

# 同一病棟より継続的に分離されたプラスミド性 Class B $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌に関する研究

南 新三郎<sup>1)</sup>・赤間 美穂<sup>2)</sup>・伊予部志津子<sup>3)</sup>・三橋 進<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 富山化学工業株式会社総合研究所\*

<sup>2)</sup> 富山市民病院中央検査室

<sup>3)</sup> 群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

<sup>4)</sup> エビゾーム研究所

(平成7年9月14日受付・平成8年1月25日受理)

1988年10月から1992年1月の約3年の間に imipenem (IPM) 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌9株が、富山市民病院の脳外科病棟に入院中の異なる9名の患者から分離された。9株中6株が分離された1991年に、この脳外科病棟における抗緑膿菌性  $\beta$ -lactam 剤 (特に IPM) の使用量が急増していた。IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生株は IPM に低度 (MIC=6.25  $\mu$ g/ml) から高度耐性 (MIC=100  $\mu$ g/ml) で、ceftazidime, cefsulodin 等の抗緑膿菌性セフェムにはすべて高度耐性であった。また、9株中4株は piperacillin (PIPC) に、また5株は aztreonam (AZT) に感受性であった。IPM 分解性  $\beta$ -lactamase は分子量 28,000, 等電点 9.5, 亜鉛要求性でいわゆる class B に属する基質特異性の広い酵素であった。 $\beta$ -lactamase 産生遺伝子は伝達性のプラスミド上にコードされており、産生様式は構成型であった。緑膿菌への伝達株では IPM 低度耐性、およびセフェム高度耐性は発現したが、IPM 高度耐性、PIPC および AZT 耐性は発現しなかった。また、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生遺伝子を大腸菌にクローニングした結果、大腸菌においても緑膿菌伝達株の場合と同様の耐性が発現した。実験的変異株、耐性伝達試験、 $\beta$ -lactamase 産生および外膜蛋白を調べた結果、IPM 高度耐性は外膜蛋白 D 2 欠損に IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生が加わったことにもとづくこと、PIPC および AZT 耐性は IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生とは関連せず、染色体性 cephalosporinase の脱抑制型産生にもとづくことが明らかとなった。IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌の血清型はすべて B 型であったが、9株中3株のみ血清型、ピオシン型およびファージ型が一致した。以上、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を産生する特殊な緑膿菌の同一病棟における継続的な分離は、抗緑膿菌性  $\beta$ -lactam 剤 (特に IPM) の使用量に関連している可能性が示唆された。

**Key words:** Class B  $\beta$ -lactamase, 緑膿菌, イミペネム耐性, 病棟内感染

Imipenem (IPM) は緑膿菌を含む種々の細菌感染症に対し優れた効果を発揮し、安全に使用できる薬剤と評価されている<sup>1-5)</sup>。しかしながら、IPM 治療中の耐性菌の出現<sup>1-4)</sup>や臨床使用量の増大に伴う耐性菌の増加も報告されている<sup>6)</sup>。また、本邦においては、IPM 耐性緑膿菌の分離頻度は10～20%に達している<sup>6-9)</sup>。これらの耐性は、外膜蛋白 D 2 の欠損にもとづくこととされ、IPM を含むカルバペネムに特異的な耐性で、セフェム剤など他の  $\beta$ -lactam 剤と交差することはまれである<sup>6-11)</sup>。最近、セフェム剤を含む多くの  $\beta$ -lactam 剤にも交差耐性を示し、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を産生する IPM 耐性緑膿菌が Watanabe らによって初めて報告された<sup>12)</sup>。

グラム陰性菌の IPM 耐性に関連する金属要求性の  $\beta$ -lactamase の存在は、すでに *Bacteroides fragilis*<sup>13-17)</sup>, *Aeromonas hydrophila*<sup>18)</sup>, *Pseudomonas* (*Stenotropho-*

*monas*) *maltophilia*<sup>19)</sup>, *Serratia marcescens*<sup>20,21)</sup> において知られている。これらの  $\beta$ -lactamase は class B<sup>22)</sup> あるいは function group 3<sup>23)</sup> に属するとされ、活性発現に2価カチオン (亜鉛イオン) を必要とする。このような metallo  $\beta$ -lactamase 産生はカルバペネムを含む広い範囲の  $\beta$ -lactam 剤に耐性化をもたらすことから、他の広域スペクトル  $\beta$ -lactamase と区別する必要があることが指摘されている<sup>24)</sup>。Metallo  $\beta$ -lactamase は、ほとんどの  $\beta$ -lactam 剤を加水分解するが、aztreonam (AZT) に加水分解活性を示すものと示さないものの2群に分けられることが報告されている<sup>25)</sup>。また、その活性は、CVA などの  $\beta$ -lactamase 阻害剤によってなら影響されない。産生遺伝子は染色体上にあるとされてきたが、最近では、*Pseudomonas aeruginosa*<sup>12,26)</sup>, *S. marcescens*<sup>27)</sup>, *B. fragilis*<sup>13)</sup> などでプラスミド上に存在することも報告されている。特に、*S. marcescens* において

IPM 分解性  $\beta$ -lactamase をコードしたプラスミドが広まっている可能性が示唆された<sup>27)</sup>ことは注目すべきであろう。

我々は、臨床分離緑膿菌から IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を産生し、IPM に対する耐性値の異なる 2 株を見出した<sup>28)</sup>。これら 2 株の性状を検討した結果、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生に外膜蛋白 D 2 欠損が加わることで、IPM 高度耐性がもたらされることが確認された。その後、これら 2 株が分離された同一病棟から IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を産生する緑膿菌を新たに 7 株分離した。これまで、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌に関する報告は少なく<sup>12,29)</sup>、今回分離した 9 株は同一病棟に入院中のそれぞれ異なる患者由来であったこと、また、上述したように *S. marcescens* において IPM 分解性  $\beta$ -lactamase をコードするプラスミドの蔓延が報告されている<sup>27)</sup>こと、さらに、最近相次いで新規なカルバペネム剤が臨床導入されたことから、本菌株出現の背景を解析することは今後の耐性菌対策に有用と考えられた。

そこで、本報では、これら緑膿菌の薬剤耐性機構の解明およびその出現の背景の解析を目的に、本菌産生の  $\beta$ -lactamase の性状、薬剤感受性、外膜蛋白、耐性の伝達性、血清型、ピオシン型、ファージ型などの諸性状ならびに抗菌薬使用状況を検討した。

## I. 実験材料および方法

### 1. 使用菌株

1988 年 10 月～1992 年 1 月の間に、富山市民病院の脳外科病棟に入院中の患者の喀痰、尿および浸出液から分離された IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生 *P. aeruginosa* 9 株および対照として Watanabe ら<sup>12)</sup>が分離した metallo  $\beta$ -lactamase 産生の *P. aeruginosa* GN 17203 株を用いた (Table 1)。IPM 耐性伝達の受容菌

としては rifampicin 耐性の *P. aeruginosa* PAO 2142 Rp 株<sup>12)</sup>を用いた。また、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 遺伝子の大腸菌へのクローニングに *Escherichia coli* JM 109 株<sup>28)</sup>を用いた。*S. marcescens* 由来 metallo  $\beta$ -lactamase 遺伝子の recombinant plasmid 保有 *E. coli* HB 101/pSMBNU 24 株<sup>20)</sup>は名古屋大学医学部細菌学荒川親宜先生より分与された。緑膿菌の染色体性 cephalosporinase (CEPase) 産生株として *P. aeruginosa* GN 918 株<sup>29)</sup>を、また、薬剤感受性比較および外膜蛋白解析にそれぞれ当研究所保存の *P. aeruginosa* IFO 3445 および PAO 1 を用いた。これらの株は 50% グリセリンに懸濁し、-135℃にて凍結保存した。

### 2. 使用薬剤

IPM、および benzylpenicillin (PCG) は萬有製薬より、ritipenem (RITM) はファルミタリアより、cef-tazidime (CAZ) は日本グラクソより、cefsulodin (CFS) は武田薬品工業より、cefoperazone (CPZ) および piperacillin (PIPC) は富山化学工業より、aztreonam (AZT) は日本スクイブより、carbenicillin (CBPC)、cephalothin (CET)、cephaloridine (CER) および latamoxef (LMOX) は塩野義製薬より、cefuroxime (CXM) は中外製薬より、cefmetazole (CMZ) は三共より、tazobactam は大鵬薬品より、clavulanic acid (CVA) はピーチャム・スミスクラインより、sulbactam (SBT) は日本ファイザーより、ceftiofime (CPR) はヘキストジャパンより、gentamicin (GM) はシェリング・プラウより購入あるいは提供を受けた。Ofloxacin (OFLX) および BRL 42715<sup>20)</sup>は富山化学工業 (株) 総合研究所で合成されたものを用いた。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the present study

