

## 【原著・基礎】

*Pseudomonas aeruginosa* におけるβ-ラクタム系薬耐性菌出現の検討

堀 りつ子・松村 尚樹・大懸 直子・荒木 春美・南 新三郎

富山化学工業株式会社総合研究所\*

(平成 12 年 5 月 25 日受付・平成 12 年 7 月 3 日受理)

β-ラクタム系薬感受性の臨床分離株である *Pseudomonas aeruginosa* S-1278 を用いて、4 種のβ-ラクタム系薬 (piperacillin (PIPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), ceftazidime (CAZ) および imipenem (IPM)) 作用時の耐性菌出現についてラット pouch 内感染モデルを用いて検討した。ラット pouch 内に *P. aeruginosa* S-1278 を感染させ、各薬剤 20 および 100 mg/kg を 1 回静脈内投与した時の pouch 内耐性菌出現頻度は PIPC および TAZ/PIPC 投与群では  $<1.0 \times 10^{-6} \sim 3.7 \times 10^{-6}$  で、CAZ, IPM 投与群 ( $2.4 \times 10^{-5} \sim 7.5 \times 10^{-5}$ ) より低かった。また、3 回の投与により CAZ 投与群で耐性菌出現頻度の著しい上昇が認められ、もっとも高い出現頻度 ( $4.7 \times 10^{-2} \sim 2.1 \times 10^{-1}$ ) を示した。*P. aeruginosa* S-1278 における *in vitro* 耐性菌出現頻度は薬剤により大きな違いは認められなかったが、CAZ では他剤に比べて広い濃度域で耐性菌を選択した。以上、ラット pouch 内感染モデルにおける PIPC の耐性菌出現頻度は、TAZ/PIPC と同程度で、CAZ および IPM より低かった。

**Key words:** 緑膿菌, β-ラクタム系薬, 耐性菌出現頻度, 脱抑制型変異株, ラット pouch 内感染モデル

*Pseudomonas aeruginosa* は感染症の重要な起因菌の 1 つであり、多数のβ-ラクタム系薬に対し、自然耐性および獲得耐性を示す。この耐性機構としては、β-lactamase 産生、ペニシリン結合蛋白 (PBPs) の変化および外膜透過性の低下などが知られており、単独およびこれらの組み合わせの結果として耐性がもたらされる<sup>1)</sup>。このうちβ-lactamase 産生はグラム陰性菌の主要な耐性機構であり、近年、β-lactamase 産生様式が誘導型から構成型に変化することにより、β-ラクタム系薬に多剤耐性化した脱抑制型変異株 (drd mutant) の出現が問題となっている<sup>2-6)</sup>。この drd mutant がβ-ラクタム系薬による治療中に出現することも報告されており、治療の不成功や感染の再発につながる事が懸念されている<sup>3)</sup>。また、透過性の低下による耐性発現については、imipenem (IPM) 作用時における外膜蛋白 D2 の欠損によるものが知られている<sup>7,8)</sup>。

耐性菌出現頻度は薬剤の種類やその作用濃度、作用時間、あるいは菌種、菌株によっても異なると考えられ、β-lactamase に安定で親和性の低いβ-ラクタム系薬は耐性菌を選択しにくいと報告されている<sup>9)</sup>。またβ-lactamase 誘導能の低いβ-ラクタム系薬は drd mutant を選択しやすいことも報告されている<sup>10)</sup>。今回、β-ラクタム系薬感受性の *P. aeruginosa* S-1278 を用い、piperacillin (PIPC)、PIPC にβ-lactamase 阻害剤 tazobactam を配合 (TAZ: PIPC=1:4) した tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)、ceftazidime (CAZ) および IPM 作用時の耐性菌出現について *in vitro* および *in vivo* 試験系で検討したので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤

PIPC (富山化学工業)、TAZ/PIPC (富山化学工業)、CAZ (日本グラクソ) および IPM (萬有製薬) を使用した。また、β-lactamase 活性測定のため、cephaloridine (CER: 日本グラクソ) を使用した。

