

# β-ラクタマーゼの新測定法：酵素活性・基質特異性 および阻害剤効果の測定

山 辺 茂

## I 序 論

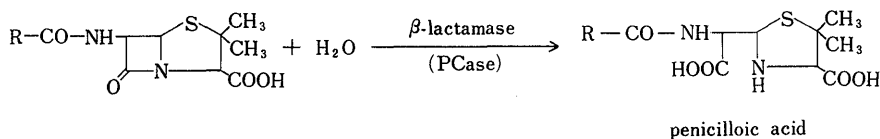
ペニシリン (penicillin, PC と略記) が Fleming によって青カビからみつけられて (1929) 11年のちに, Chain と Florey により純物質として単離され, 化学療法剤としての抗生物質の歴史はスタートした。しかしまもなく, Abraham と Chain は PC に感受性のない大腸菌からペニシリナーゼ (penicillinase, PC ase) をみつけた (1940)。同じような PC の加水分解酵素が Kirby (1945) によって, ブドウ球菌からもみつけられた。セファロスポリン (cephalosporin, CEP) も同じような β-ラクタム環の抗生物質であるから, 同様の酵素によって加水分解される。この酵素は Abraham と Newton (1956) により, セファロスポリナーゼ (cephalosporinase, CEP ase) と名づけられた。両酵素は基質のパターンにおいて相互乗入れがみとめられるので, 現在は β-ラクタマーゼ (β-lactamase) と総称される。

β-ラクタム抗生物質は細胞膜にはなんら影響を与えずに, もっぱら細菌細胞壁のペプチドグリカン (murein ともいう) の合成を阻害するため, いわゆる選択毒性の高い化学療法剤として, ペンシルペニシリン (benzylpenicillin, PCG) 以来今日まで 40 年間たえず進展をつづけてきている。

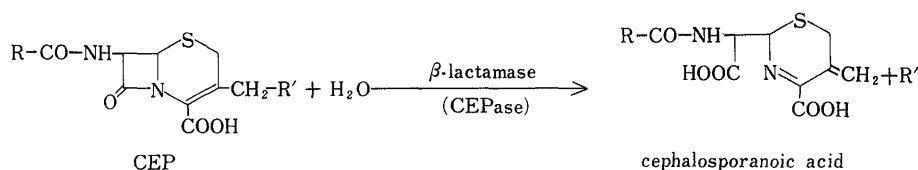
しかし β-ラクタム抗生物質にとっても, 最大の敵は標的細菌の産出する β-ラクタマーゼであるから, この酵素に対する高い安定性が現在開発され, あるいは目下研究されている PC および CEP にとって必須の条件である。[この点については横田教授の総説 (1979) に詳しく記されている。]

さて β-ラクタマーゼの測定法がいくつか考案されている。オーソドックスなのは生物学的検定法 (bioassay) であるが, これは残存抗生物質の力価検定に多くの時間がある。短時間に行える方法としてヨウ素滴定法 (iodometry) がある。この方法は次に示す β-ラクタマーゼの反応, すなわち

PC の場合：

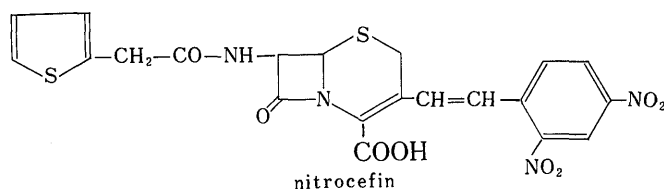


CEP の場合：



において、反応生成物であるペニシロ酸またはセフアロスポラノ酸が還元性に富み、 $\text{I}_2$  を  $\text{HI}$  にすることを利用したものである。Perret 法 (1954) をはじめ多くの方法があるが、現在では Novick (1962) によるマイクロヨウ素法 (micro-iodometry) がよく用いられている。これらについては Citri と Pollock (1966) の総説を参照されたい。

なお、わりあい新しい O'Callaghan 法 (1972) は発色団をもつ CEP すなわちニトロセフィン (nitrocef, NCF) を用いて、 $\beta$ -ラクタマーゼがはたらくと黄色から赤色に変ることを



指標としたもので、分光学的に反応をトレースすることができる。

これらの  $\beta$ -ラクタマーゼ測定法はそれぞれ特色をもっているが、時間がかかりすぎたり、操作に技術を要したりする欠点がある。これに対して筆者の方法 (山辺, 1980) は、若干の制限条件がつくとはいえ、応用範囲のひろい簡便・迅速な  $\beta$ -ラクタマーゼ測定法と考えられる。

山辺法をみつけた糸口は、ペニシロ酸またはセフアロスポラノ酸が還元性物質であること、およびシステアミンなどの還元性物質が  $\text{Cu}^{2+}$  の存在でシトクロム  $c$  (Cyt  $c$  と略記) に急速に電子を伝達することが当研究室でわかっていたことである。したがって PC や CEP が  $\beta$ -ラクタマーゼで加水分解されたのち、 $\text{Cu}^{2+}$  により触媒されて電子を Cyt  $c$  に移すことが予測できたわけである。Cyt  $c$  の還元反応は分光学的にトレースできることはいうまでもないから、この方法によって  $\beta$ -ラクタマーゼのいろんな特性研究ができる可能性が大きい。

