

原 著

患者分離の結核菌と非定型抗酸菌の  
 $\beta$ ラクタマーゼ活性と薬剤耐性の検討中 川 義 久 ・ 島 津 和 泰  
蛭 原 桃 子 ・ 阿 萬 久 美 子

国立療養所熊本南病院内科

A STUDY OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY OF MYCOBACTERIA AND CLINICAL  
TRIAL OF PENICILLIN/BETA-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS IN THE  
TREATMENT OF DRUG-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*Yoshihisa NAKAGAWA\*, Kazuyoshi SHIMAZU  
Momoko EBIHARA, and Kumiko AMAN

Beta-lactamase activity was determined using a nitrocefin disc method on 34 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) strains and 13 nontuberculous mycobacteria strains. In the 34 *M. tuberculosis* strains, 23 strains showed beta-lactamase activity. In 10 *Mycobacterium avium* complex strains, no beta-lactamase activity was detected. In the *Mycobacterium chelonae* strains, all three strains examined showed strong beta-lactamase activity.

No correlation was found between beta-lactamase activity and resistance to anti-tuberculous chemotherapeutic agents.

Four patients who were persistently positive for multi-drug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) on sputum and positive in beta-lactamase activity, were treated with penicillin/beta-lactamase inhibitor combinations. In two cases, the trials were discontinued because of diarrhea; the trials were continued in the remaining two for four months, but the MDR-TB was positive during the course of the therapy.

Effectiveness of the therapy with penicillin/beta-lactamase inhibitor combinations against *M. tuberculosis* was obscure, although many of *M. tuberculosis* examined showed beta-lactamase activity.

**Key words** : Beta-lactamase, Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Penicillin

**キーワード** :  $\beta$ -ラクタマーゼ, 多剤耐性結核菌, ペニシリン

別刷り請求先：  
中川 義久  
起生会吉田病院  
〒860-0855 熊本市北千反畑町2-5

\* From the Department of Internal Medicine,  
Kumamoto National South Hospital, 2338 Matsubase,  
Shimomashiki, Kumamoto 869-0524 Japan.  
(Received 1 Oct. 1998/ Accepted 21 Dec. 1998)

## はじめに

抗酸菌は一般にβ-ラクタム剤に耐性である。この耐性機序のひとつとして、結核菌や非定型抗酸菌の一部の菌に関して、β-ラクタマーゼの関与も考えられている<sup>1)2)</sup>。実際、結核菌や非定型抗酸菌の一部はβ-ラクタマーゼを高率にかつ多量に産生することが報告されており<sup>3)4)</sup>、近年、β-ラクタム剤とβ-ラクタマーゼ阻害剤の合剤を多剤耐性結核菌の治療に応用しようとする報告もある<sup>5)6)</sup>。

今回、われわれは、β-ラクタム剤/β-ラクタマーゼ合剤を、多剤耐性結核菌持続排菌例に対して治療する目的で、結核菌と対照としての3種の非定型抗酸菌のβ-ラクタマーゼを測定し、β-ラクタマーゼ陽性でかつ多剤耐性結核菌持続排菌例に対し投与を行ったので報告する。

## 材料と方法

## 1) 対象

1997年1月より当院で各種臨床検体より分離され、Tween 80の代わりにグリセリンを加えた7H9培地にて凍結保存されていた結核菌34株、および、対照として非定型抗酸菌13株を用いて行った。

## 2) 菌種の同定

抗酸菌の鑑別は、DDH マイコバクテリア極東を用いて行った。

## 3) β-ラクタマーゼの検出

Kwonら<sup>7)</sup>の方法に従って行った。すなわち、保存菌株を小川培地にて37℃、28日間培養した後、形成したコロニーを、1白金耳鈎菌し、0.5mlの滅菌蒸留水に懸濁。懸濁液をガラスビーズ(直径0.5mm)をいれた試験管内でvortex mixerにて攪拌し細胞を破碎した。その破碎液のなかに、セフィナーゼディスク<sup>®</sup>(BBL cefinase, Becton Dickinson)を浸透させ、37℃、60分間反応させ、色調の変化で判定した。セフィナーゼディスク<sup>®</sup>はニトロセフィン含有し、β-ラクタマーゼに

