

## 緑膿菌に対するβ-ラクタム剤感受性ディスク法による 耐性誘導とそこに現れた変異株の解析

高橋 綾子・四方田幸恵・入谷さゆり・田波 洋

群馬大学医学部付属病院中央検査部\*

橋 本 一・井上松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌施設

(平成元年6月20日受付)

薬剤感受性ディスク法検査によってβ-ラクタマーゼ誘導能の強弱、至適濃度および、β-ラクタム剤変異株の選択が可能であることが判った。特に緑膿菌では阻止円の形からβ-ラクタマーゼ誘導能は imipenem, cefmetazole, ampicillin, cephalothin で強く ceftazidime, piperacillin, aztreonam では弱かった。また、従来酵素に対して安定であると言われてきたβ-ラクタム剤の多くはβ-ラクタマーゼ量の増加に伴い加水分解された。

さらに各β-ラクタム剤に対する変異株の出現頻度はどの薬剤でも概して $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ であり、imipenemを除くβ-ラクタム剤により選択された変異株はβ-ラクタマーゼの増量によるものであり、imipenem 選択による変異株は imipenem のみに対する耐性菌でβ-ラクタマーゼの量的変化は認められないものが主であった。変異株の中にはβ-ラクタム剤以外の薬剤に対しMICの低い耐性菌も低頻度ながら分離された。

**Key words:** 緑膿菌, β-ラクタム剤, β-ラクタマーゼ誘導, ディスク法, 耐性機構

緑膿菌に対する抗菌力の非常に優れた種々の抗菌剤が開発され、それらの薬剤が臨床応用されると共に、新薬に対する耐性菌が着実に分離され、幾多の問題を引き起している<sup>1,2)</sup>。

我々は、検査室で臨床分離細菌に対する感受性試験を行なっている際、TAUSK ら<sup>3)</sup>が報告しているβ-ラクタム剤間の阻止円の拮抗現象を確認した。一方ブロス法によるβ-ラクタム剤間の拮抗現象についてはすでに小林ら<sup>4)</sup>が緑膿菌で、代居ら<sup>5)</sup>がセラチア菌で報告している。検査の際、このβ-ラクタム剤間の拮抗現象は特に緑膿菌で薬剤感受性試験を行なう際に imipenem と他のβ-ラクタム剤間で強いことがわかった。また、一般に緑膿菌でその感受性試験を行なった際、β-ラクタム剤阻止円内に菌が高率に出現することに気づいた。本論文では、この2点を中心に若干の検討を行なったので報告する。

### I. 材料および方法

#### (1) 材料

使用菌株は1988年に群馬大学病院で分離された臨床分離緑膿菌96株を用いた。また詳細な実験は分離菌の

中から喀痰由来の臨床分離株TY 553を任意に選び検討した。

#### (2) 方法

薬剤感受性試験は感受性N寒天培地(日水)を用い、一濃度ディスク法(昭和ディスク)で行なった。また、平板法による最小発育阻止濃度(MIC)測定は、感受性測定ブイヨンおよび感受性N寒天培地(日水)、菌数約 $4\sim 6\times 10^6$ /mlを用い、日本化学療法学会標準法に準拠した<sup>6)</sup>。

使用薬剤は imipenem (IPM, 万有製薬), aztreonam (AZT, 日本スクィブ), ceftazidime (CAZ, 田辺製薬), cefmenoxime (CMX 武田薬品), cefotaxime (CTX, 中外製薬), cefuzonam (CZON, ビーチャム薬品), cefsulodin (CFS, 武田薬品), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), piperacillin (PIPC 富山化学), carbenicillin (CBPC, ビーチャム薬品), cefoperazone (CPZ, 富山化学), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品), gentamicin (GM, 塩野義製薬), norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), minocycline (MINO, 日本レダリー), cephalotin (CET, 塩野義製薬), ampicillin (ABPC, 万有製薬),

