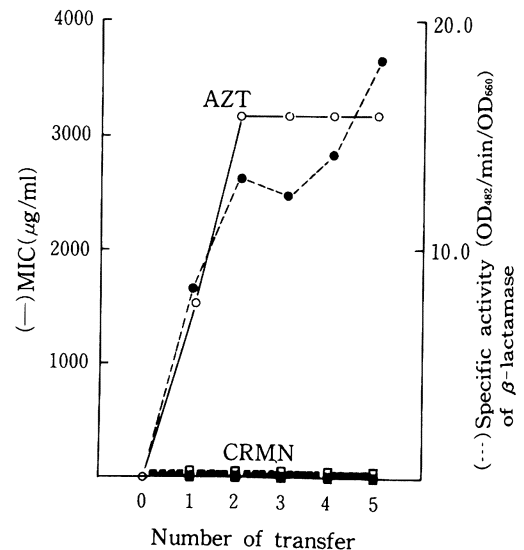
後10mMの燐酸緩衝液(pH7.0)中, CM-セファロースCL-6Bの0~0.3M NaCl直線型濃度勾配によるカラムクロマトを行い, 次にトヨパールHW-50Sを用い, 0.1M NaClを添加した50mM 燐酸緩衝液(pH7.0)溶出によりカラムクロマトを行った。これを再度, CM-セファロースCL-6Bによるカラムクロマトを行い, 精製標品とした。最終的な活性収率は13.7%, 精製度は60倍であった。

実験結果

1. 耐性獲得

E. coli 1U591はCRMNおよびAZTに対し感性

Fig. 1 Development of resistance to aztreonam and increase in β -lactamase



であり MIC はそれぞれ $0.1 \mu\text{g/ml}$ および $0.78 \mu\text{g/ml}$ であった。しかしながら、これら薬剤と sub-MIC 量を含む培地中で継代培養した場合、*E. coli* 1U591 の両剤に対する挙動は大きく異なった。Table 1 は、単一コロニー分離を行い、その中から 6 個の菌株を用い CRMN または AZT 含有培地で継代培養した場合の *E. coli* 1U591 の MIC 変動を調べた結果である。CRMN に対する感受性は 3 回の継代を経てほとんど変化しなかったが、AZT に対しては 1 回の継代だけで 6 個の菌株全て MIC は $800 \mu\text{g/ml}$ 以上を示し耐性となった。

同様の継代培養を、他の cefazolin 耐性 *E. coli* 8 株および分類学上近縁関係のある⁴⁾*Citrobacter* 属の 2 種、*C. freundii* および *C. diversus* 3 株ずつを用いて行ったが、耐性の獲得は認められなかった。また CRMN に対して耐性で AZT に感性となるものも見出されなかった。

2. MIC 変化と β -ラクタマーゼ活性

継代培養による耐性獲得において、*E. coli* 1U591 が CRMN と AZT に対し異なった挙動を示す原因を究明する目的で、継代回数と β -ラクタマーゼ比活性の関係を調べた。Fig. 1 に示す通り、AZT に対する急速な耐性獲得と同時に β -ラクタマーゼの比活性も高くなり、MIC の上昇と β -ラクタマーゼ比活性の上昇はほぼ平行関係にあった。一方、CRMN では 5 回の継代で MIC は $0.1 \mu\text{g/ml}$ から $3.13 \mu\text{g/ml}$ になったが β -ラクタマーゼの比活性上昇は全く認められなかった。

Fig 2 Transfer through antibiotic-free medium of *E. coli* 1U591 acquired resistance to aztreonam

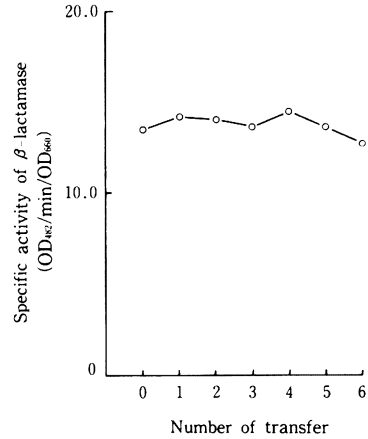


Fig. 3 Molecular weight determination by SDS-PAGE

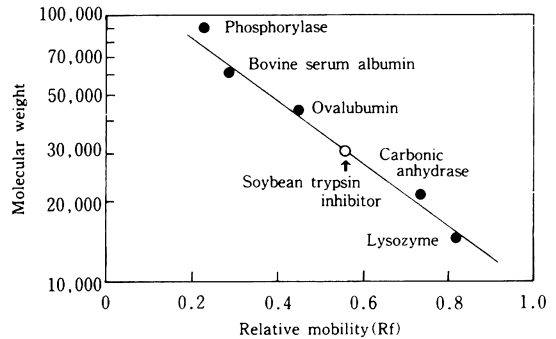


Table 2 Comparison of substrate profile of β -lactamase from *E. coli* 1U591 with that of other β -lactamases

