

Staphylococcus aureus のセフェム耐性化とペニシリン結合蛋白 4 の増量

村上 和久・土肥 正善・永田 弘・小松 良英

塩野義製薬（株）創薬第一研究所*

（平成 8 年 4 月 22 日受付・平成 8 年 5 月 15 日受理）

2 倍系列希釈した cefcapene (CFPN) または ceftoram (CFTM) を含んだ 4 ml の液体培地に *Staphylococcus aureus* FDA 209P JC-1 の菌液 40 μ l を植菌し、37 $^{\circ}$ C で 20 ~ 24 時間静置培養した。これを 1 代培養として、コントロール菌液とほぼ同じ濁度を示した菌液のうち薬剤濃度がもっとも高いものから同様に植え継ぎ、14 代まで継代培養した。親株に対し 0.78 μ g/ml であった CFPN の寒天 MIC は 5, 10, 14 代継代株ではそれぞれ 3.13, 12.5, >200 μ g/ml に上昇した。CFTM でも同様に、3.13 μ g/ml からそれぞれ 6.25, 25, >200 μ g/ml となった。一方、flomoxef や cefmetazole など PBP 4 に親和性の高いセファマイシン系薬剤の MIC は、最大 2 管までしか上昇しなかった。これらの継代株では耐性の上昇に伴って PBP 4 の産生量が増加しており、セフェム薬の作用を受けた菌では生存に PBP 4 が重要な役割を果たしていることが示唆された。薬剤存在下で 14 代継代した株の耐性は不安定で、薬剤を含まない培地で植え継ぐと簡単に低下した。耐性が低下すると共に PBP 4 の産生量も低下した株がある一方、産生量が逆に増加した株もあった。したがって、14 代継代株では PBP 4 の増量に加えて未知の要因も耐性に関与していることが示唆された。

Key words: *S. aureus*, セフェム耐性, PBP 4

ペニシリン結合蛋白質 (PBP) は菌種毎に産生される数が異なっている。*Staphylococcus aureus* では PBP 1 から 4 までの 4 種の PBP が産生される¹⁾。このうち PBP 1, 2, 3 は高分子量の PBP で、ペプチドグリカン合成の最終段階である前駆体の架橋反応を触媒する transpeptidase と考えられている²⁾。 β -ラクタム薬はこれらの高分子量 PBP のいくつかを阻害することによって抗菌作用を発揮する³⁾。一方、PBP 4 は低分子量の PBP で、前駆体のペプチドから末端の D-アラニン遊離させる反応を触媒する carboxypeptidase と考えられている。これら 4 種の PBP のうちすでに PBP 1, 2, 4 の遺伝子がクローニングされ塩基配列が決定されている⁴⁻⁶⁾。

β -ラクタム薬に対する細菌の耐性機構には β -ラクタマーゼによる薬剤の加水分解、薬剤の外膜透過障害や排出、PBP の変化などがあるが、グラム陽性菌においては PBP が関係する耐性機構は重要な位置を占めている。たとえば、ペニシリン耐性 *Streptococcus pneumoniae* では組換えによって PBP 遺伝子の一部が他の streptococci のものと入れ替わった低親和性のモザイク PBP が産生されている⁷⁾。*S. aureus* においても、メチシリン耐性株 (MRSA) では *mecA* という外来遺伝子にコードされた低親和性の PBP 2' が産生されていることが知られている^{8,9)}。さらに最近では β -ラクタムに低度耐性の *S. aureus* 株で PBP 1, 2, 4 の産生量の変化、あるいは PBP2 の変異によって耐性化した例が報告されている¹⁰⁻¹²⁾。本研究では、メチシリン感性 *S. aureus* 標準株を用いてエステル型経口セフェム薬の活性体

である cefcapene (CFPN)¹³⁾ に対する試験管内耐性獲得試験を行い、耐性獲得株では PBP4 が増量することを見いだしたので報告する。

I. 材料と方法

1. 菌 株

メチシリン感性標準株である *S. aureus* FDA 209P JC-1 を用いた。

2. 薬 剤

CFPN, ceftoram (CFTM) および flomoxef (FMOX) は塩野義製薬研究所で合成された。cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), cefotiam (CTM), および methicillin (DMPPC) はそれぞれ藤沢薬品工業、三共、武田薬品工業、および Sigma から購入した。