## 2. 使用菌株

β-ラクタム系薬感受性の臨床分離株 *P. aeruginosa* S-1278 を使用した。なお、本菌株は非誘導時にはほとんどβ-lactamase を産生しない ( $<0.1$  unit/mg protein) 誘導型β-lactamase 産生株である。

## 3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法<sup>11)</sup>に準じ、寒天平板希釈法で MIC を測定した。前培養液には Mueller-Hinton broth (MHB; Difco) を、感受性測定培地には Mueller-Hinton agar (MHA; Difco) を用いた。なお、一夜培養した菌液を生理食塩液で 500 倍に希釈し、これを  $10^6$  cells/mL の菌液として薬剤含有平板に 50 μL 接種した。

## 4. 自然耐性菌出現頻度

Brain heart infusion broth (BHIB; 栄研) 中で 37℃、一夜培養した菌液 (約  $10^9$  CFU/mL) の 10 倍希釈系列を生理食塩液を用いて作製し、そのそれぞれから 0.05 mL を、薬剤含有 MHA 平板 (薬剤濃度:  $4 \sim 32 \times \text{MIC}$ ) に塗布した。37℃ で 2 日間培養後、生じたコロニー数を測定した。また、各薬剤含有平板から無作為にコロニーを選んで MIC を測定し、耐性コロニーの MIC が親株より 4 倍以上上昇していることを確認し、薬剤非含

有平板の生菌数に対する薬剤含有平板の耐性コロニー数から耐性菌出現頻度を算出した。

#### 5. 浸出性無菌炎症 pouch の作製

Selye の方法<sup>12)</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、この空気嚢に 1% クロトン油を含有する綿実油 1 mL を注入した。翌日空気嚢の空気を抜き無菌性浸出性炎症を惹起させた。Pouch 作製から 15 日目のラット (体重 200~250 g) を実験に使用した。

#### 6. Pouch 内耐性菌出現頻度

BHIB 中で 37℃ 一夜培養した菌液 (約  $10^9$  CFU/mL) を、10% gastric mucin (半井化学) で 10 倍に希釈し、その 1 mL をラット pouch 内に接種した。次に、PIPC, TAZ/PIPC, CAZ, IPM の 20 あるいは 100 mg/kg を 1 回 (感染 2 時間後) および 3 回 (感染 2, 24, 48 時間後) 静脈内投与し、最終薬剤投与の 24 時間後に pouch 内浸出液を採取した。得られた浸出液を前記同様に薬剤非含有 MHA 平板および薬剤含有平板 (PIPC および TAZ/PIPC 投与では PIPC の 4×MIC, CAZ 投与では CAZ の 4×MIC, IPM 投与では IPM の 4×MIC) に塗布し、薬剤非含有平板の生菌数に対する薬剤含有平板の耐性コロニー数から pouch 内の耐性菌出現頻度を求めた。

#### 7. Pouch 内薬剤濃度の測定

*P. aeruginosa* S-1278 をラット pouch 内に接種した 2 時間後に PIPC, TAZ/PIPC, CAZ, IPM の 20 および 100 mg/kg を静脈内投与した。薬剤投与 1, 2, 4, 6 時間後に pouch 内浸出液を採取した。PIPC では *Micrococcus luteus* ATCC 9341, CAZ では *Proteus mirabilis* ATCC 21100, IPM では *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いる bioassay 法により、pouch 内薬剤濃度を測定した。

#### 8. 薬剤作用後の耐性菌出現頻度

BHIB で 37℃ 一夜培養した菌液を各薬剤の 0.39~50  $\mu$ g/mL を含む新鮮な BHIB に接種し、37℃ で静置培養した。この菌液を 24 時間後に採取し、前記同様、薬剤非含有 MHA 平板および薬剤含有平板 (PIPC および TAZ/PIPC 作用では PIPC の 4×MIC, CAZ 作用では CAZ の 4×MIC, IPM 作用では IPM の 4×MIC) に塗布し、薬剤非含有平板の生菌数に対する薬剤含有平板の耐性コロニー数から耐性菌出現頻度を算出した。

