

【原著・基礎】

喀痰中 β -ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討

石井 良和・馬 晃・山口 恵三

東邦大学医学部微生物学教室*

(平成 11 年 7 月 7 日受付・平成 11 年 9 月 2 日受理)

喀痰から直接 β -ラクタマーゼを検出することを目的に、*Pseudomonas aeruginosa* が分離された喀痰を対象とした β -ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。喀痰からの抽出操作は 30 分以内に終了した。*P. aeruginosa* が 10^6 cfu/ml 存在する喀痰からの抽出液を $100 \mu\text{M}$ のニトロセフィン溶液に添加して 5 分間 37°C で経時的に吸光度を測定したところ、きわめて良好な直線関係を得ることができた。一方、 10^6 cfu/ml の *Enterococcus faecalis* が存在する検体からは β -ラクタマーゼ活性は認められなかった。次に検出された菌量が異なる複数の検体を用いて検出限界に関する検討を行った。その結果、*P. aeruginosa* が 10^5 cfu/ml 以上の菌量が存在する検体からは β -ラクタマーゼ活性が検出された。また、ペニシリナーゼを産生する *Escherichia coli* が 10^7 cfu/ml 存在する喀痰の K_m 値は $127 \mu\text{M}$ と大きな値を示し、セファロスロリナーゼを産生する *P. aeruginosa* の値とは大きく異なった。以上の結果から、今回検討した方法は迅速、簡便かつ高感度で検体から β -ラクタマーゼを検出することが可能な方法であった。

Key words: sputum, β -lactamase activity, nitrocefin, UV method

臨床では感染症の原因菌が同定される以前に経験的な抗菌薬の投与がなされる場合が多いのが現実である。感染症の原因菌と考えられる微生物の耐性因子を検体から直接検出することが可能になれば、菌の分離、同定あるいは薬剤感受性検査の結果が出る以前に、よりの確な抗菌薬の投与が可能になると考えられる。これまでも喀痰からの β -ラクタマーゼ活性の測定に関しては、高速液体クロマトグラフィーを用いる方法が報告されている¹⁾が、操作が煩雑なことから結果が出るまでに時間を要することなどの理由から一般的な方法とはなっていない。

今回は検体から直接、簡便かつ迅速に β -ラクタマーゼを酵素学的方法で検出することを目的として、現在最も高感度な β -ラクタマーゼ検出試薬として知られているニトロセフィンを基質として用いる検出方法の確立を試みた。

I. 材料と方法

1. 対象とした喀痰

呼吸器疾患の患者由来の喀痰で *Pseudomonas aeruginosa* が分離された 9 検体を検討に用いた。さらに、典型的なペニシリナーゼを産生する *Escherichia coli* が分離された喀痰も使用した。なお、喀痰から分離された菌種は Vitek (日本ビオメリュー, 東京) を用いて同定した。

2. 喀痰からの β -ラクタマーゼの抽出方法

喀痰 $200 \mu\text{l}$ を 1.5 ml のマイクロチューブに移し、 $1/15 \text{ M}$ リン酸緩衝液 (pH 7.0) $200 \mu\text{l}$ を加えてホモジナイザーでホモジネート後、 $100,000\times\text{G}$, 4°C にて 15 分間超遠心機を用いて遠心分離し、その上清を酵素液とし

た (Fig. 1)。

3. 分離された菌体からの β -ラクタマーゼの抽出方法

各菌株を L-broth で一夜培養した 5 ml の菌液を $3,500 \text{ rpm}$, 4°C , 15 分間遠心分離して集菌した。その沈査を 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ の同緩衝液に再浮遊した後凍結融解を 5 回繰り返した。その後、 $100,000\times\text{G}$, 4°C , 30 分間の超遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とした (Fig. 2)。

4. β -ラクタマーゼ活性の測定方法

酵素反応は Beckman 自記吸光度計 DU 640 (恒温槽付き) を用いて、基質のニトロセフィン溶液 3 ml に試料酵素液 $50 \mu\text{l}$ を添加して、測定波長 482 nm , 反応温度 37°C の条件²⁾で UV 法³⁾により行った (Table 1)。

実験にさきだち $100 \mu\text{M}$ の濃度のニトロセフィン溶液に *P. aeruginosa* が 10^6 cfu/ml 検出された喀痰からの抽出液、*Enterococcus faecalis* が 10^6 cfu/ml 検出された喀痰からの抽出液を $50 \mu\text{l}$ 添加して 5 分間のタイムスキャンを実施し、酵素との反応性を確認した。