3. ペニシリン結合蛋白質 (PBP) と膜タンパク質の解析

L-broth 中で 37 $^{\circ}$ C で対数増殖期まで振盪培養した菌を用いて膜画分を調製した。後述するように P 3 と T 3 株は薬剤耐性が脱落しやすいため、これらの株を用いるときは、まず CFPN または CFTM を含む培地で振盪して前培養し、遠心集菌して洗浄した後、前培養培地の 20 倍量の培地に懸濁して対数増殖期まで振盪培養した。菌体は 1 回洗浄した後、0.01 M MgCl₂ を含む 0.05M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、lysothaphin (Sigma) を最終濃度 12 U/ml なるように加えた。30 $^{\circ}$ C で 10~20 分インキュベートし水中で間欠的に正味 2 分超音波砕することを 3 回繰り返した。

4 °C, 5,300 × g で 15 分間遠心して未破碎の菌体を除き, 上清を 100,000 × g で 30 分間超遠心して膜画分を集めた。1 回洗浄した後, 0.01 M MgCl₂ を含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にタンパク濃度が 10 mg/ml になるように懸濁し, -80 °C に保存した。なお, 耐性獲得株の場合には培養終了後, 菌液を寒天平板に植菌してコロニーを作らせ, 10~20 コロニーに対する MIC を測定してほとんどの菌細胞では耐性が保持されていることを確認した。

50 μl の膜画分に 5 μl の [¹⁴C] ペニシリン G (1.85 MBq/ml, Amersham) を加え, 30 °C で 10 分間インキュベートして PBP をラベルした。10 % sarkosyl (60 mg/ml のペニシリン G を含む) を 5 μl 加えて反応を停止し, 室温に 20~30 分間放置した。10 °C で 19,000 × g で 60 分間遠心した後, 上清 30 μl を loading buffer 15 μl と 2-mercaptoethanol 5 μl と混ぜ, 2 分間煮沸した後, SDS-ポリアクリルアミドゲル (9 %) 電気泳動した。フルオログラフィー法で PBP を検出し, BAS 2000 (富士写真フィルム) で定量した。

膜タンパク質を分析する場合は, 50 μl の膜画分に 10 % sarkosyl を 5 μl 加えて膜タンパク質を可溶化し, 以下, PBP の場合と同様に電気泳動し, Coomassie brilliant blue でタンパク質を染色した。

4. MIC 測定

試験管内耐性獲得試験においては 2 倍系列希釈した薬剤を含む Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) 中で菌を培養するので, 菌が増殖しなかった最小薬剤濃度を継代培養中の菌液の broth MIC とした。その他の場合は以下のように寒天平板希釈法で MIC を測定した。一夜 MHB 中で培養した菌液を 10⁶ CFU/ml に希釈し, 2 倍系列希釈した薬剤を含む Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA, Difco) に 1 μl 接種した。37 °C で 18~20 時間培養した後 MIC を判定した。

II. 結 果

1. 試験管内耐性獲得株の分離と耐性の安定性

2 倍系列希釈した CFPN または CFTM を含む 4 ml の MHB に *S. aureus* FDA 209P JC-1 の一夜培養菌液 (約 10⁸ CFU/ml) を 40 μl 接種し, 37 °C で 20~24 時間静置培養した。これを 1 代培養として, 薬剤無添加培地で増殖した菌液とほぼ同じ濁度を持つ菌液のうちもっとも高い濃度の薬剤を含む菌液 40 μl を同様に植

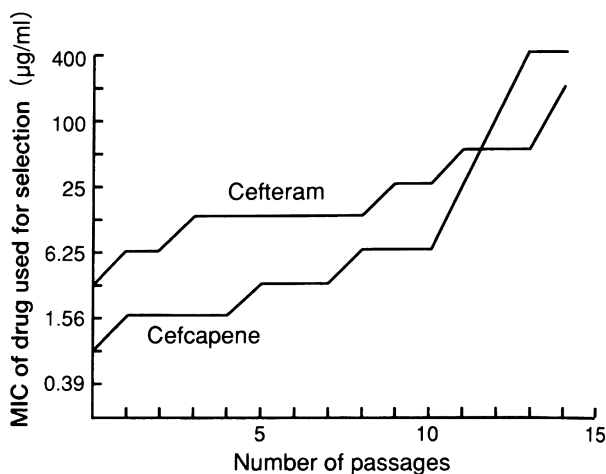


Fig. 1. Development of resistance in *Staphylococcus aureus* during passage in the presence of cefcapene or cefteteram.