\* 群馬県前橋市昭和町3丁目39-15

cefmetazole (CMZ, 三共) penicillin G (PCG, 万有製薬) であり、いずれもその分与を受けた。

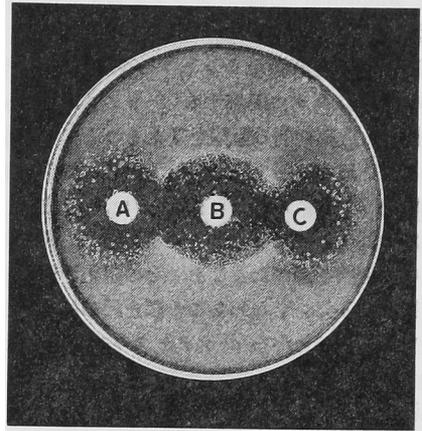
$\beta$ -ラクタマーゼ活性測定は、37°C 対数中期の培養菌体を、50 mM リン酸バッファ液 (pH 7.0) に懸濁し、これを氷冷にて超音波破壊し、4°C 30,000 g 30 分間遠心し、その上清を阻酵素とした。 $\beta$ -ラクタマーゼ活性は cephalothin を基質として用い、36°C UV 法により測定した。なお  $\beta$ -ラクタマーゼの比活性は1分当たり 1  $\mu$  mole を加水分解する量を1単位 (U) とし蛋白当り (mg) で示した。

変異株選択方法その1つは各濃度の薬剤含有平板に菌数の判明した菌液を 0.1 ml 塗布し 37°C 18 時間培養後平板上に増殖した菌集落を純化しその MIC および耐性菌の変異率を求めた (平板法)。

その2つは薬剤非含有平板に菌液を 0.1 ml 塗布し、この上に薬剤含有ディスクを置き 37°C 18 時間培養し阻止円の中に増殖した菌数を求め、それぞれを純化し同様に MIC および耐性菌の変異率を求めた (ディスク法)。

なお、変異率は各平板上に塗布した菌液中の生菌数を求め、平板法の場合はプレート上に増殖した耐性菌/生菌数、ディスク法の場合は阻止円内に増殖した耐性菌/阻止円内の菌数とした。(Table 2 参照)。

ディスク法における誘導濃度測定法は感受性N培地 (日水角1号) に約  $10^8$  前後の菌数を塗布しそこに誘導剤となるディスクと他の  $\beta$ -ラクタム剤ディスクをディスク間の距離を適当に変えて置き 37°C 18 時間培養する。誘導能の有無は阻止円の欠けぐあいから判定し各誘導剤の濃度を求めた。至適誘導濃度はディスク阻止円像が最も半月状態に近いものを MIC に換算し、かつそのうちの最小濃度で示した。



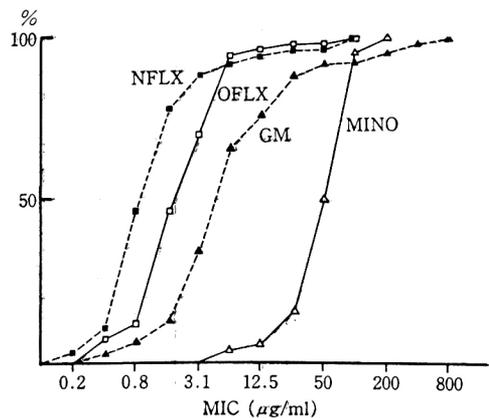
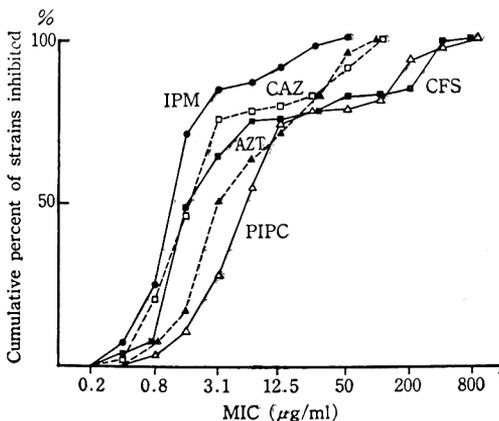
A : aztreonam, B : imipenem, C : ceftazidime

Fig. 2. Induction of  $\beta$ -lactam resistance by disc method in *Pseudomonas aeruginosa*

## II. 結 果

### (1) 臨床分離緑膿菌に対する薬剤の抗菌力

臨床分離緑膿菌 96 株の imipenem, aztreonam, piperacillin, ceftazidime, cefsulodin, cefoperazone, norfloxacin, ofloxacin, minocycline 各薬剤に対する抗菌力を平板法で求め、その結果の累積百分率を Fig. 1 に示した。全菌株の 90% を阻害する各薬剤の阻止濃度 (MIC<sub>90</sub>) は、imipenem では 12.5  $\mu$ g/ml, ceftazidime では 50  $\mu$ g/ml であった。しかし他の  $\beta$ -ラクタム剤の MIC<sub>90</sub> は 50~200  $\mu$ g/ml であった。また、norfloxacin および ofloxacin の MIC<sub>90</sub> は、3.1 および 6.25  $\mu$ g/ml であり、その抗菌力は imipenem に比べ若干優れた値を示した。



