

本邦におけるアミノ配糖体抗生物質耐性菌の検索

アミノ配糖体耐性菌研究会

大 越 正 秋 (班長)

東海大学医学部泌尿器科

石 神 襄 次

神戸大学医学部泌尿器科

大 久 保 混

関西医科大学第一内科

大 森 弘 之

岡山大学医学部泌尿器科

勝 正 孝

国立霞ヶ浦病院内科

熊 本 悦 明

札幌医科大学泌尿器科

黒 川 一 男

徳島大学医学部泌尿器科

斎 藤 篤

東京慈恵会医科大学第二内科

酒 井 克 治

大阪市立大学医学部第二外科

高 瀬 善 次 郎

川崎医科大学産婦人科

滝 上 正

横浜船員保険病院内科

島 田 馨

東京都養育院附属病院内科

中 川 圭 一

東京共済病院内科

中 山 一 誠

日本大学医学部第三外科

名 出 頼 男

名古屋保健衛生大学泌尿器科

新 島 端 夫

東京大学医学部泌尿器科

西 浦 常 雄

岐阜大学医学部泌尿器科

町 田 豊 平
東京慈恵会医科大学泌尿器科

松 本 慶 蔵
長崎大学熱帯医学研究所内科

百 瀬 俊 郎
九州大学医学部泌尿器科

三 橋 進・伊予部志津子・岡本 了一・沖井 三孔
群馬大学医学部微生物

(昭和 58 年 5 月 19 日受付)

アミノ配糖体抗生物質耐性菌として分離された臨床分離株 775 株について 11 種のアミノ配糖体に対する感受性を測定した。

1) *P. aeruginosa* では, AMK, HBK の耐性菌は少ない (それぞれ 15.3%, 22.4%) が, 一方, ASTM の耐性菌が非常に多かった (89.0%)。

2) indole 陽性 *Proteus* では, AMK, HBK, ASTM の耐性菌が非常に少ない (それぞれ 16.0%, 5.5%, 4.0%) が他の 8 薬剤に対しては耐性菌が非常に多かった。

3) *P. mirabilis* では, AMK, HBK, ASTM の耐性菌は全く分離されず, また NTL の耐性菌も少なかった (11.4%) が, 他の 7 薬剤に対する耐性菌は非常に多かった。

4) *S. marcescens* では, ASTM の耐性菌が非常に少ない (6.0%) が他の 10 薬剤に対する耐性菌は比較的多かった。

5) *E. coli* と *K. pneumoniae* では, 各薬剤に対する耐性菌の分離頻度のパターンが類似していた。

6) GM, DKB, AMK, HBK, ASTM の 5 薬剤に対する耐性パターンからアミノ配糖体不活化酵素を推定すると, AAC (6'), AAC (2'), AAD (2'') が広く分布していると考えられた。

化学療法剤の広範な使用にともなう薬剤耐性菌の分離頻度の上昇とその広い拡散は, 現在の化学療法を困難にしているばかりではなく, 病院の衛生管理上の大きな課題でもある。従って, これらの問題を解決するためには, まず, 薬剤耐性菌の動向を知ることが必要である。

我々は, 薬剤耐性菌の中で, 特にアミノ配糖体耐性菌に注目し, 21 施設を中心としてアミノ配糖体抗生物質 (以下アミノ配糖体とする) 耐性菌研究会を組織してその動向を調査してきた。

今回, 1980 年から 1982 年にかけて, アミノ配糖体耐性菌として分離された 775 株の調査結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

アミノ配糖体耐性菌研究会班員の所属する研究施設 (13 施設) において, 1980 年から 1982 年の間にアミノ配糖体耐性菌として分離された臨床分離株 775 株を用いた (Table 1)。

2. 使用薬剤 (略号)

Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Gentamicin (GM), Micronomicin (MCR), Sisomicin (SISO), Netilmicin (NTL), Tobramycin (TOB), Dibekacin

Table 1 Isolation frequency of aminoglycoside resistant bacteria

Microorganism	No. of strains	Isolation frequency (%)
<i>Escherichia coli</i>	61	7.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38	4.9
<i>Proteus mirabilis</i>	34	4.4
indole positive <i>Proteus</i>	200	25.8
<i>Serratia marcescens</i>	137	17.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	246	31.7
Glucose nonfermentative GNB*	42	5.4
Others	17	2.2
Total	775	

* Gram-negative bacteria except for *P. aeruginosa*.

