

$\beta$ -lactam 剤の治療におよぼす残存誘導型  $\beta$ -lactamase の影響

—ラット pouch 内二次感染モデルを用いた検討—

荒木 春美・南 新三郎・渡辺 泰雄・保田 隆

富山化学工業株式会社総合研究所\*

(平成 3 年 8 月 14 日受付・平成 3 年 11 月 28 日受理)

ラット pouch 内に誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌の *Enterobacter cloacae* H-27 を感染させ、 $\beta$ -lactamase 誘導能の高い cefmetazole (CMZ) あるいは誘導能の低い cefoperazone (CPZ) を先行投与した後、tosufloxacin (TFLX) で持続的に菌を減少させた。この感染から 4 日目に *Escherichia coli* TK-353 R を pouch 内に二次感染させ、ceftizoxime (CZX) あるいは cefbuperazone (CBPZ) の pouch 内殺菌効果におよぼす残存  $\beta$ -lactamase の影響について検討した。CMZ 前投与した CZX 投与群では、pouch 内の *E. coli* TK-353 R は CZX 投与の約 4 時間後から再増殖し、他の CZX 投与群 (CPZ 前投与群および非前投与群) に比べ有意に生菌数が増加した。この時、pouch 内 CZX 濃度は、CMZ 前投与群において有意な低下を示した。一方、CBPZ 投与群ではいずれも (CMZ 前投与群、CPZ 前投与群、および非前投与群) 24 時間後まで殺菌的に作用し、pouch 内 CBPZ 濃度も各群において類似した持続的な推移を示した。二次感染惹起時には、CMZ 前投与群の pouch 内に 0.1 unit/ml の  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase: CEPase) 活性が検出されたが、CPZ 前投与群および非前投与群では pouch 内  $\beta$ -lactamase 活性は <0.02 unit/ml であった。したがって、CMZ 前投与群における CZX の pouch 内濃度および *E. coli* に対する殺菌力の低下は、pouch 内に残存した *E. cloacae* 由来 CEPase による CZX の不活化に基づくものと推定された。また、この時の CZX と CBPZ の相違は、*E. cloacae* 由来の CEPase に対する安定性の差に起因するものと思われた。以上の結果から、 $\beta$ -lactam 剤投与により一次感染菌から感染巣内に漏出残存した誘導  $\beta$ -lactamase は、一次感染菌が感染巣内より減少あるいは消失した後も長時間にわたって二次感染菌に対する  $\beta$ -lactam 剤の治療効果に影響をおよぼす可能性が示唆された。

**Key words:** 感染巣内残存  $\beta$ -lactamase, 二次感染モデル, ラット pouch 内感染,  $\beta$ -lactamase 誘導

$\beta$ -lactamase は各種の細菌が産生する酵素であり、 $\beta$ -lactam 環を加水分解することによって  $\beta$ -lactam 剤を不活化し、 $\beta$ -lactam 剤に対する細菌の耐性化の主たる要因となっている。さらに、*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii* 等の各種グラム陰性菌においては  $\beta$ -lactamase が誘導産生されることが知られており<sup>1-5)</sup>、これらの菌に  $\beta$ -lactam 剤が接触すると菌体の  $\beta$ -lactamase 産生が著しく増大する。この際、用いる  $\beta$ -lactam 剤の種類によって、誘導される  $\beta$ -lactamase の量に大きな差のあることが知られている<sup>6,7)</sup>。さらに、誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌

においては、 $\beta$ -lactamase 誘導能の高い薬剤と他の  $\beta$ -lactam 剤との同時併用で強い拮抗作用が認められること<sup>8,9)</sup>、あるいは  $\beta$ -lactamase を構成的に産生する脱抑制型の耐性変異株が容易に選択され、しかもこの変異株は広範な  $\beta$ -lactam 剤に耐性を示すという報告<sup>10,11)</sup>等から、誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌による感染症の治療には様々な配慮が必要と考えられる。

ところで、薬剤により菌体が大量に  $\beta$ -lactamase を誘導産生しても、薬剤の消失に伴って菌体内の誘導  $\beta$ -lactamase 産生レベルは速やかに低下することから、 $\beta$ -lactamase 誘導が一時的な現象であり、2 つの  $\beta$ -lactam 剤の投与間隔が十分に長ければ一次投与薬剤によって  $\beta$ -

\* 富山県富山市下奥井 2-4-1

lactamase が誘導されても二次投与  $\beta$ -lactam 剤の治療には影響をおよぼさないであろうという報告がある<sup>12)</sup>。しかしながら、菌体の産生する  $\beta$ -lactamase レベルが低下しても、すでに誘導産生された  $\beta$ -lactamase が感染巣内で安定に存在すれば、投与間隔が長くても治療に影響をおよぼす可能性が考えられる。

