

ブドウ球菌の産生するアミノ配糖体修飾酵素の現況について

後 藤 朝

帝京大学医学部臨床病理

(主任：紺野 馬俊教授)

(昭和 59 年 8 月 20 日受付)

1983年1月から同年7月までの期間に、帝京大学医学部附属中検細菌検査室で扱った検査材料より検出された、種々のアミノ配糖体薬 (AGs) に耐性を示すブドウ球菌と、本学以外の5施設において1983年9月から同年11月までの間に分離された AGs 耐性のブドウ球菌とを研究の対象とした。そして、AGs に対する感受性を測定するとともに、それらの菌株中から抽出した菌株より粗酵素液を作製し、ラジオアイソトープ・アッセイ法と私達が作製した抗血清を用いた免疫学的方法とにより、AGs 修飾酵素を検索し、以下に述べるような成績を得た。

1. 上述した AGs 耐性菌は、その薬剤耐性パターンから、3つのグループに分けることができたが、その中の今回の酵素学的検索の対象とした第2と第3のグループに属する菌株は、ほぼその耐性パターンから推測される通りの AGs 修飾酵素を産生していることが明らかにされた。すなわち、KM, GM, AMK などに耐性の第2のグループの菌は、さらに LVDM に対する感受性から、LVDM に耐性の 2)-a と LVDM に感性の 2)-b) とに分けることができた。2)-a に属する菌は、2''-APH と 6'-AAC の bifunctional な活性を有する酵素と、3'-APH とを産生し、2)-b に属する菌は bifunctional な酵素のみを共通して産生する菌であった。第3のグループとした KM と AMK に耐性の菌株は、すべて 4', 4''-AAD のみを産生する菌であった。

2. 4', 4''-AAD を産生する菌は、第2のグループの中にも見出されたが、それらの菌は2種以上の AGs 修飾酵素を産生する菌であった。それらの酵素活性はラジオアイソトープ・アッセイ法と免疫学的方法によって確認できた。

3. 4', 4''-AAD を産生する菌は、本学附属病院のみならず、日大附属駿河台病院からの菌株中にも高頻度に見出された。また、それらの産生菌は、北海道、岡山あるいは鹿児島地区からの菌株中にも見出された。そして、4', 4''-AAD を産生する菌は、*S. aureus* よりも *S. epidermidis* に多く見出される傾向が見られた。

4. 異菌種間における機能を同じくするところの AGs 修飾酵素は、私達が作製した抗血清を用いた免疫学的方法によって、抗原性としても同一であることが示唆された。

私達は、1975年に小児の重症ブドウ球菌感染症から kanamycin 耐性の *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) を分離¹⁾して以来、本菌の薬剤耐性の動向に注目し、機会あるごとにその疫学的検索を進めてきた。さらに、そのアミノ配糖体薬 (AGs) に対する耐性機構のメカニズムについても、GM 耐性菌が分離²⁾されたのを契機に、それらの菌より抽出した酵素による薬剤の修飾部位を nuclear magnetic resonance (NMR) によって解析している³⁾。一方、欧米では比較的早く出現のみられた 4', 4''-アデニル転移酵素 (4', 4''-AAD) を産生すると推定されるブドウ球菌^{4, 5)}が、最近、私達の中検細菌検査室で扱う検査材料の中から分離されるようになってきたことから、1983年1月から約7か月間にわたって、私達が

扱っている臨床材料から分離されたブドウ球菌について、AGs に対する感受性を調べ、その解析を行なった。その結果、私達の病院で分離される *S. aureus* の AGs に対する耐性パターンには、大きく分けて3つのタイプがあることを見出した⁶⁾。すなわち、第1のグループは、kanamycin に耐性を示す菌群、第2のグループは、kanamycin に加えて gentamicin, dibekacin, tobramycin および sisomicin などにも耐性を示すのみならず、amikacin にも中等度以上の耐性を示す菌群、第3のグループは、tobramycin と amikacin に高度の耐性、ならびに dibekacin には中等度の耐性を示すが、gentamicin や sisomicin には感性である菌群である。そして、このような耐性パターンの特徴は、コアグラ-

ゼ陰性のブドウ球菌 (coag. 陰性ブドウ球菌) においても同様に見られることも報告してきた⁷⁾。さらには、これらの AGs 耐性菌の中から、耐性パターンの異なるいくつかの *S. aureus* と coag. 陰性ブドウ球菌とを選び出して、それぞれの菌が産生する AGs 修飾酵素の精製法を確立し、それに基づいてそれぞれの酵素に対する抗血清をも作製して、AGs 修飾酵素の免疫学的同一性についても検討を行なった⁸⁾。その結果、ブドウ球菌が産生する AGs 修飾酵素には 3'-リン酸転移酵素(3'-APH)、2'-リン酸転移酵素(2'-APH)と 6'-アセチル転移酵素(6'-AAC)の両機能を有する酵素、および 4', 4''-AADの3つの酵素があることが明らかとなった。そして、ブドウ球菌であれば、菌種にかかわらず、薬剤の修飾部位を同じくする酵素は、その分子量や等電点は同じであること、そして、免疫学的にも同一であることが示されたのである。

これらの修飾部位を具にする酵素は、AGs に対する耐性パターンの特徴からも、ある程度推測することは可能であるが、しかしながら、そのような解析は、前述したように私達の病院における中検細菌検査室で分離された AGs 耐性菌の中から選んだ少数株について検討したものであり、臨床検査材料から分離される多くの菌株について調べたものではない。また、他施設から分離される AGs 耐性のブドウ球菌においても同様の成績が見られるものなのか否かを確かめることも必要であった。そのため、私達は、先に発表した 1983 年の 1 月から 7 か月間にわたって調べたブドウ球菌の中から、さらに多くの菌株を選び、加えて本邦 5 か所の施設より AGs に耐性を示すブドウ球菌の分与を受け、それらの菌の AGs に対する耐性パターンを調べるとともに、AGs 修飾酵素を後に述べるラジオアイソトープ・アッセイ法(ラジオ・アッセイ法)と抗血清を用いた免疫学的手法とを用いて検索し、耐性パターンとの関連性について調べたので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

