

アミノ配糖体薬に耐性のブドウ球菌に対する HBK の抗菌作用

山下直子・生方公子・野々口律子
後藤 朗・松下真理・紺野昌俊
帝京大学医学部臨床病理

1983年1月から4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に提出された臨床検査材料より分離された gentamicin (GM) に耐性を示すブドウ球菌 237 株 (*S. aureus*: 102 株, コアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CNS): 135 株) と, GM には感性であるが amikacin (AMK), tobramycin (TOB) に耐性を示す *S. aureus* 6 株と CNS 11 株とを対象とし, HBK の抗菌力について検討を加え, 以下の成績を得た。

1. HBK はその他のアミノ配糖体薬 (AG₈) に比較して上述した耐性菌に対して最も優れた抗菌力を有しており, *S. aureus* および CNS においてその MIC のピークはいずれも 1.56 μg/ml 前後にあり, 一峰性の分布であった。
2. また HBK に 6.25 μg/ml 以上の MIC を示す菌株もわずかながら認められたが, 100 μg/ml 以上の MIC を示す高度耐性株は極く少数であった。
3. GM, AMK, あるいは TOB に耐性を示す菌株から抽出した粗酵素液を用いて, AG₈ 修飾酵素の基質特異性を調べたが, HBK はこれらのブドウ球菌が産生する 2"-リン酸転移酵素, 6'-アセチル転移酵素, あるいは 4', 4"-アデニル転移酵素のいずれによっても最も修飾を受け難いことが明らかにされた。
4. このように, 各修飾酵素の基質として, HBK の利用効率が最も低いことが, ブドウ球菌に対する HBK の抗菌力が優れている最大の原因と考えられた。
5. GM 耐性のブドウ球菌に対する HBK の殺菌効果を測定した成績では, MIC 以上の HBK 添加によって生菌数は経時的に減少した。その殺菌効果を AMK や netilmicin (NLT) のそれと比較すると, HBK では MIC が優れている分だけ, 低濃度から殺菌作用が認められた。

近年, 臨床検査材料から分離されるブドウ球菌は, 従来から市販されている tetracycline 系, macrolide 系, penicillin 系, あるいは kanamycin (KM) といった薬剤に対する耐性に加えて, gentamicin (GM) 耐性菌が高率に検出され, それらの耐性菌の多くはさらに methicillin, cephem 系薬剤にも耐性を示すようになってきている¹⁾。このような動向の中で, 私達は臨床材料の中から, 最近, GM には感性を示すが, amikacin (AMK) と tobramycin (TOB) には耐性を示す菌が検出され始めたことに気付いた。そして, それらのブドウ球菌は, 従来, 本邦では検出されたという報告のなかったアデニル転移酵素を産生する菌であることを見出し, これらアデニル転移酵素を産生する菌についての一連の疫学的考察を行い, AG₈ 耐性のブドウ球菌が本邦においても多様化しつつあることを報告してきた^{2,3)}。HBK は, dibekacin (DKB) の 1 位のアミノ基に (S)-4-アミノ-

2-ヒドロキシ酪酸 (AHB) をアミド結合させた新しいアミノ配糖体薬であるが, その化学構造の特徴から, これらの多様化している AG₈ 耐性のブドウ球菌中に存在する AG₈ 修飾酵素の基質とはなり難いことが予想される。我々は, 明治製薬中央研究所から HBK の提供を受け, GM, AMK, あるいは TOB に耐性を示すブドウ球菌に対する抗菌力について検討する機会を得たので, その成績について報告する。

I. 材料および方法

1) 使用菌株

1983年1月から同年4月までの4か月間に, 当大学附属病院中央検査部細菌検査室で扱った臨床検査材料から分離されたブドウ球菌のうち, ディスクによる感受性測定で GM または AMK に耐性を示した *S. aureus* 108 株およびコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) 146 株を対象とした。これらの菌株の産生する AG₈ 修飾酵

