

【原著・基礎】

Prevotella intermedia MA1 と MA1-V2 由来 β -lactamase の基質特異性

船岡 勝博・尾上 孝利・佐川 寛典

大阪歯科大学細菌学講座*

(平成 8 年 12 月 27 日受付・平成 9 月 1 月 7 日受理)

Prevotella intermedia の β -lactamase 低度産生株 (MA1) と高度産生株 (MA1-V2) の β -lactamase 感受性とこれら細菌由来 β -lactamase の基質特異性について検討した。 β -Lactam 薬は 28 種を使用した。MA1-V2 に対する 4 種 penicillins, 12 種 cephalosporins, 2 種 oral cepheims の合計 18 抗菌薬の MIC が $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ のとき, それら抗菌薬を基質としたときの MA1-V2 β -lactamase 活性は $\geq 0.122 \text{ U/mg p}$ であり, MIC と酵素活性は平行していた。18 抗菌薬に対する本酵素の K_m は $6.3 \sim 2,141.7 \mu\text{mol}$, V_{max} は $0.03 \sim 10.21 \mu\text{mol/min/mg p}$ であった。しかし, 酵素活性や基質親和性は必ずしも MIC に反映していなかった。本酵素は供試 oxyiminocephalosporin を分解したので oxyiminocephalosporinase と考えられる。MIC は大きい, 酵素活性が低いあるいは検出限界以下の抗菌薬が 9 剤みられた。このうち阻害効果が検出された抗菌薬は 4 種 (cefoxitin, cefmetazole, cefbuterazone および latamoxef) で, 残り 5 抗菌薬では阻害効果は見られなかった。IPM では阻害効果がみられ, 基質として安定していた。 β -Lactamase 阻害剤の clavulanic acid, sulbactam および tazobactam は MA1-V2 β -lactamase 活性 (基質 cefazolin) を阻害した。MA1 に対する供試 β -lactam 薬の MIC のほとんどは著しく小さかった。MA1 β -lactamase は供試抗菌薬のうち 17 抗菌薬を分解したが, その活性は低かった。以上の事実は, MA1-V2 β -lactamase は cefsulodin, cephamycins, imipenem, latamoxef と aztreonam を除く β -lactam 薬に対し広い分解能を示し, 本菌の β -lactam 薬間での交叉耐性や高度耐性化に深く関与していると推定される。

Key words: *Prevotella intermedia*, β -lactam 薬耐性, β -lactamase, 基質特異性, β -lactam 薬感受性

抗菌薬は, 種々の外因感染症や内因感染症の治療あるいは術後や抜歯後感染症の予防のために投与され, 常在菌叢に大きな影響を与えていることは周知の事実である^{1,2)}。

口腔常在菌叢を構成する細菌のある株が β -lactams, tetracyclines, macrolides および aminoglycosides など種々の抗菌薬に対して耐性を示すことは多くの研究者によって報告されている³⁻⁵⁾。Kinder et al.⁶⁾ は成人性菌周炎, 松本⁷⁾, 斎木ら⁸⁾, 木下ら^{9,10)} は菌性感染症から分離した多くの β -lactam 薬耐性菌が β -lactamase を産生し, 本酵素が耐性機構に深く関与していることを示唆している。

β -Lactam 薬には抗菌域の広いものから狭いものまで多種類が存在し, 感染症の治療および術後の感染予防に頻繁に使用されている。しかし, これらの抗菌薬は β -lactam 薬耐性菌の選択や β -lactamase の誘導にも関与していると考えられる。

口腔から分離される β -lactam 薬耐性嫌気性グラム陰性桿菌のなかでは *Prevotella intermedia* の分離頻度が高く, β -lactamase 産生菌の割合も高い⁷⁻¹¹⁾。また, 本菌で MIC が大きくなると, β -lactamase の産生率も高いと述べられ

ている^{6-8,10)}。同様の結果は, 口腔以外の感染症から分離した *Prevotella* 属でも報告されている¹²⁻¹⁴⁾。

P. intermedia は種々の口腔感染症^{7,9-11)}, 成人性菌周炎^{6,15)} および妊娠性菌肉炎¹⁶⁾ から分離され, それらの発症と増悪化に関与すると推定されている。*P. intermedia* のある株が β -lactamase を産生して耐性化することは本菌感染症の治療を困難にする一因と考えられる⁶⁻¹¹⁾。

医科領域では各種細菌由来 β -lactamase の基質特異性がよく研究され, 本酵素に対する基質の安定性が評価されている¹⁷⁻²¹⁾。ところが, 歯科領域における口腔常在菌が産生する β -lactamase に関する研究は少なく²²⁻²⁴⁾, 基質特異性に関する報告はほとんどみられない。しかし, 口腔以外の感染症から分離した *Prevotella* 属や *Fusobacterium* 属の基質特異性に関する報告は認められる^{25,26)}。

田中ら²²⁾ は *in vitro* で *P. intermedia* MA1 を $100 \mu\text{g/ml}$ ABPC 添加 Todd Hewitt broth で培養後, $1,600 \mu\text{g/ml}$ ABPC 添加 CDC 処方嫌気性菌用血液寒天培地に塗抹すると, ABPC 高度耐性株が 11 株得られ, それらの β -lactamase 活性は親株の 9~23 倍に上昇していたと報告し