(DKB), Amikacin (AMK), Habekacin (HBK)^{1,2)}, Astromicin (ASTM) の 11 薬剤を用いた。

3. 感受性測定法

日本化学療法学会標準法³⁾に準じた寒天平板希釈法に従った。すなわち、被験菌を感受性測定用ブイヨン培地(ニッスイ)で 37°C, 18 時間培養後(10⁸~10⁹ cells/ml), 10⁶ cells/ml になるように BSG 溶液で希釈し、マイクロプランターを用いて接種した。測定用培地には、変法 Mueller-Hinton 寒天培地(ニッスイ)を用い、37°C, 18 時間培養後、被験菌の発育が認められない最小濃度をもって、minimum inhibitory concentration(MIC)とした。

II. 実験結果

1. 臨床分離株の菌種別分離頻度および耐性限界値

アミノ配糖体耐性菌の菌種別分離頻度を Table 1 に示した。*P. aeruginosa* の分離頻度が最も高く、次いで indole 陽性 *Proteus*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* の順に高かった。また、*P. aeruginosa*

以外のブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌も数菌種にわたり分離された。

これらの臨床分離株の 11 種のアミノ配糖体に対する耐性菌分離頻度を求めるにあたり、用いられた耐性限界値は各菌種の MIC 分布曲線から決定した (Table 2)。ブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌は、それぞれの菌種について材料が少ないため MIC 分布曲線を求めることができず、従ってその耐性限界値はいずれの薬剤に対しても 12.5 µg/ml とした。

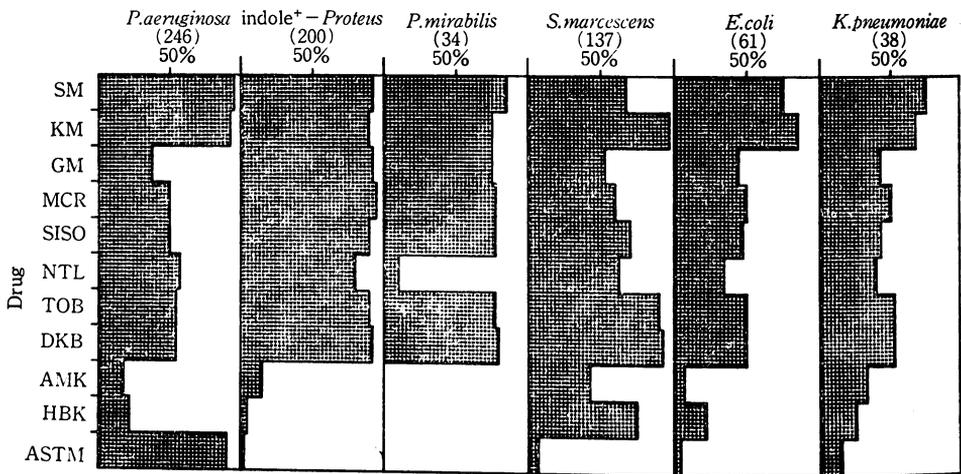
各菌種について Table 2 に示した MIC 以上の MIC を示す菌を耐性菌とした。アミノ配糖体に対する MIC の培地による変動は、特に *P. aeruginosa* において著しく、今回使用した培地では特に GM, AMK, HBK に対する MIC が高く出ている。

2. 各種アミノ配糖体に対する臨床分離株の薬剤耐性 *P. aeruginosa*, indole 陽性 *Proteus*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae* の 11 種のアミノ配糖体に対する耐性菌分離頻度を Fig. 1 に示した。

