

## $\beta$ -ラクタム剤による緑膿菌の $\beta$ -lactamase 誘導と薬剤感受性

田村 忍・長岐為一郎・福田 一郎

日本グラクソ㈱開発本部開発研究センター\*

(平成5年3月4日受付・平成5年5月6日受理)

臨床分離緑膿菌13株に対する ceftazidime (CAZ), cefoperazone (CPZ), cefsulodin (CFS), latamoxef (LMOX), aztreonam (AZT) および imipenem/cilastatin sodium (IPM) の  $\beta$ -lactamase 誘導能を検討した。各菌株を CAZ の感受性により3群に分類し比較した。その結果、IPM が各群ともにもっとも誘導能が強く CAZ 感受性株 (S群) では330倍、CAZ 中等度耐性株 (LR群) では165倍に  $\beta$ -lactamase 活性が増加した。しかし、CAZ, CPZ, CFS, LMOX, AZT ではS群, LR群においては強い誘導能は認められなかった。CAZ 高度耐性株 (HR群) では6薬剤ともに弱い酵素誘導能であった。また、IPM を誘導剤として使用し酵素誘導時の薬剤感受性を測定したところ、S群ではMICがCPZに対し18倍、CAZで12倍、CFSで8倍、LMOXで5倍、AZTで4倍それぞれ上昇した。また、 $\beta$ -lactamase 非誘導時およびIPMによる誘導時の酵素活性とCAZ, CPZ, CFS, LMOX, AZT に対するMICとの間に相関が認められた。

**Key words:**  $\beta$ -lactamase, 誘導能, 緑膿菌,  $\beta$ -ラクタム剤

緑膿菌は種々感染症の重要な起炎菌の1つであり、難治感染を引き起こすことが知られている。また、抗生剤に対し比較的容易に耐性を獲得し、特に  $\beta$ -lactamase による  $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性化は重要である<sup>1)</sup>。緑膿菌の  $\beta$ -lactamase のうち染色体性  $\beta$ -lactamase は誘導型で、ほとんどの菌株に存在しているため、 $\beta$ -ラクタム剤による治療により誘導されやすく耐性の主たる原因となっている<sup>2-5)</sup>。また、 $\beta$ -ラクタム剤により誘導能は異なり<sup>6)</sup>、誘導された  $\beta$ -lactamase 産生菌の薬剤感受性は変化すると報告されている<sup>4)</sup>。小林らは薬剤感受性測定時の前培養液に誘導剤を加えMICの変化を検討しているが、 $\beta$ -lactamase の増加に見合うほどMICは上昇していない<sup>9)</sup>。また、Tauskらはディスク拡散法によるIPMと他の  $\beta$ -ラクタム剤との間にみられる拮抗作用はIPMによって誘導される  $\beta$ -lactamase に起因すると報告している<sup>4)</sup>。そこで、我々は臨床分離緑膿菌を用い、IPMを含む  $\beta$ -ラクタム剤6剤の  $\beta$ -lactamase 誘導能を測定し、 $\beta$ -lactamase 誘導時の薬剤感受性の変化について検討した。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用菌株

1991年1月から3月に臨床材料より分離された緑膿菌13株を使用した。

#### 2. 使用薬剤

$\beta$ -lactamase 誘導能の検討には ceftazidime (CAZ; 日本グラクソ), cefoperazone (CPZ; 富山化学), cefsulodin (CFS; 武田薬品), latamoxef (LMOX; 塩野義製薬), aztreonam (AZT; エーザイ), imipenem/cilastatin sodium (IPM; 万有製薬) を用いた。また、 $\beta$ -lactamase の基質として cephaloridine (CER; 塩野義製薬) を用いた。

#### 3. 薬剤感受性の測定

日本化学療法学会標準法<sup>7)</sup>の寒天平板希釈法で測定した。 $\beta$ -lactamase 誘導時のMICの測定は以下の方法で行った。すなわち、上記の方法で作製した薬剤希釈系列に誘導剤としてIPM 0.2  $\mu$ g/ml を同時に加えた平板でMICを測定した。

#### 4. $\beta$ -lactamase の誘導および調製

各菌株の前培養液を普通液体培地に2%接種し、37°C、1時間振盪培養した。最終濃度1/4もしくは1/8 MICになるように薬剤を加え3時間振盪培養した。集菌、洗浄後超音波処理により菌体を破碎し、4°C 20,000 r.p.m. 1時間の遠心清液を酵素液とした。

