

誘導型 β -lactamase 産生菌共存時における cephem 系薬剤の 大腸菌に対する殺菌効果について

荒木 春美・大懸 直子・南 新三郎

保田 隆・渡辺 泰雄

富山化学工業株式会社総合研究所*

(平成5年1月13日受付・平成5年4月27日受理)

誘導型 β -lactamase 産生菌 (*Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, *Morganella morganii* T-211, *Providencia rettgeri* GN 4430, *Serratia marcescens* W-24) 共存時の *Escherichia coli* TK-16 R (β -lactamase 非産生菌) に対する cephem 系薬剤 [cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX), cefoperazone (CPZ)] の殺菌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討し、以下の結果を得た。

1) CEZ および CTM の *E. coli* に対する *in vitro* 殺菌効果は、すべての混合系において著しく低下した。CMZ では、*P. vulgaris* を除く4種の誘導型 β -lactamase 産生菌との混合系で、*E. coli* に対する殺菌効果の低下が認められた。CTX では、前記3剤に比べ影響は少なかったが、*S. marcescens* 以外の混合系で *E. coli* の明らかな再増殖が認められた。CPZ では、誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響がもっとも少なく再増殖がみられなかった。

2) *E. coli* と *E. cloacae* のラット pouch 内混合感染実験において、CMZ の *E. coli* に対する殺菌効果は単独感染時に比べ低下したが、CPZ では単独感染と混合感染で差がみられず殺菌的に作用した。

3) β -Lactamase 誘導能は、CMZ がもっとも高く、次いで CTX, CTM, CEZ であり、CPZ がもっとも低い成績であった。

4) 各 β -lactamase 産生菌由来の酵素に対する cephem 剤の V_{max} および K_m or K_i 値は、CEZ, CTM > CPZ > CMZ, CTX の順に高値を示す傾向が認められた。しかし、 V_{max}/K_m or K_i 値は、 V_{max} 値に比べ薬剤間の差が小さく類似していた。

5) *In vitro*, *in vivo* で認められた *E. coli* に対する cephem 剤の殺菌性低下は、薬剤の β -lactamase 誘導能および β -lactamase に対する安定性 (V_{max} および V_{max}/K_m or K_i 値) の両因子に深く関わっているものと考えられた。

Key words: 誘導型 β -lactamase, 混合培養, 混合感染, cephem 剤, 大腸菌

喀痰などの臨床材料や感染部位から複数の菌が分離されることが多く、その中に β -lactamase 産生菌が起因菌あるいは常在菌として共存する時は、 β -lactamase が間接的に他の起因菌を β -lactam 剤から保護して病原性を増強させることに注意が必要である¹⁻⁷⁾。これは、主として β -lactamase 産生菌の β -lactamase によって β -lactam 剤が加水分解され、感染部位の薬剤濃度が低下することにもとづくとされている⁸⁻¹²⁾。しかし、 β -lactamase 産生菌は多種にわたっており、 β -lactamase の性状および産生様式や産生レベル等はさまざまであることから、それらの与える影響についても相違があるものと考えられる。この影響

については、誘導型 β -lactamase 産生菌ではいまだ十分な解析がなされていない。

これまで我々は、 β -lactamase に安定と言われる cephamycin 系薬剤でさえも誘導産生された β -lactamase によって加水分解されることを報告しており^{13,14)}、誘導型 β -lactamase 産生菌が共存する複数菌感染において、このような β -lactam 剤の加水分解が治療に影響をおよぼすことが考えられた。そこで今回、 β -lactamase 非産生性の大腸菌 (*Escherichia coli* TK-16 R) に対する cephem 剤の殺菌性におよぼす誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響を、薬剤の β -lactamase 誘導能や β -lactamase に対する

* 富山県富山市下奥井2-4-1

安定性 (V_{max} および V_{max}/K_m or K_i 値) の観点から *in vitro* および *in vivo* の実験モデルを用いて調べた。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

β -Lactamase 誘導能および β -lactamase に対する安定性の異なる cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefmetazole (CMZ, 三共), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), cefoperazone (CPZ, 富山化学工業) を用いた。また, β -lactamase 活性の測定には cephaloridine (CER, 塩野義製薬), K_i 値の測定には cephalothin (CET, 塩野義製薬) を基質として用いた。さらに, 菌の選択培地の調製に ampicillin (ABPC, 東洋醸造) および rifampicin (RFP, 第一製薬) を使用した。

2. 使用菌株

β -Lactamase 剤感受性の β -lactamase 非産生菌として, *E. coli* TK-16 R¹¹⁾ を用いた。本菌株は, 臨床分離株である *E. coli* TK-16 からニトロソグアニジン処理 (100 μ g/ml, 30分, 30°C) して得た RFP 耐性 (MIC > 200 μ g/ml) 変異株である。また, 誘導型 β -lactamase 産生菌として, 当研究所保存の臨床分離株の中から腸内細菌の *Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, *Providencia rettgeri* GN 4430, *Morganella morganii* T-211 および *Serratia marcescens* W-24 を使用した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC の測定は, Broth dilution 法で行った。すなわち, Nutrient broth (NB, pH 7.0, 栄研) で作製した薬液の 2 倍希釈系列に, 各菌株の一夜培養液 (NB 中, 37°C) を最終菌量が約 1×10^7 cells/ml となるように加えて 37°C で 18 時間培養後, 肉眼で菌の発育を認めない最小濃度を MIC とした。

