

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

Junichirou Shimada, Shunkiti Baba, Haruji Kinoshita, Yoshito Mori, Kenji Suzuki, Mitsuaki Inagaki and Kaoru Soyano

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

We used *S.aureus* isolated from purulent otitis media and measured MICs and β -lactamase activity which was induced by CMX, CFX, FOM and Betamethasone. The results were as follows

1) β -lactamase was induced more by CMX than CFX in three strains. Clinically we have to pay attention much more, when we administrate ABPC

which is inactivated by β -lactamase.

2) No β -lactamase was induced by FOM.

3) We did not recognize MIC changes of *S.aureus* when we added Betamethasone. But Betamethasone had a little possibility to increase β -lactamase in one strain.

化膿性中耳炎由来*S.aureus*における β -lactamase

産生誘導実験 (第2報)

名古屋市立大学耳鼻咽喉科学教室

島田 純一郎・馬場 駿吉・木下 治二

森 慶人・鈴木 賢二・稲垣 光昭

征矢野 薫

はじめに

耳鼻咽喉科感染症において難治性を示す疾患の一つに慢性化膿性中耳炎がある。

この疾患治療の目的でFOM及びCMX耳

用液の開発が進められ、その治療効果は内服用抗生剤と比較して高い有効率をしめており今後の化膿性中耳炎の治療にとってかなり強力な治療手段となりえるものと考えられる。

またBetamethasoneは中耳炎の補助的な治療剤として既に製品化され、日常その抗炎症効果を期待して外用投与されている。

今回化膿性中耳炎由来の*S. aureus*を用いて各薬剤添加における β -lactamase産生の変化につき検討を加えたので報告する。

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cefinaise disc¹⁾を用い、高産生株5株を選出し、試験菌株とした。判定方法は前述した2種の試験紙に菌体を直接塗抹し、室温にて1時間放置後、色調の変化を起こしたものを陽性と判断した。

2. 感受性測定

分類した各菌株のABPC, CMX, CFX, FOMに対するMIC(最小発育阻止濃度)を測定した。FOMのMIC測定にはFOM研究会法²⁾, ABPC, CFX, CMXの測定には日本化学療法学会標準法³⁾に準じた。0.1% Betamethasoneを添加した検定用培地は滅菌したMH agar 100mlに対しBetamethasone 100mgを加えて作成した。

2) 菌体外 β -lactamaseの抽出

CMX, FOM(1/2~1/32MIC濃度), CFX(1/4MIC濃度), Betamethasone(0.1%vol/w)をinducerとして添加した100mlのBHI培地に 10^8 cells/mlの各菌液を0.5mlずつ植菌し、37°C 18時間静置培養した。その培養液を10,000rpm 10分間4°C冷却遠沈する。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、これを酵素液とし、直ちに使用した。

4. β -lactamaseの定量

PCG(明治製菓)を基質としたmacroiodometry法⁴⁾⁵⁾にて測定した。

5. 生菌数の測定(平板培養法)

37°C 18時間静置培養した菌液を滅菌蒸留水

を用いて適当に希釈しおおよそ 10^3 , 10^4 , 10^5 cells/mlの希釈液を作成した。その希釈液の10 μ lを血液寒天培地に薄く引き延ばし24時間後集落数を測定、換算した。

成 績

1. ABPC, CFX, CMX, FOM に対する*S. aureus* 5株のMIC (Table 1)

Table 1 MICs of ABPC, CFX, CMX & FOM

	Inoculum size : 10^6 cells/ml				
	U-255	U-347	U-396	U-744	U-791
ABPC	1.56	12.5	25	12.5	0.78
CFX	3.13	6.25	12.5	6.25	3.13
CMX	0.78	3.13	3.13	1.56	0.78
FOM	50	25	25	50	12.5

各種抗生剤に対する各菌株のMICは表のごとくであった。 β -lactamase高産生株のため比較的ABPCのMICは高く、 β -lactamase安定性のあるCFX, CMXのMICはABPCのそれに比しておしなべて低い値であった。FOMは全株12.5 μ g/ml以上であった。2. subMIC(1/2~1/32MIC)以下のCMX添加による β -lactamase activity変化(Fig 1)