菌し, 14 代まで培養を繰り返した (Fig. 1)。CFPN または CFTM 含有培地で 5 または 10 代継代培養した菌液をそれぞれ P 1, P 2 または T 1, T 2 と名付け, -80 °C に保存した (Table 1)。P 1 と P 2 の場合には選択薬剤である CFPN の MIC が親株の場合の 0.78 μg/ml からそれぞれ 3.13 μg/ml あるいは 6.25 μg/ml に, T 1 と T 2 の場合には CFTM の MIC が 3.13 μg/ml からそれぞれ 12.5 μg/ml あるいは 25 μg/ml に上昇した。獲得した耐性の安定性を調べるため, これらの菌液からそれぞれ 3 コロニーを分離し, 薬剤を含まない MHB で 4 代まで継代培養して元の菌液と薬剤の MIC を比較したが, 変動は 1 管以内であり, 獲得した耐性は比較的安定であることがわかった。

CFPN または CFTM 存在下で継代培養をさらに 14 代まで続けたところ, 選択薬剤の MIC はそれぞれ 400 μg/ml または 200 μg/ml まで上昇した。これらの菌液を薬剤を含まない MHB で 1 代培養した後, MHA 上で, CFPN 耐性株から 5 コロニー (うち 1 株を P 3 と命名), CFTM 耐性株から 1 コロニー (T 3 と命名) を分離した (Table 1)。これらのコロニーをそれぞれ独立に薬剤を含まない MHB 中でさらに 4 代継代培養した後, MHA 上で再び各菌液ごとに 5 コロニーを分離し, それらに対する MIC を寒天平板法で測定した (Table 2)。5 または 10 代継代した菌液 (P 1, P 2, T 1, T 2 株) とは対照的に 14 代継代した株では獲得した耐性は

Table 1. Resistant variants of *Staphylococcus aureus* used in this study

Resistant variant	Origin
P 1 or T 1	Passaged 5 times in the presence of cefcapene or cefteteram, respectively
P 2 or T 2	Passaged 10 times in the presence of cefcapene or cefteteram, respectively
P 3 or T 3	Single colony isolated after 14 passages in the presence of cefcapene or cefteteram, respectively, and one passage in the absence of the drug
P 4 or T 4	Single colony isolated after 4 passages of P 3 or T 3, respectively, in the absence of the drug

非常に不安定で、薬剤を含まない MHB で植え継ぐとまだ耐性の残っている株から親株とほぼ同程度まで耐性の低下した株まで様々な耐性度の株が出現した。調べた限りでは耐性がまだ少し残っている株が多かったが、その代表として T 3 由来の株 (T 4 株) を、また、親株レベルまで耐性の低下した株として P 3 由来の株 (P 4 株) を選び (Table 1), さらに詳しく性質を調べた。

2. 耐性獲得株に対する各種 β -ラクタム薬の MIC

上記の耐性獲得株に対する各種 β -ラクタム薬の寒天 MIC を Table 3 に示した。耐性獲得株では CFPN や CFTM ばかりでなく CEZ や CTM の MIC も上昇した。特に P 3 や T 3 株ではこれらの薬剤の MIC は 50~100 $\mu\text{g/ml}$ にまで上昇した。一方、PBP4 に親和性の高い¹⁴⁾セファマイシン系の薬剤である FMOX や CMZ の MIC は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ あるいは 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、MIC の上昇は 2 管以内であった。また、DMPPC の MIC も 2~3 管程度の上昇にとどまった。

Table 2. Stability of resistance developed in *Staphylococcus aureus* passaged 14 times in the presence of the drug