1) 本学附属病院よりの分離菌株

S. aureus については 1983 年 1 月から同年 4 月、coag. 陰性ブドウ球菌については 1983 年 1 月から同年 7 月までの期間中に、帝京大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室で扱った臨床検査材料より分離された株の中で、後に述べる薬剤感受性測定方法に従って AGs に対する感受性を調べた既報^{6,7)}の AGs 耐性菌の中から、前述した第 2 のグループと第 3 のグループに属すると思われる菌 66 株を選び、酵素学的検索に供した。抽出した菌株の内訳は、*S. aureus* が入院患者由来 16 株、外来

患者由来 10 株、coag. 陰性ブドウ球菌は入院患者由来 24 株、外来患者由来 16 株である。

2) 他施設よりの分離菌株

下記の 5 施設において、1983 年 9 月から同年 11 月までの期間に収集された kanamycin (KM), gentamicin (GM) あるいは amikacin (AMK) のいずれかに耐性を示す *S. aureus* および coag. 陰性ブドウ球菌の分与を受け、実験に用いた。分与を受けた施設は、1) 旭川医科大学小児科学教室 (*S. aureus* 4 株, coag. 陰性ブドウ球菌 8 株)、2) 日本大学附属駿河台病院中央検査部細菌検査室 (*S. aureus* 17 株, coag. 陰性ブドウ球菌 1 株)、3) 川崎医科大学産婦人科学教室 (*S. aureus* 1 株, coag. 陰性ブドウ球菌 9 株)、4) 久留米大学医学部小児科学教室 (*S. aureus* 3 株, coag. 陰性ブドウ球菌 11 株) および 5) 鹿児島市医師会臨床検査センター (*S. aureus* 21 株, coag. 陰性ブドウ球菌 9 株) の合計 84 株である。これらの菌株は、後に述べる薬剤感受性測定法に従って、感受性を再度測定し、AGs に耐性を示した菌株の中から 29 株を無作為に抽出して、前述の本学附属病院由来の菌から抽出した 66 株とともに酵素学的検討に供した。他施設由来の菌株から抽出した 29 株の内訳は、*S. aureus* が 15 株、*S. epidermidis* が 14 株であったが、酵素学的検討を行なったこれらの菌については、SP-18 (日水製薬) を用いて菌種の同定を行なったものである。

2. 薬剤感受性測定方法

上述した菌株について、日本化学療法学会標準法⁹⁾に従い、各種抗生物質に対する感受性を測定した。対象とした被験抗生物質は、AGs のうち、KM, lividomycin (LVDM), GM, dibekacin (DKB), tobramycin (TOB), AMK の 6 剤、その他に、benzylpenicillin (PCG), cloxacillin (MCIPC), cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX), tetracycline (TC), clindamycin (CLDM) で、いずれも、それぞれの薬剤を製造している製薬会社より提供を受けたものである。培地は感受性ディスク用培地 (日水) を使用し、最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、被験菌を感受性 broth で 37°C 18 時間培養した菌の原液と、その原液を 100 倍に希釈した菌液とについて行なった。

3. 酵素の抽出

被験菌株は、GM あるいは TOB 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む Tryptic Soy broth (TS broth) 10 ml 中に接種し、37°C で 18 時間前培養を行ない、その菌液 5 ml を 150 ml の TS broth 中に接種して対数増殖期の後期まで 37°C で振盪培養を行なった。そして、4°C、8,000 r. p. m., 10 分の遠心により集菌し、菌体を 0.1 M PMK buffer {0.1 M phosphate buffer, 60 mM KCl, 10 mM

Mg(CH₃COO)₂ · 4 H₂O, 6 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol pH 6.8) で一度洗浄した。次に、菌体を 5~6 ml の PMK buffer に懸濁し、氷冷しながら 30 分 2 回の超音波破碎 (9 KHz, KUBOTA 200 M) を行なった。破碎液は、4°C, 8,000 r. p. m., 10 分間の遠心を行ない、上清部分をさらに 4°C, 40,000 r. p. m., 60 分遠心し、得られた上清を粗酵素液として使用した。

4. 酵素活性の測定

1) ラジオアイソトープ・アッセイ法

粗酵素液中に存在する AGs 修飾酵素の種類は、特定の標識化合物を用いて、その反応系に用いる AGs の基質特異性によって推測することが可能であることから¹⁰⁾、以下の標識化合物を用いた。すなわち、アセチル転移酵素の解析には [¹⁴C]-acetyl coenzyme A (¹⁴C-acetyl CoA 2.2 Ci/mmol), リン酸転移酵素の解析には [γ-³²P]-adenosine-triphosphate (γ-³²P ATP 3,000 Ci/mmol) および アデニル転移酵素の解析に [¹⁴C]ATP (1.0 mCi/mmol) を使用した。活性測定のためのそれぞれの組成は下記のとおりである。

A. アセチル転移酵素の反応系

Enzyme	40 μl
[¹⁴ C]Acetyl CoA (final 0.5 μCi)	10 μl
1 mM SISO	10 μl
0.1 M PMK buffer	40 μl
Total	100 μl

B. 2' 位の水酸基あるいは 3' 位の水酸基のリン酸転移酵素の反応系

Enzyme	40 μl
[γ- ³² P] ATP (final 0.5 μCi)	10 μl
1 mM SISO or LVDM	10 μl
0.1 M PMK buffer	40 μl
Total	100 μl

