

臨床分離 *Pseudomonas* 属の  $\beta$ -lactamase 誘導について  
菌種間の特性と安定な耐性株について

小林寅吉・池田文昭・西田 実・五島曉智子  
東邦大学医学部微生物学教室

手塚孝一・草野朱美・森 節子・佐藤弓枝・高橋かおる  
バイオス臨床検査センター

(昭和 61 年 7 月 12 日受付)

臨床分離の緑膿菌 (*P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia* および *P. putida*) をそれぞれ 20~29 株を、低濃度の Cefoxitin (CFX) で処理することにより  $\beta$ -lactamase を誘導し、それらの  $\beta$ -lactamase の産生能と抗緑膿菌用セフェム剤、Cefoperazone (CPZ) に対する感受性の変化を測定した。

*P. aeruginosa* の非構成型  $\beta$ -lactamase 産生株では、誘導によって酵素産生は著しく上昇し、これにともなって CPZ にある程度耐性化した。しかし構成型産生株では  $\beta$ -lactamase 産生能の上昇は軽度で、また CPZ の MIC は変化しなかった。*P. cepacia* では試験株のすべては一定比率で、かつ軽度の  $\beta$ -lactamase 産生の上昇が認められた。*P. maltophilia* の非構成型酵素産生株は、菌株によって  $\beta$ -lactamase 誘導産生能が大きく異なる。しかし各菌株の CPZ に対する感受性は酵素誘導能と関係なく変化しなかった。*P. putida* は CFX により全く誘導を受けなかった。緑膿菌 4 菌種の CFX による  $\beta$ -lactamase 誘導能および CPZ に対する感受性の変化は菌種および菌種間で大きく異なる。

また多数の試験菌株のうち、*P. aeruginosa* 1 株および *P. cepacia* の 2 株は、CFX による誘導後 CPZ を含む一部の薬剤に対する耐性は、数代の継代によっても大きく低下せず安定な耐性株が得られた。

緑膿菌による単独または複数菌感染症は、多くの場合いわゆる難治性感染症として、その治療は化学療法における重要な課題となっている。特にこの菌種は他のグラム陰性桿菌とともに、 $\beta$ -ラクタム剤の存在下に誘導的に  $\beta$ -lactamase を産生し、さらに菌株によっては構成的に高度に  $\beta$ -lactamase を産生することが知られている<sup>1,2,3,4,5</sup>。

従来、 $\beta$ -lactamase の誘導については、主として *Enterobacter cloacae* または *Pseudomonas aeruginosa* などの特定の少数の菌株についての検討が行なわれ、*Pseudomonas* 属の全般の挙動は明らかではない。

われわれは臨床材料よりの分離頻度が比較的高い *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia* および *P. putida* などの主要菌種の新鮮分離株それぞれ 20~29 株を用いて実験を行ない、現在までに得られた結果を報告する。

#### I. 実験材料および方法

##### 1. 試験菌株

国内の各臨床施設において分離された *P. aeruginosa* 29 株、*P. cepacia* 23 株、*P. maltophilia* 20 株、*P. putida* 20 株を用いた。また教室保存の標準株 *P. aeruginosa* NCTC 10490 および No. 2 株を対照として用いた。

##### 2. 使用薬剤

Cefsulodin (CFS, 武田薬品工業)  
Cefoperazone (CPZ, 富山化学工業)  
Ceftazidime (CAZ, 新日本実業)  
Cefoxitin (CFX, 第一製薬)  
Cephaloridine (CER, 鳥居薬品)  
Azthreonam (AZT, 日本スライブ社)

##### 3. MIC 測定法

日本化学療法学会標準法に従った。Mueller Hinton broth (Difco) の一夜培養液の 100 倍希釈液を試験菌液とし、寒天平板希釈法により、37°C、20 時間培養後に MIC を判定した。

##### 4. $\beta$ -lactamase 活性の測定法

培養後、集菌、洗浄した菌懸濁液を超音波処理により

Table 1 Induction of  $\beta$ -lactamase of *P. aeruginosa* and *P. cepacia* by cefoxitin