#### 5. $\beta$ -lactamase 活性の測定

小林らの方法<sup>8)</sup>に従いU.V.法で測定した。すなわち、CERを基質とし30°Cにおける水解速度を260 nmの紫外外部吸収の変化によって求めた。 $\beta$ -lacta-

\* 茨城県つくば市和台43

mase 活性は、1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の CER を分解する酵素量を 1 単位とし Lowry 法<sup>9)</sup> によって求めた単位蛋白 (mg) 当りの比活性 (units/mg protein) で示した。

## II. 結 果

### 1. 薬剤感受性

被検菌株の CAZ, CPZ, CFS, LMOX, AZT, IPM に対する MIC を Table 1 に示した。各菌株を CAZ に対する感受性により 3 群に分類した。すなわち MIC が  $0.78 \sim 1.56$  の 5 株を感受性株 (S 群),  $6.25 \sim 12.5$  の 4 株を中等度耐性株 (LR 群),  $50 \sim >400$  の 4 株を高度耐性株 (HR 群) とした。各抗生剤の抗菌力についてみると、IPM は NG 12, NG 95, NG 51 の 3 株を除き MIC は 3.13 以下でもっとも優れていた。CPZ, CFS, LMOX, AZT に対する MIC は CAZ と同様にほぼ 3 群に分けることができ、5 薬剤の抗菌力の強さは  $CAZ \geq CFS > AZT \geq CPZ > LMOX$  の順に強い傾向を示した。

### 2. $\beta$ -lactamase 活性と MIC の相関

各菌株の  $\beta$ -lactamase 活性を Table 1 に示す。S 群の活性値は  $7.30 \times 10^{-4} \sim 3.60 \times 10^{-3}$  units/mg protein, LR 群は  $1.98 \times 10^{-3} \sim 2.67 \times 10^{-2}$ , HR 群は  $1.67 \times 10^{-1} \sim 1.47$  であった。それぞれの薬剤に対する MIC と酵素活性の相関を比較すると、CPZ, CFS,

LMOX および AZT の 4 剤はよく相関し ( $P < 0.001$ ), CAZ はそれに次ぐ ( $P < 0.02$ ) 相関を示した。それに対し IPM は酵素活性と MIC との間にまったく相関は認められなかった ( $P > 0.5$ )。

### 3. 各抗生剤による $\beta$ -lactamase の誘導

各抗生剤添加時の酵素活性を測定し酵素誘導能を Fig. 1 に示した。IPM が各群でもっとも誘導能が強く、S 群においては酵素活性は 331 倍に上昇した。しかし、他の 5 薬剤はほとんど誘導能が認められなかった。LR 群においても誘導能は IPM がもっとも強く 165 倍に上昇させ、次いで CAZ, CPZ が強く約 10 倍、CFS, AZT, LMOX は 2~4 倍であった。HR 群では各薬剤とも誘導能は認められたが大きな差はみられず 2~6 倍であった。

### 4. 酵素誘導時の MIC

IPM を誘導剤として使用し酵素誘導時の MIC を測定した。Table 2 に非誘導時および IPM 誘導時の各群の MIC の平均を、Fig. 2 には各菌株ごとの酵素活性と MIC の関係を示した。各抗生剤とも誘導による酵素活性の増加に伴い MIC も上昇した。特に、S 群において顕著であり、CPZ に対し 18 倍、CAZ では 12 倍、CFS では 8 倍、LMOX では 5 倍、AZT では 4 倍それぞれ MIC が上昇した。LR 群では CPZ で 6 倍、CAZ で 5 倍、CFS で 4 倍、AZT と LMOX で 2

Table 1.  $\beta$ -lactamase activity and susceptibility to  $\beta$ -lactams of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	$\beta$ -lactamase activity <sup>a</sup>	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>b</sup>						Group
		CAZ	CPZ	CFS	LMOX	AZT	IPM	
NG 2	$3.60 \times 10^{-3}$	0.78	3.13	1.56	12.5	3.13	0.78	S
NG 1	$1.08 \times 10^{-3}$	1.56	6.25	3.13	12.5	6.25	0.39	
NG 9	$7.30 \times 10^{-4}$	1.56	6.25	1.56	12.5	6.25	3.13	
NG 92	$1.37 \times 10^{-3}$	1.56	6.25	3.13	25	6.25	1.56	
NG 12	$2.53 \times 10^{-3}$	1.56	6.25	1.56	12.5	3.13	25	
NG 95	$1.98 \times 10^{-3}$	6.25	25	6.25	50	12.5	12.5	LR
NG 5	$5.82 \times 10^{-3}$	6.25	25	6.25	100	12.5	0.78	
NG 21	$1.03 \times 10^{-2}$	6.25	50	12.5	100	25	0.78	
NG 24	$2.67 \times 10^{-2}$	12.5	50	6.25	50	12.5	0.78	
NG 66	$1.67 \times 10^{-1}$	50	200	25	400	25	3.13	HR
NG 15	1.12	50	200	50	200	50	3.13	
NG 8	1.47	200	>400	>400	>400	200	1.56	
NG 51	1.16	>400	>400	>400	>400	50	25	

