

化膿性腹膜炎における腹水中 β -lactamase 活性に関する 基礎的・臨床的検討

道 浦 準

和歌山県立医科大学消化器外科*

(主任: 谷村 弘教授)

(平成3年10月21日受付・平成4年1月31日受理)

Acidimetry 法を応用して腹水中 β -lactamase 活性を定量的に測定し、化膿性腹膜炎を中心とした外科感染症 42 例の腹水中 β -lactamase 活性を測定した結果、

- 1) β -lactamase 産生菌を含む腹水中の penicillinase (PCase) および cephalosporinase (CSase) は、 β -lactamase 産生菌を含まない腹水と比較して有意に高い活性を示した。
- 2) 感染後 96 時間を超えると腹水中 CSase 活性が有意に上昇した。
- 3) β -lactam 剤を全身投与された症例における腹水では、CSase 活性が高い傾向を示した。
- 4) β -lactamase 活性は、分離菌の β -lactamase 産生性や治療効果とよく相関して変動した。
- 5) *In vitro* において、 β -lactamase 活性は、腹水中でも β -lactamase 阻害剤 (sulbactam: SBT) の添加によって阻害された。

Key words: 化膿性腹膜炎, 腹水, β -lactamase, penicillinase, cephalosporinase, Acidimetry 法

化膿性腹膜炎は外科感染症のなかでも急性かつ重症であり、その治療に際しては適切な手術による感染巣の除去と抗菌薬の投与が必要不可欠である。特に、下部消化管穿孔による化膿性腹膜炎は、ほとんどがグラム陽性菌、グラム陰性菌、嫌気性菌による複数菌感染であり、化学療法に対する反応も単一菌感染の場合と比べて一般に鈍い。

一方、現在使用されている抗菌薬は多数開発されたとはいえ、ペニシリン系・セフェム系などの β -lactam 剤が中心であるため¹⁻³⁾、その不活化には細菌由来の β -lactamase が薬剤耐性の大きな原因の 1 つとなっている。さらに、複数菌感染では、共存する感受性菌にも効果を発揮できなくなるといった「間接的病原性」の見地からも⁴⁾、 β -lactamase の存在は非常に重要な役割を果たしている。

臨床検体における β -lactamase 活性については、喀痰、胆汁、胆汁に関する報告はあるが⁵⁻¹⁰⁾、腹水や腹腔内浸出液について penicillinase (PCase) と cephalosporinase (CSase) を分別定量したり、経日的に測定したものはほとんどない。

今回、著者は Acidimetry 法^{11,12)}を応用し、化膿性腹膜炎を中心とした腹水中 β -lactamase 活性を基質特異性に

基づいて PCase と CSase に分けて測定し、基礎的・臨床的検討を行った。なお、腹腔内より得られた胆汁や腹腔内浸出液を一括して腹水と記した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

今回の実験には ampicillin (ABPC, Sigma), cephaloridine (CER, Sigma), sulbactam (SBT, ファイザー製薬) を用いた。

2. 腹水中 β -lactamase 活性測定法の基礎的検討

坂本の Acidimetry 法による胆汁中 β -lactamase 測定法に準じ¹⁰⁾、腹水中の β -lactamase 活性を測定するために種々の基礎的検討を行った。非活性腹水として癌性腹膜炎患者由来の腹水を用いた。PCase 測定には ABPC を、CSase 測定には CER を基質とし、 β -lactamase の 1 活性単位 (U: unit) は、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を加水分解する酵素活性とした。

1) 腹水の至適希釈濃度の検討

非活性腹水を 0.4 mM リン酸塩緩衝液 (以下緩衝液と略す) で 4~40 倍に希釈し、反応溶液とした。この反応溶液および緩衝液に種々の濃度の HCl を添加

* 和歌山市七番丁 27

し、pHの低下による phenol red の色調の変化を分光光度計（日本分光，U best-50）により 558 nm で測定した。

2) β -lactamase 添加回収試験

Escherichia coli CSH 2-RK 1 および *Klebsiella pneumoniae* GN 69 より抽出した β -lactamase 粗酵素液¹⁰⁾、*Bacillus cereus* 由来の PCase (Sigma) および *Enterobacter cloacae* 由来の CSase (Sigma) を用いた。上記の β -lactamase を非活性腹水と緩衝液に等量添加し、緩衝液で 20 倍に希釈したのち、 β -lactamase 活性を PCase と CSase に分けて測定した。

3) 測定時の温度は、PCase も CSase も 25°C、測定限界は 20 倍希釈時で PCase が 2.0 mU/ml、CSase が 1.0 mU/ml とした¹⁰⁾。

3. 臨床検体における細菌学的検討と腹水中 β -lactamase 活性の定量

1990 年 4 月より 1991 年 3 月の 1 年間に、和歌山県立医科大学消化器外科および関連施設に入院した患者から得られた腹水 83 検体 (42 症例) を対象とした。患者の内訳は、急性腹膜炎 19 例 (十二指腸潰瘍穿孔 2 例、小腸穿孔 4 例、虫垂炎穿孔 6 例、虫垂炎非穿孔 4 例、大腸穿孔 3 例)、腹腔内膿瘍および肝膿瘍 5 例、消化管の縫合不全 2 例、癌性腹膜炎 4 例、消化器外科術後ドレナージ液を中心としたその他 12 例であった (Table 1)。採取方法は、急性腹膜炎 19 例ではすべて術中採取で、小腸穿孔、虫垂炎穿孔や大腸穿孔では引き続き腹腔内浸出液を採取した。腹腔内膿瘍、肝膿