Subculture	Passage number ^{a)}	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		CFPN	CFTM
1 (P 3)	1	400	>200
	5	0.39 (0.39-1.56) ^{b)}	1.56 (1.56-6.25)
2	1	200	200
	5	0.78 (0.78-12.5)	3.13 (3.13-50)
3	1	200	>200
	5	1.56 (1.56-6.25)	6.25 (6.25-25)
4	1	200	>200
	5	6.25 (1.56-6.25)	25 (6.25-50)
5	1	200	100
	5	1.56 (0.78-1.56)	3.13 (3.13-6.25)
6 (T 3)	1	>400	>200
	5	1.56 (1.56-6.25)	6.25 (6.25-50)
209P JC-1 ^{c)}		0.78	1.56

Bacteria were grown in MHB after 14 passages in the presence of CFPN or CFTM and inoculated onto MHA. Five (subcultures 1 to 5) colonies were picked up from CFPN culture and one colony (subculture 6) from CFTM culture. These colonies were further passaged four times in the MHB and five colonies were isolated on MHA for each subculture. MIC was determined by the agar dilution method.

^{a)} Passaged in drug-free MHB.

^{b)} Median MIC and MIC ranges against the five colonies are given in parentheses.

^{c)} Parent strain of *S. aureus*.

CFPN: cefcapene, CFTM: ceftemam

Table 3. Agar dilution MIC against *Staphylococcus aureus* strains passaged in the presence of the drug

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	CFPN	CFTM	CEZ	CTM	CMZ	FMOX	DMPPC
P 1	3.13	6.25	0.39	0.78	1.56	0.39	3.13
P 2	12.5	50	3.13	6.25	1.56	0.78	6.25
P 3	>200	>200	100	50	1.56	0.78	6.25
P 4	0.78	1.56	0.2	0.39	0.78	0.2	1.56
T 1	3.13	6.25	0.78	0.78	0.78	0.39	3.13
T 2	12.5	25	3.13	6.25	1.56	0.39	3.13
T 3	>200	>200	100	100	1.56	0.78	12.5
T 4	1.56	6.25	0.39	1.56	0.78	0.2	3.13
209P JC-1	0.78	3.13	0.2	0.39	0.78	0.2	1.56

Inoculum size: 10^6 cfu/ml

CFPN: cefcapene, CFTM: ceftemam, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam, CMZ: cefmetazole,

FMOX: flomoxef, DMPPC: methicillin

3. 耐性獲得株の PBP と膜タンパク質の分析

Fig. 2A に各菌株の PBP パターンを示した。耐性獲得株では PBP 4 の産生量が増加していた。他の PBP には有意の差は認められなかった。Fig. 2A では PBP 1 が欠損しているように見える株もあったが、これには実験ごとのばらつきが見られ、有意な変化とは思われなかった。次に PBP 4 を定量し、その相対値を CFPN の MIC 値に対してプロットした (Fig. 2B)。P1, P2, P3 株や T1, T2, T3 株においては PBP 4 産生量増加と耐性度の上昇とはよく相関した。なお、P1, P2, T1, T2 株の場合は植え継いだ菌液そのものを使用しているため、Fig. 2A で見られる PBP 4 の増量は、産生量の増加したコロニーを偶然分離したためではなく、菌液中の多くの細胞で産生量が増加したためと考えられる。PBP 4 に親和性が高い FMOX や CMZ では、耐性のもっとも高い P3 や T3 株に対しても MIC の上昇が 2 管以内であったことを考え合わせると、PBP 4 の増量は耐性上昇に寄与していると考えられる。なお、CFPN, CFTM, および FMOX を用いて P3 株と親株間で PBP 親和性を比較したが有意の差は認められな

ったので、PBP の親和性の変化が耐性化の原因とは思われなかった。

P3 株由来で親株と同程度まで耐性度が低下した P4 株では、同時に PBP 4 の産生量も低下した。つまり、P3 株では PBP 4 産生量の増加そのものが不安定で、耐性が不安定なことでよく対応した。一方、T3 株由来で耐性がまだ少し残っていた T4 株では耐性が低下したにもかかわらず PBP 4 の産生量はさらに増加した。したがって、この場合は耐性度と PBP 4 の増量は相関しなかった。T4 株が出現したということは、P3 や T3 株に見られる高度耐性化には PBP 4 の増量に加えて未知の因子の発現増加あるいは減少も関与すること、さらに、この発現量の変化は非常に不安定で、菌を植え継ぐだけで元に戻ることを示唆している。