本論文では筆者が最近公表した山辺法の論文を中心として、 $\beta$ -ラクタマーゼの活性測定、基質特異性の決定および阻害剤の効果判定について述べる。

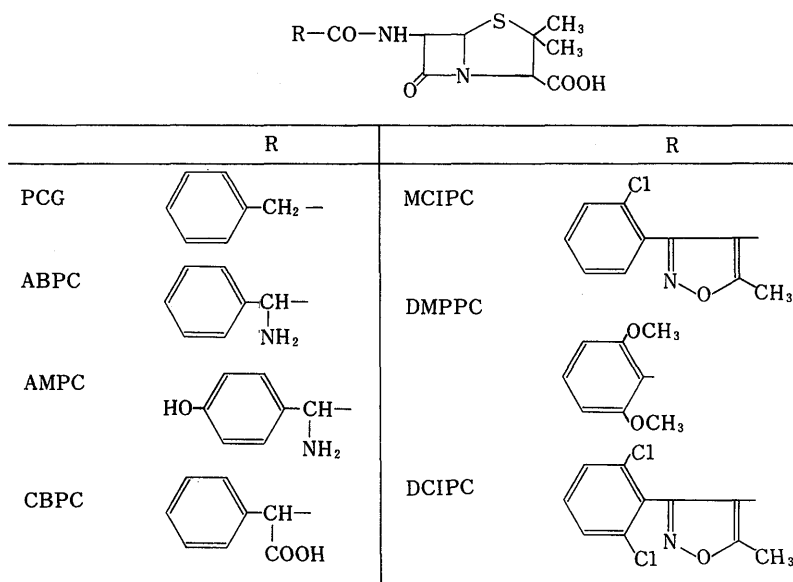
## II 試薬と測定法

### (1) 試薬と酵素

#### i) PC 類

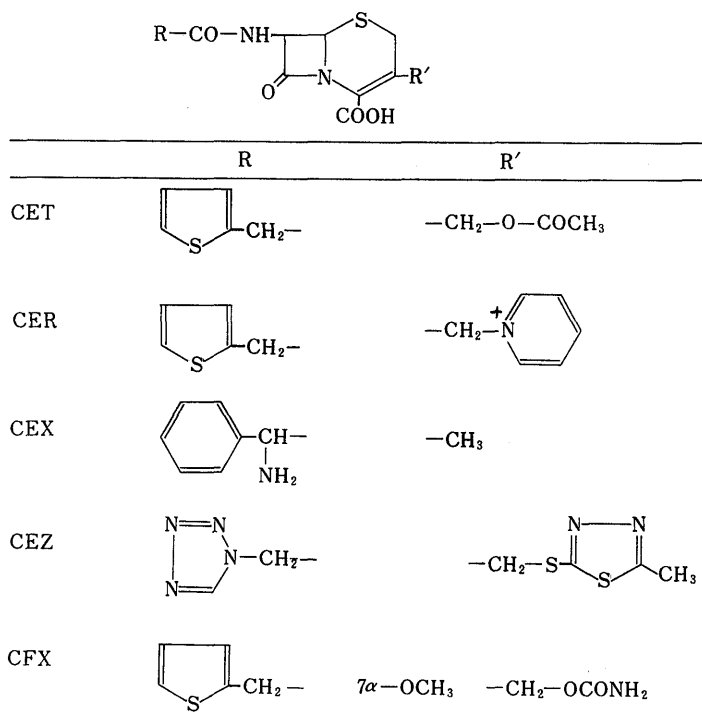
PCG (Meiji), アンピシリン (ampicillin, ABPC, Takeda), アモキシシリン (amoxycillin, AMPC, Beecham), カルベニシリン (carbenicillin, CBPC, Beecham), メチシリン (methi-

cillin, DMPPC, Banyu), クロキサシリン (cloxacillin, MCIPC, Meiji), ジクロキサシリン (dicloxacillin, DCIPC, Beecham) を用いた。これらの分子構造式を次に示す。



## ii) CEP類

セファロチン (cephalothin, CET, Torii), セファロリジン (cephaloridin, CER, Torii), セファレキシム (cephalexin, CEX, Torii), セファゾリン (cefazolin, CEZ, Fujisawa), セフォキシチン (cefoxitin, CFX, Merck) を用いた。これらの分子構造式を次に示す。



iii)  $\beta$ -ラクタマーゼ

*Bacillus cereus* より抽出された次の3種の酵素標品を用いた。

Tokyo Kasei 社製 (水溶液),  $10^5$  I.U. PCG hydrolyzed/60min/ml (以下  $10^5$  I.U.P.H./60min/ml と書く) およびその100倍力価溶液

