

抗緑膿菌用 β -ラクタム剤による緑膿菌の β -lactamase 誘導と薬剤感受性について

小林 寅祐^{*1,*2}・手塚 孝一^{*1}・佐藤 弓枝^{*1}・長谷川美幸^{*1}

内野卯津樹^{*1}・金子 康子^{*2}・西田 実^{*2}・五島瑳智子^{*2}

^{*1}: 三菱油化ビーシーエル・化学療法研究室

^{*2}: 東邦大学医学部微生物学教室*

(平成元年3月23日受付)

臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* 15 株を sub-MIC の sulbenicillin (SBPC), ticarcillin (TIPC), piperacillin (PIPC), cefsulodin (CFS), cefoperazone (CPZ), cefpiramide (CPM), ceftazidime (CAZ) および azthreonam (AZT) などの抗緑膿菌用 β -ラクタム剤で処理し, β -lactamase の誘導能を検討した。

これらの薬剤による被検菌株の β -lactamase 誘導能は, 中等度 β -lactamase 産生株において強く, 構成的産生株および弱産生株では薬剤により β -lactamase 誘導の強弱が見られた。

中等度 β -lactamase 産生株を試験菌株とした場合, SBPC, TIPC, PIPC, CFS, CPZ, CPM, CAZ および AZT の 8 薬剤による誘導により, それらの菌株の β -lactamase 活性は対照の 3~5 倍に上昇した。しかし CFS および CAZ は誘導効果を示さなかった。また弱産生株では SBPC および CPM で 3~4 個の β -lactamase 産生量の上昇が見られ, 比較 8 薬剤のうち SBPC および CPM が最も誘導効果が強かった。

上記の β -ラクタム剤による高度誘導株に対しては, それらの薬剤の抗菌力が低下する傾向が認められた。

Key words: 抗緑膿菌用 β -ラクタム剤, β -lactamase, 誘導能

我々は前報において, 各種の緑膿菌の多数菌株を用いて cefoxitin による β -lactamase の誘導効果を比較し, *Pseudomonas* 属の誘導は菌種により明らかな特徴があることを報告した¹⁾。特に *Pseudomonas aeruginosa* は誘導能が強いことを認めた。

本報では *P. aeruginosa* の β -lactamase の各種の抗緑膿菌用 β -ラクタム剤による誘導効果と誘導後の薬剤感受性について検討したのでその結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試験菌株

1987 年 1 月~4 月の間に国内の 12 の各臨床施設において, *P. aeruginosa* 感染症患者より新しく分離され当研究室にて -80°C でスキムミルク保存中の株よりランダムに取り出した菌株を用いた。

2. 使用薬剤

Cefoxitin (CFX, 第一製薬), sulbenicillin (SBPC, 武田薬品), ticarcillin (TIPC, ビーチャム薬品), piperacillin (PIPC, 富山化学), cefsulodin (CFS, 武田

薬品), cefoperazone (CPZ, 富山化学), cefpiramide (CPM, 山之内製薬), ceftazidime (CAZ, 新日本実業), azthreonam (AZT, 日本スクイブ)

3. MIC 測定法

日本化学療法学会標準法に準じて行なった。すなわち, Mueller-Hinton broth (Difco) の一夜培養液の 100 倍希釈液を試験菌液とし, 同培地に用いた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. β -lactamase の誘導および調製

P. aeruginosa の前培養液を, 各薬剤をそれぞれ 1/4~1/8 MIC 濃度を含む Mueller-Hinton broth に 10% (v/v) 接種し, 37°C , 2 時間振盪培養した。一部は各薬剤の MIC の測定に, 残りを集菌, 洗浄後, 超音波処理により菌体を破碎し, 4°C , 12,000 r. p. m. 20 分間の遠心上清液を粗酵素液とした。

5. β -lactamase 活性の測定

Cephaloridin (CER) を基質として, 30°C における酵素液による水解速度を 260 nm における紫外外部吸収の

* 東京都大田区大森西 5-21-16

Table 1. Antimicrobial activity of antipseudomonal β -lactams against *Pseudomonas aeruginosa*MIC: $\mu\text{g/ml}$