瘍、縫合不全ではドレーン排液であった。これらを検査材料とし、一部を細菌培養用としてカルチャーボトル 5 号 (栄研) に採り、残りを -80°C で凍結保存した。

1) 細菌学的検討

腹水中の細菌をカルチャーボトルで 37°C、48 時間増菌後、馬脱線維血液寒天培地およびプルセラ HK 寒天培地に画線塗抹し、前者を好気培養、後者を嫌気培養した。分離菌について同定を行い、cefinase disk (BBL) (nitrocefin disk 法) により β -lactamase 産生能を調べた。disk に菌を塗抹後、15 分で赤色反応が見られたものを β -lactamase 陽性とした。

2) 腹水中 β -lactamase 活性の定量

融解した腹水を 2,000 rpm、10 分間遠沈分離したのち、上清を蛋白低吸着性のメンブランフィルター (0.45 μ m, MILLEX®-HV) でろ過した。ろ過液を緩衝液で 20~40 倍に希釈し、 β -lactamase 活性を測定した。

4. 臨床的検討

β -lactamase 活性が陽性を示した検体を対象に以下の検討を行った。

- 1) 発症からの時間経過と β -lactamase 活性の関係
- 2) 投与抗菌薬と β -lactamase 活性の関係
- 3) β -lactamase 活性の経日的変化
5. SBT の *in vitro* における β -lactamase 阻害効果の検討

Table 1. Clinical diagnosis and abdominal fluids used in β -lactamase assay

Diagnosis	Cases (Samples)	Sample source		
		operation	transcutaneous puncture	exudate from drains
Acute suppurative peritonitis	19 (36)	19		17
perforative duodenal ulcer	2 (2)	2		
perforation of the small intestine	4 (9)	4		5
appendicitis, perforated	6 (10)	6		4
appendicitis, not perforated*	4 (4)	4		
perforation of the large intestine	3 (11)	3		8
Intraabdominal/liver abscess	5 (26)		1	25
Leakage from anastomosed stoma	2 (3)			3
Carcinomatous peritonitis	4 (4)		4	
Miscellaneous	12 (14)	4	2	8
Total	42 (83)	23	7	53

*Gangrenous or phlegmonous appendicitis with fluid collection.

β -lactamase の活性が陽性を示した検体に、SBT を最終濃度が $1.0 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、 30°C で 60 分 incubate したのち、 β -lactamase 活性を測定した。

6. 統計学的検討

各群間の β -lactamase 活性値の統計学的検定は Wilcoxon test により行った。

II. 結 果

1. 腹水中 β -lactamase 活性測定法の基礎的検討

1) 腹水の至適希釈濃度

腹水は生理的な成分構成のため緩衝能が非常に強く、Acidimetry 法で用いる緩衝液とほぼ同等の緩衝能を得るためには、20 倍以上の希釈が必要であった (Fig. 1)。

2) β -lactamase の添加回収試験

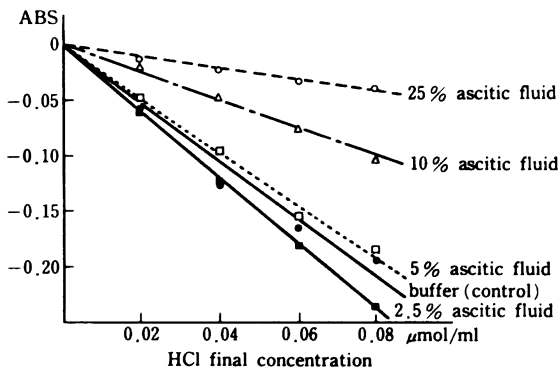


Fig. 1. Buffer action of diluted ascitic fluid^a.

^a Ascitic fluid was diluted by 0.4 mM sodium phosphate buffer ranged from 2.5% to 25%

添加回収試験では、PCase は $95\% \sim 141\%$ ($115 \pm 24\%$), CSase は $86\% \sim 137\%$ ($113 \pm 26\%$) の回収率を示した (Table 2)。

2. 臨床検体における細菌学的検討と腹水中 β -lactamase 活性の定量

1) 細菌学的検討

腹水より分離された 78 株を同定したところ、*E. coli* 15 株、*Bacteroides fragilis* 10 株、*K. pneumoniae* 7 株、*Enterococcus* spp. 6 株が多く、約半数を占めた。nitrocefin disk 法では、78 株中 43 株 (55%) が β -lactamase 産生菌であった。グラム陽性球菌では β -lactamase 産生率が低いのにに対し、グラム陰性桿菌 50 株中、84% にあたる 42 株が β -lactamase 産生菌であった (Table 3)。

2) 腹水中 β -lactamase 活性の定量

有菌腹水 46 検体のうち、 β -lactamase 産生菌が分離されたのは 41 検体であり、このうち 38 検体は PCase あるいは CSase のどちらかの活性が認められたが、残りの 3 検体は PCase も CSase も測定限界以下であった。PCase 活性は、最高 65 mU/ml 、平均 $11.0 \pm 1.8 \text{ mU/ml}$ 、CSase は検体によって差が大きく、最高 287 mU/ml 、平均 $19.0 \pm 8.2 \text{ mU/ml}$ であった。

一方、 β -lactamase 非産生菌のみを含む腹水 5 検体では活性は証明されなかった。

無菌腹水 37 検体のうち、34 検体では PCase も CSase も証明されなかったが、3 検体で PCase と CSase が証明された。全体として PCase は $1.1 \pm 0.7 \text{ mU/ml}$ であったが、CSase はわずか $0.4 \pm 0.2 \text{ mU/ml}$ であった (Fig. 2)。 β -lactamase 産生菌を含む腹水は、その他の腹水と比較して、PCase も CSase も

Table 2. Recovery rate of β -lactamases

Sample source	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a		<i>Escherichia coli</i> ^a		<i>Bacillus cereus</i> ^b		<i>Enterobacter cloacae</i> ^b	
	PCase	CSase	PCase	CSase	PCase	CSase	PCase	CSase
0.4 mM PBS	81.0	13.1	27.0	12.0	34.5	ND	ND	35.0
Ascitic fluid ^c	87.9	18.0	38.0	14.0	32.9	ND	ND	30.0
Recovery rate (%)	109	137	141	117	95	—	—	86

PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase; ND, not detected.