IPM : imipenem, CAZ : ceftazidime, AZT : aztreonam, CFS : cefsulodin, PIPC : piperacillin, NFLX : norfloxacin, OFLX : ofloxacin, GM : gentamicin, MINO : minocycline

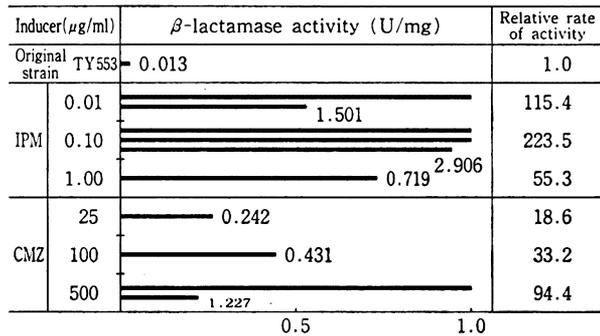
Fig. 1. Sensitivity distribution of 49 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*

(2) Imipenem と他の  $\beta$ -ラクタム剤間に認められる拮抗現象

緑膿菌の感受性試験をディスク法を用い調べた際、imipenem ディスクに隣接する  $\beta$ -ラクタム剤ディスクの阻止円は、各薬剤間の距離を変えることにより半月状に欠ける、いわゆる阻止円の拮抗現象が(臨床分離緑膿菌 30 株中 28 株に)認められた (Fig. 2)。また、この拮抗現象の認められた部位から菌を釣菌し、再度同様にしてその阻止円を調べたところ、その阻止円形は前と同様の結果であった。すなわちこの阻止円の拮抗現象は、可逆的であったことから  $\beta$ -ラクタマーゼの誘導と推定した。緑膿菌 TY 553 株で、この現象が引き起こされる imipenem の濃度範囲を阻止円径から求めたところ 0.1~0.78  $\mu\text{g/ml}$  前後であった。液体プロス法にて  $\beta$ -ラクタマーゼを誘導する際、誘導剤として imipenem, 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , およびグラム陰性菌の  $\beta$ -ラクタマーゼに対しその誘導能の高い薬剤として知られている cefmetazole 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  の各濃度を 37°C で 2 時間対数初期の培養菌 (緑膿菌 TY 553) に作用させ、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性を調べた。

なお使用菌株 (緑膿菌 TY 553) に対する imipenem, cefmetazole の MIC は、それぞれ 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , > 800  $\mu\text{g/ml}$  である。Imipenem を 0.1  $\mu\text{g/ml}$  処理時の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、2.906  $\mu\text{mg protein}$  であり、この活性は非誘導時の活性に比べ約 200 倍上昇していた (Fig. 3)。しかし imipenem 1.0  $\mu\text{g/ml}$  処理時の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、0.719  $\mu\text{mg protein}$  であった。しかし cefmetazole を誘導剤とした場合 cefmetazole の濃度の上昇と共に  $\beta$ -ラクタマーゼ活性上の上昇がみられ、特に cefmetazole 500  $\mu\text{g/ml}$  における  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、imipenem 0.01  $\mu\text{g/ml}$  作用した時の活性とはほぼ同程度であった。

一方  $\beta$ -ラクタマーゼ誘導濃度は、各ディスクの薬剤間の距離を適当に変え阻止円径を MIC に換算することにより求めることができた。緑膿菌 TY 553 において ampicillin, cefmetazole, cephalothin ディスクを誘導剤として、cefotaxime ディスクを接近させる (薬剤濃度を増やす) ことにより  $\beta$ -ラクタマーゼの誘導能およびその時の濃度を調べた。各  $\beta$ -ラクタム剤の至適誘導濃度は、ampicillin 25  $\mu\text{g/ml}$ , cefmetazole, 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ,



IPM : imipenem, CMZ : cefmetazole

Fig. 3. Induction of  $\beta$ -lactamase activity by treatment with imipenem and cefmetazole in *Pseudomonas aeruginosa*

Table 1. Induction of  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* TY 553 by the disc method

Inducer	Concentration of inducer	
	range ( $\mu\text{g/ml}$ )	optimal ( $\mu\text{g/ml}$ )
ABPC	0.1 $\geq$ ~ > 50	25
CER	0.1 ~ > 100	12.5
CMZ	0.1 $\geq$ ~ > 50	12.5

Cells were selected by CTX.