β -Lactams	<i>E. coli</i> 1U591	<i>E. coli</i> GN5482	<i>C. freundii</i> GN7391	<i>K. oxytoca</i> 1082E	<i>P. vulgaris</i> 5D63-1
Penicillin G	66	64	14	305	—
Ampicillin	60	4.4	10	287	—
Cefazolin	55	55	86	114	—
Cefuroxime	15	0.4	0.1	16	145
Cefotaxime	12	0.5	0.1	3.9	40
Cefoperazone	3.2	2.1	2.5	1.8	—
Carumonam	<0.01	<0.1	<0.1	<0.1	—
Aztreonam	2.4	<0.1	<0.1	9.3	—

concentration of substrates: $100 \mu\text{M}$

hydrdysis rate of CER=100

— : not done

耐性獲得後、続けて行った抗生物質無添加培地中の継代培養においては、 β -ラクタマーゼ比活性の変化は6回継代後でも認められず一定値を保持した (Fig. 2)。

一方、AZT, CRMN の *E. coli* 1U591 β -ラクタマーゼ誘導能について調べたが 0.39~100 $\mu\text{g/ml}$ で誘導は観察されなかった。

3. *E. coli* 1U591 の産生する β -ラクタマーゼの性質

AZT 含有培地中で継代培養することにより、 β -ラクタマーゼ活性が高くなることが明らかになった。ここで、この酵素が CRMN より AZT を速く分解するなら、本 β -ラクタマーゼの AZT 耐性機構への寄与が一層確実となる。そこで、 β -ラクタマーゼの精製を行った。その結果 *E. coli* 1U591 の β -ラクタマーゼは分子量 31,000 (Fig. 3) であり、基質特異性は広くペナム系および第3世代セファロスポリンを含むセフェム系 β -ラクタムを分解した (Table 2)。単環系 β -ラクタム 2 剤のうち AZT は CER の 2.4% の速度で加水分解されたが CRMN は 0.01% 以下であり、AZT より安定であることが分かった。

さらに比較のため Table 2 には、第3世代セファロスポリンを分解することが知られている *K. oxytoca* および *P. vulgaris* のセフロキシマーゼ型酵素⁷⁾、典型的 *E. coli* さらに近縁種 *C. freundii* の酵素の基質特異性も示した。*E. coli* 1U591 β -ラクタ

Fig. 4 Hydrolysis of aztreonam and carumonam by β -lactamase from *E. coli* 1U591

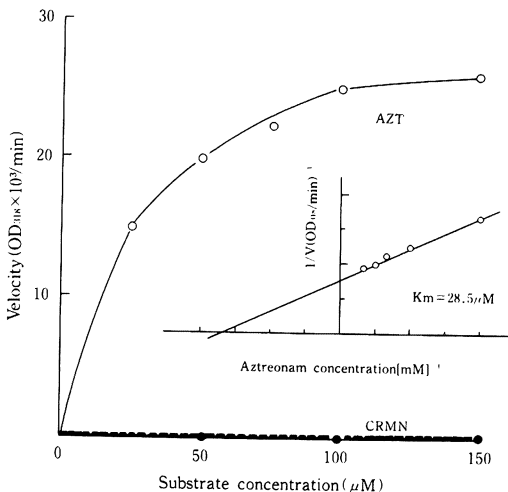


Table 3 Km and relative Vmax of β -lactamase from *E. coli* 1U591 for various β -lactams

Compounds	Km (μM)	Vmax(CER=100)	Vmax/Km
Penicillin G	80	36	0.45
Ampicillin	133	37	0.28
Cephaloridine	220	100	0.45
Cefazolin	29	15	0.52
Cefuroxime	20	3.2	0.16
Cefotaxime	83	5.2	0.06
Cefoperazone	13	1.6	0.12
Carumonam	N.D.	<0.01	—
Aztreonam	27	1.2	0.04