^aEach β -lactamase was obtained from the supernate after bacterial sonication and centrifugation for 30 min. at 12,000 g.

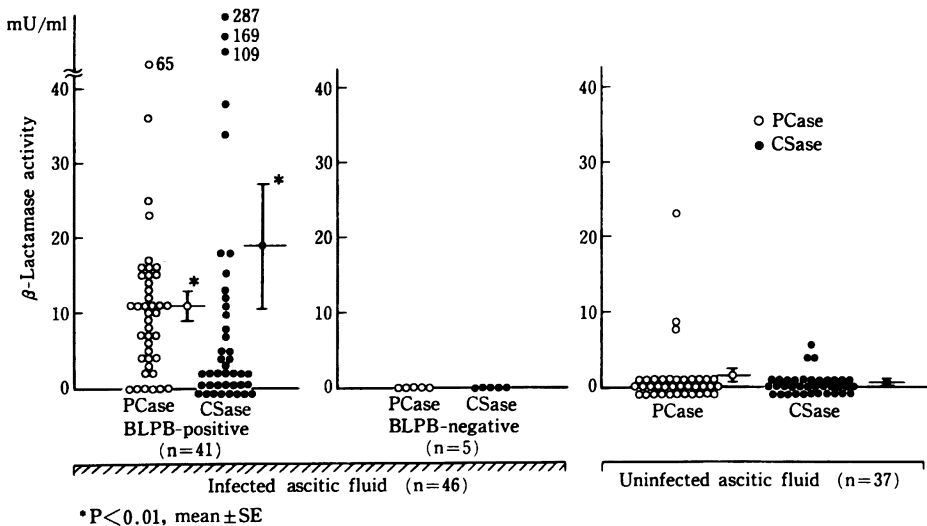
^bStandard β -lactamase obtained commercially from Sigma Chemicals Co.

^cAscitic fluid was obtained from a patient of carcinomatous peritonitis.

Table 3. Producibility of β -lactamase by bacteria isolated from ascitic fluid

	Genus	Number of strains	Production of β -lactamase*		
			positive	(%)	
Gram-positive cocci	<i>Enterococcus</i> sp.	6	0	(0)	
	<i>Staphylococcus</i> sp.	4	1	(25)	
	<i>Streptococcus</i> sp.	4	0	(0)	
	<i>Lactococcus</i> sp.	3	0	(0)	
Gram-negative bacilli	Family Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	15	13	(87)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	6	(86)
		<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	(100)
		<i>E. aerogenes</i>	1	1	(100)
		<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	(0)
	Anaerobes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	6	(86)
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	1	(100)
		<i>Bacteroides fragilis</i>	10	10	(100)
		<i>B. thetaiotaomicron</i>	2	2	(100)
		<i>B. distasonis</i>	1	0	(0)
	<i>Fusobacterium</i> sp.	2	0	(0)	
	Others	11	0	(0)	
	Total	78	43	(55)	

*Tested by nitrocefin disk method.

Fig. 2. The acidimetric assay of β -lactamase in ascitic fluid.BLPB, β -lactamase producing bacteria; PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase

ともに有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

3. 臨床的検討

上記のごとく β -lactamase 活性陽性例は 41 検体 (有菌腹水 38 検体, 無菌腹水 3 検体) であり, 以下の結果を得た。

1) 発症からの時間経過と β -lactamase 活性

発症から腹水採取までの時間を, 24 時間未満, 24 時間以上 96 時間未満, 96 時間以上に分け, 腹水中 β -lactamase 活性を比較したところ, 時間が経過するにつれて PCase は減少するのに対し, CSase は 96 時間を過ぎると著しく上昇し (Fig. 3), 96 時間未満と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

2) 投与抗菌薬と β -lactamase 活性の関係

抗菌薬の全身投与を受けていない患者の腹水では, PCase は最も高値であったのに対し, CSase は最も低値であった。 β -lactam 剤以外の薬剤を投与された

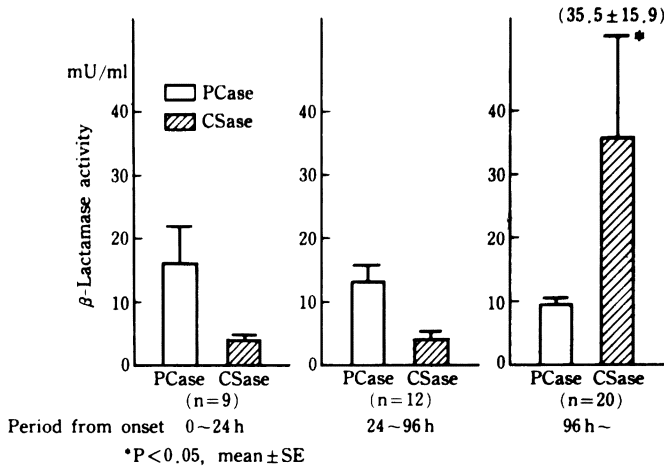


Fig. 3. Relationship between the activity of each β -lactamase and the period from onset. PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase

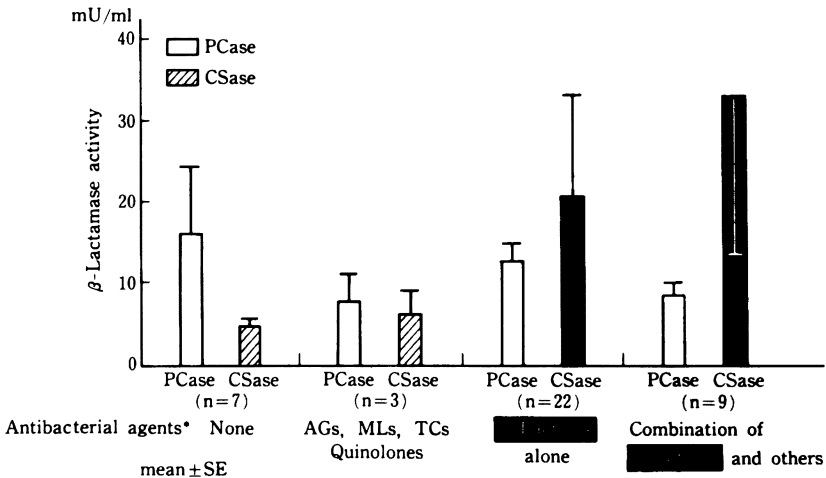


Fig. 4. Relationship between the activity of each β -lactamase and the antibacterial agents administered.

* Administered orally or intravenously before sampling

PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase; AGs, aminoglycosides; MLs, macrolides; TCs, tetracyclines

患者の腹水では PCase も CSase も比較的低値であるのに比し、 β -lactam 剤投与を受けた患者の腹水では PCase はやや低下するものの、CSase は著しく高値を示した (Fig. 4)。

3) β -lactamase 活性の経日的変化

術後経過良好例で β -lactamase 活性の経日的変化をみると、直腸癌穿孔 (症例 1) と虫垂炎穿孔性腹膜炎 (症例 2) では手術時高値を示した β -lactamase 活性は、術後 β -lactamase 産生菌の消失とともに速やかに低下し再上昇を認めなかった (Fig. 5)。

一方、難治・予後不良例の経日的変化をみると、胃癌術後の腹腔内膿瘍 (症例 3) では、ドレーン抜去後胸中の貯留と発熱をきたし、感染が示唆された。諸検査にて腹腔内膿瘍を見出し再びドレナージを施行したが、4 種の β -lactamase 産生菌とともに PCase も CSase も約 1 か月の長期にわたり検出された (Fig. 6, 左)。

小腸穿孔による汎発性腹膜炎 (症例 4) では、術中採取した腹水の CSase が 287 mU/ml と著しく高値を示したが、翌日には手術の洗浄効果によりほとんど検出されなくなった。しかし、感染の再燃による全身状態の悪化につれて、109 mU/ml, 169 mU/ml と再上昇し、術後 1 週間で死亡した (Fig. 6, 右)。

4. SBT の *in vitro* における β -lactamase 阻害効果

PCase および CSase がそれぞれ 18.5 mU/ml, 16.2 mU/ml であった腹水に SBT 濃度を 1.0 μ g/ml となるように添加した場合、PCase および CSase それぞれ 4.9 mU/ml (74%阻害), 2.0 mU/ml (88%阻害) に低下した。さらに、SBT 濃度を 10 μ g/ml とすると、 β -lactamase 活性はほとんど 100%阻害された (Fig. 7)。

III. 考 索

1) 基礎的検討について

β -lactamase は β -lactam 剤の β -lactam 環を開裂し、その抗菌力を失活させる加水分解酵素であり、その基質特異性に基づき PCase と CSase に大別され、また、その産生様式は β -lactam 剤の存在によって誘導的に産生される誘導型と、 β -lactam 剤の有無にかかわらず一定量が恒常的に産生される構成型に分類される^{11,13-16)}。