#### 9. 耐性コロニーの $\beta$ -lactamase 産生

上記 4 および 6 で得られた各耐性株を BHIB 中で 37℃、一夜培養後、新鮮な BHIB で 10 倍に希釈し、37℃ で 4 時間振盪培養した。遠心分離 (4℃, 1,000×g, 30 分) により集菌後、0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) で菌体を 2 回洗浄後、適量の同 PB に懸濁し、Ultrasonicator (Tomy-Seiko) により冷却下で超音波破碎した。この破碎液の遠心分離 (4℃, 10,000×g, 30 分) 上清を粗酵素液とし、粗酵素液中の  $\beta$ -lactamase 活性と蛋白濃度を測定した。 $\beta$ -lactamase 活性を CER (100  $\mu$ M) を基質とする UV 法<sup>13)</sup>により、蛋白濃度を bovine serum albumin を標準品とする Lowry 法<sup>14)</sup>により測定した。 $\beta$ -lactamase 活性を比活性 (unit/mg protein) で表し、1 unit を 0.05 M PB (pH 7.0) 中 37℃ で 1 分間に 1  $\mu$ mol の基質を分解するのに必要な酵素量とした。

## II. 結 果

### 1. Pouch 内耐性菌出現頻度

Pouch 内に *P. aeruginosa* S-1278 を感染させたラットに各薬剤を静脈内投与し、pouch 内の耐性菌出現頻度を調べた成績を Fig. 1 に示す。PIPC, TAZ/PIPC 20 mg/kg 投与後の耐性菌出現頻度は control 同様、 $1.0 \times 10^{-6}$  以下であった。100 mg/kg 投与では  $3.7 \times 10^{-6}$ ~ $5.6 \times 10^{-5}$

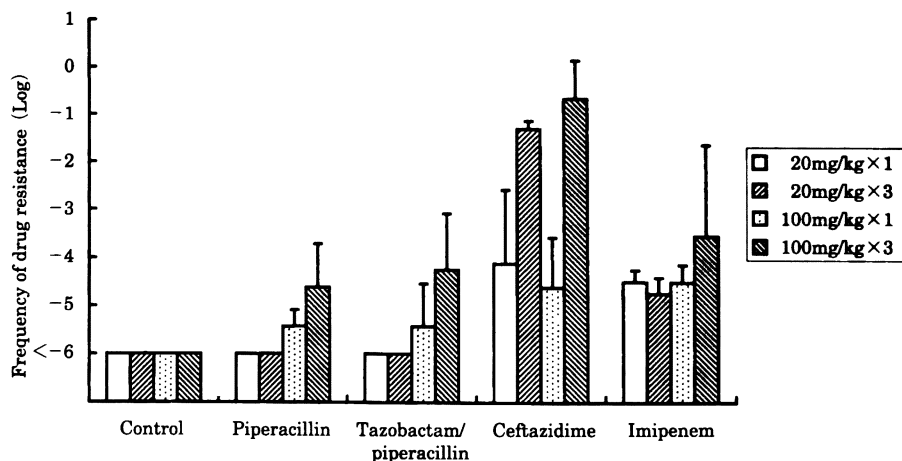


Fig. 1. Frequency of drug resistance in rat pouch infected with *Pseudomonas aeruginosa* S-1278.

に上昇したが、PIPCとTAZ/PIPCの間に大きな差は認められなかった。CAZでは耐性菌出現頻度はPIPCおよびTAZ/PIPCに比べ、いずれも上昇し、20および100 mg/kgの1回投与で $2.4\sim 7.5\times 10^{-5}$ 、3回投与では $4.7\times 10^{-3}\sim 2.1\times 10^{-1}$ であり、3回投与時に著しい上昇がみられた。IPMでは20および100 mg/kgの1回または3回投与時の耐性菌出現頻度は $1.8\times 10^{-5}\sim 2.8\times 10^{-4}$ であり、いずれもPIPCおよびTAZ/PIPCより高かった。なお、データは示さないが、pouch内生菌数はいずれも $10^7\sim 10^8$  cells/mLであり、大きな変化はみられなかった。また、各薬剤20および100 mg/kg投与後のpouch内濃度はいずれも投与1時間後に最高濃度を示し、PIPCでは0.69および5.60 μg/mL、TAZ/PIPCでは $\leq 0.78$ および5.62 μg/mL (PIPC濃度)、CAZでは2.92および12.3 μg/mL、IPMでは1.48および12.1 μg/mLであった。