4. 混合培養時の殺菌作用

E. coli TK-16 R と β -lactamase 産生菌 (*E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178, *P. rettgeri* GN 4430, *M. morganii* T-211, *S. marcescens* W-24) の NB 中一夜培養液をそれぞれ約 2×10^8 cells/ml になるように NB で希釈混合後, 37°C で振盪培養した。2 時間培養後, 測定した *E. coli* TK-16 R に対する MIC と等しい濃度 (CEZ: 3.13 μ g/ml, CTM: 1.56 μ g/ml, CMZ: 3.13 μ g/ml, CTX: 1.56 μ g/ml, CPZ: 0.39 μ g/ml) になるように薬剤を加え, 経時的に生菌数を測定した。*E. coli* TK-16 R の分離には RFP (100 μ g/ml) を含む Heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板を, β -lactamase 産生菌の分離には ABPC (50 μ g/

ml) を含む HIA 平板を用いた。なお, 対照として各菌の単独培養時の生菌数についても同様に測定した。

5. 浸出性無菌炎症 pouch の作成

Selye の方法¹²⁾ に準じた。すなわち, wistar 系雄性ラット (体重 130~150 g) の背部皮下に 25 ml の空気を注入後, これに 1% クロトン油を含有する綿実油 1 ml を注入し, 翌日空気を抜き無菌的浸出性炎症を惹起させた。Pouch 作成から 15 日目のラット (体重 200~250 g) を実験に用いた。

6. ラット pouch 内感染実験

E. coli TK-16 R および *E. cloacae* H-27 を HIA 平板に 37°C, 18~20 時間培養後, 生理食塩水にそれぞれの菌を懸濁し, この懸濁液各々 1 容を 20% gastric mucin (半井化学薬品) 8 容に加え, それぞれ約 5×10^8 および 1×10^8 cells/ml となるように調整し, その 3 ml をラット pouch 内に接種した。なお, 単独感染の場合には, 感染菌 1 容と生理食塩水 1 容を 20% gastric mucin 8 容に加えた。菌接種の 2 時間後に CPZ あるいは CMZ の 100 mg/kg を i.v. 投与した後, 2 時間間隔で pouch 内浸出液を採取し, ただちに生理食塩水で 10 倍に希釈した。この 10 倍希釈系列を生理食塩水で作製し, 薬剤含有平板に 0.05 ml ずつを塗布した後, 一夜培養後に生じたコロニー数から pouch 内生菌数を算出した。なお, 結果は 1 群 6 匹の平均値で示した。

7. β -Lactamase 誘導能

既報¹⁶⁾ に従って, 各薬剤を *E. coli* TK-16 R に対する MIC と等しい濃度になるように添加し, 2 時間培養後の菌体中 β -lactamase 活性を測定した。すなわち, 各菌株の Brain heart infusion broth (BHIB, pH 7.4, 栄研) 中一夜培養液を新鮮な BHIB で 10 倍希釈し, 37°C で 2 時間振盪培養後に各薬剤を添加し, さらに 2 時間振盪培養した。次に, 遠心分離 (4°C, 1,000 \times g, 30分) により集菌し, 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) で 2 回洗浄後, 適量の同 PB (pH 7.0) に懸濁し, Ultrasonicator (Tomy-Seiko) により氷冷下で超音波破碎した。この破碎液を遠心分離 (4°C, 10,000 \times g, 30分) した上清を粗酵素液とし, 粗酵素液中の β -lactamase 活性と蛋白濃度を測定した。 β -Lactamase 活性は CER (100 μ M) を基質とする UV 法¹⁷⁾ によって測定し, 蛋白濃度は Bovine serum albumin を標準品として Lowry 法¹⁸⁾ で測定した。

8. β -Lactamase の部分精製

BHIB 中一夜培養した被検菌株を新鮮な BHIB で 10 倍に希釈し, 37°C で 2 時間振盪培養を行った。こ

れに、誘導剤として CMZ を最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ となるように加え、さらに 2 時間振盪培養を行った。次に、前述のごとく、集菌洗浄後に超音波破碎して粗酵素液を調製し、既報¹⁹⁾に従って CM-Sephadex カラム (C-50) を用いて部分精製酵素を得た。