C. アデニル転移酵素の反応系

Enzyme	40 μl
[¹⁴ C] ATP (final 0.34 μCi)	20 μl
1 mM TOB	10 μl
0.1 M PMK buffer	30 μl
Total	100 μl

各粗酵素液について、上述したすべての反応系の検索を実施した。各々の反応液は、37°C で 60 分間 incubation した後、ワットマンの濾紙 (phosphocellulose paper P 81) 上に 20 μl ずつ滴下して乾燥させた。続いて、72°C の湯水で 3 回洗浄しながら酵素反応を停止させ、次いで冷水で 4 回洗浄した後乾燥させた。それらの濾紙片の放射活性は液体シンチレーションカウンター (Aloka

LSC-700 型) により測定し、コントロール (基質を加えないサンプル) との対比により、それぞれの標識化合物の薬剤への取り込みの有無を検討して AGs 修飾酵素を推定した。

2) 免疫学的手法による修飾酵素の検索

既に報告したように、3'-APH に対する抗血清 (*S. aureus* MS 353 (pTU 512) 株産生の 3'-APH を用いて作製)、6'-AAC および 2'-APH の bifunctional な機能を有する酵素に対する抗血清 (*S. aureus* MS 353 (pTU 068) 株産生の酵素を用いて作製) および 4', 4''-AAD に対する抗血清 (*S. aureus* TK 729 株産生の 4', 4''-AAD を用いて作製) を使用して、粗酵素液中に存在する AGs 修飾酵素の検索を immunodiffusion 法により行なった。immunodiffusion 用のゲル板 (直径 5 cm のシャーレを使用) は、Sigma agarose 0.5 g, Difco agar 0.5 g, および窒化ナトリウム 0.1 g を 0.1 M ベロナル buffer (pH 8.6) 100 ml に溶解したものを 5 ml ずつ注して使用した。ゲル板には、中央に抗血清を入れるための φ 0.5 mm の well を作り、さらにその周囲に 5 mm の幅をあけて、4 個の抗原用 well を作製した。抗血清および抗原となる粗酵素液は、各々 30 μl ずつ well に注入し、3 日間冷蔵庫に放置した後、沈降線の有無を観察した。

II. 結 果

1. 本学附属病院由来の AGs 耐性菌における AGs 修飾酵素について

本学附属病院中検細菌検査室で扱う臨床検査材料から分離された AGs 耐性のブドウ球菌より、酵素学的検討をするために選んだ 66 株の内訳は、Table 1 および Table 2 に示したとおりである。

すなわち、*S. aureus* については、第 2 のグループに属すると考えられるパターンを示した菌株の中から、入院患者由来 10 株、外来患者由来 10 株の計 20 株を無作為に抽出し、第 3 のグループに属すると考えられる耐性パターンを示した菌株は、検索期間中に検出し得た入院患者由来の 6 株全株を抽出した。coag. 陰性ブドウ球菌についても、同様にして第 2 のグループに属すると推定される菌株からは、入院患者由来 12 株、外来患者由来 10 株の計 22 株を無作為に選び、第 3 のグループに属すると推定される菌株は、入院患者由来株から 12 株、外来患者由来株から 6 株を無作為に選んだ。つまり、AGs に対する耐性パターンから、第 2 のグループに属すると考えられる菌は、計 298 株と多数検出されたことから、無作為に計 42 株を選び、第 3 のグループに属すると考えられる菌については、計 32 株と検出頻度が低いことから、ほとんどの菌株について AGs の修飾酵素

Table 1 Resistance patterns to aminoglycosides of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials at Teikyo University Hospital

Resistance pattern	Inpatient		Outpatient	
	No. of strains isolated	No. of strains extracted	No. of strains isolated	No. of strains extracted
1) KM	44(18.1%)		3(10.7%)	
2) KM, GM and AMK	193(79.4%)	10	25(89.3%)	10
3) KM, TOB and AMK	6(2.5%)	6	0	
Total	243	16	28	10

Table 2 Resistance patterns to aminoglycosides of coagulase negative staphylococci isolated from clinical materials at Teikyo University Hospital

Resistance pattern	Inpatient		Outpatient	
	No. of strains isolated	No. of strains extracted	No. of strains isolated	No. of strains extracted
1) KM	15(15.6%)		15(37.5%)	
2) KM, GM and AMK	64(66.7%)	12	16(40.0%)	10
3) KM, TOB and AMK	17(17.7%)	12	9(22.5%)	6
Total	96	24	40	16

を検索したことになる。

これらの AGs 耐性菌のうち、*S. aureus* についての AGs に対する耐性パターンと、ラジオ・アッセイ法に基づく AGs 修飾酵素との関係についての検討成績を、Table 3 に示す。AGs に対する耐性パターンから第 2 のグループに属すると推定された菌株は、その推測のとおり、確かに 2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素の産生が認められたが、その他に、第 1 のグループに属する菌に見出される 3'-APH をも産生する菌と、産生しない菌とに大別された。それらの菌株は、Table 3 に 2)-a および 2)-b として示したように、LVDM に対する感受性を調べることによって区別することが可能であった。また、これらの菌の中には、さらに、第 3 のグループに属する菌が産生する 4', 4''-AAD をも産生する菌も、少数株ではあるが認められたが、第 3 のグループとした菌が、この 4', 4''-AAD のみを産生する菌であることと対比して考えると、各種 AGs に対する耐性パターンの意味は、かなり明確にその菌の産生する AGs 修飾酵素を反映しているものと考えられた。

coag. 陰性ブドウ球菌についての成績を、Table 4 に示す。第 2 のグループに属すると考えられた外来患者由来株のうち 1 株は *S. cohnii*、2 株は *S. haemolyticus* と同定され、その他の菌株はすべて *S. epidermidis* であった。これらの菌においても菌種による違いは見られず、*S. aureus* と同様に、第 2 のグループは 2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素と 3'-APH とを産生する 2)-a と、2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素の