さきに我々は、*E. cloacae* から誘導産生された cephalosporinase (CEPase) が、薬剤処理によって菌体内から容易に放出されて各種体液中 (ラットの血清、尿、浸出液中など) で安定に存在することを報告した<sup>13)</sup>。また、*S. marcescens* においても、 $\beta$ -lactamase 誘導能の高い薬剤によって誘導産生された CEPase は菌体内から容易に放出されて感染部位 (ラット pouch 内) に残存すること、さらに、感染 24 時間後に二次投与された  $\beta$ -lactam 剤の感染巣内濃度を低下させることを報告した<sup>14)</sup>。

今回、残存した誘導型  $\beta$ -lactamase の影響をさらに調べるため、ラット pouch 内に誘導型 CEPase 産生菌の *E. cloacae* を感染させ、 $\beta$ -lactamase 誘導能の高い薬剤 (CMZ) と低い薬剤 (CPZ) を先行投与した後、tosufloxacin (TFLX) によって *E. cloacae* を持続的に減少せしめ、pouch 内に菌体から漏出した誘導型  $\beta$ -lactamase が残存するようにした。そして *E. cloacae* の感染から 4 日目に、*Escherichia coli* TK-353 R を pouch 内に二次感染させた後、ceftizoxime (CZX), cefbuperazone (CBPZ) を投与し、pouch 内に残存する誘導型  $\beta$ -lactamase の二次感染治療におよぼす影響について検討したので報告する。

## I. 実験材料および方法

### 1. 使用菌株

当研究所保存の臨床分離株の中から、誘導的に cephalosporinase (CEPase) を産生する *Enterobacter cloacae* H-27 を一次感染菌として用いた。さらに、二次感染菌として、Pouch 内に低濃度の tosufloxacin (TFLX) が残存した場合を考慮し、比較的 TFLX に対する感受性が低い *Escherichia coli* TK-353 R を使用した。なお、*E. coli* TK-353 R は、*E. cloacae* H-27 株との識別のため、当研究所保存の臨床分離株 *E.*

*coli* TK-353 を用いて rifampicin (RFP) 100  $\mu$ g/ml を含むプレートから選択した spontaneous な RFP 耐性変異株で、TEM 型 penicillinase (PCase) を産生する。使用した菌の最小発育阻止濃度 (MIC) は、日本化学療法学会標準法<sup>16)</sup> に準じた寒天平板希釈法で測定し、Table 1 に示した。

### 2. 使用薬剤

Cefoperazone (CPZ, 富山化学工業), cefmetazole (CMZ, 三共), tosufloxacin (TFLX, 富山化学工業), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業), cefbuperazone (CBPZ, 富山化学工業) を用いた。また、*E. coli* TK-353 R の分離に rifampicin (RFP, 第一製薬) を、酵素活性測定の前質として cephaloridine (CER, 日本グラクソ), Ki 値測定の前質として cephalothin (CET, 塩野義製薬) を使用した。

### 3. 浸出性無菌炎症 pouch の作成

Selye の方法<sup>16)</sup> に準じた。すなわち、wistar 系雄性ラット (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。

### 4. Pouch 内感染実験

*E. cloacae* H-27 を Heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板に 37°C, 18~20 時間培養後、生理食塩水に懸濁し、さらにこの懸濁液 1 容を 20% gastric mucin (半井化学薬品) 9 容に加えて約  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように調整し、その 2 ml をラット pouch 内に接種した。菌接種の 2 および 5 時間後に、CPZ または CMZ を各々 100 mg/kg 2 回筋肉内 (i.m.) 投与した。なお、感染後に CPZ, CMZ を投与しないものを非前投与群 (non-pretreated group) とした。さらに、感染 8 時間後これら 3 群に、0.5% methyl cellulose (MC, 和光純薬) に懸濁した TFLX の 200 mg/kg を経口 (p.o.) 投与した。

*E. cloacae* の感染から 96 時間後 (4 日目) に、非前投与 (non-pretreated) 群, CPZ 前投与 (CPZ-

Table 1. Susceptibility of *Enterobacter cloacae* H-27 and *Escherichia coli* TK-353 R  
Inoculum size:  $10^6$  cfu/ml

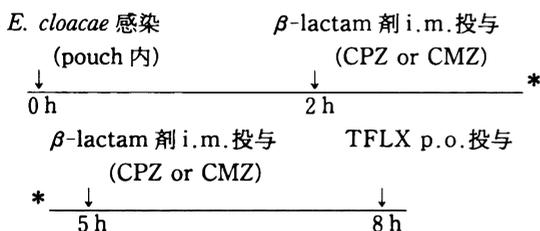
Strain	MICs ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>					
	cefoperazone	cefmetazole	ceftizoxime	cefbuperazone	tosufloxacin	rifampicin
<i>E. cloacae</i> H-27	0.39	25	0.78	3.13	0.0125	12.5
<i>E. coli</i> TK-353 R	1.56	0.78	0.025	0.05	0.39	>400

<sup>a</sup> Agar plate dilution method.