9. β -Lactamase 活性の測定

β -Lactamase 活性は UV 法¹⁷⁾ を用いて測定した。活性は unit で表し、1 unit は $0.05 \text{ M PB (pH 7.0)}$ 中、 30°C で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を分解するのに必要な酵素量とした。 V_{max} 値および K_m or K_i 値の測定には部分精製酵素を用い、 $200 \mu\text{M}$ から $6.25 \mu\text{M}$ の範囲内で基質濃度を変化させて加水分解速度を測定し、Lineweaver-Burk の式から求めた。ただし、 V_{max} 値の測定が困難な基質の場合には、基質濃度 $100 \mu\text{M}$ における加水分解速度を近似的な V_{max} 値とした。

II. 実験結果

1. 使用菌株の薬剤感受性

E. coli TK-16 R と誘導型 β -lactamase 産生菌 5 株に対する cephem 系薬剤の MIC を、Table 1 に示した。*E. coli* TK-16 R は各 cephem 剤に対して感受性であり、MIC は $0.39 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ であった。一方、誘導型 β -lactamase 産生菌はこれら cephem 剤に対していずれも耐性 (MIC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$) を示し、特に CEZ, CTM および CMZ に対してはいずれの株も高度耐性を示した。

2. 混合培養時の殺菌作用

E. coli TK-16 R と誘導型 β -lactamase 産生株との混合培養系で *E. coli* TK-16 R に対する MIC と同じ濃度となるように薬剤を添加した時の *E. coli* の生菌数変化を調べた (Fig. 1 A~E)。

E. coli TK-16 R 単独培養系に薬剤を添加した場合にはいずれの薬剤も殺菌的に作用し生菌数が漸減した

が、*E. coli* TK-16 R と誘導型 β -lactamase 産生株との混合培養系では、*E. coli* に対する CEZ, CTM, CMZ, CTX の殺菌力が低下する現象が認められた。すなわち、CEZ あるいは CTM 添加時には、すべての誘導型 β -lactamase 産生株との混合系で単独系に比べ著しい殺菌性の低下が認められた (Fig. 1 A, B)。CMZ 添加時には、*E. cloacae* H-27 との混合系でもっとも著しい殺菌性低下が認められ、*M. morgani* T-211, *S. marcescens* W-24 および *P. rettgeri* GN 4430 との混合系では一時的に生菌数低下がみられたものの薬剤添加 2~4 時間後から再増殖が認められた (Fig. 1 C)。CTX では、前記 3 剤に比べ影響は少なかったが、*S. marcescens* W-24 以外の *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178, *M. morgani* T-211 および *P. rettgeri* GN 4430 との混合系において、薬剤添加 4~6 時間後から明らかな再増殖が認められた (Fig. 1 D)。しかしながら CPZ では、単独系とほぼ同様に混合系においても殺菌的に作用し、いずれの混合系でも明らかな再増殖を示さなかった (Fig. 1 E)。

なお、データは示さなかったが、薬剤無添加時の各誘導型 β -lactamase 産生菌共存下での *E. coli* TK-16 R の増殖は単独培養系と変わらなかった。また、各誘導型 β -lactamase 産生菌の生菌数は薬剤作用時 (0 時間) にはいずれも約 1×10^7 cells/ml, 8 時間後にはいずれも約 1×10^9 cells/ml であり、各誘導型 β -lactamase 産生菌の増殖は、*E. coli* TK-16 R の共存および薬剤添加によって影響を受けなかった。

3. ラット pouch 内における殺菌作用

In vitro 混合培養において *E. cloacae* 共存の影響が顕著に認められた CMZ と認められなかった CPZ を選び、ラット pouch 内に *E. coli* TK-16 R と *E. cloacae* H-27 を単独感染または混合感染させ、2 時間後に CMZ あるいは CPZ を投与した時の pouch 内生菌

Table 1. Antibacterial activity of cephems against *Escherichia coli* TK-16 R and strains possessing inducible β -lactamases

Cepheims	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)} against following strains					
	<i>E. coli</i> TK-16 R	<i>E. cloacae</i> H-27	<i>P. vulgaris</i> T-178	<i>M. morgani</i> T-211	<i>P. rettgeri</i> GN 4430	<i>S. marcescens</i> W-24
Cefazolin	3.13	>100	>100	>100	>100	>100
Cefotiam	1.56	>100	>100	>100	>100	>100
Cefmetazole	3.13	>100	100	>100	>100	>100
Cefotaxime	1.56	>100	50	25	50	50
Cefoperazone	0.39	25	25	25	25	25

^{a)} MICs were determined by broth dilution method at 1×10^7 cells/ml.