基質のニトロセフィンは $10 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ の濃度の溶液を使用した。酵素活性の算出は、反応開始後 1 分間に生じる OD 値の変化をもとに次式から行った。Activity $=y/1.59\times 0.3\times v$ ($v=3.05/0.05\times 2$, $y=\Delta\text{OD}/\text{min}$) さらに、酵素学的パラメータは、Beckman 自記吸光度計 DU 640 付属の解析ソフトにより、Michaelis-Menten plot から算出した⁴⁾。なお、実験で得られた値は、Lineweaver-Burk plot, Eadie-Hofstee

plot, Hanes-Woolf plot の各プロットも同時に行い、実験値の信頼性を確認した⁴⁾。

5. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は日本化学療法学会が定めた微量液体希釈法に準じて測定した。力価が明らかな piperacillin (富士科学工業株式会社, 東京), imipenem (萬有製薬株式会社, 東京), cefsulodin (武田薬品工業株式会社, 大阪), cefoperazone (ファイザー製薬株式会社, 東京), ceftazidime (日本グラクソ株式会社, 東京), cefepime (プリストル・マイヤーズ・スクイブ株式会社, 東京) および aztreonam (エーザイ株式会社, 東京) の各抗菌薬を対象薬剤とした。なお、培地は Muller-Hinton broth (Difco, USA) を使用し、接種菌量は約 5×10^8 cfu/ml となるように設定した。

II. 結 果

1. ニトロセフィンと喀痰からの抽出液との反応性

P. aeruginosa が 10^8 cfu/ml 検出された喀痰からの抽出液 50 μ l を用い、ニトロセフィン溶液と 5 分間、30 秒毎に吸光度を測定しながら反応させた場合、きわめて良好な直線関係が得られた。同様に *E. faecalis* が喀痰から抽出された溶液の β -ラクタマーゼ活性 10^8 cfu/ml 検出された喀痰からの抽出液を用いて 5 分間、経時的に吸光度を測定したが吸光度の変化は認められなかった (Fig. 3)。

2. 喀痰中 β -ラクタマーゼの活性測定

喀痰中からの抽出操作は 30 分以内に終了した。今回は *P. aeruginosa* が $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml 分離された喀痰を対象に検討を加えた。*P. aeruginosa* が分離された喀痰からは 10^8 cfu/ml の菌量でも十分に β -ラクタマーゼ活性の測定が可能であり、喀痰中に存在する β -ラクタマ

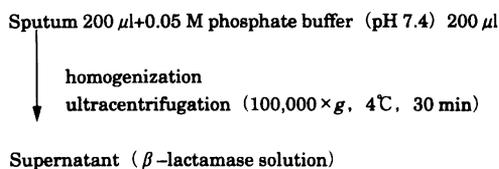


Fig. 1. Preparation of β -lactamase sample from sputum.

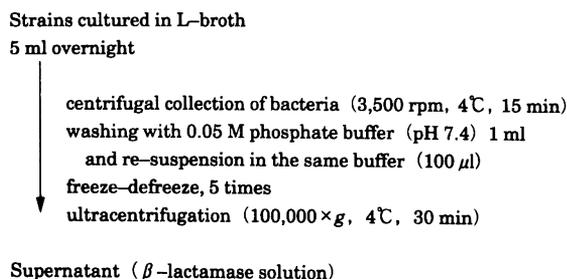


Fig. 2. Preparation of β -lactamase sample from isolated strains.

ーゼの酵素学的パラメータを Michaelis-Menten plot から算出することが可能であった (Table 2)。さらに、そのデータを Lineweaver-Burk plot, Eadie-Hofstee plot, Hanes-Woolf plot の各 plot でも検討したが、いずれの plot にもよくフィットした。

3. 喀痰から分離された菌株の薬剤感受性成績

Table 3 に各喀痰から分離された *P. aeruginosa* の各抗菌薬に対する薬剤感受性試験の成績を示す。I 株を除く菌株の imipenem に対する MIC は 4μ g/ml 以上の値を示した。B 株, C 株および F 株の aztreonam に対する MIC 値はそれぞれ、 4μ g/ml, 8μ g/ml, 2μ g/ml であったが他の菌株は 16μ g/ml 以上の値を示した。

