

## $\beta$ -ラクタマーゼの酵素阻害剤によるクラス鑑別法の検討

澤井 哲夫・小原 康治・大沼 雅江・中村 昭夫・内藤 泰代・仲澤 今日子

千葉大学薬学部微生物薬品化学研究室\*

(平成 11 年 9 月 13 日受付・平成 12 年 1 月 12 日受理)

臨床分離菌の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼのクラス A, B, C および D へのクラス鑑別を, 3 種の  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を利用して簡便, 迅速に行う方法を考案した。阻害剤としてクラブラン酸, カルバペネム誘導体 (J-110, 441) およびモノバクタム誘導体 (Syn-2161) を用いた。J-110, 441 および Syn-2161 はそれぞれ, クラス B  $\beta$ -ラクタマーゼおよびクラス C  $\beta$ -ラクタマーゼに対する新阻害物質である。アンピシリン抗菌活性 (MIC) への阻害剤併用効果から, 被験菌の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼのクラス鑑別を行った。生産する  $\beta$ -ラクタマーゼ活性とそのクラスの明らかな 7 菌種, 計 14 菌株を被験菌として本鑑別法を適用し, クラス A/D, クラス B, クラス C の各生産菌を MIC パターンから鑑別できた。MIC 測定は一般的な微量液体希釈法を用いたが, ATP-bioluminescence 法 (Hattori N., et al. Antimicrob. Agents Chemother., 42: 1406~1411, 1998) を適用すると, 鑑別時間は 5 分の 1 以下に短縮でき, 同一の判定結果が得られた。

**Key words:**  $\beta$ -lactamase class,  $\beta$ -lactam-resistance,  $\beta$ -lactamase inhibitors, rapid MIC assay

$\beta$ -ラクタマーゼは多くの病原細菌の  $\beta$ -ラクタム薬耐性の原因となる薬剤不活化酵素群である<sup>1)</sup>。酵素タンパク質アミノ酸配列の相同性から, クラス A~D の 4 クラスに分類される<sup>2,3)</sup>。このクラス分けは  $\beta$ -ラクタマーゼ分類法として現在広く用いられ, またもっとも客観的な分類法である。クラス A, C, D は活性中心にセリンを持つセリン  $\beta$ -ラクタマーゼに属し, クラス B は活性中心に亜鉛を持つメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼであり, セリン  $\beta$ -ラクタマーゼとは異なる加水分解酵素である。基質特異性では, クラス A はペニシリナーゼ, クラス C はセファロスポリナーゼ, クラス D はオキサシリン分解型ペニシリナーゼ, にそれぞれ相当する。クラス B のメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼはカルバペネム薬を含む広範な基質特異性を持つ  $\beta$ -ラクタマーゼである。これらに加え近年, クラス A および C ではオキシミノ系  $\beta$ -ラクタム薬などの難分解性  $\beta$ -ラクタム薬へ適応した変異酵素 (基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ) が出現している<sup>4,5)</sup>。特にクラス A 変異酵素は ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) の名称で知られる。

細菌感染症に対する適切な  $\beta$ -ラクタム薬選択には, 起因菌の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼの酵素化学的特性の情報が必要であり, 臨床分離株の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼの簡便なクラス鑑別法が望まれる。本研究では, クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼの阻害剤として知られるクラブラン酸 (CVA), 新たに開発されたクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤 (J-110,441) とクラス C  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤 (Syn-2161) の 3 阻害剤を用い, アンピシリン (ABPC) の MIC におよぼす阻害剤併用効果から  $\beta$ -ラクタマーゼのクラス鑑別を試みた。さら

に, 細菌細胞内 ATP 量を指標として MIC を測定する ATP-bioluminescence 法<sup>6)</sup>を適用することにより, 鑑別時間を大幅に短縮することを行った。

### I. 材料と方法

#### 1. 菌株と R プラスミド

Table 1 に示した 7 菌種, 計 16 菌株および R プラスミド宿主として *Escherichia coli* ML 1410 を使用した。*E. coli* ML 1410 は *E. coli* K 12 由来のナリジクス酸耐性変異株である<sup>7)</sup>。5 種のプラスミド (RGN 823, RGN 14, RDK 4, RGN 238, pMTY 010) はそれぞれ TEM-II  $\beta$ -ラクタマーゼ, TEM-I  $\beta$ -ラクタマーゼ, メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ, OXA-1  $\beta$ -ラクタマーゼ, 基質特異性拡張型クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ (Toho-1 ESBL), の酵素遺伝子を持つ。*Citrobacter freundii* GN 346/RGN 823 は染色体性クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌に RGN 823 を導入して作成した 2 種  $\beta$ -ラクタマーゼ生産株である。その他の菌株は染色体性  $\beta$ -ラクタマーゼ生産株である。

