

グラム陰性桿菌の Bicyclomycin 耐性と R 因子

深 田 志 計 実・横 田 健

順天堂大学医学部細菌学教室

(昭和 50 年 11 月 27 日受付)

はじめに

Bicyclomycin は藤沢薬品工業株式会社, 中央研究所において *Streptomyces sapporonensis* ATCC 21532 の培養液から発見, 精製された新抗生物質¹⁾で, Fig. 1 に示すとおり, アミノ酸が二重に環状結合した特異な化学構造を有する²⁾。この物質の *in vitro* における抗菌活性, 安定性や *in vivo* における感染治療効果, 吸収, 排泄等についてはすでに報告されている³⁻⁶⁾。

この薬剤はグラム陰性桿菌, とくに *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. 等に 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し, 現用のどの抗生物質とも交叉耐性を示さない。上記の菌種の野外分離株のなかには今のところ 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性株は 1 株も見出されていないが, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp. のなかには少数ながら 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上の Bicyclomycin 自然耐性株が見られる。本報告はこれらの Bicyclomycin 自然耐性が R 因子 (R plasmid: グラム陰性桿菌における伝達性薬剤耐性を支配する染色体外遺伝因子⁷⁾) と関係があるかどうかを検討するとともに, もし Bicyclomycin 耐性に伝達性が認められないなら, その耐性マーカーを既知の R 因子に取り込ませることができかどうか追求した結果を示すものである。

材料および方法

被験菌株: Bicyclomycin 自然耐性株として, 臨床材料から分離した *Klebsiella* 408, *Klebsiella* 420, *Kleb-*

siella 423, *P. mirabilis* 701, *P. mirabilis* 702, *P. mirabilis* 703 および Bicyclomycin 投与実験中のサル糞便から得た *P. mirabilis* 336, *P. mirabilis* 337, *Citrobacter* 308, *Citrobacter* 312, *Citrobacter* 318 と *Citrobacter* 338 を使用した。

既知の R plasmid の供与菌 (donor) としては, R 100 (*cml*, *tet*, *str*, *sul*, *fi*⁺)⁸⁾ または R *tsl* (*kan*, *fi*⁻*ts*)⁹⁾ をもつ *E. coli* W 3630 (*F*⁻, *mal*) を用いた。

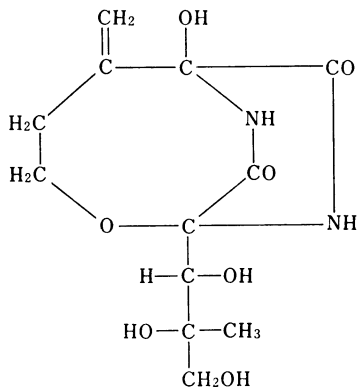
また Bicyclomycin 耐性の受容菌 (recipient) としては染色体性の nalidixic acid 耐性または streptomycin 耐性を平板選択法で人工的に付与した *E. coli* CSH 2 (*F*⁻, *nal*, *met* B), *Klebsiella* III/2 (*nal*) および *E. coli* AB 1157 (*F*⁻, *str*, *arg* E, *thr*, *leu*, *pro*, *his*, *lac*, *gul*, *mal*, *mil*, *xyl*) を使用した。

薬剤: Nalidixic acid (NA, 第一製薬株式会社, 東京), Chloramphenicol (CM, 藤沢薬品工業株式会社, 大阪), Tetracycline (TC, 日本レダリー株式会社, 東京), Kanamycin sulfate (KM, 武田薬品工業株式会社, 大阪), Streptomycin sulfate (SM, 武田), および Bicyclomycin (BCM) は使用直前に滅菌蒸留水に溶かし使用した。

最小発育阻止濃度の測定: Minimum inhibitory concentration (MIC) の測定は日本化学療法学会法¹⁰⁾に準じた平板法でおこなった。