ている。

このように *Prevotella* 属は口腔内外の感染症に關与する口腔常在菌で、 β -lactamase を産生する重要な細菌である。

本研究では、田中ら²⁰⁾が選出した *P. intermedia* MA1-V2 とその親株 *P. intermedia* MA1 から抽出した β -lactamase を用いて β -lactam 薬に対する基質特異性と両菌株に対するそれら抗菌薬の MIC を検討し、 β -lactam 薬耐性化の機構について考察した。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株は閉鎖性膿瘍から分離後同定し、当教室で保存している *P. intermedia* MA-1 (β -lactamase 低産生株, MA1) と ampicillin を用いて MA1 から選出した *P. intermedia* MA1-V2 (β -lactamase 高度産生株, MA1-V2) を使用した²⁰⁾。

菌株の保存と前培養は教室の通法に従った²¹⁾。

2. 供試抗菌薬

β -Lactam 薬は合計 28 種用いた。Penicillins は 4 種、penicillin G (PCG, Sigma), ampicillin (ABPC, 和光純薬), piperacillin (PIPC, 富山化学工業) および cloxacillin (MCIPC, 明治製薬) を使用した。Cephalosporins は 15 種、cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), cephalothin (CET, 塩野義製薬), cephaloridin (CER, 塩野義製薬), cefamandole (CMD, 塩野義製薬), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefoperazone (CPZ, ファイザー製薬), cefuroxime (CXM, 日本グラクソ), cefpiramide (CPM, 山之内製薬), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業), cefmenoxime (CMX, 武田薬品工業), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), ceftriaxone (CTRX, プリストルマイヤーズスクイブ), cefpirome (CPR, 塩野義製薬) および cefsulodin (CFS, 武田薬品工業) を用いた。Oral cepheims は 3 種、cephalexin (CEX, 塩野義製薬), cefaclor (CCL, 塩野義製薬) および ceftoram (CFTM, 富山化学工業), cephamycins は 3 種、cefoxitin (CFX, 第一製薬), cefmetazole (CMZ, 三共) および cefbuperazone (CBPZ, 富山化学工業), oxacephem は latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), carbapenem は imipenem (IPM, 萬有製薬), monobactam は aztreonam (AZT, エーザイ) を用いた。 β -Lactamase 阻害剤は 3 種、clavulanic acid (CVA, スミスクラインビーチャム), sulbactam (SBT, ファイザー製薬) および tazobactam (TAZ, 大鵬薬品) を使用した。抗菌薬はいずれも力価の明瞭なものを使用した。

3. MIC 測定法

MIC の測定は、化学療法学会標準法の微量液体希釈法²⁰⁾に準じて行った。感受性測定培地は hemin と vitamin K₁ 添加 trypticase soy broth (HVTSB, Difco,

U. S. A.) を用い、抗菌薬は同培地で 0.13~256 μ g/ml の範囲に希釈した。菌液は CDC 処方嫌気性菌用血液寒天培地²⁰⁾ (血液寒天培地) で 24 時間嫌気ボックス (N₂: 80%, CO₂: 10%, H₂: 10%, 平沢製作所, 東京) 内で培養した供試菌を HVTSB に懸濁して作成後、ウエル当たり 10 μ l (接種菌量は 10⁸ CFU/ウエル) を接種し、24 時間嫌気培養してから MIC を判定した。MIC は濁りの認められないウエルの最小濃度として、力価 μ g/ml で示した。

4. β -Lactamase 活性測定法

1) β -Lactamase 抽出法

HVTSB で前培養した菌液 60 ml を 800 ml の HVTSB に接種し、24 時間嫌気培養した。この菌液を 11,500 \times g で 20 分間遠心 (CR 21, 日立工機, 東京, ローター No. RPR 9-2) 集菌し、0.01 mol リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0, PB) で洗淨した。この菌体を 15 ml の PB に懸濁後、超音波破砕装置 (US-600T, 日本精機, 東京) で 250 μ A で 20 秒間ずつ 4 回、氷冷下で処理して破砕した。ついで、29,000 \times g で 60 分間遠心 (ローター No. RPR 16) した上清に 2% の streptomycin (明治製薬) を添加し、2 時間 4 $^{\circ}$ C 下に放置した。再び 29,000 \times g で 30 分間遠心し、その上清を 0.01 mol PB で 48 時間透析 (MW cutoff 8,000, Biodesign Inc., U. S. A.) した。透析後、29,000 \times g で 30 分間遠心し、その上清を粗酵素液として -80 $^{\circ}$ C で保存した。

2) タンパク質量の測定

タンパク質量は、Lowry et al. 法²⁰⁾で測定した。標準タンパク質は Albumin Bovine FV (ナカライテスク, 京都) を使用した。

3) β -Lactamase 活性測定法

β -Lactamase 活性は分光光度計 (U-2000, 日立製作所, 茨城) を用いて吸光度の減少を測定して算出した。各基質を 100 μ mol になるように 0.01 mol PB に溶解した。この基質溶液 1.2 ml に 0.1 ml の粗酵素液 (最終タンパク質量約 100 μ g) を添加後、すぐ各基質の β -lactam 環が解裂したときにもっとも吸光度の変化の大きい波長で、吸光度の減少を 1~3 分間測定した²¹⁾。酵素反応は 30 $^{\circ}$ C で行った。 β -Lactamase 活性は、1 分間に 1 μ mol の基質を分解する酵素量を 1 Unit とし、1 mg タンパク質当たりの比活性 (Units/mg of protein, U/mg p) で示した。