## 2. 自然耐性株出現頻度

*P. aeruginosa* S-1278の培養液を、4~32×MICの各薬剤含有平板に塗布した時の自然耐性株出現頻度をTable 1に示す。自然耐性株出現頻度は、PIPCでは $<1.4\times 10^{-8}\sim 2.8\times 10^{-6}$ 、TAZ/PIPCでは $4.2\times 10^{-6}\sim 2.7\times 10^{-6}$ 、CAZでは $1.7\times 10^{-7}\sim 2.8\times 10^{-6}$ 、IPMでは $<1.4\times 10^{-8}\sim 5.6\times 10^{-7}$ であった。CAZの32×MIC作用時の自然耐性株出現頻度は、他剤に比べて高かった。またIPMの8×MIC以上では、自然耐性株は得られなかった。

## 3. 自然耐性コロニーの薬剤感受性

各薬剤含有平板に生育した耐性コロニーのMICを測定し、親株と比較した成績をTable 2に示す。耐性コロニーのMICは、PIPCおよびTAZ/PIPCではほとんどが親株の16倍、CAZでは32倍、IPMでは8倍に上昇していた。なお、PIPC、TAZ/PIPC、CAZ耐性コロニ

ーはこれら3薬剤のいずれに対しても耐性化していたが、IPMのMICは変わらなかった。またIPM耐性コロニーは、PIPC、TAZ/PIPC、CAZに対し、耐性化していなかった。なお、選択時の薬剤濃度による耐性コロニーのMIC上昇程度の違いはいずれの薬剤においても認められなかった。

## 4. 薬剤作用後の耐性菌出現頻度

*P. aeruginosa* S-1278株の培養液中に0.39~50 μg/mLとなるよう各薬剤を添加し、24時間後に耐性菌出現頻度を調べた成績をFig. 2に示す。PIPC、TAZ/PIPCでは6.25および12.5 μg/mL、CAZでは0.78~12.5 μg/mL作用で出現頻度が著しく上昇した。またIPMでは3.13~12.5 μg/mL作用で耐性菌が認められたが、出現頻度は $10^{-4}\sim 10^{-5}$ であった。なお、培養液中の生菌数はいずれも $10^8\sim 10^9$  CFU/mLであった。

## 5. 耐性コロニーのβ-lactamase産生

*In vitro* および*in vivo* で得られた耐性コロニーについて、非誘導時のβ-lactamase活性を測定し、親株と比較した成績をTable 3に示す。PIPC、TAZ/PIPC、CAZ作用で得られた耐性コロニーの非誘導時β-lactamase活性は親株(0.003 units/mg protein)より5~500倍高く、30~50倍に上昇した株が多かった。IPM作用で得られた耐性株のβ-lactamase活性は親株と変わらなかった。

## III. 考 察

*P. aeruginosa* においてはβ-lactamase産生、PBPの変異、透過性の低下などによる耐性菌が増加している。β-ラクタム系薬およびキノロン薬治療中に耐性菌が出現したとの報告もあり、治療上問題となっている<sup>3,10</sup>。今回、β-lactamase誘導能が低いPIPC、中等度のCAZ、高いIPM<sup>10</sup>を選び、耐性菌出現頻度を*in vitro*

Table 1. Frequency of drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* S-1278

