

各種 β -lactam 薬の β -lactamase 誘導作用の比較— *Enterobacter cloacae* H-27 株における検討 —

茗原 由紀・藤巻 一雄・荒木 春美・前花 淳子
南 新三郎・保田 隆・渡辺 泰雄・成田 弘和
富山化学工業株式会社総合研究所*

三 橋 進
エビゾーム研究所

(平成 6 年 2 月 17 日受付・平成 6 年 6 月 8 日受理)

β -lactamase を誘導的に産生する *Enterobacter cloacae* H-27 の培養液中に、56 種の β -lactam 薬を各々 1, 10 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、2 時間作用後の菌体内 β -lactamase 活性を測定した。その結果、methicillin, mezlocillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, cephalexin, cefroxadin, cefadroxil, aztreonam, carumonam, sulbactam および tazobactam ではいずれの作用濃度においても β -lactamase 活性は低値であった。一方、その他の β -lactam 薬作用時には、上記薬剤より高い β -lactamase 活性が認められ、薬剤濃度の増加に伴って β -lactamase 活性が上昇する傾向が見られた。なかでも cefmenoxime, ceftriaxone, cefpirome, cefoxitin, cefmetazole, cefotetan, cefbuperazone, cefminox, latamoxef, flomoxef および imipenem では低濃度から高い β -lactamase 活性が認められ、薬剤によって β -lactamase 誘導作用に明らかな違いが認められた。

Key words: β -lactamase 誘導能, *E. cloacae*, β -lactam 剤

グラム陰性桿菌には、*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとして、誘導型の菌種特異的 β -lactamase (cephalosporinase (CEPase)) を産生する菌種が多数存在する。これらの菌種の β -lactamase 誘導に関する研究¹⁾から、1) 誘導される β -lactamase 量は菌種や菌株あるいは用いた β -lactam 薬によって異なる、2) 誘導作用の強い薬剤と他の β -lactam 薬を同時添加すると、最小発育濃度をはじめとした抗菌活性に拮抗現象がみられる、3) β -lactamase 産生菌と非誘導菌との混合感染時に、誘導作用の強い薬剤の中には誘導された β -lactamase の影響を受け非誘導菌に対する治療効果が低下する、4) ラットポーチ内感染モデルにおいて β -lactamase 誘導作用の強い薬剤を投与した場合に、誘導産生された β -lactamase が菌体外に漏出し長く炎症巣内に残存することなどが明らかになっている。また、臨床的にも緑膿菌の慢性呼吸器感染症患者に誘導作用の強い薬剤を投与した場合に喀痰中 β -lactamase 活性が上昇することも明らかにされている²⁾。これらは、 β -lactamase

誘導が薬剤の治療効果に影響する可能性を示唆しており、各薬剤の β -lactamase 誘導作用を知ることは、感染症治療の際の薬剤選択にとって重要と考えられる。すでに、種々の菌種で多くの β -lactam 剤の β -lactamase 誘導作用が調べられている^{3,4)}が、最近開発された薬剤を含めた多種の β -lactam 薬の誘導作用を同一菌株、同一条件下で比較した成績は見あたらない。そこで、今回入手可能であった 56 種の β -lactam 薬の β -lactamase 誘導作用を、誘導型 CEPase 産生株である *E. cloacae* H-27⁵⁾ を用い比較した。

Cefteram (CFTM), cephalexin (CEX), mecillinam (MPC), cefixime (CFIX), cefdinir (CFDN), cefibuten (CFTB), cefpodoxime (CPDX), ceftiofuran (CZOP), cefpirome (CPR), cefclidine (CFCL), cefatrizine (CFT), cefroxadine (CXD), cefaclor (CCL), cefadroxil (CDX) および sulbactam (SBT) は富山化学工業総合研究所にて合成および錠剤またはカプセル剤から抽出精製したものを使用した。他の薬剤は以下の各社市販製品を用いた。