Table 1 Distribution of susceptibilities of Gentamicin- or Amikacin-resistant *Staphylococcus aureus* to various aminoglycosides

Antibiotics	Inoculum size (CFU/ml)	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/ml}$)										Rate of resistance*			
		≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 \leq	100 \leq	Rate of resistance*	
Kanamycin	10^8													108 (6)	108 (100.0%)
	10^6													107 (6)	108 (100.0%)
Gentamicin	10^8													86	102 (94.5%)
	10^6		3 (3)	3 (3)			2 (2)	5	9	6	6	5	26	56	102 (94.5%)
Tobramycin	10^8													94 (6)	108 (100.0%)
	10^6													45 (6)	108 (100.0%)
Dibekacin	10^8													86	108 (100.0%)
	10^6													48	108 (100.0%)
Amikacin	10^8													12 (2)	108 (100.0%)
	10^6													2	103 (95.4%)
HBK	10^8		14 (4)	15 (1)	26 (1)	42	6	25	6	7				38 (35.2%)	5 (4.6%)
	10^6														

* : All strains that showed the MICs over 6.25 $\mu\text{g/ml}$ to aminoglycosides were regarded as resistant strains

Table 2 Distribution of susceptibilities of Gentamicin- or Amikacin-resistant coagulase negative staphylococci to various aminoglycosides

Antibiotics	Inoculum size (CFU/ml)	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/ml}$)										Rate of resistance*			
		≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 \leq	100 \leq	Rate of resistance*	
Kanamycin	10^8													142 (11)	146 (100.0%)
	10^6													139 (11)	144 (98.6%)
Gentamicin	10^8		7 (7)	3 (3)	1 (1)									113	135 (92.5%)
	10^6		9 (9)	2 (2)										82	135 (92.5%)
Tobramycin	10^8													99 (10)	145 (99.3%)
	10^6													66 (8)	138 (94.5%)
Dibekacin	10^8													87	137 (93.8%)
	10^6													14	133 (91.1%)
Amikacin	10^8													45	141 (96.6%)
	10^6													3	119 (81.5%)
HBK	10^8		3 (2)	18 (5)	30	38	33 (1)	4	1	1				1	6 (4.1%)
	10^6		11 (6)	47 (4)	44	5 (1)	4	2	1					1	5 (3.4%)

* : All strains that showed the MICs over 6.25 $\mu\text{g/ml}$ to aminoglycosides were regarded as resistant strains

素についてはくわしく調べてあるが、別に発表⁶⁾しているので、ここではその詳細は略す。

2) 薬剤感受性測定法

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、日本化学療法学会標準法⁵⁾に従って行った。培地は感受性測定用培地 (日水) を使用し、被験菌の接種は感受性 broth (日水) で 37°C, 18 時間培養した菌液 (約 10⁸ CFU/ml) と、それを 100 倍希釈した菌液 (約 10⁶ CFU/ml) とを作製して、その両者について感受性を測定した。MIC を測定した薬剤は、KM, GM, TOB, DKB, AMK および HBK の計 6 剤である。

3) AG_B 修飾酵素の抽出と基質特異性の測定

AGs 耐性のブドウ球菌の産生する AGs 修飾酵素の種類は、MIC の測定によって AG_B に対する耐性パター

ンから 3 つのグループに分けることができる⁶⁻⁸⁾。その各グループの中から数株を選び、それぞれ粗酵素液を抽出し、その粗酵素液中のリン酸転移酵素活性、アセチル転移酵素活性、およびアデニル転移酵素活性を HAA8 らの方法⁹⁾に準じて測定すると同時に、それぞれの酵素の基質特異性を調べた⁷⁾。なお、リン酸転移酵素活性およびアセチル転移酵素活性は GM の修飾率を 100% とし、アデニル転移酵素活性は TOB の修飾率を 100% とし、他の AG_B の修飾率を算出した。