ABPC : ampicillin, CER : cephalothin, CMZ : cefmetazole, CTX : cefotaxime

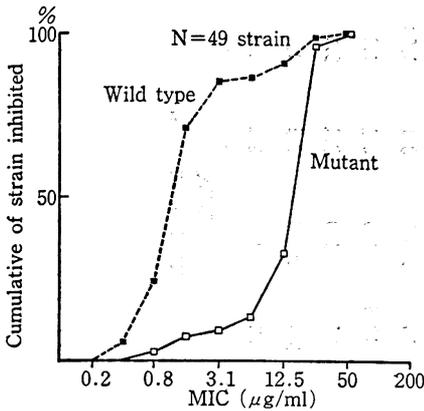


Fig. 4. Cumulative curve of MICs of imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*

cephalothin 12.5 μg/ml 前後の濃度であった。(Table 1) しかし penicillin G をはじめとした他の各 β-ラクタム剤ディスク、たとえば ceftazidime, piperacillin, aztreonam などには、明らかな誘導能が認められなかった。

(3) 各 β-ラクタム剤による突然変異株の選択

ディスク法により緑膿菌の感受性試験を行なった際 imipenem や、他の各 β-ラクタム剤ディスクの阻止円内に菌集落が出現した (Fig.2)。まずこの現象を imipenem を用い調べたところ 96 株中 82 株 (85.4%) にこの現象が認められた。このうち 49 株について原株と imipenem の阻止円内増殖菌の imipenem に対する MIC を調べその結果を Fig.4 に示した。

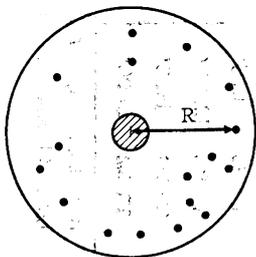
Imipenem 突然変異株は、原株に比べ 2~4 倍高い MIC を示し、それは継代培養しても安定であった。続

いてこの中から任意に 3 株を選びディスク法および平板法により β-ラクタム剤選択による変異株の出現頻度、および得られた変異株の MIC を比較し、その結果を Table 2 に示した。β-ラクタム剤耐性株の出現頻度は、いずれの薬剤でも、ディスク法  $1 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ 、平板法  $1.5 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-5}$  とほぼ一致した。特に突然変異株の選択濃度は、ディスク中心より阻止円内に増殖した菌集落までの距離を測定することにより求められる。これら変異株の多くは、MIC の約 4~8 倍濃度で得られており、この濃度は平板法で分離した際の濃度とほぼ一致した。次に任意に選んだ臨床分離緑膿菌株 TY 553 から各 β-ラクタム剤阻止円内に出現した突然変異株をそれぞれ 8 株ずつ選び、その MIC を測定した。その結果 aztreonam, ceftazidime, cefotaxime により得られた変異株はその耐性型から 2 つのパターンが得られた。しかし cefuzonam, cefsulodin, latamoxef, piperacillin, carbenicillin, により得られた変異株は 8 株すべて同一パターンであったのでこれらのうち各々任意の株についての MIC の結果を Table 3 に示した。その結果 imipenem 変異株の MIC は、原株に比べ imipenem のみ 16 倍高い値を示した。しかし、他の β-ラクタム剤を含め、gentamicin, norfloxacin に対する MIC はいずれの imipenem 耐性菌でも原株のそれと同程度であった。Aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, cefuzonam, piperacillin 選択により得られた突然変異株 TY 551-1, TY 556-1, TY 557-1, TY 558, TY 561 は、原株 TY 553 に比べ imipenem, gentamicin, norfloxacin 耐性値の上昇は認められなかった。しかし imipenem 以外の β-ラクタム剤の MIC は著しく上昇していた。また、TY 555-2, TY 556-2, TY 557-2, TY 559, TY 560,

Table 2. MICs estimated by disc method in *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	Original strain	Disk method					Plate method			
		MIC	★	Mutation frequency	2×R	MIC of mutant	MIC	Mutation frequency	MIC of mutant	
28	28mm	1.56 μg/ml	40	$1 \times 10^{-4}$	16mm	12.5 μg/ml	3.1 μg/ml	$1.5 \times 10^{-4}$	25 μg/ml	
82	28	1.56	60	$2 \times 10^{-4}$	20	6.25	3.1	$4 \times 10^{-5}$	12.5	
118	27	1.56	40	$1 \times 10^{-4}$	22	3.1	3.1	$5 \times 10^{-4}$	12.5	

★ No. of mutants in inhibition zone



R : Distance between disc and mutant (mm)

Mutation frequency  
= No. of mutants in inhibition zone / No. of cells which plated in inhibition zone