4) 基質親和性の測定法

MA1-V2 β -lactamase と各基質の親和性はミカエリス定数 (K_m) と最大速度 (V_{max}) を求めて比較した。すなわち、25~200 μ mol の基質濃度で β -lactamase 活性を測定した結果を用いて、Lineweaver-Burk の式から K_m と V_{max} を算出した²²⁾。

5) 阻害効果の測定法

阻害効果は、阻害定数 (Ki)³⁹⁾ と IC₅₀³⁹⁾ を求めて判定した。阻害剤は、MA1-V2 β -lactamase 活性が検出されなかった抗菌薬と 3 種 β -lactamase 阻害剤を供試した。阻害剤の濃度は 0.1~100 μ mol で使用した。酵素反応は基質 100 μ mol CEZ 1.1 ml に阻害剤 0.1 ml, ついで粗酵素液 0.1 ml を添加して吸光度の減少を測定した。Ki は Dixon プロット法³⁹⁾ で、IC₅₀ は阻害剤を添加しなかった時の吸光度の 50 % になる濃度をそれぞれ算出して求めた。

II. 結 果

1. β -Lactam 薬感受性とそれら抗菌薬に対する β -lactamase 活性

1) Penicillins の場合

供試 2 菌株に対する penicillins の MIC と供試菌由来酵素の penicillins 分解性を Table 1 に示した。酵素活性を測定したとき、1 分間当たりの吸光度の減少が検出されなかった抗菌薬は、本実験法では検出できないとして ND で示した。

MA1-V2 に対する供試 penicillins の MIC はいずれも >256 μ g/ml, β -lactamase 活性も 0.122~0.339 U/mg p を示し、MIC が大きいと酵素活性も高かった。これに対し、親株の MA1 では供試 penicillins の MIC は \leq 2 μ g/ml と小さく、 β -lactamase 活性は基質 PIPC と MCIPC では検出されず、基質 PCG と ABPC では 0.008~0.011 U/mg p と低かった。

2) Cephalosporins, oral cephems および cephamycins の場合

Cephalosporins は第 1, 第 2 および第 3 世代をそれぞれ 3, 4 および 8 種用いた。MA1-V2 に対する cephalosporins (CFS を除く) の MIC は世代に関係なく大きく、ほとんどが \geq 256 μ g/ml であった。 β -Lactamase 活性は基質の種類によって異なるが、第 1 と第 2 世代抗菌薬を基質としたとき \geq 0.136 U/mg p と高く、MIC と酵素活性は平行していた。しかし、第 3 世代抗菌薬を基質としたとき、酵素活性は CZX と CAZ を除く抗菌薬に対して高く (0.178~0.750 U/mg p),

両者は平行していたが、CZX と CAZ を基質としたときの酵素活性は低く (それぞれ 0.035 と 0.007 U/mg p), MIC と酵素活性は平行しなかった。CFS では MIC が小さく、酵素活性も検出されず、他の cephalosporins とは異なった傾向を示した (Table 2)。

MA1 に対する cephalosporins の MIC も penicillins 同様に小さく、 \leq 2 μ g/ml であった。酵素活性は数種抗菌薬を基質としたとき検出されたが、世代分類に関係なく小さく、その値は 0.003~0.053 U/mg p の範囲を示した (Table 2)。

MA1-V2 に対する oral cephems の CEX, CCL (第 1 世代抗菌薬) および CFTM (第 3 世代抗菌薬) の MIC はいずれも \geq 128 μ g/ml と大きく、基質 CCL と CFTM では β -lactamase 活性も高く、両者は平行していた。しかし、基質 CEX の場合 β -lactamase 活性は 0.021 U/mg p と、CCL や CFTM の約 1/10 であり、MIC と β -lactamase 活性は平行しなかった。MA1 に対するこれら抗菌薬の MIC は \leq 0.5 μ g/ml と小さく、 β -lactamase 活性も \leq 0.006 U/mg p であった (Table 2)。

Cephamycins は第 2 世代の CFX と CMZ および第 3 世代の CBPZ の 3 種を用いた。MA1-V2 に対するこれら抗菌薬の MIC は penicillins, cephalosporins および oral cephems の値より小さく、16~64 μ g/ml であった。これら抗菌薬を基質にしたとき、酵素活性は基質 CBPZ で 0.009 U/mg p 検出されたが、残りの抗菌薬を基質にしたときは検出されなかった。MA1 に対するこれら抗菌薬の MIC は 0.25~0.5 μ g/ml であった。これら抗菌薬を基質にしたとき、MA1 β -lactamase の活性は検出限界以下であった (Table 2)。

3) LMOX, IPM および AZT の場合

MA1-V2 に対する LMOX と AZT の MIC は大きかったが、これら抗菌薬を基質にしたとき、Table 中には記載しなかったが、 β -lactamase 活性は検出限界以下であった。MA1-V2 に対する IPM の MIC は \leq 0.13 μ g/ml と小さく、また、 β -lactamase 活性も検出限界

Table 1. Susceptibility of β -lactamase-producers to penicillins and their β -lactamase activity

Drug	<i>P. intermedia</i>			
	MA1-V2		MA1	
	MIC (μ g/ml)	β -lactamase activity (U/mg p ^a)	MIC (μ g/ml)	β -lactamase activity (U/mg p ^a)
Penicillin G	>256	0.122	\leq 0.13	0.008
Ampicillin	>256	0.154	\leq 0.13	0.011
Piperacillin	>256	0.339	\leq 0.13	ND
Cloxacillin	>256	0.174	2	ND