4) 殺菌効果

ブドウ球菌に対する HBK の殺菌効果は、培地中に薬剤を添加後、2, 4, 6, 8 時間後に生菌数を測定し、AMK あるいは netilmicin (NTL) のそれと比較した。菌の接種方法は、37°C で一夜培養したのち、9.9 ml の感受性

Fig. 1 Correlation between MICs of Gentamicin and Tobramycin, Amikacin, or HBK for *S. aureus*

Inoculum size : 10⁶ CFU/ml No. of strains : 108

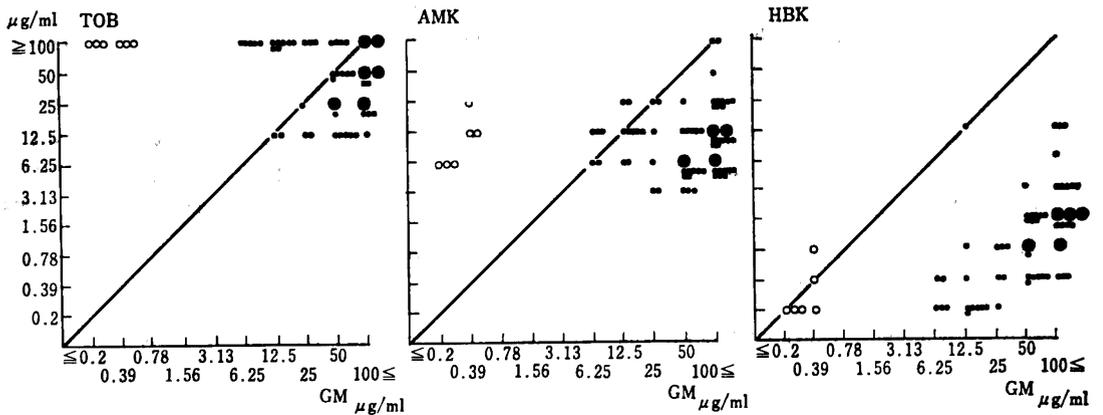
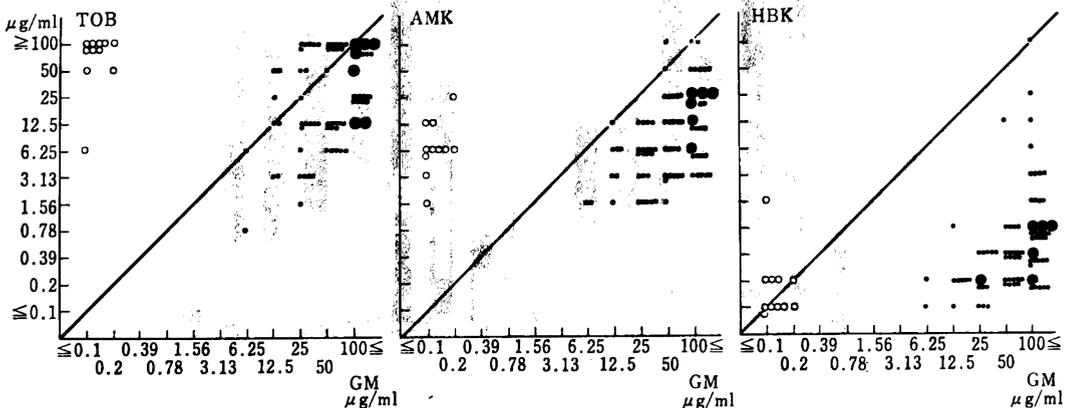


Fig. 2 Correlation between MICs of Gentamicin and Tobramycin, Amikacin, or HBK for Coagulase Negative Staphylococci

Inoculum size : 10⁶ CFU/ml No. of strains : 146



broth に 0.1 ml 接種して 2 時間前培養を行ない、被験薬剤の最終濃度がそれぞれ 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, あるいは 2 MIC, 4 MIC になるように加えた。