CAZ, ceftazidime; CPZ, cefoperazone; CFS, cefsulodin; LMOX, latamoxef; AZT, aztreonam; IPM, imipenem/cilastatin.

a: units/mg protein, b: Inoculum size:  $10^6$  CFU/ml.

S: CAZ-susceptible, LR: CAZ-low level resistant, HR: CAZ-high level resistant.

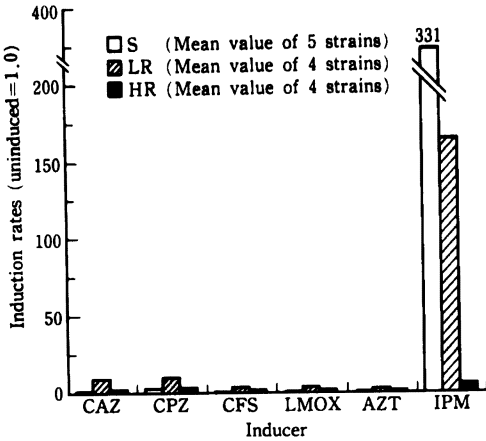
倍それぞれ MIC が上昇した。HR 群ではいずれの抗生剤に対しても 1~1.2 倍とほとんど変化がなかった。他の抗生剤を誘導剤とした場合はいずれの抗生剤に対しても顕著な MIC の上昇はなかった。酵素活性と各抗生剤に対する MIC の関係を統計学的処理したところ、LMOX (P<0.001), CPZ および CFS (P<0.01), AZT および CAZ (P<0.05) とそれぞれに差

はあるが相関関係を示した。

III. 考 察

グラム陰性菌の多くは染色体上に  $\beta$ -lactamase 遺伝子を持っており、そのほとんどは誘導型である。特に緑膿菌の  $\beta$ -lactamase は誘導されやすいことが報告されている<sup>2-4)</sup>。従来、緑膿菌はこの誘導型  $\beta$ -lactamase の産生、他のグラム陰性菌との膜の透過性の違い等により、 $\beta$ -ラクタム剤には低感受性であった。近年、 $\beta$ -lactamase に安定で、緑膿菌の膜透過性が改良されたセフェム剤、オキサセフェム剤、モノバクタム剤あるいはカルバペネム剤の開発により抗緑膿菌活性の強い  $\beta$ -ラクタム剤が常用されるようになった。それに伴いこれらの抗生剤に耐性を示す緑膿菌の臨床からの分離が増加している<sup>1)</sup>。これらの耐性機構としては、カルバペネム剤に対しては外膜の透過性の阻害<sup>10)</sup>、セフェム剤等に関しては  $\beta$ -lactamase の高度産生が主たる原因であると推測されている<sup>9)</sup>。我々は、臨床分離緑膿菌を用いこれらの抗生剤の  $\beta$ -lactamase 誘導能および酵素誘導時の薬剤感受性を測定し、耐性菌増加における抗生剤の関与について検討を行った。

小林らは緑膿菌を  $\beta$ -lactamase 活性により弱産生株、中等度産生株、構成的産生株の 3 群に分類し抗緑膿菌剤の酵素誘導能の違いについて報告している<sup>9)</sup>。我々の結果も同様に 3 群に分類することができた。S 群は IPM によって強く酵素誘導されたが、CAZ, CFS, LMOX, AZT ではほとんど誘導されなかった。LR 群では IPM のみならず他の 5 剤からも誘導を受



CAZ, ceftazidime; CPZ, cefoperazone; CFS, cefsulodin; LMOX, latamoxef; AZT, aztreonam; IPM, imipenem/cilastatin.

S: CAZ-susceptible, LR: CAZ-low level resistant, HR: CAZ-high level resistant

Fig. 1. Comparison of  $\beta$ -lactamase induction rates by CAZ, CPZ, CFS, LMOX, AZT and IPM.