グラム陽性球菌の β -lactamase はほとんどが、PCase 型であり、染色体や細胞質因子にて産生される菌種特異的な誘導酵素である。

一方、グラム陰性桿菌の産生する β -lactamase は、大きく分けて R-plasmid によって菌種を超えて伝達

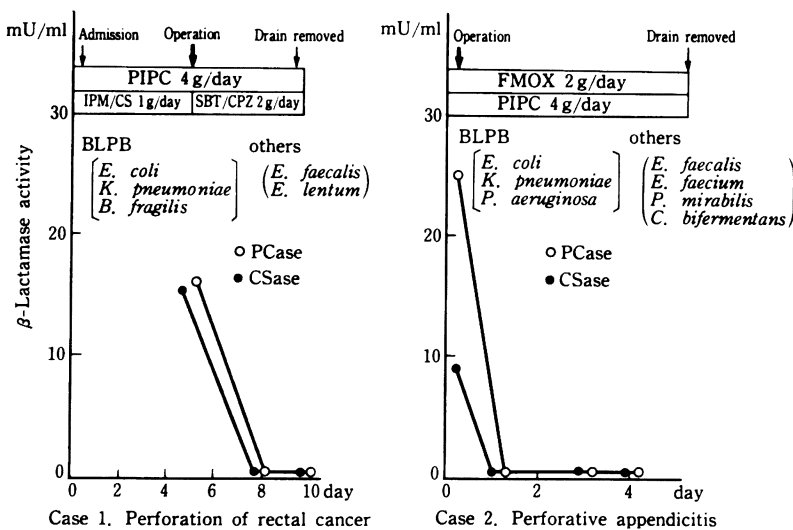
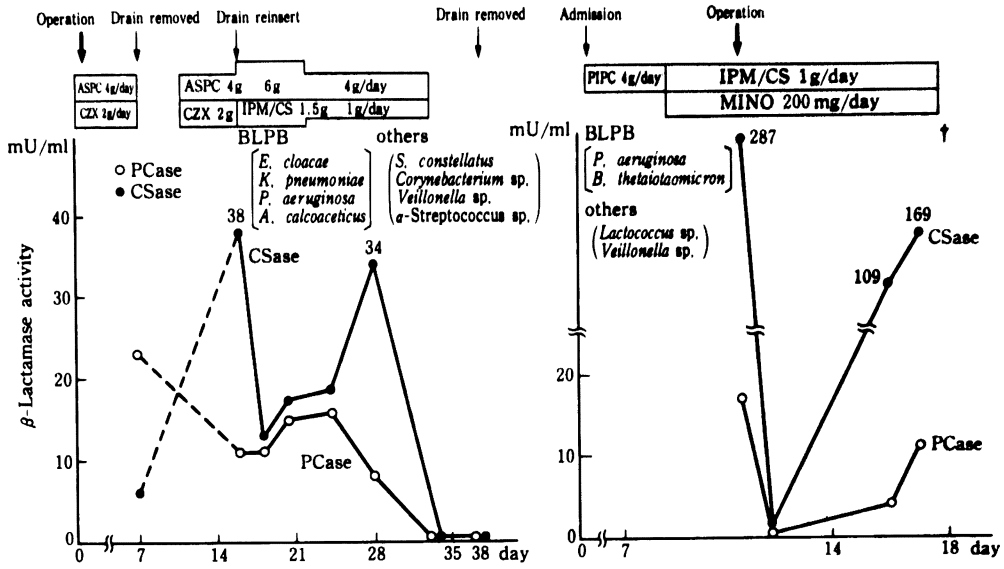


Fig. 5. Daily changes in activity of two β -lactamases in non-complicated cases.

PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase; BLPB, β -lactamase producing bacteria

Antibiotics were administered intravenously every 12 h.

All organisms were isolated from the ascitic fluid at the operation.



Case 3. Intraabdominal abscess (postoperative gastric cancer) Case 4. Panperitonitis due to perforation of the ileum

Fig. 6. Daily changes in activity of two β -lactamases in complicated cases. PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase; BLPB, β -lactamase producing bacteria. Antibiotics were administered intravenously every 8 or 12 h.

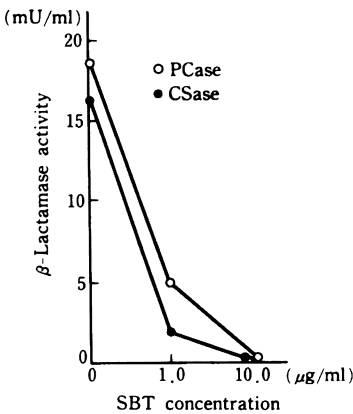


Fig. 7. Inhibition of β -lactamase activity in ascitic fluid by sulbactam (SBT). PCase, penicillinase; CSase, cephalosporinase

グラム陽性球菌の β -lactamase は菌体外放出型の酵素であるのに対し、グラム陰性桿菌の β -lactamase は菌体内、特にペリプラズム内に多く存在するとされてきた^{11,13-15}。今回の測定方法では、採取された腹水をただちに -80°C で保存したため、融解時に細菌の菌体がある程度破碎されているとも考えられ⁶、もともと腹水中にある菌体外の β -lactamase と、一部の破碎された菌体内の β -lactamase も結果的に相加して測定している。

一方、Acidimetry 法以外の β -lactamase 活性定量法としては、生物学的測定法 (bioassay)、macroiodometry、microiodometry、紫外吸収法 (UV 法) や¹¹、Enzyme Radioisotopic Assay (ERIA)⁹、High Performance Liquid Chromatography (HPLC)¹⁰ が報告されている。 β -lactamase の定性法としては、その簡便性から nitrocefin disk 法や acidimetry disk 法¹⁷⁻¹⁹ が用いられている。

UV 法や Acidimetry 法は感度が鋭敏で比較的簡便なため、臨床検体の β -lactamase 活性を定量するために多く用いられる。最近では、中浜ら⁶ が UV 法にて喀痰中 β -lactamase 活性を、また坂本¹⁰ が Acidimetry 法にて胆汁中 β -lactamase 活性を定量している。

当初、著者も中浜らの方法に準じて UV 法の応用

される構成型の PCase と、染色体遺伝子において産生される菌種特異的な構成型あるいは誘導型の CSase に分類することができる。しかし、*K. pneumoniae* や *Proteus mirabilis* のように、例外的に染色体遺伝子支配の PCase を構成的に産生する菌種も存在する^{11,13-15}。

を試みたが、腹水は200~300 nmの紫外波長域にきわめて強い吸収域をもっているため(成績未発表)、UV法で β -lactamase活性を測定することは不可能であった。