U-255株では1/2, 1/4 MICは50U以上の高い産生量を示しているものの、1/8 MIC以下では突然産生量が20U以下と減少している。U-396株では1/2 MICで40U程度であったものが1/32 MICにても20U前後の高い産生量を示している。したがって各菌株の β -lactamase産生量はまちまちで、共通したsubMICにおける産生量変化の傾向は、はっきりしなかった。しかしいずれの菌株ともほぼ1/2 MIC添加にて16.8~50.2Uと最も高い β -lactamase産生を示した。

またこの値は薬剤無添加の場合よりいずれもはるかに高値であった。全ての株において1

1/2 MIC と 1/32 MIC 添加の β -lactamase 産生量を比較して、前者の値はすべて後者よりも高く、inducer として添加した薬剤の量に応じて β -lactamase 産生も行われるようにみうけられた。

3. subMIC (1/2 ~ 1/32 MIC) 以下の FOM 添加による β -lactamase activity 変化 (Fig 2)

Fig. 1. Relationship β -lactamase activity and subMICs of CMX

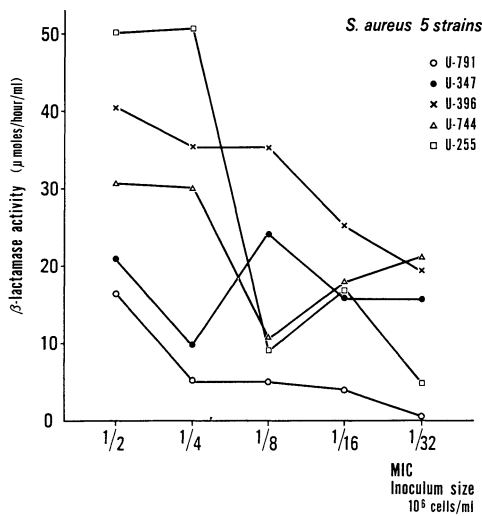
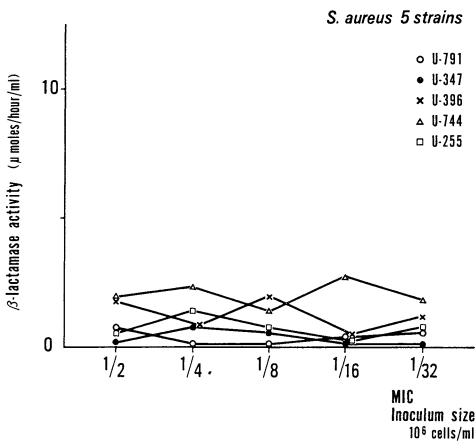


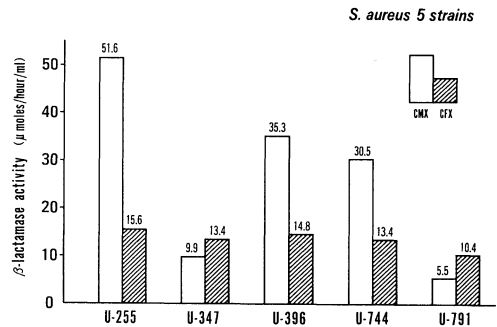
Fig. 2. Relationship β -lactamase activity and subMICs of FOM



U-744株以外の4菌種は2U以下であり、測定誤差内と思われる。U-744株では1/4, 1/16MICで2.5U程度の産生を認めておりFOMを添加しない場合の β -lactamase産生量よりもやや増加しているようにみうけられるが、CFX, CMXを添加した場合の産生量よりもかなり低い値である。したがって β -lactam環を持たないFOMはinducerにはならないと考える。しかしFOM添加にて培養した菌液及びその菌体はアシドメトリー及びニトロセフィンに反応し、5株とも β -lactamase高産生株のままであった。

