

Enterobacter cloacae の菌体外 β -lactamase とその安定性

荒木春美・南 新三郎・渡辺泰雄・保田 隆・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所*

(昭和62年6月12日受付)

Enterobacter cloacae H-27 の菌体内および菌体外(培養液) β -lactamase 活性を測定するとともに、ラット各種体液における β -lactamase の安定性を検討した。cefoperazone (CPZ) 作用時には菌体内および菌体外の β -lactamase 活性はいずれも低値であったが、ceftazidime (CMZ) 作用時には β -lactamase が誘導され、菌体内および菌体外に高い活性が認められた。また、ラット pouch 内に *E. cloacae* H-27 を感染させ、CPZ, CMZ をそれぞれ 100 mg/kg i. v. 投与した時の pouch 内浸出液中 β -lactamase 活性は、CPZ 投与群では低かったが CMZ 投与群では高値を示した。さらに β -lactamase の安定性をラット各種体液を用いて *in vitro* で検討した結果、胆汁中では速やかに失活したが、血清、尿、pouch 内浸出液中では6日後においても90%以上の活性を有していた。またラット pouch 内においても β -lactamase は比較的安定に存在していた。

以上、誘導された β -lactamase は菌体内のみならず菌体外にも認められ、ラット体液中において比較的安定に存在した。

Key words: β -lactamase, 誘導, 安定性, *E. cloacae*

β -lactamase は β -lactam 剤に対する細菌の耐性化の主たる要因となるとともに、薬剤の体内動態にも影響を及ぼしている^{1,2)}。さらに *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* などのグラム陰性菌の一部では、 β -lactam 剤によって β -lactamase が誘導的に産生されることが問題となっている。この β -lactamase 誘導に関する研究から、1) β -lactamase 誘導は菌種間あるいは β -lactam 剤間で差があり、 β -lactam 剤の中では特に ceftazidime (CMZ), cefoxitin (CFX) が高い誘導能を有している³⁻⁶⁾。2) 誘導能の高い薬剤と他の β -lactam 剤を同時添加すると、最小発育阻止濃度 (MIC) をはじめとした抗菌活性に拮抗現象がみられる⁷⁻¹⁷⁾。3) 誘導型 β -lactamase 産生菌と非誘導菌との混合感染時、誘導能の高い薬剤の非誘導菌に対する治療成績が低下する¹⁸⁾。4) β -lactam 剤存在下、誘導型 β -lactamase 産生菌から非抑制的に β -lactamase を産生する構成型変異株が選択される^{6,19)}。ことなどが明らかになっている。

一般にグラム陰性菌の産生する β -lactamase はペリプラスマ領域に存在する菌体内酵素であるため、 β -lactamase 誘導の検討は南らの方法⁹⁾に従って菌体内の酵素活性を測定することによって行なわれている。ところで、この β -lactamase 誘導は誘導薬剤(inducer)の消

失とともに低下するが、誘導産生された β -lactamase の消長については不明な点が少なくない。また、我々は β -lactamase 誘導実験中に菌体外にも高い活性が存在することを認めたことから、今回誘導型 β -lactamase 産生菌の *E. cloacae* H-27 を用い、菌体内および菌体外の β -lactamase 活性を測定するとともに β -lactamase の安定性を検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

cefoperazone (CPZ, 富山化学工業), ceftazidime (CMZ, 三共), cephaloridine (CER, 日本グラクソ) を使用した。

2. 使用菌株

当研究所保存の臨床分離株の中から、誘導により cephalosporinase (CSase) を産生する *E. cloacae* H-27⁵⁾ を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) は heart infusion agar (HIA, 栄研) を用いた寒天平板希釈法で測定した。10⁶, 10⁸ cells/ml の菌液を1エーゼ(約5 μ l)接種した時の MIC は、CPZ ではそれぞれ 0.78, 25 μ g/ml, CMZ では 100, 200 μ g/ml であった。

3. β -lactamase 活性測定法

β -lactamase 活性の測定は、CER 100 μ M を基質とす

* 富山市下奥井 2-4-1

る UV 法で行なった²⁰⁾。すなわち、基質液 3 ml を 2 個の UV 用石英セルに入れ、一方に 20 μ l の酵素液を加えて手早く攪拌し、ダブルビーム UV 計 (日立、100-60 タイプ) にて β -lactam 環の開裂に伴う OD 変化を 260 nm で測定した。 β -lactamase 活性は unit で表わし、1 unit は 30°C、0.05 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) 中で 1 分間に 1 μ mol の基質を分解するのに必要な酵素量をもって表現した。