Table 3. MICs of  $\beta$ -lactam resistant mutants isolated by disc method

	IPM	AZT	CAZ	CMX	CTX	CZON	CFS	LMOX	PIPC	CBPC	CPZ	CZX	GM	NFLX
TY553	1.6	3.1	1.6	25	12.5	25	1.6	12.5	1.6	25	3.1	25	3.1	0.08
TY554	25	3.1	3.1	12.5	12.5	25	1.6	12.5	1.6	25	3.1	25	3.1	0.08
TY555-1	1.6	12.5	12.5	>400	400	400	12.5	100	50	100	50	>400	3.1	0.08
TY555-2	1.6	50	6.25	100	50	50	6.25	50	12.5	200	12.5	100	3.1	3.1
TY556-1	1.6	25	50	>400	>400	400	25	100	100	100	100	>400	1.6	0.08
TY556-2	1.6	12.5	3.1	100	25	50	3.1	25	12.5	100	12.5	50	1.6	3.1
TY557-1	1.6	25	50	>400	>400	400	25	100	100	100	100	>400	3.1	0.08
TY557-2	1.6	12.5	3.1	100	50	50	6.25	25	12.5	200	12.5	100	3.1	3.1
TY558	1.6	12.5	12.5	>400	400	400	12.5	100	50	100	50	>400	3.1	0.08
TY559	1.6	25	6.25	100	50	100	6.25	50	12.5	200	12.5	100	3.1	3.1
TY560	1.6	12.5	3.1	50	100	50	3.1	50	25	25	25	100	3.1	3.1
TY561	1.6	25	100	400	>400	400	25	200	100	100	100	>400	3.1	0.08
TY562	1.6	12.5	3.1	100	50	50	6.25	50	12.5	200	25	100	3.1	3.1

IPM : imipenem, AZT : aztreonam, CAZ : ceftazidime, CMX : ceftaxime, CTX : cefotaxime, CZON : ceftazoneam, CFS : cefsulodin, LMOX : latamoxef, PIPC : piperacillin, CBPC : carbenicillin, CPZ : ceftiozime, CZX : ceftiozime, GM : gentamicin, NFLX : netilmicin

Table 4.  $\beta$ -Lactamase activity of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	$\beta$ -lactamase activity ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative rate of activity
TY 553 wild type	0.013	1.0
TY 554 (IPM <sup>r</sup> )	0.007	0.5
TY 555-1 (AZT <sup>r</sup> )	0.171	13.2
TY 555-2 (AZT <sup>r</sup> )	0.024	1.8
TY 556-1 (CAZ <sup>r</sup> )	1.402	107.8
TY 556-2 (CAZ <sup>r</sup> )	0.010	0.8
TY 557-1 (CTX <sup>r</sup> )	0.238	21.8
TY 557-2 (CTX <sup>r</sup> )	0.010	0.8
TY 560 (LMOX <sup>r</sup> )	0.101	7.8

IPM : imipenem, AZT : aztreonam, CAZ : ceftazidime, CTX : cefotaxime,  
LMOX : latamoxef

Table 5.  $\beta$ -Lactamase activity of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	$\beta$ -lactamase activity*		
	Before induction (A)	After induction (B)	Relative rate of activity (A/B)
TY 553 (wild type)	0.013 ( 1.0)	2.906 (1.0)	223.5
TY 555-1 (AZT <sup>r</sup> )	0.171 ( 13.2)	2.853 (0.9)	15.1
TY 556-1 (CAZ <sup>r</sup> )	1.402 (107.8)	6.453 (2.2)	4.6
TY 557-1 (CTX <sup>r</sup> )	0.238 ( 21.8)	5.309 (1.9)	22.3
TY 560 (LMOX <sup>r</sup> )	0.101 ( 7.8)	3.810 (1.3)	37.7

\*  $\beta$ -Lactamase was induced by 0.1  $\mu\text{g/ml}$  of imipenem

( ) Relative rate of activity

AZT : aztreonam, CAZ : ceftazidime, CTX : cefotaxime, LMOX : latamoxef

TY 562 は TY 555-1, TY 556-1, TY 557-1, TY 558, TY 561 に比べ imipenem を除く他の  $\beta$ -ラクタム剤の MIC の上昇は少なかったが norfloxacin の MIC が確実に上昇していたものもみられた。この型の変異株の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は元株のそれとほぼ同程度であった(後述)。