Sigma 社製 (粉末),  $220\mu\text{mole}$  PCG hydrolyzed/min/mg (以下  $220\mu\text{mole}$  P.H./min/mg-solid と書く)

Whatman 社製 (粉末), 600 (PCase) & 88 (CEP ase)  $\mu\text{mole}$  PCG & CEP-C hydrolyzed/min/vial. これを 5ml の純水に溶かして原液とした。

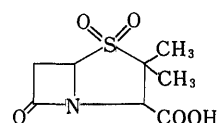
なお臨床分離菌より抽出した酵素については、測定法の項で述べる。

iv)  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤

デアミノペニシラン酸スルホン (CP-45899, Pfizer) を用いた。

v) シトクロム c

*Candida krusei* より抽出した結晶性 Cyt c (Sankyo) を用いた。



CP-45899

## (2) 測定法

i) 標準反応

反応溶液の組成は、PCG (0.4mM, 最終濃度),  $\beta$ -ラクタマーゼ (Tokyo Kasei 原液の5倍希釈),  $\text{CuSO}_4$  (0.5mM), Cyt c (0.5mg/ml) をリン酸 Na-K 緩衝液 (4mM, pH 7.0) 中に含む。これを反応セルに置いて (対照セルには酵素ぬきの反応溶液をいれる) 島津 UV-190 ダブルビーム分光光度計により, 550nm の差吸光度 (以下  $\Delta\text{Abs}$  と略記する) の経時変化を記録した。反応温度は  $25^\circ\text{C}$  であった。

ii) 各成分の濃度変化

$\text{PCG} \cdot \text{CuSO}_4 \cdot \text{Cyt c}$  および酵素の濃度を標準反応の値から変動させて, 反応に伴う  $\Delta\text{Abs}$  の経時変化がどのように影響されるかをしらべた。濃度範囲は実験成績の部に記してある。

iii) 基質および酵素の種類の変化

基質を PCG から, ほかの PC および CEP に変えて, 同一濃度 (0.4mM) において  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線を求めた。また酵素を Sigma 社の  $\beta$ -ラクタマーゼに変えて, かつ濃度も変動させて,  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線を求めた。

iv) 阻害剤を含む反応

溶液の組成は上述の標準反応に準じるが, 異なる点は: 基質として PCG を用いるが阻害剤として CP-45899 (1~2mM) を含むこと, Cyt c の濃度が 1/2 であること, Whatman 社の酵素 (原液の 1/160) を用いたことである。また Unicam SP-1700 UV ダブルビーム分光光度計を用い, 反応温度は  $30^\circ\text{C}$  であった。[(iv)~(vi) 項の実験はロンドン病院医科大学で行なった]。

#### v) NCF による比較実験

NCF を基質として CP-45899 の阻害効果を山辺法および O'Callaghan 法を用いて測定した。山辺法による場合、反応溶液の組成は NCF (0.38mm),  $\beta$ -ラクタマーゼ (Whatman, 原液の 1/160), CP-45899 (1~2mm),  $\text{CuSO}_4$  (0.5mm), Cyt c (0.25mg/ml) を緩衝液中に含む。また O'Callaghan 法では、反応溶液は  $\text{CuSO}_4$  と Cyt c を欠き、かつ測定波長は 390nm である。

#### vi) 臨床分離菌の $\beta$ -ラクタマーゼ反応 (基質特異性)

ロンドン病院より提供された臨床分離菌 *Enterobacter* の中から 3 種 (WL 3, WL 5, WL 7) を選び、Leung-Williams の記載 (1977) に従って培養し、リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗ってから MSE-ultrasonicator で破碎し、20000g・30min・4°C で超遠心分離した上清液をそのまま用いた。反応液の組成は標準反応に準じた。基質として 5 種の  $\beta$ -ラクタム抗生物質を用いた。

### III 実験成績

#### (1) 標準反応と濃度変化

図 1 は標準反応系の  $\Delta\text{Abs}$  (550nm における差吸光度) の経時変化曲線 (以下  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線とよぶ) および一成分を欠くときの影響を示している。Cyt c の還元反応は、たしかに標