#### 2. $\beta$ -ラクタム薬と $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤

ABPC は明治製菓, CVA はスミスクライン・ビーチャム製菓, カルバペネム誘導体 (J-110,441) は萬有製菓, モノバクタム誘導体 (Syn-2161) は大鵬薬品工業よりそれぞれ分与された原末を使用した。

#### 3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC の測定は日本化学療法学会の規定に準じ, 微量液体希釈法<sup>15)</sup>により行い  $\mu\text{g/mL}$  で表した。菌体内 ATP の定量にもとづく ATP-bioluminescence 法による MIC

Table 1. List of the  $\beta$ -lactamase-producing bacteria employed

$\beta$ -lactamase	Strain	Ref.
Class A	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 823	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 14	Sawai et al. <sup>9)</sup>
	<i>K. pneumoniae</i> GN 69	Sawai et al. <sup>9)</sup>
	<i>P. mirabilis</i> N-29	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
	<i>P. vulgaris</i> GN 76/C 1	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
Class B	<i>E. coli</i> ML 1410/RDK 4	Yamaguchi et al. <sup>10)</sup>
Class C	<i>E. coli</i> 255	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
	<i>C. freundii</i> GN 346	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
	<i>E. cloacae</i> P 99	Galleni et al. <sup>11)</sup>
	<i>E. cloacae</i> 363	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
	<i>M. morgani</i> 1510	Sawai et al. <sup>8,9)</sup>
Class D	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 238	Sawai et al. <sup>9)</sup>
Extended-spectrum Class A (Toho-1, ESBL)	<i>E. coli</i> ML 1410/pMTY 010	Ishii et al. <sup>12)</sup>
Extended-spectrum Class C	<i>E. cloacae</i> GC 1	Nukaga et al. <sup>13)</sup>
	<i>C. freundii</i> GC 3	Haruta et al. <sup>14)</sup>
Production of two kinds of $\beta$ -lactamases (class A and C)	<i>C. freundii</i> GN 346/RGN 823	This paper

測定は Hattori らの改良法<sup>6)</sup>を用いた。

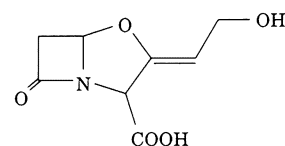
## II. 結 果

### 1. $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の性質

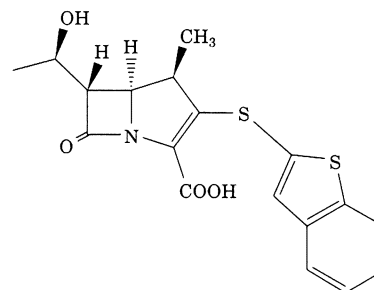
CVA はクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼの阻害剤として利用されている。その酵素阻害様式は安定な酵素-阻害剤の共有結合体形成による progressive inactivation (漸進的不活化) である<sup>16)</sup>。J-110, 441<sup>17)</sup> はクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼ, Syn-2161<sup>18)</sup> はクラス C  $\beta$ -ラクタマーゼに対するそれぞれ特異的な新阻害剤である。これら 3 種の  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の化学構造を Fig. 1 に示す。カルバペネム誘導体である J-110, 441 は、基質アナログとしてクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼに対し拮抗阻害剤として作用する<sup>17)</sup>。アズトレオナムなどのモノバクタム薬は強い抗菌力と共に、クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼの強力な阻害剤として作用し、その阻害様式は progressive inactivation である<sup>19)</sup>。モノバクタム薬の抗菌力を著しく低め、阻害剤としての性質を残した誘導体が Syn-2161 である。本研究の使用菌株に対する 3 阻害剤の MIC 値は 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  またはそれ以上であり、阻害剤としての使用濃度は MIC 値の 5 分の 1 以下を用いた。