MA1-V2: high β -lactamase producer, MA1: low β -lactamase producer

ND: not determined

^a units of protein per mg

Table 2. Susceptibility of β -lactamase-producers to cephalosporins, oral cepheims and cephamycins, and their β -lactamase activity

Drug	Generation	<i>P. intermedia</i>			
		MA1-V2		MA1	
		MIC (μ g/ml)	β -lactamase activity (U/mg p)	MIC (μ g/ml)	β -lactamase activity (U/mg p)
Cephalosporins					
Cefazolin	I	128	0.814	2	0.014
Cephalothin	I	>256	0.348	0.5	0.014
Cephaloridine	I	>256	0.978	≤ 0.13	0.003
Cefamandole	II	>256	0.182	1	ND
Cefotiam	II	>256	0.153	0.5	ND
Cefoperazone	II	256	0.136	0.5	0.006
Cefuroxime	II	>256	0.533	1	0.008
Cefpiramide	III	256	0.178	≤ 0.13	0.009
Cefotaxime	III	>256	0.366	≤ 0.13	0.037
Ceftizoxime	III	>256	0.035	1	ND
Cefmenoxime	III	>256	0.211	≤ 0.13	ND
Ceftazidime	III	256	0.007	2	ND
Ceftriaxone	III	>256	0.257	≤ 0.13	ND
Cefpirome	III	>256	0.750	≤ 0.13	0.053
Cefsulodin	III	16	ND	0.5	ND
Oral cepheims					
Cephalexin	I	128	0.021	0.5	0.006
Cefaclor	I	>256	0.216	0.5	ND
Cefteram	III	256	0.182	≤ 0.13	ND
Cephamycins					
Cefoxitin	II	32	ND	0.5	ND
Cefmetazole	II	16	ND	0.25	ND
Cefbuperazone	III	64	0.009	0.25	ND

ND: not determined

以下であった。MA1 に対する AZT の MIC は 64 μ g/ml でこれまで述べてきた抗菌薬のなかではもっとも大きい値を示した。LMOX と IPM の MIC は小さかった。 β -Lactamase 活性はこれらを基質にしたとき認められなかった (Table 3)。

2. MA1-V2 β -lactamase の相対分解率

本研究に使用した粗酵素の相対分解率は第 1 世代 cephalosporins の CEZ に対する値で示した (Fig. 1)。

供試 penicillins の相対分解率は 15~42 % で、CEZ の半分以下であった。

本酵素は第 1 世代 cephalosporins の CER を CEZ よりも多く分解したが、CET は CEZ の約 50 %、oral cepheims の CEX と CCL は ≤ 30 % しか分解しなかった。第 2 世代 cephalosporins を基質にしたとき、CXM を除く残りの基質の相対分解率はいずれも CEZ の ≤ 30 % の値を示した。しかし、CXM の場合は 65 % と他の基質より高かった。CPR を除く第 3 世代 cephalosporins、oral cepheims の CFTM および cephamycins の CBPZ の相対分解率は、いずれも ≤ 50 % であったが、CPR では 92 % と高い値を示した。相対分解率は基質によって大きく異なるが、概して第 1 世代 cephalosporins よりも第 2、第 3 世代抗菌薬の値が小

Table 3. MIC of latamoxef, imipenem and aztreonam against β -lactamase-producer *Prevotella intermedia*

Drug	Generation	<i>P. intermedia</i>	
		MA1-V2	MA 1
Latamoxef	III	128	1
Imipenem		≤ 0.13	≤ 0.13
Aztreonam		256	64

さかった。CFS, CFX, CMZ, LMOX, IPM および AZT の場合は β -lactamase 活性が検出限界以下のため、相対分解率は求められなかった。

3. MA1-V2 β -lactamase の基質親和性

本酵素活性が検出された抗菌薬の基質親和性を明らかにするために粗酵素液を用いて各基質に対する K_m と V_{max} を求めた結果が Table 4 である。基質の親和性は本来精製酵素を用いるべきであるが、本酵素の精製が現段階では困難であったので、粗酵素を用いて調べた。