BCM 耐性伝達の可能性の検討: BCM 自然耐性の *Klebsiella*, *P. mirabilis* または *Citrobacter* spp. の L ブイヨン¹¹⁾ 37°C, 1 夜振盪培養液 0.1 ml と *E. coli* CSH 2 NA 突然変異耐性株の L ブイヨン培養液 1 ml および新鮮 L ブイヨン 1.1 ml を混合し, 37°C で 20~24 時間振盪培養した。この混合培養液 0.1 ml を NA 100 $\mu\text{g/ml}$ および BCM 50~200 $\mu\text{g/ml}$ を含有する Mac Conkey 寒天平板上に塗布し, 37°C で 1 夜培養すると, NA 耐性の *E. coli* CSH 2 が BCM 耐性を受け取った時だけ集落形成が見られるはずである。もし, BCM 耐性の *Klebsiella*, *P. mirabilis* または *Citrobacter* が同時に NA 耐性であることがわかった時には, recipient として, *E. coli* CSH 2 (*nal*) の代りに *E. coli* AB 1157 (*str*) を使用し, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の SM と 50~200 $\mu\text{g/ml}$ の BCM を含む Mac Conkey 平板で選択した。

Fig. 1 Chemical structure of bicyclomycin



C₁₂H₁₈N₂O₇ M. W. 302.28

また R plasmid の種類によっては同一種間の伝達にくらべ異種間の伝達が著しく悪い場合もあり得るので、*Klebsiella* からの BCM 耐性伝達を検討する場合には recipient として *E. coli* CSH 2(*nal*) の他に NA 耐性の *Klebsiella* III/2 も使用して実験をおこなった。

BCM 耐性マーカーの既知の R plasmid 補助による伝達可能性の検討：野外分離の BCM 耐性 *Klebsiella* 420 株がたまたま CM, TC, SM, SA 4 剤に対する R plasmid をもっていることがわかったので、この菌から CM または TC 耐性を *E. coli* CSH 2(*nal*) に接合によって伝達した時、BCM 耐性が同時に伝達されるかどうか replica 法でしらべた。

また *E. coli* W 3630/R 100 および *E. coli* W 3630/R ts1 から *Klebsiella* 408 または *Klebsiella* 423 に R 100 または R ts1 plasmid を伝達し、安定した exconjugants を作ったのち、これらから *E. coli* CSH 2(*nal*) に R plasmids を再伝達した時 BCM 耐性が R plasmids の伝達に伴って移動するかどうか検討した。

なお R ts1 plasmid 伝達のための混合培養温度は 27 °C とし、*E. coli* W 3630/R⁺ から *Klebsiella* への R 100 および R ts1 伝達の実験に際しては exconjugants を 400 µg/ml の BCM と 50 µg/ml の CM の両方を含む Mac Conkey 寒天を選択平板として選択した。

実験成績

1 臨床材料から得た BCM 自然耐性 *Klebsiella* の

Table 1 Resistance patterns of bicyclomycin-resistant *Klebsiella* isolated from patients

Strain	MIC* of BCM with inoculum size of			Resistance to other drugs					
	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	CM	TC	SM	SA	AB-PC	CEZ
401	>800	50	50	S	S	S	R	S	S
410	>800	50	50	S	S	S	R	S	S
412	>800	100	50	R	R	R	R	R	S
420	>800	>800	>800	R	R	R	R	R	S
423	>800	>800	>800	S	S	S	R	R	S
408	>800	>800	>800	S	S	S	R	S	S

* µg/ml

Table 2 Trial for conjugative transfer of bicyclomycin resistance from *Klebsiella* to *E. coli* CSH 2(*nal*^r)

Donor	Selective plate	Number of colonies of BCM ^R <i>E. coli</i>	Transfer frequency
408	BCM+NA*	0	<5.3×10 ⁻⁸
420	"	0	<3.3×10 ⁻⁸
423	"	0	<1.1×10 ⁻⁸

* Mac Conkey plates containing 100 µg/ml BCM and 50~200 µg/ml of NA.