Table 2 Concentration for the criteria of resistance

Organism	MIC (µg/ml)										
	SM	KM	GM	MCR	SISO	NTL	TOB	DKB	AMK	HBK	ASTM
<i>E. coli</i>	25	12.5	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	25	25	6.25	25
<i>K. pneumoniae</i>	12.5	25	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	25	12.5	25
<i>P. mirabilis</i>	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	25	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5
indole ⁺ - <i>Proteus</i>	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	25	25
<i>S. marcescens</i>	25	12.5	6.25	12.5	6.25	25	6.25	12.5	25	6.25	25
<i>P. aeruginosa</i>	12.5	25	50	25	12.5	25	6.25	25	50	50	25

Fig. 1 Isolation frequency of aminoglycoside-resistant strains in clinical isolates



(): Number of strains

P. aeruginosa では、SM, KM および ASTM に対する耐性菌の分離頻度がそれぞれ 95.5%, 94.7% および 89.0% と非常に高く、次いで GM, MCR, SISO, NTL, TOB, DKB に対する耐性菌が中等度の頻度 (37.6~56.8%) で分離されていた。これらに比べると AMK および HBK に対する耐性菌の分離頻度はそれぞれ 15.9% および 22.4% と低かった。

indole 陽性 *Proteus* では、SM, KM, GM, MCR, SISO, NTL, TOB, DKB に対する耐性菌の分離頻度が 79.0~94.0% と非常に高かった。これに反して、AMK, HBK および ASTM に対する耐性菌の分離頻度はそれぞれ 16.0%, 5.5% および 4.0% ときわめて低かった。

P. mirabilis でも indole 陽性 *Proteus* と同様に SM, KM, GM, MCR, SISO, TOB, DKB に対する耐性菌分離頻度は、74.3~85.7% と高かったが、NTL の耐性菌分離頻度は 11.4% と低かった。さらに、AMK, HBK, ASTM の耐性菌は分離されなかった。

S. marcescens では、KM, TOB, DKB に対する耐性菌分離頻度がそれぞれ 98.5%, 91.0%, 92.5% と非常に高く、次いで SM, GM, MCR, SISO, NTL, AMK, HBK の耐性菌も 44.0~74.6% と比較的高頻度で分離された。これに比べて、ASTM の耐性菌分離頻度は 6.0% ときわめて低かった。

E. coli および *K. pneumoniae* は、類似した耐性菌分離頻度のパターンを示しており、SM, KM の耐性菌の分離頻度は、それぞれ 73.8%, 88.5% および 76.3%, 68.4% と高かった。次いで GM, MCR, SISO, NTL, TOB, DKB の耐性菌が中等度の頻度 (34.4~50.8% および 39.5~52.6%) で分離された。これに比べると AMK, HBK, ASTM の耐性菌の分離頻度は低かった (4.9~23.0% および 15.8~31.6%)。

Table 3 Resistance patterns of *P. aeruginosa* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB AMK HBK ASTM	5.7
GM DKB HBK ASTM	8.9
GM DKB ASTM	22.0
DKB AMK HBK ASTM	7.3
ASTM	37.8
Others	9.8
—	8.5

246 strains were examined.

*Drugs tested were GM, DKB, AMK, HBK and ASTM.

3. 各菌種のアミノ配糖体耐性パターン

P. aeruginosa, indole 陽性 *Proteus*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae* の GM, DKB, AMK, HBK, ASTM に対する耐性パターンを Table 3~8 に示した。

P. aeruginosa では、GM, DKB, ASTM の 3 剤耐性および ASTM 1 剤耐性のパターンを示すものが多く分離され、これらで約 60% を占めていた (Table 3)。

Table 4 Resistance patterns of indole⁺-*Proteus* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB AMK HBK ASTM	2.5
GM DKB AMK	11.0
GM DKB	71.5
DKB	3.0
Others	7.0
—	5.0

200 strains were examined.

*See the footnote of Table 3.

Table 5 Resistance patterns of *P. mirabilis* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB	76.5
DKB	5.9
—	17.6

34 strains were examined.

*See the footnote of Table 3.

Table 6 Resistance patterns of *S. marcescens* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB AMK HBK ASTM	4.4
GM DKB AMK HBK	22.6
GM DKB HBK	13.1
GM DKB	13.1
DKB AMK HBK	16.1
DKB HBK	16.1
Others	2.9
—	11.7

137 strains were examined.

