

臨床材料から分離した *Acinetobacter calcoaceticus*
subsp. *anitratus* の薬剤感受性

清水昌寿・三橋進

群馬大学医学部微生物学教室

田波洋

群馬大学医学部附属病院中央検査部

小栗豊子

順天堂大学附属順天堂医院中央臨床検査部

佐竹幸子

東海大学附属病院中央検査部

(昭和56年11月27日受付)

1) 被験菌のほとんどが、ABPC、CP に耐性であったが、KM、DKB、AMK、GM、NTL のアミノ配糖体系抗生物質と TC に対して感性であった。

2) アミノ配糖体系抗生物質に交叉耐性を示す4株について、修飾酵素産生の有無を検討したところ、SM、SPC が ATP と Mg^{2+} の存在下で不活化されたが、KM 系、GM 系の抗生物質の酵素的修飾はみられなかった。

近年、*Acinetobacter* の臨床材料からの検出頻度が増加しており^{1,2)}、多くの抗生物質に抵抗を示し日和見感染の原因菌のひとつとして注目されている。最近に至って、本菌にもアミノ配糖体系抗生物質に耐性を示す菌の中に修飾酵素を産生する菌が確認され、それらの酵素にも数種類のものがあることが判明してきている³⁻⁵⁾。

今回、私どもは臨床分離 *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* (以下 *A. anitratus*) について種々の抗生物質の感受性を測定し、その中のアミノ配糖体系抗生物質に耐性を示す菌については、修飾酵素の有無を検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1) 使用菌株

順天堂大学医学部(小酒井望教授の好意による)、東海大学医学部(河喜多龍祥教授の好意による)、群馬大学医学部(田波洋教授の好意による)の各中央検査部で分離された臨床分離の *A. anitratus* 101 株(1980年度分離)を使用した。

2) 使用薬剤

使用薬剤は以下の11種で()内に記した記号はそれぞれの薬剤の略号を示す。

Streptomycin (SM), Spectinomycin (SPC), Kanamycin (KM), Dibekacin (DKB), Amikacin (AMK),

Gentamicin (GM), Netilmicin (NTL), Ampicillin (ABPC), Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CP), Mercuric chloride (Hg^{2+}) の11種で、抗生物質に関してはすべて力価の明瞭なものを使用した。

3) 感受性測定法

日本化学療法学会最小発育阻止濃度(MIC)測定法に従い、 $10^6/ml$ 接種について検討を行なった⁶⁾。すなわち、前培養には感受性測定用ブイオン培地(ニッスイ)、測定用培地には感受性測定用培地(ニッスイ)を用い感受性測定用ブイオン培地 $37^{\circ}C$ 、18時間培養菌液をBSG(buffered saline with gelatin)で希釈し $10^6/ml$ の懸濁液とした後、約5 μl の容量をマイクロランターを用いて接種し、 $37^{\circ}C$ 、18時間培養後の最小発育阻止濃度(MIC: $\mu g/ml$)を求めた。

4) アミノ配糖体系抗生物質修飾酵素の検出法

OZANNE ら⁷⁾の方法に準じて行なった。すなわち、brain heart infusion broth (Difco) で $37^{\circ}C$ 、18時間培養した被験菌を5mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄後、超音波破碎器(トミー精工)によって菌体を破碎し、30,000 $\times g$ 、30分の遠心分離を行ない、得られた上清を粗酵素液とし、蛋白質量を15mg/mlの濃度に調製して用いた。反応液の組成は、150 μl のトリス-塩酸緩衝液(0.2M, pH 8.0)、50 μl の20mM adenosine-

5'-triphosphate (ATP), 50 μ l の 1mM 抗生物質溶液, 50 μ l の 20mM 酢酸マグネシウム, 50 μ l の coenzyme A (リン酸化およびアデニル化の反応の場合は蒸留水を添加した), および 150 μ l の粗酵素液からなり, 反応は 37°C の水槽で行ない, 60 分後に 100°C, 1 分加熱後反応液中の抗生物質の残存する活性を *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を被験菌としてカップ法で測定した。

