

## 【短報】

## 各種基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生株に対するβ-ラクタマーゼ阻害薬の阻害効果の比較

石井 良和・アルバ ヒメナ・満山 順一・山口 恵三

東邦大学医学部微生物学講座\*

(平成13年7月16日受付・平成13年7月26日受理)

各種 ESBL 産生株、β-ラクタマーゼ阻害薬耐性酵素産生株および Toho-1 産生株に対するβ-ラクタマーゼ阻害薬の効果を比較検討した。各種β-ラクタマーゼ産生株に対する piperacillin (PIPC) の MIC 値は 32~256 μg/mL であったが、clavulanate を 4 μg/mL 含有する場合は、ESBL 産生株に対して 0.25 μg/mL から 2 μg/mL、TEM-33 および TEM-34 産生株に対して 1~4 μg/mL、Toho-型β-ラクタマーゼ産生株に対しては 0.25 および 0.5 μg/mL の値を示した。Sulbactam を 4 μg/mL 含有する場合の PIPC の MIC 値は、ESBL 産生株に対して 0.25~4 μg/mL、阻害薬耐性酵素産生株に対する MIC 値は 32~128 μg/mL、Toho-型酵素産生株には 128 μg/mL の値を示した。Tazobactam (TAZ) を含有する場合の PIPC の MIC 値は、ESBL 産生株に対して 0.25~4 μg/mL、阻害薬耐性酵素産生株には 4~8 μg/mL、Toho-型酵素産生株には 1 μg/mL を示した。以上、各種 ESBL 産生株などに対し TAZ などのβ-ラクタマーゼ阻害薬は強い阻害効果を示した。

**Key words:** 薬剤耐性, ESBL, β-ラクタマーゼ, β-ラクタマーゼ阻害薬

β-ラクタマーゼは、グラム陽性菌やグラム陰性菌の多くの菌種が産生し、β-ラクタム系抗菌薬に対する細菌の主要な耐性機構のひとつとなっている。β-ラクタマーゼは、保存されているアミノ酸配列をもとにクラス A からクラス D までの 4 クラスに Ambler によって分類されている<sup>1)</sup>。クラス B β-ラクタマーゼは、亜鉛を活性中心に保持することから、亜鉛β-ラクタマーゼあるいは金属β-ラクタマーゼと呼ばれている。一方、このクラス B を除くβ-ラクタマーゼは、いずれも活性中心にセリンを保持することから、セリンβ-ラクタマーゼと呼ばれている。クラス A あるいはクラス D β-ラクタマーゼは、基質としてペニシリン系抗菌薬を好むことから、ペニシリナーゼあるいはオキサシリナーゼとも呼ばれていた。しかし、最近になって、ペニシリン系抗菌薬のみならず抗菌域が広くクラス A やクラス D β-ラクタマーゼに安定であるとされている第三世代セフェム系抗菌薬に耐性を示す *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* などが出現し、臨床上問題視されている。それらの菌株のなかには、TEM-型や SHV-型のような古典的クラス A β-ラクタマーゼや OXA-型と呼ばれるクラス D β-ラクタマーゼの遺伝子に点変異が生じて第三世代セフェム系抗菌薬をも分解することが可能となったβ-ラクタマーゼを産生する菌株が存在する<sup>2)</sup>。これらのβ-ラクタマーゼは基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase: ESBL) と呼ばれている。ESBL は、基質特異性が広いもののクラブ

ラン酸やスルバクタムなどのβ-ラクタマーゼ阻害薬によって不活化される酵素が多い<sup>3)</sup>。しかし、最近になってβ-ラクタマーゼ阻害薬に耐性を示す TEM-型あるいは SHV-型酵素が報告されている<sup>4)</sup>。

本報告では TEM-型および SHV-型などの ESBL 産生株に対する各種β-ラクタマーゼ阻害薬の阻害効果について比較することを目的に、ESBL を含む 13 種類のβ-ラクタマーゼ産生株を対象として薬剤感受性試験を実施した。

TEM-型 ESBL としては TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-6, TEM-7, TEM-9 および TEM-10 を、SHV-型 ESBL としては SHV-3 および SHV-24 を対象とした。また、β-ラクタマーゼ阻害薬に耐性を示す酵素として TEM-33 および TEM-34 を対象とした。さらに、第三世代セフェム系抗菌薬を加水分解するクラス A β-ラクタマーゼとして知られている Toho-1 および Toho-2 も対象とした。これらのβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子はいずれも伝達性プラスミド上に存在するが、分与された施設からの許可が得られない菌株があるため、同一の宿主菌に接合伝達した後に供試菌株とすることができなかった。