みを共通して産生する 2)-b とに分けることができた。そして、これらの菌株には、さらに、4', 4''-AAD をも産生する菌株が *S. aureus* よりも多く認められ、特に入院由来株 (8/12=66.7%) で、外来由来株 (2/10=20.0%) と比べてそれらの産生菌が多いという印象を受けた。

一方、第 3 のグループに属する菌は、すべて 4', 4''-AAD の産生能のみを有していることが明らかにされた。

2. 本学以外の他施設より分離されたブドウ球菌における AGs 耐性と AGs 修飾酵素について

他施設から分与を受けた AGs 耐性のブドウ球菌については再度薬剤感受性を測定したが、AGs のいずれかの薬剤に耐性を示した菌株は、*S. aureus* 46 株、*S. epidermidis* 38 株であり、その他の菌種に同定された coag. 陰性ブドウ球菌はなかった。これらの菌株の AGs に対する耐性パターンは、Table 5 および Table 6 に示す。菌株数が少なく、各施設間の比較はできなかったが、全体を集計して眺めると、Table 5 に示した *S. aureus* では、第 1 のグループに属すると考えられる KM、LVDM 耐性菌は 6 株 (13.0%) であり、第 2 のグループに属する菌は 30 株 (65.2%) と最も多く、第 3 のグループに属する菌は日大附属駿河台病院から分与を受けた 10 株 (21.7%) のみであった。これらの菌の AGs に対する耐性パターンは、本学附属病院で検出された AGs 耐性菌の耐性パターンと基本的には差は見られなかったが、第 3 のグループに属すると考えられる菌が、

Table 3 AG modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials at Teikyo Univ. Hospital

Resistance pattern	Source (No.)	Strain	Enzyme*		
			6'-AAC+2'-APH	3'-APH	4',4''-AAD
2)-a KM·LVDM·GM·AMK·TOB	Inpatient (6)	634	+	+	-
		661	+	+	-
		727	+	+	-
		730	+	+	+
		731	+	+	-
		781	+	+	-
	Outpatient (8)	O-316	+	+	+
		O-333	+	+	-
		O-507	+	+	-
		O-669	+	+	+
		O-724	+	+	-
		O-773	+	+	-
		O-774	+	+	-
		O-811	+	+	-
2)-b KM·GM·AMK·TOB	Inpatient (4)	539	+	-	-
		541	+	-	-
		589	+	-	+
		590	+	-	-
	Outpatient (2)	O-511	+	-	-
O-587		+	-	-	
3) KM·AMK·TOB	Inpatient (6)	705	-	-	+
		729	-	-	+
		784	-	-	+
		790	-	-	-
		803	-	-	+
		806	-	-	-

*Enzyme : 3'-APH=3'-phosphotransferase
 2''-APH=2''-phosphotransferase
 6'-AAC=6'-acetyltransferase
 4',4''-AAD=4',4''-adenylyltransferase

本学と同じ東京地区であることが注目された。

Table 6 に示した *S. epidermidis* の AGs 耐性パターンも、基本的には *S. aureus* の耐性パターンと大差はなかったが、この菌種では、鹿児島医師会センターから分与された1株が第3のグループに属すると思われる菌であった。

上述した *S. aureus* から産生される AGs 修飾酵素と AGs 耐性パターンとの関係について調べた結果を Table 7 に示す。第2のグループに属する被験菌株は、すべて LVDM 耐性を含む第2のグループの 2)-a に属する菌で、2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素と、3'-APH の2種類の酵素を産生する菌であり、第3のグループに属すると思われる日大附属駿河台病院由来株は、すべて 4',4''-AAD を産生する菌であった。なお、これらの菌株中には、本学附属病院で分離された菌株中に見られたような、第2のグループに属する菌の中

に、4',4''-AAD をも同時に産生する菌は見出されなかった。

S. epidermidis についての成績は Table 8 に示す。本学附属病院から検出された AGs 耐性菌と同様に、第2のグループに属する菌は、LVDM 耐性の有無に従って 2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素の他に、さらに 3'-APH をも産生する菌と産生しない菌、すなわち、2)-a と 2)-b とに分けることができた。また、鹿児島医師会センターから分与された第3のグループに属すると考えられた菌は、4',4''-AAD のみを産生する菌であった。そして、その他に、第2のグループに属する菌ではあるが、旭川医大からの1株と川崎医大からの1株に、4',4''-AAD の産生能をも有している株のあることが見出された。全体として眺めると、本学で検出された AGs 耐性菌における酵素と同じ機能を有する酵素を産生する菌が、他施設においても認められたこととなる。

Table 4 AG-modifying enzymes from coagulase negative staphylococci isolated from clinical materials at Teikyo Univ. Hospital

Resistance pattern	Source (No.)	Strain	Enzyme		
			6'-AAC+2'-APH	3'-APH	4',4'-AAD
2)-a KM·LVDM·GM·AMK·TOB	Inpatient (7)	318	+	+	+
		336	+	+	+
		355	+	+	+
		390	+	+	+
		400	+	+	+
		453	+	+	+
		455	+	+	+
	Outpatient (8)	O-305	+	+	+
		O-319	+	+	+
		O-1003	+	+	+
		• O-1019	+	+	-
		O-1025	+	+	-
		•• O-1065	+	+	-
		O-1072	+	+	-
		•• O-1097	+	+	-
2)-b KM·GM·AMK·TOB	Inpatient (5)	307	+	-	-
		427	+	-	+
		462	+	-	+
		467	+	-	-
		483	+	-	-
	Outpatient (2)	O-1062	+	-	-
		O-1098	+	-	-
3) KM·AMK·TOB	Inpatient (12)	301	-	-	+
		1001	-	-	+
		1018	-	-	+
		1025	-	-	+
		1030	-	-	+
		1037	-	-	+
		1081	-	-	+
		1096	-	-	+
		1111	-	-	+
		1219	-	-	+
		1221	-	-	+
		1252	-	-	+
	Outpatient (6)	O-1040	-	-	+
		O-1091	-	-	+
		O-1099	-	-	+
		O-1101	-	-	+
		O-1111	-	-	+
O-1212	-	-	+		