### 2. ABPC との併用による阻害剤最適濃度の設定

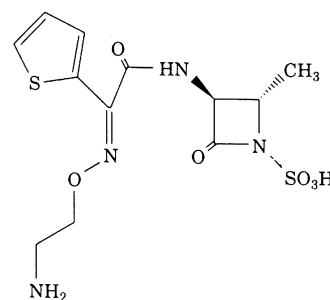
阻害剤と併用する  $\beta$ -ラクタム薬としては、クラス A ~ D  $\beta$ -ラクタマーゼのいずれの生産によってもその MIC 値が大きく影響を受けるものが望ましい。また、臨床分離菌の薬剤感受性測定で一般的に使用される薬剤であることが実用的である。以上の要件を考慮し、ABPC を併用薬とした。微量液体希釈法による阻害剤効果測定では、阻害剤濃度を 1 濃度に固定することが実用的である。使用菌株より代表的な 8 菌株を選択し、各阻害剤濃度での ABPC の MIC を測定し、効果的な阻害剤濃



Clavulanic acid (CVA)



J-110,441



Syn-2161

Fig. 1. Structures of the inhibitors used in this study.

度を定めた。Table 2 に Syn-2161 の測定例を示した。この場合、Syn-2161 濃度は 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を採用した。同様に CVA と J-110,441 の使用濃度を実験的に検討し、それぞれ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

3.  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌に対する阻害剤併用効果  
 クラス A~D の生産菌および  $\beta$ -ラクタム薬感受性 *E. coli* に対して、各阻害剤一定濃度下での ABPC の MIC を測定した (Table 3)。これら菌株または R プラスミドの  $\beta$ -ラクタマーゼの酵素化学的性質はすでに解析されている。クラス A 生産菌に対して、CVA はすべてに阻害剤効果を示し、Syn-2161 ではまったく観察されなかった。J-110,441 では *Klebsiella pneumoniae* および *Proteus vulgaris* の染色体性クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌で阻害剤効果が見られるが、その他のプラスミド性  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌では観察されない。クラス B 生産菌では J-110,441 により明瞭な阻害剤効果が観察された。クラス C 生産菌はすべて Syn-2161 による顕著な阻害剤効果が観察された。クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼはすべて染色体性酵素であるが、*Morganella morganii* のみが J-110,441 の影響を受けた。クラス D  $\beta$ -

ラクタマーゼは典型的なペニシリナーゼ型基質特異性を持つプラスミド性酵素であり、阻害剤効果はプラスミド性クラス A 酵素生産菌と差異がみられなかった。

Toho-1 はわが国でグラム陰性菌に広く分布するプラスミド性クラス A の ESBL である。主に染色体性であるクラス C では著者らの分離した *Enterobacter cloacae* GC 1 と *C. freundii* GC 3 の  $\beta$ -ラクタマーゼが基質特異性拡張型の変異酵素である。一方、臨床分離の高度耐性菌では複数の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を持つものが少なくない。*C. freundii* GN 346/RGN 823 は染色体性クラス C とプラスミド性クラス A をそれぞれ構成的に生産する 2 種  $\beta$ -ラクタマーゼ生産の高度耐性菌のモデル菌株である。Table 4 に示すように、クラス A の ESBL では CVA の阻害剤効果がみられるのに対し、クラス C の基質特異性拡張型変異酵素を生産する *E. cloacae* GC 1、*C. freundii* GC 3 とクラス A/C 生産株の *C. freundii* GN 346/RGN 823 では CVA に弱い感受性を示す以外は阻害剤に不感受性を示した。

それぞれ特徴のある  $\beta$ -ラクタマーゼ生産型を持つ菌株に対する 3 阻害剤の効果の総括を Table 5 に示した。

Table 2. Combined effect of Syn-2161 on MIC of ampicillin in bacteria producing  $\beta$ -lactamases

$\beta$ -Lactamase class	Strain	MIC of ampicillin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
		Syn-2161 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	5	10	20	50
non	<i>E. coli</i> ML 1410		6.3	3.1	3.1	3.1	<1.6
A	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 823		>1,600	>1,600	>1,600	>1,600	>1,600
B	<i>E. coli</i> ML 1410/RDK 4		25	25	25	25	25
C	<i>C. freundii</i> GN 346		800	25	12.5	1.6	<1.6
C	<i>E. cloacae</i> P 99		>1,600	100	25	12.5	3.1
D	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 238		800	800	800	800	800
ES-C*	<i>E. cloacae</i> GC 1		>1,600	>1,600	>1,600	>1,600	800
ES-C*	<i>C. freundii</i> GC 3		>1,600	>1,600	>1,600	>1,600	800

\*ES-C: Extended-spectrum class C  $\beta$ -lactamase.