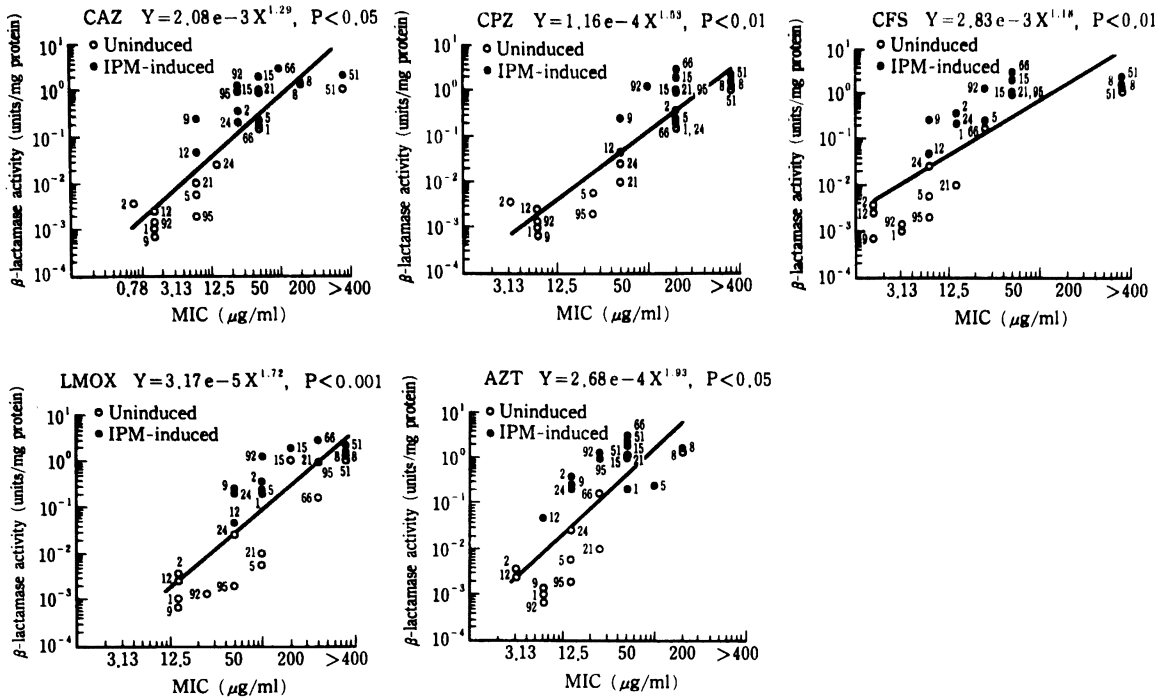
Table 2. Susceptibility to  $\beta$ -lactams with and without imipenem

Group	Mean MIC ( $\mu$ g/ml)									
	CAZ		CPZ		CFS		LMOX		AZT	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
S	1.36	16.5	5.45	100	2.06	16.5	14.4	75.8	4.74	16.5
	(12.1)		(18.3)		(8.0)		(5.3)		(3.5)	
LR	7.43	35.4	35.4	200	7.43	29.7	70.7	168	14.9	35.4
	(4.8)		(5.7)		(4.0)		(2.4)		(2.4)	
HR	140	170	400	400	170	200	480	480	60	70
	(1.2)		(1.0)		(1.2)		(1.0)		(1.2)	

CAZ, ceftazidime; CPZ, cefoperazone; CFS, cefsulodin; LMOX, latamoxef; AZT, aztreonam; IPM, imipenem/cilastatin.

A: without IPM, B: with IPM, B/A: relative rate of mean MIC.

S: CAZ-susceptible, LR: CAZ-low level resistant, HR: CAZ-high level resistant.



CAZ, ceftazidime; CPZ, cefoperazone; CFS, cefsulodin; LMOX, latamoxef; AZT, aztreonam; IPM, imipenem/cilastatin. The numbers beside the circles represent strain numbers.

Fig. 2. Relationship between  $\beta$ -lactamase activity and the MICs of CAZ, CPZ, CFS, LMOX and AZT.

け、HR 群はどの抗生剤においても誘導効果は強くは現れなかった。これは、元株がすでに  $\beta$ -lactamase を構成的に多量に産生しているために、さらに多くの酵素産生には限度があるためと考えられた。各抗生剤の誘導能については IPM の誘導能がもっとも強く、誘導後はいずれの菌株も酵素活性が高度耐性株のレベルに達していた。今回の実験結果からはカルバペネム系の IPM の誘導能の強さが示されたが、セフェム系、モノバクタム系、オキサセフェム系の誘導能の差は見いだされなかった。

