

ブドウ球菌における各 β -ラクタマーゼ測定法の比較検討

高橋 綾子・四方田幸恵・小林 功

群馬大学医学部臨床検査医学中央検査部*

大久保豊司・岡本 了一

群馬大学医学部薬剤耐性菌施設

井上松久

北里大学医学部微生物学教室

(平成3年11月18日受付・平成4年2月18日受理)

β -ラクタマーゼ測定法の中のヨード・デンプン法、 β -チェック、 β -ラクタムリジェント・ディスク、セフィナーゼおよびUV法を用い測定法の面から *Staphylococcus aureus* の β -ラクタマーゼ検出法について検討した。

1. β -ラクタマーゼチェック、 β -ラクタムリジェント・ディスクにより β -ラクタマーゼが陰性と判定された *S. aureus* の中には ceftizoxime で誘導することにより陽性と変化するものが認められた。しかしヨード・デンプン法では酵素の非誘導条件下でもその検出が可能であった。

2. セフィナーゼは *S. aureus* MS 353 等の β -ラクタマーゼ非産生株までも陽性と判定された。

3. *S. aureus* の PCase 活性既知株を用い β -ラクタマーゼ測定法の感度を調べた結果ヨード・デンプン法、セフィナーゼでは 0.01 U/mg protein 以上の酵素活性をもつ菌株、 β -ラクタムリジェント・ディスクは 0.07 U/mg protein 以上、 β -チェックは 0.09 U/mg protein 以上の酵素活性をもつ菌株から β -ラクタマーゼの検出が可能であった。

Key words: β -ラクタマーゼ, ブドウ球菌 MRSA

1980年代に入り新しいセフェム剤が臨床応用され、治療面で大きな成果を挙げている。その一方でこれらいわゆる第3世代セフェム剤の使用とともに *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* において β -ラクタム剤耐性菌が増えたことも事実である。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は多剤耐性菌であることから、その増加に伴い他の菌種による感染治療に対する β -ラクタム剤の使用に対してもその選択に苦慮している。MRSAのメチシリン耐性は菌の保有するペニシリナーゼ(PCase)産生遺伝子存在下において誘導型であり、ペニシリナーゼ産生遺伝子非存在下では構成型であると報告されている¹⁾。最近増えつつある高度耐性MRSAでは β -ラクタマーゼ産生菌が減少傾向にあるという報告もある²⁾。

現在 β -ラクタマーゼ検出法としては簡便な種々の方法が用いられている^{3,4)}。しかしこれら β -ラクタマーゼ測定

法はそれぞれ測定原理が異なり、方法や判定の仕方により様々な報告がなされている⁵⁻⁷⁾。

グラム陰性菌の β -ラクタム剤の耐性の多くは、 β -ラクタマーゼによる薬剤の加水分解が主体である。 β -ラクタマーゼはその基質特異性からセファロスポリナーゼ(CEPase)およびオキシミノセファロスポリナーゼ(CXase)ないしペニシリナーゼ(PCase)と呼称されている⁸⁾。*S. aureus*のPCaseやグラム陰性菌のCEPaseの産生様式はいずれも誘導型である^{9,10)}。したがって日常検査においていかにこれらの β -ラクタマーゼを効率よく検出するかこの点が重要となる。今回MRSAのPCase産生株がはたして減少傾向にあるものかどうか日常検査室で用いられている種々の β -ラクタマーゼ測定法であるアシドメトリー法(β -チェック・ β -ラクタムリジェント・ディスク)、ニトロセフィン法(セフィナーゼ)およびUV法に加え、ヨード・デンプン法それぞれについて測定法の

* 前橋市昭和町3-39-15

面から検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 材料

(1) 被検菌として1991年分離臨床分離株, *Staphylococcus aureus* 31株を用いた。β-ラクタマーゼ陰性対照として *S. aureus* MS 353を用いた。(2) 使用薬剤は aminobenzylpenicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), benzylpenicillin (PCG), cefazolin (CEZ), cephalotin (CET), methicillin (DMPPC), ceftizoxime (CZX), clavulanic acid (CVA), を使用した。