4. 培養液中の β -lactamase 活性

brain heart infusion broth (BHIB, pH 7.4, 栄研) で 37°C、約 14 時間静置培養した *E. cloacae* H-27 を新鮮な nutrient broth (NB, pH 7.0, 栄研) に 1% 接種 (約 3×10^8 cells/ml) した後直ちに CPZ, CMZ を 2.5, 10, 40 μ g/ml となるように添加し、37°C フラン器中に静置培養した。4, 8, 24, 48 時間後に培養液を採取し、4°C、1,000 \times g、30 分間の遠心分離により集菌を行なった。上清をミリポアフィルター (0.22 μ m) を用いて濾過し、その無菌濾液 (cell-free medium) の β -lactamase 活性を測定することによって菌体外 β -lactamase 活性を求め、units/ml で示した。培養液中に薬剤が残存している場合は薬剤によって β -lactamase 活性が阻害されるので、薬剤を除去するために濾液をセルロースチューブに入れて蒸留水中で 10°C、1~2 日間透析を行ない、薬剤除去後に活性を測定した。一方、集めた菌体は 0.1 M PB (pH 7.0) で 1 回洗浄し、集菌時の培養液と同量の同 PB (pH 7.0) に懸濁した後超音波破碎 (Ultra-sonicator, Tomy-Seiko, 4°C) し、4°C、10,000 \times g、30 分間の遠心分離を行なった。得られた上清 (cell extract) の β -lactamase 活性を測定することにより、菌体内 β -lactamase 活性 (units/ml) を求めた。さらに、菌体内 β -lactamase 活性については LOWRY 法²¹⁾により蛋白量を測定し、比活性 (units/mg of protein) も求めた。

5. 浸出性無菌炎症 pouch の作成

SELYE の方法²²⁾に準じた。すなわち、Wistar 系雌性ラット (体重 130~150 g) の背部皮下に 25 ml の空気を注入後、これに 1% クロトン油を含有する綿実油 1 ml を注入し、翌日空気を抜き無菌的浸出性炎症を惹起させた。pouch 作成から 15 日目のラット (体重 200~250 g) を実験に使用した。

6. pouch 内感染実験

E. cloacae H-27 を HIA で 37°C、18~20 時間培養後 20% gastric mucin (半井化学薬品) に懸濁 (約 1.5×10^8 cells/ml) し、その 2 ml をラット pouch 内 (n=8~10) に接種した。菌接種の 2 時間後に CPZ および CMZ を各 100 mg/kg i.v. 投与し、その 6, 24,

48 時間後に pouch 内浸出液を採取した。次に 4°C、1,000 \times g、30 分間の遠心分離により集菌し、前述の培養液の場合と同様に菌体内および菌体外 β -lactamase 活性 (units/ml) を測定した。

7. 粗酵素液の調整

BHIB で一夜培養した *E. cloacae* H-27 を新鮮な BHIB に 10% 接種し、37°C で 2 時間振盪培養した。これに CMZ を 10 μ g/ml となるように添加し、37°C でさらに 2 時間培養後、遠心分離 (4°C、1,000 \times g、30 分) により集菌した。0.1 M PB (pH 7.0) で 2 回洗浄し、適量の同 PB (pH 7.0) に懸濁して超音波破碎した後遠心分離 (4°C、10,000 \times g、30 分) し、上清を粗酵素液として実験に供した。

8. β -lactamase の各種体液中安定性

E. cloacae H-27 の粗酵素液 1 容に、ラットの新鮮な各種体液 (血清、尿、pouch 内浸出液、胆汁) をそれぞれ 9 容加え、37°C フラン器中に静置し、経時的に β -lactamase 活性を調べた。なお、粗酵素液および各種体液はミリポアフィルターを用いて無菌濾過した後使用した。