化膿性腹膜炎の腹水は腸内容や血液成分など成分が多様で緩衝能がきわめて強く、原液のままではAcidimetry法による β -lactamaseの測定は不可能であったが、20倍以上希釈することによって感度よく測定できた。特に、高い β -lactamase活性を含む腹水では反応が速すぎるため、40~80倍に希釈したほうが正確に測定できる。

添加回収試験では、標準株由来の β -lactamaseは腹水中でやや高値となり、精製された β -lactamaseはやや低値となった。これは、菌種の違いや、測定時にincubationしていなかったことなどが主な理由であろう。また、腹水を20倍に希釈して回収率を比較したが、Table 2に示したような高活性の場合は、もう少し希釈した方が正確であったかも知れない。さらに、標準株由来の β -lactamaseの粗酵素液には菌体内の他の成分が多く含まれており、これらが腹水中に共存すると β -lactamase活性に影響をおよぼすことも推察されるが、逆に腹水中では β -lactamase活性がやや抑制されるという報告もあり²⁰⁾、明らかでない。

腹水中 β -lactamaseの安定性について、*E. coli*および*K. pneumoniae*由来の β -lactamaseは-20°Cおよび-80°Cで4週間保存しても90%以上の活性が保たれる²¹⁾。荒木ら²²⁾はラットの血清、尿、pouch内浸出液および胆汁中における β -lactamaseの安定性(*in vitro*, 37°C)を検討し、胆汁以外では6日後でも90%以上の活性を認めたと報告している。さらに、胆汁の上清中では-20°C、2年間の保存にても活性が保たれたという報告もある⁸⁾。

2) 臨床的検討について

消化器外科領域の腹膜炎を中心とした感染症では、腸内細菌叢を反映してグラム陰性桿菌を起因菌とすることがほとんどであり、さらに複数菌感染がきわめて多い。詳細は省略したが、今回の腹水の細菌検査でも複数菌感染は76%にもおよび、最も多いのは*E. coli*と*B. fragilis*の組合せであり、諸家の報告とほぼ一致している²³⁻²⁵⁾。

今回の腹水からの検出菌のうち、嫌気性菌を含むグラム陰性桿菌の84%が β -lactamase産生菌であり、その頻度は胆道感染症の90%¹⁰⁾よりやや低いものの、呼吸器感染症の61.3%²⁶⁾と比較すると高率であった。これは、他の感染症と比較して、化膿性腹膜炎では下

部消化管の優勢菌である*B. fragilis*を中心とした嫌気性菌が多く検出される特徴があり、しかも消化管の*B. fragilis*の99%以上が β -lactamaseを産生する²⁷⁾ためである。

検出菌と β -lactamaseの基質特異性を比較すると、*K. pneumoniae*のみによる感染腹水ではPCaseが優位に、*Pseudomonas aeruginosa*や*Bacteroides*属による感染腹水ではCSaseが優位であり、分離菌の β -lactamase産生性とよく一致していた。

β -lactamase活性値をみると、 β -lactamase産生菌を含む腹水ではPCaseは10 mU/ml前後が多いのに対して、CSaseは高低差が顕著である。グラム陰性桿菌の多くはR-plasmidによるPCase産生量が一定であるのに対し、CSaseは染色体で構成的に少量産生される菌と、誘導的あるいは高度構成的(脱抑制型)に大量産生される菌があり、この測定値はその産生様式を反映していると考えられる。今回は菌数を正確にカウントしていないが、化膿性腹膜炎ではほとんどの菌が3(+)であった。 β -lactamase活性の高低は主に菌数や菌種に左右されると考えられるが、実験的な化膿性腹膜炎では菌数のみでなく、投与された抗菌薬にも影響されることが証明されている²⁸⁾。

β -lactamase活性が陽性であるにもかかわらず細菌陰性であった腹水が3検体あった。これらは、壊疽性虫垂炎の腹水2検体と胃癌術後(症例3)のドレーン排液1検体であった。症例3ではこの検体を採取後、測定結果を待たずにドレーンを抜去したが、その後腹腔内膿瘍のため再度ドレナージを施行し、4種の β -lactamase産生菌を検出した。細菌が検出されなかったのは、3例とも抗菌薬の全身投与を受けており、細菌の増殖が抑制されたためと考えられる。

ラットのpouch内に β -lactamaseを注入したところ、ある程度の時間 β -lactamase活性が存在することが報告されており²²⁾、菌体外に放出または遊離した β -lactamaseが蓄積されることは臨床においても十分考えられる。無菌胆汁や絞扼性イレウスの無菌腹水においても β -lactamase活性が検出されることがあり^{10,21)}、同様の機序が考えられる。

逆に、 β -lactamase活性が陰性で細菌が陽性であった8検体のうち、5検体はnitrocefin disk法で β -lactamase非産生菌のみが認められた検体であった。3検体のうち2検体はsulbactam/cefoperazoneが全身投与されており、SBTにより β -lactamaseが阻害されたためと考えられる。腹水中でもSBTによって β -lactamaseが阻害されることは今回の検討でも証明されている。残る1検体は胆汁を多量に含む検体で

凍結までに約20時間経過していたもので、胆汁中では β -lactamaseの安定性が比較的悪いことから²²⁾、失活したものと考えられる。

β -lactamase 活性陽性例では、発症から時間が経過するにつれてPCaseはやや減少、CSaseは増加し、その傾向は96時間以上で有意に高値となった。なかでも、 β -lactam 剤の全身投与を受けている症例の腹水ではCSaseが著しく上昇していた。この理由として、①菌交代が起こりCSase 高度産生株が出現あるいは選択された、②投与された抗菌薬によって菌体が破壊されCSaseが放出された、③ β -lactam 剤によってCSaseが誘導された、などが推察される。