次に膜タンパク質を各菌株間で比較した (Fig. 3)。45 kDa のマーカーより少し分子量の大きな位置に変異株では薄いバンドが現れた。PBP 4 の分子量は 48 kDa で⁶⁾ 良く対応するので、このバンドが PBP 4 と思われ、コマジー染色でも PBP 4 の増量が確認できた。また、P3 や T3 株では 62 kDa のタンパク質の増量も認められたが、感性化した P4 や T4 株では親株とほとんど変わらなかった。しかしながら、これだけのデータではこのタンパク質が上記の未知因子であるか否かは不明である。

III. 考 察

セファロスポリンに耐性を示す *S. aureus* の臨床分離株のほとんどは MRSA である。MRSA は β -ラクタムに低親和性の PBP 2' を新たに産生して耐性となっている。一方、PBP 2' によらない耐性株も例は少ないが報告されている。これらの株では通常の PBP のうち PBP 1 や 2 が減少していたり、あるいは PBP 4 が増量していた¹¹⁾。また、実験室内で分離された耐性株としては、PBP4 が増量した株^{10,15)}、PBP 1, 2 あるいは 4 の速度定数の変化した株¹⁶⁾、PBP 2 が点変異を受けて低親和性となった株¹²⁾ などが知られている。本研究において分離された *S. aureus* 耐性株では PBP 4 が増量

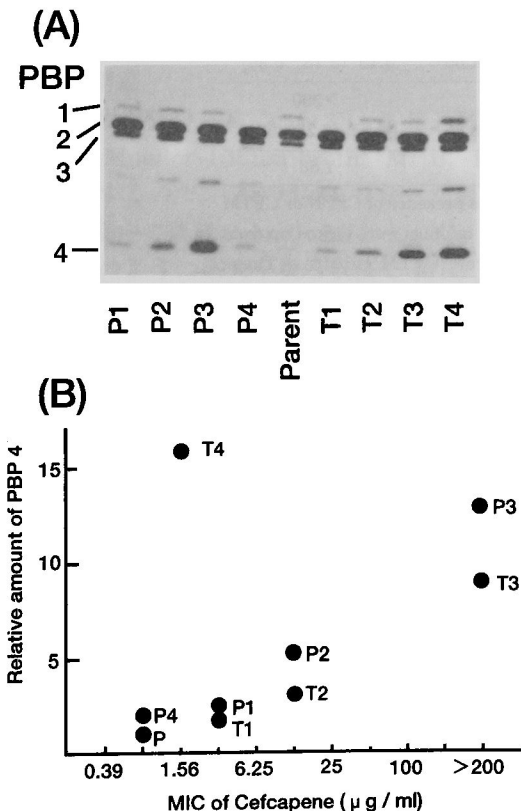


Fig. 2. (A) Patterns of penicillin-binding proteins produced in the strains of *Staphylococcus aureus* passaged. (B) Correlation between the resistance level and the amount of PBP 4. MIC was determined by the agar dilution method. The amounts of PBP 4 are expressed as values relative to that of the parent strain. Parent (P) and resistant variants (P1 to P4 and T1 to T4) are indicated in the figure.

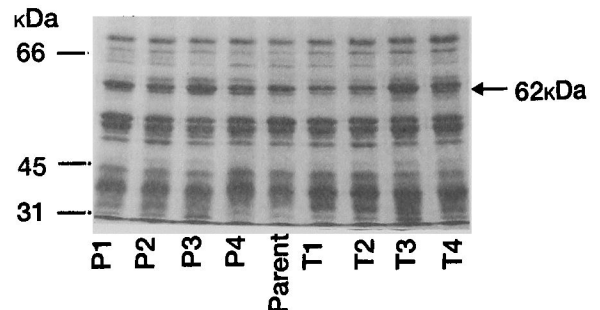


Fig. 3. Analysis of membrane proteins from passaged *Staphylococcus aureus* strains. The proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue. Molecular masses of standards are indicated.