4. 喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性

喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性を Table 4 に示した。C 株および E 株の V_{max} 値がそれぞれ 0.495μ M/sec, 0.673μ M/sec と高い値を示した。一方, A 株および F 株から抽出した β -ラクタマーゼ活性は各々 0.012μ M/sec, 0.011μ M/sec と低い値を示した。

III. 考 察

現在まで、喀痰中 β -ラクタマーゼ活性の測定は、あらかじめ酵素と基質を反応させその分解産物を高速液体クロマトグラフィーで定量して求める方法が報告されている⁵⁾。しかし、この方法は検体の処理がきわめて煩雑であること、迅速に検査が行えないこと、酵素学的パラ

Table 1. β -lactamase activity measurements: methods and conditions

Substrate	Nitrocefim
Substrate conc	10, 25, 100 μ M
Measuring wave length	482 nm
Measuring equipment	Absorption photometer (Beckman DU 640)
Reaction time	1 min
Reaction temp	37 $^{\circ}$ C

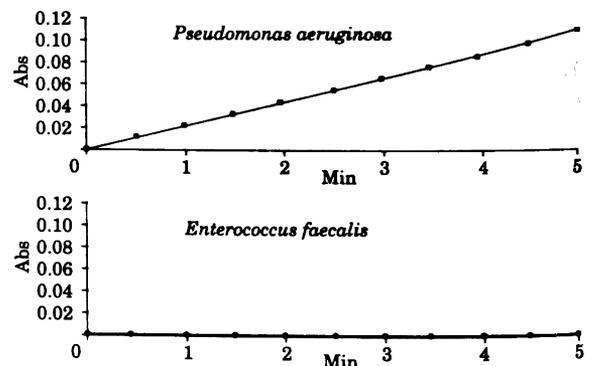


Fig. 3. Time course of absorbance changes in reaction of nitrocefim and extracts of sputum in which *Pseudomonas aeruginosa* or *Enterococcus faecalis* were detected.

Table 2. β -lactamase in sputum: enzymologic parameters

Specimen	Bacterial count (CFU/ml)	V_{max} (μ M/sec)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m
A	10^8	0.132	97.3	0.0035
B	10^7	0.014	23.1	0.0006
C	10^7	0.071	39.2	0.0018
D	10^7	0.093	37.6	0.0025
E	10^8	0.165	33.7	0.0049
F	10^7	0.023	25.2	0.0009
G	10^8	0.059	24.1	0.0024
H	10^8	0.059	22.3	0.0026
I	10^8	0.011	17.4	0.0006
J	10^7	0.005	127.5	<0.0001

Table 3. Drug sensitivity of isolated strains to various β -lactam antibiotics

Drug	MIC (μ g/ml)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Piperacillin	16	8	8	16	128	4	64	>128	4
Imipenem	64	4	16	32	64	16	32	64	2
Cefsulodin	4	16	16	4	64	2	4	64	16
Cefoperazone	64	16	32	16	64	16	16	>128	16
Ceftazidime	16	4	4	4	16	2	8	64	4
Cefepime	16	2	4	4	16	2	8	64	4
Aztreonam	16	4	8	16	16	2	16	64	16

メータを算出することが困難なことなどの理由から一般的な応用には限界があると考えられる。

今回検討した β -ラクタマーゼを検出する方法は、簡便、迅速かつ高感度な方法であった。さらに、酵素学的パラメータを算出することも可能であり、 V_{max} および K_m 値に対する解析を加えれば β -ラクタマーゼの型の推定も可能であるものと考えられた。しかし、現在問題となっている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ⁶⁾や複数の型の β -ラクタマーゼが一つの菌体内に存在する場合⁶⁾などのデータの解析は今後の課題である。しかし、 β -ラクタマーゼ阻害剤を併用し、酵素学的パラメータの詳細な解析を加えれば、喀痰中に存在する β -ラクタマーゼの型もある程度判別することが可能となるものと考えられる。

喀痰中 β -ラクタマーゼの活性と分離された菌種のMICとの間にいくつか食い違う結果が認められた。この結果が乖離した原因として、 β -ラクタマーゼ以外の要因が薬剤感受性に影響していることの他に、MIC測定をした菌株が、喀痰中に存在する多数の菌株の中の一部の菌株であることが挙げられる。すなわち、測定した菌株のMIC値は、喀痰中の β -ラクタマーゼ活性が、