* 富山県富山市下奥井 2-4-1

Piperacillin (PIP), cefoperazone (CPZ) および cefbuperazone (CBPZ) は富山化学工業, sulbenicillin (SBPC), cefotiam (CTM), cefmenoxime (CMX), cefsulodin (CFS) および carumonam (CRMN) は武田薬品工業, cephaloridine (CER), latamoxef (LMOX), flomoxef (FMOX) および cefamandole (CMD) は塩野義製薬, benzylpenicillin (PCG), imipenem (IPM) および methicillin (DMPPC) は萬有製薬, carbenicillin (CBPC), cefazolin (CEZ) および ceftizoxime (CZX) は藤沢薬品工業, amoxicillin (AMPC) および cefminox (CMNX) は明治製菓, cefotaxime (CTX) および cefodizime (CDZM) はヘキストジャパン, cefuroxime (CXM) および ceftazidime (CAZ) は日本グラクソ, cefmetazole (CMZ) は三共, mezlocillin (MZPC) はバイエル薬品, ticarcillin (TIPC) は日本ルセル, aztreonam (AZT) はエーザイ, aspoxicillin (ASPC) は田辺製薬, cefpiramide (CPM) は住友製薬, ceftriaxone (CTRX) は日本ロシュ, cefpimizole (CPIZ) は味の素, cefuzonam (CZON) は日本レグリー, ceftioxin (CFX) は第一製薬, cefotetan (CTT) は山之内製薬, clavulanic acid (CVA) はビーチャム薬品, tazobactam (TAZ) は大鵬薬品工業および ampicillin (ABPC) は旭化成工業のものを使用した。被験菌株としては非誘導時の β -lactamase 活性レベルは低いが、誘導後の活性が高いので酵素誘導量が測定しやすい *E. cloacae* H-27 株を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学

療学会標準法⁶⁾に準じ、寒天平板希釈法で測定した。接種菌量は 10^6 および 10^8 CFU/ml とした。薬剤作用時の誘導 β -lactamase 活性の測定は Minami ら⁹⁾の方法に従って行った。すなわち、Brain heart infusion broth (BHIB: 栄研) で一夜培養した *E. cloacae* H-27 を新鮮な BHIB に 10% 接種し 37°C で 2 時間振とう後、この培養液 (2×10^8 CFU/ml) に各薬剤を 1, 10 および 100 μ g/ml となるように添加した。さらに 37°C で 2 時間培養後、遠心分離 (4°C, 10,000 \times g, 30 分) により集菌した。集菌した菌体は 0.05 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) で 2 回洗浄し、適量の同 PB に懸濁した後、超音波破碎 (Ultrasonicator, Tomy-Seiko, 4°C) し、4°C, 10,000 \times g, 30 分間の遠心分離を行った。得られた上清 (cell extract) の β -lactamase 活性を測定することにより、菌体内 β -lactamase 活性 (units/ml) を求め、さらに Lowry 法⁷⁾により蛋白量を測定し、比活性 (units/mg of protein) を求めた。なお、 β -lactamase 活性の測定は CER 100 μ M を基質とする UV 法⁸⁾で行い、誘導活性値は 3 回行った実験の平均で示した。

E. cloacae H-27 に各薬剤 1, 10 あるいは 100 μ g/ml を 2 時間作用させた時の菌体内 β -lactamase 活性および薬剤感受性を Tables 1~4 に示した。薬剤無添加時の β -lactamase 活性は約 0.02 units/mg of protein であったが、薬剤存在下の菌体内 β -lactamase 活性は薬剤濃度の増加にともなって上昇する傾向が認められた。いずれかの濃度において β -lactamase 活性値