反応して加水分解を受け色調が黄色より赤色に変化するものであるが、色調の変化を薄い赤色(+)から、濃赤色(+++)まで肉眼的に半定量的に分類した。

## 4) 培地、薬剤

耐性検査は1%小川培地を用いた普通法にて行った。β-ラクタム剤とβ-ラクタマーゼ阻害剤の合剤は、ampicillin/sulbactam (SBTPC)(ファイザー製薬)と、amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA)(スミスクラインビーチャム製薬)を使用した。投与法は、この2剤を2週間毎に交互に投与した。すなわち、SBTPCを1日3錠、2週間内服し、その後、AMPC/CVAを1日3錠、2週間内服し、これを交互に繰り返した。この投与法は保険上の制約により独自に考案した。

## 結 果

## 1) β-ラクタマーゼ活性と薬剤感受性(表1, 表2)

ニトロセフィン法によるβ-ラクタマーゼ活性の測定結果を表1に示した。結核菌は34株中、23株がβ-ラクタマーゼ陽性で、2株が強いβ-ラクタマーゼ活性を示していた。*Mycobacterium avium* complex (MAC)は10株全株がβ-ラクタマーゼ陰性であった。

*Mycobacterium chelonae* (*M. chelonae*)は3株すべてがβ-ラクタマーゼ陽性で、うち2株は強いβ-ラクタマーゼ活性を有していた。

結核菌34株中、13株が多剤耐性結核菌であったが、β-ラクタマーゼ活性と各種抗結核薬に対する耐性度に関連は認められなかった(表2)。

## 2) β-ラクタマーゼ陽性多剤耐性結核菌に対するベニシリン/β-ラクタマーゼ阻害剤投与の試み(表3)

β-ラクタマーゼ陽性でかつ多剤耐性結核菌持続排菌例で排菌陰性化の手段がない4例に対して、SBTPCとAMPC/CVAを投与した。4例のうち2例は対処困難な下痢のため、2週間以内に投与中止し、2例は4カ月間投与継続した。その経過を表3に示す。症例1は昭和55年より入院中で、表2の検体番号17の患者で、症例2は昭和63年より入院中で検体番号14の患者である。両者

表1 各種抗酸菌のβ-ラクタマーゼ活性  
(ニトロセフィン法)

| 種                        | 株数 | β-ラクタマーゼ活性 |    |    |     |
|--------------------------|----|------------|----|----|-----|
|                          |    | -          | +  | ++ | +++ |
| <i>M. tuberculosis</i>   | 34 | 11         | 19 | 2  | 2   |
| <i>M. intracellulare</i> | 9  | 9          | 0  | 0  | 0   |
| <i>M. avium</i>          | 1  | 1          | 0  | 0  | 0   |
| <i>M. chelonae</i>       | 3  | 0          | 0  | 1  | 2   |