| Strain or plasmid    | Origin and/or genotype   | Reference of source  |               |
|----------------------|--|--|---------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | S-860/pMS 381  | Clinical isolate (1988.10) <sup>a)</sup>   | (26)          |
|                      | S-861/pMS 382  | Clinical isolate (1988.10)   | (26)          |
|                      | S-1008/pMS 383   | Clinical isolate (1991.3)  | Present study |
|                      | S-1020/pMS 384   | Clinical isolate (1991.3)  | Present study |
|                      | S-1030/pMS 385   | Clinical isolate (1991.3)  | Present study |
|                      | S-1046/pMS 386   | Clinical isolate (1991.11)   | Present study |
|                      | S-1047/pMS 387   | Clinical isolate (1991.11)   | Present study |
|                      | S-1051/pMS 388   | Clinical isolate (1991.12)   | Present study |
|                      | S-1086/pMS 389   | Clinical isolate (1992.1)  | Present study |
|                      | S-861 PR   | Piperacillin-resistant mutant from S-861   | Present study |
|                      | GN 17203   | Clinical isolate producing metallo $\beta$ -lactamase  | (12)          |
|                      | GN 918   | Clinical isolate producing chromosomal CEPase  | (29)          |
|                      | PAO 2142 Rp  | Rifampicin-resistant mutant from PAO 2142, <i>ilu</i> , <i>lys</i> , <i>met</i> , <i>tyu</i>   | (12)          |
|                      | IFO 3445   | Laboratory strain  |               |
|                      | PAO 1  | Laboratory strain  |               |
| pTP 131              | Recombinant plasmid encoding metallo- $\beta$ -lactamase gene of <i>P. aeruginosa</i> S-1051 | Present study  |               |
| pSMBNU 24            | Recombinant plasmid encoding metallo- $\beta$ -lactamase gene of <i>S. marcescens</i> TN9106 | (20)   |               |
| <i>E. coli</i>       | JM 109   | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), F' [ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> *, <i>lacI</i> *, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15] | (28)          |

<sup>a)</sup> Date of isolation

### 3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は, Mueller-Hinton agar (MHA, 栄研) を用い, 日本化学療法学会標準法<sup>31)</sup> に準じて測定した。Brain heart infusion broth (BHIB) 中, 37 °C, 一夜培養した菌液を生理食塩水にて 500 倍希釈したものを  $10^6$  cells/ml の接種菌液とした。接種にはマイクロプランター (佐久間製作所, 型式 MIT-P) を用いた。37 °C, 20 時間培養後に MIC を判定した。

IPM 感受性に及ぼす塩基性アミノ酸の影響の検討時には, Davis の最少寒天培地に 50 mM の L-lysine (東京化成) を添加して MIC を測定した。Davis の最少培地中で 37 °C, 24 時間培養した菌液を生理食塩水で約  $10^6$  cells/ml に希釈したものを接種菌液とした。

### 4. 粗 $\beta$ -lactamase の調製

BHIB 中, 一夜培養した菌液を新鮮 BHIB にて 20 倍に希釈し, 37 °C にて 4 時間振盪培養した。遠心分離 (6,000 × g, 15 分間, 4 °C) により, 菌体を分離し, これを Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M, pH 7.0, 以下 Tris と略) にて 2 回洗浄後, 同緩衝液に再浮遊させ, 水冷下超音波破碎機 (UR-200 P, トミー精工) にて破碎した。この菌体破碎液を遠心分離 (10,000 × g, 30 分間, 4 °C) し, その上清を  $\beta$ -lactamase 粗酵素液とした。誘導後の活性測定には, 種々の濃度の IPM を培養開始 2 時間後に添加し, 上記と同様に粗酵素液を調製した。

### 5. IPM 分解性 $\beta$ -lactamase の精製

上記の方法で得た S-861 株由来粗酵素液 (0.3 unit/mg of protein, 基質: IPM (100  $\mu$ M)) から, 既報<sup>12)</sup> の一部を改変した方法で精製酵素 (比活性: 23.1 unit/mg of protein, 基質: IPM (100  $\mu$ M)) を得た。すなわち, 除核酸処理し, 0.1%メルカプトエタノールおよび 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub> 含有 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に対して 4 °C 一夜透析した。透析後の遠心分離上清から, イオン交換カラムクロマトグラフ (CM Sephadex; 3  $\phi$  × 17 cm) およびゲル濾過 (Sephadex G-100; 2  $\phi$  × 80 cm) にて IPM 分解活性画分を分離し, 精製酵素とした。粗酵素中の活性の 29% が回収された。なお, 溶出バッファー中には, 0.1%メルカプトエタノールおよび 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub> を添加した。

### 6. $\beta$ -lactamase 活性の測定

$\beta$ -lactamase 活性は, UV 法<sup>32,33)</sup> にて測定した。反応は, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 37 °C にて行った。ダブルビーム式分光光度計 (HITACHI, 100-60 型) により紫外外部吸収の変化を測定することにより加水分解速度を求めた。酵素活性は, 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中, 37 °C において 1 分間に 1  $\mu$  mole の基質を分解する酵素量を 1 unit とした。また, 酵素液の蛋白濃度を子牛血清アルブミン (Sigma) を標準蛋白として Lowry らの方法<sup>34)</sup> にて求め, 単位蛋白 (mg) 当りの unit で比活性 (unit/mg of protein) を表した。

### 7. 等電点の測定

等電点電気泳動は, 2%LKB アンホライン (pH 3.5 ~ 10.0) を含む 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。pH 勾配は pI マーカー (オリエンタル酵母) で確認した。また,  $\beta$ -lactamase 泳動位置は, 泳動後のゲルを 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub> 含有 Tris-HCl 緩衝液に 30 分間浸した後, 1 mM PCG, 0.4% Starch, 1 mM Iodine および 1.2% agar を含む 40 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) を重層することにより確認した。

### 8. 分子量の決定

Laemmli の方法<sup>35)</sup> に従い精製酵素の分子量を SDS-PAGE により求めた。分子量マーカーとしては Pharmacia 製 (Pharmacia LKB Biotechnology) のものを用いた。

### 9. $\beta$ -lactamase 阻害活性および活性回復試験

精製  $\beta$ -lactamase 溶液に各種薬剤を 100  $\mu$ M になるように加え, 30 °C, 10 分間インキュベートした後, CER (100  $\mu$ M) を基質として  $\beta$ -lactamase 活性を測定した。EDTA 処理後の金属イオンによる活性回復試験は Watanabe らの方法<sup>12)</sup> に従った。

### 10. 外膜蛋白

L-broth<sup>36)</sup> で培養した菌体から Fukuoka らの方法<sup>37)</sup> に従い外膜画分を抽出した。これを 10%SDS-PAGE で分離後, クマーシー染色により蛋白バンドを検出した。

### 11. PIPC 耐性菌の選択

S-861 株を BHIB 中, 37 °C で一夜培養し, これを生理食塩液で 10 倍希釈後, PIPC (50  $\mu$ g/ml) 含有 heart infusion agar (HIA) 平板上に塗布した。37 °C, 一夜培養後に生育してきたコロニーを同じ濃度の PIPC を含む HIA 平板上で 2 回単一コロニーとし, その 1 つを S-861 PR とした。

### 12. 耐性伝達試験

Kato らの方法<sup>38)</sup> にしたがって, *P. aeruginosa* PAO 2142 Rp を受容菌として接合伝達 (フィルターメイトイング法) または transformation を行った。伝達株は 50  $\mu$ g/ml の CAZ および 100  $\mu$ g/ml の rifampicin を含む HIA 平板を用いて選択した。

### 13. IPM 分解性 $\beta$ -lactamase 遺伝子の大腸菌へのクローニング

アルカリ簡便法<sup>39)</sup> により S-1051 株からプラスミド DNA を抽出し, これを制限酵素 BamHI で切断後 CIP 処理した pHSG 397 と混合し, ligation 反応を行った。この ligation 溶液を用い, Hanahan らの方法<sup>39)</sup> にて *E. coli* JM 109 株に導入し, CAZ 50  $\mu$ g/ml 含有 LB 寒天培地に塗布した。生育したコロニーよりプラスミドを分離し, ベクターおよび挿入断片を確認し, 目的とするクローン pTP 131 を得た。

### 14. 血清型, ファージ型およびピオシン型の決定

各臨床分離株の血清型は、抗緑膿菌血清（メイアッセイ緑膿菌；明治製菓）を用いて決定した。また、ファージ型は Bergan らの方法<sup>40)</sup>に、ピオシン型は Gillies ら<sup>41)</sup>の方法に従って決定した。

## II. 実験結果

### 1. 薬剤感受性および IPM 分解活性

IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌 9 株、Watanabe ら<sup>12)</sup>が分離した metallo  $\beta$ -lactamase 産生の GN 17203 株および標準株の IFO 3445 の各種抗菌剤感受性および IPM 分解活性を Table 2 に示す。