*See the footnote of Table 3.

Table 7 Resistance patterns of *E. coli* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB AMK HBK ASTM	4.9
GM DKB AMK HBK	3.3
GM DKB HBK	14.8
GM DKB	23.0
DKB	4.9
HBK	1.6
—	47.5

61 strains were examined.

*See the footnote of Table 3.

indole 陽性 *Proteus* および *P. mirabilis* では、GM, DKB の 2 剤耐性のものがそれぞれ 71.5% および 76.5% と高頻度で分離された (Table 4, 5)。

S. marcescens では、GM, DKB の 2 剤耐性およびこれに AMK あるいは HBK 耐性が加わった 3 剤、4 剤耐性のものがほぼ均等に分離された (Table 6)。

E. coli および *K. pneumoniae* では、GM, DKB, AMK, HBK, ASTM の 5 剤に対しては、感受性を示すものが、それぞれ 47.5% および 44.7% と他菌種に比べると多く分離されている。また、耐性菌について、そのパターンをみると、*E. coli* では、GM, DKB および GM, DKB, HBK のパターンを示すものが多かった。一方、*K. pneumoniae* では、GM, DKB ; GM, DKB, AMK, HBK ; GM, DKB, AMK, HBK, ASTM のパターンを示すものがほぼ均等に分離された (Table 7, 8)。

P. aeruginosa 以外のブドウ糖非酸酵グラム陰性桿菌では、成績は示していないが、4 剤あるいは 5 剤の多剤耐性を示すものが多く分離された。

4. 各菌種のアミノ配糖体に対する感受性相関

P. aeruginosa, indole 陽性 *Proteus*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae* に対する GM の感受性を DKB, AMK, HBK, ASTM と比較し, Fig. 2~5 に示した。

DKB と GM を比較すると、*P. aeruginosa*, indole 陽性 *Proteus*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* では相関している。しかし、*S. marcescens* では DKB 耐性菌の一部が GM に対して感受性を示した (Fig. 2)。

AMK および HBK と GM を比較すると、*P. aeruginosa*, indole 陽性 *Proteus*, *E. coli* の GM 耐性菌の一部および *P. mirabilis* の GM 耐性菌は AMK, および HBK に感受性を示した (Fig. 3, 4)。

Table 8 Resistance patterns of *K. pneumoniae* to aminoglycosides

Resistance pattern*	Isolation frequency(%)
GM DKB AMK HBK ASTM	13.2
GM DKB AMK HBK	13.2
GM DKB	10.5
DKB	10.5
Others	7.9
—	44.7

38 strains were examined.

*See the footnote of Table 3.

ASTM と GM を比較すると、indole 陽性 *Proteus*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae* のほとんどの GM 耐性菌および *P. mirabilis* の GM 耐性菌は、ASTM に対して感受性を示した。しかし *P. aeruginosa* では、反対に ASTM 耐性菌の一部が GM に感受性を示した (Fig. 5)。

III. 考 察

今回、アミノ配糖体耐性菌研究会で調査した菌株は、各研究機関においてアミノ配糖体に耐性として分離された菌株を対象として集めた。

これら臨床分離株の耐性限界値 (Table 2) は、11 種のアミノ配糖体に対する MIC 分布より求めたものであるが、従来用いられている耐性限界値に比べると高い値を示した。特に *P. aeruginosa* においては、アミノ配糖体の血中濃度を考慮すると高すぎる値を示した。しかし、この現象は、今回用いた培地中の Mg^{2+} および Ca^{2+} 濃度の影響と考えられ⁹⁾、他の培地を用いた場合には MIC は 2~4 倍低くなっている。

11 種のアミノ配糖体に対する菌種ごとの耐性菌の分離頻度 (Fig. 1) をみると菌種ごとに特徴がみられた。*P. aeruginosa* では、ASTM の耐性菌が他の菌種に比べて多いが、これはアミノ配糖体不活化酵素による ASTM の不活化によるものではないことが分かった⁹⁾。*Proteus* 属では、AMK, HBK および ASTM の耐性菌はきわめて少なく、それ以外のアミノ配糖体の耐性菌が非常に多く分離されている。また、NTL の耐性菌が indole 陽性 *Proteus* で非常に多いが *P. mirabilis* では少ない点も興味深い。*S. marcescens* では、ASTM の耐性菌が少ない反面、AMK や HBK の耐性菌が他の菌種に比べると多く分離されており、化学療法上問題になる菌と考えられる。