表2 結核菌のβ-ラクタマーゼ活性と抗結核剤感受性

| 検体番号 | β-ラクタマーゼ | 抗結核剤感受性 (μg/ml) |       |        |       |      |
|------|----------|-----------------|-------|--------|-------|------|
|      |          | INH             | RFP   | SM     | EB    | PAS  |
| 1    | +++      | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 2    | +++      | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 3    | ++       | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 4    | ++       | 5以上             | 50以上  | 20~200 | 5以上   | 感    |
| 5    | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 6    | +        | 5以上             | 50以上  | 感      | 感     | 感    |
| 7    | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 8    | +        | 1~5             | 10~50 | 感      | 感     | 1~10 |
| 9    | +        | 1~5             | 感     | 感      | 2.5~5 | 感    |
| 10   | +        | 5以上             | 50以上  | 感      | 感     | 10以上 |
| 11   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 12   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 13   | +        | 5以上             | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 14   | +        | 1~5             | 50以上  | 200以上  | 5以上   | 1~10 |
| 15   | +        | 1~5             | 50以上  | 感      | 5以上   | 感    |
| 16   | +        | 1~5             | 50以上  | 200以上  | 5以上   | 1~5  |
| 17   | +        | 5以上             | 50以上  | 20~200 | 5以上   | 1~5  |
| 18   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 19   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 20   | +        | 1~5             | 50以上  | 20~200 | 5以上   | 10以上 |
| 21   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 22   | +        | 感               | 感     | 200以上  | 感     | 感    |
| 23   | +        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 24   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 25   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 26   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 27   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 28   | -        | 5以上             | 10~25 | 感      | 感     | 10以上 |
| 29   | -        | 5以上             | 50以上  | 感      | 5以上   | 1~5  |
| 30   | -        | 5以上             | 50以上  | 200以上  | 5以上   | 10以上 |
| 31   | -        | 1~5             | 感     | 20~200 | 5以上   | 感    |
| 32   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 33   | -        | 感               | 感     | 感      | 感     | 感    |
| 34   | -        | 1~5             | 50以上  | 感      | 5以上   | 感    |

(感;感受性)

ともに明らかな菌陰性化効果はなかった。効果判定にはより長期の投与が必要と考えられたが、患者の希望で中止とした。

### 考 察

多剤耐性結核菌 (MDR-TB: Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*) はINH・RFP両剤を含む、主要な抗結核剤2剤以上に耐性を示すものであり、近年増加傾向にあるといわれており、米国では1991

年の時点で、全分離菌のうち3.5%を占めることが報告されている<sup>8)</sup>。また、MDR-TBは近年、医療従事者への感染死亡例も報告されるにいたり<sup>9)</sup>、その治療法が検討されている。

今回、われわれが検討した結核菌の34株中、13株がIsemanら<sup>10)</sup>の基準でMDR-TBであり、非常に高い確率であるが、当院ではMDR-TBを持続排菌している入院患者が多数存在するため、短期間の検討ではそれらの株が多くをしめたものと思われる。われわれはこの



も同様の報告をしている。その原因として、結核菌の $\beta$ -ラクタマーゼは染色体上の遺伝子によってコードされているので<sup>15)</sup>、抗結核剤に対する耐性と同じく、自然に発生した突然変異であると考えられている。そういう観点より、抗結核剤耐性菌は $\beta$ -ラクタム剤との接触の機会も多く、抗結核剤耐性菌はより多く $\beta$ -ラクタマーゼを産生するとわれわれは仮定したが、結果は、両者に関連はなく、この原因については文献的考察もなされておらず、不明である。

多剤耐性結核菌に対して、 $\beta$ -ラクタム剤と $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の合剤が有効であったという症例報告は散見されるが<sup>16)</sup>、まだ、大きな規模の臨床試験の報告はない。今回、2例に対し、4カ月の投与を行ったが、明らかな効果は見られなかった。今回は検討できなかったが、やはり投与開始前には対象症例の菌の $\beta$ -ラクタム剤/ $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の合剤のMICを測定すべきであるし、また有効と報告された例はいずれもその効果発現までに6カ月から数年を要しており<sup>17)</sup>、より長期の投与が必要であると考えられたが、2例のうち1例は軟便の副作用が持続しており対処に苦慮し、また4例中、2例は下痢のために長期投与が困難であった。これは従来の報告<sup>16)</sup><sup>17)</sup>には記載のないことであった。

また、今回 $\beta$ -ラクタマーゼ陰性のMDR-TBが4例認められたが、われわれの検討では、 $\beta$ -ラクタマーゼ検出の感度が低いため、 $\beta$ -ラクタマーゼ陽性の可能性があるのではないかと考え、ペニシリン単独による治療は行わなかった。