(a) *P. aeruginosa*

Strain	Enzyme (U/mg)		Factor B/A
	before (A)	after (B)	
No. 6	1.73	143	82.0
NCTC	2.00	428	214
No. 8	3.25	459	141
No.11	3.38	490	145
No.1	3.43	376	110
No.21	3.60	123	34.2
No. 2	7.00	636	91.0
# 2	7.13	861	121
No.18	495	656	1.33
No.17	551	1,531	2.78
No.29	688	1,795	2.61
No.16	707	3,340	4.72
No.30	2,953	3,595	1.22
Mean			73.1

(b) *P. cepacia*

Strain	Enzyme (U/mg)		Factor B/A
	before (A)	after (B)	
No.31	4.33	68.0	15.7
No.33	5.00	110	22.0
No.42	8.00	114	14.3
No.53	10.7	208	19.4
No.40	24.5	61.0	2.49
No.35	26.6	517	19.4
No.103	36.8	492	13.4
No.54	42.4	720	17.0
No.50	62.1	752	12.1
No.108	76.5	1,253	16.4
Mean			15.2

破壊した。この液を酵素液とした。CER を基質として、水解速度を 260 nm における紫外部吸収の変化によって求めた。試験菌の  $\beta$ -lactamase 活性は Lowry 法によって求めた単位蛋白当たり、1 分間に CER を  $1 \mu\text{M}$  分解した場合を 1 単位とした。

#### 5. $\beta$ -lactamase の誘導

各試験菌株の Mueller Hinton broth による一夜培養菌液を、CFX を  $20 \mu\text{g/ml}$  に含有する新鮮な培地に 10% (v/v) 接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間振盪した。

### II. 実験結果

#### 1. *Pseudomonas* 属 4 菌株の $\beta$ -lactamase 誘導能の比較

Table 2 Induction of  $\beta$ -lactamase of *P. maltophilia* and *P. putida* by cefoxitin

(a) *P. maltophilia*

Strain	Enzyme (U/mg)		Factor B/A
	before (A)	after (B)	
No.79	3.19	344	108
No.101	10.5	50.5	4.81
No.92	15.8	470	29.7
No.76	17.1	1,621	94.8
No.81	20.3	1,750	86.2
No.75	23.0	37.0	1.61
No.99	23.5	100	4.26
No.77	27.5	250	9.09
No.93	29.7	75.0	2.53
No.97	36.8	143	3.89
No.106	1,759	4,295	2.44
No.85	3,868	5,087	1.32
Mean			29.1

(b) *P. putida*

Strain	Enzyme (U/mg)		Factor B/A
	before (A)	after (B)	
No.72	5.55	10.6	1.91
No.65	5.75	6.00	1.04
No.63	6.10	3.50	0.57
No.61	6.86	9.00	1.31
No.67	7.85	3.17	0.40
No.74	8.00	8.00	1.00
No.71	12.2	31.3	2.57
No.57	18.0	42.0	2.33
No.73	52.8	44.8	0.85
No.102	1,538	2,519	1.64
No.105	1,577	2,491	1.58
Mean			1.38

*Pseudomonas* 属 4 菌株の各試験菌株のうち一部の菌株を無作為に選び、CFX による  $\beta$ -lactamase の誘導能を比較した。

まず *P. aeruginosa* (13 株) の場合、Table 1-(a) のとおり標準菌株 NCTC-10490 など  $\beta$ -lactamase 産生能が低い菌株群 ( $1.73 \sim 7.13 \text{ U/mg}$ ) では、例外なく CFX により強い誘導能を示し、産生酵素量は処理前の約 34 倍から 214 倍に達する。一方、非誘導条件下で  $\beta$ -lactamase 産生量の多い 5 株の構成的酵素産生株では、2 株は酵素活性の上昇はみられなかったが、3 株では低倍率ではあるが産生酵素量の増加が認められた。すなわち *P. aeruginosa* では、CFX 処理により強い酵素

産生を示す誘導産生株と、殆ど誘導能を示さないか軽度  
に示す構成産生株に分類できる。

*P. cepacia* (10 株) では、1 株を除き CFX 処理前の  
 $\beta$ -lactamase 産生量とは無関係に、誘導による酵素産生  
は 12~22 倍と比較的一定の倍率にとどまり、*P. aeru-*  
*ginosa* の場合とは異なった挙動を示した (Table 1-  
(b))。