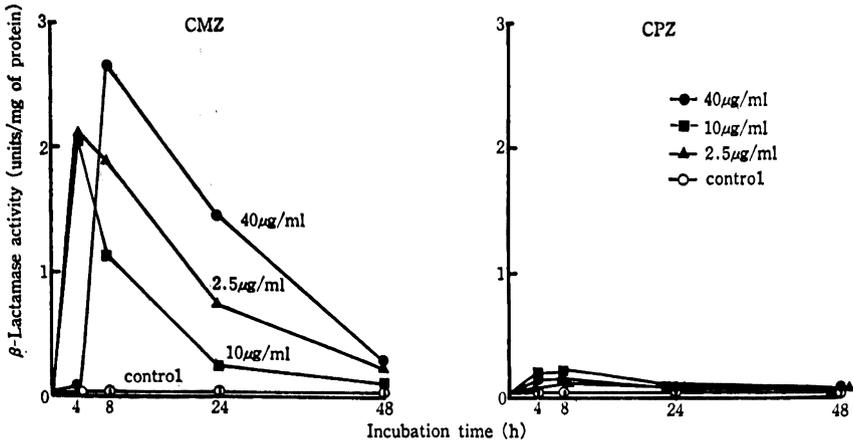
9. pouch 内における β -lactamase の安定性

ラット (n=4) の pouch 内に、無菌濾過した *E. cloacae* H-27 の粗酵素液 (β -lactamase 活性: 約 10 units/ml) を注入し、経時的に pouch 内浸出液中 β -lactamase 活性を測定した。

II. 実験結果

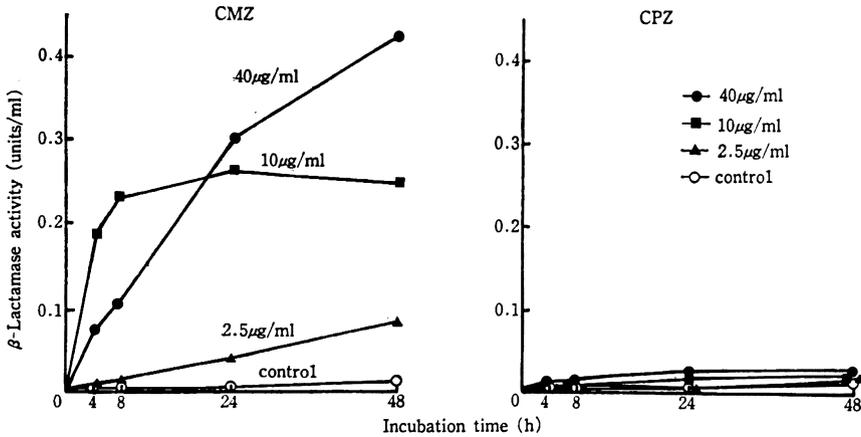
1. *E. cloacae* の培養液中 β -lactamase 活性

E. cloacae H-27 の菌体内および菌体外 β -lactamase 活性を Fig. 1 および 2 に示す。CMZ 添加時の菌体内 β -lactamase 活性は 2.5 および 10 μ g/ml では 4 時間後、40 μ g/ml では 8 時間後に 2.1~2.6 units/mg of protein の最高値を示し、48 時間後には 0.10~0.28 units/mg of protein に低下した。また、この時の菌体外 β -lactamase 活性は 2.5 μ g/ml では 48 時間後、10 μ g/ml では 24 時間後、40 μ g/ml では 48 時間後に 0.08~0.42 units/ml の最高値を示し、菌体内と異なり菌体外活性は低下せずむしろ上昇傾向にあった。一方、CPZ 添加時には CMZ 添加時に比べいづれも低い活性を示し、菌体内 β -lactamase 活性は 0.2 units/mg of protein 以下、菌体外 β -lactamase 活性は 0.02 units/ml 以下であった。なお図には示さないが、培養液中菌数 (スタート時: 約 3×10^8 cells/ml) は両剤共、40 μ g/ml で 10^8 cells/ml レベルに減少したものの 2.5, 10 μ g/ml では減少せず、いづれの濃度においても 24, 48 時間後には約 2×10^8 cells/ml に増加した。また、培養液中残存活性は CMZ の 2.5, 10, 40 μ g/ml ではそれぞれ 4, 8, 24 時間後か



CPZ or CMZ was added to the cultures at the start of cultivation. β -Lactamase activity was determined by spectrophotometry using CER(100 μM) as a substrate.