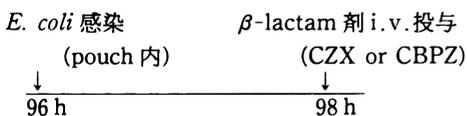
pretreated) 群, および CMZ 前投与 (CMZ pretreated) 群の pouch 内に *E. coli* TK-353 R を二次感染させた。*E. coli* TK-353 R は, HIA 平板上 37°C, 18~20 時間培養後生理食塩水に懸濁し, さらにこの懸濁液 1 容を 20% gastric mucin 9 容に加えて約  $5 \times 10^6$  cells/ml となるように調整し, その 1 ml をラット pouch 内に接種した。二次感染から 2 時間後に CZX あるいは CBPZ をそれぞれ上記 3 群に 100 mg/kg 静脈内 (i.v.) 投与し, 経時的に pouch 内浸出液を採取した。実験スケジュールを下に示す。また, pouch 内生菌数測定のため, pouch 内浸出液採取後ただちに生理食塩水で 100 倍に希釈し, その 10 倍希釈系列を生理食塩水で作製し, 薬剤を含まない HIA 平板および RFP (100  $\mu$ g/ml) を含有する HIA 平板上に 0.05 ml を塗布した。この平板を 37°C で一夜培養後生じたコロニー数から, pouch 内生菌数を算出した。なお, 非前投与群, CPZ 前投与群, および CMZ 前投与群の 3 群に *E. coli* TK-353 R を二次感染後 CZX, CBPZ を投与しない対照群についても生菌数を調べた。

#### 実験スケジュール

1 日目:



4 日目:



#### 5. $\beta$ -lactamase 活性測定法

$\beta$ -lactamase 活性の測定は, CER 100  $\mu$ M を基質とする UV 法<sup>17)</sup>で行った。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  $\mu$ 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  $\beta$ -lactam 環の開裂に伴う OD 変化を 260 nm で測定した。 $\beta$ -lactamase 活性は unit で表し, 1 unit は 37°C, 0.05 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) 中で 1 分間に 1  $\mu$ mol の基質を分解するのに必要な酵素量をもって示した。なお, pouch 内  $\beta$ -lactamase 活性測定のため, 採取した pouch 内浸出液を 4°C, 1,000 $\times$ g, 30 分間遠心分離し, 上清を

ミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) を用いて濾過した。この無菌濾液の  $\beta$ -lactamase 活性を UV 法で求め, unit/ml で示した。

*E. cloacae* H-27 由来  $\beta$ -lactamase に対する各薬剤の Km および Ki 値は, Lineweaver-Burk の式より求めた。なお, Ki 値は, CET を基質として測定した。

#### 6. 薬剤濃度測定法

CZX および CPZ については *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を<sup>18,19)</sup>, CBPZ は *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 を<sup>20)</sup>, TFLX については *E. coli* Kp を<sup>21)</sup> 検定菌とするペーパーディスク法で, それぞれ濃度を測定した。

薬剤濃度測定のための pouch 内浸出液は, 浸出液中の  $\beta$ -lactamase を失活させるため, 採取後ただちに同量の冷メタノールを加えて混合した後, 遠心分離 (4°C, 1,000 $\times$ g, 10 分) し, 上清中の薬剤濃度を測定した。

検量線は, プールした薬剤非含有 pouch 内浸出液を用いて 50  $\mu$ g/ml から (TFLX は 10  $\mu$ g/ml から) の 2 倍希釈系列で作製し, これに同量の冷メタノールを加えて混合した後, 遠心分離 (4°C, 1,000 $\times$ g, 10 分) して得られた上清を用いた。なお, 平板にディスクをはり付ける前に 37°C のフラン器中で 30 分間放置してメタノールを揮発させ, メタノールが薬剤濃度測定に影響しないようにした。