Drug for selection	MIC (μg/mL)	Mutational frequency with drug at			
		4×MIC	8×MIC	16×MIC	32×MIC
Piperacillin	3.13	$2.8\times 10^{-6}$	$9.9\times 10^{-7}$	$2.8\times 10^{-7}$	$<1.4\times 10^{-8}$
Tazobactam/Piperacillin	3.13	$2.7\times 10^{-6}$	$9.9\times 10^{-7}$	$8.5\times 10^{-8}$	$4.2\times 10^{-8}$
Ceftazidime	1.56	$2.8\times 10^{-6}$	$1.8\times 10^{-6}$	$1.7\times 10^{-7}$	$1.7\times 10^{-7}$
Imipenem	1.56	$5.6\times 10^{-7}$	$<1.4\times 10^{-8}$	$<1.4\times 10^{-8}$	$<1.4\times 10^{-8}$

Table 2. Susceptibility of resistant mutants from *Pseudomonas aeruginosa* S-1278

Drug for selection	No. of mutants tested	% of mutants with increased MIC at following times of parent MICs:				
		4	8	16	32	64
Piperacillin	28	7	0	79	0	14
Tazobactam/piperacillin	23	0	9	78	13	0
Ceftazidime	33	3	3	9	82	3
Imipenem	13	23	77	0	0	0

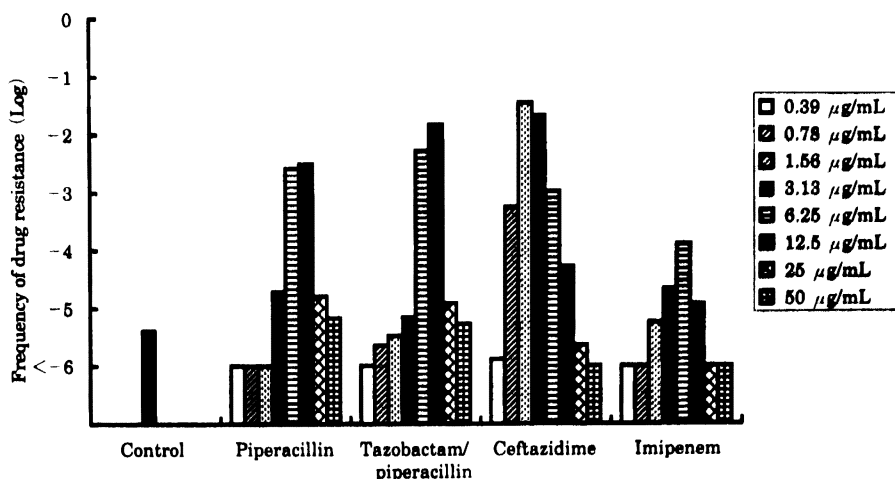


Fig. 2. Frequency of drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* S-1278 culture.

Table 3.  $\beta$ -lactamase levels of uninduced cells of resistant mutants from *Pseudomonas aeruginosa* S-1278

Drug for selection	<i>in vitro</i> or <i>in vivo</i>	No. of mutants tested	No. of mutants with increased $\beta$ -lactamase levels at following times of parent level <sup>a</sup>			
			<5	$\geq 5$ -<25	$\geq 25$ -<125	$\geq 125$ -<500
Piperacillin	<i>in vitro</i>	11	0	2	8	1
	<i>in vivo</i>	5	0	2	3	0
Tazobactam/piperacillin	<i>in vitro</i>	12	0	0	8	4
	<i>in vivo</i>	5	0	1	4	0
Ceftazidime	<i>in vitro</i>	12	0	0	9	3
	<i>in vivo</i>	5	0	0	5	0
Imipenem	<i>in vitro</i>	11	11	0	0	0
	<i>in vivo</i>	5	5	0	0	0

<sup>a</sup> $\beta$ -lactamase activity of uninduced cells of parent (*P. aeruginosa* S-1278): 0.003 units/mg protein

および *in vivo* において検討した。また TAZ/PIPC についても耐性菌出現頻度を PIPC と比較検討し、 $\beta$ -lactamase 阻害剤配合の影響を検討した。使用菌株として 1 種類の cephalosporinase (CEPase) を誘導的に産生し、用いた 4 薬剤すべてに感受性を示す *P. aeruginosa* S-1278 を選択した。