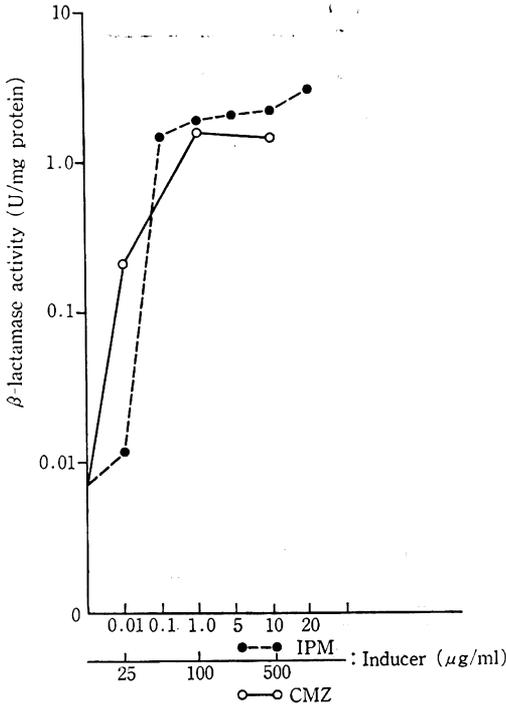
#### (4) 突然変異株の $\beta$ -ラクタマーゼ活性

次にこれらの代表的菌株についてその  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を調べた (Table 4)。Norfloxacin の MIC には変化が認められず、かつ imipenem を除く  $\beta$ -ラクタム剤に高い MIC を示した変異株 TY 555-1, TY 556-1, TY 557-1 の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、 $\beta$ -ラクタム剤未処理の条件下で、原株 TY 553 の酵素活性 0.013  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein に比べ相対活性値で約 13~100 倍上昇していた。また、norfloxacin の MIC が上昇した変異株 TY 555-2, TY 556-2, TY 557-2 および imipenem の

MIC が高かつ他の  $\beta$ -ラクタム剤や norfloxacin の MIC に変化が認められなかった変異株 TY 554 の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、原株とほぼ同程度であった。Latamoxef の変異株 TY 560 の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、相対活性値で原株に比べ 7.8 倍を示した。なお、この変異株の norfloxacin の MIC は低度の耐性を示した。

#### (5) 誘導による変異株の $\beta$ -ラクタマーゼ活性

以上述べた突然変異株について、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生様式が誘導型から構成型へと変化したものかどうかを検討し、その結果を Table 5 に示した。誘導剤として imipenem (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) を用い調べたところ、いずれの変異株においても、酵素活性は、誘導前の活性に比べ 5~38 倍上昇した。また、これらの変異株の誘導後の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を、原株の誘導後のそれと比較すると、相対値で 0.9~2.2 であった。一方 imipenem 耐性株の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は誘導前および誘導後いずれも



IPM : imipenem, CMZ : cefmetazole

Fig. 5. Induction of  $\beta$ -lactamase by imipenem and cefmetazole against *Pseudomonas aeruginosa* TY 554

その活性は原株の誘導前、誘導後の $\beta$ -ラクタマーゼ活性と同じであった。しかし imipenem 変異株での酵素の誘導濃度は原株 0.01~1.0  $\mu\text{g/ml}$  に比べ、0.1~20  $\mu\text{g/ml}$  と、より高い濃度を必要とした。これに対し cefmetazole は imipenem 変異株、原株いずれにおいても $\beta$ -ラクタマーゼ誘導の至適濃度には変化が認められなかった。(Figs. 3, 5)

### III. 考 察

緑膿菌の薬剤感受性試験を行なった際、結果の項で述べたごとくディスク法により $\beta$ -ラクタム剤による $\beta$ -ラクタマーゼ誘導の有無、強弱が容易に判別でき、しかもその阻止円径により $\beta$ -ラクタマーゼ誘導の至適濃度、さらに薬剤の $\beta$ -ラクタマーゼに対する安定性も知ることができた。 $\beta$ -ラクタム剤ディスクの拮抗現象は金沢ら<sup>7)</sup>により、すでに *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* で報告されている。緑膿菌では、imipenem のみによる拮抗現象を TAUSK ら<sup>8)</sup>は報告している。小林ら<sup>9)</sup>は、ブロス法により一定濃度の cefoxitin を誘導剤として緑膿菌を処理したところ aztreonam で 34.5%, cefsulodin 10% の割合で各菌株の MIC が上昇した

と述べている。ディスク法による imipenem の拮抗現象は ceftazidime, aztreonam を指標した時、緑膿菌では、30 株中 28 株 (93.3%) に認められた。拮抗現象の出現割合は誘導剤として用いる $\beta$ -ラクタム剤の種類、方法の違いによりずいぶん異なるといえよう。