## II. 結 果

### 1) Pouch 内生菌数の変化

ラット pouch 内に誘導型 CEPase 産生菌の *E. cloacae* H-27 を感染させ, その 2 および 5 時間後に CPZ あるいは CMZ を投与した。この CPZ 前投与 (CPZ-pretreated) 群, CMZ 前投与 (CMZ-pretreated) 群および非前投与 (non-pretreated) 群のそれぞれに, 感染 8 時間後 TFLX を投与し pouch 内から持続的に菌を減少させ, 感染 4 日目には *E. cloacae* の pouch 内生菌数はいずれの群においても  $< 1 \times 10^4$  cells/ml となった。*E. cloacae* 感染から 96 時間後 (4 日目) に *E. coli* TK-353 R を pouch 内に二次感染させ, その 2 時間後に CZX あるいは CBPZ を静脈内投与した時の *E. coli* TK-353 R の pouch 内生菌数の変化を, Fig. 1 の a および b に示す。なお, 感染 96 時間後の TFLX の pouch 内濃度はいずれも検出限界以下 ( $< 0.039 \mu$ g/ml) で, *E. coli* TK-353 R の増殖に影響をおよぼさなかった。また, *E. coli* TK-353 R の産生する PCase 活性は約  $1 \times 10^7$  cells/ml でも検出限界以下 ( $< 0.02$  unit/ml) を示し, CZX および

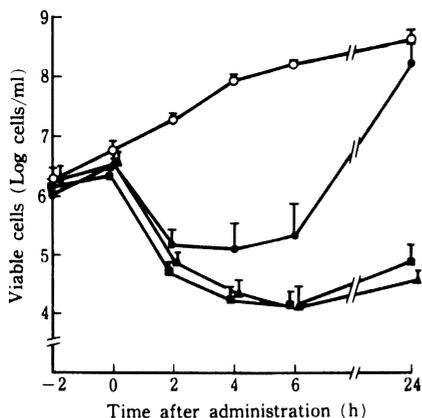


Fig. 1 a. Bactericidal activity of ceftizoxime in rat pouch against *Escherichia coli* TK-353 R. Ceftizoxime was intravenously administered to rats in a dose of 100 mg/kg at 2 h after infection. Each point with a bar shows the mean  $\pm$  standard error. ● cefmetazole - pretreated (n=8), ▲ cefoperazone-pretreated (n=9), ■ non-pretreated (n=7), ○ control (n=9).

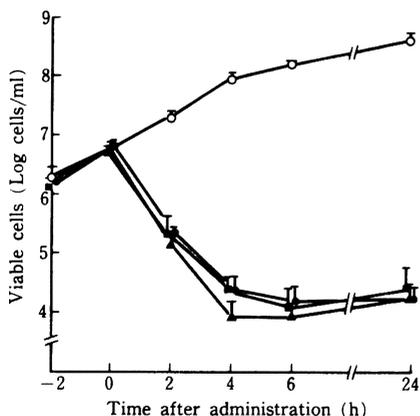


Fig. 1 b. Bactericidal activity of cefbuperazone in rat pouch against *Escherichia coli* TK-353 R. Cefbuperazone was intravenously administered to rats in a dose of 100 mg/kg at 2 h after infection. Each point with a bar shows the mean  $\pm$  standard error. ● cefmetazole - pretreated (n=7), ▲ cefoperazone - pretreated (n=8), ■ non-pretreated (n=5), ○ control (n=9).

CBPZ の本酵素に対する相対加水分解速度は CER を 100 とした場合に  $< 0.1$  であり、両剤共本酵素に安定であった。

CZX あるいは CBPZ を投与しない対照群の場合には、CPZ 前投与群、CMZ 前投与群、および非前投与群のいずれにおいても *E. coli* TK-353 R は良好な増殖を示し、菌接種 8 時間後に  $1.5 \times 10^8$  cells/ml に達した。そこで、この対照群を control としてまとめて Figs. 1 a, 1 b に示した。なお、*E. cloacae* の一次感染および薬剤前投与を行わないラット pouch においては、*E. coli* TK-353 R は Figs. 1 a, 1 b の control と類似した推移を示した。したがって、CPZ あるいは CMZ による前処置、さらに、わずかに残存した *E. cloacae* ( $< 1 \times 10^4$  cells/ml) は、*E. coli* TK-353 R の増殖に影響をおよぼさなかった。

CZX による *E. coli* TK-353 R の二次感染治療においては、CZX 投与直後にはいずれも速やかに生菌数が低下したが、CMZ 前投与群では CZX 投与 4 時間後に  $1.2 \times 10^6$  cells/ml を示した後再増殖し、24 時間後には  $1.5 \times 10^6$  cells/ml に達した。一方、CPZ 前投与群、および非前投与群では両群共殺菌的に作用し、CZX 投与 6 時間後の生菌数は  $1.4 \times 10^4$  cells/ml まで低下し、24 時間後でも  $3.7 \sim 7.6 \times 10^4$  cells/ml であり、CPZ 前投与群、および非前投与群における CZX の殺菌力は CMZ 前投与群に比べ優れていた (Fig. 1 a)。

CBPZ による *E. coli* TK-353 R の二次感染治療においては、CPZ 前投与群、CMZ 前投与群、および非前投与群のいずれもほぼ同様に殺菌的に作用し、CBPZ 投与 6 時間後の生菌数は  $8.3 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^4$  cells/ml、さらに 24 時間後には  $1.7 \sim 2.4 \times 10^4$  cells/ml であった (Fig. 1 b)。