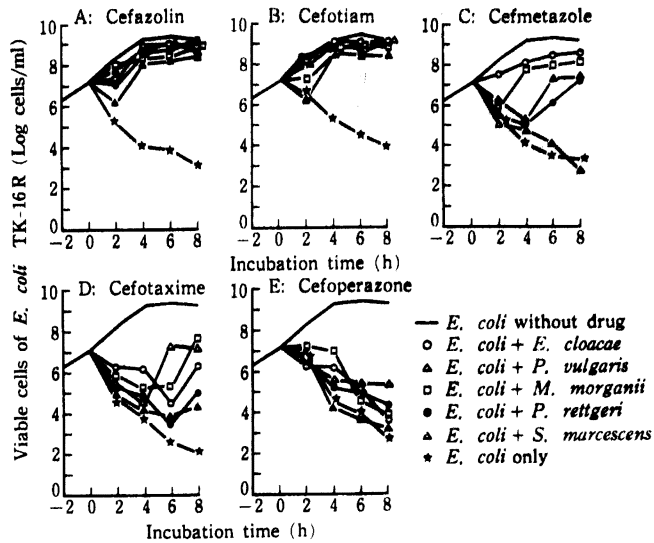


Fig. 1. Bactericidal activities of cephems against *Escherichia coli* TK-16 R in mixed cultures with strains possessing inducible β -lactamases.

Each drug (A: cefazolin, B: cefotiam, C: cefmetazole, D: cefotaxime, E: cefoperazone) was added to pure (\star : *E. coli* TK-16 R only) or mixed cultures of *E. coli* TK-16 R and each strain possessing an inducible β -lactamase (O: *E. cloacae* H-27, Δ : *P. vulgaris* T-178, \square : *M. morgani* T-211, \bullet : *P. rettgeri* GN 3440, \blacktriangle : *S. marcescens* W-24), to give an MIC against *E. coli* TK-16 R (A: $3.13 \mu\text{g/ml}$, B: $1.56 \mu\text{g/ml}$, C: $3.13 \mu\text{g/ml}$, D: $1.56 \mu\text{g/ml}$, E: $0.39 \mu\text{g/ml}$).

数変化を調べた (Fig. 2)。

CMZ 投与群では、*E. coli* 単独感染時には殺菌的に作用し生菌数の減少がみられたが、*E. cloacae* との混合感染時には生菌数の減少がみられなかった (Fig. 2 A)。*E. cloacae* に対しては CMZ は単独感染と混合感染のいずれにおいても殺菌的に作用しなかった (Fig. 2 B)。一方、CPZ 投与群では、*E. coli* と *E. cloacae* の生菌数は、単独感染と混合感染のいずれにおいても漸減した。なお、control 群は、両菌共、単独感染と混合感染でほぼ同様な増殖を示した。

4. β -Lactamase 誘導能

誘導型 β -lactamase 産生菌の培養液に、*E. coli* TK-16 R に対する MIC に等しい濃度となるように各薬剤を添加し、2 時間培養後、菌体中に誘導された β -lactamase 活性を測定した (Table 2)。

薬剤無添加時の β -lactamase 活性はいずれの株も

低く、 $0.01 \sim 0.02$ unit/mg of protein であった。CMZ 添加時には、いずれの株においても他剤に比べ大きな β -lactamase 活性の上昇がみられ、薬剤無添加時に比べて活性が 46~152 倍に上昇した。次いで、CTX を添加した時に活性の上昇が大きく (薬剤無添加時の 2~48 倍)、CTM および CEZ 添加時にも活性の上昇傾向 (1~22 倍) が認められた。CPZ では、いずれの株においても薬剤無添加時の活性とほとんど変わらなかった。なお、*E. coli* TK-16 R では薬剤無添加および添加時のいずれにおいても β -lactamase 活性は < 0.001 unit/mg of protein であった。

5. Cephem 剤の β -lactamase に対する安定性および親和性

各 β -lactamase 産生株から得た部分精製酵素を用い、cephem 剤の V_{\max} 値および K_m or K_i 値を求めた (Tables 3, 4)。

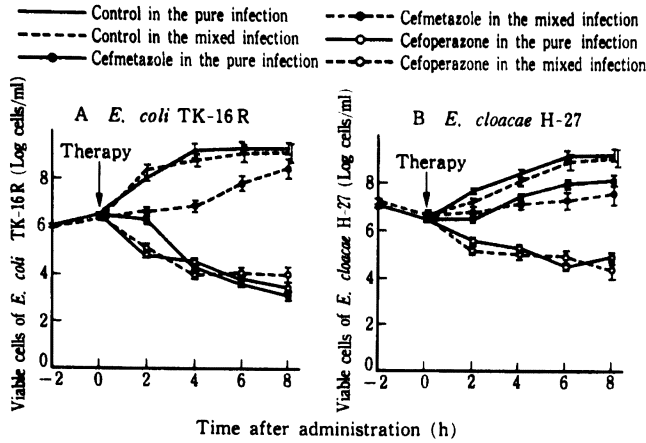


Fig. 2. Bactericidal activities of cefoperazone and cefmetazole against *Escherichia coli* TK-16 R and *Enterobacter cloacae* H-27 in rat pouches.

Cefmetazole or cefoperazone was intravenously administered to rats in a dose of 100 mg/kg at 2 h postinfection. The data for *E. coli* TK-16 R are shown in Fig. 2 A and for *E. cloacae* H-27 in Fig. 2 B. Each point with a bar shows the mean \pm SE for six animals.