我々は先に腸内細菌でブロス法による $\beta$ -ラクタマーゼの誘導について報告したが<sup>8,9)</sup>。この方法を用い cefoxitin と同様緑膿菌に対し抗菌力の弱い cefmetazole 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  各濃度を誘導剤として用い調べたところ、その $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、0.242, 0.431, 1.227 であり、500  $\mu\text{g/ml}$  作用させた時の酵素活性は非誘導時の約 94 倍の上昇をみた。Cefmetazole ディスクと ceftazidime あるいは aztreonam 各ディスク間の距離を変えることにより両者の間にやはり拮抗現象が認められた。特に cefmetazole は互いのディスク間の距離を近づけることによりその程度は強かった。このことはディスク法によっても $\beta$ -ラクタマーゼ活性は数 10 倍上昇し、その結果 $\beta$ -ラクタマーゼに安定とされてきた ceftazidime, aztreonam, cefsulodin 等々も酵素量の増加に伴い加水分解され阻止帯が小さくなることを意味する。この事実は平板法で MIC を求める時、菌数の変化すなわち酵素量の量的変化と共に MIC の変わる現象と一致した。

ディスク法では、寒天平板上で薬剤の濃度勾配ができるため、容易に変異株が選択でき、かつその時の濃度や変異率を求めることができた。今回調べた緑膿菌での $\beta$ -ラクタム剤による変異株の出現頻度は約  $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  と他菌種に比べ高いこともわかった。また、その時の変異株の選択濃度を阻止円直径から求めた時、概して MIC の 4~8 倍が妥当であった。この濃度は寒天平板法による変異株の選択濃度とほぼ一致した。

臨床分離緑膿菌 TY 553 から各々の $\beta$ -ラクタム剤より変異株を分離したところ、MIC の互いに異なる 4 種類の $\beta$ -ラクタム耐性株が得られた。Aztreonam, ceftazidime, cefotaxime に対する変異株は、 $\beta$ -ラクタマーゼの増量による耐性が多かった。また、得られた耐性菌の酵素産生は、依然誘導型であり、誘導剤存在下での酵素活性は、誘導前に比べ約 5~22 倍と変化した。前島、井上ら<sup>10)</sup>は、臨床分離 *Proteus vulgaris* の $\beta$ -ラクタマーゼ活性が誘導剤存在下でも 1.5 倍以上上昇しないような菌株からその $\beta$ -ラクタマーゼ産生遺伝子を大腸菌 K12 株にクローン化した。その結果 $\beta$ -ラクタマーゼ活性は誘導剤存在下で約 16 倍以上上昇する典型的な酵素であったと報告している。一方大腸菌で $\beta$ -ラクタマーゼ誘導に関して $\beta$ -ラクタマーゼ産生遺伝子以外の宿主変異 (amp<sup>r</sup> D または deb<sup>r</sup>) では $\beta$ -ラクタマーゼ産生量は

誘導剤が存在しない場合でも野生株 (deb+) に比べ変異株 (deb-) は、20 倍程度上昇すると報告している。すなわち野生株で構成型変異株と思われるβ-ラクタマーゼ産生菌はβ-ラクタマーゼ遺伝子の変異そのものより、それ以外の遺伝子の変異 (deb or amp D) によるものであろうと推定している。今回緑膿菌の中でβ-ラクタマーゼを誘導した場合、非誘導時の活性に比べ2~5倍程度と低い変異株は、β-ラクタマーゼ産生の構成型変異株かあるいは大腸菌で報告されている amp D, deb- 類似の変異株と考えられよう。

Aztreonam, ceftazidime, cefotaxime に対する変異株の中には、β-ラクタム剤と norfloxacin の MIC が共にわずかに上昇した変異株が分離された。この変異株のβ-ラクタマーゼ活性は原株と同程度であることから、この変異株は中江<sup>11,12)</sup>およびHIRAI<sup>13,14)</sup>が報告している薬剤の細胞内透過性の変化によるものと予測された。一方、imipenem により得られた変異株は imipenem の MIC のみに上昇が認められたが、しかしβ-ラクタマーゼ活性の上昇は認められなかった。Imipenem 耐性菌の耐性機構は imipenem 特有のものと推定される。その理由として imipenem, cefmetazole による誘導後のβ-ラクタマーゼ活性は原株と imipenem 変異株間で差異が認められず、かつ imipenem 変異株において imipenem のみβ-ラクタマーゼの至適誘導濃度が高くなった2点が挙げられる。したがって今回我々が分離した imipenem 変異株の耐性機構は中江<sup>11,12)</sup>あるいは佐竹<sup>15)</sup>が報告しているように imipenem 特有の細胞透過性を反映したものであろう。