Table 1. Induction of β -lactamase by penicillins in *Enterobacter cloacae* H-27

β -lactam	β -lactamase activity (U/mg of protein) ^{a)} at			MIC (μ g/ml) ^{b)}	
	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	10 ^a	10 ^b
Benzylpenicillin	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.94 \pm 0.32	>100	>100
Methicillin	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	>100	>100
Ampicillin	0.06 \pm 0.03	0.55 \pm 0.35	2.00 \pm 0.30	>100	>100
Amoxicillin	0.10 \pm 0.03	0.78 \pm 0.23	1.87 \pm 0.30	>100	>100
Amoxicillin+clavulanic acid (2: 1)	0.07 \pm 0.02	0.50 \pm 0.17	1.27 \pm 0.12	>100	>100
Mezlocillin	0.03 \pm 0	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	25	>100
Aspoxicillin	0.03 \pm 0.01	0.26 \pm 0.11	1.64 \pm 0.59	>100	>100
Piperacillin	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.10 \pm 0.06	12.5	>100
Piperacillin+tazobactam (4: 1)	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.12 \pm 0.07	12.5	>100
Carbenicillin	0.03 \pm 0.01	0.23 \pm 0.17	2.92 \pm 0.54	25	50
Sulbenicillin	0.03 \pm 0.01	0.14 \pm 0.06	2.72 \pm 0.99	50	>100
Ticarcillin	0.03 \pm 0.01	0.39 \pm 0.11	3.50 \pm 0.69	25	100
Ticarcillin+clavulanic acid (15: 1)	0.03 \pm 0.01	0.48 \pm 0.14	3.11 \pm 0.74	25	100
Mecillinam	0.10 \pm 0.02	0.37 \pm 0.18	1.25 \pm 0.42	>100	>100
Without drug	0.02 \pm 0				

^{a)} β -lactamase activity is expressed as mean \pm SD calculated from data of three experiments.^{b)}Inoculum size: CFU/ml.

Table 2. Induction of β -lactamase by injectable cepheids in *Enterobacter cloacae* H-27

β -lactam	β -lactamase activity (U/mg of protein) ^a at			MIC (μ g/ml) ^b	
	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	10 ^a	10 ^a
Cephaloridine	0.03±0.01	0.08±0.02	1.10±0.19	>100	>100
Cefazolin	0.03±0.01	0.07±0.04	1.04±0.54	>100	>100
Cefamandole	0.03±0.02	0.62±0.35	2.37±0.88	>100	>100
Cefotiam	0.03±0.01	0.34±0.22	1.11±0.56	25	>100
Cefoperazone	0.04±0.02	0.08±0.06	0.45±0.27	0.78	12.5
Cefuroxime	0.04±0.02	0.50±0.16	3.41±0.99	100	>100
Cefotaxime	0.08±0.07	1.43±1.07	2.52±1.93	1.56	25
Ceftizoxime	0.06±0.01	0.29±0.18	0.74±0.25	12.5	25
Cefmenoxime	0.19±0.09	1.49±0.70	1.20±0.76	3.13	6.25
Cepiramide	0.05±0.03	0.11±0.01	0.73±0.27	25	100
Ceftazidime	0.04±0.02	0.15±0.06	1.30±0.19	3.13	25
Ceftriaxone	0.26±0.02	1.39±0.09	1.09±0.12	3.13	25
Cefpimizole	0.04±0.01	0.10±0.04	0.45±0.17	>100	>100
Cefuzonam	0.07±0.03	1.77±0.30	1.39±0.45	1.56	12.5
Cefodizime	0.07±0.04	0.67±0.37	1.86±0.44	50	100
Cefpirome	0.18±0.16	1.33±0.53	2.09±0.81	0.10	0.78
Cefclidin	0.05±0.04	0.16±0.17	1.23±0.50	0.20	0.78
Cefozopran	0.05±0.02	0.73±0.42	5.42±1.76	0.39	0.78
Cefsulodin	0.05±0.02	0.05±0.02	0.77±0.42	50	100
Cefoxitin	0.70±0.69	2.73±1.21	4.78±1.60	12.5	50
Cefmetazole	1.40±0.98	3.64±0.44	4.62±0.56	12.5	12.5
Cefotetan	0.74±0.53	3.32±1.64	4.20±1.45	3.13	50
Cefbuperazone	0.88±0.89	3.83±2.63	3.78±1.43	3.13	50
Cefminox	1.45±0.96	3.42±0.75	2.47±0.63	12.5	50
Latamoxef	0.28±0.16	2.78±1.40	2.46±1.69	0.20	0.78
Flomoxef	0.37±0.08	2.48±0.56	2.71±0.98	12.5	50
Without drug	0.02±0				

^a β -lactamase activity is expressed as mean±SD calculated from data of three experiments.

^bInoculum size: CFU/ml.