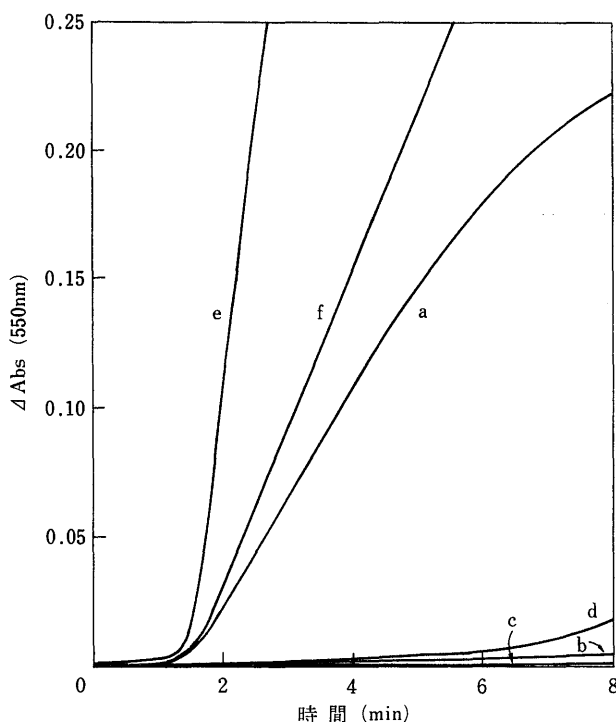


図 1. 標準反応および成分反応の  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線

- (a) 完全系, Cyt c (0.25mg/ml)
- (b)  $\text{CuSO}_4$  なし (c) 酵素なし
- (d) 酵素なし,  $\text{CuSO}_4$  (0.2mM)
- (e) 完全系, PCG (2mM)
- (f) 完全系, PCG (4mM)

[ ( ) 以外の組成は本文の標準反応の組成と同じ ]

準反応系のみにもみられることがわかる。また PCG の濃度が大きくなれば反応は速くなり、Cyt c の濃度が小さくなれば反応はゆるくなるとともに曲線はS字型になる。

この標準曲線は四つのパートからなる：負応期 (negative response phase), 加速期 (increasing velocity phase), 直線期または等速期 (linear or velocity-constant phase), 減速期 (velocity-down phase). 負応期は  $\beta$ -ラクタマーゼによって PCG からペニシロ酸が形成される期間に対応する。ペニシロ酸が一定量つくられると,  $\text{Cu}^{2+}$  の触媒作用によって Cyt c への電子移行がはじまり, これが加速期と直線期に対応する。Cyt c の濃度が化学量論的に制約されたときには, 反応はしだいにおそくなり, ついに停止する。これが減速期 (飽和による停止期を含む) に対応する。

図2は  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線におよぼす  $\beta$ -ラクタマーゼの濃度の影響を示したものである。濃度が大きくなるにつれて直線期の速度が大きくなるとともに, 負応期が短くなっている。これはペニシロ酸の形成反応が濃度に依存して, はやくなっているためである。

この図2のデータをもとにして, 直線期速度 ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) を酵素濃度についてプロットしたものが図3である。濃度が 200~2000 I.U.P.H./60min/ml の範囲で良い比例性がみられる。

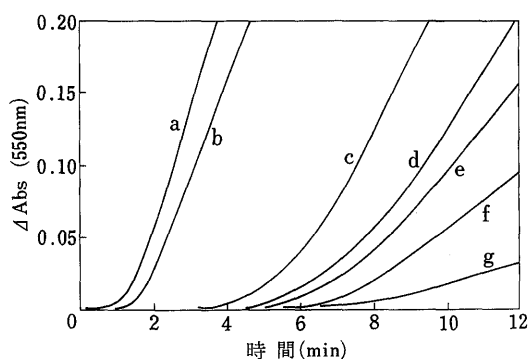


図2. 標準反応の  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線におよぼす酵素濃度の影響

(a) 酵素 (Tokyo Kasei) 濃度  $2 \times 10^5$  I.U.P.H./60 min/ml (b)  $2 \times 10^4$  (c)  $2 \times 10^3$  (d)  $1.5 \times 10^3$  (e)  $10^3$  (f)  $0.5 \times 10^3$  (g)  $2 \times 10^2$

[系の組成は酵素のほかは標準反応と同じで, (b)~(g)までは酵素の単位を略した]

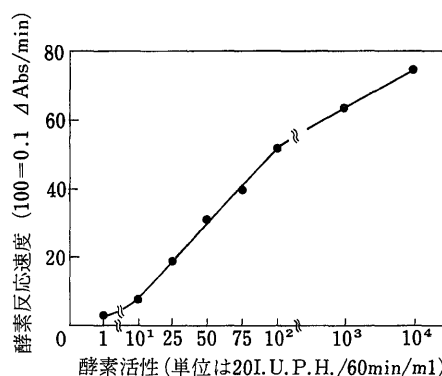


図3. 酵素活性と酵素反応速度との関係

## (2) 基質特異性

図4は各種の $\beta$ -ラクタム抗生物質を, 標準反応と同じ条件で基質として用いたときの  $\Delta\text{Abs}$ -時間曲線である。Tokyo Kasei  $\beta$ -ラクタマーゼによる加水分解の受け易さは次の順である。



なお図には記入を略したが, CEZ と同じように CET・CER・CFX もまったく加水分解されなかったが, CEX はすこし分解された。これに対して AMPCは ABPC より分解されやすく, DCIPC は MCIPC より強く  $\beta$ -ラクタマーゼに抵抗した。

### (3) $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤 (山辺法)

図5は標準反応の  $\Delta$ Abs-時間曲線におよぼす CP-45899 の阻害効果を示したものである。阻害剤の濃度が 1mM ですでに強い効果がみとめられ、2mM で完全阻害に達している。なお阻害剤それ自体は  $\beta$ -ラクタマーゼの作用をまったく受けない。