* *S.cohnii*, ** *S.haemolyticus*

なお、久留米大学からの1菌株(No.60)で、酵素活性が見出せなかったが、その原因は、耐性が脱落しやすく酵素の産生量が極端に少ないためか、あるいは、菌体膜の透過性の変化等による耐性菌である可能性が考えられた。

3. 免疫学的検索方法による酵素の同一性

上述したラジオ・アッセイ法によるAGs修飾酵素を検討した本学附属病院分離株と他施設から分与された菌株のすべてより抽出した粗酵素液を用いて、3'-APH, 6'-AACと2'-APHの両機能を有する酵素および4', 4''-AADに対して作製した抗血清を反応させ、沈降線の

Table 5 Resistance patterns to aminoglycosides of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials at five hospitals other than Teikyo Univ. Hospital

Resistance pattern	Asahikawa	Nichidai	Kawasaki	Kurume	Kagoshima	Total
1) KM and LVDM	0	1	0	0	5	6(13.0%)
2)-a KM, LVDM, GM and AMK	2	6	1	3	15	27(58.7%)
2)-b KM, GM and AMK	2	0	0	0	1	3(6.5%)
3) KM, TOB and AMK	0	10	0	0	0	10(21.7%)
Total	4	17	1	3	21	46

Table 6 Resistance patterns to aminoglycosides of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical materials at five hospitals other than Teikyo Univ. Hospital

Resistance pattern	Asahikawa	Nichidai	Kawasaki	Kurume	Kagoshima	Total
1) KM and LVDM	2	0	2	2	1	7(18.4%)
2)-a KM, LVDM, GM and AMK	3	1	6	7	4	21(53.2%)
2)-b KM, GM and AMK	3	0	1	2	3	9(23.7%)
3) KM, TOB and AMK	0	0	0	0	1	1(2.6%)
Total	8	1	9	11	9	38

Table 7 AG-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials at five hospitals other than Teikyo Univ. Hospital

Hospital	Resistance pattern	Strain	Enzyme		
			6'-AAC+2'-APH	3'-APH	4',4''-AAD
Asahikawa	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	62	+	+	-
		73	+	+	-
Nichidai	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	89	+	+	-
		109	+	+	-
	3) KM·AMK·TOB	79	-	-	-
		81	-	-	-
		82	-	-	-
		85	-	-	-
88	-	-	-		
99	-	-	-		
Kawasaki	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	42	+	+	-
Kurume	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	55	+	+	-
		57	+	+	-
Kagoshima	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	9	+	+	-
		25	+	+	-

有無により AGs 修飾酵素の免疫学的同一性について検索した。その結果は、Table 3, Table 4, Table 7 および Table 8 に示したラジオ・アッセイ法で得られた酵素活性の有無とすべて一致した。その中から、いくつかの例を示す。Fig. 1 には、4',4''-AAD の産生が明らかにされた他施設より分与された菌株の成績を示す。中心の well にはそれぞれの AGs 修飾酵素に対する抗血清が注入されており、A, B, C と名付けた well には、それらの抗血清を作製するために、抗原として用いた精製された AGs

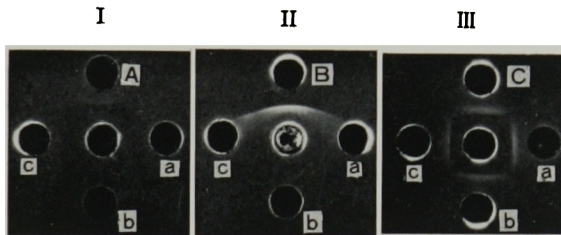
修飾酵素液を注入してある。そして、a の well には鹿児島医師会センターから分与された *S. epidermidis* No. 8 株より得た粗酵素液、b と c の well には日大附属駿河台病院から分与された *S. aureus* No. 79 株と No. 81 株から得た粗酵素液をそれぞれ注入してある。いずれの被験菌株においても、4',4''-AAD に対する抗血清との間のみ明瞭な沈降線が形成された。

Fig. 2 には、4',4''-AAD だけではなく、その他の酵素の産生も見られた、旭川医大から分与された *S. epider-*

Table 8 AG-modifying enzymes from *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical materials at four hospitals other than Teikyo Univ. Hospital

Hospital	Resistance pattern	Strain	Enzyme		
			6'-AAC+2'-APH	3'-APH	4',4''-AAD
Asahikawa	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	67	+	+	-
		74	+	+	-
	2)-b KM·GM·AMK·TOB	66	+	-	-
		75	+	-	+
Kawasaki	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	40	+	+	-
		44	+	+	+
Kurume	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	46	+	+	-
		60	-	-	-
	2)-b KM·GM·AMK·TOB	54	+	-	-
Kagoshima	2)-a KM·LVDM·GM·AMK ·TOB	13	+	+	-
		20	+	+	-
	2)-b KM·GM·AMK·TOB	11	+	-	-
		18	+	-	-
	3) KM·AMK·TOB	8	-	-	+

Fig. 1 Immunodiffusion patterns of antisera to AG-modifying enzymes and enzyme solutions extracted from KM, AMK, and TOB resistant staphylococci



I: Antiserum to 3'-APH, II: Antiserum to bifunctional enzyme of 6'-AAC and 2''-APH, III: Antiserum to 4', 4''-AAD.