Fig. 1. β -Lactamase activity of cell extract from the culture of *E. cloacae* H-27



CPZ or CMZ was added to the cultures at the start of cultivation. β -Lactamase activity was determined by spectrophotometry using CER(100 μM) as a substrate.

Fig. 2. β -Lactamase activity of cell-free medium from the culture of *E. cloacae* H-27

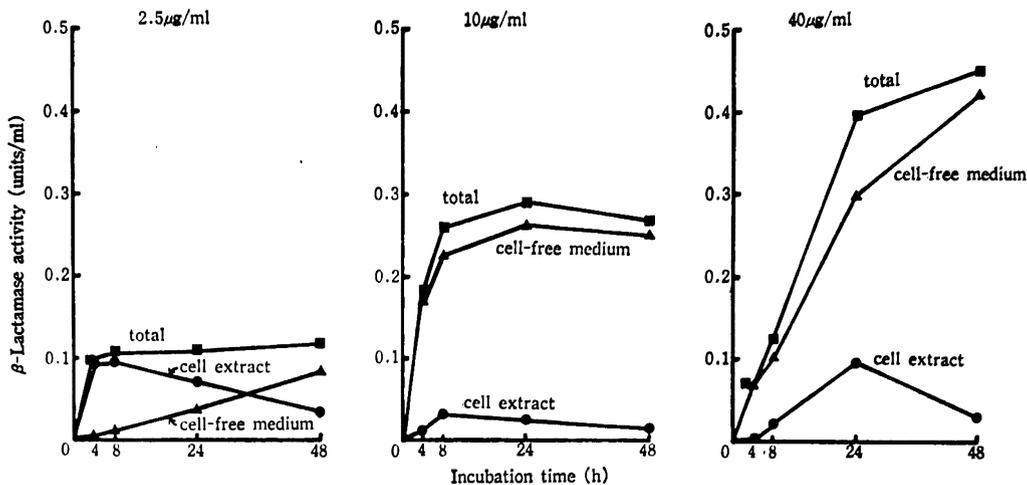
ら検出限界 (1.56 $\mu\text{g/ml}$) 以下, CPZ は8時間後にはそれぞれ 0.78, 1.2, 12 $\mu\text{g/ml}$ といずれも残存していたが24時間後にはすべて検出限界 (0.78 $\mu\text{g/ml}$) 以下であった。

さらに CMZ 作用時の菌体内, 菌体外およびトータルの β -lactamase 活性を, 培養液 1 ml 当りに表示した結果を Fig. 3 に示す。トータル活性は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ では4時間後, 10 $\mu\text{g/ml}$ では8時間後, 40 $\mu\text{g/ml}$ では24時間後にそれぞれ 0.10, 0.26, 0.40 units/ml を示し, その後はほぼ一定に推移した。トータル活性に占める菌体外活性の割合は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ よりも 10 および 40 $\mu\text{g/ml}$ で高く, 4時間後では 2.5, 10, 40 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 4,

93, 99% であった。菌体内活性は, CMZ の 2.5 および 10 $\mu\text{g/ml}$ では8時間後, 40 $\mu\text{g/ml}$ では24時間後に最高値を示し, その後いずれも徐々に低下した。

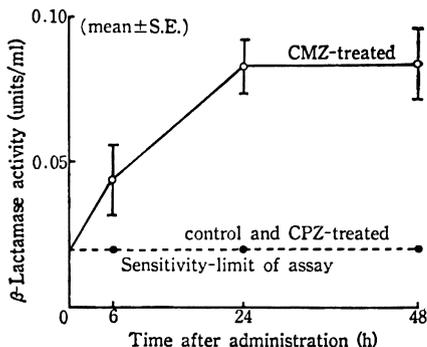
2. ラットの pouch 内 β -lactamase 活性

ラットの pouch 内に *E. cloacae* H-27 を感染させた後, CPZ および CMZ を各 100 mg/kg i.v. 投与した時の pouch 内浸出液中 β -lactamase 活性を測定した。その結果, 菌体内活性は CPZ 投与群, CMZ 投与群, control 群 (薬剤非投与群) のいずれにおいても検出限界 (0.02 units/ml) 以下であったので, 菌体外 (cell-free exudate) の活性推移を Fig. 4 に示す。CMZ 投与群の活性は薬剤投与6時間後に 0.04 units/ml を示し, 24時



CMZ was added to the cultures at the start of cultivation. β -Lactamase activity was determined by spectrophotometry using CER(100 μ M) as a substrate.