なお、いずれの場合においても、RFP plate と HIA plate とではほぼ一致した生菌数を示した。

## 2) Pouch 内薬剤濃度

Pouch 内に *E. coli* TK-353 R を二次感染させたラットに、CZX あるいは CBPZ の 100 mg/kg を静脈内投与した時の pouch 内 CZX および CBPZ 濃度をそれぞれ Fig. 2 の a および b に示す。

CZX の pouch 内濃度は、CMZ 前投与群では、CPZ 前投与群、および非前投与群に比べ速やかに消失し、投与 4 時間後には 5 例中 3 例が検出限界以下 ( $< 0.78 \mu\text{g/ml}$ ) であり、投与 6 時間後には全例検出限界以下となった (Fig. 2 a)。一方、CBPZ の pouch 内濃度は、CPZ 前投与群、CMZ 前投与群、および非前投与群のいずれもほぼ同様に持続的な推移を示した (Fig. 2 b)。

なお、*E. cloacae* H-27 感染 24 時間後の pouch 内 CMZ、CPZ 濃度はいずれも検出限界以下 ( $< 0.78$

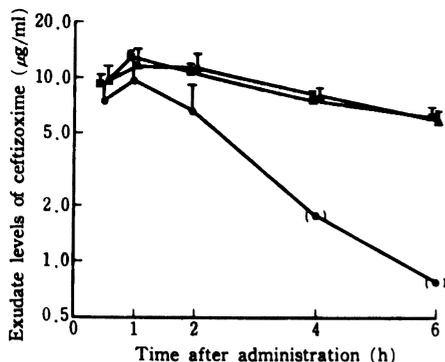


Fig. 2 a. Exudate levels of ceftizoxime in rat pouch infected with *Escherichia coli* TK-353 R. Cefprozime was intravenously administered to rats in a dose of 100 mg/kg at 2 h postinfection. Each point with a bar shows the mean  $\pm$  standard error. The value in the parenthesis indicates the tentative mean, in which the detectable limit was tentatively used for the calculation if the value below the detection limit (0.78  $\mu$ g/ml) exists. ● cefmetazole - pretreated (n=5), ▲ cefoperazone-pretreated (n=5), ■ non-pretreated (n=5).

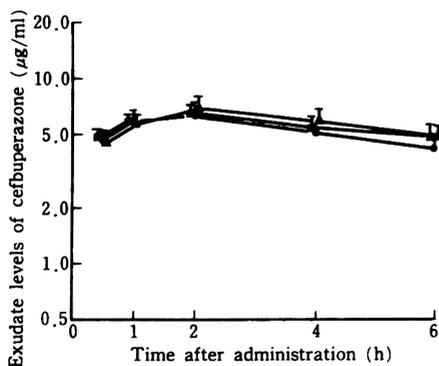


Fig. 2 b. Exudate levels of cefbuperazone in rat pouch infected with *Escherichia coli* TK-353 R. Cefbuperazone was intravenously administered to rats in a dose of 100 mg/kg at 2 h postinfection. Each point with a bar shows the mean  $\pm$  standard error. ● cefmetazole - pretreated (n=5), ▲ cefoperazone-pretreated (n=5), ■ non-pretreated (n=5).

$\mu$ g/ml) であり, TFLX の pouch 内濃度は感染 24, 48, 72, 96 時間後にそれぞれ約 0.31, 0.15, < 0.08, < 0.039  $\mu$ g/ml であった。

Table 2. Cephalosporinase activity in rat pouch infected with *Enterobacter cloacae* H-27

Group pretreated with	Cephalosporinase activity (unit/ml) at following times after infection	
	24 h	96 h
Cefmetazole	0.19 $\pm$ 0.03*	0.10 $\pm$ 0.02
Cefoperazone	< 0.02	< 0.02
None	< 0.02	< 0.02

The rats were intramuscularly treated twice with 100 mg/kg of each drug at 2 and 5 h postinfection, and tosfloxacin was administered to all the rats with a dose of 200 mg/kg (p.o.) at 8 h postinfection.

\* Each value is expressed as the mean  $\pm$  standard error for four animals.