II. 結 果

1) 薬剤感受性

ディスクによる感受性測定で、GM あるいは AMK に耐性を示した *S. aureus* の AG₈ に対する感受性成績を Table 1 に示す。これらの菌株は、KM, TOB, DKB および AMK に対してはほぼすべての菌株が 10⁸ CFU/ml の菌液接種で 6.25 μg/ml 以上の MIC を示し、耐性であるとみなされたが、HBK に対する MIC のみは比較的良好な分布を示した。すなわち 10⁸ CFU/ml の菌液接種、10⁶ CFU/ml の菌液接種のいずれにおいても HBK に対する MIC のピークは 1.56 μg/ml にあり、一峰性の分布であった。HBK に対して 6.25 μg/ml 以上の MIC を示した菌株は、10⁸ CFU/ml の菌液接種で 38/108 株 (35.2%)、10⁶ CFU/ml の菌液接種で 5/108 株 (4.6%) 認められたが、それらの菌株の MIC は、6.25~25 μg/ml であり、いわゆる高度耐性菌とは言い難かった。一方、表中に () で示した 6 菌株は、後述する AG₈ 修飾酵素のうち、4',4''-アデニル転移酵素 (4',4''-AAD) を産生する菌株である。これらの菌株は、KM, TOB, DKB, AMK に対しては耐性を示すが、GM と HBK に対しては高い感受性を示した。

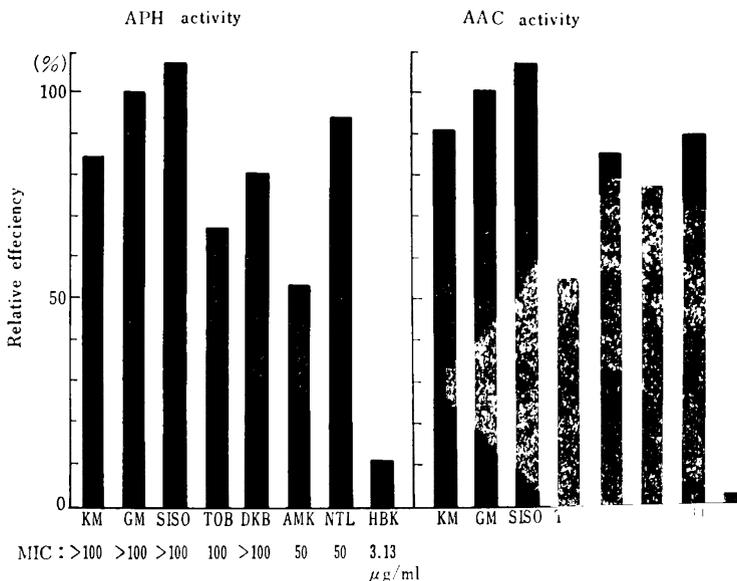
Table 2 には CNS に対する AG₈ の感受性成績を示す。*S. aureus* の場合と同様に、GM に耐性の菌は KM, TOB, DKB, および AMK にも耐性を示した。HBK に対しては 6.25 μg/ml 以上の MIC を示す株が若干認められたものの、MIC のピークは 10⁸ CFU/ml の菌液接種で 1.56 μg/ml、10⁶ CFU/ml の菌液接種で 0.2~0.78 μg/ml にあり、AG₈ 感受性菌に対する MIC とほとんど差異がみられなかった。表中に () で示した菌は、Table 1 と同様に 4',4''-AAD を産生することを確かめた菌株であるが、それらの菌株に対しても HBK は優れた MIC を示した。