BCM に対する MIC と他薬剤に対する感受性：Table 1 に 6 株の BCM 耐性 *Klebsiella* の BCM その他に対する耐性度を示した。表に見るとおり、No. 401, No. 410 および No. 412 株は接種菌量が少くなると BCM に対する耐性度は低下し、10⁴ cells/ml 接種では感受性菌の 2~4 倍の耐性を示すにすぎない。これに対し、No. 420, No. 423 および No. 408 株の BCM 耐性は高く、接種菌が 10⁴ cells/ml になっても 400 µg/ml 以上の高度耐性を示したので、BCM 耐性伝達の可能性を検討する実験においては、これらの高度耐性菌を donor として使用することにした。

これらの 6 株の *Klebsiella* のなかで No. 420 株は BCM に高度耐性であるばかりでなく、CM, TC, SM, SA, ABPC にも耐性を示すいわゆる多剤耐性株で、もし BCM 耐性を運ぶ R plasmid が存在するとすれば、この株が持っている可能性が高いので、とくに詳細に検討した。

2 BCM 自然耐性 *Klebsiella* から *E. coli* CSH 2(*nal*) への BCM 耐性伝達の検討：Table 2 に示すとおり、BCM 高度耐性 *Klebsiella* から *E. coli* への BCM 耐性伝達の試みは混合培養を 37°C で 24 時間行なってもすべて陰性におわり、これらの菌が BCM 耐性を運ぶ R plasmid を有する可能性は少ない。また recipient として *E. coli* の代りに NA 耐性の *Klebsiella* を使用した時も Table 3 に示すとおり、BCM 耐性の伝達は認められなかった。

Table 3 Trial for conjugative transfer of bicyclomycin-resistance from *Klebsiella* to BCM^R-*Klebsiella*

Donor	Selective plate	Number of colonies of BCM ^R <i>Klebsiella</i>	Transfer frequency
408	NA 200*+ BCM 400	0	<2.0×10 ⁻⁸
420	"	0	<2.1×10 ⁻⁸
423	"	0	<2.4×10 ⁻⁸

* µg/ml

Table 4 Trial for conjugative transfer of bicyclomycin-resistance from naturally isolated BCM^R-*Proteus mirabilis* to *E. coli* CSH 2(*nal*^r).

Donor	Selective plate	Number of colonies of BCM ^R <i>E. coli</i>	Transfer frequency
PM 701	BCM+NA*	0	<1.9×10 ⁻⁹
PM 702	"	0	<3.8×10 ⁻¹⁰
PM 703	"	0	<2.6×10 ⁻¹⁰

* Mac Conkey plates containing 200 µg/ml of BCM and 100 µg/ml of NA.

3 BCM 自然耐性 *P. mirabilis* および *Citrobacter* からの BCM 耐性伝達の検討: Table 4 には臨床材料から分離された *P. mirabilis* 3 株の BCM 耐性伝達を検討した結果を示したが、この場合も伝達は認められず、これら BCM 耐性が R plasmid 上にあるかも知れないという危惧は否定された。

さらに BCM 40 mg/kg を 30 日間連続経口投与したサル糞便中から得た BCM 耐性の *P. mirabilis* 2 株, *Citrobacter* spp. 4 株からの BCM 耐性伝達の試みも Table 5 に示すとおり、すべて陰性に終わっている。

4 既存の R plasmid による BCM 耐性伝達補助の検討: *Klebsiella* 420 は BCM 高度耐性であるほかに、R(*cml*, *tet*, *str*, *sul*, *amp*) plasmid を有することを見出した。そこで、この R plasmid を *E. coli* CSH 2(*nal*) に伝達した時 BCM 耐性が同時に伝達されるかどうかしらべた。Table 6 に示すとおり、NA と CM で選択し

Table 5 Trial for conjugative transfer of bicyclomycin-resistance from BCM^R *P. mirabilis** and *Citrobacter** to *E. coli* CSH 2(*nal*^r)

Donor	Selective plate	Number of colonies of BCM ^R <i>E. coli</i>	Transfer frequency
PM 336	BCM+NA**	0	$<2.4 \times 10^{-10}$
PM 337	"	0	$<2.8 \times 10^{-10}$
CB 308	"	0	$<1.5 \times 10^{-9}$
CB 312	"	0	$<3.6 \times 10^{-9}$
CB 318	"	0	$<2.4 \times 10^{-9}$
CB 338	"	0	$<3.3 \times 10^{-9}$

* Strains were isolated from feces of monkeys administered BCM per os.