Table 4 Substrate profile of β -lactamases obtained from *E. coli* 1U591 before and after transfer through AZT containing medium

β -Lactams	Relative hydrolysis rate*	
	before transfer	after transfer
Cefazolin	34	55
Cefuroxime	9	15
Cefoperazone	2	3
Cefotaxime	7	12

* : CER=100

マーゼはこれらの酵素と基質特異性を異にする別タイプであることが明らかとなった。

本酵素の AZT に対する Km, Vmax は Lineweaver-Burk プロットから Km 28.5 μM , Vmax は CER の 1.2% と求められた (Fig. 4)。他の β -ラクタムに対する Km, Vmax も測定し (Table 3) 触媒係数 (Vmax/Km) を比較すると *E. coli* 1U591 β -ラクタマーゼに対し AZT, CTX が CRMN に次いで安定で、CPZ, CXM がそれらに続いた。

4. 継代培養前後の β -ラクタマーゼ

前述の通り AZT に対し *E. coli* 1U591 が耐性を獲得する過程において β -ラクタマーゼの比活性が数十倍上昇することが明らかとなった。しかし、耐性機構を明らかにするためには、継代培養前後の酵素が同一か否かを認めることは重要である。継代前および後の *E. coli* 1U591 を用い β -ラクタマーゼ基

Table 5 Susceptibility to CRMN and AZT of *E. coli* 1U591 transferred through AZT containing medium

Colony No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	before transfer		5 th transfer	6 th transfer	
	CRMN	AZT	AZT	CRMN	AZT
1	0.2	3.13	1600	0.20	1600
2	0.2	1.56	1600	0.39	800
3	0.2	1.56	800	0.20	100

質特異性を調べた (Table 4)。両酵素とも同一の基質特異性を示し耐性獲得過程において同一酵素の量的変化が起こったことが明らかとなった。

5. 交叉耐性

AZT 含有培地中で継代し AZT 耐性となった *E. coli* 1U591 の CRMN に対する感受性を調べた。単一分離法で得た 3 個の菌株を用いて、5 回 AZT 含有培地中で継代後、6 回目の継代の際 CRMN の MIC を求めた。Table 5 に示す通り *E. coli* 1U591 は 5 回の継代で 800~1,600 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し高度耐性となったが、これらの株に対して CRMN は MIC 0.2~0.39 $\mu\text{g/ml}$ で抗菌活性を示し、AZT 耐性株にも CRMN は有効であることが分かった。

考 察

E. coli 1U591 は sub-MIC 濃度の AZT を含む培地中で継代培養すると AZT に対する耐性を急速に獲得した。しかし、同じ単環系 β -ラクタムである CRMN においては、同様の方法を用いても耐性獲得は認められなかった。この 2 薬剤に対する *E. coli* 1U591 の挙動の違いを、 β -ラクタマーゼとの関連を中心に検討した結果、次の点が明らかとなった。(1) AZT 含有培地中で継代すると *E. coli* 1U591 の β -ラクタマーゼ活性は 60 倍に増加した。(2) その際の β -ラクタマーゼ比活性上昇と MIC 上昇の経時的変化はほぼ平行していた。(3) この *E. coli* 1U591 から単一コロニー分離した 6 個の菌株を用いた継代培養実験においても、これら 6 株全ての MIC 上昇パターンは同じであった。(4) 一度耐性になった株は、抗生物質無添加培地を 6 回継代しても β -ラクタマーゼの比活性は減少しなかった。(5) *E. coli* 1U591 の β -ラクタマーゼは AZT, CRMN で誘導されなかった。(6) AZT, CRMN とともに *E. coli* 1U591 の産生する β -ラクタマーゼに安定であったが、この 2 薬剤

を比較すると AZT は CRMN の 100 倍以上の速さで加水分解を受けた。これらの結果は、*E. coli* 1U591 の β -ラクタマーゼ高度生産株が AZT により選別され、その結果として耐性を獲得することを示唆している。一方、CRMN は本菌株の β -ラクタマーゼに安定であり、 β -ラクタマーゼ高度生産株の選別が起こらないと考えられる。

一般的に、薬剤耐性機構のもう一つの重要な因子として薬剤の膜透過性がある⁸⁾。今回の研究では、この点を検討していない。しかし、AZT 耐性獲得株の β -ラクタマーゼ量が感性株より数十倍高いこと、MIC 上昇と酵素比活性上昇に平行関係があったことを考えると、 β -ラクタマーゼが *E. coli* 1U591 の AZT 耐性において主たる役割を果たしていると推察される。