感染初期や抗菌薬の投与を受けていない症例では、*E. coli* や *K. pneumoniae* などの検出頻度が高く、感染後時間がかなり経過していたり、抗菌薬投与後の症例では *B. fragilis*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* などのCSase 高度産生菌が検出されることが多かった。さらに、これらのCSase 産生菌は β -lactam 剤によってCSaseが誘導産生されることが実験的に知られており^{22,29-31)}、呼吸器感染症⁹⁾と同様に、化膿性腹膜炎においても誘導産生されている可能性が示唆された。

化膿性腹膜炎は急性かつ重症であり、さらに腹腔内といった閉鎖腔の複数菌感染であるため、手術や腹腔洗浄によって菌数の増減が激しく、使用される抗菌薬も多種多様である。そのため各菌種について β -lactamase 誘導の程度や、個々の β -lactam 剤の β -lactamase 誘導能は不明であり、実際の治療に際して誘導を明確に証明する余裕はない。ここで強調すべきことは、感染巣の除去ができていない時、長期にわたる盲目的な β -lactam 剤の投与は β -lactamase 産生株を中心とした耐性菌の増殖を招く可能性がきわめて強いということである。

β -lactamase 活性の経日的変化をみると、経過良好例では術後1~3日で菌の消失とともに陰性化し再上昇を認めなかった。しかし、難治性の腹腔内膿瘍や予後不良例では長期にわたり β -lactamase が検出されたり、術後再上昇を認めた。すなわち、 β -lactamase 産生菌による腹膜炎では、 β -lactamase 活性は臨床症状とある程度相関して変動した。

他方、SBTは*in vitro* 検討で腹水中でも β -lactamase 阻害効果が認められた。SBTはPCaseおよび*B. fragilis* の産生するCSaseを強く、その他のCSaseを中等度に阻害するとされている³²⁾。今回、*E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* が検出された腹水中では、SBTが1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でPCaseもCSaseも70%以上

の阻害効果が認められた。さらに、SBTの濃度が10 $\mu\text{g/ml}$ ではPCaseもCSaseも100%阻害されたことから、*in vivo* でもSBTが腹水に十分移行すればその効果を発揮できるはずである。SBTの腹腔浸出液への移行は1~3 $\mu\text{g/ml}$ とされ²⁹⁾、感染巣への移行はより良好であるため^{29,34)}、化膿性腹膜炎でも、実際の臨床使用量でその効果を十分に果たしていると考えられる。

以上より、化膿性腹膜炎において β -lactamase 産生菌が起因菌となった場合、治療の遅れや盲目的な抗菌薬の投与は、病原菌の薬剤耐性を招く可能性が示唆され、さらに、 β -lactamase 活性を経日的に測定することにより、術後経過の予測、使用すべき抗菌薬の種類や投与方法の適正化、ドレナージ継続の適否などに関する情報を得ることができるといえる。

本研究の要旨は、第38回日本化学療法学会西日本支部総会(1990)、第3回日本外科感染症研究会(1990)、第39回日本化学療法学会総会(1991)にて発表した。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始ご指導とご校閲を賜った和歌山県立医科大学消化器外科教授谷村 弘先生ならびに、検体の採取にご協力戴いた教室関連施設の先生方に深く感謝するとともに、本研究に技術的なご協力を戴いた徳川佐奈美氏、川崎賢二博士、小川正俊博士をはじめとするファイザー製薬新薬開発センターの皆様心から謝意を表します。

文 献

- 1) 谷村 弘: 今日の化学療法剤の使い方。一ペニシリン系・セフェム系注射薬。外科診療 32: 610~616, 1990
- 2) 谷村 弘, 吉田圭介, 斎藤 徹, 小澤和恵: 嫌気性菌感染症。消外セミナー 24: 259~276, 1987
- 3) 谷村 弘: Empiric therapy. 4. 外科系感染症。Medicament News 1247: 10~11, 1989
- 4) Maddocks J L, May J R: "Indirect pathogenicity" of penicillinase-producing enterobacteria in chronic bronchial infections. Lancet 1: 793~795, 1969
- 5) Brook I: Presence of beta-lactamase-producing bacteria and beta-lactamase activity in abscesses. Am J Clin Pathol 86: 97~101, 1986
- 6) 中浜 力, 黒川幸徳, 上田 智, 副島林造, 山田真理恵, 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇: 喀痰中誘導型 β -lactamaseの測定—特に緑膿菌感染症における臨床的検討。感染症誌 63: 400~409, 1989
- 7) 千葉潤一, 加藤美和, 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 本宮雅吉: 喀痰内の β -lactamase活性に関する研究(1),