*P. maltophilia* では検討した 12 菌株間で  $\beta$ -lactama-

se の誘導能にはかなりの相違があり、3 株は産生倍率  
が約 86~108 倍の高度誘導株、1 株は中等度誘導株  
(29.7 倍)、その他の 8 株は誘導による酵素産生の増加  
は比較的低率であった。この菌種では、非誘導時に  $\beta$ -  
lactamase 産生量の少ない菌株でも、CFX 処理により  
*P. aeruginosa* ほど一律に酵素誘導がみられなかった  
(Table 2-(a))。

また *P. putida* では、全般に  $\beta$ -lactamase の顕著な誘

Fig. 1-1 Relationship between  $\beta$ -lactamase activity and cefopera-  
zone susceptibility of *P. aeruginosa* and *P. cepacia* before  
and after induction by cefoxitin

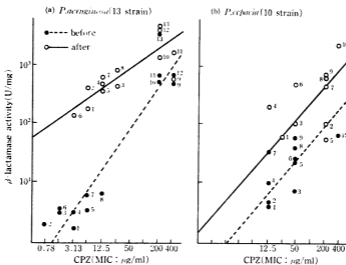
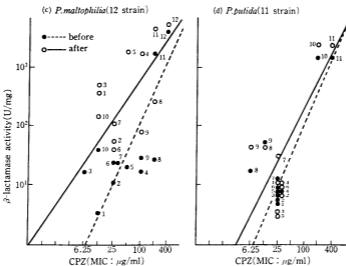


Fig. 1-2 Relationship between  $\beta$ -lactamase activity and cefopera-  
zone susceptibility of *P. maltophilia* and *P. putida* before  
and after induction by cefoxitin



導は認められなかった (Table 2-(b))。

## 2. 各菌種の $\beta$ -lactamase 活性と CPZ 感受性との関連

前項の実験に用いた *Pseudomonas* 4 菌種、各菌株の誘導前後における  $\beta$ -lactamase 活性と抗緑膿菌性セフェム剤、CPZ の MIC 相関を調べた。

*P. aeruginosa* の場合 (Fig. 1-(a)), CFX により強い誘導能を示した菌株群では CPZ の MIC も影響を受け、2 管以上 MIC が大きくなる傾向が認められた。しかし構成的に多量の  $\beta$ -lactamase を産生する菌株では、CPZ の MIC は 200  $\mu\text{g/ml}$  またはそれ以上と大きく、誘導処理により MIC のより以上の上昇は認められなかった。*P. cepacia* では、CFX の誘導後  $\beta$ -lactamase 活性に比較して CPZ に対する MIC は軽度の上昇が認められた (Fig. 1-(b))。*P. maltophilia* は前述のとおり、菌株によって誘導後の  $\beta$ -lactamase 産生能は一定しないが、いずれの場合も CPZ の MIC は変化しなかった (Fig. 1-(c))。また *P. putida* では CFX 処理の前後で各菌株の  $\beta$ -lactamase 活性、CPZ に対する MIC に大き

な変化は認められなかった (Fig. 1-(d))。

## 3. *Pseudomonas* 属の CFX による誘導を各種抗緑膿菌用 $\beta$ -ラクタム剤の感受性

*Pseudomonas* 属の各菌種それぞれ 20~29 株を CFX による誘導処理後、5 種類の  $\beta$ -ラクタム剤の感受性を検討した。

Table 3 に明らかとなおり、*P. putida* および *P. maltophilia* の各 20 株中には CFX による  $\beta$ -lactamase の誘導処理後、MIC が 4 倍以上に上昇した菌株は認められなかった。しかし *P. aeruginosa* の 29 株のうち約 30% の菌株は CPZ, CAZ および PIPC の MIC がいずれも 4 倍以上に上昇した。すなわち CFX による処理は、これらの薬剤の抗菌作用と拮抗した。また同様な菌株が AZT については約 17%、CFS では 10% の比率で認められた。また *P. cepacia* 23 株では PIPC および AZT に 90% 以上の菌株が 4 倍以上の MIC の上昇を示し、CPZ に対しては約 74%、また CAZ および CFS にはそれぞれ 30% および 13% が 4 倍以上の MIC 値となった。