2) 感受性相関

S. aureus における TOB, AMK あるいは HBK と GM との感受性相関は Fig. 1, CNS における同様の成績は Fig. 2 に示す。黒丸は主としてリン酸転移酵素とアセチル転移酵素の両方を産生する (GM に耐性を示す) 菌、白丸は 4',4''-AAD を産生する (GM に感性で TOB に耐性を示す) 菌である。いずれの GM 耐性菌も、TOB には高度耐性を示しており、完全な交叉耐性を示したが、AMK には交叉耐性を示すものの、試験管で 3~4 本、AMK の MIC が低い傾向がみられた。これら GM 耐性菌に対する HBK の感受性は、AMK よりもさらに良好で、GM 耐性とはある程度の相関関係がみられるものの、その係数は *S. aureus* で 0.2311, CNS

Fig. 3 Comparison of aminoglycosides as substrates for modifying enzymes from *S. aureus* MS 353 (pTU 053) strain

Modifying enzyme : 3'-APH and bifunctional enzyme of 2''-APH and 6'-AAC



で 0.1084 と有意なものではなかった。なお、4',4''-AAD のみを産生する TOB 耐性で GM 感性の菌株に対しても、HBK は高い感受性を示していた。

3) AGs 修飾酵素の基質特異性

Fig. 3 は、*S. aureus* MS 353 (pTU 053) 株から抽出した粗酵素液の AGs 基質特異性を、GM の修飾率を

Fig. 4 Comparison of aminoglycosides as substrates for modifying enzyme from *S. aureus* TK 729 strain

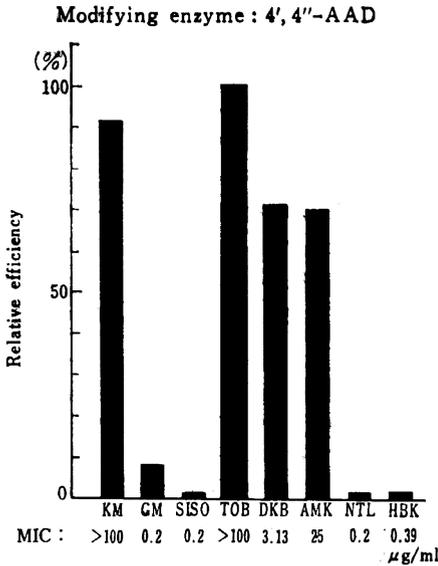
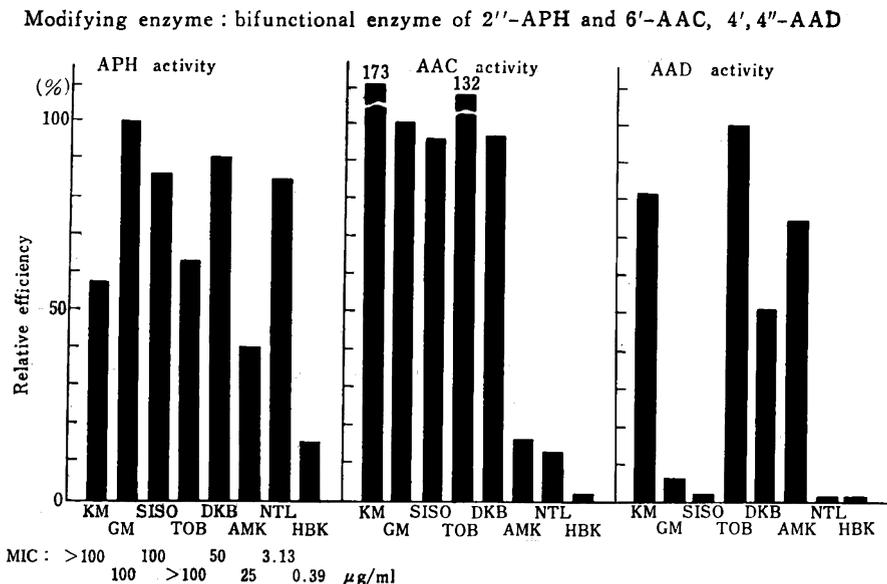


Fig. 5 Comparison of aminoglycosides as substrates for modifying enzymes from *S. epidermidis* TK 406 strain