2. β-ラクタマーゼ測定方法

β-ラクタマーゼ測定は、ヨード・デンプン法 (自家製), ニトロセフィン法のセフィナーゼ (BBL社), およびアシドメトリー法のβ-チェック (ファイザー製薬), β-ラクタムリエーゼント・ディスク (Marion) を用いた。

(1) ヨード・デンプン法

1%デンプン加0.75%寒天10mlを溶解後, ヨード液 (I₂ 2g+KI 53.2g/10ml) 1ml, およびPCGまたはABPC (20mg/ml) 1mlを, 手早く加えその3~4mlをあらかじめ分離培養した被検菌の培地上に手早く重層し, 水平台の上に2~10分放置する。培地は当初ヨード・デンプンにより紫色を呈するがβ-ラクタマーゼ産生菌は時間とともにコロニーの周囲に透明のハローを作る。

(2) ニトロセフィン法

セフィナーゼを使用した。このディスクに滅菌水を30μl滴下し, 分離した被検菌をディスク表面に塗り付ける。常時観察し最高1時間以内にディスクの色調が黄色から赤色に変化したものをβ-ラクタマーゼ陽性とした。

(3) アシドメトリー法

β-チェックおよびβ-ラクタムリエーゼント・ディスクを使用した。

β-チェックはディスクに基質としてPCGあるいはCEZを4.5mg, プロモクレゾールパープル3μgを含み, 対照にはプロモクレゾールパープルのみを含ませてある。ディスクに0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) を30μl滴下後被検菌を塗布し, 5~15分後に色調が紫色から黄色に変化したものをβ-ラクタマーゼ陽性とした。陰性の場合商品説明に従い30分および60分後にも判定した。

β-ラクタムリエーゼント・ディスクはディスクにPCG 6.6mg, プロモクレゾールパープル, 1N水酸化ナトリウムを含んでいる。蒸留水を30μlディスク

に滴下した後被検菌を塗布し商品説明に従い30分以内に色調が青紫色から黄色に変化したものをβ-ラクタマーゼ陽性とした。

3. MIC測定

寒天希釈法 希釈法 日本化学療法学会標準法に準じた¹¹⁾。

4. 酵素量測定

5mlのHIブイオンに被検菌を37°C 12時間振とう培養し, これまでに報告したUV法により測定し酵素活性を求めた¹²⁾。なお, 酵素活性は30°Cにて1分間当たり100μMを加水分解するmg蛋白質当たりの量を1Unitとした。

5. *S. aureus* の誘導

CZX 6.25μg/ml含有培地で増菌したものを使用した。

6. PCase産生菌からPCase非産生菌の分離

S. aureus 株についてのPCase脱落は系列2倍希釈エチジウムブロマイド含有培地に42°Cにて1夜培養し, その中からヨード・デンプン法によりPCase非産生菌を分離した¹³⁾。また, PCase産生遺伝子を担うpMS 18 (PCG, kanamycin, lividomycin) の形質導入は常法により行い各導入株についてβ-ラクタマーゼ測定法の比較を行った¹⁴⁾。

II. 結果

1. β-ラクタマーゼの検出率の比較

臨床分離株の *S. aureus* 31株についてヨード・デンプン法, アシドメトリー法 (β-ラクタムリエーゼント・ディスク, β-チェック), ニトロセフィン法 (セフィナーゼ) を用いβ-ラクタマーゼ産生の有無と各測定法の比較をした (Table 1)。 *S. aureus* 31株中β-ラクタマーゼ陽性はヨード・デンプン法で26株 (84%) であった。一方β-ラクタムリエーゼント・ディスクやβ-チェック (基質PCG) を用いた時のPCaseの陽性率はそれぞれ71%, 32%とヨード・デンプン法に比べ低かった。しかしセフィナーゼでのPCase陽性率は97%と高かった。

2. *S. aureus* におけるβ-ラクタマーゼ測定法の誘導による変化

S. aureus でβ-ラクタマーゼ測定法の結果が不一致の菌をCZXで誘導後と誘導前の菌体についてβ-ラクタマーゼ測定を行った (Table 2)。

MS 11525 (MRSA), MS 15620 (MSSA), MS 15561 (MRSA) 3株の産生するPCaseを検討したところいずれの菌株も, CZX誘導前の検体ではヨード・デンプン法, セフィナーゼの2法が陽性で, β-ラクタムリエーゼント・ディスク, β-チェック (基質

Table 1. Frequency of the incidence β -lactamase producing *Staphylococcus aureus* by β -lactamase detection methods

Method	Iodine-Starch method	β -lactam reagent disk	β -check		Cefinase
Substrate	PCG			CEZ	nitrocefin
Reaction time (min.)	15	30	30		60
Tested strains 31 (%)	29 (84)	22 (71)	10 (32)	0 (0)	30 (97)

PCG, penicillin; CEZ, cefazolin.