II. 実験成績および考察

1) 薬剤感受性分布

A. anitratus のアミノ配糖体系抗生物質に対する感受性分布は, KM, DKB, AMK については Fig. 1, GM, NTL については Fig. 2, および Spectinomycin (SPC), SM については Fig. 3 に示した。KM およびその誘導体である DKB, AMK の MIC 分布は, 共に 3.1 μ g/ml

Fig. 1 Distribution of sensitivity of clinically isolated *Acinetobacter* against kanamycin, dibekacin and amikacin. Inoculum size 10⁸/ml 101 strains

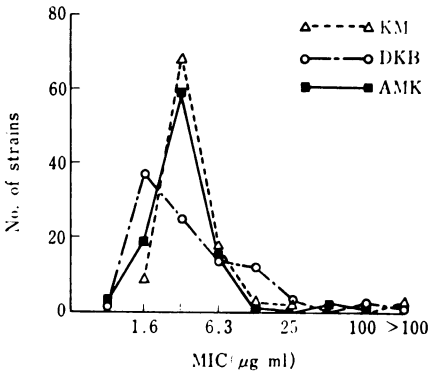


Fig. 2 Distribution of sensitivity of clinically isolated *Acinetobacter* against gentamicin and netilmicin. Inoculum size 10⁸/ml 101 strains

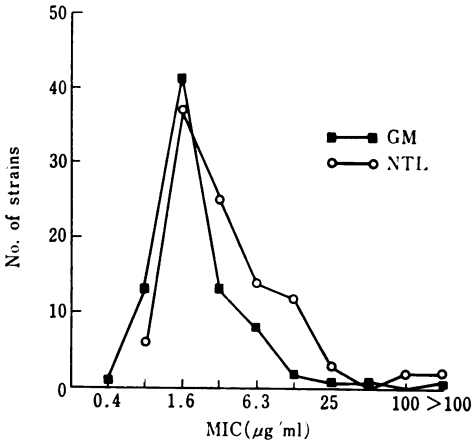
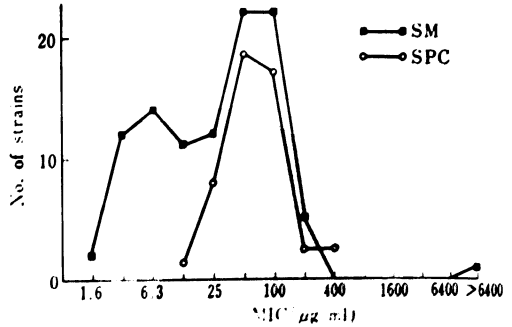


Fig. 3 Distribution of sensitivity of clinically isolated *Acinetobacter* against streptomycin and spectinomycin. Inoculum size 10⁸/ml 101 strains



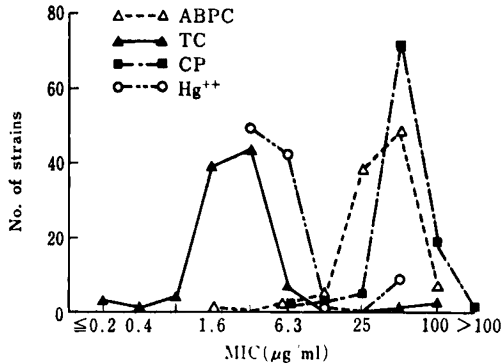
にピークを有するほぼ同等のパターンを示した。GM および NTL の MIC は各々 0.4~>100 μ g/ml, 0.8~>100 μ g/ml に分布し, いずれも 1.6 μ g/ml にピークを有する一峰性の分布を示した。上述のアミノ配糖体系抗生物質に対して, >100 μ g/ml の MIC を示す耐性菌はほとんど認められなかった。SM, SPC についての成績は Fig. 3 に示したが, SM では 1.6~>6,400 μ g/ml, SPC では 12.5~400 μ g/ml に分布し, SM では 6.3 と 50~100 μ g/ml のそれぞれにピークをもつ二峰性の分布を示し, 後者のグループに属する株を耐性菌とみなすと, 12 μ g/ml 以上の耐性菌は約 72% 存在した。さらに >6,400 μ g/ml の高度耐性菌が 1 株認められた。SPC は 50 μ g/ml にピークを有する一峰性の分布を示したが, 全株が 12 μ g/ml 以上の MIC 値を示し, アミノ配糖体系抗生物質の中で最も低い感受性を示した。KM に対して 12.5 μ g/ml 以上の耐性を示した J9, J28, J32, および T63 株について, KM 以外のアミノ配糖体系抗生物質, DKB, AMK, GM, NTL, SM, SPC に対する交叉耐性の有無を検討した成績を Table 1 に示