使用薬剤は、力価が明らかな piperacillin (PIPC: 富山化学)、clavulanate (CVA: ビーチャム製薬)、sulbactam (SBT: ファイザー製薬) および tazobactam (TAZ: 大鵬薬品) の各β-ラクタム系抗菌薬を用いた。

最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentra-

\*東京都大田区大森西 5-21-16

Table 1. Antibacterial activity of piperacillin in the presence (4  $\mu$ g/mL) or in the absence of  $\beta$ -lactamase inhibitor against various  $\beta$ -lactamase producers

Enzyme	Piperacillin only	Tazobactam	Clavulanate	Sublactam
TEM-3	128	2	1	2
TEM-4	128	1	0.5	0.5
TEM-5	32	1	1	1
TEM-6	>256	4	2	4
TEM-7	128	0.25	0.25	0.25
TEM-9	>256	2	1	2
TEM-10	256	2	1	2
TEM-33	>256	8	4	128
TEM-34	256	4	1	32
SHV-3	128	1	1	1
SHV-24	256	4	2	4
Toho-1	>256	1	0.25	128
Toho-2	>256	1	0.5	128

These values indicate the minimum inhibitory concentration (MIC:  $\mu$ g/mL)

tion: MIC)の測定は米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) の微量液体希釈法 (M 100-S 10) に準じた<sup>5)</sup>。精度管理株として *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumoniae* ATCC 700603 を用いた。

今回の試験成績は Table 1 にまとめて示した。各種  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株に対する PIPC の MIC 値は 32  $\mu$ g/mL~256  $\mu$ g/mL 以上と明らかに耐性を示した。一方, CVA を 4  $\mu$ g/mL 含有する PIPC の場合は, ESBL 産生株に対して 0.25  $\mu$ g/mL から 2  $\mu$ g/mL, TEM-33 および TEM-34 産生株に対して 4  $\mu$ g/mL および 1  $\mu$ g/mL, Toho-型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株に対しては 0.25 および 0.5  $\mu$ g/mL の値を示した。CVA の場合と同様に SBT 4  $\mu$ g/mL 含有培地を用いて PIPC の ESBL 産生株に対する MIC 値は 0.25~4  $\mu$ g/mL, 阻害薬耐性酵素産生株に対する MIC 値は 128  $\mu$ g/mL および 32  $\mu$ g/mL, Toho-型酵素産生株には 128  $\mu$ g/mL の値を示した。4  $\mu$ g/mL の TAZ を含有する PIPC の MIC 値は, ESBL 産生株に対して 0.25  $\mu$ g/mL~4  $\mu$ g/mL, 阻害薬耐性酵素産生株に対する値は 4  $\mu$ g/mL と 8  $\mu$ g/mL, Toho-型酵素産生株には 1  $\mu$ g/mL を示した。

本邦での ESBL 産生株の分離頻度は *E. coli* で 0.1%, *K. pneumoniae* で 0.3% と多いとはいえない<sup>6)</sup>。しかし, ヨーロッパでは *Klebsiella* spp. のうち平均 23% の菌株が ESBL を産生するとの報告があり大きな問題となっている<sup>7)</sup>。今後, 本邦でも ESBL 産生株による感染症が増加することが懸念される。現在まで ESBL のなかに阻害薬に対する耐性を獲得した酵素があるとの報告はない。今回の検討からも ESBL に対する  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬の有効性が確認された。TEM-33 および TEM-34 といった阻害薬耐性酵素産生株に対する阻害効果は, 程度の差が認められ, SBT での阻害効果は弱かったが, TAZ や CVA での阻害効果は強かった。

今回の検討から, 4  $\mu$ g/mL の各種阻害薬を含有する培地において PIPC の MIC 値が顕著な改善を認めた。

健康成人男子志願者を対象とした検討結果から, この阻害薬の濃度は生体内で十分に存在しうるものであるとの報告<sup>8-10)</sup>があり, TAZ は ESBL を含むクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌による感染症に対する有効な治療薬となりえるものと期待される。また, TAZ は, 現在まで市販されている  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬が阻害効果を示さないとされている, クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼに対する阻害作用を示したとの報告<sup>11)</sup>もあることから, その効果にも期待がもたれる。

Toho-型やその亜種である CTX-M-型  $\beta$ -ラクタマーゼは, 基質特異性が狭い起源となる  $\beta$ -ラクタマーゼが見つかっていないため, 現段階では ESBL に分類することはできないとの考えもある。この種の酵素はもともと SBT による阻害を受けにくいとされており<sup>12-14)</sup>, 今回の検討からもその現象が確認された。さらに, Sme-1<sup>15)</sup>, NMC-A<sup>16)</sup> および IMI-型  $\beta$ -ラクタマーゼ<sup>17)</sup> を除くクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼは carbapenem 系抗菌薬を分解することはできないとされているが, われわれの Toho-1 に対する詳細な酵素学的検討から, 本酵素は carbapenem 系抗菌薬を分解することが確認されている (データは示していない)。本邦ではこの種の酵素を産生する菌株の分離報告例が多く, 今後さらに増加することも懸念されることから, 分離頻度の推移の追跡を実施する必要があるものと考えられた。

#### 謝 辞

今回用いた酵素産生株を分与いただきました Patrice Nordmann 博士, Jean-Marie Frère 博士, David M. Livermore 博士および Anne M. Harris 氏に感謝いたします。本研究の一部は, 平成 12 年度厚生省科学研究補助金, 財団法人日本公定書協会, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団および東邦大学医学部プロジェクト研究補助金 (12-20) によって実施した。

#### 文 献

- 1) Ambler R P: The structure of  $\beta$ -lactamases. Philos.

- Trans R. Soc. Lond. (Biol.) 289: 321~331, 1980
- 2) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.: Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole, and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 6: 315~317, 1983
  - 3) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211~1233, 1995
  - 4) Knox J R: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases: mutation, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2593~2601, 1995
  - 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved standard M7-A5, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Fifth ed. 2, 2000
  - 6) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 184: 53~56, 2000
  - 7) Livermore D M, Yuan M: Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 38: 409~424, 1996
  - 8) Higashitani F, Hyodo A, Ishida N, et al.: Inhibition of beta-lactamases by tazobactam and *in-vitro* antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. *J Antimicrob Chemother* 25: 567~571, 1990
  - 9) 柴孝也, 斎藤篤, 嶋田甚五郎, 他: Sulbactam・ampicillin に関する臨床的検討. *Chemotherapy* 36(S-8): 149~159, 1988
  - 10) 松本慶蔵, 永武毅, 大石和徳, 他: Tazobactam/Piperacillin の臨床第 I 相試験. *Chemotherapy* 42(S-2): 281~299, 1994
  - 11) 渡辺健太郎, 小山優, 飯島福生, 他: BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) 臨床第 I 相試験—81) 単回筋肉および静脈内投与の検討—. *Chemotherapy* 34(S-4): 210~247, 1986
  - 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: 2269~2275, 1995
  - 13) Yagi T, Kurokawa H, Senda K, et al.: Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2606~2611, 1997
  - 14) Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, et al.: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A  $\beta$ -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1181~1186, 1998
  - 15) Naas T, Vandel L, Sougakoff W, et al.: Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1262~1270, 1994
  - 16) Mariotte-Boyer S, Nicolas-Chanoine M H, Labia R: A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. *FEMS Microbiol Lett* 143: 29~33, 1996
  - 17) Rasmussen B A, Bush K, Keeney D, et al.: Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from Enterobacter cloacae. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 40: 2080~2086, 1996

## The effect of $\beta$ -lactamase inhibitors against various extended-spectrum $\beta$ -lactamase producers

Yoshikazu Ishii, Jimena Alba, Jun-ichi Mitsuyama and Keizo Yamaguchi

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo, Japan

In this report, we show the activity of  $\beta$ -lactamase inhibitors against ESBL producers, inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases and Toho-type  $\beta$ -lactamase producers. The MIC values of piperacillin (PIP) against each  $\beta$ -lactamase producer were 32~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As recommended by the NCCLS, we used 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 3 inhibitors. In the presence of clavulanate the MIC values of piperacillin against ESBL producers, TEM-33 and TEM-34 and Toho-type producers were 0.25~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.25~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. The MIC values of PIP with sulbactam against ESBL producers, inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases and Toho-type  $\beta$ -lactamases were 0.25~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 32~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. In the presence of tazobactam (TAZ) the MIC values were 0.25~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ESBL producers, inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases and Toho-type  $\beta$ -lactamases respectively. These results suggest that  $\beta$ -lactamase inhibitors including TAZ show strong inhibitor activities against  $\beta$ -lactamase producing strains such as the ones mentioned in this article.