Table 3. Effect of specific inhibitors on MIC of ampicillin in bacteria producing four class  $\beta$ -lactamases

$\beta$ -Lactamase class	Strain	MIC of ampicillin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		0	CVA	Syn-2161	J-110,441
non	<i>E. coli</i> ML 1410	6.3	3.1	3.1	3.1
A	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 823	>800	12.5	>800	>800
	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 14	>800	12.5	>800	>800
	<i>K. pneumoniae</i> GN 69	>800	1.6	>800	100
	<i>P. mirabilis</i> N-29	>800	12.5	>800	>800
	<i>P. vulgaris</i> GN 76/C 1	800	1.6	800	6.3
B	<i>E. coli</i> ML 1410/RDK 4	25	12.5	25	3.1
C	<i>E. coli</i> 255	400	400	6.3	400
	<i>C. freundii</i> GN 346	800	200	1.6	400
	<i>E. cloacae</i> P 99	>800	800	12.5	800
	<i>E. cloacae</i> 363	800	400	3.1	400
	<i>M. morganii</i> 1510	800	400	1.6	6.3
D	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 238	800	25	800	800

The inhibitor concentrations were fixed as follows: CVA; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Syn-2161; 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , J-110,441; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

CVA: clavulanic acid

Table 4. Effect of the specific inhibitors on MIC of ampicillin in bacteria producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or two kinds of  $\beta$ -lactamases

$\beta$ -Lactamase	Strain	MIC of ampicillin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		0	CVA	Syn-2161	J-110,441
Toho-1 ESBL	<i>E. coli</i> ML 1410/pMTY 010	>800	6.3	>800	>800
Extended-spectrum class C	<i>E. cloacae</i> GC 1	>800	800	>800	>800
	<i>C. freundii</i> GC 3	>800	800	>800	>800
Class A/C simultaneous production	<i>C. freundii</i> GN 346/RGN 823	>800	400	>800	>800

The inhibitor concentrations were fixed as follows: CVA; 10  $\mu\text{g}$  mL, Syn-2161; 20  $\mu\text{g}$  mL, J-110,441; 10  $\mu\text{g}$  mL.  
CVA: clavulanic acid

Table 5. Summary of the inhibitory effect on MIC of ampicillin in  $\beta$ -lactamase-producing bacteria

$\beta$ -Lactamase production	Inhibitor effect*		
	CVA	Syn-2161	J-110,441
Class A	++	-	-(v)**
Class B	+	-	++
Class C	+	++	-(v)**
Class D	++	-	-
Toho-1 ESBL	++	-	-
Extended-spectrum Class C	+	-	-
Class A/C production	+	-	-

\*The degree of effect was expressed as follows; significant effect (++) , weak effect (+) , no effect (-) .

\*\*varied according to the species.

CVA: clavulanic acid

ABPC の MIC 値が 8 分の 1 以下に低下する顕著な阻害剤効果を ++ で表示し、MIC 値低下が 2 分の 1~4 分の 1 程度の弱い効果を + と表示した。なお、同一クラスの  $\beta$ -ラクタマーゼの中のごく一部のものが阻害剤感受性を示す場合は -(v) と表している。J-110,441 ではクラス A およびクラス C 生産菌の一部菌種で阻害効果が見られるが、クラス A あるいは D, クラス B, クラス C, 基質特異性拡張型クラス C あるいはクラス A・C 複合生産の分類が可能である。

#### 4. ATP-bioluminescence 法による MIC 判定の迅速化

微量液体希釈法は MIC 測定法として汎用されるが、結果の判定には約 18 時間を要する。クラス鑑別の迅速化の方策として、ATP-bioluminescence 法による MIC

測定を行い、微量液体希釈法と比較した (Table 6)。ATP-bioluminescence 法を用いても微量液体希釈法とほぼ同一の結果が得られ、さらに鑑別所要時間は 3.5 時間であり、微量液体希釈法の約 5 分の 1 に短縮が可能であった。