しかし、急速な MIC 上昇が単一分離された 6 個の菌株で同様に観察されること、継代の際の接種菌量が 10^5 cells/well 以下であることを考慮すると、*E. coli* 1U591 は、 β -ラクタマーゼ発現に関する変異率が高い株であると推察される。FINDELL と SHERRIS⁹⁾ および THOMAS ら¹⁰⁾ は *E. cloacae* で cefamandole 耐性変異株の出現頻度が通常より高く、この高い変異率が *E. cloacae* の cefamandole 耐性機構の一つであることを示している。*E. coli* 1U591 の AZT 耐性機構も *E. cloacae* の場合に類似していると思われるが、これらの点を確かめるには変異頻度の測定などの検討が必要である。また、このような AZT 耐性 *E. coli* の分離頻度については調べてはいないが、今回得られた 1 株は CRMN 評価中に臨床分離株約百数十株の中から見い出されたものである。今後分離頻度についても検討してみたい。

文 献

- 1) IMADA, A.; M. KONDO, K. OKONOJI, K.

- YUKISHIGE & M. KUNO: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of carumonam (AMA-1080), a new N-sulfonated monocyclic β -lactam antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 : 821~827, 1985
- 2) WILLSON, W.S.N.G. ; P.Y. CHAU, Y.K. LEUNG & D.M. LIVERMORE: *In vitro* activity of Ro 17-2301 and aztreonam compared with those of other new β -lactam antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 : 872~873, 1985
 - 3) ARISAWA, M. ; J. OHSHIMA, H.B. MARUYAMA & P. ANGEHRN: Ro 17-2031 (AMA-1080), a novel N-sulfo monocyclic β -lactam antibiotics: *in vitro* and *in vivo* antibacterial evaluation and resistance development. Abstract of the 23rd ICCAC, No.581, 1983
 - 4) COWAN, S.T.: (坂崎利一訳) 医学細菌同定の手びき
 - 5) ROSE, G.W. & C.H. O'CALLAGHAN: *Methods in enzymology*. Vol 43, ed. by S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN, Academic Press, New York, pp.69~85, 1975
 - 6) ARISAWA, M. ; J. OHSHIMA & H.B. MARUYAMA: Effect of 3-substitution in oxyiminocephalosporins in the stability to and the inhibition of various β -lactamases. *Chem. Pharm. Bull.* 30 : 3333~3339, 1982
 - 7) MITSUHASHI, M. & M. INOUE: β -Lactam antibiotics. ed. by M. SALTON and G.D. SHOCKMAN, Academic Press, New York, pp.361~375, 1981
 - 8) SAWAI, T. ; R. HIRUMA, N. KAWANA, M. KANEKO, F. TANIYASU & A. INAMI: Outer membrane permeation of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 : 585~592, 1982
 - 9) FINDELL, C.M. & J.C. SHERRIS: Susceptibility of *Enterobacter* to cefamandole: Evidence for a high mutation rate to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9 : 970~974, 1976
 - 10) THOMAS, D.G. ; C.C. SANDER & R.V. GOERING: Resistance to cefamandole: Derepression of β -lactamase by cefoxitin in *Enterobacter cloacae*. *J. Infect. Dis.* 146 : 34~42, 1982

AN *E. COLI* STRAIN WHICH DEVELOPED RESISTANCE TO AZTREONAM BUT NOT TO CARUMONAM: RESISTANCE DEVELOPMENT KINETICS AND β -LACTAMASE

MIKIO ARISAWA, YUZURU SEKINE and HIROMI MARUYAMA
Nippon Roche Research Center, Kamakura, Kanagawa

Escherichia coli 1U591 developed resistance to aztreonam (AZT), but not to carumonam (CRMN), by more than 2,000 times by five transfers through a medium containing a sublethal concentration of AZT. A concomitant increase in β -lactamase activity was observed. The subsequent transfer of AZT-resistant *E. coli* 1U591 to an antibiotic-free medium showed no reduction in the MIC of β -lactamase activity. Furthermore, the β -lactamase purified from the strain hydrolyzed AZT but not CRMN, suggesting a major role of the β -lactamase in the development of resistance. The substrate profile of this β -lactamase indicated that it differs from those of *Proteus vulgaris* and *Klebsiella oxytoca*.