我々が分離した 9 株は標準株の IFO 3445 に比較し、IPM に対し明らかに耐性であった。IPM に対する MIC 値は、S-860, S-1008 および S-1030 株では 6.25  $\mu$ g/ml で、IPM に低度耐性のレベルであったが、S-861, S-1020, S-1046, S-1047, S-1051 および S-1086 株では 25  $\mu$ g/ml および 100  $\mu$ g/ml で、中等度ないしは高度耐性であった。CAZ, CFS, CPZ, CPR および CBPC に対してはすべての株が高度耐性 (MIC  $\geq$  100  $\mu$ g/ml) であった。一方、PIPC には、S-860, S-861, S-1008 および S-1030 株が標準株の IFO 3445 と同様感受性であったが、他の 5 株は耐性であった。また、AZT に対しては、S-1046, S-1047, S-1051 および S-1086 の 4 株は中等度耐性 (MIC = 12.5  $\mu$ g/ml ~ 25  $\mu$ g/ml) を示し、その他の株は感受性であった。IPM に高度耐性を示した 5 株のうち S-1046, S-1047, S-1051 および S-1086 の 4 株は PIPC および AZT にも高度あるいは中等度耐性を示したが、S-861 株は PIPC および AZT には感受性であった。 $\beta$ -lactam 剤以外の薬剤のうち GM に対しては、S-1030 株が感受性 (MIC = 3.13  $\mu$ g/ml) であったが、その他の株はすべて耐性であった。また、OFLX には、S-1047 および S-1051 が 3.13  $\mu$ g/ml または 6.25  $\mu$ g/ml の MIC を示し、低感受性化していたが、他の 7 株は感受性であっ

た。これら 9 株は全体的に、分離時期が新しいほど高度耐性化、多剤耐性化の傾向を示した。

IPM を基質として、9 株から調整した粗酵素液の  $\beta$ -lactamase 活性を測定した結果、すべての粗酵素液中に IPM 分解活性が認められ、蛋白 1 mg 当り 1 分間に 0.16  $\mu$  mole ~ 0.49  $\mu$  mole の IPM を分解した。活性のレベルは、S-1020 株が 0.49 unit/mg of protein と他の株に比べ約 2 倍高い活性を示した以外はほぼ同じであり、IPM を含む  $\beta$ -lactam 剤の耐性値と IPM 分解活性レベルには相関はみられなかった。なお、Watanabe ら<sup>12)</sup>が分離した GN 17203 株の感受性パターンは OFLX に低感受性化している S-1047 株に類似し、また、その IPM 分解活性は S-1020 株と同程度であった。

### 2. 耐性伝達性

IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌 9 株および *P. aeruginosa* GN 17203 を供与菌とし、PAO 2142 Rp 株にフィルターメイティング法にて耐性の接合伝達を試みた。S-1030 株を除いて低い頻度 ( $10^{-7}$  ~  $10^{-8}$ ) ながら接合により耐性伝達株が得られ、S-1030 株でも transformation によって耐性伝達株が得られた。伝達株では、IPM 耐性、セフェム耐性、CBPC 耐性、GM 耐性および IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生能の発現が確認されたが、PIPC 耐性、AZT 耐性、OFLX 耐性 (低感受性)、IPM 高度耐性、GM 高度耐性は発現しなかった (Table 3)。耐性伝達株では、臨床分離株と同レベルの IPM 分解活性が確認され、S-1020 株由来プラスミド (pMS 384) 保有株の IPM 分解活性は臨床分離株と同様に他の株由来プラスミド保有株の約 2 倍であったが、PIPC 中等度 (MIC = 50  $\mu$ g/ml) 耐性は発現しなかった。GN 17203 株由来プラスミド (pMS 350) 伝達株でも pMS 384 (S-1020 株) 伝達株とほぼ同様の結果が得られた。なお、データは示さないが、9 株す

Table 2. Antimicrobial susceptibilities and imipenem-hydrolyzing activities of 9 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

| Strain no.       | MIC ( $\mu$ g/ml) at 10 <sup>7</sup> CFU/spot |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Imipenem-hydrolyzing activity <sup>a)</sup> |
|------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
|                  | IPM   | CAZ  | CFS  | CPZ  | CPR  | PIPC | CBPC | AZT  | GM   | OFLX |   |
| S-860/pMS 381    | 6.25  | 400  | >800 | 200  | 100  | 6.25 | 800  | 3.13 | 200  | 0.78 | 0.28  |
| S-861/pMS 382    | 100   | 400  | >800 | 200  | 200  | 6.25 | >800 | 3.13 | 200  | 0.78 | 0.23  |
| S-1008/pMS 383   | 6.25  | 400  | >800 | 400  | 200  | 6.25 | >800 | 3.13 | 200  | 0.78 | 0.16  |
| S-1020/pMS 384   | 25  | 800  | >800 | 800  | 400  | 50   | >800 | 6.25 | 100  | 1.56 | 0.49  |
| S-1030/pMS 385   | 6.25  | 400  | >800 | 200  | 100  | 6.25 | 800  | 1.56 | 3.13 | 1.56 | 0.21  |
| S-1046/pMS 386   | 100   | 800  | >800 | 400  | 200  | 400  | >800 | 12.5 | 200  | 1.56 | 0.21  |
| S-1047/pMS 387   | 100   | 800  | >800 | 400  | 200  | 200  | >800 | 25   | 800  | 6.25 | 0.18  |
| S-1051/pMS 388   | 100   | 800  | >800 | 400  | 200  | 400  | >800 | 25   | >800 | 3.13 | 0.22  |
| S-1086/pMS 389   | 100   | 800  | >800 | 400  | 200  | 200  | >800 | 12.5 | 200  | 0.78 | 0.21  |
| GN 17203/pMS 350 | 100   | >800 | >800 | >800 | 400  | 400  | >800 | 25   | 200  | 12.5 | 0.51  |
| IFO 3445         | 0.78  | 0.78 | 1.56 | 6.25 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 3.13 | 3.13 | 0.78 | <0.01                                       |

<sup>a)</sup> Imipenem-hydrolyzing activity was determined by the spectrophotometric method using imipenem (100  $\mu$ M) as the substrate and is expressed in units per mg of protein.

Abbreviations: IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, CFS: cefsulodin, CPZ: cefoperazone, CPR: cefpirome, PIPC: piperacillin, CBPC: carbenicillin, AZT: aztreonam, GM: gentamicin, OFLX: ofloxacin

Table 3. Antimicrobial susceptibilities and imipenem-hydrolyzing activities of the transconjugants

| Strain no.                                | MIC ( $\mu$ g/ml) at 10 <sup>4</sup> CFU/spot |      |      |      |      |      |      |      |      | Imipenem-hydrolyzing activity <sup>a</sup> |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
|   | IPM   | CAZ  | CFS  | CPZ  | PIPC | CBPC | AZT  | GM   | OFLX |  |
| PAO 2142 Rp/pMS 381 (S-860) <sup>b</sup>  | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.29                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 382 (S-861)               | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.29                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 383 (S-1008)              | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 6.25 | 0.78 | 0.22                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 384 (S-1020)              | 6.25  | 800  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 6.25 | 0.78 | 0.59                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 385 (S-1030) <sup>c</sup> | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 0.78 | 0.78 | 0.20                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 386 (S-1046)              | 3.13  | 400  | >800 | 100  | 3.13 | 400  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.26                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 387 (S-1047)              | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.30                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 388 (S-1051)              | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.23                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 389 (S-1086)              | 3.13  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.30                                       |
| PAO 2142 Rp/pMS 350 (GN 17203)            | 12.5  | 400  | >800 | 200  | 3.13 | 800  | 3.13 | 12.5 | 0.78 | 0.61                                       |
| PAO 2142 Rp                               | 0.39  | 1.56 | 1.56 | 3.13 | 3.13 | 50   | 3.13 | 0.78 | 0.78 | <0.01                                      |

<sup>a</sup> Imipenem-hydrolyzing activity was determined by the spectrophotometric method using imipenem (100  $\mu$ M) as the substrate and is expressed in units per mg of protein.

<sup>b</sup> Strain from which transconjugant was obtained.

<sup>c</sup> Transformant.

Abbreviations: See the foot note to Table 2.

Table 4. Expression of  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli* JM 109/pTP 131

| Drug          | MIC ( $\mu$ g/ml) at 10 <sup>4</sup> CFU/spot for |                               |
|---------------|---|-------------------------------|
|               | <i>E. coli</i> JM 109                             | <i>E. coli</i> JM 109/pTP 131 |
| Imipenem      | 0.2   | 12.5                          |
| Ceftazidime   | 0.2   | 400                           |
| Cefsulodin    | 25  | >800                          |
| Cefoperazone  | 0.2   | 200                           |
| Cefpirome     | $\leq 0.05$                                       | 3.13                          |
| Latamoxef     | 0.2   | 800                           |
| Piperacillin  | 1.56  | 6.25                          |
| Carbenicillin | 6.25  | >800                          |
| Aztreonam     | 0.1   | 0.1                           |
| Gentamicin    | $\leq 0.2$  | $\leq 0.2$                    |
| Ofloxacin     | 0.2   | 0.1                           |

べてに大きさの類似した (約 40 kb) プラスミドが確認された。

S-1051 株由来プラスミド pMS 388 から IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生遺伝子を、pHSH 139 をベクターとし大腸菌にクローニングした (Table 4)。IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 遺伝子は大腸菌でも発現し、1.24 unit/mg of protein の IPM 分解活性が確認された。Recombinant plasmid 保有大腸菌では、IPM、セフェム剤、CBPC の耐性値が宿主株に比べ 5 管以上上昇した。また、PIPC の耐性値も 3 管上昇したが、AZT に対する感受性は変化しなかった。