$\beta$ -lactamase 誘導時の薬剤感受性について小林らは MIC 測定時の前培養液に誘導剤を加え測定している<sup>6)</sup>。我々も同様の方法で測定したが、 $\beta$ -lactamase 活性の増加に見合うような MIC の顕著な上昇はみられなかった。そこで MIC 測定時の薬剤含有平板中に誘導剤を共存させる方法をとったところ、IPM 以外の 5 剤に対する感受性は  $\beta$ -lactamase 活性の増加に伴い低下し、酵素活性とそれに対応する MIC 値には相関関係が認められた。今回実験に使用した薬剤はいずれも緑膿菌の  $\beta$ -lactamase には安定であると報告

されている。緑膿菌の IPM 以外の  $\beta$ -ラクタム剤耐性における  $\beta$ -lactamase の果たす役割について、Tauskらは  $\beta$ -lactamase による  $\beta$ -ラクタム剤の捕捉や高濃度の  $\beta$ -lactamase による少量の加水分解であろうと考察している<sup>4)</sup>。今回、相関が認められたことは耐性における  $\beta$ -lactamase の関与をより一層強く示唆するものである。また、一部高度耐性株において酵素活性のわりに MIC が高い株が存在した。これは、 $\beta$ -lactamase の他に PBP や膜の変化等他の要因が伴うことよりさらに高度耐性化しているものと考えられた。

緑膿菌感染症に対する化学療法については併用療法や使用薬剤の変更などが行われることがあるが、 $\beta$ -ラクタム剤どうしの併用あるいは変更においては酵素誘導による耐性獲得を考慮する必要があると考えられた。

#### 文 献

- 1) 横田 健: 臨床分離菌の  $\beta$ -lactamase 産生率と各種薬剤に対する感受性の検討. *Chemotherapy* 39: 941~952, 1991

- 2) 池田文昭, 高乗 仁, 西田 実, 五島遊智子, 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
- 3) 小林寅詔, 池田文昭, 西田 実, 五島遊智子, 手塚孝一, 草野朱美, 森 節子, 佐藤弓枝, 高橋かおる: 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。Chemotherapy 35: 71~76, 1987
- 4) Tausk F, Evans M E, Patterson L S, Federspiel C F, Stratton C W: Imipenem-induced resistance to antipseudomonal  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemotherapy 28: 41~45, 1985
- 5) 金坂明美: 新開発の抗生物質に対する耐性緑膿菌の  $\beta$ -lactamase。Chemotherapy 33: 528~535, 1985
- 6) 小林寅詔, 手塚孝一, 佐藤弓枝, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 金子康子, 西田 実, 五島遊智子: 抗緑膿菌用  $\beta$ -ラクタム剤による緑膿菌の  $\beta$ -lactamase 誘導と薬剤感受性について。Chemotherapy 37: 1453~1457, 1989
- 7) 日本化学療法学会, 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 8) 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
- 9) 代居敬子, 井上松久, 橋本 一: 臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性。Chemotherapy 38: 214~219, 1990
- 10) Buscher K, Cullmann W, Dick W, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 703~708, 1987

### Induction of *Pseudomonas aeruginosa* $\beta$ -lactamase by $\beta$ -lactam antibiotics, and drug susceptibility

Shinobu Tamura, Tameichiro Nagaki and Ichiro Fukuda

Preclinical Research Center, Development Division, Nippon Glaxo Ltd., Tsukuba Research Laboratories, 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan

We investigated the ability of six  $\beta$ -lactam antibiotics, ceftazidime (CAZ), cefoperazone (CPZ), cefsulodin (CFS), latamoxef (LMOX), aztreonam (AZT) and imipenem/cilastatin (IPM), to induce  $\beta$ -lactamase production in thirteen clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. We classified thirteen *P. aeruginosa* strains into three groups based on susceptibility to CAZ, and compared the six  $\beta$ -lactam antibiotics for rates of induction of  $\beta$ -lactamase. As a result, IPM was shown to have the highest inducing potential in the three strain groups. When induced by IPM,  $\beta$ -lactamase activity increased 330-fold in the CAZ-susceptible strains (S group), and 165-fold in the CAZ-low level resistant strains (LR group). However, neither CAZ, CPZ, CFS, LMOX nor AZT showed high inducing activities in the S or LR strain groups. In contrast, in the CAZ-high level resistant strains (HR group), all six  $\beta$ -lactam antibiotics showed low induction potential for  $\beta$ -lactamase. The MICs for strains in the S group measured after  $\beta$ -lactamase induction by IPM increased 18 times for CPZ, 12 times for CAZ, 8 times for CFS, 5 times for LMOX, 4 times for AZT. Uninduced and IPM-induced  $\beta$ -lactamase activities correlated with the MICs of CAZ, CPZ, CFS, LMOX and AZT, respectively.