Table 3 Changes in susceptibility of *Pseudomonas* group to antipseudomonal antibiotics after induction by cefoxitin  
(% of strains with  $\geq$ fourfold increase in MIC)

Species (strain)	CFS	CPZ	CAZ	PIPC	AZT
<i>P. aeruginosa</i> (29)	10.0	27.6	34.5	31.0	17.2
<i>P. cepacia</i> (23)	13.0	73.9	30.8	91.3	95.7
<i>P. putida</i> (20)	0	0	0	0	0
<i>P. maltophilia</i> (20)	0	0	0	0	0

Table 4 Comparative MIC<sub>50</sub> of *Pseudomonas* group for antipseudomonal antibiotics before and after induction by cefoxitin

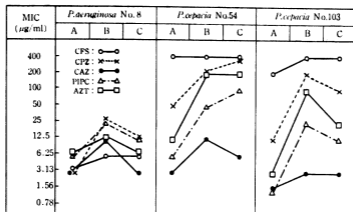
Drug	<i>P. aeruginosa</i> (29) <sup>*1</sup>		<i>P. cepacia</i> (23)		<i>P. putida</i> (20)		<i>P. maltophilia</i> (25)	
	A <sup>*2</sup>	B <sup>*3</sup>	A	B	A	B	A	B
CFS	3.13	6.25	>400	>400	100	100	100	100
CPZ	6.25	25	50	200	25	25	25	25
CAZ	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13	3.13	50	50
PIPC	6.25	25	3.13	25	12.5	12.5	200	200
AZT	6.25	6.25	6.25	25	25	25	200	200

\*1 ( ): Number of strain.

\*2 A : Before induction.

\*3 B : After induction.

Fig. 2 Drug susceptibility of stably resistant strains obtained by cefoxitin-induction



A: Before induction, B: After induction, C: After 5-transfer in fresh medium.

Table 4 は誘導の前後における MIC<sub>50</sub> を求め、感受性側の MIC の変化を観察した。この結果でも *P. aeruginosa* および *P. cepacia* について、Table 3 と同様な傾向を確認した。

#### 4. 安定な誘導耐性株の分離

実験の項に記載した方法により、*P. aeruginosa* 29 株、*P. cepacia* 23 株をそれぞれ CFX により誘導処理し、それらの菌株を薬剤を含まない培地で 5 代継代した (Fig. 2)。

*P. aeruginosa* No. 8 株では CPZ の MIC が最初 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、誘導後 25  $\mu\text{g/ml}$  に上昇し、この誘導耐性株を薬剤の存在しない培地で 5 代継代すると CPZ の MIC は 12.5  $\mu\text{g/ml}$  を維持した。他の薬剤の MIC は継代によりもとの水準に復帰した。

*P. cepacia* No. 54 および No. 103 株はもともと CFS には高度耐性で、誘導処理によりこの薬剤の MIC には変化はない。また両株とも CAZ に感受性であるが、誘導の前後にこの薬剤の MIC も大きな変化はない。しかし、No. 54 株では CPZ、AZT および PIPC の MIC は CFX による誘導により、4 倍、16 倍および 8 倍にそれぞれ上昇し、薬剤を含まない培地による 5 代継代後も各 MIC レベルは低下しない。また No. 103 株の場合もこれら 3 薬剤の MIC 値は誘導により上昇し、同様な継代によっても原株の MIC の 8 倍以上の値が維持された。

以上の 3 株は CFX 誘導処理により、特定の抗緑膿菌性  $\beta$ -ラクタム剤に安定的に耐性化した菌株であると判定した。

### III. 考 察

*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, インドール陽性 *Proteus* sp., *P. aeruginosa* など cephalosporinase type の  $\beta$ -lactamase を産生する細菌は、ある種の  $\beta$ -ラクタム剤の存在下において酵素産生が誘導的に増強されることはよく知られている<sup>1),2),3),4),5)</sup>。しかし、一般にこの種の検討は、ごく少数の特定の菌株を用いて行なわれ、その結果から各菌株の  $\beta$ -lactamase 誘導能を結論する傾向がみられる。われわれは *Pseudomonas* 属の主要な 4 菌株から、それぞれ相当数の菌株を無作為に選び各菌株の CFX による  $\beta$ -lactamase の特性を検討した。