A: 3'-APH III from MS 353(pTU 512), B: Bifunctional enzyme of 6'-AAC and 2''-APH from MS 353(pTU 068), C: 4', 4''-AAD from TK 729.

a: Enzyme sol. extracted from *S. epidermidis* No. 8 strain from Kagoshima.

b: Enzyme sol. extracted from *S. aureus* No. 79 strain from Surugadai Hosp., Nippon Univ.

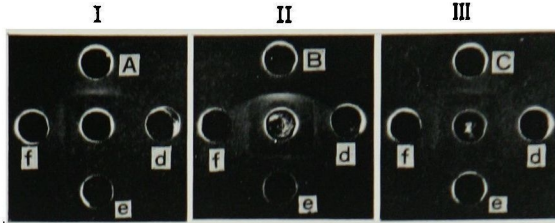
c: Enzyme sol. extracted from *S. aureus* No. 81 strain from Surugadai Hosp., Nippon Univ.

midis No. 75 株 (well: d) と川崎医大から分与された *S. epidermidis* No. 44 株 (well: f) の成績を示した。well e には、抗原として用いた 6'-AAC と 2''-APH の両機能を有する酵素のみを産生する *S. epidermidis* の酵素液を対照として注入してある。複数の AGs 修飾酵素を産生している菌株でも、このように明瞭な沈降線が形成され、産生されている AGs 修飾酵素を検定することと同時に、それらの酵素の免疫学的同一性についての確認がなされた。

III. 考 察

ブドウ球菌の AGs 修飾酵素に関する研究は、本邦における *S. aureus* および *S. epidermidis* の 3'-APH の説明が始まりである¹¹⁾。しかしながら、欧米での GM や TOB に耐性を示すブドウ球菌の出現は本邦よりも早く、1970 年代には、GM に耐性を示す菌にはリン酸転移酵素とアセチル転移酵素の活性¹²⁻¹⁴⁾、TOB 耐性の菌にはアデニル転移酵素の活性^{5,15)}が見出されるとの報告がなされた。そして、hospital strain¹⁶⁻²²⁾としてこれらの耐

Fig. 2 Immunodiffusion patterns of antisera to AG-modifying enzymes and enzyme solutions extracted from AGs resistant *Staphylococcus epidermidis*



I : Antiserum to 3'-APH, II : Antiserum to bifunctional enzyme of 6'-AAC and 2''-APH, III : Antiserum to 4', 4''-AAD.

A : 3'-APH III from MS 353 (pTU 512), B : Bifunctional enzyme of 6'-AAC and 2''-APH from MS 353(pTU 068), C : 4', 4''-AAD from TK 729.

d : Enzyme sol. extracted from *S. epidermidis* No.75 strain from Asahikawa Univ. Hosp.

e : Enzyme sol. extracted from *S. epidermidis* TK 307 strain from Teikyo Univ. Hosp.

f : Enzyme sol. extracted from *S. epidermidis* No. 44 strain from Kawasaki Univ. Hosp.

性菌が問題にされたことから、AGs を修飾する酵素の検討に加えて、耐性伝達に関する解析も行なわれてきた。その中でも注目されたのは、*S. aureus* と *S. epidermidis* 間における耐性プラスミドの相似性^{23,24)} と conjugation による耐性伝達の成績²⁵⁻²⁷⁾ であった。しかしながら、AGs 修飾酵素の相似性を直接証明するに必要な、前段階としての酵素の単離法についてはいくつかの困難があり、その単離を目的とした報告^{5,28)} は散見されたが、いずれも酵素蛋白の精製度が充分ではなく、免疫学的な同一性を云々するまでの抗血清の作製には至っていなかった。このようなことを踏まえて、私達は既に報告²⁾ したように、欧米に比べ約5年程遅れてのことではあるが、本邦においても、GM に耐性を示すブドウ球菌を臨床検査材料から見出したのを機会に、AGs 修飾酵素の精製法を確立して、免疫学的な同一性を証明するための研究に踏み出したのである。しかしながら、この研究の初期に対象とした AGs 耐性菌の中からは、KM に耐性を示す 3'-APH を産生する菌と、KM と GM を含む大部分の AGs に耐性を示す 2''-APH と 6'-AAC の両活性の見出される菌のみが分離され、4', 4''-AAD を産生すると推定される菌は、私達のところをも含めて本邦では分離されておらず、その点が欧米における AGs 耐性菌の相違点とも考えられたのである。

しかしながら、1983 年の始め頃より、本学附属病院の中検細菌検査室で扱う検査材料から分離されるブドウ球菌の中に、GM 含有ディスクの周囲には明瞭な阻止円が見られるが、KM と AMK のディスクの周囲には阻止円の見られない菌株が、稀にはあるが見出されるよ

うになってきたのである。つまり、臨床検査材料から分離される AGs 耐性菌は、日常業務に使用している KM, GM および AMK の3種類のディスクに対する感受性を調べることにより、KM のみに耐性を示す第1グループ、KM, GM には耐性を示し、AMK にも耐性を示すか、あるいは感性菌に比べて阻止円が著しく小さい第2のグループ、そして上述した KM と AMK には耐性を示すが GM には感性を示す第3のグループに分けられ、それらの耐性パターンからそれぞれの菌が産生する AGs 修飾酵素をある程度推測することが可能であると述べたのである^{6,7)}。