### 3) Pouch 内 CEPase 活性

ラット pouch 内に *E. cloacae* H-27 を感染させ, CPZ あるいは CMZ を投与し, さらに TFLX を投与した時の pouch 内 CEPase 活性を Table 2 に示す。

非前投与群, CPZ 投与群では pouch 内 CEPase 活性の上昇は認められず, いずれも検出限界以下 (< 0.02 unit/ml) であった。一方, CMZ 投与後では pouch 内 CEPase 活性が上昇し, *E. cloacae* H-27 の感染 24 時間後には 0.19 unit/ml, 二次感染直前の感染 96 時間後においても 0.10 unit/ml の活性が認められた。また, pouch 内浸出液の遠心上清の無菌ろ過液中には上記のような活性が認められたが, 遠心分離後の沈澱を採取時と同量の 0.05 M PB に懸濁し超音波破碎後に得られた遠心上清については CEPase 活性はいずれも検出限界以下 (< 0.02 unit/ml) であった。なお, 感染 24 時間後の *E. cloacae* H-27 の pouch 内生菌数は  $< 1 \times 10^6$  cells/ml, 96 時間後では  $< 1 \times 10^4$  cells/ml であり, 感染 5 日目まで再増殖を示さなかった。また, *E. cloacae* H-27 の産生する CEPase 活性は, 非誘導時には菌数が  $1 \times 10^8$  cells/ml であっても検出限界以下 (< 0.02 unit/ml) であった。

### 4) *E. cloacae* H-27 由来 CEPase による加水分解の Kinetics

*E. cloacae* H-27 由来の精製  $\beta$ -lactamase を用いて, 最大反応速度  $V_{max}$ , および CZX, CBPZ の  $K_i$  値を調べた。CZX および CBPZ の  $K_i$  値はそれぞれ 0.30 および 0.16  $\mu$ M であり, *E. cloacae* H-27 由来の  $\beta$ -lactamase に対する親和性に大きな差は見られなかった。 $V_{max}$  は, CZX では 0.03, CBPZ では < 0.003 であり, 本酵素に対して CBPZ は CZX よりも

Table 3. Kinetic parameters of hydrolysis of cepheids by  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* H-27

Substrate	Ki ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	V <sub>max</sub> <sup>b</sup>
Ceftizoxime	0.30	0.03
Cefbuperazone	0.16	<0.003
Cephaloridine	(250) <sup>c</sup>	100

The specific activity of the purified enzyme was 25 unit/mg of protein when cephaloridine (100  $\mu$ M) was used as a substrate.

<sup>a</sup> Ki values were determined with cephalothin as a substrate by Lineweaver-Burk plots and hydrolysis was measured by a spectrophotometric method.

<sup>b</sup> Relative values when the V<sub>max</sub> of cephaloridine was taken as 100.

<sup>c</sup> Km value

10倍以上安定であった (Table 3)。

### III. 考 察

誘導産生された  $\beta$ -lactamase が長時間感染巣内に残存したモデルを作成し、二次感染時の  $\beta$ -lactam 剤治療におよぼす影響について検討を行った。

ラット pouch 内に比較的高菌量 (約  $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  cells/ml) の誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌の *E. cloacae* H-27 を感染させたため、 $\beta$ -lactam 剤の CPZ あるいは CMZ の 100 mg/kg i.m. 2 回投与では pouch 内から菌を消失させることができなかったが、TFLX の 200 mg/kg p.o. 投与で感染 96 時間後には  $< 1.0 \times 10^4$  cells/ml に減少させることができ、しかも誘導産生された  $\beta$ -lactamase が残存している状態を作成することができた。このような状態の pouch に *E. coli* TK-353 R を二次感染させ、CZX あるいは CBPZ を投与した時の *E. coli* TK-353 R の pouch 内生菌数変化および pouch 内薬剤濃度推移を調べた。その結果、CMZ 前投与群の CZX 投与時には、CPZ 前投与群や非前投与群に比べ pouch 内での殺菌力および濃度の低下が認められた。このような殺菌力や濃度の低下が CMZ 前投与した CZX 投与群のみで認められたことや *E. cloacae* の pouch 内生菌数がわずかであったことから、これは CZX と CBPZ の CEPase 誘導能の差によるものではないと考えられる。また、CPZ 前投与群や非前投与群においては pouch 内に残存する CEPase 活性がいずれも  $< 0.02$  unit/ml と低値であったのに対し、CMZ 前投与群では *E. cloacae* の感染 96 時間後においても 0.1 unit/ml と高値を示した。Table 3 に示した Kinetic parameters に基づいて計算すると、この 0.1 unit/ml の CEPase 活性に

より pouch 内 CZX 濃度に匹敵する 10  $\mu$ g/ml の CZX をすべて加水分解するには約 4 時間を要することになり、実験成績とほぼ一致していた。したがって、このような CZX の pouch 内濃度および殺菌性の低下は、前投与された CMZ により *E. cloacae* から誘導産生された CEPase が、菌体外に漏出して pouch 内に残存し、CZX を加水分解したことによるものと考えられる。すなわち、残存した誘導型  $\beta$ -lactamase の影響が、4 日間という長時間にわたって持続し、しかも二次投与  $\beta$ -lactam 剤の感染巣内濃度のみならず殺菌力にも影響をおよぼすことが明らかにされた。一方、CPZ は  $\beta$ -lactamase 誘導能が低い (1,3,6-7,12,22)、CZX の pouch 内殺菌力および濃度は、CPZ 前投与によって影響を受けなかったものと思われる。