Penicillins に対する K_m は 6.3~466.7 μ mol で、MCIPC の値がもっとも小さく、PIPC の値がもっとも大きかった。

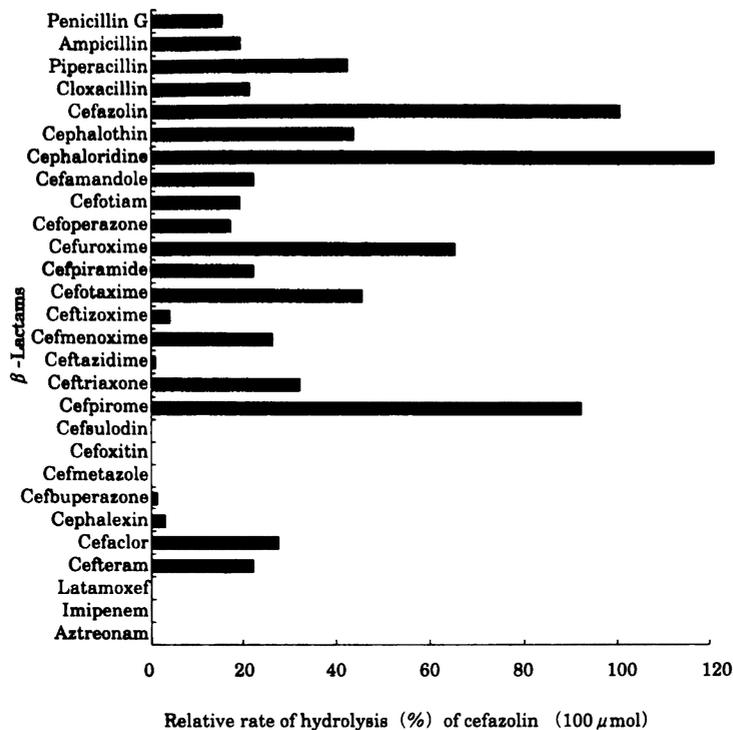


Fig. 1. Substrate profiles of crude enzyme from *Prevotella intermedia* MA1-V2.

Table 4. Kinetic parameters of various β -lactams for crude *Prevotella intermedia* MA1-V2 β -lactamase

Drug	Km (μ mol)	V_{max} (μ mol/min/ mg p)	Relative V_{max}^a (%)	Relative V_{max}/K_m
Penicillins				
Penicillin G	244.5	0.52	43	0.18
Ampicillin	22.1	0.25	21	0.95
Piperacillin	466.7	1.49	122	0.26
Cloxacillin	6.3	0.17	14	2.22
Cephalosporins				
Cefazolin	216.6	1.22	100	0.46
Cephalothin	19.4	0.30	25	1.29
Cephaloridine	1,146.7	10.21	836	0.73
Cefamandole	52.4	0.15	12	0.23
Cefotiam	6.8	0.13	11	1.62
Cefoperazone	388.0	0.46	38	0.10
Cefuroxime	235.2	1.71	140	0.60
Cefpiramide	109.2	0.32	26	0.24
Cefotaxime	1,479.4	5.47	448	0.30
Ceftizoxime	68.3	0.03	2	0.03
Cefmenoxime	49.5	0.26	21	0.42
Ceftriaxone	2,141.7	4.79	393	0.18
Cefpirome	279.9	0.89	73	0.26
Oral cepheams				
Cephalexin	1,101.2	0.27	22	0.02
Cefaclor	438.5	2.29	188	0.43
Ceferam	369.3	0.94	77	0.21

^a Relative V_{max} values are expressed in relation to the V_{max} for cefazolin which was considered to be 100%

Cephalosporins に対する K_m は CTM の $6.8 \mu\text{mol}$ ~ CTRX の $2,141.7 \mu\text{mol}$ の範囲で認められた。これらの値は基質間で著しく異なっていたが、世代間における相違はみられなかった。

Oral cepheams に対する K_m は $369.3 \sim 1,101.2 \mu\text{mol}$ で、CCL と CFTM に対する K_m はほぼ類似していたが、CEX のそれは大きかった。

基質 CEZ に対する本酵素の V_{max} は $1.22 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg p}$ であった。各基質に対する V_{max} をこの値に対する比率 (%) で示すと、第 1 世代の CER と CCL、第 2 世代の CXM、第 3 世代の CFX、CTX、CTRX および penicillins の PIPC に対する値は CEZ のそれより大きかった。特に、CER では CEZ の約 8 倍、CTX では約 4.5 倍の速さを示した。これ以外の基質に対する V_{max} はいずれも CEZ に対する値よりも低かった。Relative V_{max}/K_m の値が 1.00 を越えた基質は MCIPC、CTM および CET であった。これら以外の基質に対する値は 1.00 以下で、最小は CEX の 0.02 であった。

4. 阻害効果

MA1-V2 β -lactamase に対する CZX, CAZ, CFS および AZT の K_i と IC_{50} はすべて $>100 \mu\text{mol}$ であった。しかし、cephamycins の CFX と CMZ の K_i は 0.90 と $0.62 \mu\text{mol}$ 、 IC_{50} は 0.70 と $0.25 \mu\text{mol}$ と小さかった。残りの cephamycins の CBPZ と LMOX および IPM の K_i は $2.85 \sim >100 \mu\text{mol}$ 、 IC_{50} は $13.50 \sim 33.25$

Table 5. IC₅₀ and Ki values of various β -lactams for crude *Prevotella intermedia* MA1-V2 β -lactamase

Drug	IC ₅₀ (μ mol)	Ki (μ mol)
Cephalosprins		
Ceftizoxime	>100	>100
Ceftazidime	>100	>100
Cefsulodin	>100	>100
Cephamycins		
Cefoxitin	0.70	0.90
Cefmetazole	0.25	0.62
Cefbuperazone	33.25	>100
Oxacephems		
Latamoxef	26.00	27.39
Carbapenems		
Imipenem	13.50	2.85
Monobactams		
Aztreonam	>100	>100
β -Lactamase inhibitors		
Clavulanic acid	0.13	ND
Sulbactam	0.23	ND
Tazobactam	0.25	ND

IC₅₀: concentration of inhibitor required to inhibit the 100 μ mol cefazolin rate of destruction by 50%

ND: not determined

μ mol を示した。 β -Lactamase 阻害剤の IC₅₀ は CVA, SBT および TAZ ではそれぞれ 0.13, 0.23 および 0.25 μ mol と小さかった (Table 5)。