### 3. $\beta$ -lactamase 産生

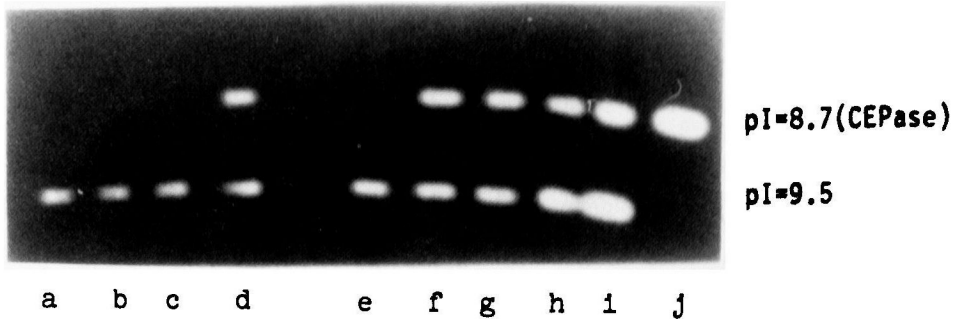
IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生 9 株から得た粗酵素液の等電点電気泳動パターンを Fig. 1 に示す。対照に緑膿菌の染色体性 CEPase (GN 918 株<sup>20</sup> 由来) を同時に泳動した。非誘導時には、9 株中 S-860, S-861, S-1008, および S-1030 株では、pI 約 9.5 に泳動される 1 本のバンドのみが認められた。一方、その他の株

では緑膿菌の染色体性 CEPase に相当する位置 (pI = ca 8.7) にさらにもう 1 本のバンドが検出された。次に、誘導時の泳動パターンを、S-1086 および S-860 の場合を代表例として Fig. 2 に示す。非誘導時に 2 本のバンドが認められた S-1086 株では誘導時に pI 8.7 のバンドがやや強く検出され、1 本しかバンドの認められなかった S-860 では pI 8.7 に新たなバンドが検出された。なお、本報では、非誘導時にも CEPase バンドが検出された 5 株を染色体性 CEPase 脱抑制株としたが、いずれも PIPC 耐性であった。

誘導時の  $\beta$ -lactamase 活性を、IPM を基質とした IPM 分解活性、CET を基質とした CEPase 活性に分けて測定した (Fig. 3)。S-1020 株ではわずかに、また、S-1046, S-1047, S-1051 および S-1086 株では明らかに誘導前の CEPase 活性が IPM 分解活性より高かった。誘導後には、すべての株で CEPase 活性が上昇したが、IPM 分解活性には変化がみられなかった。また、最大 CEPase 活性が得られた IPM 濃度は、IPM 低度耐性の S-860, S-1008, S-1020, S-1030 では 3.13~6.25  $\mu$ g/ml であったが、その他の高度耐性株では 25~50  $\mu$ g/ml であった。なお、データは示さないが、CMZ で誘導した場合、S-861 株 (IPM 低度耐性) と S-861 (IPM 高度耐性) 株で CEPase 活性が上昇する濃度に違いは見られなかった。

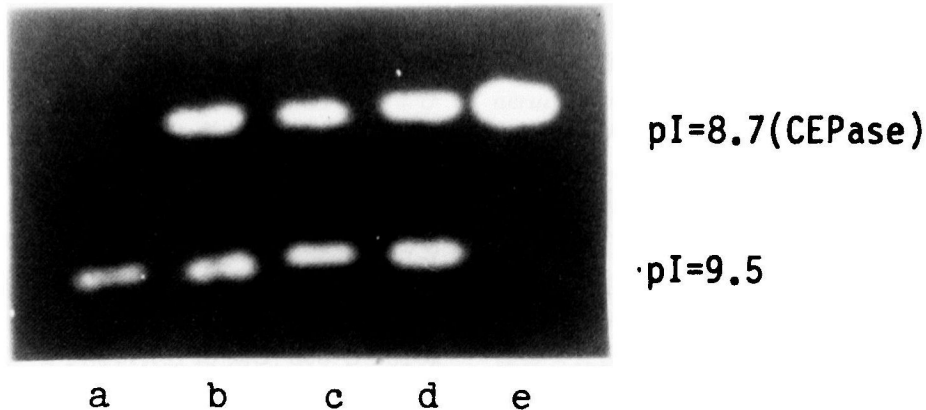
### 4. IPM 分解性 $\beta$ -lactamase の性状

耐性伝達株から調製した粗酵素液を用い各種  $\beta$ -lactam 剤に対する加水分解活性を測定した (Table 5)。その結果いずれも類似した加水分解パターンを示し、AZT に対していずれの株の酵素も分解活性を示さなかった。その他の薬剤に対しては明らかな分解活性を示した。Watanabe ら<sup>12)</sup> が分離した metallo  $\beta$ -lactamase 産生の GN 17203 株からの伝達株 (pMS 350)



The  $\beta$ -lactamase bands were visualized iodometrically. The pI 8.7 and 9.5 bands correspond to chromosomal cephalosporinase and imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, respectively. Lanes a: S-860; b: S-861; c: S-1008; d: S-1020; e: S-1030; f: S-1046; g: S-1047; h: S-1051; i: S-1086; j: GN 918 (CEPase)

Fig. 1. Analytical isoelectric focusing patterns of  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with imipenem-hydrolyzing activity.



The  $\beta$ -lactamase bands were visualized iodometrically. The pI 8.7 and 9.5 bands correspond to chromosomal cephalosporinase and imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, respectively. Lanes a: S-860 (control); b: S-860 (with induction); c: S-1086 (control); d: S-1086 (with induction); e: GN918 (CEPase)

Fig. 2. Analytical isoelectric focusing patterns of  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* S-860 and S-1086 incubated with and without inducer.

および *S. marcescens* の metallo  $\beta$ -lactamase 産生遺伝子を保有する大腸菌<sup>20)</sup> から調製した粗酵素の基質特異性はこれら 9 株の結果と類似していた。また、粗酵素を 4 mM EDTA で 10 分間処理したところ、すべてで 92~98% の活性が阻害され、透析後に亜鉛イオンを添加したところ活性の一部が回復した。

S-861 株を代表株として選び、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を精製単離した。精製  $\beta$ -lactamase は、カルバペネム、ペネム、セファマイシン、ペニシリンおよびセファロsporin (オキシイミノセフェムを含む) を加水分解したが、AZT には分解活性を示さなかった (Table 6)。本酵素のセフェム剤に対する  $K_m$  値は、ペニシリン剤に比べ小さく、セフェム剤に高い親和性を示す傾向がみられた。本酵素の等電点は約 9.5 で、SDS-PAGE によって求めた分子量は約 28,000 であり、至適 pH および温度はそれぞれ 9.5 および 60~65 °C であった。

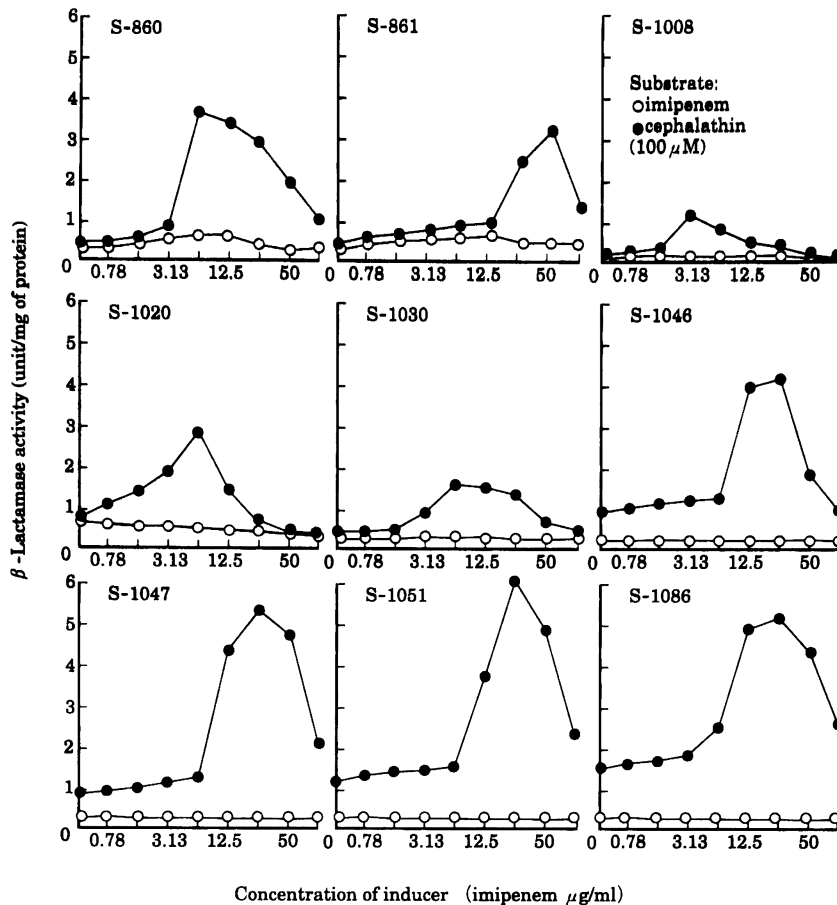
精製酵素に対する各種阻害剤および金属イオンの  $\beta$ -

lactamase 阻害活性を検討した (Table 7)。本酵素の活性は、EDTA, *p*-chloromercuribenzoate, ヨウ素, FeCl<sub>3</sub> および CuSO<sub>4</sub> の添加により完全に阻害された。一方、 $\beta$ -lactamase 阻害剤である TAZ, CVA, SBT および BRL 42715<sup>30)</sup>, さらに KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> および CoCl<sub>2</sub> の添加は本酵素の活性にほとんど影響しなかった。

EDTA によって阻害された酵素活性に対する各種金属イオンによる回復性を検討した (Table 8)。その結果、Ca イオンおよび Mg イオンの添加ではほとんど活性は回復しなかったが、Zn イオンの添加で 40%, Co イオンの添加では 23% の活性が回復した。

##### 5. IPM および PIPC 耐性の解析

IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌における IPM および PIPC 耐性が必ずしも IPM 分解活性と相関せず (Table 2), また、Table 3 に示したように伝達株では IPM 高度耐性および PIPC 耐性が発現しなかったことから、臨床分離株に加え、実験的耐性株を用いてこれ



Sonic extracts were prepared from *Pseudomonas aeruginosa* producing imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase after incubation with various concentrations of imipenem for 2 hours, and their  $\beta$ -lactamase activities were determined by a spectrophotometric method using both imipenem (○) and cephalothin (●) as the substrates.