していた。もっとも耐性の高かった P 3, T 3 株に対しては CFPN や CFTM などの選択薬剤の MIC は 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上であったが, CEZ の MIC も 100 $\mu\text{g/ml}$ であり, MRSA なみの耐性度であった。ただし, セファマイシン系の薬剤である FMOX や CMZ には感性であったことや耐性が非常に脱落しやすかったことが MRSA とは異なっていた。

セファマイシン系の薬剤や imipenem は PBP 4 に親和性が高いために, セフェム薬と併用したとき, MRSA に対し相乗的に作用することが知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。その作用機序ははっきりしないが, セフェム薬の作用に加えてセファマイシン薬による PBP 4 の阻害が加わると, たとえ PBP 2' が機能していても菌は生存できなくなると思われる。逆に言えば, PBP 4 が活性を保持していれば菌は増殖できるのであるから, この PBP は PBP 2' と協同してセフェム薬が菌に与える損傷をある程度解消していると考えられる。さらに, 本研究で得られた結果は, PBP 2' を産生しないメチシリン感性株においても PBP 4 が増量すればセフェム薬による阻害作用をある程度解消できることを示しており, ペプチドグリカン生合成において PBP 4 が果たす役割の重要性を示唆している。

T 4 株ではなんら選択しなかったにもかかわらず PBP 4 の産生量は T 3 株よりさらに増加し, しかも耐性度は低下した。このことから, 少なくとも高度耐性となった P 3 や T 3 株においては PBP 4 の増量に加えて他の因子も耐性に関与していることが示唆された。これと類似した現象はメチシリン耐性に必須の PBP 2' においても認められる。つまり, MRSA の高度耐性化には PBP 2' に加えて他の因子も必要であることが知られている²⁰⁾。さらに, *fem* や *llm* のように, PBP 2' によるメチシリン耐性度を保持するのにその活性を必要とする遺伝子も存在する²¹⁻²³⁾。また, *Escherichia coli* では PBP 2 の活性発現に RodA タンパク質が必要であることが知られている²⁴⁾。PBP 4 の場合, 他の因子の影響を受けるのは耐性に関与する特別の場合だけであるのか否かは不明だが, そのような PBP のひとつであると思われる。

P 3 や T 3 株で見られた高度耐性は薬剤の作用をやめたときには速やかに消失したので, そのような高度耐性株が臨床の場でさほど簡単に生ずるとは思われない。実際, 臨床で分離される耐性株はほとんど PBP 2' を産生する MRSA であり, 通常の PBP の変異株は分離頻度が低い。さらに, MRSA は耐性度が低い場合でも高頻度に高度耐性株を生じるので²⁵⁾, この点でも β -ラクタム薬に曝されたとき生き残りやすいと考えられる。S. aureus において, 通常の PBP の変異が耐性機構として今後どの程度重要な位置を占めるかはわからないが, 現時点では, PBP2' 産生の方が重要であると思わ

れる。

謝 辞

本研究の一部は第 5 回上田記念感染症・化学療法研究奨励賞の援助を受けて行われた。研究中, 終始激励していただきました塩野義製薬(株)吉田正博士にお礼申し上げます。

文 献

- Georgopadakou N H, Liu F Y: Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 834~836, 1980
- Waxman D J, Strominger J L: Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 52: 825~869, 1983
- Beise F, Labischinski H, Giesbrecht P: Selective inhibition of penicillin-binding proteins and its effects on growth and architecture of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 55: 195~202, 1988
- Murakami K, Fujimura T, Doi M: Nucleotide sequence of the structural gene for the penicillin-binding protein 2 of *Staphylococcus aureus* and the presence of a homologous gene in other staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* 117: 131~136, 1994
- 和田昭仁, 渡辺治雄: S. aureus NCTC 8325 の PBP 1 遺伝子のクローニング。第 67 回日本細菌学会総会, 演題 No. 96, 東京, 1994 年 3 月
- Henze U U, Berger-Bächi B: *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 and intrinsic β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2415~2422, 1995
- Dowson C G, Coffey T J, Spratt B G: Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 2: 361~366, 1994
- Utsui Y, Yokota T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 397~403, 1985
- Hartman B J, Tomasz A: Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513~516, 1984
- Georgopadakou N H, Cummings L M, LaSla E R, Unowsky J, Pruess D L: Overproduction of penicillin-binding protein 4 in *Staphylococcus aureus* is associated with methicillin resistance. In *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function* (Actor P, Daneo-Moore L, Higgins M L, Salton M R J, Shockman G D ed.), p. 597~602, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1988
- Tomasz A, Drugeon H B, de Lencastre H M, Jabes D, McDougall L, Bille J: New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and con-