本報の成績では *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia* および *P. putida* の CFX による  $\beta$ -lactamase の誘導能には明らかに一括して論じ得ない相異があり、同一菌株においても菌株間で特徴的な差異が認められた。この結果は少数の菌株についての成績に基づいて、*Pseudomonas* 属全般の  $\beta$ -lactamase の誘導を結論できないことが明らかになった。ただ菌株間の傾向として、*P. putida* では  $\beta$ -lactamase の産生様式が構成的か非構成的かに関係なく、CFX による  $\beta$ -lactamase の誘導は弱く、*P. aeruginosa* や *P. maltophilia* とは対象的であった。また *P. cepacia* の  $\beta$ -lactamase 誘導は一定の制約を受け、 $\beta$ -lactamase 活性の上昇は中等度であった。

また緑膿菌は、一般に難治感染症例における菌交替あるいは複数菌感染症の起炎菌として関与することが多く、抗緑膿菌用抗菌剤の投与と同時にまたは、これに先立って  $\beta$ -ラクタム剤による治療が行なわれることがある。このような症例においては、本報の結果から明らかとなり、緑膿菌の  $\beta$ -lactamase の誘導に起因する抗緑膿菌

用  $\beta$ -ラクタム剤の抗菌活性の低下についての配慮が必要である。もちろん多くの場合、この種の拮抗現象による活性の低下は一過性で、 $\beta$ -ラクタム剤の除去により抗緑膿菌剤の抗菌活性は回復する。ただ、*P. aeruginosa* または *P. cepacia* の少数の菌株において、特定の薬剤に対する耐性が比較的安定化することが認められた。このような事実は今後、*in vivo* 実験による確認の必要がある。

#### 文 献

- 1) SAINO, Y.; M. INOUE & S. MITSUHASHI: Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN 12873. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 362~365, 1984
- 2) TAUSK, F.; M. E. EVANS, L. S. PATTERSON, et

al.: Imipenem-induced resistance to antipseudomonal  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 41~45, 1985

- 3) 池田文昭, 高泉 仁, 西田 実, 五島雅智子, 桑原章吾: Cephem 系薬剤間の antagonism とグラム陰性菌における  $\beta$ -lactamase 誘導について. *Chemotherapy* 31: 304~308, 1983
- 4) MINAMI, S.; A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 382~385, 1980
- 5) SANDERS, C. C.; W. E. SANDERS, Jr., & R. V. GOERING: *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by Cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 968~975, 1982

## $\beta$ -LACTAMASE INDUCTION IN CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS* GROUP

INTETSU KOBAYASHI, FUMIAKI IKEDA, MINORU NISHIDA  
and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine Toho University

KOICHI TEZUKA, AKEMI KUSANO, SETSUKO MORI, YUMIE SATO  
and KAORU TAKAHASHI

Bios Clinical Research Laboratories

Twenty to twenty-nine isolates each of *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia* and *P. putida* were treated with a concentration of 20  $\mu$ g/ml of cefoxitin at 37°C for 2 hours to induce  $\beta$ -lactamase production. The  $\beta$ -lactamase activity of these strains and their susceptibility to cefoperazone, an antipseudomonal cephem, are summarized as follows:

The  $\beta$ -lactamase inducibility of cefoxitin in the *Pseudomonas* group and their susceptibility to cefoperazone differed widely among the 4 species tested.

Enzyme activity increased sharply in the non-constitutive  $\beta$ -lactamase producers among the *P. aeruginosa* strains and considerably enhanced their resistance to cefoperazone. However, the enzyme activity of the constitutive  $\beta$ -lactamase producers increased only slightly and their susceptibility to cefoperazone did not change. The  $\beta$ -lactamase activity of all the *P. cepacia* strains tested increased slightly and consistently. Among the non-constitutive  $\beta$ -lactamase producers of *P. maltophilia*, enzyme activity varied greatly but their susceptibility to cefoperazone did not differ. Cefoxitin did not induce  $\beta$ -lactamase production in *P. putida*.

A few of the *P. aeruginosa* and *P. cepacia* strains became resistant to cefoperazone and the resistance persisted through five generations.