Fig. 3. Cephalosporinase and imipenem-hydrolyzing activity in 9 *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with various concentrations of imipenem as the inducer.

Table 5. Hydrolyzing activities of the crude extracts from the transconjugants against various  $\beta$ -lactams

| Enzyme sources                 | Relative rate of hydrolysis (%) at 100 $\mu$ M |                      |     |      |      |     |      |     | Recovery of imipenem-hydrolyzing activity by addition of zinc cation (%) <sup>d)</sup> |    |
|--------------------------------|--|----------------------|-----|------|------|-----|------|-----|--|----|
|                                | CER  | PCG                  | IPM | RIPM | LMOX | CAZ | PIPC | AZT |  |    |
| <i>P. aeruginosa</i>           |  |                      |     |      |      |     |      |     |  |    |
| PAO 2142 Rp/pMS 381            | 100  | (0.19) <sup>a)</sup> | 69  | 138  | 127  | 98  | 11   | 22  | <4   | 23 |
| PAO 2142 Rp/pMS 382            | 100  | (0.17)               | 79  | 152  | 124  | 94  | 16   | 15  | <3   | 11 |
| PAO 2142 Rp/pMS 383            | 100  | (0.15)               | 57  | 203  | 172  | 82  | 19   | 17  | <2   | 23 |
| PAO 2142 Rp/pMS 384            | 100  | (0.40)               | 65  | 151  | 123  | 86  | 16   | 8   | <2   | 16 |
| PAO 2142 Rp/pMS 385            | 100  | (0.17)               | 55  | 152  | 112  | 88  | 19   | 24  | <3   | 20 |
| PAO 2142 Rp/pMS 386            | 100  | (0.18)               | 66  | 142  | 110  | 85  | 16   | 16  | <4   | 18 |
| PAO 2142 Rp/pMS 387            | 100  | (0.19)               | 78  | 173  | 128  | 100 | 20   | 16  | <3   | 12 |
| PAO 2142 Rp/pMS 388            | 100  | (0.15)               | 72  | 160  | 117  | 85  | 19   | 18  | <3   | 26 |
| PAO 2142 Rp/pMS 389            | 100  | (0.17)               | 71  | 172  | 132  | 101 | 20   | 10  | <2   | 7  |
| PAO 2142 Rp/pMS 350            | 100  | (0.39)               | 90  | 118  | 137  | 149 | 15   | 16  | <2   | 11 |
| <i>E. coli</i>                 |  |                      |     |      |      |     |      |     |  |    |
| HB 101/pSMBNU 24 <sup>b)</sup> | 100  | (0.61)               | 50  | 97   | 111  | 82  | 8    | 4   | <2   | 12 |

<sup>a)</sup> The values in parentheses indicate activities (units per ml) used for assay.

<sup>b)</sup> *E. coli* HB101 harbored the recombinant plasmid encoding metallo- $\beta$ -lactamase gene of *S. marcescens* TN 9106 (20).

<sup>c)</sup> The enzyme activities of EDTA-treated crude extracts were determined by the spectrophotometric method after incubation with 1 mM of ZnSO<sub>4</sub> for 10 min. Recovery of enzyme activity was expressed as a percentage of the activity before treatment with EDTA.

Abbreviations: CER: cephaloridine, PCG: benzylpenicillin, IPM: imipenem, RIPM: ritipenem, LMOX: latamoxef, CAZ: ceftazidime, PIPC: piperacillin, AZT: aztreonam

ら 2 剤の耐性機構について検討した。

外膜蛋白の SDS-PAGE 泳動像を Fig. 4 に示す。IPM に高度耐性な株ではいずれも D 2 蛋白バンド (Figure 中に矢印で表示) が検出されなかった。

D 2 蛋白が塩基性アミノ酸の取り込みに関与し、塩基性アミノ酸が IPM の透過と拮抗することが報告されている<sup>37)</sup>ので、最少培地に塩基性アミノ酸のリジンを追加し、IPM 高度耐性の S-861 と低度耐性の S-860 の IPM に対する MIC を測定した (Table 9)。その結果、培地中に塩基性アミノ酸が存在しない状態では、S-860 株に対する IPM の MIC は感受性株の IFO 3445 と同じであったが、リジン添加により S-861 に対する値と同じレベルになった。一方、D 2 欠損の S-861 株ではリジン添加の影響はわずかで、リジンの有無にかかわらず IPM の MIC 値は感受性株より大きかった。

Table 6. Kinetics of  $\beta$ -lactam hydrolysis by the purified  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* S-861

| $\beta$ -Lactams | Km ( $\mu$ M)           | Relative Vmax <sup>a)</sup> |
|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Cephaloridine    | 21.6                    | 100                         |
| Cephalothin      | 10.1                    | 102                         |
| Cefuroxime       | 9.2                     | 36.2                        |
| Ceftazidime      | 36.5                    | 15.5                        |
| Cefoperazone     | 22.9                    | 122                         |
| Cefsulodin       | 3.2                     | 5.0                         |
| Latamoxef        | 22.2                    | 151                         |
| Cefmetazole      | 2.7                     | 31.8                        |
| Imipenem         | 33.3                    | 115                         |
| Ritipenem        | 38.5                    | 116                         |
| Benzylpenicillin | 485                     | 574                         |
| Carbenicillin    | 406                     | 304                         |
| Piperacillin     | 139                     | 55.5                        |
| Aztreonam        | >100 (Ki) <sup>b)</sup> | <1                          |

<sup>a)</sup>  $\beta$ -Lactam hydrolysis rates are expressed as percentages of cephaloridine hydrolysis (enzyme activity: 1.83~3.43 units/ml at 100  $\mu$ M).

<sup>b)</sup> The Ki value was determined using cephalothin as the substrate.

PIPC に高度耐性な株は Fig. 1 に示したようにいずれも CEPase 産生が脱抑制型であった。そこで、CEPase の脱抑制的産生と PIPC 耐性との関係をさらに明らかにするために、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生細菌に対する IPM, CAZ, AZT および PIPC と CEPase 阻害剤の BRL 42715 との併用効果ならびに S-861 株から得た PIPC 高度耐性株の MIC および  $\beta$ -lactamase 産生を調べた (Table 10)。

IPM および CAZ では、BRL 42715<sup>38)</sup> 併用時に MIC 値の変化はみられなかったが、PIPC および AZT では、CEPase 脱抑制的産生株で MIC 値の低下がみられた。また、S-861 から得た PIPC 耐性変異株では親株の S-861 に検出されなかった CEPase に対応する位置に

Table 7. Effects of inhibitors and cations on the activity of imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase

| Inhibitor or cation     | Inhibition (%) |
|-------------------------|----------------|
| FeSO <sub>4</sub>       | 71             |
| FeS <sub>2</sub>        | 100            |
| CuSO <sub>4</sub>       | 100            |
| KCl                     | 0              |
| CaCl <sub>2</sub>       | 0              |
| NaCl                    | 0              |
| MgSO <sub>4</sub>       | 0              |
| ZnSO <sub>4</sub>       | 0              |
| CoCl <sub>2</sub>       | 0              |
| EDTA                    | 100            |
| p-Chloromercuribenzoate | 100            |
| Iodine                  | 100            |
| Subactam                | 0              |
| Clavulanic acid         | 0              |
| Tazobactam              | 0              |
| BRL 42715               | 0              |
| Aztreonam               | 0              |

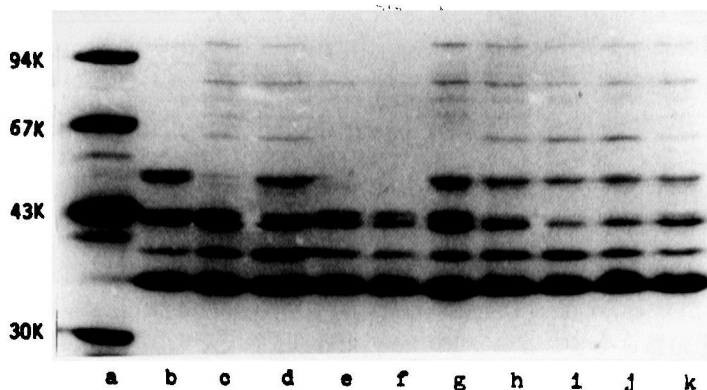
The purified enzyme (5.25 units/ml, substrate: CER (100  $\mu$ M)) was incubated with various cations and inhibitors (100  $\mu$ M)