** Mac Conkey plates containing 100 µg/ml BCM and 50~100 µg/ml of NA.

Table 6 Trial for cotransfer of bicyclomycin-resistance with conjugative R plasmids from *Klebsiella* 420 to *E. coli* CSH 2(*nal*^r)

Selective plate	Transfer frequency of drug-resistance	Co-transfer % of BCM-R
NA 200+CM 25*	4.4×10^{-2}	0/100
NA 200+TC 25	7.7×10^{-3}	0/100
NA 200+BCM 100	$<1.6 \times 10^{-9}$	—

* µg/ml

Table 7 Trial for mobilization of bicyclomycin-resistance from naturally isolated BCM^R *Klebsiella* to *E. coli* CSH 2(*nal*^r) by known conjugative R plasmids

R plasmid	Transfer frequency of R	Co-transfer % of BCM-R	Transfer frequency of BCM ^R
R 100	7.9×10^{-3}	0/100	$<7.1 \times 10^{-10}$
R ts1	6.0×10^{-2}	0/100	$<5.0 \times 10^{-9}$

ても、NA と TC で選択してもこの R plasmid は 10^{-2} ~ 10^{-9} /donor の頻度で *E. coli* に伝達されることが確認されたが、これらの exconjugants 各々 100 コのうち BCM 耐性を同時伝達されたものは 1 コも無かった。さらに NA と BCM で選択すると exconjugant が全く認められないので、*Klebsiella* 420 からそのもつ R plasmid が *E. coli* に伝達された時にも BCM 耐性の移動は無く、BCM 耐性マーカーが R plasmid によってとり込まれる可能性は少いことが示された。

また、R⁻ の BCM 高度耐性 *Klebsiella* に *fi*⁺ 型の R 100 または温度感受性で *fi*⁻ 型の R ts1 plasmid を伝達し、これらを *E. coli* CSH 2(*nal*) に再伝達した時も Table 7 に示すとおり、BCM 耐性が伝達性を獲得するという事実を認めることはできなかった。

考 察

藤沢薬品工業株式会社において開発された BCM は既存のどのような抗生物質とも交叉耐性を示さないだけでなく、現在のところ *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. の自然分離株のなかに 50 µg/ml 以上の耐性を示すものはなかった。

今回、*Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. および *P. mirabilis* の自然分離株のなかに少数認められる BCM 高度耐性株の BCM 耐性が接合によって他の菌株に伝達されるかどうかしらべたが、その証拠は得られなかった。

さらに BCM 高度耐性の *Klebsiella* でたまたま R plasmid をもっていることが見出された株、あるいは BCM 高度耐性 *Klebsiella* に *fi*⁺ 型または *fi*⁻ 型の R plasmid を伝達した株から *E. coli* に R 因子を再伝達させ、その時 BCM 耐性が同時伝達されるかしらべたが、結果は陰性に終わった。このことは現在分離される *Klebsiella* や *Citrobacter* の BCM 耐性は非伝達性(おそらくは染色体性)で、R 因子とは無関係と思われる。さらに BCM を 1 カ月間経口投与したサルから分離された *Klebsiella*, *Citrobacter*, *P. mirabilis* の BCM 耐性も非伝達性で、*E. coli* の BCM 耐性株は 1 つも見出されなかった事実は、現時点においてはこの薬剤が広く応用されたとしてもその耐性菌が急激に増加する危険は少いことを示している。

現在 *Shigella*, *Salmonella* 等には多剤耐性株が増加し、病原大腸菌が従来知られている特定 O 抗原型のものから ENT plasmid¹²⁾(腸管毒素産生プラスミッド)をもつものに多様化しつつあるので、これらの菌種に全く自然耐性株が認められず、しかも R plasmid と今のところ無関係な BCM はたとえその MIC はあまり小さくなくとも、腸管感染症の経口治療薬として期待し得るもの

の1つではなからうか。

ま と め

藤沢薬品で開発された Bicyclomycin は他の既存抗生物質と交叉耐性を示さず、自然分離の *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. には現在のところ耐性株は認められない。