$\beta$ -lactamase 誘導に基づく 2 種の  $\beta$ -lactam 剤間の *in vivo* antagonism については我々の報告以外にも若干の報告<sup>22-26)</sup>があり、これらは主にマウス実験感染において同時併用あるいは短い投与間隔で行われた成績である。今回の我々の成績は、4 日間という長い投与間隔であっても 2 種の  $\beta$ -lactam 剤間に  $\beta$ -lactamase 誘導に基づく *in vivo* antagonism の起こりうることを示すものである。さらに、ヒトにおける  $\beta$ -lactamase 誘導について、中浜ら<sup>26)</sup>は *Pseudomonas aeruginosa* 感染患者の喀痰において CMZ 投与により  $\beta$ -lactamase 活性が上昇残存することを報告しており、誘導  $\beta$ -lactamase による二次投与薬剤の不活化が実際の臨床場においても起こりうることを示唆されている。したがって、CMZ を含む  $\beta$ -lactamase 誘導能の高い薬剤が一次投与された場合に多量の誘導  $\beta$ -lactamase が残存することによる影響が考えられるので、二次投与薬剤の選択には十分に注意が必要であろう。特に、 $\beta$ -lactamase に不安定な薬剤の二次投与には、投与間隔を考慮するべきであろう。ところで、誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌では  $\beta$ -lactam 剤による derepressed mutants の選択が治療に影響することも問題となっている<sup>10,11,27)</sup>。しかしながら、今回の実験においては、TFLX 投与により誘導型  $\beta$ -lactamase 産生菌の残存がきわめて少なくなっている ( $< 1.0 \times 10^4$  cells/ml) こと、CMZ 前投与群の無菌汚過した pouch 内浸出液のみから CEPase 活性が認められたこと等から考えて、derepressed mutants の選択による影響は認められないものと思われるが、詳細については今後の検討が必要であろう。

一方、CBPZ 投与群では CZX 投与群と異なり、CMZ、CPZ 前投与群共に残存した誘導型  $\beta$ -lactamase による影響が認められなかった。これは、

Table 3 に示したように、CBPZ の本酵素に対する安定性が CZX よりも優れているためと考えられた。したがって、誘導  $\beta$ -lactamase 残存時でも、それに対する安定性がより優れた  $\beta$ -lactam 剤であれば二次投与されても残存  $\beta$ -lactamase による影響は少ないものと考えられる。

以上、感染巣内の残存誘導型  $\beta$ -lactamase は、二次感染治療時の  $\beta$ -lactam 剤の治療効果に影響をおよぼす可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S: Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 382~385, 1980
- 2) Saino Y, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN 12873. Antimicrob Agents Chemother 25: 362~365, 1984
- 3) Yotsuji A, Minami S, Araki Y, Inoue M, Mitsuhashi S: Inducer activity of  $\beta$ -lactam antibiotics for the  $\beta$ -lactamase of *Proteus rettgeri* and *Proteus vulgaris*. J Antibiotics 35: 1590~1593, 1982
- 4) Stobberingh E E: Induction of chromosomal  $\beta$ -lactamases by different concentrations of clavulanic acid in combination with ticarcillin. J Antimicrob Chemother 21: 9~16, 1988
- 5) Sanders C C, Sanders Jr. W E: Type I  $\beta$ -lactamase of gram negative bacteria: Interaction with  $\beta$ -lactam antibiotics. J Infect Dis 154: 792~800, 1986
- 6) 南 新三郎: *Enterobacter cloacae* における  $\beta$ -lactamase 誘導と  $\beta$ -ラクタム剤耐性。北関東医学 36 (1): 59~70, 1986
- 7) 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  $\beta$ -lactam 剤の抗菌作用, 第一報 Chephem 系薬剤の抗菌活性と  $\beta$ -lactamase 誘導。Chemotherapy 31: 909~915, 1983
- 8) Sanders C C, Sanders Jr. W E, Goering R V: *In vitro* antagonism of  $\beta$ -lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob Agents Chemother 21: 968~975, 1982
- 9) 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
- 10) Sanders C C, Sanders Jr. W E: Microbial resistance to newer generation  $\beta$ -lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. J Infect Dis 151: 399~406, 1985
- 11) Robert H K E, Sharon M S, Charles E C: *In vitro* emergence of  $\beta$ -lactam-resistant variants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 17: 717~723, 1986
- 12) Okonogi K, Sugiura A, Kuno M, Higashide E, Kondo M, Imada A: Effect of  $\beta$ -lactamase induction on susceptibility to cephalosporins in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother 16: 31~42, 1985
- 13) 荒木春美, 南 新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇: *Enterobacter cloacae* の菌体外  $\beta$ -lactamase とその安定性。Chemotherapy 36: 725~731, 1988
- 14) Araki H, Minami S, Watanabe Y, Yasuda T: Significance of inducible cephalosporinase remaining in the experimentally infected rat granuloma pouch after  $\beta$ -lactam therapy. Antimicrob Agents Chemother 35: 1131~1136, 1991
- 15) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 16) Selye H: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. Proc Soc Exp Biol Med 82: 328~333, 1953
- 17) Waley S G: A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. Biochem J 139: 780~781, 1974
- 18) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 渡辺泰雄, 清水喜八郎: Cefoperazone (T-1551) の体液内濃度測定法について。Chemotherapy 28 (S-6): 157~162, 1980
- 19) 村川武雄, 坂本 博, 深田志計実, 中本昭治, 広瀬俊治, 伊藤位一, 西田 実: Ceftizoxime (CZX) の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 28 (S-5): 111~118, 1980
- 20) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 荒木春美, 松永清美, 中島博美: T-1982 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 30 (S-3): 139~144, 1982
- 21) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南 新三郎, 熊野克彦, 恒田礼子, 金山淳子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 36 (S-9): 137~142, 1988
- 22) 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
- 23) 平井裕一:  $\beta$ -lactam 抗生剤間の拮抗現象と  $\beta$ -lactamase 誘導の関連。弘前医学 38: 405~418, 1986
- 24) 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