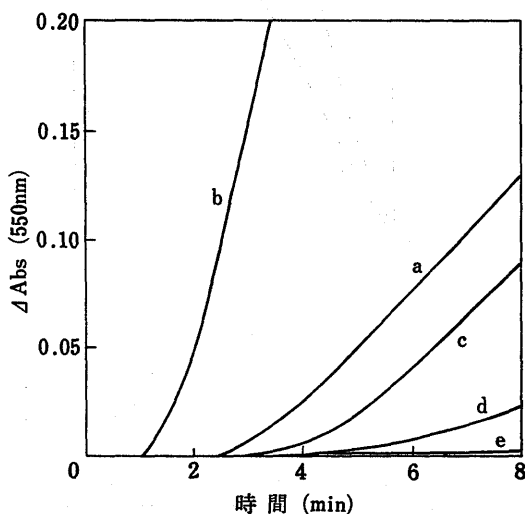


図4. 酵素 (Tokyo Kasei) の基質特異性  
(a) ABPC (b) CBPC (c) DMPPC  
(d) MCIPC (e) CEZ

[系の組成は基質のほかは標準反応に同じで、基質の濃度は0.4mM (CEZのみ0.1mM)である]

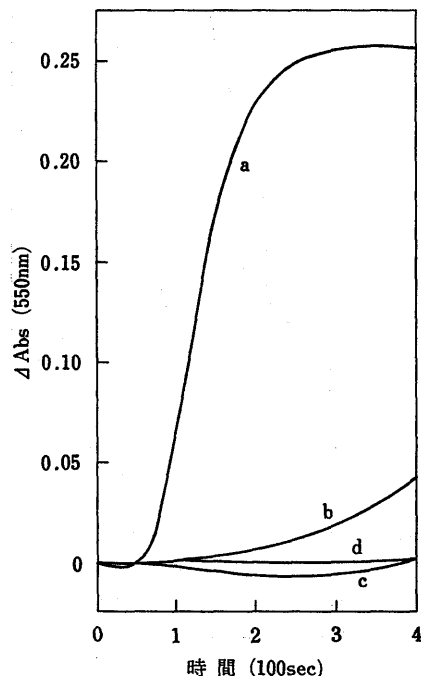


図5. PCG-酵素 (Whatman) 標準反応におよぼす CP-45899 の効果

(a) 標準反応 (b) CP-45899 (1mM) 添加  
(c) CP-45899 (2mM) 添加  
(d) PCGを欠くほかは(c)と同じ

[標準反応系の組成は本文にある]

### (4) NCF による O'Callaghan 法

図6は NCF が  $\beta$ -ラクタマーゼの作用を受けたときの吸収スペクトルの変化を示したもので、特異吸収ピークが 390nm (黄色) から 480nm (赤色) に完全に移行していることがわかる。したがって反応のトレースには、390nm の差吸光度  $\Delta$ Abs の減少または 480nm の  $\Delta$ Abs の増大が用いられる。

### (5) $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤 (O'Callaghan 法)

図7は NCE を基質とした O'Callaghan 法による吸光度 (390nm)-時間曲線におよぼす CP-45899 の阻害効果を示したものである。対照反応は、NCF がきわめて  $\beta$ -ラクタマーゼの作用を受けやすいことをよく示している。これに伴って CP-45899 の阻害効果も、PCG を基質としたときに比して弱く、2mM でも不完全阻害しかみられない。

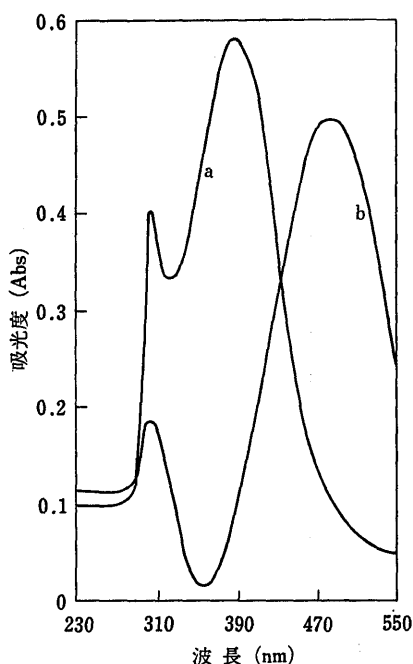


図 6. ニトロセフィン (NCF) の酵素 (Tokyo Kasei) による吸収スペクトルの変化 (O' Callaghan 法)  
(a) 反応前 (b) 30° C, 20min 反応後  
[NCF は 0.038mM, 酵素は  $2 \times 10^4$  I.U.P.H./60min/ml]