### III. 考 察

医療現場における臨床分離菌の薬剤感受性試験法として、ディスク法に代わり微量液体希釈法による定量的測定が普及しつつある。自動測定機器の改良によりさらに一般化することと思われる。この測定法を利用して、阻害剤一定濃度下における ABPC の MIC 値から被験菌株の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼの酵素化学的特徴を判定する本鑑別法は、MIC 測定作業へ組み入れることにより医療現場での実施が容易と思われる。臨床利用されている  $\beta$ -ラクタム薬の各クラス  $\beta$ -ラクタマーゼに対する安定性などについては十分な情報があり、本鑑別法の結果を加えることにより、 $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌に対する適切な  $\beta$ -ラクタム薬選択が可能と思われる。また、特に迅速な鑑別が要求される場合は、ATP-bioluminescence 法の利用により鑑別時間を大幅に短縮可能である。

本鑑別法ではクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌とクラス D  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌の区別ができない。R プラスミドに支配されるクラス D  $\beta$ -ラクタマーゼはオキサシリン分解型ペニシリナーゼとも呼ばれる。基質特異性からはもっとも典型的なペニシリナーゼ型に属し、クラス分類初期にはクラス A に分類されている。この  $\beta$ -ラ

Table 6. Comparison of the MIC values measured by ATP-bioluminescence method with those by microdilution method

$\beta$ -Lactamase class	Strain	MIC of ampicillin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		ATP-bioluminescence		microdilution	
		ABPC	ABPC + CVA*	ABPC	ABPC + CVA*
non	<i>E. coli</i> ML 1410	3.1	3.1	6.3	3.1
A	<i>E. coli</i> ML 1410/RGN 823	>800	12.5	>800	12.5
B	<i>E. coli</i> ML 1410/RDK 4	25	12.5	25	12.5
C	<i>E. cloacae</i> P 99	>800	800	>800	>800
ES-C	<i>E. cloacae</i> GC 1	>800	>800	>800	>800

\*The CVA concentration was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

ABPC: ampicillin, CVA: clavulanic acid

クタマーゼの酵素化学的特徴から、クラス D 酵素生産菌に対する  $\beta$ -ラクタム薬の適用ではクラス A 酵素生産菌と同様に扱ってもよいと考えられる。クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌とクラス A の ESBL 生産菌の区別は本鑑別法ではできなかったが、オキシミノ系薬剤の MIC 値を参照すれば区別は可能である。J-110,441 はクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤として用いたが、それぞれクラス A および C に属する *P. vulgaris* と *M. organii* の生産する染色体性  $\beta$ -ラクタマーゼに対して強い阻害効果を示した。*P. vulgaris* の  $\beta$ -ラクタマーゼはセファロスポリナーゼ型の基質特異性を持ちながら、クラス A に属する特異な  $\beta$ -ラクタマーゼとして知られる<sup>20)</sup>。また *M. organii* は以前の菌種分類では *Proteus* グループに分類された菌種である。これら菌種の生産する  $\beta$ -ラクタマーゼが J-110,441 に対して他のクラス A あるいはクラス C  $\beta$ -ラクタマーゼと異なる挙動を示すことは、酵素活性中心における性質の差異を反映しているものと考えられ興味深い。これらのバリエーションは CVA または Syn-2161 の明確な阻害パターンから、クラス鑑別の障害にはならないと考えられる。

基質特異性拡張型クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼとクラス A/C  $\beta$ -ラクタマーゼ複合生産の菌株では用いた阻害剤への感受性が低く、これら高度耐性菌のより細分化した鑑別はできなかった。これらの耐性菌に対してはより慎重な  $\beta$ -ラクタム薬の選択あるいは他薬剤の使用が必要となる。新たな阻害剤の採用により、高度耐性菌の分類を試みる予定である。なお、3 阻害剤を用いる鑑別法をディスク法に適用して、定性的であるがより簡便なクラス鑑別法の作成は原理的に十分に可能である。この点については現在検討中である。

#### 謝 辞

本研究は平成 9 年度および 10 年度厚生省科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）による研究の一環として実施されたものである。 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を提供していただいた大鵬薬品工業株式会社 (Syn-2161)、萬有製薬株式会社 (J-110,441) およびスミスクライン・ピーチャム製薬株式会社 (クラブラン酸) に感謝致します。またアンピシリンを提供していただいた明治製菓株式会社に御礼申し上げます。さらに、ATP-bioluminescence 法の利用について、キッコーマン株式会社のご協力に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 澤井哲夫:  $\beta$ -ラクタマーゼによる  $\beta$ -ラクタム剤耐性メカニズム。日本臨牀 55: 1225~1230, 1997
- 2) Ambler R P: The structure of  $\beta$ -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 289: 321~331, 1980
- 3) 澤井哲夫:  $\beta$ -ラクタマーゼの新しい分類。検査と技術 21: 1118, 1993
- 4) Livermore D M:  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8: 557~