100% として表わしたものである。この菌株の AGs に対する MIC は、図の下方に示したが、本菌は 3'-リン酸転移酵素 (3'-APH) の他に、2''-リン酸転移酵素 (2''-APH) と 6'-アセチル転移酵素 (6'-AAC) の両活性を有する bifunctional な酵素の 2 種類の酵素を産生する菌株である。3'-APH と 2''-APH の両酵素の基質になり得る KM と AMK に対する APH 活性は、区別して測定することは不可能であり、両者が一緒に測定されているが、図に示した GM, SISO, TOB, DKB, NTL および HBK のリン酸転移酵素による修飾部位は、2'' 位の OH 基のみである。この酵素によって、被験薬剤の大部分が 50% 以上の修飾を受けるが、HBK の修飾率は 11% であり、他剤に較べて著しく修飾され難いことが明らかにされた。

一方、6'-AAC に対する基質としては、薬剤によって多少の強弱は認められるものの、被験薬剤の大部分がリン酸転移酵素と同様に 50% 以上の修飾を受けるのに対し、HBK のみが特異的に 4% 程度の修飾率であった。

Fig. 4 に示した *S. aureus* TK 729 株は、図の下方に MIC を示したように、GM 感性で TOB と AMK に耐性の菌株である。この菌株には、4',4''-AAD 活性のみが認められ、TOB の修飾率を 100% とした時の相対的修飾率は KM, TOB, DKB および AMK が 70% 以上であるのに対して、4',4'' 位に単独の水酸基を有しない GM, SISO, NTL と 5'' 位の -CH₂OH ならびに 1 位に AHB を有する HBK の被修飾率はいずれも 10%

以下という成績であった。

Fig. 5 には, *S. epidermidis* TK 406 株から抽出した酵素に対する AG_S の基質特異性を示す。この菌株は, 2''-APH と 6'-AAC の bifunctional な酵素の他に, 4', 4''-AAD をも産生する菌株であるが, 被験薬剤の大部分がいずれかの酵素によって 50% 以上の修飾を受けるのに対し, HBK のみは 2''-APH によって 14% の修飾を受けたものの, その他の 6'-AAC, 4', 4''-AAD によってはほとんど修飾されず, いずれの AG_S 修飾酵素に対しても, 基質とはなり難いことが示された。

Fig. 6 に示した *S. epidermidis* TK 1043 株は, 先に述

Fig. 6 Comparison of aminoglycosides as substrates for modifying enzyme from *S. epidermidis* TK 1043 strain

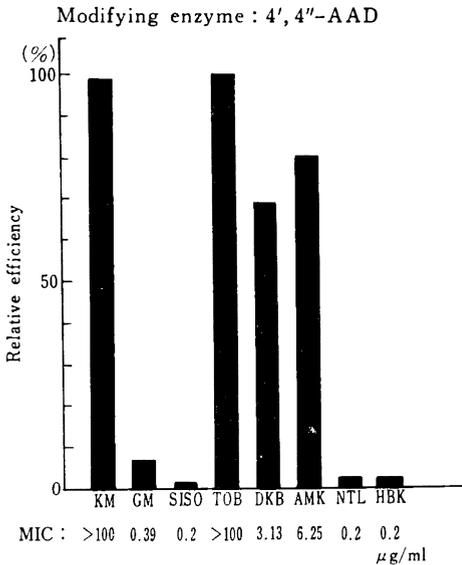


Fig. 7 Bactericidal effect of HBK and Amikacin on Gentamicin-resistant *S. aureus* MS 353 (pTU 053) strain