Table 2. Inducer activity of cepheids for β -lactamase production

Cepheids	β -Lactamase activity (U/mg of protein) of cells from following strains				
	<i>E. cloacae</i> H-27	<i>P. vulgaris</i> T-178	<i>M. morgani</i> T-211	<i>P. rettgeri</i> GN 4430	<i>S. marcescens</i> W-24
Without drug	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
Cefazolin	0.02	0.15	0.14	0.22	0.06
Cefotiam	0.06	0.14	0.01	0.13	0.06
Cefmetazole	1.06	0.67	0.46	0.59	1.52
Cefotaxime	0.05	0.43	0.02	0.48	0.03
Cefoperazone	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01

The β -lactamase activity (unit/mg of protein) of the sonic extract from cells incubated with cepheids was determined by a spectrophotometric method using cephaloridine (100 μ M) as a substrate. Each cepheid was added to give an MIC against *E. coli* TK-16 R (cefazolin: 3.13 μ g/ml, cefotiam: 1.56 μ g/ml, cefmetazole: 3.13 μ g/ml, cefotaxime: 1.56 μ g/ml, cefoperazone: 0.39 μ g/ml).

各酵素に対する cephem 剤の V_{max} 値は, *P. vulgaris* T-178 由来 β -lactamase を除き, 類似したパターン (CEZ>CTM>CPZ>CTX, CMZ) を示した。しかし, *P. vulgaris* T-178 由来酵素に対しては, 他の酵素に安定な CTX の V_{max} 値が CTM に次いで大きく, 次に CEZ>CPZ>CMZ の順であった。

また, 各酵素に対する親和性 (Km or Ki 値) につ

いては, いずれの場合も CMZ, CTX>CPZ>CEZ, CTM の順に高い値 (小さな Km or Ki 値) を示す傾向がみられた。しかし, *P. vulgaris* T-178 および *P. rettgeri* GN 4430 由来酵素ではパターンが若干異なっており, 特に CTX が CTM あるいは CEZ に次いで大きな Km 値を示し, 他の酵素の場合に比べ CTX の親和性が低かった。

Table 3. V_{max} values of cepheids for β -lactamases

Cepheids	Relative V_{max} (%) of cepheids for β -lactamases from following strains				
	<i>E. cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>S. marcescens</i>
	H-27	T-178	T-211	GN 4430	W-24
Cefazolin	100	33	18	99	189
Cefotiam	5.3	235	13	3.0	18
Cefmetazole	0.04*	<0.01*	0.07*	0.06*	0.03*
Cefotaxime	0.05*	61	0.3*	0.5	0.2
Cefoperazone	0.3	6.6	0.7	1.0	2.4

The hydrolysis rates of cepheids were determined by a spectrophotometric method. V_{max} was calculated from Lineweaver-Burk plots and expressed as the percentage of cephaloridine hydrolysis.

* The rates were obtained at a substrate concentration of 100 μ M.

Table 4. Affinity of cepheids for β -lactamases

Cepheids	Km (μ M) or Ki (μ M) for β -lactamases from following strains									
	<i>E. cloacae</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>M. morgani</i>		<i>P. rettgeri</i>		<i>S. marcescens</i>	
	H-27		T-178		T-211		GN 4430		W-24	
	Km	Ki	Km	Ki	Km	Ki	Km	Ki	Km	Ki
Cefazolin	450	—*	130	—	159	—	940	—	318	—
Cefotiam	11	—	268	—	23	—	13	—	98	—
Cefmetazole	—	0.06	—	34	—	0.40	—	5.8	—	0.97
Cefotaxime	—	0.07	186	—	—	0.04	138	—	6.1	—
Cefoperazone	6.0	—	13	—	7.0	—	25	—	18	—

* Not tested.

Table 5. V_{max}/Km or Ki values of cepheids for β -lactamases

Cepheids	Relative V_{max}/Km or Ki of cepheids for β -lactamases from following strains				
	<i>E. cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>S. marcescens</i>
	H-27	T-178	T-211	GN 4430	W-24
Cefazolin	0.22	0.25	0.11	0.11	0.59
Cefotiam	0.48	0.88	0.57	0.23	0.18
Cefmetazole	0.67	<0.0003	0.18	0.01	0.03
Cefotaxime	0.71	0.33	7.5	0.004	0.03
Cefoperazone	0.05	0.51	0.10	0.04	0.13

ペリプラスム内のように薬剤が低濃度で酵素過剰となる条件下では、 β -lactamase に対する安定性は V_{max} 値よりも V_{max}/Km or Ki 値に相関することが知られており^{20,21)}、 V_{max}/Km or Ki 値が小さいほどペリプラスム内では安定であると考えられる。そこで、その値を算出し、Table 5 に示した。 V_{max}/Km or Ki 値は、 V_{max} 値に比べ薬剤間の差は小さく類似した値

を示した。しかし、*P. rettgeri* GN 4430 由来酵素では CTX が、*P. vulgaris* T-178 由来酵素では CMZ が他剤に比べ低値を示し、*M. morgani* T-211 由来酵素では CTX が高値を示した。