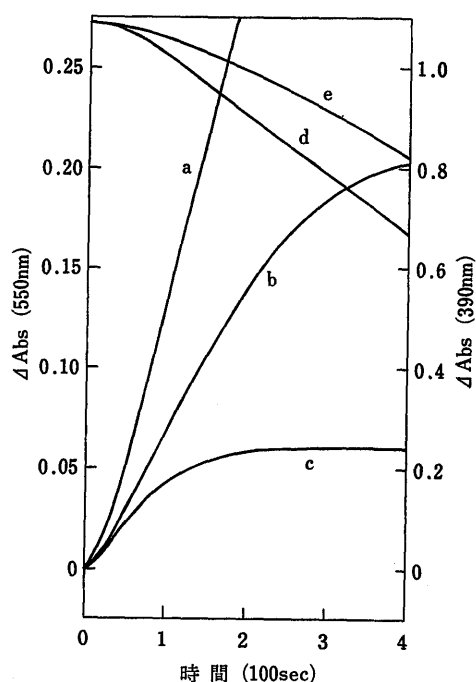


図 7. NCF-酵素 (Whatman) 基準反応におよぼす CP-45899 の効果: 山辺法と O' Callaghan 法の比較  
(a) 基準反応 (b) CP-45899 (1mM) 添加  
(c) CP-45899 (2mM) 添加 [以上は山辺法による]  
(d) CP-45899 (1mM) 添加  
(e) CP-45899 (2mM) 添加 [以上は O' Callaghan 法による]

#### (6) *Enterobacter* (臨床分離株) の $\beta$ -ラクタマーゼ

図 8 は *Enterobacter* WL 7 より抽出した  $\beta$ -ラクタマーゼの基質特異性をしらべた  $\Delta$ Abs-時間曲線である。5 種の  $\beta$ -ラクタム抗生物質の加水分解の受け易さはつぎの順である。



図 9 は *Enterobacter* WL3 および WL 5 より抽出した  $\beta$ -ラクタマーゼの, PCG および CER を基質としたときの  $\Delta$ Abs-時間曲線である。両者のパターンは相似していて, PCG に対する活性も弱い。

#### (7) Tokyo Kasei と Sigma の酵素の比較

Tokyo Kasei 社酵素 (原液の 1/50) を用いた標準反応の直線期の速度 ( $\Delta$ Abs/min) は 0.052 で, これは Sigma 社酵素の 0.28mg-solid/ml を用いた系の速度と等しいことがわかった。



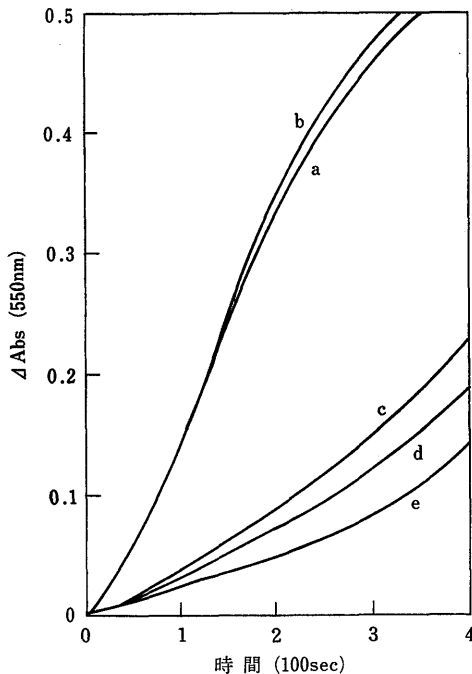


図 8. *Enterobacter* WL 7 の酵素の基質特性 (山辺法)

(a) 標準反応 (PCG) (b) CBPC (c) CET  
(d) CER (e) CEZ

[基質は0.4mM, Cyt cは0.5mg/ml, 酵素は原液  
×1/5]

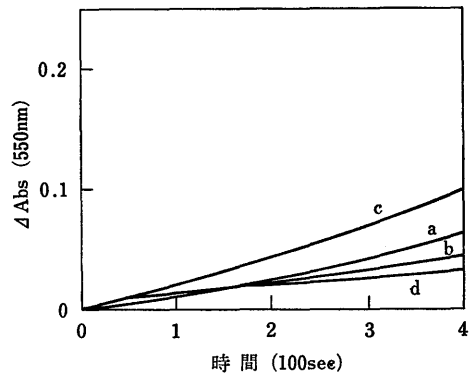


図 9. *Enterobacter* WL 3 と WL 5 の酵素の  
基質特性の比較 (山辺法)

(a) PCG-WL 3系 (b) CER-WL 3系  
(c) PCG-WL 5系 (d) CER-WL 5系

[基質は0.4mM, Cyt cは0.5mg/ml, 酵素は原液  
×1/5]

#### IV 考 察

##### (1) $\beta$ -ラクタマーゼの相対活性の測定

PC または CEP から  $\beta$ -ラクタマーゼによって生じた ペニシロ酸またはセファロスポラノ酸は  $\text{Cu}^{2+}$  の存在で Cyt c を還元することがわかり (図 1), 山辺法の成立がみとめられた。この場合,  $\text{Cu}^{2+}$  以外の  $\text{Ni}^{2+} \cdot \text{Co}^{2+} \cdot \text{Mn}^{2+}$  などは無効であった。