現在使用頻度の高い GM, DKB, AMK と新しく開発

Fig. 2 Correlogram of MICs between DKB and GM

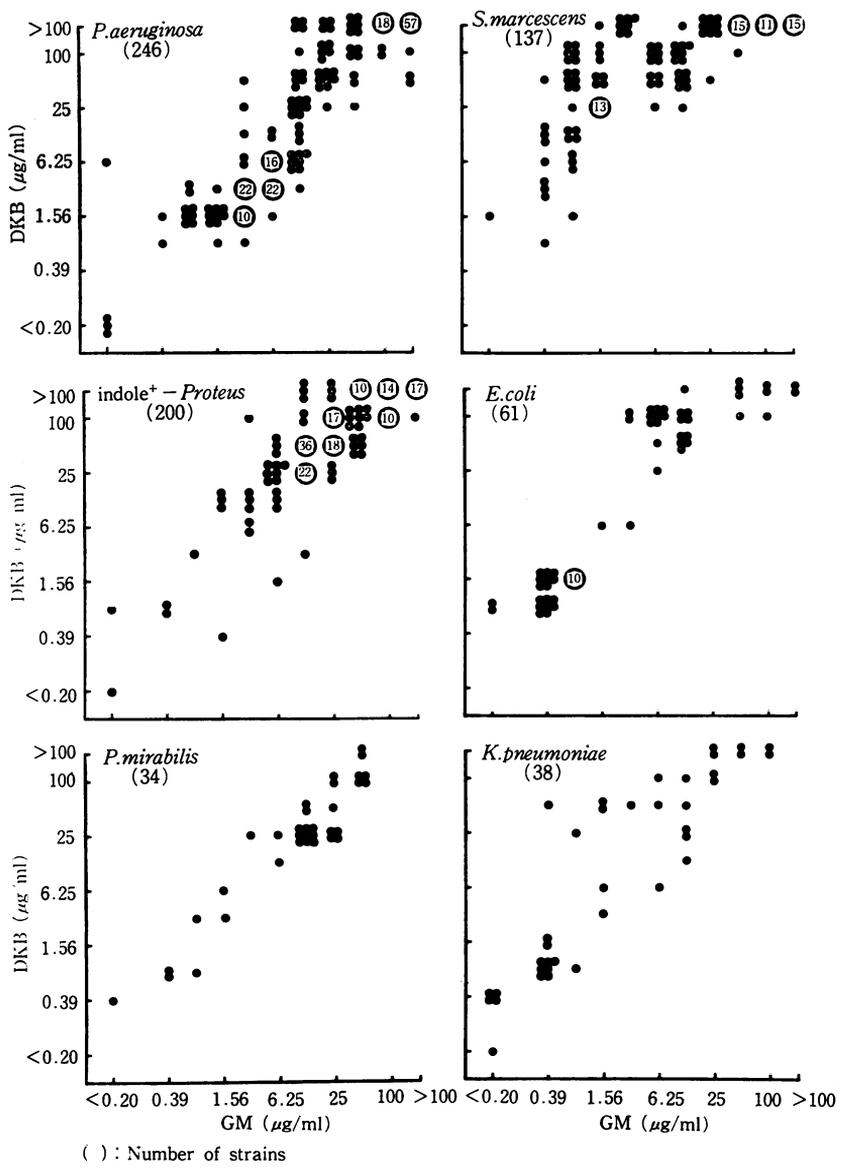