多剤耐性結核菌に対する治療においてキノロン剤とともに $\beta$ -ラクタム剤は可能性のある薬剤であるが、その副作用から慎重な対象症例の検討が必要であると考えられた。

## 結 論

結核菌と各種非定型抗酸菌の $\beta$ -ラクタマーゼを測定したところ、結核菌では34株中、23株が $\beta$ -ラクタマーゼ陽性であった。非定型抗酸菌では菌種により大きな差が認められた。

多剤耐性結核菌持続排菌例で $\beta$ -ラクタマーゼ陽性例2例に対し、 $\beta$ -ラクタム剤/ $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤合剤を投与したが、4カ月の投与では明らかな有効性はなかった。

## 文 献

- 1) Zhang Y, Steingrube VA, Wallace RJ Jr.: Beta-lactamase inhibitors and the inducibility of the beta-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis. 1992; 145: 657-660.
- 2) Prabhakaran K, Harris EB, Randhawa B, et al.: Use of beta-lactam/beta-lactamase-inhibitor combinations as antimycobacterial agents. Microbios. 1993; 76: 251-261.
- 3) Coira A, Salvado M, Reig R, et al.: Beta-lactamase activity in mycobacteria other than *M. tuberculosis*. J Chemother. 1995; 7: 106-108.
- 4) Kasik JE, Monick M, Schwarz B: Beta-lactamase activity in slow-growing nonpigmented mycobacteria and their sensitivity to certain beta-lactam antibiotics. Tubercle. 1980; 61: 213-219.
- 5) Sorg TB, Cynamon MH: Comparison of four beta-lactamase inhibitors in combination with ampicillin against *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrobial Chemotherapy. 1987; 19: 59-64.
- 6) Grassi C, Peona V: New drugs for tuberculosis. Eur Respiratory J (Suppl). 1995; 20: 714-718.
- 7) Kwon HH, Tomioka H, Saito H: Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. Tubercle & Lung Dis. 1995; 76: 141-148.
- 8) Bloch AB, Cauthen GM, Onorato IM, et al.: Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. JAMA. 1994; 271: 665-671.
- 9) Weltman AC, Diferdinando GT, Washko R, et al.: A death associated with therapy for nosocomially acquired multidrug-resistant tuberculosis. Chest. 1996; 110: 279-281.
- 10) Iseman MD: Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. N Eng J Med. 1993; 329: 784-791.
- 11) Chen CH, Yang MH, Lin JS, et al.: The in vitro activity of beta-lactamase inhibitors in combination with cephalosporins against *M. tuberculosis*. Proceedings of the National Science Council, Republic of China-Part B, Life Sciences. 1995; 19: 80-84.
- 12) Cynamon MN, Palmer GS: In vitro activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1983; 24

- : 429-431.
- 13) Rastogi N, Potar MC, David HL : Action of antituberculous and beta-lactam drugs (including imipenem) against extra- and intracellularly growing *Mycobacterium avium-intracellulare*. Annal Institut Pasteur-Microbiology. 1988 ; 139 : 225-232.
  - 14) Chambers HF, Moreau D, Yajko D, et al. : Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? Antimicrobial Chemother. 1995 ; 39 : 2620-2624.
  - 15) Segura C, Salvado M, Collado I, et al. : Contribution of  $\beta$ -lactamases to  $\beta$ -lactam susceptibilities of susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42 : 1524-1526.
  - 16) Nadler JP, Berger J, Nord JA, et al. : Amoxicillin-clavulanic acid for treating drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Chest. 1991 ; 99 : 1025-1026.
  - 17) 岩永知秋, 横田欣児, 岸川禮子 : オフロキサシンとアモキシシリン/クラブラン酸の併用が有効であった多剤耐性結核菌による持続排菌肺結核症の1例. 結核. 1997 ; 72 : 9-13.