- 585, 1995
- 5) 澤井哲夫, 額賀路嘉, 春田 伸:  $\beta$ -ラクタマーゼとその分子進化。蛋白質 核酸 酵素 40: 1887~1899, 1995
- 6) Hattori N, Nakajima M, O' Hara K, et al.: Novel antibiotic susceptibility tests by the ATP-bioluminescence method using filamentous cell treatment. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1406~1411, 1998
- 7) Egawa R, Sawai T, Mitsuhashi S: Drug resistance of enteric bacteria. XII. Unique substrate specificity of penicillinase produced by R factor. Japn. J. Microbiol. 11: 173~178, 1967
- 8) Sawai T, Kanno M, Tsukamoto K: Characterization of eight  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 152: 567~571, 1982
- 9) Sawai T, Yoshida T, Tsukamoto K, et al.: A set of bacterial strains for evaluation of  $\beta$ -lactamase-stability of  $\beta$ -lactam antibiotics. J. Antibiot. 34: 1318~1326, 1981
- 10) Yamaguchi H, Nukaga M, Sawai T: Appearance of an R plasmid mediated metallo- $\beta$ -lactamase in gram-negative enteric bacteria. DNA Data Base of Japan (DDBJ) entry name KPNRD 4 and accession no.D 29636. 1994
- 11) Galleni M, Lindberg F, Normark S, et al.: Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae ampC*  $\beta$ -lactamase genes and their products. Biochem. J. 250: 753~760, 1988
- 12) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2267~2275, 1995
- 13) Nukaga M, Haruta S, Tanimoto K, et al.: Molecular evolution of a class C  $\beta$ -lactamase extending its substrate specificity. J. Biol. Chem. 270: 5729~5735, 1995
- 14) 春田 伸, 額賀路嘉, 澤井哲夫: オキシミノ系  $\beta$ -ラクタム剤高度耐性菌, *Citrobacter freundii* GC 3 の耐性機構の解析。日本薬学会第 115 年会講演要旨集 3: 210 p. 1995
- 15) 日本化学療法学会: 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法)。Chemotherapy 38: 103~104, 1990
- 16) Sawai T, Yamaguchi A: Mechanism of beta-lactamase inhibition: Differences between sulbactam and other inhibitors. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 12: 121 S~129 S, 1989
- 17) Nagano R, Adachi Y, Imamura H, et al.: Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various  $\beta$ -lactamases including class B metallo- $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2497~2503, 1999
- 18) Maiti S N, Reddy A V, Micetich R G, et al.: Azetidinone derivatives as  $\beta$ -lactamase inhibitors. PCT International Publication No.WO 99/10324, 1999
- 19) Sakurai Y, Yoshida Y, Saitoh K, et al.: Characteristics of aztreonam as a substrate, inhibitor and inducer for  $\beta$ -lactamases. J. Antibiot. 43: 403~410, 1990

- 20) Tamaki M, Nukaga M, Sawai T: Replacement of serine 237 in class A  $\beta$ -lactamase of *Proteus vulgaris* modifies its unique substrate specificity. *Biochemistry* 33: 10200~10206, 1994

## Classification of $\beta$ -lactamases by utilizing the enzyme inhibitors

Tetsuo Sawai, Koji O'hara, Masae Ohnuma, Akio Nakamura,  
Yasuyo Naitou and Kyoko Nakazawa

Division of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Chiba University, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

A simple and rapid method for classification of  $\beta$ -lactamases in bacterial cells into classes A, B, C and D was devised by utilizing three  $\beta$ -lactamase-inhibitors clavulanic acid, a carbapenem derivative (J-110,441) and a monobactam derivative (Syn-2161). On the basis of the combined effects of ampicillin with the inhibitor on the MIC of ampicillin, the enzyme class in the test organisms was estimated. This method was evaluated according to its application in 14 bacterial strains, which consisted of seven gram-negative species. For routine assay, a liquid microdilution method for MIC determination was employed. However, the time required for assay was reduced to one-fifth by employing an ATP-bioluminescens method developed by Hattori N, et al. (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 1406~1411, 1998).