Fung-Tomc らは *P. aeruginosa* において、CAZ, ceftaxime が  $10^{-5}$ ~ $10^{-10}$  の頻度で drd mutant を生じたと報告している<sup>17)</sup>。各種グラム陰性菌の drd mutant 出現頻度については、これまで  $10^{-5}$ ~ $10^{-10}$  であるとの報告が多い<sup>18-21)</sup>。今回の成績も CAZ では  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$ 、PIPC および TAZ/PIPC では  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$  であり、これまでの報告に類似していた。

CAZ の自然耐性株出現頻度は低濃度では PIPC および TAZ/PIPC と同程度であったが、高濃度では PIPC および TAZ/PIPC に比較し、高かった。これは CAZ では PIPC および TAZ/PIPC に比較し、耐性株における MIC 上昇が大きく、広い濃度範囲で耐性株が生育可能であることが一因であると考えられる。選択濃度が低い場合には耐性菌出現頻度に大きな差がなかったことや

PIPC, TAZ/PIPC, CAZ に突然変異誘発活性が知られていないことから、 $32\times$ MIC における耐性菌出現頻度の違いは耐性株と親株との MIC の開きの差によるものと考えられた。

また、今回の検討において PIPC と TAZ/PIPC の自然耐性株出現頻度および得られた耐性株の MIC 上昇程度に大きな違いは認められず、 $\beta$ -lactamase 阻害剤配合の影響は認められなかった。しかし、PIPC では MIC が 64 倍に上昇した株が 14% 認められたのに対し、TAZ/PIPC では認められなかった。またデータは示さないが、これらの株に対する TAZ/PIPC の MIC は PIPC に比較して低かった。一般に PIPC は誘導型  $\beta$ -lactamase を産生するグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示し、今回使用した S-1278 株のように PIPC と TAZ/PIPC の MIC に差がない。しかし、drd mutant に変化すると大量の  $\beta$ -lactamase がペリプラスム内に存在することから  $\beta$ -lactamase 阻害剤配合の効果が現れ、MIC が PIPC に比べて TAZ/PIPC では低かったものと考えられる。

Buscher らは *P. aeruginosa* における IPM  $2\times$ MIC

作用時の自然耐性株出現頻度は $10^{-5}$ ~ $10^{-8}$ であり、PIPC, CAZ および AZT と同程度であると報告している<sup>7)</sup>。また IPM 作用により得られた耐性株は膜蛋白の変異株であることから、他剤とは交叉耐性を示さず、MIC 上昇も小さかったと報告している<sup>7)</sup>。今回の検討においても、4×MIC 作用時の自然耐性株出現頻度は PIPC, TAZ/PIPC および CAZ と同程度であった。また、IPM 耐性株では MIC 上昇が 4~8 倍にとどまっておき、PIPC, TAZ/PIPC, CAZ との交叉耐性を示さなかった。しかし、8×MIC 以上では耐性株の MIC 上昇の小さい IPM では耐性株が選択されにくく、自然耐性株出現頻度が低かったものと考えられる。

さらに、長時間にわたって高菌量が残存し、経時的に同一個体からのサンプリングが可能なラット pouch 内感染モデルを用い、*in vivo* での耐性菌出現についても検討を加えた。その結果、CAZ 投与時に高頻度に耐性菌が出現し、連投によりさらに *drd* mutant 出現頻度が高くなった。この原因を調べるため、0.39~50 μg/mL の各薬剤を含有する液体培地中で菌を培養し、耐性菌出現頻度を測定したところ、CAZ では他剤に比べ、より広い濃度域で耐性菌を選択した。このことに加え、CAZ では pouch 内濃度が他剤より高く推移したことから、耐性菌を選択する濃度を持続する時間が長く、*in vivo* での耐性菌出現頻度が高かったものと考えられた。

以上、*P. aeruginosa* における耐性菌出現を検討した結果、*in vitro* では耐性菌出現頻度に薬剤による大きな違いは認められなかったが、*in vivo* における PIPC 投与後の耐性菌出現頻度は TAZ/PIPC と同程度で CAZ および IPM より低かった。