III. 考 察

ある細菌に対する β -lactam 薬耐性と細菌の β -lactamase 産生性がよく相関することが、*Bacteroides fragilis* group, non-*B. fragilis* group rod (*Prevotella* と *Porphyomonas*), *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* などで報告されている^{12,13,34})。また、 β -lactamase の基質分解量や基質特異性に関する報告は *Pseudomonas aeruginosa*^{21,35}), *Enterobacter cloacae*²¹), *Fusobacterium nucleatum*²⁶), *Staphylococcus aureus*³⁶) などみられる。しかし、口腔常在菌における基質分解量や基質特異性に関する報告は少ない²⁴)。山田ら³⁷)、山本ら³⁸) は *Prevotella* 属と *Capnocytophaga* 属で基質 CEZ と ABPC の分解性と MIC の関係を調べ、 β -lactamase 活性 ≥ 0.03 U/mg p のとき MIC が ≥ 50 μ g/ml を示す割合が高くなると述べている。

本研究で供試菌に対する各種 β -lactam 薬の MIC と酵素活性 (基質分解速度) の関係を調べた。その結果、MA1-V2 では、MIC が大きいとき (≥ 128 μ g/ml), β -lactamase 活性 (penicillins 0.122~0.339 U/mg p, cephalosporins 0.136~0.978 U/mg p, oral cepems 0.182~0.216 U/mg p) も高かった。逆に、MA1 では MIC が小さいとき、 β -lactamase の基質分解速度が遅かった。このように MIC と酵素活性はよく平行していた。この事実、*B. fragilis* の β -lactam 薬耐性でも述べられているように、 β -lactam 薬に対する高度耐性

化に本菌が産生する不活化酵素が深く関与していることを示唆している^{39,40})。しかし、酵素活性は供試抗菌薬によって異なっており、酵素活性が MIC に完全に反映しているとは考えられない。

MA1-V2 株は IPM と CFS を除く供試 26 抗菌薬に交叉耐性を示した。その背景には、CZX, CAZ, CEX, CFX, CMZ, CBPZ, LMOX および AZT を除く 18 基質に対する本菌産生の β -lactamase が高い活性を示していることが関与していると推定される。

MA1-V2 β -lactamase で酵素活性が検出された 20 抗菌薬に対する本酵素の Km を測定すると、6.3~2,141.7 μ mol であり、抗菌薬の種類によって値は異なっていたが、多くの酵素で示されている最適範囲 (6×10^{-3} ~ 2×10^{-4} mol) 内であった⁴¹)。Km は平均して大きく、酵素と基質の親和性はそれほど高いとは考えられなかった。CEZ を 100 として V_{max} を示すと、Km 値同様抗菌薬の種類によって著しく異なり、相対値は 2~836 % であった。本研究では、Km が V_{max} より大きかった。この傾向は *B. fragilis*⁴²) と同様であるが、*P. aeruginosa*³⁵) の場合とは異なっていた。供試 β -lactam 薬のなかでどの基質が本酵素に適しているかを推定するために relative V_{max}/Km⁴²) を求めたところ、MCIPC, CTM, CET, ABPC および CER の順に基質は良好であることが示唆されたが、基質親和性と酵素活性の間には特別な関係は見出せなかった。

MA1-V2 β -lactamase の基質 CEZ に対する第 1 世代 cephalosporins の相対分解率は、第 2, 第 3 世代 cephalosporins をはじめとする供試抗菌薬の値より高かった。このことは、本酵素がこれら抗菌薬を基質としたとき多く分解する可能性を示唆している。また、本酵素は oxyiminocephalosporins (CTX, CZX, CMX, CTRX, CPR および CFTM) を比較的よく分解した (0.035~0.750 U/mg p) ので oxyiminocephalosporinase⁴³) と考えられる。

MIC は大きい、 β -lactamase 活性が低いあるいは検出されなかった 9 抗菌薬 (CZX, CAZ, CFS, CEX, CFX, CMZ, CBPZ, LMOX および AZT) と両者とも小さい IPM の Ki と IC₅₀ を求めた。その結果、CZX, CAZ, CFS および AZT では Ki, IC₅₀ ともに >100 μ mol であり、酵素とこれら抗菌薬の親和性は、基質 CEZ との親和性より低いと考えられる。CFX, CMZ, CBPZ, LMOX および IPM では、Ki は 0.62~>100 μ mol, IC₅₀ は 0.25~33.25 μ mol と小さく、本酵素とこれら抗菌薬は高い親和性を示すと考えられた。さらにこれら抗菌薬は MA1-V2 β -lactamase に対して安定であると推定される。 β -Lactamase 阻害剤の IC₅₀ は口腔以外の感染症から分離した *P. intermedia* の値⁴⁴) より大きい、いずれも MA1-V2 β -lactamase 活性を強く阻害した。したがって、真下ら⁴⁵) が報告し

ているように β -lactam 薬とこれら阻害剤の配合剤が β -lactamase 高度産生性 *P. intermedia* に起因する感染症の治療に応用できると考えられる。

9 抗菌薬 (CZX, CAZ, CFS, CEX, CFX, CMZ, CBPZ, LMOX および AZT) に対する MA1-V2 の耐性化の原因は本酵素によるとは考えられず、山田ら³⁷⁾、山本ら³⁸⁾ が述べているように複数の耐性機構の存在を考慮し、今後、外膜透過性障害やペニシリン結合タンパク質との親和性の変化についても本菌で検討する必要がある。