Table 2. Sensitivities of various β -lactamase detection methods in *Staphylococcus aureus*

Methods Substrate Reaction time (min)	Induction*	(A)			(B)		(C)				(D)		MIC	
		15	30	60	30	60	PCG		CEZ		60	90	DMPPC	CZX
							30	60	30	60				
MS 15525	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	≥ 100	≥ 800
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+		
MS 15620	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	1.56	6.25
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+		
MS 15561	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	≥ 100	≥ 800
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+		
MS 15517	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1.56	1.56
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
MS 15523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1.56	6.25
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
MS 353	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	0.8	1.6
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		

(A) Iodine-starch method (B) β -lactam reagent disk (C) β -check (D) Cefinase*Inducer CZX (6.25 μ g/ml)

PCG, penicillin; CEZ, cefazolin; DMPPC, methicillin; CZX, ceftizoxime.

PCG) の2法は陰性であった。しかし CZX 誘導後の菌体では β -ラクタムリジェント・ディスク、 β -チェックのいずれの方法でも PCase 陽性と変化した。

MS 15517, MS 15523 株を CZX 非存在下で培養した菌体の PCase について調べた。その結果2株はセフィナーゼのみ陽性を示し、他の方法では変化がみられなかった。また、対照とした *S. aureus* MS 353 も同様であった。これらの測定法で判定時間の延長による変化は認められなかった。なお、MS 353 の PCase 活性を UV 法で検討したところ酵素活性は 0.001 U/mg protein 以下であった。

3. *S. aureus* における PCase 脱落株における各 β

-ラクタマーゼ測定と比較

S. aureus 5 株についてその PCase 産生プラスミッド脱落株と PCase 産生遺伝子形質導入株について β -ラクタマーゼ測定法の比較を行った (Table 3)。元株 5 株の β -ラクタマーゼは β -チェック (基質 CEZ) を除くヨード・デンプン法、 β -ラクタムリジェント・ディスク、 β -チェック (基質 PCG) セフィナーゼすべて陽性であった。PCase 脱落後のそれはセフィナーゼのみ陽性で他法はすべて陰性であった。PCase 脱落株に再び PCase 遺伝子を形質導入した後の β -ラクタマーゼは元株のそれと同様の結果となった。

β -ラクタマーゼ非産生株である *S. aureus* MS 353

Table 3. Comparison of sensitivities of staphylococcal β -lactamase detection methods

Methods	Iodine-Starch method	β -lactam reagent disk	β -check		Cefinase
			PGG	CEZ	
Reaction time (min.)	15	30	30	30	60
Strain No. (1~5)	+	+	+	-	+
PCase*	-	-	-	-	+
PCase**	+	+	+	-	+

* Plasmid pMS 18 encoding PCase production was cured from wild strain (See materials and methods).

**Plasmid pMS 18 encoding PCase production was transduced into PCase negative strain MS 353.

PCG, penicillin; CEZ, cefazolin.

Table 4. Sensitivity of β -lactamase activity to various β -lactamase detection methods in *Staphylococcus aureus*

Strain	β -lactamase activity*	Iodine-starch method	β -lactam reagent disk	β -check	Cefinase
No. 1	0.51	+	+	+	+
No. 2	0.16	+	+	+	+
No. 3	0.088	+	+	+	+
No. 4	0.065	+	+	-	+
No. 5	0.010	+	-	-	+

*(U/mg protein)