III. 考 察

複数菌感染例において、感染巣内に β -lactamase 非産生の病原菌と β -lactamase 産生菌が共存した場

合に、“indirect pathogenicity” (間接的病原性) の概念から、本来病原菌に対して投与された β -lactam 剤が不活化されることが考えられる^{6,8-12)}。これに関連して我々は、菌体外に漏出した誘導型 β -lactamase が感染巣内に残存し、治療に影響をおよぼす可能性があることを報告している²²⁻²⁴⁾。特に誘導型 β -lactamase 産生菌共存による影響を考える場合には、薬剤の β -lactamase 誘導能や β -lactamase に対する安定性という因子が重要であるものと思われる。ところで一般に、グラム陰性菌のペリプラスム内における薬剤濃度は低値であるが β -lactamase は高密度に存在するため、 β -lactam 剤では V_{max} 値 (最大加水分解速度) よりも V_{max}/Km or Ki 値がペリプラスム内における安定性を反映すると言われている^{20,21)}。そこで今回、共存する誘導型 β -lactamase 産出菌の種類により非産生菌 (*E. coli*) に対する cephem 剤の殺菌性がどのように影響を受けるかについて、薬剤の β -lactamase 誘導能や β -lactamase に対する安定性 (V_{max} および V_{max}/Km or Ki 値) の観点から検討した。

今回用いた cephem 剤は、誘導型 β -lactamase 産生菌に対する抗菌力に差があるため、その抗菌力の違いによって *E. coli* に対する殺菌効果の比較が困難になることが予想された。そこで我々は、接種菌量を高菌量に設定することにより、混合培養における誘導型 β -lactamase 産生菌の増殖が薬剤の添加や *E. coli* の共存によって影響を受けないような実験系で検討を行った。この菌量での誘導型 β -lactamase 産生菌に対する各 cephem 剤の MIC は、*E. coli* に対する値に比べ 16 倍以上大きく、*E. coli* に対する MIC に等しい濃度の薬剤を添加しても各誘導型 β -lactamase 産生菌の増殖は影響を受けなかった。また、各薬剤の作用濃度が MIC よりも高すぎる場合あるいは低すぎる場合には、殺菌力が強すぎる、あるいは、弱すぎるにより、*E. coli* に対する殺菌力におよぼす誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響が明確に認められず結果の解析も困難になることが予想された。そのため、各薬剤の作用濃度は *E. coli* に対する MIC とし、この濃度で *E. coli* に対する殺菌力におよぼす誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響を調べた。

CEZ と CTM では、すべての誘導型 β -lactamase 産生菌との混合培養系において *E. coli* に対する殺菌性が著しく低下した。これは、両剤の誘導酵素活性が薬剤無添加時の 1~22 倍の中等度の上昇を示したこと、および、両剤の V_{max}/Km 値は 0.11~0.88 の範囲の値であったものの V_{max} 値が他剤に比べ大きいこ

とによるものと考えられた。CEZ と CTM の殺菌性低下の程度が V_{max}/Km 値よりも V_{max} 値と良く相関した一因としては、我々が報告したような菌体外に漏出した酵素²²⁻²⁴⁾ の関与が考えられる。たとえば、*E. cloacae* 由来酵素の場合、今回用いた薬剤の V_{max} 値および Km or Ki 値から計算した加水分解速度は、 $0.1 \mu M$ 以下の低い濃度では V_{max}/Km or Ki 値とほぼ相関しており薬剤間で大きな差がみられないが、今回の添加濃度では CEZ と CTM は CMZ, CTX および CPZ に比べ 21~54 倍大きくなる (データ未発表)。したがって、CEZ や CTM のような V_{max} 値が大きい薬剤の場合には、菌体外に漏出した β -lactamase が少量であっても、これによる加水分解が無視できないものと思われる。

CMZ では、*E. cloacae* 共存時に *E. coli* に対する殺菌性低下がもっとも著しく、次いで *M. morgani* 共存時であり、*P. rettgeri* や *S. marcescens* 共存時にも *E. coli* に対する殺菌性低下がみられた。これは、CMZ による誘導酵素活性がいずれの菌においても薬剤無添加時の 46~152 倍と大きく上昇したことが一因であると考えられるが、共存する菌株によって *E. coli* に対する殺菌性低下の程度に差がみられ、この差は V_{max}/Ki 値の相違から説明されるものと思われた。すなわち、CMZ の V_{max}/Ki 値は、*E. cloacae* および *M. morgani* 由来酵素に対してそれぞれ 0.67 および 0.18 で CEZ や CTM とほぼ同じレベルの値であり、*P. rettgeri* と *S. marcescens* 由来酵素に対しては低値 (0.01~0.03) で、 V_{max}/Ki 値が大きいほど殺菌性低下が著しかった。なお、*P. vulgaris* 共存時には CMZ の *E. coli* に対する殺菌性の低下がみられなかったが、これはこの酵素に対する CMZ の V_{max}/Ki 値が著しく低値 (<0.0003) を示したことにもとづくものと思われた。CMZ の V_{max} 値は他剤に比べもっとも小さい値を示したことから、混合培養時における CMZ の成績は V_{max} 値よりもむしろ V_{max}/Ki 値に良く相関しているものと考えられた。