そして、この第3のグループに属する菌が 4', 4''-AAD を産生する菌であることは既に報告したとおりである^{7,8)}。1983 年の本学附属病院での 4', 4''-AAD を産生する菌の分離状況は、*S. aureus* で入院由来株中 1.0%、外来由来株中 0%、coag. 陰性ブドウ球菌で入院由来株中 0.9%、外来由来株中 6.3% という成績であったが、それらの菌が、いわゆる hospital strain として本学附属病院のみに見出される菌なのか、また、AGs に対する耐性パターンのみから AGs 修飾酵素を推測してよいのかなどについては、まだいくつかの問題点も存在していたのである。

そのようなことから、私達は、AGs 耐性菌から AGs 修飾酵素を抽出し、その精製法と精製ずみのそれぞれの酵素を単一の抗原とした抗血清の作製を試み、それらがブドウ球菌における AGs 修飾酵素の有無のみならず、酵素の性状ならびに抗原としての同一性を調べるのに有用であることを見出したのである⁸⁾。したがって、AGs

修飾酵素に関連した研究において後に残された問題は、私達が作製したそれぞれの AGs 修飾酵素に対する抗血清が実際に分離される多くの野生株における AGs 修飾酵素の検索に役立つかどうかということ、当初の問題提起とした AGs に対する感受性測定値から読み取れる AGs 耐性パターンから、その菌の産生する AGs 修飾酵素を推定することは本当に妥当なのかということ、さらには、もし妥当だとするならば、4',4''-AAD を産生する菌が、本学附属病院のみならず本邦にも広く分布し始めているのかという3点に重点がおかれたのである。このことから、北は北海道から、南は鹿児島に至る日本のいくつかの医療施設により、その御好意により AGs 耐性菌の分与を受け、私達が本学附属病院で分離した菌とともに、AGs に対する感受性を調べると同時に、多くの AGs 耐性菌について、菌を破砕して AGs に対する粗酵素を抽出し、それらの粗酵素液に含まれる AGs 修飾酵素の同定をラジオ・アッセイ法と抗血清を用いての免疫学的手法により検索を行なったのである。

その結果、私達が AGs 修飾酵素を精製して作製したそれぞれの抗血清を用いて得られた成績は、多くの菌株でラジオ・アッセイ法と完全に一致した成績を示すことが実証された。また、本研究の目的の一つとした 4',4''-AAD を産生する菌は、本学附属病院のみならず、日大附属駿河台病院ではより高頻度に見出され、しかも北海道や鹿児島で分離された菌株中にもそれらの菌を見出すことができること、しかも 4',4''-AAD を産生する菌は、*S. aureus* よりも *S. epidermidis* に多く見出されること、そして、*S. aureus* と *S. epidermidis* のような異菌種間における AGs 修飾酵素であっても、抗原としては同一であることが明らかにされたのである。さらに興味あることには、AGs 耐性菌の中には、複数の AGs 修飾酵素を産生する菌が高頻度に見出されたことであり、それらは、ラジオ・アッセイ法と免疫学的手法の両者を用いて、初めて明確に解析できたことである。しかしながら、その中の 3'-APH の有無については、臨床ではほとんど使用されていないが、薬剤感受性試験に LVDM を加えることで、少なくとも第 2 グループの a) とした 2''-APH と 6'-AAC の両機能を有する酵素および 3'-APH の 2 種類の酵素を産生する菌であることを推定することは可能であった。

そして、今後、臨床における薬剤の使われ方によっては、GM に耐性を示すブドウ球菌だけでなく、AMK や TOB に耐性を示す 4',4''-AAD を産生する菌の増加する可能性のあることが示唆されるのである。

本論文の要旨は、第 32 回日本化学療法学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、御指導を賜った紺野昌俊教授に感謝致します。また、菌株の収集に御協力いただきました中央検査部細菌検査室の皆様、ならびに臨床病理の生方公子、山下直子の阿氏に感謝致します。貴重な菌株を快く御分与下さいました施設の贈先生に感謝致します。

文 献

- 1) 生方公子, 紺野昌俊, 沢井 稔, 斎藤洪太, 柳瀬義男, 高橋洋子, 藤井良知: 最近の重症ブドウ球菌感染症に対する疫学的研究, 第一篇, 分離したブドウ球菌の各種抗生物質に対する感受性とその β -lactamase について. 小児科臨床 30: 865~876, 1977
- 2) 紺野昌俊, 生方公子, 高橋洋子, 佐々木有字子, 川上小夜子: 本邦で分離されたゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌について. 第一篇, 臨床検査材料からのゲンタマイシン耐性菌の分離頻度と薬剤感受性ならびにフェージ型について. Chemotherapy 30: 86~95, 1982
- 3) 生方公子, 紺野昌俊, 白幡公勝, 飯田孝男: 同上, 第三篇, アミノグリコシド系抗生物質の耐性機構について. Chemotherapy 30: 546~553, 1982
- 4) LE GOFFIC, F.; A. MARTEL, M. L. CAPMAU, B. BACA, P. GOEBEL, H. CHARDON, C. J. SOUSSY, J. DUVAL, & D. H. BOUANCHAUD: New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 10: 258~264, 1976
- 5) SANTANAM, P. & F. K. KAYSER: Purification and characterization of an aminoglycoside inactivating enzyme from *Staphylococcus epidermidis* FK 109 that nucleotidylates the 4'- and 4''-hydroxyl groups of the aminoglycoside antibiotics. J. Antibiotics 31: 343~351, 1978
- 6) 野々口律子, 後藤 朗, 山下直子, 生方公子, 紺野昌俊, 川上小夜子: 4',4''-アデニル転移酵素を産生する黄色ブドウ球菌の分離状況について. Chemotherapy 32: 89~98, 1984
- 7) 野々口律子: 本邦において分離され始めた 4',4''アデニル転移酵素を産生するコアグラセ陰性ブドウ球菌の分離状況について. 感染症学雑誌 7: 569~582, 1984
- 8) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA, A. GOTOH & M. KONNO: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 754~759, 1984
- 9) 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
- 10) 日本細菌学教育委員会編: R プラスミドの分子遺