Strain No.	TIPC	SBPC	PIPC	CFS	CPZ	CPM	CAZ	AZT
6	12.5	25	3.13	1.56	3.13	3.13	1.56	3.13
13	>400	>400	100	200	200	200	100	100
16	25	50	6.25	3.13	6.25	6.25	3.13	6.25
20	12.5	25	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13
28	200	200	200	25	200	200	50	50
29	100	100	200	12.5	100	100	25	12.5
33	12.5	25	25	1.56	25	12.5	3.13	3.13
35	100	100	200	12.5	100	100	25	12.5
36	>400	>400	400	>400	>400	400	25	100
38	400	>400	200	50	50	25	3.13	25
65	50	100	50	6.25	100	50	12.5	12.5
78	100	200	12.5	12.5	25	12.5	6.25	25
80	>400	>400	400	200	200	200	50	6.25
89	12.5	25	3.13	1.56	3.13	3.13	0.78	3.13
90	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39	0.39	0.78	0.39

※ Inoculum size: 10^6 CFU/ml

TIPC: ticarcillin, SBPC: sulbenicillin, PIPC: piperacillin, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone, CPM: cefpiramide, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

変化によって求めた。試験菌の β -lactamase 活性は Lowry 法によって求めた単位蛋白 (mg) あたり、1 時間に CER を $1 \mu\text{mole}$ 分解した場合を 1 単位 (unit/mg protein) とした。

II. 実験結果

1. 試験菌株に対する抗緑膿菌剤の MIC

実験に用いた菌株の各種抗緑膿菌剤の MIC を Table 1 に示した。

被検 15 株のうち、No. 13 および No. 36 は 8 薬剤のすべてに高度耐性であった。これに対して No. 6, No. 16, No. 20, No. 89 および No. 90 の 5 株は各薬剤に比較的感受性であった。その他の 8 株は両者の中間的な感受性を示した。また 8 薬剤のうち、TIPC, SBPC および PIPC は、これらの菌株に対する抗菌力が比較的弱く、CAZ および AZT は比較的強い活性を示した。

2. *P. aeruginosa* の β -lactamase 活性と抗緑膿菌 β -ラクタム剤による誘導

臨床分離 *P. aeruginosa* 15 株の β -lactamase 活性を

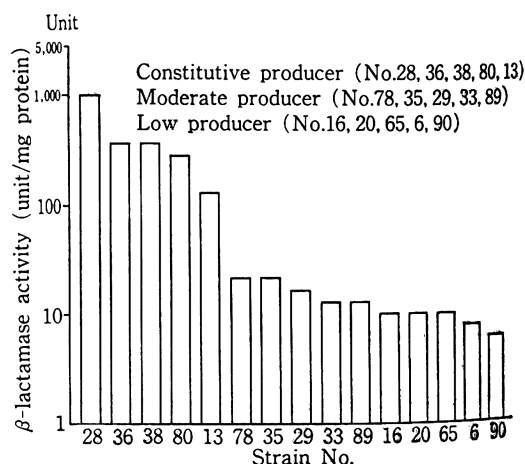
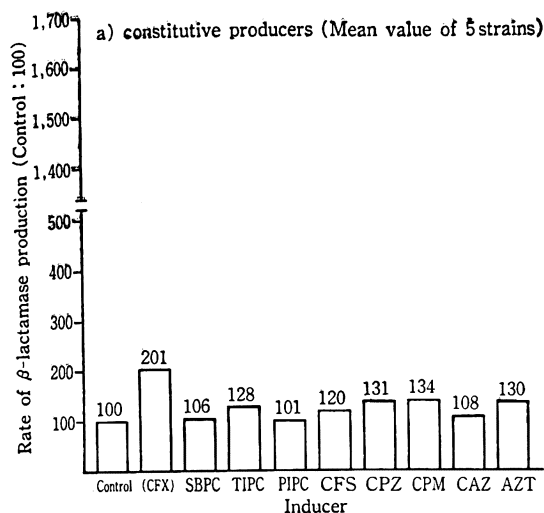
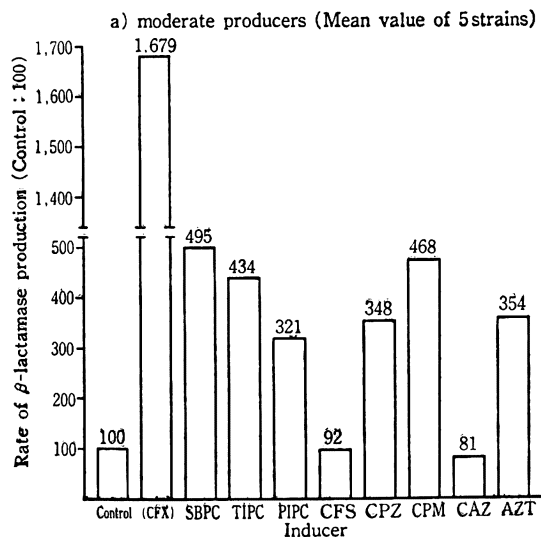