Table 3. Induction of β -lactamase by oral cepheids in *Enterobacter cloacae* H-27

β -lactam	β -lactamase activity (U/mg of protein) ^a at			MIC (μ g/ml) ^b	
	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	10 ^a	10 ^a
Cephalexin	0.05±0.04	0.04±0.02	0.11±0.07	>100	>100
Cefatrizine	0.03±0.02	0.05±0.04	0.30±0.05	>100	>100
Cefaclor	0.05±0.02	0.06±0.03	0.28±0.24	>100	>100
Cefroxadine	0.03±0.02	0.04±0.01	0.18±0.13	>100	>100
Cefadroxil	0.03±0.01	0.04±0	0.11±0.02	>100	>100
Cefixime	0.03±0.01	0.24±0.08	0.75±0.25	50	100
Ceftibuten	0.04±0.03	0.03±0.02	0.41±0.25	6.25	100
Cefdinir	0.15±0.01	1.48±0.27	2.08±0.57	50	100
Cefpodoxime	0.04±0.02	0.21±0.04	0.66±0.04	50	>100
Cefteram	0.03±0.02	0.26±0.03	1.18±0.42	6.25	100
Without drug	0.02±0				

^a β -lactamase activity is expressed as mean±SD calculated from data of three experiments.

^bInoculum size: CFU/ml.

Table 4. Induction of β -lactamase by other β -lactams in *Enterobacter cloacae* H-27

β -lactam	β -lactamase activity (U/mg of protein) ^a at			MIC (μ g/ml) ^b	
	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	10 ⁶	10 ⁸
Imipenem	3.35 \pm 1.26	2.27 \pm 1.08	2.39 \pm 0.70	0.78	1.56
Aztreonam	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0	0.02 \pm 0.01	0.78	1.56
Carumonam	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0	0.39	1.56
Sulbactam	0.01 \pm 0	0.01 \pm 0.01	0.15 \pm 0.16	100	>100
Clavulanic acid	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.40 \pm 0.38	100	>100
Tazobactam	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.05	>100	>100
Without drug	0.02 \pm 0				

^a β -lactamase activity is expressed as mean \pm SD calculated from data of three experiments.

^bInoculum size: CFU/ml.

が1.00 units/mg of protein 以上を示した薬剤はペニシリン系薬剤ではABPC, AMPCの他7剤, セフェム系薬剤ではCER, CEZの他21剤, およびカルバペネム系薬剤のIPMであった。これら薬剤のうち, CMX, CTRX, CPR, CFX, CMZ, CTT, CBPZ, CMNX, LMOX, FMOX およびIPMでは1 μ g/ml 添加時でも薬剤無添加時の10倍以上(0.19~3.35 units/mg of protein)の高い活性が認められた。一方, DMPPC, MZPC, PIPC, PIPC/TAZ, CEX, CXD, CDX, AZT, CRMN, SBT およびTAZではいずれの濃度においても薬剤無添加時と比較して活性の上昇はほとんど認められなかった。また, CPZやCPIZのように100 μ g/mlでのみ若干の活性上昇がみられた薬剤もあった。なお, 全体の約60%の薬剤が10⁸ CFU/ml 接種時におけるMIC値は100 μ g/ml 以上を示しており, 薬剤を100 μ g/ml 添加した時の生菌数は薬剤無添加時(1 \times 10⁹ CFU/ml)とほぼ同様の生菌数に達していた。一方, 10⁸ CFU/ml 時のMIC値が6.25 μ g/ml 以下の薬剤中には, CMXやCPRのように薬剤作用後の生菌数が10⁵~10⁶ CFU/ml まで減少している薬剤も見られた。

グラム陰性菌における各種 β -lactam薬の β -lactamase誘導作用についてSandersら⁹⁾は, 用いた菌種, あるいは菌株, 実験条件(菌量, 培養時間, 薬剤濃度)など誘導活性値に影響を与える因子はあるものの, セファマイシン系薬剤およびIPMは多くの場合明らかな β -lactamase誘導作用を示すと述べている。今回の我々の検討でもこれらの薬剤では明らかな β -lactamase誘導作用が認められた。また, いずれかの濃度作用時に1 unit/mg of protein 以上の誘導活性を示した薬剤が多数認められたが, これらも基本的には誘導作用を有する薬剤と考えられる。一方, いずれの濃度においても顕著な β -lactamase活性の上