#### 文 献

- 1) Neu H C: Current mechanisms of resistance to antimicrobial agent in microorganisms causing infection in the patient at risk for infection. *Am. J. Med.* 76 (6 A): 11, 1984
- 2) Sanders C C: Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β-lactam antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 573~593, 1987
- 3) Sanders C C, Sanders W E Jr, Goering R V: Microbial resistance to newer generation β-lactam antibiotics: Clinical and laboratory implications. *J. Infect. Dis.* 151: 399~406, 1985
- 4) Giwercman B, Lambert P A, Rosdah V T et al.: Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to *in vivo* selection of partially derepressed β-lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 247~259, 1990
- 5) Chandrasekar P H, Crane L R, Bailey E J: Comparison of the activity of antibiotic combinations *in vitro* with clinical outcome and resistance emergence in serious infection by *Pseudomonas aeruginosa* in non-neutropic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 321~329, 1987
- 6) Letendre E D, Mantha R, Turgeon P L: Selection of resistance by piperacillin during *Pseudomonas aeruginosa* endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 557~562, 1988
- 7) Bucher K H, Cullmann W, Dick W, et al.: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agent Chemother.* 21: 703~708, 1987
- 8) Trias J, Nikaido H: Outer membrane protein D 2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 34: 52~57, 1990
- 9) Watanabe N, Katsu K: Cefclidin (E 1040), a novel cephalosporin: lack of selection of β-lactamase overproducing mutants in an *in vitro* pharmacokinetic models system. *J. Antibiot.* 45: 1335~1345, 1992
- 10) 上田 泰, 清水喜八郎: 耐性機序。β-ラクタム系薬, p.32~47, 南江堂, 東京, 1987
- 11) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 12) Selye H: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphagocytic corticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 328~333, 1953
- 13) Waley S G: A spectrophotometric assay of β-lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780~781, 1974
- 14) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 15) Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos G M, et al.: Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1379~1382, 1999
- 16) 南新三郎, 荒木春美, 山田 尚, 他: Tazobactam/Piperacillin の *in vitro*, *in vivo* 抗菌活性。 *Chemotherapy* 42 (S-2): 164~177, 1994
- 17) Fung-Tomc J, Huczko E, Pearce M, et al.: Frequency of *in vitro* resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefepime, ceftazidime and cefotaxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1443~1445, 1988
- 18) Livermore D M: Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 439~445, 1987
- 19) Aronoff S C: Derepressed beta-lactamase production as a mediator of high level beta-lactam resistance in *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr. Pulmonol.* 4: 72~77, 1988
- 20) Yang Y J, Livermore D M: Chromosomal beta-lactamase expression and resistance to beta-lactam antibiotics in *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1385~1391, 1988
- 21) Piddock L J, Griggs D J: Selection and characterization of cefepime-resistant gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 669~676, 1991

## Emergence of $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Ritsuko Hori, Naoki Matsumura, Naoko Ogake,  
Harumi Araki and Shinzaburo Minami

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

The emergence of  $\beta$ -lactam resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* S-1278, a clinical isolate susceptible to  $\beta$ -lactams, was investigated in a rat pouch infection model using 4  $\beta$ -lactam antibiotics: piperacillin (PIPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), ceftazidime (CAZ), and imipenem (IPM). After intravenous administration of 20 and 100 mg/kg of each drug in the rat pouch infection model, the frequency of mutants resistant to PIPC and TAZ/PIPC were  $< 1.0 \times 10^{-6}$  to  $3.7 \times 10^{-6}$ ; lower than those of CAZ and IPM ( $2.4 \times 10^{-6}$  to  $7.5 \times 10^{-6}$ ). The frequency of mutants resistant to CAZ increased drastically after 3 administrations, and its frequency ( $4.7 \times 10^{-2}$  to  $2.1 \times 10^{-1}$ ) was the highest. No significant difference of frequency of resistant mutants was seen among the 4  $\beta$ -lactam antibiotics *in vitro*, but CAZ selected resistant mutants in a wider concentration than in other antibiotics. In conclusion, the frequency of mutants resistant to PIPC was comparable to that of TAZ/PIPC, and was lower than for CAZ and IPM in the rat pouch infection model.