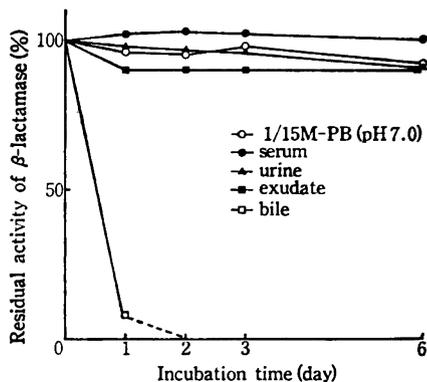
Fig. 3. β -Lactamase production by CMZ in the culture of *E. cloacae* H-27



CPZ or CMZ was administered intravenously to rats 2h after infection. The β -lactamase activity was determined by spectrophotometry using CER(100 μ M) as a substrate. The β -lactamase activity in the pouch in the control and CPZ-treated groups was below the sensitivity-limit of the assay. ●— control and CPZ-treated, ○— CMZ-treated.

Fig. 4. β -Lactamase activity in rat pouch after intravenous administration of 100 mg/kg of CPZ or CMZ in pouches infected with *E. cloacae* H-27

間以後は約 0.08 units/ml で一定に推移した。CPZ 投与群の活性はすべて検出限界 (0.02 units/ml) 以下であり、control 群と同様であった。なお pouch 内菌数は、投与 6 時間後に CPZ 投与群では約 2×10^6 cells/ml, CMZ 投与群では約 1×10^7 cells/ml であり CPZ 投与群はやや減少したが、24 時間後にはいずれも約 1×10^8 cells/ml であった。また、pouch 内薬剤濃度は CPZ では投与 2 時間後に約 4 μ g/ml, CMZ では投与 1 時間後



The residual activity of β -lactamase in various rat body fluids was determined by spectrophotometry using CER(100 μ M) as a substrate.

Fig. 5. *In vitro* stability of β -lactamase from *E. cloacae* H-27 in various rat body fluids

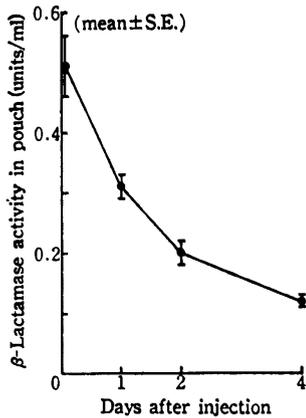
に約 7 μ g/ml の最高値を示し、いずれも 8 時間後に約 2 μ g/ml で 24 時間後には消失した。

3. β -lactamase の *in vitro* 安定性

β -lactamase のラット体液中の安定性を Fig.5 に示す。胆汁中を除き、血清、尿、pouch 内浸出液中では安定に存在し、6 日後においても 90% 以上の残存活性を示した。なお各体液の pH は、血清では 7.4 から 9.0、尿では 7.3 から 7.8、浸出液および胆汁では 7.4 から 9.0 に変化していた。

4. β -lactamase の pouch 内安定性

ラットの pouch 内における β -lactamase の安定性を



The β -lactamase activity in the pouch was determined by spectrophotometry using CER (100 μ M) as a substrate.

Fig. 6. *In vivo* stability of β -lactamase from *E. cloacae* H-27 injected in rat pouch

Fig. 6 に示す。1日目には注入時の61%、2日目では38%、4日目では25%の β -lactamase活性を示しており、比較的安定に存在した。

III. 考 察

E. cloacae H-27 の培養液における菌体内および菌体外の β -lactamase活性は、CPZでは誘導能が低い^{3-7,15,16}ので低値であったが、誘導能の高いCMZでは高値を示した。すなわちCMZ添加時の菌体内 β -lactamase活性は、4~8時間後に最高値を示した後減少したが、菌体外活性は減少せずむしろ上昇する傾向が認められた。この菌体内 β -lactamase活性の推移は、まずCMZにより多量の β -lactamaseが菌体内に誘導、蓄積されるとともに一部漏出ならびに溶菌により菌体外に β -lactamaseが放出され、菌体内外の β -lactamaseによってCMZが分解されたため、inducerの消失後に菌の β -lactamase産生が低下したものと推定される。一方、菌体外 β -lactamase活性は、漏出ならびに溶菌によって上昇したものと考えられる。この漏出については、NIEGELら²³は菌のフィラメント化に伴い外膜のバリア機能が損なわれて起こることを述べており、CMZもフィラメント化作用を有している²⁴ことから裏付けられる。