Table 1 Antibacterial activity of aminoglycoside antibiotics against *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains

Aminoglycoside	MIC (μ g/ml) of strain :			
	J 9	J 28	J 32	T 63
KM	>100	>100	12.5	25
DKB	3.1	50	25	>100
AMK	50	100	1.6	50
GM	3.1	50	12.5	>100
NTL	6.2	100	>100	>100
SM	>100	>100	>100	>100
SPC	>100	>100	>100	>100

Fig. 4 Distribution of sensitivity of clinically isolated *Acinetobacter* against ampicillin, tetracycline, chloramphenicol and mercuric chloride.

Inoculum size 10^8 /ml 101 strains



した。J 28 と T 63 は同一の耐性パターンを示し、特に T 63 では AMK に $50 \mu\text{g/ml}$ 、DKB, GM, NTL にいずれも $>100 \mu\text{g/ml}$ と高い MIC 値を示し、対象としたすべてのアミノ配糖体系抗生物質と交叉耐性を示した。また、J 9, J 32 はそれぞれ AMK と DKB に対する MIC が高く、異なる交叉耐性のパターンを示した。これらの菌株で交叉耐性がみられたことから、耐性機構として修飾酵素の関与が考えられたので、若干の検討を行なった。その結果は後述する。

アミノ配糖体系抗生物質以外の抗生物質に対する感受性分布の成績は Fig. 4 に示した。ABPC は $1.6 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に分布し、 $50 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する一峰性を示した。被験菌の中で 1 株のみ $1.6 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示したものが認められたが、ABPC の MIC は一般的に高く、その抗菌力は弱かった。CP は、 $50 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する一峰性の分布を示し、ABPC と同様に抗菌力は弱かった。TC では $3.1 \mu\text{g/ml}$ にひとつのピークがみられ、このグループに属する株が全体の 96% を占めていたが、 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株も 4% 程認められている。TC はアミノ配糖体系抗生物質と同様、強い抗菌力を示した。Hg²⁺ は $3.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ に分布し、 $3.1 \mu\text{g/ml}$ と $50 \mu\text{g/ml}$ の各々にピークをもつ二峰性を示し、耐性菌は全体の 9% を占めた。

2) アミノ配糖体系抗生物質の修飾酵素

各種アミノ配糖体系抗生物質に交叉耐性を示す上述した 4 株の修飾酵素産生の有無について調べた成績を Table 2 に薬剤別に示した。KM, DKB, AMK, GM, NTL を基質とするアセチル化、アデニル化、リン酸化のいずれの修飾酵素の存在も確認できなかった。一方、SM, SPC に対しては、調べた 4 株すべてが ATP

Table 2 Relationship of aminoglycoside resistance to production of aminoglycoside-modifying enzyme

Aminoglycoside	Total No. of resistant strain (%)	No. of strains with enzyme/No. tested	
		A system ^{a)}	P system ^{b)}
KM	4 (4.0)	0/4	0/4
DKB	3 (3.0)	0/3	0/3
AMK	3 (3.0)	0/3	0/3
GM	3 (3.0)	0/3	0/3
NTL	3 (3.0)	0/3	0/3
SM	62 (61.0)	0/4	4/4
SPC	99 (98.0)	0/4	4/4

a): The A system consisted of the following materials; 0.2 ml of Tris-hydrochloride buffer (pH 7.0), 0.05 ml of 1mM drug, 0.05 ml of 1mM acetyl coenzyme A, 0.05 ml of distilled water, and 0.15 ml of S-30 fraction (15mg of protein/ml).

b): The P system consisted of the following materials; 0.2 ml of Tris-hydrochloride buffer (pH 7.0), 0.05 ml of 20mM ATP, 0.05 ml of 0.02M magnesium chloride, 0.05 ml of 1mM drug, and 0.15 ml of S-30 fraction (15mg of protein/ml).