Fig. 1. β -lactamase activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains tested



CFX: cefoxitin, SBPC: sulbenicillin, TIPC: ticarcillin, PIPC: piperacillin, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone, CPM: cefpiramide, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

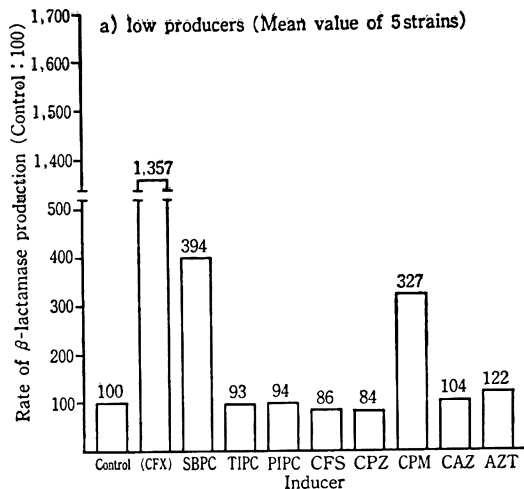
Fig. 2. Comparison of β -lactamase induction rates in *Pseudomonas aeruginosa* by various anti-pseudomonal β -lactams



CFX: cefoxitin, SBPC: sulbenicillin, TIPC: ticarcillin, PIPC: piperacillin, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone, CPM: cefpiramide, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

Fig. 3. Comparison of β -lactamase induction rates in *Pseudomonas aeruginosa* by various anti-pseudomonal β -lactams

前述のとおり測定した。Fig. 1 のとおり No. 28 株を含む 5 株は β -lactamase 産生量が多く、構成的酵素産生株である。次に No. 78 株を含む 5 株は酵素産生量が 10 単位以上であるが、構成的産生株と比較すると明らかに少



CFX: cefoxitin, SBPC: sulbenicillin, TIPC: ticarcillin, PIPC: piperacillin, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone, CPM: cefpiramide, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

Fig. 4. Comparison of β -lactamase induction rates in *Pseudomonas aeruginosa* by various anti-pseudomonal β -lactams

ない中等度酵素産生株である。No. 16 株などの残り 5 株は β -lactamase 産生量が 10 単位以下の弱産生株である。以上のとおり臨床分離 *P. aeruginosa* 15 株を、それらの β -lactamase 産生性によって 3 群に分離した。

これら 3 群の *P. aeruginosa* それぞれ 5 株について、各種の抗緑膿菌用 β -ラクタム剤の β -lactamase 誘導効果を比較した。

β -lactamase 産生量の多い構成的産生株 5 株の平均値を Fig. 2 に示した。対照薬として用いた CFX による誘導により、無処理対照の約 2 倍相当量の β -lactamase 活性が認められた。一方、8 種の抗緑膿菌 β -ラクタム剤の誘導効果は全般に低く、TIPC, CFS, CPZ, CPM および AZT により対照の 1.2~1.3 倍の酵素活性が認められるのみであった。SBPC, PIPC および CAZ では酵素活性は顕著な変化を示さなかった。