- 25) 小川正俊, 宮崎修一, 五島遊智子: 抗菌薬併用に関する実験的研究—実験的緑膿菌感染における併用効果と投与方法—. *Chemotherapy* 34: 232~239, 1986
- 26) 中浜 力, 黒川幸徳, 上田 智, 副島林造, 山田真理恵, 荒木春美, 南 新三郎, 渡辺泰雄, 保田隆, 才川 勇: 喀痰中誘導型  $\beta$ -lactamase の測定—特に緑膿菌感染症における臨床的検討—. *感染症学雑誌* 63: 400~409, 1989
- 27) Aronoff S C, Shlaes D M: Factors that influence the evolution of  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase inducible strains of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 155: 936~941, 1987

## INFLUENCE OF INDUCIBLE $\beta$ -LACTAMASE REMAINING AT INFECTION SITE AFTER $\beta$ -LACTAM THERAPY: STUDIES ON THE MODEL OF SECONDARILY INFECTED RAT GRANULOMA POUCH

Harumi Araki, Shinzaburou Minami, Yasuo Watanabe and Takashi Yasuda

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

Rat granuloma pouches were infected with *Enterobacter cloacae* H-27 possessing an inducible  $\beta$ -lactamase, and then cefmetazole (CMZ), a good inducer of  $\beta$ -lactamase or cefoperazone (CPZ), a poor one, was administered to the rats. Subsequently, tosufloxacin (TFLX) was administered to the rats in order to reduce the number of the surviving cells in the pouches. At four days postinfection, the pouches were secondarily infected with *Escherichia coli* TK-353 R, and we studied the influence of the  $\beta$ -lactamase remaining in the pouches on the antibacterial effect of ceftizoxime (CZX) or cefbuperazone (CBPZ). When CZX was administered to the CMZ-pretreated group, the number of *E. coli* TK-353 R began to regrow at 4 h after the administration of CZX, and increased significantly in comparison with those in the other CZX-treated groups (CPZ-pretreated and control groups). At this time, the pouch exudate levels of CZX in the CMZ-pretreated group were lower than those in the CPZ-pretreated and the control groups. On the other hand, CBPZ showed bactericidal action till 24 h after the administration and the pouch exudate levels of CBPZ were similar in any groups (CMZ-pretreated, CPZ-pretreated, and control groups). The  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase: CEPase) activity detected in pouch exudate was 0.1 unit/ml in the CMZ-pretreated group directly before the pouches were secondarily infected, while the  $\beta$ -lactamase activity was  $<0.02$  unit/ml in the CPZ-pretreated and the control groups. Therefore, the decline in the exudate levels and the bactericidal effect of CZX in the CMZ-pretreated group seemed to be due to the inactivation of CZX by the CEPase from *E. cloacae* remaining in the pouches. Further, CBPZ seemed to be uninfluenced by the CEPase from *E. cloacae*, because CBPZ was more stable against this enzyme than CZX. We suggest, in conclusion, that the inducibly produced  $\beta$ -lactamase, which leaked from previously infected bacterial cells due to  $\beta$ -lactam-treatment and remained at the infection site long after the disappearance of previously infected  $\beta$ -lactamase-producing bacteria, will influence the effect of  $\beta$ -lactam therapy on the second infection.