Table 8. Recovery of activity of imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase treated with EDTA

| Treatment |          |                        | Relative activity (%) |
|-----------|----------|------------------------|-----------------------|
| EDTA      | Dialysis | Divalent cation (1 mM) |                       |
| -         | -        | None                   | 100                   |
| +         | -        | None                   | 0                     |
| +         | +        | None                   | 0                     |
| +         | +        | Ca <sup>2+</sup>       | 2                     |
| +         | +        | Mg <sup>2+</sup>       | 1                     |
| +         | +        | Zn <sup>2+</sup>       | 40                    |
| +         | +        | Co <sup>2+</sup>       | 23                    |

The purified enzyme with imipenem-hydrolyzing activity of 0.707 unit/ml (substrate concentration: 100  $\mu$ M) was incubated with 4 mM of EDTA at 30°C for 10 min, and the reaction mixture was then dialyzed twice against 1 liter of 50 mM MOPS buffer (pH 7.3) at 4°C for 24 h. The dialyzed enzyme solution was incubated with 1 mM of cations at 30°C for 10 min before enzyme assay. Recovery of enzyme activity is expressed as a percentage of the activity before treatment with EDTA.





Outer membrane fractions were prepared from *P. aeruginosa* with imipenem-hydrolyzing activity and from PAO 1 strain. The arrow indicates the position of D,-protein.

Lanes a: Molecular weight markers; b: PAO 1; c: S-860; d: S-861; e: S-1008; f: S-1020; g: S-1030; h: S-1046; i: S-1047; j: S-1051; k: S-1086

Fig. 4. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* with imipenem-hydrolyzing activity.

新たなバンドが検出され、CEPase 産生が臨床分離株の PIPC 耐性株と同様に脱抑制型に変化していた。

#### 6. 血清型, ピオシン型およびファージ型

今回検討した 9 株はすべて脳外科病棟に入院中のそれぞれ異なる患者から分離されたことから, 同一株の病棟内感染が考えられたので, 血清型, ピオシン型およびファージ型を調べた。Table 11 にその結果を薬剤耐性パターンとともに示す。

Table 9. Susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* S-860 and S-861 to imipenem in the presence of lysine on Davis' minimum agar

| Strain   | MIC ( $\mu$ g/ml) of imipenem at $10^4$ CFU/spot |                |
|----------|--|----------------|
|          | with lysine (50 mM)                              | without lysine |
| S-860    | 25   | 0.78           |
| S-861    | 25   | 12.5           |
| IFO 3445 | 3.13   | 0.78           |

Table 10. Effect of BRL 42715 (a  $\beta$ -lactamase inhibitor) on the activity of  $\beta$ -lactams against *Pseudomonas aeruginosa* with imipenem-hydrolyzing activity

|         | MIC ( $\mu$ g/ml) combined with 20 $\mu$ g/ml of BRL42715 at $10^4$ CFU/spot |           |             |           |           |           |              |           | $\beta$ -Lactamase detection by isoelectric focusing before induction |        |
|---------|--|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|---|--------|
|         | imipenem   |           | ceftazidime |           | aztreonam |           | piperacillin |           | pI=8.7  | pI=9.5 |
|         | alone  | +BRL42715 | alone       | +BRL42715 | alone     | +BRL42715 | alone        | +BRL42715 |   |        |
| S-860   | 6.25   | 6.25      | 400         | 400       | 3.13      | 1.56      | 6.25         | 3.13      | -   | +      |
| S-861   | 100  | 50        | 400         | 400       | 3.13      | 3.13      | 6.25         | 6.25      | -   | +      |
| S-1008  | 6.25   | 6.25      | 400         | 400       | 3.13      | 3.13      | 6.25         | 3.13      | -   | +      |
| S-1020  | 25   | 12.5      | 800         | 400       | 6.25      | 3.13      | 50           | 12.5      | +   | +      |
| S-1030  | 6.25   | 3.13      | 400         | 200       | 1.56      | 1.56      | 6.25         | 3.13      | -   | +      |
| S-1046  | 100  | 50        | 800         | 400       | 12.5      | 3.13      | 400          | 25        | +   | +      |
| S-1047  | 100  | 100       | 800         | 400       | 25        | 6.25      | 200          | 25        | +   | +      |
| S-1051  | 100  | 100       | 800         | 400       | 25        | 3.13      | 400          | 25        | +   | +      |
| S-1086  | 100  | 100       | 800         | 400       | 12.5      | 3.13      | 200          | 25        | +   | +      |
| S-861PR | 100  | NT        | 400         | NT        | 50        | NT        | 400          | NT        | +   | +      |

pI=8.7; cephalosporinase, pI=9.5; imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase

NT: not tested

血清型はすべて B 型であったが, ピオシン型では 2 種の型が, またファージ型では 6 種の型が見られた。ピオシン型, ファージ型が一致した株は, S-860, S-861 および S-1046 株の 3 株のみであったが, この 3 株の薬剤耐性パターンは明らかに異なっていた。分離時期とピオシン型およびファージ型には特に関連は見られなかった。

#### 7. 薬剤使用状況

脳外科病棟における抗緑膿菌性  $\beta$ -lactam 剤の 1987 年から 1993 年における使用量を半年ごとに集計した結果を Fig. 5 に示す。抗緑膿菌剤, 特に IPM の使用量は 1991 年まで増加し, その後急激に減少した。CAZ は 1990 年に使用が開始されていた。また, AZT は 1992 年の 1~6 月にわずかに使用されていたが, CFS およびニューキノロン剤の使用実績はなかった。少量の GM が調査した期間中すべてで使われていた。抗緑

Table 11. Serotype, pyocin type and phage type of *Pseudomonas aeruginosa* with imipenem-hydrolyzing activity

| Strain no. | Sero-type | Pyocin-type | Phage-type          | Resistance pattern                   |
|------------|-----------|-------------|---------------------|--------------------------------------|
| S-860      | B         | 1c          | 21/119X/Co111/2     | IPM · CEP · GM                       |
| S-861      | B         | 1c          | 21/119X/Co111/2     | IPM (H) · CEP · GM                   |
| S-1008     | B         | 10b         | 31/21/119X/Co111    | IPM · CEP · GM                       |
| S-1020     | B         | 1c          | 31                  | IPM · CEP · PIPC · GM                |
| S-1030     | B         | 10c         | 31/119X/Co111/Co118 | IPM · CEP                            |
| S-1046     | B         | 1c          | 21/119X/Co111/2     | IPM (H) · CEP · PIPC · GM            |
| S-1047     | B         | 1c          | 31/21/2             | IPM (H) · CEP · PIPC · GM (H) · OFLX |
| S-1051     | B         | 1c          | 21/Co111/2          | IPM (H) · CEP · PIPC · GM (H) · OFLX |
| S-1086     | B         | 1c          | 31/21/119X/Co111    | IPM (H) · CEP · PIPC · GM            |

IPM (H): high imipenem-resistance (MIC=100  $\mu$ g/ml); GM (H): high gentamicin-resistance (MIC>800  $\mu$ g/ml); CEP: cephalosporin-resistance

IPM: imipenem, CEP: cephalosporin, GM: gentamicin, PIPC: piperacillin, OFLX: ofloxacin

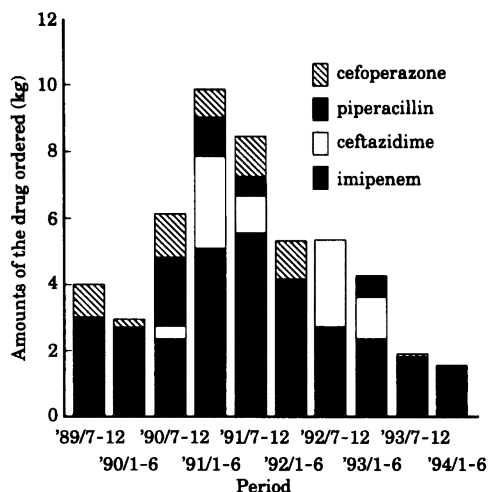


Fig. 5. Amounts of antipseudomonal agents used in the neurosurgical ward from July 1989 to June 1994.