親株の MA1 β -lactamase 活性は、MA1-V2 β -lactamase に比べて著しく低かった (0.001~0.053 U/mg p) が、17 β -lactam 薬を分解した。この事実は、田中ら²⁰⁾ も述べているように β -lactamase の低度産生株から β -lactam 薬 (本研究では ABPC) によって β -lactamase 産生能の変異した菌株が選択され、結果的に β -lactam 薬高度耐性株 (交叉耐性を示す菌株) が口腔常在菌叢から出現する可能性を示唆しており、 β -lactam 薬の投与には細心の注意が必要であると考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり、さまざまなご助言・ご助力を賜りました大阪歯科大学化学講座 鎌田愛子助手、同臨床歯科学研究所 大宮真紀助手に謝意を表します。また、ご援助をいただきました細菌学講座各位ならびに抗菌薬をご提供下さいました各製薬会社に御礼申し上げます。

本研究は大阪歯科大学中央歯学研究所低温実験施設および分析機器施設を使用して行った。関係各位に謝意を表します。

本論文の要旨は第 451 回大阪歯科学会例会 (1996 年 12 月, 大阪市) および第 70 回日本細菌学会総会 (1997 年 3 月, 宇都宮市) において発表した。

文 献

- 1) 菅野治重: 病院内分離菌の動向と菌種別の感染症の特徴。医学微生物学の新しい展開 1993 (加藤延夫 編), p.330~337, 菜根出版, 東京, 1993
- 2) 岩井重富, 張 遠春: 外科領域感染症 1) 起炎菌の変貌。細菌感染症の変貌と化学療法 (松本慶蔵 編), p.111~122, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1993
- 3) Baker P J, Slots J, Genco R J, et al.: Minimal inhibitory concentrations of various antimicrobial agents for human oral anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 24: 420~424, 1983
- 4) 高井亮栄: ヒト歯肉緑下菌垢由来 *Bacteroides* の感受性に関する研究。歯科医学 49: 325~346, 1986
- 5) 西川文男, 尾上孝利: 重度歯周疾患患者の歯周ポケットから分離した黒色素産生性 *Bacteroides* の同定ならびに薬剤感受性に関する研究。歯科医学 53: 299~312, 1990
- 6) Kinder S A, Holt S C, Korman K S: Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. J Clin Microbiol 23: 1127~1133, 1986
- 7) 松本和浩: 閉鎖性の歯槽膿瘍の細菌学的研究。日口外誌 36: 2016~2034, 1990
- 8) 斎木康正, 中川清昌, 山本悦秀: 口腔外科領域閉塞膿瘍からの検出菌の β -lactamase 活性とその薬剤感受性。Chemotherapy 42: 987~996, 1994
- 9) 木下 智, 尾上孝利, 大宮真紀, 他: 歯性感染症から分離した細菌の β -lactam 薬感受性。日本化学療法学会雑誌 43: 1025~1030, 1995
- 10) 木下 智, 尾上孝利, 大宮真紀, 他: 歯性感染症から分離した *Prevotella intermedia* の β -lactam 薬感受性と β -lactamase 活性。日本化学療法学会雑誌 43: 1099~1103, 1995
- 11) 多々見敏章: 歯性感染症における偏性嫌気性菌の病原因子 とくに酵素活性に関する研究。日口外誌 38: 254~270, 1990
- 12) Appelbaum P C, Spangler S K, Jacobs M R: β -Lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 Fusobacteria from 28 U. S. centers. Antimicrob Agents Chemother 34: 1546~1550, 1990
- 13) Jacobs M R, Spangler S K, Appelbaum P C: Beta-lactamase production and susceptibility of US and European anaerobic gram-negative bacilli to beta-lactams and other agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11: 1081~1093, 1992
- 14) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 他: 臨床分離 *Prevotella* spp. の β -ラクタマーゼ産生株の割合と薬剤感受性。第 25 回嫌気性菌感染症研究講演会抄録: 18, 1994
- 15) 中垣直毅: 歯周ポケットにおける病原酵素産生菌の分布。歯科医学 56: 497~508, 1993
- 16) Kornman K S, Loesch W J: The subgingival microbial flora during pregnancy. J Periodontal Res 15: 111~122, 1980
- 17) 渡辺泰雄, 南新三郎, 松原信之, 他: β -Lactamase に対する cefbuperazone の *in vitro*, *in vivo* 安定性。Chemotherapy 33: 753~758, 1985
- 18) 館田一博, 山口恵三, 石井良和, 他: *Vibrio cholerae* non-01 の薬剤感受性成績および β -lactamase 基質特異性について。Chemotherapy 38: 444~449, 1990
- 19) 中根たみ子, 井上邦雄, 三橋 進: Loracarbef の細菌学的評価。Chemotherapy 41 (S-3): 1~9, 1993
- 20) Cullman W: Importance of beta-lactamase stability in treating today's respiratory tract infections. Respiration 60 (S-1): 10~15, 1993
- 21) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39: 1211~1233, 1995
- 22) 田中裕之, 尾上孝利, 北条博一, 他: 口腔感染症由来 *Prevotella intermedia* における β -lactam 剤高度耐性株の選択と β -lactamase 活性の誘導。日口診誌 8: 291~297, 1995
- 23) 田中裕之: *Prevotella intermedia* β -lactamase の精製と性状。日口診誌 9: 69~78, 1996