この β -lactamaseの消長を調べるため、Fig. 3に示すように1ml当りの活性をみると、トータル活性は菌体内活性がピークに達した後ほぼ一定に推移した。これは、菌体内の β -lactamaseが菌体外に放出されるだけでトータル量にはほとんど変化がないことを示している。したがって、誘導産生された β -lactamaseは菌体内で減少しても菌体外に存在することに注意すべきであろう。

なお、菌体内活性は薬剤消失後に低下したことから、活性上昇は構成型変異株の選択^{6,10}によるものではないものと思われる。ラットを用いた*in vivo*においても*in vitro*と同様の結果が得られ、CPZ投与群ではpouch内の β -lactamase活性は低かったがCMZ投与群では菌体外に高い活性が認められた。また、この β -lactamaseはラット各種体液中(*in vitro*)およびラットpouch内(*in vivo*)で安定に存在した。なお、胆汁中での失活はpHだけでは説明できなかった。また、尿中では凍結による失活が見られ、これらの理由については不明であるが測定にあたっては注意が必要である。

ところで、OKONOGIら¹⁵はinducer消失後 β -lactamase活性および菌の感受性が誘導前のレベルに戻るの、 β -lactamase誘導は二次投与薬剤には影響しないであろうと述べている。しかし、我々の成績では誘導産生された β -lactamaseは菌体内から減少しても菌体外に存在し、しかも体液中で比較的安定であることから、他の誘導能の高い薬剤の場合においても二次投与薬剤(β -lactamase)に影響を及ぼす可能性が考えられた。これについては現在検討中である。

以上、誘導的に β -lactamaseを産生する菌の感染時に誘導能の高い薬剤が投与された場合、炎症巣において β -lactamaseが菌体外に放出され、それが安定に存在し、治療に影響を及ぼす可能性が示唆された。

文 献

- MINAMI S, ARAKI H, WATANABE Y, YASUDA T, TAKAI A, SAIKAWA I, MITSUHASHI S: Reduction of cephamycin concentrations at the infection site in mice with experimental peritoneal infection caused by cephalosporinase-producing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 376~378, 1986
- 渡辺泰雄, 南 新三郎, 松原信之, 能見寿彦, 荒木春美, 保田 隆, 高井 明, 才川 勇: β -lactamase に対する cefbuperazone の *in vitro*, *in vivo* 安定性. *Chemotherapy* 33: 753~758, 1985
- MINAMI S, YOTSUJI A, INOUE M, MITSUHASHI S: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 382~385, 1980
- YOTSUJI A, MINAMI S, ARAKI Y, INOUE M, MITSUHASHI S: Inducer activity of β -lactam antibiotics for the β -lactamase of *Proteus rettgeri* and *Proteus vulgaris*. *J Antibiotics* 35: 1590~1593, 1982
- 南 新三郎, 松原信之, 四辻 彰, 岡本直子, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇, 三橋 進: *Enterobacter cloacae* に対する β -lactam 剤の抗菌作用, 第一報 Cephem 系薬剤の抗菌活性と β -

