

## EXPERIMENT CONCERNING $\beta$ -LACTAMASE PRODUCING S.AUREUS

Junichiro Shimada, Shunkichi Baba, Haruji Kinoshita, Yoshito Mori, and Kenji Suzuki  
Department of Otolaryngology Nagoya City University Medical School

The relationship between  $\beta$ -lactamase which was produced by S.aureus and AMPC was investigated by next four methods.

1. The in vitro antibacterial activity of AMPC against a hundred strains of S. aureus isolated from otorrhea was measured. And they were selected three groups: 1)  $\beta$ -lactamase high producing group, 2) low producing group, 3) non producing group, by using acidometry and nitrocefin.
2. Quantity of  $\beta$ -lactamase producing which was induced CFX and measured by using macroiodometry was investigated each one strain of high and low producing group.
3. Antibacterial activity which was effected by  $\beta$ -lactamase was measured by using bioassay.
4. The relationship between viable cells count of S.aureus and  $\beta$ -lactamase was investigated 0–24 hours.

The results were as follows;

1. High producing group was 38 strains, low producing group was 54 strains, and non producing group was only 8 strains. The peak of high producing group's MIC was 50 to 100  $\mu\text{g/ml}$ . Low producing group's MIC was 1.56  $\mu\text{g/ml}$ .
2. A high producing strain produced  $\beta$ -lactamase about 12 unit, but a low producing strain produced only about 2 to 3 unit.
3. Antibacterial activity of AMPC was rapidly decreased under incubation of high producing strain. Under incubation of low producing strain, decrease antibacterial activity of AMPC was more slowly. But although under incubation of high and low producing strains, BRL25000 was stable against  $\beta$ -lactamase.
4. Quantity of  $\beta$ -lactamase was increased with viable cells count. When not increased viable cells count,  $\beta$ -lactamase production was stopped.

## $\beta$ -lactamase 産生 *S. aureus* について

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科教室

島田 純一郎・馬場 駿吉・木下 治二

森 慶人・鈴木 賢二 (名古屋市立大学)

### はじめに

中耳炎起炎菌として *S. aureus* は高頻度に検出され、Penicillinase を Exoenzyme として放出する事は既知のとおりである。そこで我々は、耳漏由来の *S. aureus* を試験菌株として、その薬剤感受性と、 $\beta$ -lactamase 産生量について in vitro 実験を行ったのでその成績を報告する。

### 方 法

#### 1. 感受性測定

化膿性中耳炎耳漏由来 *S. aureus* 100 株の AMPC と BRL25000 (AMPC + CVA)<sup>1) 2)</sup> に対する MIC (最小発育阻止濃度) を日本化学療法学会標準法<sup>3)</sup> に準じ測定した。

#### 2. $\beta$ -lactamase の定性及び定量

##### 1) 定性

*S. aureus* 100 株について Difco 社の  $\beta$ -lactamase detection paper と BBL 社 Nitrocefin 含有の Cefinase disc<sup>4)</sup> を用い、高産生株群と低産生株群とに分類した。同時に両群の MIC について比較検討した。

##### 2) 定量

定性試験にて判明した高産生株群と低産生株群より 1 菌種ずつえらび出し (高産生株 - T10, 低産生株 - U49), CFX を inducer として、BHI 培地に植菌し、37°C 18 時間静置培養液を 10,000 rpm 10 分間遠沈する。その上澄を 0.22  $\mu$ m ミルポアフィルターにて濾過滅菌しこれを粗酵素液すなわち、Exoenzyme として用い、その  $\beta$ -lactamase 産生量を PCG (明治製

菓) を基質とした macroiodometry 法<sup>5)</sup> にて測定した。

#### 3. 薬剤の不活性化

AMPC, BRL25000 それぞれを in vitro で *S. aureus* に添加した時の経時的残存力価を測定した。残存力価の測定は、培地に Nutrient agar. 検定菌に *B. subtilis* ATCC6633 を使用したマイクロポア法<sup>6)</sup> による bioassay に準じた。 $\beta$ -lactamase 高産生株である T-10 番と、低産生株である U-49 番を菌量  $10^5$  CFU/ml に調整し、1 時間振盪培養後それぞれ 12.5  $\mu$ g/ml, 1.56  $\mu$ g/ml 濃度の薬剤を加え、AMPC 残存力価の経時変化を薬剤添加後、30分、1 時間、2 時間、4 時間において検討した。また添加薬剤には、AMPC 単独、BRL25000 (AMPC + CVA) を用いた。なお control には、*S. aureus* へは添加されない AMPC そのものの力価を用いた。

#### 4. $\beta$ -lactamase 産生と生菌数

*S. aureus* T-10 番を用い、CFX 1/4 MIC にて induce した時の  $\beta$ -lactamase 産生量と生菌数との関係を、3 時間々隔で 24 時間まで静置培養し検討した。

### 成 績

#### 1. 感受性測定と $\beta$ -lactamase 定性

*S. aureus* 100 株の  $\beta$ -lactamase 産生を定性試験にて調べてみると、高産生株 38 株、低産生株 54 株、非産生株は 8 株にすぎなかった。高産生株と低産生株とで AMPC に対する MIC を比較すると、高産生株 (38 株) のピークは

50~100 $\mu\text{g/ml}$ に、一方低産生株(54株)のそれは1.56 $\mu\text{g/ml}$ に位置していた。(Fig 1)

高産生株でAMPCとBRL25000のMICを比較するとBRL25000では、CVAの効果により2~3管程度よいMICが認められた。(Fig 2) 一方、低産生株ではCVAの効果は著明には認められず、1管程度の改善をみるにすぎなかった。(Fig 3)

Fig 1

Comparison of sensitivity distribution between  $\beta$ -lactamase high producing and low producing *S.aureus*

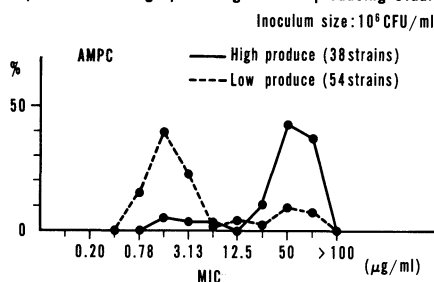


Fig 2

Sensitivity distribution of  $\beta$ -lactamase high producing *S.aureus* 38 strains to AMPC and BRL 25,000

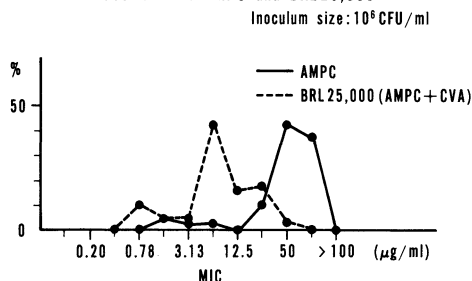
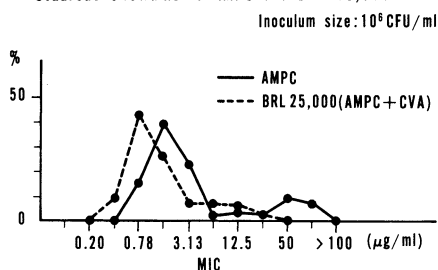


Fig 3

Sensitivity distribution of  $\beta$ -lactamase low producing *S.aureus* 54 strains to AMPC and BRL 25,000



## 2. $\beta$ -lactamase 定量

低産生株であるU-49番及び高産生株であるT-10番の $\beta$ -lactamase産生量を定量すると、U-49番ではどのCFX濃度(2~1/64 M

IC)において誘導してもその産生量は低く2~3 unitであり、controlとほぼ同等で、測定誤差内と思われた。(Table 1)。T-10番では、1/4~1/16MICにおいて12unit程度の $\beta$ -lactamase産生をみとめた。1/32~1/128MICの低濃度においても、CFXはinducerとして働き、4~9unitの $\beta$ -lactamase産生を示した。先のU-49番と比較するとはるかに高産生株であることを示す成績である。(Table 2)

Table 1

RELATIONSHIP BETWEEN CFX CONCENTRATION AND  $\beta$ -LACTAMASE ACTIVITY OF *S.aureus* U-49 AFTER 18 HRS INCUBATION

CONC	PCG	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	$\beta$ -lactamase
CONTROL	9.05	8.74	2.48
12.5	9.05	8.72	2.64
6.25	9.05	8.73	2.56
3.13	9.05	8.70	2.80
1.56	9.05	8.75	2.40
0.78	9.05	8.70	2.80
0.39	9.05	8.61	3.52
0.2	9.05	8.75	2.40
0.1	9.05	8.85	1.60

Table 2

RELATIONSHIP BETWEEN CFX CONCENTRATION AND  $\beta$ -LACTAMASE ACTIVITY OF *S.aureus* T-10 AFTER 18 HRS INCUBATION

CONC	PCG	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	$\beta$ -lactamase
6.25	8.62	8.50	0.96
3.13	8.62	7.15	11.76
1.56	8.62	7.15	11.76
0.78	8.62	7.15	11.76
0.39	8.62	7.41	9.68
0.20	8.62	7.71	7.28
0.10	8.62	8.15	3.76

## 3. 薬剤の不活性化

高産生株であるT-10番におけるAMPC力価の経時変化についてみると、AMPC単独では12.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度が、30分後で4 $\mu\text{g/ml}$ となり、1時間後では完全に不活性化されたが、BRL25000ではcontrolとほぼ同等のカーブを描いた。(Fig 4) 一方低産生株であるU-49番についてみるとAMPCでは4時間後に完全に不活性化をうけるが、先の高産生株の成績と比べるとその不活性化は遅いことがわかる。なおBRL25000においてはcontrolとほぼ同等のカーブを描いた。(Fig 5)

Fig 4  
Inhibition of *S.aureus* T-10  $\beta$ -lactamase

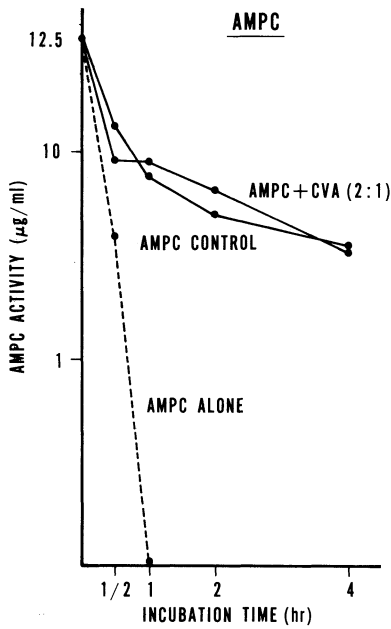
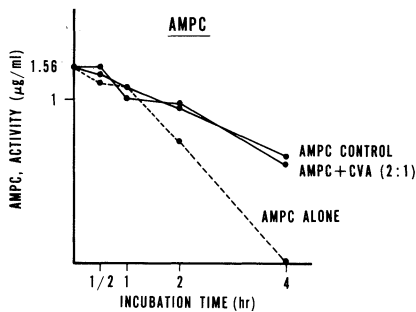


Fig 5  
Inhibition of *S.aureus* U-49  $\beta$ -lactamase

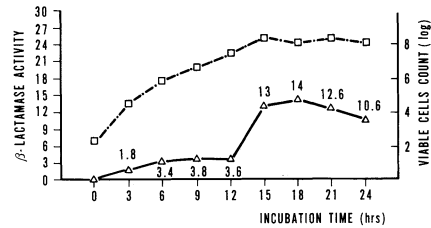


#### 4. $\beta$ -lactamase産生と生菌数

T-10番を用いて $\beta$ -lactamase産生量と生菌数との関係を検討すると、 $\beta$ -lactamase産生は生菌数の増加とともに漸次増加し、15時間後に13unitに達し、以後platoとなり、菌増殖の停止にともない $\beta$ -lactamase産生は停止したものと考えられた。経時的にCFXが自然分解されinducerとしての働きを失った結果かも知れないが、 $\beta$ -lactamaseは菌の分裂増

殖に伴い exoenzyme として菌体外に放出するものと考えられた。(Fig 6)

Fig 6  
RELATIONSHIP BETWEEN VIABLE CELLS COUNT AND  $\beta$ -LACTAMASE ACTIVITY OF *S.aureus* T-10 AFTER 0-24 HRS INCUBATION  
INDUCER---CFX



#### 考 按

近年開発されているセフェム系抗生剤は、グラム陽性菌に対する抗菌力がやや弱く、グラム陽性菌感染症があらたに注目されて来ている。そこで化膿性中耳炎耳漏より高頻度に検出される黄色ブドウ球菌をとりあげin vitro実験を試みた。

Nelsonら<sup>7)</sup>はAMPCを10mg/kg空腹時経口投与した時の小児middle ear effusion中への移行濃度は、0.3 $\mu$ g/ml程度であると報告している。我々の検討した $\beta$ -lactamase非産生株のAMPCに対するMICは0.2 $\mu$ g/ml以下であるので、Nelsonらの成績を基準にとれば、AMPCは $\beta$ -lactamase非産生株には有効性が発揮できるものと思われる。一方、山口ら<sup>8)</sup>は、喀痰中に $\beta$ -lactamase活性が強くみとめられるほど喀痰内AMPC濃度は低く、従来より行われていた抗菌活性にて測定するbioassay法による移行濃度は、 $\beta$ -lactamaseの影響をうける抗生剤では真の値を反映しないと報告している。同様にAMPCの耳漏中移行を考える場合にも、 $\beta$ -lactamaseによるAMPCの力価の低下を考慮に入れると、我々が使用した $\beta$ -lactamase高産生株はもちろん低産生株に対しても、10mg/kg程度の経口投与では、理論上その臨床的効果は期待しがたいものと思われた。経口投与量を増量して臨床効果が期待できるのは低

産生株に対してであり、CVAとの併用も低産生株に対してのみ期待できるものと考えた。また $\beta$ -lactamase産生株と $\beta$ -lactamase非産生株との混合感染の場合、本来AMPC感受性株である $\beta$ -lactamase非産生株に対しても、 $\beta$ -lactamase産生株によるAMPCの力価の低下をおこし、有効性を発揮できないと考へる。以上のごとく $\beta$ -lactamase産生S.aureusが起炎菌である中耳感染症を、AMPC経口投与による治療をする場合十分な注意を要すると考えた。

#### 文 献

- 1) 中沢久, 他:  
Clavulanic acidの $\beta$ -lactamase 阻害効果およびAmoxicillinとの併用による抗菌作用について CHEMOTHERAPY, VOL 30, S-2, 1~9, 1982.
- 2) 五島瑳智子, 他:  
 $\beta$ -lactamase産生菌におけるClavulanic acidの $\beta$ -lactamase inhibitorの効果 CHEMOTHERAPY, Vol 30. S-2, 20~28, 1982.
- 3) MIC測定法改訂委員会:  
最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について, CHEMOTHERAPY 29, 76~79, 1981
- 4) 感染症, Vol 13, 74, 1983.
- 5) 澤井哲夫, 高橋郁子:  
 $\beta$ -ラクタマーゼ活性測定法とその応用 蛋白質核酸酵素, Vol 23, 391~400, 1978.
- 6) 和田健二:  
抗生物質の組織移行濃度測定法に関する基礎的研究—とくに耳鼻咽喉科領域の微量検体における検討— 名市大医誌, 29(4), 491~511, 1979.
- 7) John D. Nelson et al. :  
Concentration of Antimicrobial agents in middle ear fluid, saliva and tears. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 3, 327~334, 1981.
- 8) 山口恵三, 他:  
喀痰による $\beta$ -lactam系抗生剤の不活化現象 感染症学雑誌, 55, 902~908, 1981.