上述のごとく緑膿菌のβ-ラクタム剤耐性菌が、ディスク法による薬剤感受性試験で容易に分離され、かつ様々な現象を捕らえることができることは、今後β-ラクタム剤に関する種々の研究の一つの方法として役立つものと考えられる。また、緑膿菌 TY 553 由来耐性株より4種類のβ-ラクタム耐性が得られたことは、臨床の場においてβ-ラクタム剤使用により、より複雑な性状を兼ね備えた耐性化による耐性菌の増加が予想されよう。

#### 文 献

- 1) 河合 健, 治療の進歩. *Medicina* 23: 1718~1719, 1986
- 2) 田波 洋, 高橋綾子, 四方田幸恵, 井野佳代子: 群馬大学医学部付属病院における臨床分離菌の変異. *化学療法の領域* 10: 108~116, 1987

- 3) TAUSK F, EVANS M E, PATTERSON L S, FEDERSPIEL C F, STRATTON C W: Imipenem-induced resistance to anti-pseudomonal β-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicro. Agents. Chemother.* 28: 41~45, 1985
- 4) 小林寅詔, 池田文昭, 西田 実, 五島瑳智子, 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
- 5) 代居敬子, 橋本 一, 井上松久: *Serratia marcescens* のβ-ラクタム剤耐性の誘導とその解析 (第2報). *日本化学療法学会総会講演抄録* 35: 107, 1987
- 6) 最小発育濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 7) 金沢 裕: 感受性ディスク法の基礎と臨床 (一濃度法を中心として). 20. *メヂヤサークル* 20. No. 9: 357~365, 1975
- 8) MINAMI S, YOTSUJI A, INOUE M, MITSUHASHI S: Induction of β-lactamase by various β-lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Ag. Chemother* 18(3): 382~385, 1980
- 9) 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(11): 1590~1593, 1982
- 10) MAEJIMA T, OHYA Y, MITSUHASHI S, INOUE M: Cloning and expression of the gene(s) for chromosome-mediated β-lactamase production of *Proteus vulgaris* in *Escherichia coli*. *Plasmid* 18: 120~126, 1987
- 11) 中江太治: グラム陰性菌の抗生物質耐性に及ぼす外膜の役割. *けんさ* 16: 34~45, 1986
- 12) 中江太治: ポーリンと抗生剤の膜透過. *代謝* 23: 791~799, 1986
- 13) HIRAI K, AOYAMA H, SUZUE S, IRIKURA T, IYOBE S, MITSUHASHI S: Isolation and characterization of norfloxacin resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicro. Agents. Chemother.* 30: 248~253, 1986
- 14) HIRAI K, SUZUE S, IRIKURA T, IYOBE S, MITSUHASHI S: Mutation-Producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicro. Agents. Chemother* 31: 582~586, 1987
- 15) 佐竹幸子: 緑膿菌におけるβ-lactam 剤の透過性. *日本化学療法学会総会, 講演抄録* 87: 62, 1989

INDUCTION AND SELECTION OF  $\beta$ -LACTAM-RESISTANT  
MUTANTS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
ISOLATED BY DOUBLE DISC METHOD

AYAKO TAKAHASHI, SACHIE YOMODA, SAYURI IRIYA  
and YOH TANAMI

Clinical Laboratory, Gunma University Hospital,  
3-39-15 Shyowamachi, Maebashi 371, Japan

HAJIME HASHIMOTO and MATSUHISA INOUE

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria  
Gunma University School of Medicine

To examine the effect of  $\beta$ -lactams on the induction of  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*, we used the disc method. When an imipenem disc was placed adjacent to a  $\beta$ -lactam disc the inhibition zone produced by the  $\beta$ -lactam disc was truncated on the side closest to the imipenem disc. When enzyme synthesis was induced by these double disc tests, the activity of most  $\beta$ -lactams was antagonised significantly against  $\beta$ -lactamase-inducible strains. Ampicillin, penicillin G, cephaloridine and cefmetazole in addition to imipenem also induced  $\beta$ -lactamase production in *P. aeruginosa*. In more than 90% of clinical isolates of *P. aeruginosa* strains,  $\beta$ -lactamase synthesis was induced by  $\beta$ -lactam disc. Using the disc method, we estimated the optimal concentration of  $\beta$ -lactam for  $\beta$ -lactamase induction.

$\beta$ -Lactam highly resistant mutants were isolated at a frequency of about  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  by the disc method. Most of the mutants selected by the  $\beta$ -lactams produced inducible  $\beta$ -lactamases at a high level. However, the mutants isolated by imipenem disc were resistant to imipenem only, and the enzyme activities of these resistant mutants were almost the same as those of the parent strains.