山辺法では Cyt c の還元速度が,  $\beta$ -ラクタマーゼ濃度の一定範囲内において, 酵素濃度と一次比例するから, 酵素の相対活性を求めることができる (図 2 と 3)。

##### (2) $\beta$ -ラクタマーゼの絶対活性の測定

$1\mu\text{M}$  の電子受容 (還元) による Cyt c の  $\Delta\text{Abs}$  は 0.0185 である (Margoliash, 1954)。たとえば標準反応の直線期の速度が 0.052/min なる値は,  $2.8\mu\text{M}/\text{min}$  の電子移動に相当する。ペニシロ酸 1 分子から 4 電子が遊離されるから, この電子移動は  $0.7\mu\text{M}$  の PCG が 1min で加水分解されることを示している。ただし注意しなければならぬのは, この電子移動速度は山辺法の第二段反応に対するもので, 真の  $\beta$ -ラクタマーゼの反応 (第一段) の値そのものではない点である。しかし両値は良い比例関係にあると考えられる。

つぎに山辺法による絶対活性の測定について例示したい。1mg PCG (K塩) は 1570 I.U. であるから、2000 I.U. の PCG は 1.28mg すなわち  $3.4 \times 10^{-6}$  mole となる。したがって III-(7) で用いられた Tokyo Kasei 社酵素の絶対活性値 2000 I.U.P.H./60min/ml は、 $0.056 \times 10^{-6}$  mole P.H./min/ml に相当する。この反応速度に等しいのは、Sigma 社酵素の 0.28  $\mu$ g-solid/ml 溶液を用いたときであるから、この絶対活性は 1mg-solid になおせば、 $(0.056 \mu\text{mole}/0.28) \times 10^3 = 200 \mu\text{mole P.H./min/mg-solid}$  となる。この値は Sigma 社による検定値 220 ときわめて近いといえよう。

### (3) 基質特異性

*Bacillus cereus* より抽出された  $\beta$ -ラクタマーゼは、PC 類に対しては強く作用するが、CEP 類に対しては作用がきわめて弱いことが明らかにされている (Smith & Hamilton-Miller, 1963 および Depeu, Moat & Bondi, 1964)。山辺法による測定でも、このことがよく立証されている。ただし  $\beta$ -ラクタマーゼに対して抵抗性の高い PC は、この方法でも同じように酵素感受性の低いことが示された (図4)。

### (4) $\beta$ -ラクターゼ阻害剤

最近になって微生物より  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤がいくつかみつけれられたが、クラブラン酸 (clavulanic acid) と CP-45899 が現在のところ臨床への応用が有望である (Aswapokee & Neu, 1978)。これとの併用によって、たとえば ABPC 耐性のブドウ球菌に対して ABPC が再び活性をとり戻すことができる。

CP-45899 については山辺法によって、それが  $\beta$ -ラクタマーゼを完全に阻害することを (PCG を基質としたときに) 明らかにしたが (図5)、ABPC を基質としても同じような阻害を示すことができる。しかし基質が  $\beta$ -ラクタマーゼについてきわめて敏感な NCF のときは、阻害剤の濃度を高めても完全阻害がみられなかった (図6)。したがって、CP-45899 による阻害は基質分子との競合によるものであり、酵素タンパクの非可逆的不活性化を起すものではないと考えられる。

### (5) O'Callaghan 法との比較

NCF が  $\beta$ -ラクタマーゼによって加水分解を受けたときの系の 390nm の  $\Delta$ Abs の経時変化を  $\text{Cu}^{2+}$  および Cyt *c* の存在なしで測定することにより、山辺法で求めた阻害剤のデータをチェックすることができる。この比較法により CP-45899 の阻害効果がたしかめられたが、この場合でも NCF に対する ( $\beta$ -ラクタマーゼからの) 相対的な保護作用が測定されている点に注意しなければならない。

なお山辺法では、第二段の反応 (ペニシロ酸・セファロスポラン酸から Cyt *c* への電子伝達過程) が  $\text{Cu}^{2+}$  キレーションなどによって阻害されても、見かけ上  $\beta$ -ラクタマーゼが阻害されたように測定される。これが本法の唯一の欠点である。

#### (6) *Enterobacter* (臨床分離株)の酵素特性

WL 3 と WL 5 は基質特異性が似ていて、FCGに対する作用も弱く、CER にはほとんど作用しない。これに対して WL 7 は PC 類に対する強い活性を示すとともに、CET・CER・CEZ にもかなり強い作用をもっていることは興味ぶかい。

### V 結 論

山辺法は、ペニシリン (PC) またはファロスポリン (CEP) を基質とした  $\beta$ -ラクタマーゼ反応系に、 $\text{CuSO}_4$  を触媒として加えてシトクロム *c* の還元を 550nm の吸光度の経時変化からトレースする迅速定量法である。