膿菌性  $\beta$ -lactam 剤以外では CTM (半年間に 7 ~ 15 kg), CEZ (1 ~ 7 kg), FMOX (~3 kg) および LMOX (~3.5 kg) などが主に使用されていた。なお、FMOX の使用量は LMOX の使用量の減少ともない増加した。

### III. 考 察

緑膿菌における IPM 分解性  $\beta$ -lactamase の産生は、これまで報告例が少なく<sup>12,26)</sup> きわめてまれなことであるが、我々はたまたま同一病棟に入院中の異なる 9 名の患者から分離された緑膿菌が IPM 分解性  $\beta$ -lactamase を産生していることを見いだした。今回検討した IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌は、約 3 年間にわたって同一病棟に入院中のそれぞれ異なる患者から継続して分離されたこと、IPM に 100  $\mu$ g/ml の高度耐性を示しなおかつ広範囲の抗菌剤にも耐性を示す株が含まれていたこと、また、これら 9 株は分離時期が新しくなるにつれ多剤耐性化、高度耐性化する傾向が認められたことなど、これまでにない特殊な例と考えられた。

IPM 分解性  $\beta$ -lactamase の基質特異性および等電点を検討した結果、今回検討した 9 株は同一の酵素を産生していると考えられた。S-861 株から精製した酵素の性状は Watanabe ら<sup>12)</sup> の報告したものとほぼ一致しており、また、耐性伝達株から得た粗酵素の基質特異性は Watanabe ら<sup>12)</sup> および Osano ら<sup>20)</sup> の分離した metallo  $\beta$ -lactamase とほぼ一致した。さらに、いずれの酵素も EDTA 処理により酵素活性が失われたが、透析後に亜鉛イオン添加により活性の一部が回復した。以上の結果から今回検討した 9 株の IPM 分解性  $\beta$ -lactamase は class B<sup>23)</sup> あるいは function group 3<sup>24)</sup> に属する metallo  $\beta$ -lactamase と考えられた。

今回精製した酵素の性状に Osano ら<sup>20)</sup> および Marumo ら<sup>21)</sup> の報告した *S. marcescens* 由来の metallo  $\beta$ -lactamase と一部一致しない点が見られた。すなわち、Km 値および等電点である。今回得られたペニシリンの Km 値は Marumo ら<sup>21)</sup> の報告値と類似していたものの Osano ら<sup>20)</sup> の報告している値より大きかった。伊予部ら<sup>42)</sup> は、*P. aeruginosa* 由来の IPM 分解性  $\beta$ -lactamase の構造遺伝子の塩基配列は Osano ら<sup>20)</sup> の報告した酵素のものと完全に一致したと報告していることから、Km 値の不一致は、酵素反応条件の違いによる可能性が高いと考えられるが、詳細は不明である。また、我々の精製酵素の等電点は約 9.5 と推定されたが、Watanabe ら<sup>12)</sup> の報告値 (9.0)、Osano ら<sup>20)</sup> の報告値 (>9.5) および Marumo ら<sup>21)</sup> の報告値 (8.7) と異なっていた。これは pI が測定上限値に近い値であったためと考えている。

ところで、菌体内透過障壁にもとづく薬剤耐性は、効率的なクリアランス機構を伴うときに高度耐性となって発現するとされる<sup>43,44)</sup>。D 2 蛋白欠損による IPM の菌体内透過性の低下<sup>9-11,44,45)</sup> とクリアランス機構の  $\beta$ -lactamase の共存が IPM 耐性発現にとって必要であることがすでに指摘され<sup>43,45)</sup>、D 2 蛋白欠損は染色体性 CEPase と組み合わせられて初めて耐性値の上昇として

表現されると考えられている。我々<sup>36)</sup>はすでに D 2 蛋白欠損と IPM 分解性  $\beta$ -lactamase の共存が IPM 高度耐性をもたらすことを明らかにしている。今回検討した IPM 高度耐性の 5 株のいずれも IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生に D 2 蛋白欠損が加わったものであった。種々の濃度の IPM を用いた CEPase 誘導試験で、Livermore の報告<sup>40)</sup>と同様に D 2 欠損株における最高誘導量を得るための IPM 添加濃度が D 2 保有株より高いことが明らかになった。これは、D 2 欠損株での IPM の菌体内透過障害の存在を示していると考えられる。また、IPM の菌体内透過に拮抗すると言われる<sup>37)</sup>塩基性アミノ酸存在下に、D 2 保有株の MIC 値が D 2 欠損株と同レベルにまで上昇した。これらは、D 2 蛋白欠損が IPM の透過の減少をもたらし、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase の存在とともに高度耐性化をもたらすという考えを支持するものであろう。一方、興味深いことに塩基性アミノ酸が存在しない最少培地上では、D 2 蛋白を保有する IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生株の IPM に対する耐性値は標準株と同レベルであった。これは、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生による IPM 耐性発現にはなんらかの形で IPM の透過障害が必要なことを示していると考えられる。今回の我々の検討結果は、IPM 耐性発現における透過障害とクリアランス機構の関係を考える上で非常に示唆に富む成績と考えられる。

耐性伝達試験の結果から、IPM 耐性、CBPC 耐性およびセフェム耐性はプラスミド上にコードされている IPM 分解性  $\beta$ -lactamase にもとづくことが確認された。しかしながら、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌における PIPC 耐性および AZT 耐性は伝達せず、IPM 耐性、CBPC 耐性およびセフェム耐性とは耐性機作が異なっていた。すなわち、PIPC 耐性は染色体性の CEPase の脱抑制型産生によるものであった。緑膿菌では IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生を獲得することで PIPC 耐性は発現せず、また大腸菌でも耐性値の上昇は CAZ 程ではなかったが、精製酵素を用いた加水分解反応の解析では、PIPC の  $V_{max}/K_m$  は IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生で高度耐性化する CAZ と類似していた (Table 6)。本酵素に対しては、PIPC は CAZ に比べ必ずしも悪い基質ではなく、耐性値の上昇が CAZ 程度であっても不思議ではないと考えられる。PIPC におけるこのような discrepancy の原因としては、IPM で見られたような菌体内への透過性のファクターの関与も考えられるが、詳細は不明である。

今回分離した 9 株中には、血清型、ピオシン型、フェージ型および薬剤耐性パターンのすべてが一致した株は認められず、必ずしも同一株の病棟内感染とは考えられない結果であった。しかしながら、3 株では薬剤耐性パターンを除き各種性状が一致した。これは、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生プラスミドを獲得した菌

株が、D 2 欠損により IPM に高度耐性化し、さらに染色体性 CEPase 産生が脱抑制型に変化することにより PIPC にも耐性化し病棟内に広がった可能性を示唆しているとも考えられる。一方、IPM 耐性が伝達性プラスミド上にコードされていることが確認されたことから、病棟内において、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase をコードしたプラスミドが伝播した可能性も考えられた。また、伊予部ら<sup>40)</sup>および Arakawa ら<sup>40)</sup>が報告しているように IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 遺伝子がインテグロン機構を伴っていることから遺伝子上を移動している可能性も考えられる。事実、*S. marcescens* では染色体上およびプラスミド上の両方にその遺伝子が存在することが確かめられている<sup>20,27)</sup>。今回分離した 9 株の薬剤耐性プラスミドを比較検討することによって、IPM 分解性  $\beta$ -lactamase による  $\beta$ -lactam 剤耐性の伝播に関しさらに詳細な知見が得られるものと考えられる。

今回検討した 9 株では分離時期が新しいほど高度耐性化・多剤耐性化する傾向が見られた。このような薬剤耐性の進行は抗菌剤の使用量と関連していると考えられる。実際に薬剤使用量を調査した結果、これらの緑膿菌が分離された脳外科病棟においては、IPM を含む抗緑膿菌性抗菌剤の使用量が 1990 年から急増し、特に 9 株中 6 株が分離された 1991 年の IPM 使用量は調査期間中もっとも多くなっていた。また、S-1086 株が分離された 1992 年以後は、IPM を含めた抗緑膿菌性抗菌剤全体の使用量が減少しており、また新たな IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生株も分離されていない。これらは、IPM の高度耐性化や IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生株の分離株数の増加が薬剤の使用量に関連している可能性を強く示唆する成績といえよう。しかし、調査期間中においては、PIPC の使用量に特に大きな変化はなく、また、AZT は 1992 年に少量使用されただけであり、PIPC および AZT 耐性菌の出現と薬剤使用量との間に明確な関連はなかった。また、程度はわずかであるが、キノロン剤の OFLX に対する感受性が低下した。この病棟ではキノロン剤の使用実績がなく、キノロン剤の低感受性化がどのような機作によるのか興味を持たれる。本病棟の入院患者は、その病態の性質上入院が長期にわたり、またしばしば感染を繰り返すことから、抗菌化学療法を受ける機会が他の病棟の患者より多いと考えられる。上述した薬剤使用量に加え、このような入院患者の特性も耐性菌出現の要因になっている可能性が考えられる。なお、現在も同じ病院で分離される緑膿菌について引き続き調査を継続しているが、1992 年 1 月に S-1086 株を分離後現在 (1995 年 6 月) まで、新たな IPM 分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌は分離されていない。幸いなことに一過性の流行であったものと思われる。

以上、同一病棟内より継続的に分離されたイミベネ

ム分解性  $\beta$ -lactamase 産生緑膿菌の諸性状について報告した。最近、新規なカルバペネム剤が臨床導入されており、この種の薬剤の使用機会の増大が予想されることから、今後とも耐性菌の動向には十分な注意が必要であろう。

(本論文は上田賞受賞者論文として既報<sup>26, 47)</sup>に新たなデータを加え作成したものである)