- 24) Foweraker J E, Hawkey P M, Heritage J, et al.: Novel β -lactamase from *Capnocytophaga* sp.. Antimicrob Agents Chemother 34: 1501~1504, 1990
- 25) Appelbaum P C, Philippon A, Jacobs M R, et al.: Characterization of β -lactamases from non-*Bacteroides fragilis* group *Bacteroides* spp. belonging to seven species and their role in β -lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 34: 2169~2176, 1990
- 26) Tuner K, Lindqvist L, Nord C E: Purification and properties of a novel β -lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. Antimicrob Agents Chemother 27: 943~947, 1985
- 27) 大宮真紀: 学童期小児の唾液中における penicillin G 耐性菌の分布. 歯科医学 55: 173~187, 1992
- 28) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法)—日本化学療法学会標準法—. Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 29) Koneman E W, Janda W M, Allen S D, et al.: The anaerobia bacteria. In Color atlas and textbook of diagnostic microbiology p.406~408, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1988
- 30) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265~275, 1951
- 31) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Bicochem J 139: 789~790, 1974
- 32) 高河原勇: 活性測定法—酵素反応速度論—. 蛋白質酵素の基礎実験法 (堀尾武一, 山下仁平 編), p.383~408, 1981
- 33) Yotsuji A, Minami S, Kakizawa H, et al.: Cephamycin inactivation due to enzymatic hydrolysis by β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 28: 773~777, 1985
- 34) Spangler S K, Jacobs M R, Appelbaum P C: Activity of WY-49605 compared with those of amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, imipenem, ciprofloxacin, cefaclor, cefpodoxime, cefuroxime, clindamycin, and metronidazole against 384 anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 38: 2599~2604, 1994
- 35) Nordmann P, Ronco E, Naas T, et al.: Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 37: 962~969, 1993
- 36) Zygmunt D J, Stratton C W, Kernodle D S: Characterization of four β -lactamase produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 36: 440~445, 1992
- 37) 山田英夫, 尾上孝利: 学童期小児の唾液より分離した β -lactam 剤耐性 *Prevotella* の β -lactamase 活性と外膜透過性. 歯科医学 57: 153~166, 1994
- 38) 山本英樹, 尾上孝利: 急性リンパ性白血病患者の唾液由来 penicillin G 耐性 *Capnocytophaga* の薬剤感受性と β -lactamase 活性. 歯科医学 57: 217~232, 1994
- 39) Britz M L, Wilkinson R G: Purification and properties of beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 13: 373~382, 1978
- 40) Nord C E: Mechanisms of β -lactam resistance in anaerobic bacteria. Rev Infect Dis 8: 543~548, 1986
- 41) 加藤節子: 酵素. スタンダード口腔生化学 (大塚吉兵衛, 他 編), p.103~128, 学建書院, 東京, 1996
- 42) Bandoh K, Muto Y, Watanabe K, et al.: Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 35: 371~372, 1991
- 43) 井上松久: セフェム剤とその耐性機構. 医学微生物学の新しい展開 1993 (加藤延夫 編), p. 288~298, 薬根出版, 東京, 1993
- 44) Appelbaum P C: Comparative susceptibility profile of piperacillin/tazobactam against anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 31 (S-A): 29~38, 1993
- 45) 真下尚人, 尾上孝利: β -Lactamase 阻害剤による菌性感染症由来 *Prevotella intermedia* β -lactamase 活性の阻害. 菌基礎誌 38: 285~298, 1996

Substrate profile of *Prevotella intermedia* MA1 and MA1-V2 β -lactamase

Katsuhiro Funaoka, Takatoshi Onoe and Hirosuke Sagawa

Department of Bacteriology, Osaka Dental University, 5-31 Otemae,
1-chome, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

We determined the susceptibility of low level (*Prevotella intermedia* MA1) and high level (*P. intermedia* MA1-V2) β -lactamase-producers to β -lactam antibiotics and the substrate profile of β -lactamase from these organisms. Twenty-eight β -lactam antibiotics were used. MICs of four penicillins, 12 cephalosporins and two oral cephems for *P. intermedia* MA1-V2 were $\geq 128 \mu\text{g/ml}$, and β -lactamase activity from this organism against these drugs was ≥ 0.122 units of protein per mg. In this organism the MIC value of β -lactams paralleled the β -lactamase activity to substrate these drugs. K_m and V_{max} values of MA1-V2 β -lactamase against these drugs were $6.3\sim 2,141.7 \mu\text{mol}$ and $0.03\sim 10.21 \mu\text{mol/min/mg}$ of protein, respectively. However, it seems that enzyme activity and affinity of the substrate are not associated with the MIC at all. This enzyme hydrolyzed oxyiminocephalosporins, so we concluded that the enzyme is oxyiminocephalosporinase. As cefoxitin, cefmetazole, cefbuperazon, latamoxef and imipenem inhibited the β -lactamase activity against substrate cefazolin, these drugs were stable to β -lactamase producing MA1-V2. β -Lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam and tazobactam) inhibited the activity of β -lactamase against substrate cefazolin. MICs of the β -lactam antibiotic used against MA1 were very low, and β -lactamase from this strain weakly hydrolyzed 17 substrate drugs. These results suggest that MA1-V2 β -lactamase hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics except for cefsulodin, cephamycins, imipenem, latamoxef and aztreonam, and that this enzyme is closely associated with the cross-resistance or high level β -lactam antibiotic resistance of *P. intermedia* MA1-V2.