この方法により  $\beta$ -ラクタマーゼの相対活法を求めることができたし、また活性既知の酵素標本との比較から絶対活性を求めることもできた。さらに  $\beta$ -ラクタマーゼの基質特異性を知ること、および酵素阻害剤の効果を定量的に測ることができた。

ただし阻害剤の場合には、 $\text{Cu}^{2+}$  キレーションによる誤認を避けるために、ほかの方法たとえばニトロセフィンを用いた比色法によるチェックが必要である。

論文では、*Bacillus cereus* より抽出された Tokyo Kasei 社・Sigma 社・Whatman 社の  $\beta$ -ラクタマーゼについて、7 種の PC と 6 種の CEP を基質として実験を行ない、酵素の特性を明らかにすることができた。また阻害剤 CP-45899 の強い効果を山辺法によってみとめるとともに、O'Callaghan 法で確認できた。

本法は臨床分離菌からの抽出液についても、その  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定および基質特異性の決定に応用され、満足すべき成績が得られた。

\* \* \* \* \*

本稿を脱するにあたり、筆者の研究実験に対しつねに援助いただいたロンドン病院医科大学の J.D. Williams 教授および A. Miles 教授、助言をいただいたオックスフォード大学の E.P. Abraham 教授に心より感謝の意を表する。

また各種の  $\beta$ -ラクタム抗生物質を供与された鳥居薬品研究所の青山卓夫所長、CP-45899 を供与された英国 Pfizer 中央研究所の D. Cox 博士、高純度の  $\beta$ -ラクタマーゼを供与された東京化成工業(株)に対して厚く感謝したい。

なお実験操作を担当した平野裕子・松田洋子・西羅永実子・渡辺直子の諸学生・および A. Zehrin 嬢にも感謝する。

## 文 献

- Abraham, E.P. & Chain, E.B. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature (London)* **146**: 837 (1940).
- Abraham, E.P. & Newton, G.G.F. New penicillins, cephalosporin C and penicillinase. *Endeavour* **20**: 92 (1961).
- Aswapokee, N. & Neu, H.C. A Sulfone  $\beta$ -lactam compound which acts as a  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Journal of antibiotics* **31**: 1238-44 (1978).
- Citri, N. & Pollock, M.R. The Biochemistry and Function of  $\beta$ -Lactamase. *Advances in Enzymology* **28**: 237-323 (1966).
- Depeu, R.H., Moat, A.G. & Bondi, A. The relation between penicillin structure and penicillinase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **107**: 374-81 (1964).
- Kirby, W.M.M. Properties of a penicillin inactivator extracted from penicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Investigation* **24**: 170-4 (1945).
- Leung, T. & Williams, J.D.  $\beta$ -Lactamases of subspecies of *Bacteroides fragilis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **4**: 47-54 (1978).
- Margoliash, E. The chromatographic behaviour of cytochrome *c* on cation exchangers. *Biochemical Journal* **56**: 535-43 (1954).
- Novick, R.P. Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochemical Journal* **83**: 236-40 (1962).
- O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M. & Shingler, A.H. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **1**: 283-8 (1972).
- Perret, C.J. Iodometric assay of penicillinase. *Nature (London)* **174**: 1012-3 (1954).
- Smith, J.T. & Hamilton-Miller, J.M.T. Differences between penicillinases from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nature (London)* **197**: 976-8 (1963).
- Yamabe, S. Rapid spectrophotometric method for the determination of  $\beta$ -lactamase activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **6**: 261-6 (1980).
- 横田 健.  $\beta$ -lactam 薬剤の抗菌力. *Chemotherapy(Tokyo)* **27**: 211-21 (1979).

原稿受理 1980年 2月 1日

## Rapid Spectrophotometric Determination of the $\beta$ -Lactamase Activity

Shigeru Yamabe

This article describes a rapid spectrophotometric method for determination of the  $\beta$ -lactamase activity. The rate of reduction of cytochrome *c* (*Candida krusei*) linked with an enzyme system containing benzylpenicillin (PCG) and  $\beta$ -lactamase was determined by measuring the time-dependent increase of the difference in absorbance at 550 nm between the reaction mixture and the reference mixture. By using  $\beta$ -lactamase extracted from *Bacillus cereus* (Tokyo Kasei and Sigma Chem.), a linear relation was obtained between the enzyme activity and the reaction velocity.

The sensitivity of  $\beta$ -lactam antibiotics to the enzyme was also measured and a high resistance of cefazolin and cloxacillin was demonstrated. The inhibitory effect of CP-45899 (Pfizer Central Research) on the  $\beta$ -lactamase (Whatman Biochemicals) was marked with PCG as a substrate. By using nitrocefin (chromogenic cephalosporin) as a substrate, this method was found to agree with the O'Callaghan method. Three  $\beta$ -lactamases extracted from *Enterobacter*, clinical isolates in The London Hospital, were measured for their substrate specificity, which should be reflected on their clinical usage.