CTX では、前記 3 剤に比べ誘導型 β -lactamase 共存の影響は少なかったものの、*S. marcescens* 以外の 4 種の誘導型 β -lactamase 産生菌共存時には *E. coli* の明らかな再増殖がみられた。すなわち、*P. vulgaris*, *M. morgani*, *E. cloacae* 共存時には、誘導酵素活性が 2 倍以上に上昇し、さらに V_{max}/Km or Ki 値も 0.33 以上であったため、*E. coli* の再増殖がみられたものと思われた。また、*P. rettgeri* 共存時については、誘導酵素活性が高いにもかかわらず V_{max}/Km 値が小さいため、前記 3 株の共存時に比べ再増殖の程度

が小さかったものと考えられた。*S. marcescens* 共存時においては、*S. marcescens* 由来酵素に対する CTX の V_{max}/Km or Ki 値が *P. rettgeri* の場合よりも高いにもかかわらず明らかな再増殖がみられなかったのは、誘導酵素活性の違いを反映したものと思われた。CPZ では、いずれの誘導型 β -lactamase 産生菌との混合培養系においても *E. coli* の再増殖がみられなかったのは、いずれの菌においても誘導酵素活性の上昇がほとんどみられなかったこと、さらに V_{max}/Km 値が 0.04~0.51 の範囲にあり低濃度では他剤と同等以上に安定であることにもとづくものと思われた。なお、CTX や CPZ においても、混合培養時における成績は V_{max} 値よりもむしろ V_{max}/Km or Ki 値に良く相関しているものと考えられ、ペリプラスム内における薬剤の加水分解が、経時的に菌体外の薬剤濃度の低下を引き起こし、共存菌への薬剤の殺菌性にも影響を与えることが示唆された。

データは示さなかったが、培養液中における薬剤の不活化を確認するため、*E. coli* 単独培養系および *E. cloacae*, *P. vulgaris* との混合培養系において培養 2 時間後の薬剤濃度を HPLC で測定したところ、混合系において *E. coli* に対する殺菌力が低下した場合 (*E. cloacae* での CEZ, CTM, CMZ と *P. vulgaris* での CEZ, CTM, CTX) にはいずれも 10% 以下の残存率であった。したがって、混合培養系での殺菌力の低下は、培養液中の薬剤が β -lactamase によって不活化されたためと考えられる。このことは、 β -lactamase に安定と言われる cephamycin 系薬剤が、誘導産生された β -lactamase によって加水分解されるという我々の知見からも裏付けられる^{13,14)}。

さらに、*in vitro* で誘導型 β -lactamase 産生菌共存の影響が顕著に認められた CMZ と認められなかった CPZ を選び、*E. coli* と *E. cloacae* の *in vivo* 混合感染系での殺菌効果を調べた。その結果、CMZ 投与時には *E. coli* に対する殺菌効果が混合感染時に著しく低下したが、CPZ 投与時では単独感染と混合感染で殺菌効果に差がみられなかった。これは、今回の *in vitro* での検討成績や pouch 内 β -lactamase 誘導活性²²⁻²⁴⁾ から考えて、*in vitro* 混合系の場合と同様に β -lactamase による CMZ の加水分解にもとづくものと思われた。

以上、誘導型 β -lactamase 産生菌共存時に β -lactamase 非産生性 *E. coli* に対する cephem 剤の殺菌力が低下する現象が *in vitro* および *in vivo* で認められ、その低下の程度は各薬剤の β -lactamase 誘導能および β -lactamase に対する安定性 (V_{max} および