- 伝学的実験法, II. 抗生物質不活性酵素の活性測定 (澤井哲夫, 川辺晴英), 29~39, 菜根出版, 1983
- 11) DOI, O.; M. MIYAMOTO, N. TANAKA & H. UMEZAWA: Inactivation and phosphorylation of kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 16: 1282~1284, 1968
 - 12) BROWN, D. F. J.; F. H. KAYSER & J. BIBER: Gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet ii: 419, 1976
 - 13) SHANNON, K. P. & I. PHILLIPS: Gentamicin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet ii: 580~581, 1976
 - 14) DOWDING, J. E.: Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 47~50, 1977
 - 15) SCOTT, D. F.; D. O. WOOD, G. H. BROWNELL, M. J. CARTER & G. K. BEST: Aminoglycoside modification by gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 641~644, 1978
 - 16) SHANSON, D. C.; J. C. KENSIT & DUKE: Outbreak of hospital infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and methicillin. Lancet ii: 1347~1348, 1973
 - 17) SPELLER, D. C.; D. RAGHUNATH, M. STEPHENS & A. C. VIAT: Epidemic infection by a gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in three hospitals. Lancet i: 464~466, 1976
 - 18) VOGEL, L.: Infection due to gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in a nursery for neonatal infants. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 466~472, 1978
 - 19) BUCKWOLD, F. J.; W. L. ALBRITTON, A. R. RONALD, J. LERTZMAN & R. HENRIKSEN: Investigations of the occurrence of gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 152~156, 1979
 - 20) CROSSLEY, K.; D. LOESCH, B. LANDESMAN, K. MEAD, M. CHERN & R. STRATE: An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. J. Infect. Dis. 139: 273~279, 1979
 - 21) MCGOWAN, J. E.; P. M. TERRY, T. S. R. HUANG, C. L. HOUK & J. DAVIES: Nosocomial infections with gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 140: 864~872, 1979
 - 22) WEINSTEIN, R. A.; S. A. KABINS, C. NATHAN, H. M. SWEENEY, H. W. JAFFE & S. COHEN: Gentamicin resistant staphylococci as hospital flora: Epidemiology and resistance plasmids. J. Infect. Dis. 145: 374~382, 1982
 - 23) JAFFE, H. W.; H. M. SWEENEY, C. NATHAN, R. A. WEINSTEIN, S. A. KABINS & S. COHEN: Identity and interspecific transfer of gentamicin-resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. 141, 6: 738~747, 1980
 - 24) COHEN, M. L.; E. S. WONG & S. FALKOW: Common R-Plasmids in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* during a nosocomial *Staphylococcus aureus* outbreak. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 210~215, 1982
 - 25) JAFFE, H. W.; H. M. SWEENEY, R. A. WEINSTEIN, S. A. KABINS, C. NATHAN & S. COHEN: Structural and phenotypic varieties of gentamicin resistance plasmids in hospital strains of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 121: 773~779, 1982
 - 26) MCDONNELL, R. W.; H. M. SWEENEY & S. COHEN: Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 123: 151~160, 1983
 - 27) FORBES, B. A. & D. R. SCHABERG: Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: Evidence for conjugative exchange of resistance. J. Bacteriology 153: 627~634, 1983
 - 28) LE GOFFIC, F.: The resistance of *S. aureus* to aminoglycoside antibiotics and pristinamycins in France in 1976~1977. Jpn. J. Antibiot. 30(Suppl.): 286~291, 1977

AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING ENZYMES IN STAPHYLOCOCCI

AKIRA GOTOH

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine
Kaga 2-11-1, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

The organisms used in the present study were staphylococci resistant to various aminoglycosides (AGs) isolated from clinical materials handled at Bacteriological Department, Central Clinical Laboratory, Teikyo University Hospital between January and July 1983, and that obtained through the courtesy of five outside institutions between September and November 1983. The sensitivities to AGs of the above strains were determined, then crude enzyme solutions were prepared from some of them. The activities of AG-modifying enzymes were assayed by radioisotope-assay and an immunological test with the antiserum prepared by us. The results were as follows:

AGs-resistant strains could be divided into 3 groups according to their AGs resistance patterns. Group 2 and group 3 strains, that were subjected to the present enzymological assays, were confirmed to produce AG-modifying enzymes which roughly agreed with the prediction based on their resistance patterns. The group 2 strains, resistant to kanamycin (KM), gentamicin (GM) and amikacin (AMK), could be divided into 2 subgroups according to their sensitivity to lividomycin (LVDM). LVDM-resistant strains classified into 2-a produced a 3'-phosphotransferase in addition to a bifunctional enzyme acting as 2''-phosphotransferase and 6'-acetyltransferase, while all the 2-b strains sensitive to LVDM produced a bifunctional enzyme alone. Group 3 strains, resistant to KM and AMK, all produced a 4', 4''-adenylyltransferase (4', 4''-AAD).

4', 4''-ADD-producing staphylococci were found in group 2 and such strains all produced two or more AG-modifying enzymes. Their enzyme activities were confirmed by radioisotope-assay and immunological test. 4', 4''-AAD-producing staphylococci were also detected with a high frequency from AGs-resistant strains isolated from patients at the Surugadai Hospital, Nippon University School of Medicine. In addition, they were found among strains from Hokkaido, Okayama and Kagoshima areas. 4', 4''-AAD-producing strains tended to be detected more frequently in *S. epidermidis* than in *S. aureus*. The functionally identical AG-modifying enzymes each produced by a different species of staphylococci were suggested to be immunologically identical with each other.