4. CMX及びCFX添加時(1/4 MIC濃度)における β -lactamase activityの差 (Fig 3)

Fig. 3. Change of β -lactamase activity induced by CMX and CFX



U-347, U-791株ではCFX添加時の産生量がCMX添加時よりも3.5~5Uほど多い値であったが、CMX, CFXとも10U前後の値であり極端な差はなかった。U-255, 396, 744株においてはCMX添加時の方が15~36Uと高値をしめし、CMXの方がより強く β -lactamaseを誘導される菌株が存在することを示唆している。U-255株においては実にCFX誘導時の3倍以上の値をCMX誘導にて得ている。しかしCFX, CMXによって誘導された β -lactamase量は、いずれの菌株でも β -lactam環を開裂させそのMICを上昇させるのに十分な産生量であると思われる。

5. Betamethasone添加におけるABPCに対するMIC変化 (Table 2)

Table 2. MICs of ABPC and ABPC with 0.1% Betamethasone

	Inoculum size : 10 ⁶ cells/ml				
	U-255	U-347	U-396	U-744	U-791
ABPC	1.56	12.5	25	12.5	0.78
ABPC with 0.1% Betamethasone	1.56	12.5	25	25	0.78

0.1%Betamethasone 添加によって各菌株のMICはほとんど変化なくU-744株で12.5 μ g/mlが25 μ g/mlと1管の変化を認めた。これは測定誤差内の変化と考えられる。しかしMICの低下した菌株は1株もなかった。

6. Betamethasone添加時における β -lactamase activityとviable cells countとの関連 (Table 3)

Table 3. Relationship β -lactamase activity and viable cells count

	without Betamethasone		0.1% Betamethasone	
	β -lactamase activity (μ moles/hour/ml)	viable cells count	β -lactamase activity (μ moles/hour/ml)	viable cells count
U-255	18.3	3.4 \times 10 ⁹	23.6	3.8 \times 10 ⁹
U-347	15.2	1.0 \times 10 ⁹	16.2	0.7 \times 10 ⁹
U-396	15.0	5.2 \times 10 ⁹	14.6	5.4 \times 10 ⁹
U-744	16.1	1.5 \times 10 ⁹	16.2	2.6 \times 10 ⁹
U-791	10.8	4.8 \times 10 ⁹	11.1	9.9 \times 10 ⁹

inducerとしてCFX 1/4 MIC添加時の、各菌株の β -lactamase activityと平板培養法によって測定した生菌数との関連を示した。Betamethasone非添加時の β -lactamase産生量は生菌数と特に関連を持たないように見える。Betamethasone添加にても非添加時と比較して β -lactamase産生量の著明な変化を認めず、また生菌数との関連もないように見えた。

7. U-255株0.1%Betamethasone添加における β -lactamase産生量変化 (Table 4)

Table 4. Change of β -lactamase activity added by 0.1% Betamethasone

	U-255 <i>S. aureus</i>			mean
	β -lactamase activity (μ moles/hour/ml)			
with Betamethasone	19.3	28.0	36.0	27.8
without Betamethasone	15.6	21.0	17.6	18.1

3回ともBetamethasone添加の β -lactamase産生量の値は、非添加のそれよりも4~18 Uほど高値であった。その平均の差は9 U程度であり統計的に有意差はなかったがU-255株の場合 β -lactamase産生量が増加する傾向にあると思われる。

考 按

慢性化膿性中耳炎の起炎菌として *P. aeruginosa* 及び *S. aureus* は高頻度に検出される菌株である。*S. aureus* の薬剤に対する耐性については最近多くの報告がなされるようになってきている。

その化膿性中耳炎に対して、点耳療法は従来より施行されてきたものであるが、使用される薬剤の耳毒性の問題及び薬剤安定性の問題より、これまで点耳治療に適する薬剤がなかったが、CMX, FOMは耳毒性の検索がなされ、その安全性も検討され点耳液として、適した薬剤と考えられる。実際にその臨床第2相試験にて、その有効率が検討され、かなり良好な結果を得ている⁸⁾⁹⁾。

またBetamethasoneは以前より中耳炎の耳用液として既に製品化された薬剤であり、中耳炎の日常診療にも抗炎症効果を期待して使用されている。しかしBetamethasoneと抗生剤を併用した場合のMIC及び β -lactamase産生変化についての報告は見あたらない。