は前述のごとくセフィナーゼで陽性と判定された。

4. β -ラクタマーゼ活性と各 β -ラクタマーゼ測定法との関係

PCGを基質として測定したPCase活性の既知*S. aureus* 5株について各 β -ラクタマーゼ測定法の限界値を調べた (Table 4)。

ヨード・デンブ法およびセフィナーゼは0.010 U/mg protein以上の酵素活性をもつ菌は陽性と判定された。 β -ラクタムリジェント・ディスクは0.065 U/mg protein以上、 β -チェックは0.088 U/mg protein以上の酵素活性をもつ菌は陽性であった。

ヨード・デンブ法陽性の臨床分離MSSAおよびMRSAを各10株ずつ任意に選びそのPCase活性をUV法により求めたところ、CZX非誘導時のPCase活性は0.01~1.0 U/mg protein,であったが、CZX 0.78 μ g/ml (MSSA) ないし3.1 μ g/ml (MRSA)で誘導後のPCase活性は0.16~11.0 U/mg proteinと上昇した。しかもこれら使用菌のCZX誘導後のPCase活性はMSSAでは0.1~10 U/mg protein,

MRSAでは0.16~11 U/mg proteinであり両者に差が認められなかった。

III. 考 察

種々の β -ラクタマーゼ測定法を用い検討した結果*S. aureus* (MRSA, MSSA)は β -ラクタムリジェント・ディスクおよび β -チェックを用いて測定した場合のPCase陽性率はセフィナーゼやヨード・デンブ法に比べ低かった。しかしPCase非産生と判定された株についてCZXによりPCaseを誘導し、その β -ラクタマーゼ活性を調べたところ β -ラクタマーゼは β -ラクタムリジェント・ディスク、 β -チェックいずれの方法でもその陽性率の増加が認められた。したがってMRSAの β -ラクタマーゼ測定の際にはPCaseの誘導に影響されなかったヨード・デンブ法を用いるか、他の測定法を行う場合には結果に述べたごとくCZX非誘導時に比べ誘導後のPCase活性が約10倍上昇したことから、あらかじめ β -ラクタマーゼの誘導を試みてからの β -ラクタマーゼ産生の有無の判定が必要であろう。本田¹⁵⁾、武藤¹⁶⁾らは β -ラクタ

マーゼ産生菌の測定にはニトロセフィンディスクが鋭敏であり、基質として PCG, cephaloridine を使用した時は感度が落ちると述べている。また橋¹⁷⁾らは β -ラクタムリジェント・ディスクを使用し *Staphylococcus* を調べたところ MIC が PCG で $8 \mu\text{g/ml}$ 以上, ABPC で $8 \mu\text{g/ml}$ 以上を示したものでも β -ラクタマーゼ陰性株がみられたことを指摘している。

β -ラクタマーゼ測定法のなかでセフィナーゼが一番陽性率が高かった。しかし PCase を持たない株までも陽性と判定されたことは、なんらかの因子により非特異的に陽性反応が現れたものとおもわれる。

β -ラクタマーゼ測定法の感度を検定したなかで PCase の検出限界値が最も良い方法はヨード・デンプン法、セフィナーゼであり、その時の酵素活性は $0.01 \text{ U/mg protein}$ 以上を示す菌が陽性であった。次いで β -ラクタムリジェント・ディスク、 β -チェックであった。しかしこれらの方法は陽性と検出するまで時間を費やすことも明らかとなった。最近 *Staphylococcus* 属における β -ラクタマーゼ産生量の低い菌株が増えている傾向がみられ、このことは本菌の β -ラクタマーゼ (PCase) を判定する上でもヨード・デンプン法が簡易でかつ安価、加えて一度に多数の検体を処理できることなど、日常検査業務においても効率よく検討可能な方法の一つと言えよう。

一方今回、ヨード・デンプン法により MRSA の β -ラクタマーゼを調べたかぎり PCase 産生菌の割合は 1991 年分離菌で 85%前後であり、1988 年 78.6%、1989 年 91%³⁾、1990 年 88.8%とこの 4 年間で比較しても PCase 産生菌の割合には、減少変化が認められなかった。しかし MSSA, MRSA いずれにおいても PCase 活性は菌株間で相当異なるものが検出された。したがって *S. aureus* における PCase 産生菌の減少の報告は測定法による方法あるいは測定法の感度の差によるものと理解される。