中等度 β -lactamase 産生株 (5 株) の平均については Fig. 3 のとおりである。この群の菌株では CFX による誘導によって酵素活性は対照の約 17 倍に上昇した。一方、SBPC, TIPC, PIPC, CPZ, CPM および AZT の 6 薬剤は、この群の菌株の β -lactamase 活性を比較的強く誘導し、約 3.2~5.0 倍の活性の上昇がみられた。しかし、CFS および CAZ はこれらの菌株の β -lactamase 産生に影響を与えなかった。

Fig. 4 に弱産生株 (5 株) の平均を示した。CFX による誘導によって、これらの菌株の β -lactamase 活性は 13.6 倍と中等度産生株と同様に上昇する。しかし抗緑

Table 2. Susceptibility of highly induced strains of *Pseudomonas aeruginosa* to various anti-pseudomonal β -lactams
MIC: $\mu\text{g/ml}$

Drug	No. 29		No. 35		No. 65		No. 33	
	B* ¹	A* ²	B	A	B	A	B	A
TIPC	100	400	100	400	50	200	12.5	12.5
SBPC	100	200	100	200	100	200	25	100
PIPC	200	> 400	200	400	50	50	25	25
CFS	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	1.56	1.56
CPZ	100	100	100	100	100	400	25	25
CPM	100	200	100	200	50	50	12.5	25
CAZ	25	25	25	25	12.5	12.5	3.13	3.13
AZT	12.5	100	12.5	50	12.5	12.5	3.13	3.13

*¹ B: Before induction

*² A: After induction

Each drug is also used as inducer

TIPC: ticarcillin, SBPC: sulbenicillin, PIPC: piperacillin, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone,
CPM: cefpiramide, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

膿菌剤では比較的軽度で、SBPC で約 3.9 倍、CPM で約 3.2 倍の活性が認められたが、その他の薬剤では顕著な活性の上昇がみられなかった。

以上のとおり、抗緑膿菌 β -ラクタム剤による *P. aeruginosa* の β -lactamase の誘導産生は、菌株固有の β -lactamase 誘導能によってかなりの相違がある。特に中等度酵素産生株で顕著な誘導産生が認められ、弱産生株では SBPC および CPM によってのみ β -lactamase の誘導が認められた。また構成的産生株では各薬剤による酵素誘導はきわめて軽度であった。

3. β -lactamase の誘導産生と薬剤感受性

実験の項に記載した方法により *P. aeruginosa* を各抗緑膿菌剤によって誘導処理し、誘導後の菌液を前培養液として、誘導に使用したそれぞれの薬剤について MIC を測定し、誘導処理前の MIC と比較し、その一部を表わした。特に前記の実験結果から、抗緑膿菌剤によって β -lactamase が比較的良好に誘導された 4 菌株を選択し、それらの菌株に対する各薬剤の MIC を示した (Table 2)。被検 8 薬剤のうち CFS および CAZ による誘導処理の前後で各菌株に対する CFS および CAZ の MIC の変化はまったく認められなかった。その他の薬剤では 4 倍程度 MIC が上昇する菌株が存在した。特に TIPC はこの傾向が顕著であった。

III. 考 察

起炎菌として緑膿菌が関与する感染症の多くの症例は、いわゆる難治感染症でその治療は今日においても化学療法における重要な課題となっている。近年、忍容性の優れた抗緑膿菌活性を有する β -ラクタム剤が開発され臨床的にも応用されている。しかしこれらの薬剤の抗緑膿菌作用は必ずしも充分なものでなく、臨床分離株の多くは一部の薬剤を除き MIC 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ 前後の中等度感受性の域を出ない。また、臨床において、常用投与量では投与初期には MIC を越える高い薬剤濃度が生体内で維持されても、時間の経過と共に低下し、MIC を下まわる濃度の薬剤が感染菌と長時間接触するという局面がある。他方、既報のとおり緑膿菌を含むグラム陰性菌の多くは、ある種の β -ラクタム剤の存在下において誘導的に β -lactamase を産生し、さらに一部の菌株では構成的に多量の β -lactamase を産生することが知られている²⁻⁴⁾。