1/4MIC, CFX, CMX投与時の β -lactamase産生量変化につき検討を加えた。CFXは5株とも10U前後の産生量であるがCMX投与時には2株40以上とCFXよりかなり高い産生量を示し、各菌株における β -lactamase産生量は、その酵素誘導に用いた薬剤の相違により、また同一薬剤にてもその菌株間に大きな差を生じる可能性があると思われる。

FOMは β -lactam環を持たない抗生剤であるため、 β -lactamase産生のinducerとなりえないと考えるのが自然であるが、事実FOM添加によりどのsubMIC濃度にもほとんど β -lactamase産生量の増加はみられていない。しかしながらFOM添加時の菌培養液及び菌体をアシドメトリー、Nitrocefinを持ちいた方法にて β -lactamaseを検出してみると、はっきりと β -lactamase高産生をしめしている。これは菌株がFOM存在下で培養したときにも β -lactamase非産生菌と変化しているのではなく依然高い β -lactam環分解能を持っているものと考えられる。

KM, AMK, GMのsubMIC以下における β -lactamaseの産生量変化についてJochanan Stessmann¹⁰⁾らは1/2048MICという低濃度での影響を報告しているがCFX, CMX及びFOMのsubMIC以下の効果については今回の実験では、1/32MICまでの測定にとどめたため、はっきりした傾向はつかめなかったが、おそらくCMX, CFX及びFOMにおいては1/32MIC以下の低濃度では β -lactamaseの誘導はあまりかかれないと想像される。

β -lactamase産生量と生菌数との問題については既に当研究会で発表したように、ある程度相関性を持っているものと思われる。今回の測定においては、以前の結果を基にして菌株別の0.1%Betamethasone添加による β -lactamase産生量と生菌数の関連性を予測し

て検索したわけである。当然、 β -lactamase産生量と生菌数とは正の相関を持つものと予想していたのであるが、結果は表のごとく一見なんら相関性のなさそうな結果が得られた。

ま と め

1. β -lactamase高産生*S.aureus* 5株ともCMX, CFXは β -lactamaseをよく誘導した。とくにCMXは多量に β -lactamaseを誘導する菌株が存在するので、臨床上ABPC等を併用する場合は注意を要すると思われる。
2. FOMは β -lactamaseを誘導しなかった。
3. Betamethasoneは*S.aureus*のABPCに対するMICに変化を与えないと思われたが β -lactamase産生については追加検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) 五島瑛智子他： β -lactamase 検出法，感染症，13：73～76，1983.
- 2) 五島瑛智子他：Fosfomycinのin vitro, in vivo 抗菌作用，CHEMOTHERAPY，23：1653～1661，1975.
- 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) 澤井哲夫，高橋郁子： β -lactamase 活性測定とその応用，蛋白質核酸酵素，23：391～400，1978.
- 5) 横田健： β -lactamase 測定法とその酵素活性と耐性，モダンメディア，24：360～377，1978.
- 6) 野村恭也：点耳薬性難聴について，耳展，18：541～546，1975.
- 7) 中井義明：鼓室内薬剤による内耳障害（実験的観察），Audiology，16：275～276，1977.
- 8) 馬場駿吉他：化膿性中耳炎に対する耳用Fosfomycinの臨床使用成績，耳鼻と臨床，32：270～274，1986.
- 9) 木下治二他：Cefmenoxime 耳用液によ

る臨床的検討, 耳鼻臨床, 77:1395~1400, 1984.

10) Jochanan Stessman, Jacques Michel : Effects of Subminimal Inhibitory Concentrations of Amonoglycosides on the Penicillinase Production of *Staphylococcus aureus*, Chemotherapy, 29:116~120, 1983.

11) 島田純一郎他: β -lactamase 産生 *S.aureus* について, 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌, 1:85~98, 1985.

質 疑 応 答

質問 田中久夫 (新潟大)

どうしてセファマイシン系のCFXよりセファロsporin系のCMXの方が β -lactamaseの誘発が多かったのか。

応答 島田純一郎 (名市大)

御質問のごとくセファマイシン系抗生剤の方が β -lactamase誘導作用が強いと考えられますが, 今回の実験では, CFXよりもCMXにて β -lactamaseをより多く誘導した株が多かった。またその原因については検討しておりません。