昇の認められなかった薬剤のうちDMPPC, MZPC, PIPC, PIPC/TAZ, AZT, CRMN, SBTおよびTAZでは, 薬剤添加(100 μ g/ml)2時間後の薬剤残存活性は50%以上を示し, 著しい生菌数の減少や蛋白量の低下も認められなかった。なかには低いMIC値を示すものの, 生菌数および蛋白量をさほど減少させなかった薬剤がみられた理由として, 高接種菌量による抗菌力の低下が考えられる。一般に β -lactam薬の抗菌力は接種菌量によって大きく影響を受け, 高菌量になるほど抗菌力は低下することが知られており, 今回, 我々が用いたような菌量の多い条件下で行えば薬剤の殺菌性の影響が少ないと思われる。また, データは示さなかったが, 透析後, 培養液中 β -lactamase活性を測定したところ菌体外への β -lactamaseの漏出も認められなかった。したがって, 少なくともこれら8薬剤は誘導作用の弱い薬剤と考えられた。なお, CEX, CXDおよびCDXは速やかに培養液中で不活化されていることから, これらの薬剤の β -lactamase誘導作用については今後さらに検討が必要であろう。

以上, 56種の β -lactam薬の β -lactamase誘導作用を*E. cloacae* H-27株を用い比較した結果, セファマイシン系薬剤およびIPMの誘導作用が強く, AZT, PIPC, PIPC/TAZなどはほとんど誘導作用を示さなかった。今回の*E. cloacae* H-27株を用いた検討では多くの薬剤が程度に差はあるものの明らかな β -lactamase誘導作用を示すことが確認された。薬剤の β -lactamase誘導作用が直接あるいは間接的に感染治療に影響することが示唆されていることから^{2,10,11)}, さらに種々の感染モデル等を用い薬剤投与時の感染巣内における β -lactamase誘導作用を比較することも重要と考えられる。

文 献

- 1) 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, 1987
- 2) 中浜 力, 他: 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—. *感染症雑誌* 63: 400~409, 1989
 - 3) 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
 - 4) Farmer T H, Reading C: Induction of the β -lactamase of a strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii* and *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 19: 401~404, 1987
 - 5) 南新三郎, 松原信之, 四辻 彰, 岡本直子, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇, 三橋 進: *Enterobacter cloacae* に対する β -lactam 剤の抗菌作用, 第一報. Cephem 系薬剤の抗菌活性と β -lactamase 誘導. *Chemotherapy* 31: 909~915, 1983
 - 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
 - 7) 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
 - 8) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139: 780~781, 1974
 - 9) Sanders C C: Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 41: 573~593, 1987
 - 10) 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆: β -lactam 剤の治療に及ぼす残存誘導型 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
 - 11) 荒木春美, 大懸直子, 南新三郎, 保田 隆, 渡辺泰雄: 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. *Chemotherapy* 41: 755~764, 1993

The β -lactamase inducer activity of various β -lactam antibiotics

—Investigation in *Enterobacter cloacae* H-27—

Yuki Myouhara, Kazuo Fujimaki, Harumi Araki,
Jyunko Maehana, Shinzaburou Minami, Takashi Yasuda,
Yasuo Watanabe, Hirokazu Narita,
and Susumu Mitsuhashi¹⁾

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

¹⁾Episome Institute

The intracellular β -lactamase activity of *Enterobacter cloacae* H-27 which produces an inducible β -lactamase was determined after exposure to 1, 10 and 100 μ g of 56 β -lactam agents per ml for 2 h. Methicillin, mezlocillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, cephalexin, cefroxadin, cefadroxil, aztreonam, carumonam, sulbactam, and tazobactam induced hardly any intracellular β -lactamase production at the concentrations tested. Most of the other β -lactams increased the β -lactamase activity in a dose-dependent manner. Ceftriaxone, cefoxitin, cefmetazole, cefotetan, cefbuperazone, cefminox, latamoxef, flomoxef and imipenem showed high inducer activity for β -lactamase production even at low drug concentrations. Distinct differences in β -lactamase inducer activity were observed.