Fig. 3 Correlogram of MICs between AMK and GM

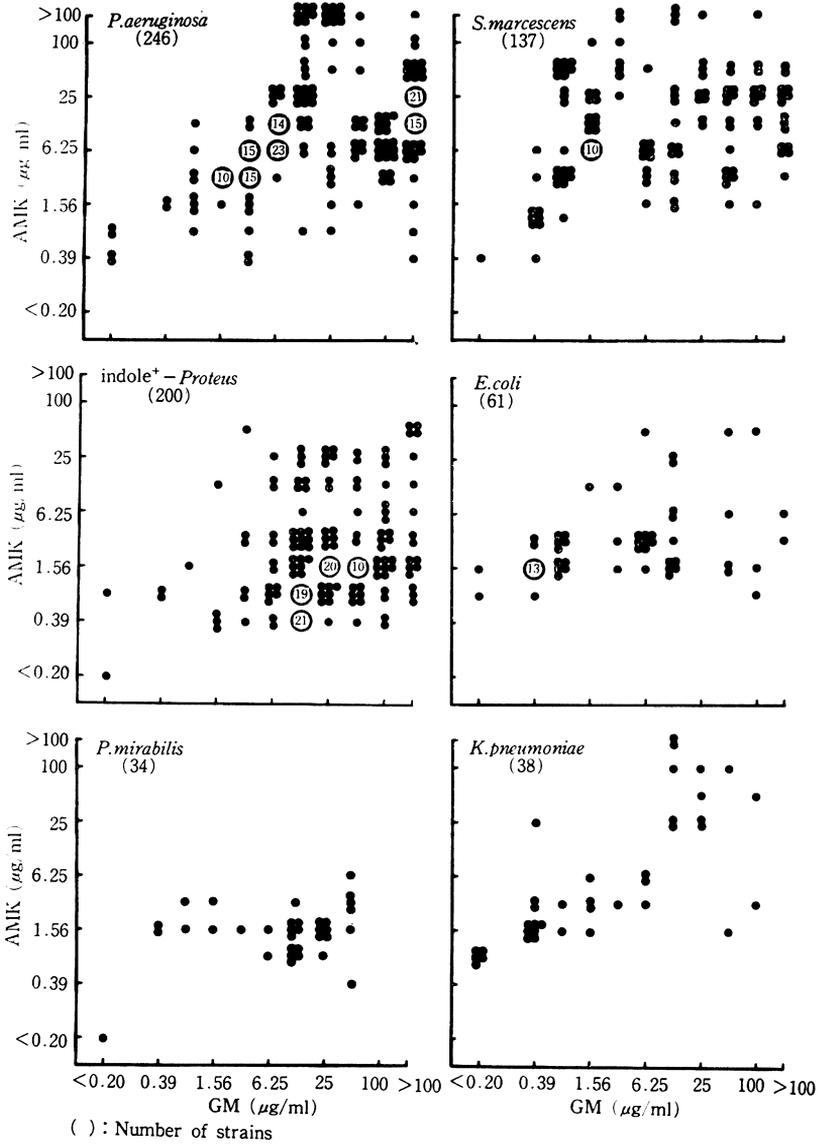
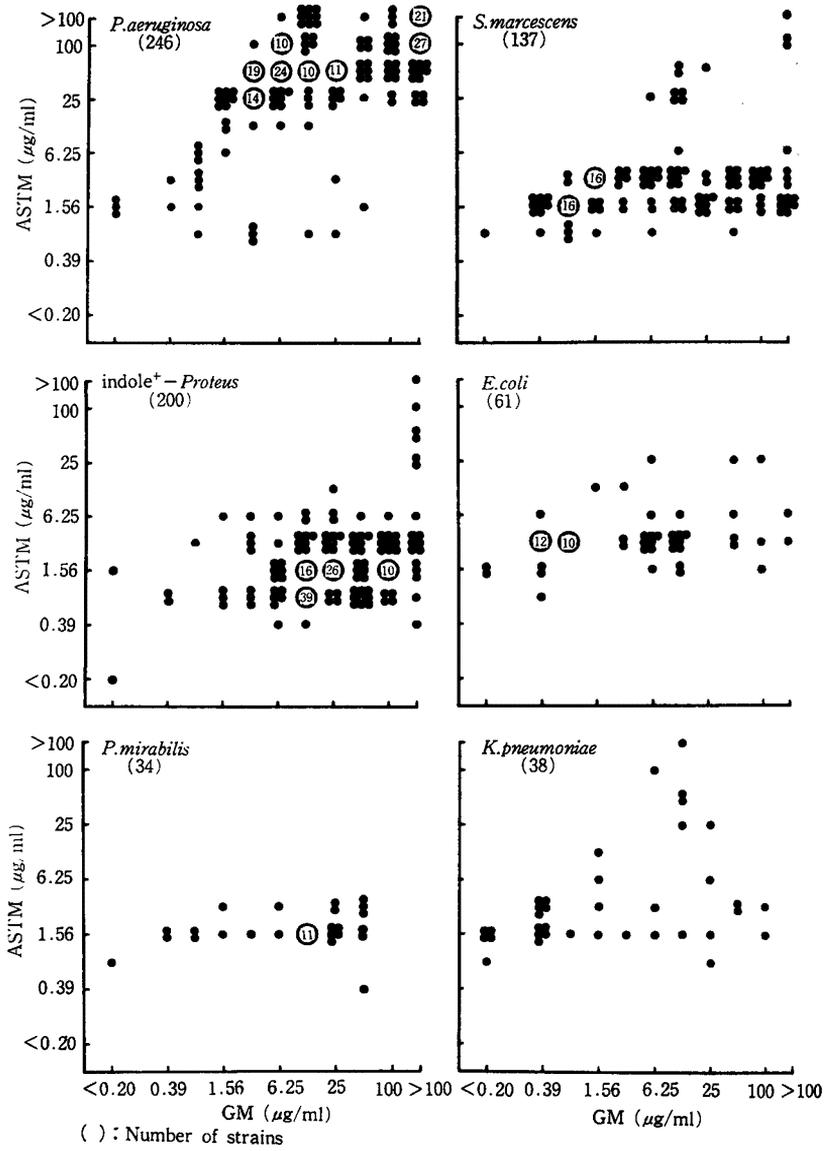