- 喀痰分離株および喀痰内の β -lactamase 活性の相関と間接的病原性の意義。Chemotherapy 37: 1031~1039, 1989
- 8) Bryant R E, Rashad A L, Mazza J A, Hammond D: β -Lactamase activity in human pus. J Infect Dis 142: 594~601, 1980
- 9) Yolken R H, Hughes W T: Rapid diagnosis of infections caused by β -lactamase-producing bacteria by means of an enzyme radioisotopic assay. J Pediatr 97: 715~720, 1980
- 10) 坂本幸具: 胆道感染症における胆汁中 β -lactamase 活性測定の臨床的意義。和歌山医 42: 27~38, 1991
- 11) 横田 健: β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。Mod Media 24: 360~377, 1978
- 12) Rubin F A, Smith D H: Characterization of R factor β -lactamases by the acidimetric method. Antimicrob Agents Chemother 3: 68~73, 1973
- 13) 井上松久: β -ラクタマーゼ。代謝 23: 801~811, 1986
- 14) 三橋 進, 井上松久: 薬剤耐性機構の生化学。三橋進編, 学会出版センター, 東京, 1981, p 131~164
- 15) 山岸三郎, 沢井哲夫: グラム陰性菌の β -lactamase について。日細菌誌 30: 615~629, 1975
- 16) Kodoh S, Nakamura H: Facile measurement of β -lactamase activity by high performance liquid chromatography with postcolumn enzymatic reaction. Anal Sci 4: 111~113, 1988
- 17) 小川正俊, 武藤弓子, 吉田 勇, 宮崎修一, 五島澁智子: 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
- 18) 五島澁智子, 小川正俊, 武藤弓子, 達 彦二: β -lactamase の産生機序と証明法。Med Technol 10: 317~324, 1982
- 19) 横田 健: 臨床分離菌の β -lactamase 産生率と各種薬剤に対する感受性の検討。Chemotherapy 39: 941~952, 1991
- 20) Letendre E D, Turgeon P L: Production and induction of beta-lactamase during growth of *Pseudomonas aeruginosa* in biological fluids. Antimicrob Agents Chemother 33: 776~777, 1989
- 21) 道浦 準, 谷村 弘, 坂本幸具, 佐々木政一, 石本喜和男, 谷口勝俊, 内山和久, 寺下史朗, 児玉悦男, 小林康人, 一宮源太, 徳川佐奈美, 松永敏幸, 小川正俊, 川崎賢二: 腹水中 β -lactamase 活性の測定法。日本外科感染症研究, 第3巻, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1991, p 300~305
- 22) 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川勇: *Enterobacter cloacae* の菌体外 β -lactamase とその安定性。Chemotherapy 36: 725~730, 1988
- 23) 谷村 弘, 日笠頼則, 小林展章, 加藤仁司, 関谷 司, 佐藤友信, 斉藤 徹, 吉田圭介, 黄 文芳, 端野博康, 中村正則, 出口浩一: 化膿性腹膜炎に対する Cefotetan と Cefmetazole の二重盲検法による比較試験。Jpn J Antibiot 36: 369~390, 1983
- 24) 谷村 弘, 小林展章, 関谷 司, 向原純雄, 瀬戸山元一, 日笠頼則, 片岡三朗, 佐藤友信, 伊豆蔵健, 藤井一寿, 安本 裕, 薄井裕治, 村山保雄: 腹膜炎の化学療法 (II), とくに Ceftizoxime による臨床効果について。Chemotherapy 28 (S-5): 533~541, 1980
- 25) Brook I: A 12 year study of aerobic and anaerobic bacteria in intraabdominal and postsurgical abdominal wound infections. Surg Gynecol Obstet 169: 387~392, 1989
- 26) 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 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: 563~577, 1989
- 27) 上野一恵: 最近の臨床分離嫌気性菌と薬剤感受性。Prog Med 9: 2797~2802, 1989
- 28) 道浦 準, 谷村 弘, 坂本幸具: 実験的腹腔内感染症における腹水中 β -lactamase の測定, 腹水中生菌数および薬剤濃度との比較検討。Chemotherapy 39: 1110~1118, 1991
- 29) Livermore D M: Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol 6: 439~445, 1987
- 30) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsunashi S: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 382~385, 1980
- 31) 小林寅詰, 池田文昭, 西田 実, 五島澁智子, 手塚孝一, 草野朱美, 森 節子, 佐藤弓枝, 高橋かおる: 臨床分離 *Pseudomonas* 属の β -lactamase 誘導について, 菌種間の特性と安定な耐性株について。Chemotherapy 35: 71~76, 1987
- 32) 五島澁智子, 小川正俊, 金子康子, 辻 明良, 宮崎修一, 桑原章吾: β -Lactamase inhibitor である Sulbactam と Cefoperazone の併用による *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 32 (S-4): 38~50, 1984
- 33) 菊山成博, 相川直樹, 鈴木文雄, 石引久弥: Sulbactam-Ampicillin の腹腔内浸出液移行と外科患者の感染症に対する臨床的検討。Chemotherapy 36 (S-8): 317~323, 1988
- 34) Foulds G: Pharmacokinetics of Sulbactam/Ampicillin in humans, A review. Rev Infect Dis 8 (S-5): 503~511, 1986

BASIC AND CLINICAL STUDIES OF β -LACTAMASE ACTIVITY
IN ASCITIC FLUID OF PATIENTS WITH ACUTE
SUPPURATIVE PERITONITIS

Jun Michiura

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College

(Director: Prof. Hiroshi Tanimura),

27 Shichi Bancho, Wakayama 640, Japan

A new method for quantitative determination of β -lactamase activity in ascitic fluid was established by using acidimetry, and β -lactamase activity was measured in 42 patients with intraabdominal surgical infections, which consisted mainly of acute suppurative peritonitis.

- 1) Both penicillinase (PCase) and cephalosporinase (CSase) activities were significantly higher in ascitic fluid containing β -lactamase-producing bacteria (BLPB) than in fluid without BLPB.
- 2) CSase activity was significantly increased in ascitic fluid when the period from onset was over 96 hours.
- 3) CSase activity was high in patients who had received β -lactams.
- 4) β -Lactamase activity varied correlatively with clinical condition and therapeutic efficacy.
- 5) β -Lactamase activity was inhibited in ascitic fluid *in vitro* by addition of sulbactam, a β -lactamase inhibitor.