- lactamase 誘導。Chemotherapy 31 : 909~915, 1983
- 6) SANDERS C C, SANDERS JR. W E : Type I β -lactamase of gram-negative bacteria : Interaction with β -lactam antibiotics. J Infect Dis 154 : 792~800, 1986
 - 7) KUCK N A, TESTA R A, FORBES M : *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of combinations of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 19 : 634~638, 1981
 - 8) GRIMM H : Bacteriological antagonism between acylureidopenicillins and cephalosporins. J Antimicrob Chemother 9 (Suppl.) : 31~34, 1982
 - 9) NEU H C, LABTHAVIKUL P : Combination of mezlocillin and azlocillin with cephalosporin antibiotics : cefoxitin, cefoperazone and moxalactam. J Antimicrob Chemother 9 (Suppl.) : 101~106, 1982
 - 10) SANDERS C C, SANDERS JR. W E, GOERING R V : *In vitro* antagonism of β -lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob Agents Chemother 21 : 968~975, 1982
 - 11) MINAMI S, MATSUBARA N, YOTSUJI A, WATANABE Y, YASUDA T, SAIKAWA I, MITSUHASHI S : Antibacterial activity of cefoperazone alone and in combination against cephalosporinase-producing *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 24 : 123~125, 1983
 - 12) 池田文昭, 高乗 仁, 西田 実, 五島瑛智子, 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
 - 13) MILLER M A, FINAM M, YOUSUF M : *In-vitro* antagonism by *N*-formimidoyl thienamycin and cefoxitin of second and third generation cephalosporins in *Aeromonas hydrophila* and *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother 11 : 311~318, 1983
 - 14) 南 新三郎, 中島博美, 熊野克彦, 渡辺泰雄, 保田 隆, 高井 明, 才川 勇 : Piperacillin と β -lactam 剤の *in vitro* 併用効果。Chemotherapy 33 : 293~304, 1985
 - 15) OKONOGI K, SUGIURA A, KUNO M, HIGASHIDE E, IMADA A : Effect of β -lactamase induction on susceptibility to cephalosporins in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother 16 : 31~42, 1985
 - 16) 南 新三郎 : *Enterobacter cloacae* における β -lactamase 誘導と β -ラクタム剤耐性。北関東医学 36(1) : 59~70, 1986
 - 17) GOERING R V, SANDERS C C, SANDERS JR. W E : Antagonism of carbenicillin and cefamandole by cefoxitin in treatment of experimental infections in mice. Antimicrob Agents Chemother 21 : 963~967, 1982
 - 18) 南 新三郎, 能見寿彦, 荒木春美, 渡辺泰雄, 保田 隆, 高井 明, 才川 勇, 三橋 進 : β -lactamase 産生菌と大腸菌の混合培養系における cephem 剤の大腸菌に対する殺菌効果。Chemotherapy 32 : 925, 1984
 - 19) SANDERS C C, SANDERS JR. W E : Microbial resistance to newer generation β -lactam antibiotics : clinical and laboratory implications. J Infect Dis 151 : 399~406, 1985
 - 20) WALEY S G : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem J 139 : 780~781, 1974
 - 21) LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, RANDALL R J : Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265~275, 1951
 - 22) SELYE H : Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. Proc Soc Exp Biol Med 82 : 328~333, 1953
 - 23) NIEGEL A C C, EISENSTADT R E, TURNER K A, WHITE A J : Inhibition of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* K-12. Effects upon growth, viability and outer membrane barrier function. J Antimicrob Chemother 16 : 287~296, 1985
 - 24) 西野武志, 宇津井幸男, 後藤直正, (故)中沢昭三 : CS-1170 による *Escherichia coli*, *Proteus morgani*, *Serratia marcescens* の形態変化について。Chemotherapy 26 : 67~80, 1978

EXTRACELLULAR β -LACTAMASE ACTIVITY OF *ENTEROBACTER CLOACAE* AND ITS STABILITY

HARUMI ARAKI, SHINZABURO MINAMI, YASUO WATANABE,
TAKASHI YASUDA and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.
2-4-1 Shimookui, Toyama 930, Japan

Using *Enterobacter cloacae* which produced an inducible β -lactamase, we studied β -lactamase activity in cell-free medium and its stability in rat body fluids.

When cefoperazone (CPZ) was added to a broth culture of *E. cloacae* H-27, β -lactamase activity in cell-free medium and cell extract was negligibly low. However, with the addition of cefmetazole (CMZ), β -lactamase was induced in large quantities and its activity in cell-free medium and cell extract increased. When CPZ or CMZ was administered intravenously to rats at a dose of 100 mg/kg after their pouches were infected with *E. cloacae* H-27, β -lactamase activity in pouch exudate was low in the CPZ-treated group, but high in the CMZ-treated group. The results of an *in vitro* stability test of β -lactamase in various rat body fluids showed that more than 90% of β -lactamase activity remained six days after the addition of β -lactamase in serum, urine and exudate other than bile. β -Lactamase injected into the pouch was stable *in vivo* as well as *in vitro*.

These results suggest that the induced β -lactamase remains at the infection site long after the disappearance of β -lactamase-producing bacteria and consequently influences the concentration of β -lactam antibiotics.