Fig. 5 Correlogram of MICs between ASTM and GM



された HBK, ASTM の 5 剤に限って各菌種の耐性パターン (Table 3~8) をみると各菌種において GM・DKB に耐性の菌が多く、これに AMK あるいは HBK あるいは ASTM 耐性の加わった菌が低頻度ながら分離されている。

アミノ配糖体に対する耐性機構^{6,7)}は、1) アミノ配糖体不活化酵素による不活化、2) 30S リボゾームの変化、3) 薬剤透過性の減少などが考えられる。中でも酵素による薬剤の不活化がその主なものであり、多くの場合 R 因子によるものである。今回 R 因子の検出やアミノ配糖体不活化酵素の同定はしていないが、耐性のパターンから酵素を推定する⁸⁾と、AAC(6') AAC(2''), AAD(2'') が多く分離されていると考えられる。また、ASTM の耐性菌が *P. aeruginosa* 以外の菌では少ないことから AAC(3)-I は少ないと考えられる。三橋ら⁷⁾は、日本において分離されるアミノ配糖体耐性菌は、AAC(6'), AAC(2''), APH(2'') および AAD(2'') によるものが多く、AAC(3)-I は少ないことを記載しており、今回の成績はこれと一致している。したがってアミノ配糖体による治療に際しては、その薬剤選択に注意が必要である。