と Mg²⁺ の存在下で両薬剤を不活化した。この修飾酵素は SM, SPC の両薬剤を ATP 存在下で同時に不活化することから、従来の修飾酵素の分類⁹⁾に従うと、この修飾酵素は AAD(3'') と推測された。

上述の結果から、本邦で分離された *A. anitratus* の KM, DKB, AMK, GM, NTL に対する耐性機構は修飾酵素の産生によらない、リボゾームの変化あるいは薬剤の菌体内透過性の変化等の面から説明されるものと考えられた。既に、MURRAY ら^{3,4)}により、*Acinetobacter* には APH II, APH III, AAC(6'), AAC(3), AAD(2''), AAD(3'') の修飾酵素が報告されているが、今回、私どもが調べた結果、AAD(3'') と推定される修飾酵素のみが検出された。なお、分離機関を拡大して疫学的調査を行なうことによって本邦においてもさらに多種の修飾酵素産生株が検出されるものと考えられる。

文 献

- 1) 小栗豊子: 緑膿菌以外のブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌の検出率と薬剤感受性。最新医学 32(11): 2056~2068, 1977
- 2) 富岡 一, 小林芳夫, 内田 博, 亀岡百合子: ブドウ糖非醗酵性グラム陰性桿菌の抗菌剤感受性。最新医学 32(8): 1454~1459, 1977
- 3) MURRAY, B. E. & R. C. MOELLER, JR: Aminoglycoside-modifying enzymes among clinical

- isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* (*Herellea vaginicola*): Explanation for high-level aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(2): 190~199, 1979
- 4) MURRAY, B. E. & R. C. MOELLERIN, JR.: Evidence of plasmid-mediated production of aminoglycoside-modifying enzymes not previously described in *Acinetobacter*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17(1): 30~36, 1980
 - 5) SHIMIZU, S.; M. INOUE, S. MITSUHASHI, H. NAGANAWA & S. KONDO: Enzymatic adenylation of spectinomycin by *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus*. *J. Antibiotics* 34(7): 869~875, 1981
 - 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 29(1): 76~79, 1981
 - 7) OZANNE, B.; R. BENVENISTE, D. TIPPER & J. DAVIEN: Aminoglycoside antibiotics: Inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors. *J. Bacteriol.* 100: 1144~1146, 1969
 - 8) MITSUHASHI, S.: Proposal for a rational nomenclature for phenotype, genotype, and aminoglycoside-aminocyclitol modifying enzymes, in *Drug Action and Drug Resistance in Bacteria. 2. Aminoglycoside Antibiotics.* pp. 269~275, Ed. by S. MITSUHASHI, University of Tokyo Press, Tokyo, 1975

A STUDY ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* SUBSP. *ANITRATUS* ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS

SHOJI SHIMIZU and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

HIROSHI TANAMI

Department of Clinical Laboratory, School of Medicine, Gunma University

TOYOKO OGURI

Clinical Laboratories, Juntendo University Hospital

SACHIKO SATAKE

Department of Clinical Laboratory, School of Medicine, Tokai University

Antimicrobial susceptibility of 101 strains of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* isolated from clinical specimens during 1979~1980 were investigated against 11 drugs, i. e., 7 aminoglycoside antibiotics, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol and mercuric chloride. Production of aminoglycoside-modifying enzyme among resistant strains to aminoglycoside antibiotics was tested by bioassay. The results were as follows.

(1) Almost all of test strains of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* were resistant to ABPC and CP, but were sensitive to 5 aminoglycosides (KM, DKB, AMK, GM and NTL) and TC.

(2) Four strains resistant to SM and SPC showed enzymatic modification of these antibiotics in the presence of adenosine-5'-triphosphate and magnesium ion. But no strain with resistance to GM, NTL, KM, DKB, and AMK had aminoglycoside-modifying enzyme activity.