- tain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1869~1874, 1989
- 12) Hackbarth C J, Kocagoz T, Kocagoz S, Chambers H F: Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 103~106, 1995
 - 13) Ishikura K, Kubota T, Minami K, Hamashima Y, Nakashimizu H, Motokawa K, Kimura Y, Miwa H, Yoshida T: Synthesis and structure-activity relationships of 7 β -[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-3-(substituted)-2-propenoyl-amino]-3-cephems with C-3 substitutions. *J Antibiot* 47: 466~476, 1994
 - 14) Murakami K, Nomura K, Doi M, Yoshida T: Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1307~1311, 1987
 - 15) Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bächi B: Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 175: 1612~1620, 1993
 - 16) Chambers H F, Sachdeva M J, Hackbarth C J: Kinetics of penicillin binding to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 301: 139~144, 1994
 - 17) Yoshida T, Sonoyama T, Nishimura K, Kageyama B, Ito M: Synergy of cephalothin combined with moxalactam against *Staphylococcus aureus*. 24th ICAAC Abstr No. 1051, 1984
 - 18) 小林義直, 園部直美, 土肥正善, 村上和久, 吉田正: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する flomoxef と cefamandole の *in vitro* および *in vivo* 併用効果. *Chemotherapy* 39: 968~975, 1991
 - 19) 渡辺裕二, 若井芳美, 久野京一郎, 波多野和男, 坂本博, 峯 靖弘, 井上松久: MRSA に対する cefazolin と imipenem との *in vitro* および *in vivo* 併用効果. *Chemotherapy* 38: 797~806, 1990
 - 20) Murakami K, Tomasz A: Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 171: 874~879, 1989
 - 21) Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser F H: FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 219: 263~269, 1989
 - 22) de Lencastre H, Tomasz A: Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2590~2598, 1994
 - 23) Maki H, Yamaguchi T, Murakami K: Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 176: 4993~5000, 1994
 - 24) Ishino F, et al. : Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J Biol Chem* 261: 7024~7031, 1986
 - 25) Knox R, Smith J T: The nature of penicillin resistance in staphylococci. *Lancet* ii: 520~522, 1961

Cephem-resistance of *Staphylococcus aureus* associated with elevated production of penicillin-binding protein 4

Kazuhisa Murakami, Masayoshi Doi, Hiroshi Nagata
and Yoshihide Komatsu

Shionogi Research Laboratories, Shionogi and Co., Ltd., 1-1, Futaba-cho 3-Chome,
Toyonaka, Osaka 561, Japan

Staphylococcus aureus FDA 209 P JC-1 was passaged 14 times in Mueller-Hinton broth containing serial two-fold dilutions of cefcapane (CFPN) or ceftem (CFTM), as follows. A bacterial suspension of 40 μ l containing the highest concentration of the drug which allowed full bacterial growth was inoculated into 4 ml of broth containing the drug and stationarily grown for 20 to 24 h at 37°C. CFPN MIC increased from 0.78 μ g/ml for the parent to 3.13, 12.5 and >200 μ g/ml for strains passaged 5, 10 and 14 times, respectively, in the broth containing CFPN. Similarly, CFTM MIC increased from 3.13 μ g/ml to 6.25, 25 and >200 μ g/ml. In contrast, only up to four-fold increases were observed for the MICs of cephamycins such as flomoxef and cefmetazole which had high affinities for PBP 4. In the passaged strains, the resistance increase was associated with the elevation of PBP 4 production, suggesting that PBP 4 played an important role in bacterial survival after exposure to cephems. The high-level resistance observed for strains passaged 14 times in the presence of CFPN or CFTM was very unstable and the levels tended to drop during passage in the absence of the drug. The reduction in the resistance level was accompanied by a decrease of the amount of PBP 4 in one strain, but not in the other, suggesting that, in addition to elevated PBP 4 production, there was some unknown factor involved in raising the resistance to such a high level.