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、貴重なご助言を賜りました富山化学工業株式会社総合研究所 渡辺泰雄、成田弘和両博士に、また、研究遂行にあたって常日頃叱咤激励していただきました才川勇博士に心より御礼申し上げます。さらに、貴重な菌株をご提供頂きました名古屋大学医学部細菌学教室荒川宜親助教授に深謝いたします。なお、本研究は、富山化学工業株式会社総合研究所 荒木春美博士、山田尚氏、大懸直子氏、堀井妙子氏、前花淳子氏、松村尚樹氏、村谷哲郎氏の諸氏の協力のもとに、上田記念感染症・化学療法研究奨励基金からの援助により達成されたことを付記し、心より感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Cometta A, et al.: Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1309~1313, 1994
- 2) Grayson M L, Gibbons G W, Habershow G M, Freeman D V, Pomposelli F B, Rosenblum B I, Levin E, Karchmer A W: Use of ampicillin/sulbactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of limb-threatening foot infections in diabetic patients. *Clin Infect Dis* 18: 683~693, 1994
- 3) Asensi F, Otero M C, Perez-Tamarit D, Rodriguez-Escribano I, Cabedo J L, Gresa S, Canton E: Risk/benefit in the treatment of children with imipenem-cilastatin for meningitis caused by penicillin-resistant pneumococcus. *J Antimicrob Chemother* 5: 133~134, 1993
- 4) Fink M P, et al.: Treatment of severe pneumoniae in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 547~557, 1994
- 5) 高本正祇, 他: 呼吸器感染症に対する imipenem/cilastatin sodium の単独療法と amikacin sulfate との併用療法の臨床的比較検討. *Jpn J Antibiotics* 47: 1131~1144, 1994
- 6) 高橋公毅, 渡辺正治, 菅野重治: Imipenem 耐性緑膿菌の分離状況および ceftazidime と imipenem または ofloxacin の併用効果. *Chemotherapy* 40: 1201~1207, 1992
- 7) 草場耕二, 柿添侑子, 山田尚友, 田辺一郎, 永沢善三, 植田 寛, 田島 裕, 只野壽太郎, 加藤 収, 山田穂積: 当院における各種薬剤耐性緑膿菌の分離頻度について. *Chemotherapy* 42: 147~157, 1994
- 8) 猪狩 淳, 小栗豊子: 臨床分離株の抗菌薬感受性一

イミペネムを中心とした全国サーベイ成績一. 第 40 回日本化学療法学会総会講演抄録 pp 158, 1992

- 9) Buscher K-H, Cullmann W, Dick W, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 703~708, 1987
- 10) Yoneyama H, Nakae T: Cloning of the protein D 2 gene of *Pseudomonas aeruginosa* and its function expression in the imipenem-resistant host. *FEBS Lett* 283: 177~179, 1991
- 11) Gotoh N, Nishino T: Decrease of the susceptibility to low molecular weight  $\beta$ -lactam antibiotics in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: role of outer membrane protein D2 in their diffusion. *J Antimicrob Chemother* 25: 191~198, 1990
- 12) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 147~151, 1991
- 13) Bandoh K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato K, Ueno K: Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteriodes fragilis*. *J Antibiotics* 45: 542~547, 1992
- 14) Cuchural G J Jr, Malamy M H, Tally F P:  $\beta$ -Lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteriodes fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 645~648, 1986
- 15) Rasmussen B A, Gluzman Y, Tally F P: Cloning and sequencing of class B  $\beta$ -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteriodes fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1590~1592, 1990
- 16) Rasmussen B A, Yang Y, Jacobus N, Bush K: Contribution of enzymatic properties, cell permeability, and enzyme expression to microbiological activities of  $\beta$ -lactams in three *Bacteriodes fragilis* isolates that harbor a metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2116~2120, 1994
- 17) Yotsuji A, Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S: Properties of a novel  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteriodes fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 24: 925~929, 1983.
- 18) Massidda O, Rossolini G M, Satta G: The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 173: 4611~4617, 1991
- 19) Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of an inducible penicillinase from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 22: 564~570, 1982
- 20) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N: Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 71~78, 1994
- 21) Marumo K, Takeda A, Nakamura Y, Nakaya K: Purification and characterization of metallo- $\beta$ -lac-

- tamase from *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol* 39: 27~33, 1995
- 22) Ambler R P: The structure of β-lactamases. *Philos Trans R Soc. Lond B Biol Sci* 289: 321~331, 1980
  - 23) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211~1233, 1995
  - 24) Livermore D M: Carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 29: 609~616, 1992
  - 25) Mitsuhashi S, Minami S, Yotsuji A, Sato K, Inoue E: Properties of the extended-spectrum zinc-dependent β-lactamase. *Episome Rep. Med. Sci* 5: 7~12, 1995
  - 26) Minami S, Araki H, Yasuda T, Akama M, Iyobe S, Mitsuhashi S: High-level imipenem resistance associated with imipenem-hydrolyzing β-lactamase production and outer membrane alteration in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International J Exper Clin Chemother* 6: 21~28, 1993
  - 27) Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M: Plasmid-mediated dissemination of the metallo-β-lactamase gene bla<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 824~829, 1995
  - 28) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989
  - 29) Yaginuma S, Sawai T, Ono H, Yamagishi S, Mitsuhashi S: Biological properties of a cephalosporin β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Japan J Microbiol* 17: 141~149, 1973
  - 30) Coleman K, Griffin D R J, Page J W J, Upshon P A: In vitro evaluation of BRL 42715, a novel β-lactamase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1580~1587, 1989.
  - 31) 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
  - 32) Waley S G: A spectrophotometric assay of β-lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139: 780~789, 1974
  - 33) Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S: Induction of β-lactamase production by various β-lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 382~385, 1980
  - 34) 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
  - 35) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680~685, 1970.
  - 36) Trias J, Dufresne J J, Levesque R C, Nikaido H: Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1201~1206, 1989
  - 37) Fukuoka T, Masuda N, Takenouchi T, Sekine N, Iijima M, Ohya S: Increase in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenem antibiotics in low-aminoacid media. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 529~532, 1991
  - 38) Kato T, Sato Y, Iyobe S, Mitsuhashi S: Plasmid-mediated gentamicin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and its lack of expression in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 358~363, 1982
  - 39) Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557~580, 1983
  - 40) Bergan T: Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Methods in Microbiology* vol. 10 (Bergan T, Norris J R ed), p 169~199, Academic Press, London, 1978.
  - 41) Gillies R R, Govan J R W: Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. *J Path Bact* 91: 339~345, 1966
  - 42) 伊予部志津子, 山田 尚: 緑膿菌における Extended-spectrum β-lactamase インテグロン. *細菌学雑誌* 50: 198, 1995
  - 43) Livermore D M: Permeation of β-lactam antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and other gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 10: 691~698, 1988
  - 44) Lee E H, Nicolas N H, Kitzis M D, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L: Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1093~1098, 1991
  - 45) Livermore D M: Interplay of impermeability and chromosomal β-lactamase activity in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2046~2048, 1992
  - 46) Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M: A novel integron-like element carrying the metallo-β-lactamase gene bla<sub>IMP</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (7): 1612~1615, 1995
  - 47) Minami S, Akama M, Araki H, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, Mitsuhashi S: Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmid coding for class B β-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 37: 433~444, 1996

## Studies on imipenem- and cephem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying class B $\beta$ -lactamase plasmid

Shinzaburo Minami<sup>1)</sup>, Minori Akama<sup>2)</sup>, Shizuko Iyobe<sup>3)</sup>  
and Susumu Mitsuhashi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimo-okui, Toyama City, Toyama, Japan

<sup>2)</sup> Toyama City hospital

<sup>3)</sup> Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University

<sup>4)</sup> Episome Institute

From October 1988 to January 1992, 9 strains of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a transferable plasmid encoding imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (pI = approx. 9.5) were isolated from 9 different patients hospitalized in the neurosurgical ward of Toyama City Hospital. Six strains were isolated in 1991, and the amount of antipseudomonal agents (especially imipenem) used in the neurosurgical ward increased considerably during the same year. All strains were resistant to imipenem, carbenicillin and antipseudomonal cepheims such as ceftazidime, cefsulodin, cefpirome, etc.; 4 strains of were susceptible to piperacillin and 5 to aztreonam. The imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase appeared to be zinc-dependent class B  $\beta$ -lactamase with a molecular weigh of 28,000, pI of 9.5 and broad substrate specificities similar to those of the metallo- $\beta$ -lactamase from *P. aeruginosa* (Watanabe et al., 1991) and *Serratia marcescens* TN 9106 (Osano et al., 1994). The gene encoding imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase was located on the transferable plasmid of each isolate. The manner of production of these enzymes was constitutive. Both low-level imipenem- and high-level cephem-resistance were cotransferred to *P. aeruginosa* with the production of metallo- $\beta$ -lactamase, but piperacillin-, aztreonam-, and high-level imipenem-resistance were not. *Escherichia coli* harboring recombinant plasmid encoding imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase exhibited a pattern of resistance similar to that of transconjugants of *P. aeruginosa*. Production of chromosomal cephalosporinase in piperacillin-resistant strains was derepressed, and production of outer membrain protein of D2 was diminished in highly imipenem resistant strains. The serotype of all 9 strains was type B, but only 3 strains of them had the same serotype, pyocin-type and phage type. Above results suggest that the continuous isolation of imipenem- and cephem-resistant *P. aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase was related to the use of the antipseudomonal  $\beta$ -lactam agents such as imipenem.