Table 4. β -lactamase extracted from isolated strains: enzymologic parameters

Specimen	V_{max} (μ M/sec)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m
A	0.012	18.0	0.001
B	0.114	29.3	0.004
C	0.495	42.7	0.012
D	0.150	30.9	0.005
E	0.763	66.8	0.011
F	0.011	16.0	0.001

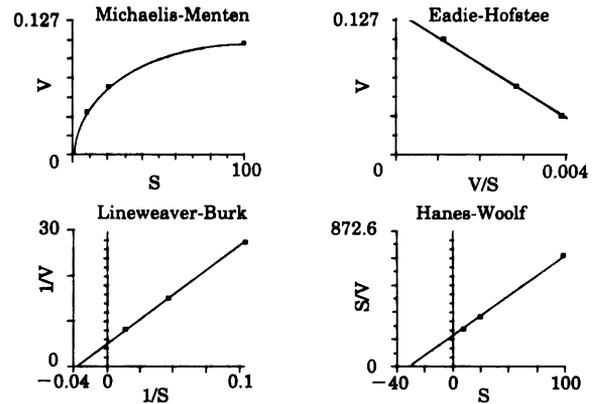


Fig. 4. Various plottings observed while calculating enzymologic parameters.

喀痰中に存在するすべての菌株の β -ラクタマーゼ活性を表わすものではないと考えられる。

一方、今回報告した方法の問題点としては、検体を採取した時点で抗菌薬が投与されている場合が挙げられる。すなわち、喀痰中の β -ラクタマーゼと投与された β -ラクタム系抗菌薬が結合している場合、正確な酵素学的パラメータを得ることはできないと考えられる。したがって、この方法を実施する場合に重要なことは、患者に投与されている抗菌薬の情報を得ることである。さらに、喀痰の塗抹検鏡の情報を加味することにより起炎菌の推定にも役立つと考えられた。

今後は喀痰以外の検体中に存在する β -ラクタマーゼの活性測定に関する検討を加えるとともに、さまざまな型の β -ラクタマーゼの酵素学的パラメータに関するデータを収集し、更なる応用の可能性について検討を加える予定である。

謝 辞

本研究の一部は平成9年度、平成10年度の厚生省科学研究補助金、新興・再興感染症研究事業、「細菌の薬剤耐性分子機構の解明と耐性機序別迅速検出法に関する研究」ならびに平成10年度東邦大学医学部プロジェクト研究(助成番号: 10-9)により行った。

本研究の一部は、馬 晃が受けた日中医学協会-日本財団補助金(1999年度日中医学術交流助成事業)に

より実施した。

文 献

- 1) 斎藤 厚, 草野展周, 普久原浩, 他: 呼吸器感染症における clindamycin の臨床効果の検討—clindamycin の β -lactamase 産生抑制作用を中心に—. *Chemotherapy* 41: 1232~1245, 1993
- 2) O'Callaghan C H, Morris A, Kirby S M, et al.: Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1: 283~288, 1973
- 3) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 789~790, 1974
- 4) Cleland W W: Determining the mechanism of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45: 273~387, 1977
- 5) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1211~1233, 1995
- 6) Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, et al.: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1181~1186, 1998

Novel method to determine β -lactamase activity in sputum

Yoshikazu Ishii, Lin Ma and Keizo Yamaguchi

Toho Univ., Sch. of Medicine, Dept. of Microbiology, 5-21-16, Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

In order to detect β -lactamases in sputum directly, we developed a method to determine β -lactamase activity for *Pseudomonas aeruginosa* isolated from sputum specimens. The extraction procedures from sputum were carried out within 30 minutes. A satisfactory linear relationship was obtained when extracts from sputum containing *P. aeruginosa* (10^8 cfu/ml) were added to $100\ \mu\text{M}$ nitrocefin solution and absorbance was measured for 5 minutes at 37°C . On the other hand, β -lactamase activity was not identified with samples of *Enterococcus faecalis* (10^5 cfu/ml). Subsequently, we examined the detection limit using samples with different bacterial quantities and found as a result that β -lactamase activity could be detected with samples of *P. aeruginosa* of 10^6 cfu/ml and above. In addition, the K_m value of sputum containing penicillinase-producing *Escherichia coli* (10^7 cfu/ml) was as high as $127\ \mu\text{M}$ and significantly differed from those values for cephalosporinase-producing *P. aeruginosa*. These results suggested that this newly developed method was able to detect β -lactamase activity in sputum samples quickly, conveniently and sensitively.