また臨床材料から得られた *Klebsiella* spp. および *P. mirabilis*, ならびにこの薬剤を実験投与中のサルから分離された *P. mirabilis* と *Citrobacter* spp. の Bicyclomycin 高度耐性株の耐性形質はすべて非伝達性で R plasmid と無関係であった。

さらに Bicyclomycin 耐性株に既知の R plasmids を入れてこれを再伝達しても Bicyclomycin 耐性が伝達性に変化することはなかったのので、この薬剤の耐性マーカーが簡単に R plasmid にとり込まれる危険は少いと考えられた。

文 献

- 1) MIYOSHI, T.; N. MIYAIRI, H. AOKI, M. KOHSAKA, H. SAKAI & H. IMANAKA : Bicyclomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. J. Antibiotics 25 : 569~575, 1972
- 2) KAMIYA, T.; S. MAENO, M. HASHIMOTO & Y. MINE : Bicyclomycin, a new antibiotic. II. Structural elucidation and acyl derivatives. J. Antibiotics 25 : 576~581, 1972
- 3) NISHIDA, M.; Y. MINE, T. MATSUBARA, S. GOTO & S. KUWAHARA : Bicyclomycin, a new antibiotic, III. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity. J. Antibiotics 25 : 582~593, 1972
- 4) NISHIDA, M.; Y. MINE, T. MATSUBARA, S. GOTO & S. KUWAHARA : Bicyclomycin, a new antibiotic. IV. Absorption, excretion and tissue distribution. J. Antibiotics 25 : 594~601, 1972
- 5) NISHIDA, M.; Y. MINE, S. NONOYAMA, S. FUKADA, M. KOBAYASHI & T. ADACHI : Therapeutic efficacy of bicyclomycin for Shigellosis experimentally induced in rhesus monkeys. J. Antibiotics 27 : 976~983, 1974
- 6) MINE, Y.; S. NONOYAMA, M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA : Antigenicity of bicyclomycin and its cross-reactivity with benzylpenicillin. Jap. J. Antibiotics 27 : 456~462, 1974
- 7) AKIBA, T.; K. KOYAMA, Y. ISSHIKI, S. KIMURA & T. FUKUSHIMA : On the mechanism of the development of multiple drug resistant clones of *Shigella*. Jap. J. Microbiol. 4 : 219~227, 1960
- 8) SUGINO, Y. & Y. HIROTA : Conjugal fertility associated with resistance factor R in *Escherichia coli*. J. Bact. 84 : 902~910, 1962
- 9) YOKOTA, T.; Y. KANAMARU, R. MORI & T. AKIBA : Recombination between a thermosensitive kanamycin resistance factor and a multiple drug resistance factor. J. Bact. 98 : 863~873, 1969
- 10) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. Chemotherapy 23 : 1~2, 1975
- 11) LENNOX, E. S. : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage ϕ 1. Virology 1 : 190~206, 1955
- 12) GUERRANT, R. L.; L. L. BRUNTON, T. C. SCHNAITMAN, L. I. REBHUN & A. G. GILMAN : Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology : a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. & Imm. 10 : 320~327, 1974

NATURAL DRUG RESISTANCE IN BACTERIA TO BICYCLOMYCIN HAS NO RELATION WITH CONJUGATIVE R PLASMIDS

SHIGEMI FUKADA and TAKESHI YOKOTA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University,
Tokyo 113, Japan

Bicyclomycin, devised by Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, showed no cross resistance with other known antibiotics, and no natural bicyclomycin-resistant strains were confirmed in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Shigella* spp. and *Salmonella* spp.

Attempt was all unsuccessful to transfer the bicyclomycin resistance from small number of clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Proteus mirabilis* to various strains of drug-sensitive *E. coli* and *Klebsiella*. Furthermore, the bicyclomycin resistance was also-transmissible in *P. mirabilis* and *Citrobacter* isolated from monkeys to which bicyclomycin was orally administered daily for one month.

Cotransfer of the bicyclomycin resistance was also unsuccessful by conjugative R plasmids (f_i^+ and f_i^- types) from R^+ bicyclomycin resistant *Klebsiella* to *E. coli* strains, indicating that the risk of integration of the bicyclomycin resistance marker is not prominent into DNA of conjugative R plasmids.