文 献

- 1) Ubukata K, Yamasita N, Konno M: Occurrence of a β -lactaminducible penicillin-binding in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 851~857, 1985
- 2) 鈴木勝也, 石原 博, 村元雅行, 足立 斎, 小野雅之, 西脇慶治, 真下啓二, 石川 周, 品川長夫, 由良二郎: 当科において最近分離された黄色ブドウ球菌の感受性および β -lactamase 産生能について。第 39 回日本化学療法学会総会プログラム。講演抄録: 145, 1990
- 3) 高橋綾子: β -ラクタマーゼの検査法。検査と技術 17: 900~905, 1989
- 4) 五島瑛智子, 辻 明良: β -ラクタム系抗生物質と β -ラクタマーゼ。検査と技術 9: 464~471, 1981
- 5) 小川正俊, 武藤弓子, 吉田 勇, 宮崎修一, 五島瑛智子: β -lactamase 測定法の臨床細菌への応用。Chemotherapy 31: 468~474, 1983
- 6) 水野全裕: 尿路感染症の β -lactamase 産生能に関する検討—Disk 法による β -lactamase の判定と薬剤感受性について—Chemotherapy 34: 1101~1109, 1986
- 7) 渡辺 彰, 大東耕太郎, 千葉潤一, 加藤美和: 喀痰由来病原細菌の β -lactamase 活性と薬剤感受性との相関— β -lactamase 阻害剤配合の意義—。Chemotherapy 37: 563~576, 1989
- 8) 井上松久: 基礎の立場から見た耐性菌の諸問題—グラム陰性かん菌のセフェム耐性—。臨床と微生物 13: 61~69, 1986
- 9) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mituhashi S: Induction of β -lactam antibiotics in Enterobacter cloacae Antimicrob Agents Chemother 18: 382~385, 1980
- 10) Dong M, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsuhasi M: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *Febs* 221 1 167~171, 1987
- 11) 最少発育濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 12) 高橋綾子, 四方田幸恵, 入谷さゆり, 田波 洋, 橋本一, 井上松久: 緑膿菌に対する β -ラクタム剤感受性ディスク法による耐性誘導とそこに現れた変異株の解析。Chemotherapy 37: 1458~1466, 1989
- 13) 三橋 進編: 薬剤感受性測定法—薬剤耐性菌の理論と実際—。講談社サイエンティフィック, 34~38, 1982
- 14) Inoue M, Hasimoto H, Yamagisi S, Mituhashi S: Transduction of the genetic determinants for chloramphenicol resistance in staphylococci. *Jap J. Microbiol* 14: 261~268, 1970
- 15) 本田一陽, 滝島 任: β -ラクタマーゼの臨床的意義と問題点。臨床と細菌 10: 79~84, 1983
- 16) 武藤弓子, 小川正俊, 吉田 勇, 五島瑛智子: 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
- 17) 橋由紀子, 久保勢津子, 渡辺正司, 高橋信二, 永井友子, 小林章男: β -lactam reagent disk による臨床分離株の β -ラクタマーゼの検出。臨床と微生物 9: 85~91, 1982

THE SUSCEPTIBILITY OF β -LACTAMASE TO VARIOUS DETECTION METHODS IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ayako Takahashi, Sachie Yomoda and Isao Kobayashi

Clinical Laboratory, Gunma University Hospital School of Medicine, Gunma University,
3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Gunma, Japan

Toyaji Okubo and Ryouiti Okamoto

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, Gunma University School of Medicine

Matuhisa Inoue

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

The effectiveness of β -lactamase detection methods such as the iodine-starch method, β -check, cefinase and UV method on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* was investigated. The results were as follows.

1. The iodine-starch method was found to be the most sensitive; inducible type β -lactamase without induction was detectable only by this method. β -lactam reagent disk or β -check of the same strains gave positive results only after induction.
2. Nonproducing β -lactamase strains including *Staphylococcus aureus* MS 353 were judged to be positive by the cefinase method.
3. The sensitivities of the iodine-starch, cefinase, β -lactam reagent disk, and β -check methods were >0.01 , >0.01 , >0.07 , and >0.09 unit/mg protein, respectively.