本報では実験に用いた臨床分離の *P. aeruginosa* 15 株のうち 5 株は高度に β -lactamase を産生する構成的産生株であること、さらに β -lactamase の産生量によって残りの菌株は中等度産生株および弱産生株に分離される。特に中等度産生株では、各種の抗緑膿菌用 β -ラクタム剤によって誘導的に β -lactamase を産生する性質をもつことが判明した。またこのような性質をもつ菌株

では、誘導に用いた抗緑膿菌用 β -ラクタム剤の MIC 値も大きくなる例が認められた。さきに我々は CFX で誘導処理を行なった一部の *P. aeruginosa* または *Pseudomonas cepacia* が数種の抗緑膿菌用 β -ラクタム剤に対して耐性化する事実を認めた。同様な傾向が一部の *P. aeruginosa* において、CFS, CAZ を除く 6 種の抗緑膿菌用 β -ラクタム剤についても確認された。

これらの成績から明らかなとおり、*P. aeruginosa* 感染に対する β -ラクタム剤による化学療法において、治療に比較的天数を要する場合は、薬剤による酵素誘導および感受性の低下が無視できないので、MIC の継続的なチェックが必要であろう。

文 献

1) 小林寅詔, 池田文昭, 西田 実, 五島瑩智子,

他: 臨床分離 *Pseudomonas* 属の β -lactamase 誘導について, 菌種間の特性と安定な耐性株について。Chemotherapy 35: 71~76, 1987

- 2) TAUSK F, EVANS M E, PATTERSON L P, et. al.: Imipenem-induced resistance to antipseudomonal β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob. Agents. Chemother. 28: 41~45, 1985
- 3) 池田文昭, 高乗 仁, 西田 実, 五島瑩智子, 栗原章吾: 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
- 4) MINAMI S, YOTSUJI A, INOUE M, MITSUHASHI S: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents. Chemotherapy 18: 382~385, 1980

INDUCTION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* β -LACTAMASE BY NEW ANTIPSEUDOMONAL β -LACTAMS AND DRUG SUSCEPTIBILITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

INTETSU KOBAYASHI^{1,2)}, KOICHI TEZUKA¹⁾, YUMIE SATO¹⁾,
MIYUKI HASEGAWA¹⁾, UTSUKI UCHINO¹⁾, YASUKO KANEKO²⁾,
MINORU NISHIDA²⁾ and SACHIKO GOTO²⁾

¹⁾ : Chemotherapy Division, Mitsubishi-Yuka Bio-clinical Laboratories

²⁾ : Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University,
Omori-nishi 5-21-16, Ota-ku 143, Tokyo, Japan

In a previous study, we compared the induction rates of β -lactamase produced by cefoxitin in many *Pseudomonas* strains and found various induction rates among those tested. The inducibility was highest in *Pseudomonas aeruginosa*. In the present study, we investigated the induction in *P. aeruginosa* of β -lactamase by various antipseudomonal β -lactams and drug susceptibility after the induction.

Fifteen clinical isolates of *P. aeruginosa* were each treated with sub-inhibitory concentrations of 8 antipseudomonal β -lactams such as sulbenicillin, ticarcillin, piperacillin, cefsulodin, cefoperazone, cefpiramide, ceftazidime and aztreonam at 37°C for 2 hours to induce β -lactamase production. The β -lactamase inducibility of these antibiotics differed among the test strains; β -lactamase activity was augmented sharply in the moderate β -lactamase producers after the induction. However, the enzyme activity of the constitutive and non-constitutive β -lactamase producers increased only slightly or not at all. On the other hand, the *P. aeruginosa* strains, which largely produced the β -lactamase after induction with these antibiotics, became resistant to them.