V_{max}/Km or Ki 値) と深く関わっていた。

文 献

- 1) Ellis C J: Indirect pathogenicity. *J. Antimicrob Chemother* 6: 307~309, 1980
- 2) 宇塚良夫, 松本慶蔵, 力富直人, 永武 毅, 原田知行, 野口行雄, 穴戸春美, 渡辺貴和雄: 喀痰定量培養法に基づく呼吸器感染症における複数菌感染の解析. *Chemotherapy* 31: 212~220, 1983
- 3) Brook I: Direct and indirect pathogenicity of *Branhamella catarrhalis*. *Drugs* 31 (Suppl. 3): 97~102, 1986
- 4) 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一. *感染症学雑誌* 63: 400~409, 1989
- 5) 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
- 6) 中浜 力, 山田真理恵, 副島林造: 慢性気道感染症における化学療法. *化学療法の領域* 6: 246~255, 1990
- 7) 出口浩一, 横田のぞみ, 古田昌美, 中根 豊, 鈴木由美子, 深山成美, 石原理加, 小田清次: 気道の常在細菌叢が産生する β -ラクタマーゼに関する検討. *Chemotherapy* 39: 961~967, 1991
- 8) Maddocks J L, May J R: "In direct pathogenicity" of penicillinase-producing enterobacteria in chronic bronchial infections. *Lancet* 1: 793~795, 1969
- 9) 富岡 一, 増田剛太, 内田 博: グラム陰性桿菌が産生する β -lactam 抗生剤不活化物質の混合感染治療に及ぼす影響に関する実験的考察. *感染症学雑誌* 48: 237~243, 1974
- 10) Soriano F, Ponte M C: Comparative activities of aztreonam and cefotaxime against *Escherichia coli* and *Bacteroides* spp. in pure and mixed cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 39~41, 1984
- 11) 能見寿彦, 南新三郎, 四辻 彰, 渡辺泰雄, 保田隆, 高井 明, 才川 勇: *Bacteroides fragilis* と *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* との混合感染時における cefbuperazone の殺菌効果. *Chemotherapy* 34: 965~972, 1986
- 12) 道浦 準, 谷村 弘, 坂本幸具: 実験的腹腔内感染における腹水中 β -lactamase 活性の測定—腹水中生菌数および薬剤濃度との比較検討一. *Chemotherapy* 39: 1110~1117, 1991
- 13) Minami S, Matsubara N, Yotsuji A, Araki H, Watanabe Y, Yasuda T, Mitsuhashi S: Inactivation of cephamycins by various β -lactamases from gram-negative bacteria. *J Antibiot* 37: 577~587, 1984

- 14) Minami S, Araki H, Watanabe Y, Yasuda T, Takai A, Saikawa I, Mitsuhashi S: Reduction of cephamycin concentrations at the infection site in mice with experimental peritoneal infection caused by cephalosporinase-producing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 376~378, 1986
- 15) Selye H: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 82: 328~333, 1953
- 16) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 382~385, 1980
- 17) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139: 780~781, 1974
- 18) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 19) Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 853~857, 1981
- 20) Sawai T, Yamaguchi A, Hiruma R: Effect of interaction between outer membrane permeability and β -lactamase production to β -lactam agents in gram-negative bacteria. *Reviews Infect Dis* 10: 761~764, 1988
- 21) Nikaïdo H, Wei L, Rosenberg E Y: Outer membrane permeability and β -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxymimino substituents. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 337~342, 1990
- 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: 725~731, 1988
- 23) Araki H, Minami S, Watanabe Y, Yasuda T: Significance of inducible cephalosporinase remaining in the experimentally infected rat granuloma pouch after β -lactam therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1131~1136, 1991
- 24) 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆: β -lactam 剤の治療におよぼす残存誘導型 β -lactamase の影響—ラット pouch 内二次感染モデルを用いた検討—。 *Chemotherapy* 40: 183~190, 1992

In vitro and *in vivo* bactericidal activities of cepheims against *Escherichia coli* in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases

Harumi Araki, Naoko Ogake, Shinzaburou Minami,

Takashi Yasuda and Yasuo Watanabe

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimo-okui,

Toyama-city, Toyama 930, Japan

In vitro and *in vivo* bactericidal activities of five cepheims [cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX), and cefoperazone (CPZ)] against *Escherichia coli* TK-16 R (a non- β -lactamase-producing strain) were studied in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases (*Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, *Morganella morganii* T-211, *Providencia rettgeri* GN4430, and *Serratia marcescens* W-24). The following results were obtained.

1) In mixed cultures with strains possessing inducible β -lactamases, CEZ and CTM showed lower bactericidal activity against *E. coli* than that in pure cultures of *E. coli*. The bactericidal activity of CMZ was reduced in mixed cultures except for *P. vulgaris*. CTX was more active in mixed cultures than CEZ, CTM, or CMZ, but *E. coli* regrew in the presence of CTX in mixed cultures except for *S. marcescens*. Among the five cepheims, CPZ was the most active agent in mixed cultures.

2) In mixed infections of rat pouches caused by *E. coli* and *E. cloacae*, the bactericidal activity of CMZ against *E. coli* was reduced, whereas, CPZ acted bactericidally on *E. coli* in pure and mixed infections.

3) In the β -lactamase inducibility tests, CMZ induced the largest amount of enzyme among the five cepheims, followed by CTX, CTM and CEZ. In contrast to CMZ, CPZ caused little induction of β -lactamase production in any of the strains tested.

4) Against the majority of enzymes tested, CEZ and CTM showed the largest V_{max} and K_m values among the five cepheims, followed by CPZ. CMZ or CTX tended to show the lowest V_{max} and K_m (K_i) values. The V_{max}/K_m or K_i values of these five cepheims were similar, and the differences between them were less than the differences between the V_{max} values.

5) These results suggest that the amount of β -lactamase induced by a cephem and β -lactamase lability of the cephem (V_{max} and V_{max}/K_m or K_i values) were important factors influencing *in vitro* and *in vivo* reduction of bactericidal activity of the cephem against *E. coli* in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases.