

EXPERIMENT CONCERNING β -LACTAMASE PRODUCING *S. aureus* ISOLATED FROM PURULENT OTITIS MEDIA

Junichi Shimada, Shunkichi Baba, Haruji Kinoshita, Yoshito Mori
Kenji Suzuki, and Itsupei Takagi

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

We used *S. aureus* isolated from purulent chronic otitis media and measured outside and inside β -lactamase activity which was induced by CFX. After continuous exposure to CFX for four weeks, β -lactamase activity changing and MICs to ABPC and CFX were measured. The results were as follows:

1) β -lactamase of *S. aureus* was present not only at outside of bacteria but also at inside of bacteria.

2) β -lactamase activity and MIC to ABPC were close parallel relationship.

3) Induced *S. aureus* had also resistant to PCG, ABPC, AMPC which were easily inactivated by β -lactamase.

4) When *S. aureus* had resistant was from one week to four weeks, but this experiment did not decide when *S. aureus* gained resistant to ABPC.

化膿性中耳炎由来 *S. aureus* における

β -lactamase産生誘導実験

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

島田 純一郎・馬場 駿吉・木下 治二

森 慶人・鈴木 賢二・高木 一平

はじめに

慢性化膿性中耳炎の起炎菌として *S. aureus* は高頻度に検出されその内の約90%が菌体外酵素としてPCaseを産生するとされている。またABPCは感染症治療に多くもちいられている抗生剤でありPCaseに分解され抗菌力の低下をまねく事も知られている。そこで我々は耳漏由来の *S. aureus* を試験菌株とし

て用い、CFXをinducerとし、

- 1) 菌体内外の β -lactamase産生量
- 2) 連続投与した場合の β -lactamase産生量
- 3) β -lactamase産生量の変化に伴うABPCのMIC変化

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. 菌の選択

化膿性中耳炎由来 *S. aureus* より Difco 社の β -lactamase detection paper と, BBL 社 Nitrocefin 含有の cefinase disc¹⁾ を用い高産生株群, 低産生株群, 非産生株群の 3 群に分類し試験菌株とした。

2. 感受性測定

分類した各菌株の ABPC と CFX 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²⁾ に準じ CFX 接触前と接触後, 経日的に測定した。

3. 菌の継代培養

各菌株の CFX の MIC を 1 週毎に測定し, CFX の $\frac{1}{4}$ MIC 濃度を添加した HIA を使用し隔日継代培養を 4 週間繰り返した。

4. 粗酵素液の調整

1) 菌体内 β -lactamase の抽出

強力超音波発生装置 (久保田 insonater, Model 200M) を使用し菌浮遊液を出力 200 W 30 分 homogenize した液と, さらに遠沈しその上澄みを粗酵素液として使用した。

2) 菌体外 β -lactamase の抽出

CFX ($\frac{1}{4}$ MIC 濃度) 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。その上澄みを 0.22 μ m ミルポアフィルターにて濾過滅菌し, これを粗酵素液とした。

5. β -lactamase の定量

PCG (明治製菓) を基質とした macroiodometry^{3) 4)} 法にて測定した。

結 果

1. U-746 株の Broth 中に産生される β -lactamase は 22.3 U であった。菌体を破壊し菌体内の酵素活性全体では 14.1 U, また菌体成分を遠沈濾過し free の酵素のみの活性は 7.0 U であった。(Table 1)

2. 高産生株における β -lactamase activity, ABPC, CFX の MIC 変化 (4 週まで)

Table 1 Proportion of β -lactamase Activity (*S. aureus* U-746)

in broth	22.3U (64.8%)
菌体内(超音波破碎)	14.1U (35.2%)
超音波破碎, 遠沈濾過後	7.0U

(Fig 1)

1) β -lactamase 活性の変化

両菌株とも 1 週間後ではあきらかな上昇を認めなかったが 4 週後では, U-68 株では 22.8 U, U-76 株では 18.4 U の β -lactamase 活性上昇を認めた。特に U-68 株では CFX 接触前の 2 倍以上の増加である。

2) ABPC の MIC 変化

4 週後の成績では U-68 株では CFX 接触前 3.13 μ g/ml が接触後 50 μ g/ml と 4 管の上昇を見た。U-76 株は接触前 6.25 μ g/ml が接触後 25 μ g/ml と 2 管の上昇を見た。

3) CFX の MIC 変化

両菌株とも CFX 接触後 1 週より MIC の上昇を認め始め 16 日後には U-68 株は CFX 接触前 6.25 μ g/ml が接触後 25 μ g/ml に, U-76 株は接触前 12.5 μ g/ml が接触後 50 μ g/ml と 2 管の上昇を認めた。4 週後の MIC は 16 日後のそれと両菌株とも変化を認めなかった。

3. 低産生株における β -lactamase activity, ABPC, CFX の MIC 変化 (4 週まで) (Fig 2)

1) β -lactamase 活性の変化

U-16, U-49 株の両菌株とも 4 週以内では CFX 接触前, 接触後共 2.5 U 以下で, 明らかな β -lactamase 活性の上昇は認められなかった。

2) ABPC の MIC 変化

U-49 株では CFX 接触前 0.39 μ g/ml が接触後 4 週で 1.56 μ g/ml と 2 管上昇し, 一応有意の上昇を認めた。U-16 株では, 接触前 0.78 μ g/ml が接触後 4 週でも 1.56 μ g/ml

と1管の上昇にとどまった。

3) CFXのMIC変化

両菌株ともCFX接触前3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が接触

後4週でも6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と1管の上昇のみであった。

Fig. 1

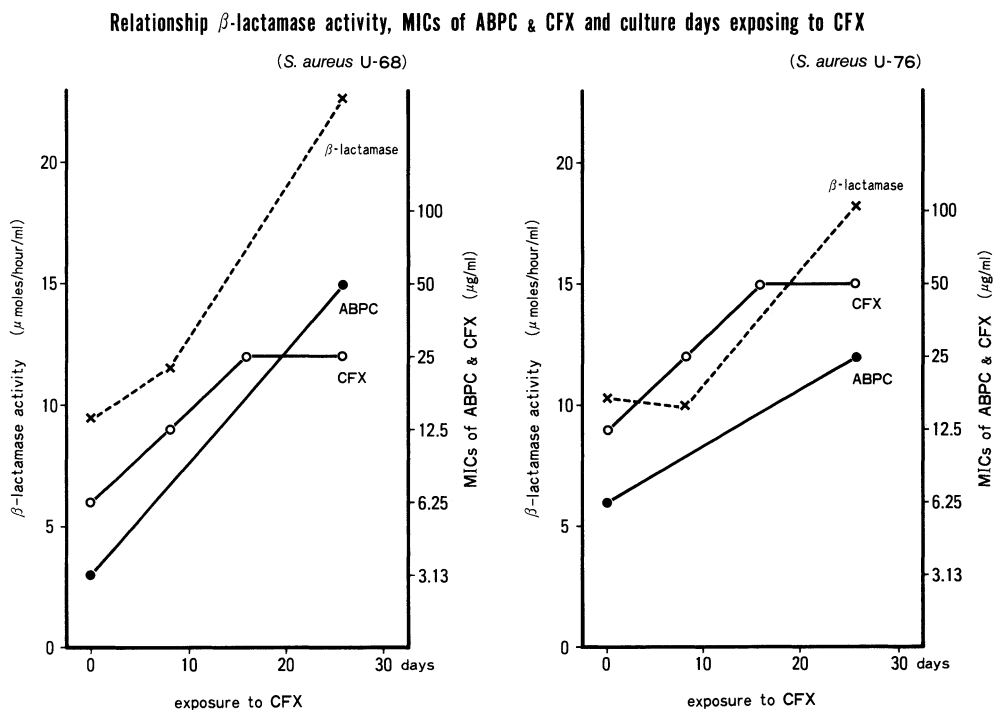
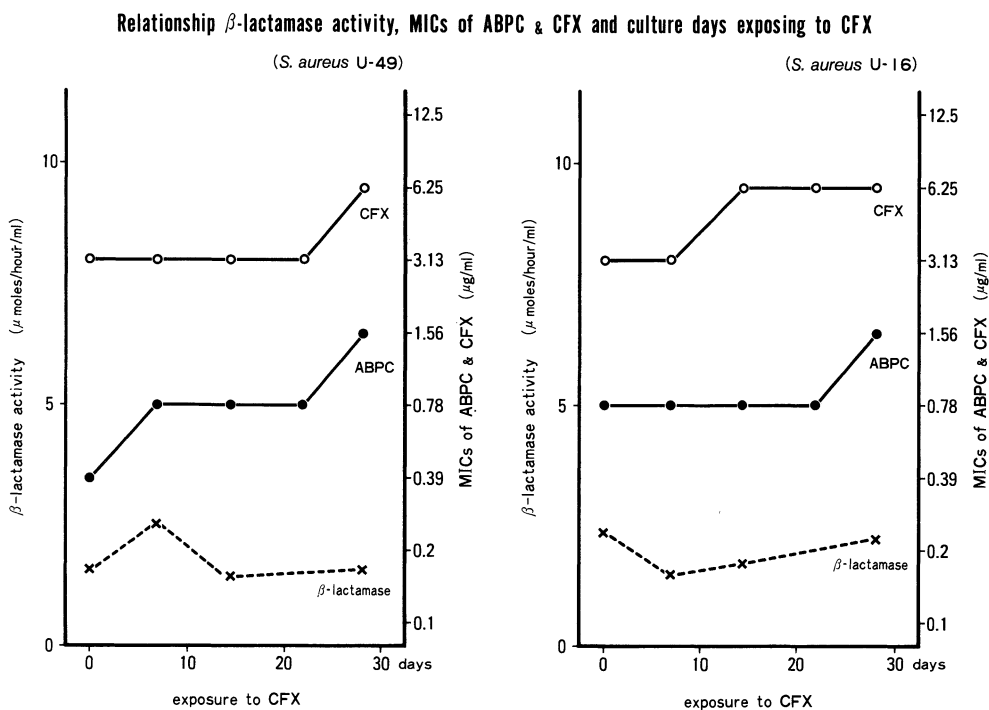
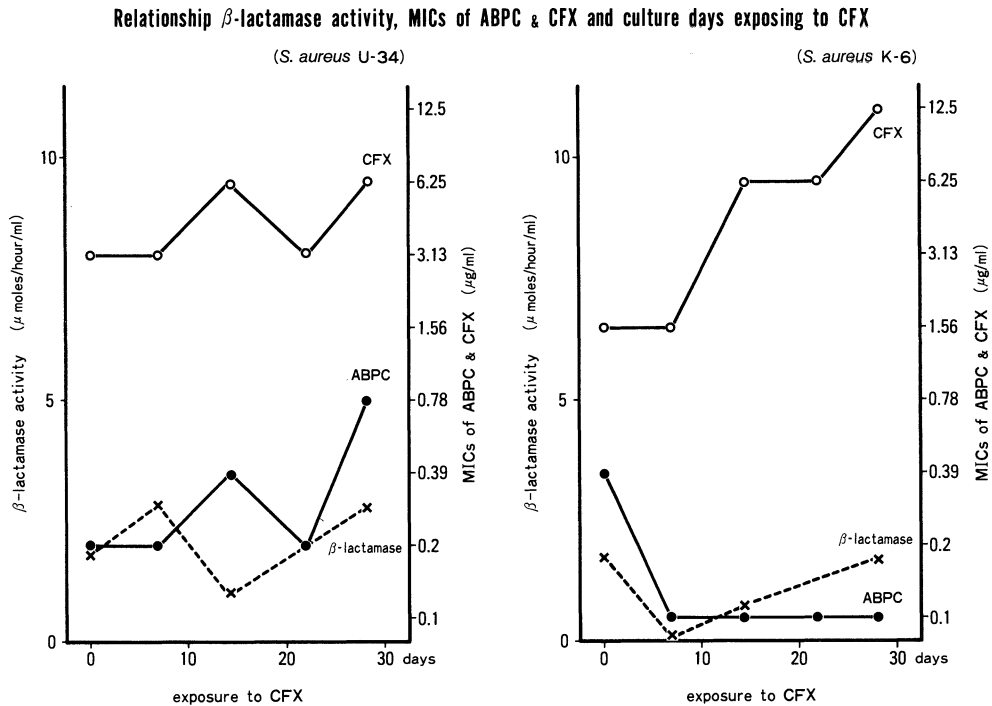


Fig. 2



4. 非産生株における β -lactamase, activity, ABPC, CFXのMIC変化
(4週まで)(Fig. 3)

Fig. 3



1) β -lactamase活性の変化

U-34, K-6の両菌株とも4週以内ではCFX接触前, 接触後共3 U以下で測定誤差内と思われ, あきらかな β -lactamase活性は認められなかった。

2) ABPCのMIC変化

U-34株ではCFX接触前0.2 μ g/mlが接触後4週では0.78 μ g/mlと2管の上昇を認めた。K-6株では接触前0.39 μ g/mlが接触後2週より0.1 μ g/mlと逆に2管のMICの低下を認めた。

3) CFXのMIC変化

U-34株ではCFX接触前3.13 μ g/mlが接触後4週でも6.25 μ g/mlであった。K-6株では接触前1.56 μ g/mlが, 接触後2週で6.25 μ g/mlと2管の上昇となり4週後では12.5 μ g/mlと著明なMIC上昇を認めた。

考 按

*S. aureus*が産生する β -lactamaseは菌体外酵素として, その大部分が菌体外に放出されると言われている。しかし我々の実験に使用した菌に於いては全体の40%近い β -lactamaseを菌体内に含有しており, この活性は薬剤の力価の低下を起こすのに十分なものと考えられる。更に菌体内には β -lactamaseがfreeの状態でも活性を持つものがそのうちの約5割, 菌体成分とbindingしている状態で活性を持つものが約5割含まれていることが予想された。これは*S. aureus*の β -lactamaseの薬剤を分解する酵素活性が働く場が必ずしも菌体外のみでなく菌体内においてもまた β -lactamase活性による薬剤の力価の低下を起こすことをうかがわせた。

CFXを接種させ続けると高産生株では4週

後に β -lactamase産生の著明な増加を認め、より多く産生したU-68株ではABPCのMIC上昇も著明に認められた。この結果より β -lactamase産生量とABPCのMICは密接な関係があることが確認された。またCFXのみでなくPCG, ABPC, AMPC等 β -lactamaseに分解される抗生剤も、それ自身が β -lactamaseのinducerとなりえ、*S. aureus*が交差耐性を獲得する事が十分予測された。

低産生菌では当初の予想では β -lactamase活性が上昇するものと思っていたが、macroiodometry法では有意差が出るほど変化は認めなかった。

非産生菌においてはCFXの誘導では4週以内の β -lactamase活性の上昇を明らかに認めなかったが、これ以上誘導をかけても酵素活性の上昇は起こらないと思われる。

耐性獲得の時期についてHoeplichらは、*K. pneumoniae*を起炎菌とした糖尿病患者の蜂窩織炎に対し10日間CETを連続投与したところその患者血中より同様に*K. pneumoniae*を検出しそのCETに対するMICの上昇と β -lactamase産生を認めたとの報告⁶⁾をしている。また β -lactamase産生及びABPCのMIC上昇は、CFX接触後1週間後でははっきりしなかったが4週間後では明らかになっている。従って耐性獲得は1週から4週の間と思われるが今回の実験からは、はっきりした時期を決定することはできなかった。

*S. aureus*に対するCFX連続接触によるCFXのMIC変化についてはCFXの β -lactamase安定性はきわめて高く、 β -lactamase分解による薬剤の力価の低下を説明できない。横田は、メチシリン耐性*S. aureus*の耐性機構につき、PBPの蛋白増加を指摘しているが、CFXのMIC上昇の原因をPBPの¹⁰⁾¹¹⁾変化に求めるという考え方もあり、今後検索してみる必要があると思われる。

文 献

- 1) 玉島瑳智子 他： β -lactamase検出法，感染症，13：73～76，1983
- 2) 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
- 3) 澤井哲夫，高橋郁子： β -ラクタマーゼ活性測定法とその応用，蛋白質核酸酵素，23：391～400，1978
- 4) 横田 健： β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性，モダンメディア，24：7360～377，1978
- 5) 中沢 久，松浦正幸，三橋 進：Clavulanic acidの β -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，30：S-2，1～9，1982
- 6) Paul D. Hoeplich, Alice C. Huston：Induction of Resistance in *Staphylococcus aureus* and *Klebsilla pneumoniae* by Exposure to Cephalothin and Cefoxitin, J Infect Dis 133：681～685，1976
- 7) 池田文昭，高乗 仁，西田 実，五島瑳智子，桑原章吾：Cephem系薬剤間のantagonismとグラム陰性菌における β -lactamase誘導について，CHEMOTHERAPY，31：304～308，1983
- 8) 澤井哲夫，高橋郁子，山岸三郎：Cefoxitinの各種 β -ラクタマーゼに対する安定性と β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌作用，CHEMOTHERAPY，26：S-1，83～87，1978
- 9) 横田 健： β -ラクタム剤に対する耐性菌とその機構，Current Concepts in Infections Disease，4：4～8，1985
- 10) Lucia Rossi, Enrico Tonin, Yuan R. Cheng and Roberta Fontana：Regulation of Penicillin-Binding Protein

Activity: Description of a methicillin-Inducible Penicillin-Binding Protein *Staphylococcus aureus*, Antimicrob Agents Chemother, 27:828~831, 1985

- 11) Kimiko Ubukata, Nakao Yamashita and Masatoshi Konno: Occurrence

of a β -Lactam-Inducible Penicillin-Binding Protein in Methicillin-Resistant Staphylococci, Antimicrob Agents Chemother, 27:851~857, 1985

質 疑 応 答

質問 田中久夫 (新潟大)

- ① β -lactamaseをinducerしたとっているが、ペニシリナーゼ、セファロスポリナーゼ、セフロキシマーゼのいずれのものか臨床的に問題となっている、セフェム耐性菌のモデルとは異ると考えてよいか。
- ② セフェム耐性ブドウ球菌で問題となっているPB2'は検出されたか。
- ③ サルモネラ菌の実験で、セファマイシン系抗生物質投与を継続すると、他の抗生物質が効きにくくなる現象 (antagonism reaction) と本質的に同じものか。

応答 島田純一郎 (名市大)

- ① *S. aureus* の産生する β -lactamaseは、Penicillinase 以外は出さないというのが定説となっています。
- ② 今回発表したK-6株ではPBB1の分画の増加、親和性の低下を認めています。
- ③ 多剤耐性のメカニズムについては、不明です。