文 献

- 1) KONDO, S.; K. IINUMA, H. YAMAMOTO, K. MAEDA & H. UMEZAWA: Synthesis of 1-N-[(s)-4-amino-2-hydroxybutyl]-kanamycin B and-3',4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J. Antibiot.* 26: 412~415, 1973
- 2) OKAMOTO, R.; S. IYOBE & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of Habekacin, a new aminoglycoside antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* (to be published)
- 3) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 4) D'AMATO, R. F.; C. THORNSBERRY, C. N. BAKER & L. A. KIRVEN: Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymyxin B and carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 596~600, 1975
- 5) UEDA, Y.; S. GOTO, A. SAITO, K. NAKAGAWA, K. SHIMIZU, K. HARA, K. MATSUMOTO, M. OHKOSHI, T. NIJIMA, T. NISHIURA, S. MITSUHASHI, S. IYOBE, M. INOUE, R. OKAMOTO & M. OKII: Astromicin (Fortimicin A) resistant bacteria in Japan. *Chemotherapy* 31: 331~338, 1983
- 6) MITSUHASHI, S.: Epidemiology and genetics of aminoglycoside antibiotic resistant in pathogenic bacteria. In *Drug action and drug resistance in bacteria. 2. Aminoglycoside antibiotics.* University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 179~207, 1975
- 7) MITSUHASHI, S. & H. KAWABE: Aminoglycoside antibiotic resistance in bacteria. In *Kidney disease. 2. The aminoglycoside; Microbiology, clinical use, and toxicology.* Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, pp. 97~122, 1982
- 8) MITSUHASHI, S.: Proposal for a rational nomenclature for phenotype, genotype and aminoglycoside-aminocyclitol modifying enzyme. In *Drug action and drug resistance in bacteria. 2. Aminoglycoside antibiotics.* University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 269~275, 1975

SURVEY OF AMINOGLYCOSIDE-RESISTANT BACTERIA IN JAPAN

MASAAKI OHKOSHI (Chief)

Department of Urology, Tokai University, School of Medicine

JOJI ISHIGAMI

Department of Urology, Kobe University, School of Medicine

HIROSHI OKUBO

The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University

HIROYUKI OMORI

Department of Urology, Okayama University, School of Medicine

MASATAKA KATSU

Department of Internal Medicine, National Kasumigaura Hospital

YOSHIAKI KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College

KAZUO KUROKAWA

Department of Urology, Tokushima University, School of Medicine

ATSUSHI SAITO

The Second Department of Internal Medicine, Jikei University, School of Medicine

KATSUJI SAKAI

Department of Surgery, Osaka City University, School of Medicine

ZENJIRO TAKASE

Department of Obstetrics and Gynecology, Kawasaki Medical School

TADASHI TAKIGAMI

Department of Internal Medicine, Yokohama Seamen Insurance Hospital

KAORU SHIMADA

Department of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

KEIICHI NAKAGAWA

Department of Internal Medicine, Tokyo Kyosai Hospital

ISSEI NAKAYAMA

The Third Department of Surgery, Nihon University, School of Medicine

YORIO NAIDE

Department of Urology, Fujita Gakuen University, School of Medicine

TADAO NIIJIMA

Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

TSUNEO NISHIURA

Department of Urology, Gifu University, School of Medicine

TOYOHEI MACHIDA

Department of Urology, Jikei University, School of Medicine

KEIZO MATSUMOTO

Department of Internal Medicine, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

SHUNRO MOMOSE

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyushu university

SUSUMU MITSUHASHI, SHIZUKO IYOBE, RYOICHI OKAMOTO and MITSUYOSHI OKII

Department of Microbiology, Gunma University, School of Medicine

The susceptibility of 775 clinical isolates to 11 aminoglycoside antibiotics was examined. The results are summarized as follows:

- 1) Isolation frequencies of strains resistant to AMK and HBK were 15.3 and 22.4 percent, respectively. On the other hand, *P. aeruginosa* strains were mostly resistant to ASTM.
- 2) Isolation frequencies of indole-positive *Proteus* strains resistant to AMK, HBK and ASTM were 16.0, 5.5 and 4.0 percent, respectively. Pattern of resistance to 11 aminoglycosides, except for NTL, was quite similar in both indole-positive and indole-negative *Proteus* strains.
- 3) Except for *P. aeruginosa* strains, ASTM was quite effective against many species of clinical isolates. Isolation frequency of *S. marcescens* strains resistant to ASTM was rather low (6.0%), in spite of high isolation frequencies of resistant strains to other aminoglycoside antibiotics.
- 4) Pattern of resistance to aminoglycoside antibiotics was very similar in both *E. coli* and *K. pneumoniae* strains.
- 5) According to the resistance patterns to 5 aminoglycosides, i. e., GM, DKB, AMK, HBK and ASTM, aminoglycoside-resistant strains having AAC(6'), AAC(2') or AAD(2'') were isolated at a high frequencies in Japan.