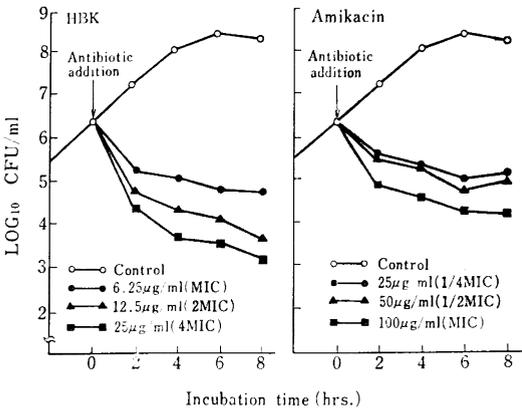
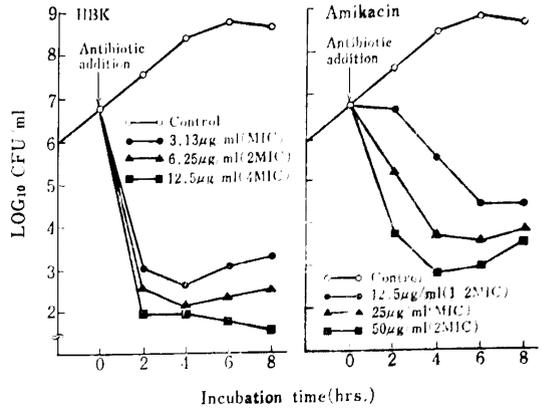


Fig. 8 Bactericidal effect of HBK and Amikacin on Tobramycin-resistant *S. epidermidis* TK 1074 strain



べた *S. aureus* TK 729 株と同様に 4', 4''-AAD のみの産生がみられる菌株である。この酵素の基質特異性のパターンは TK 729 株のそれとまったく同じであり, GM, SISO, NTL に加えて, HBK も本酵素の基質にはなり得なかった。

4) 経時的殺菌作用の比較

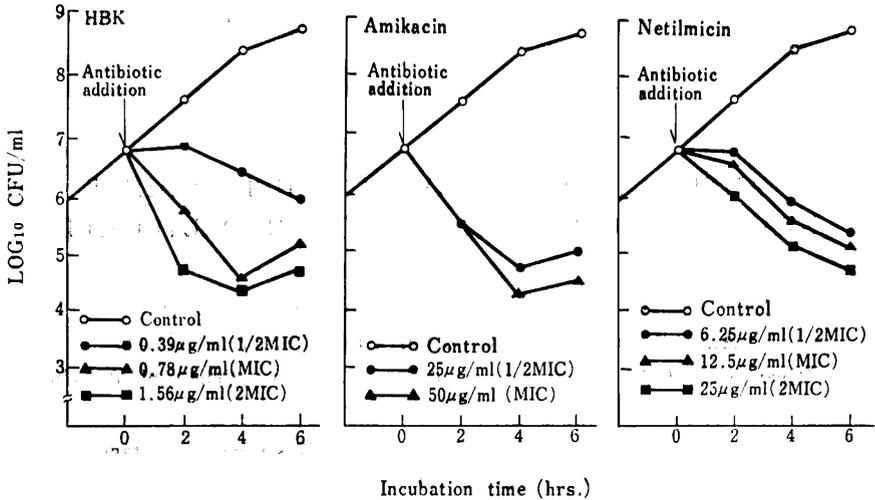
GM に耐性を示す *S. aureus* MS 353 (pTU 053) 株と *S. epidermidis* TK 406 株ならびに GM に感性で TOB に耐性を示す *S. epidermidis* TK 1074 株に対する HBK の経時的殺菌効果は, それぞれ Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 に AMK あるいは NTL と比較した成績を示す。Fig. 7 と Fig. 9 に示した GM 耐性菌である MS 353 (pTU 053) 株と TK 406 株に対して, それぞれの MIC である 6.25 あるいは 0.78 µg/ml 以上の HBK の添加によって, 菌数は経時的に減少するが, その殺菌作用は他剤に比べて極端に優れているというわけではなく, MIC が優れている分だけ生菌数の減少し始める薬剤濃度が低いということであった。

一方, Fig. 8 に示した GM に感性で TOB と AMK には耐性の TK 1074 株においては, MIC 以上の HBK の添加によって短時間に急速な生菌数の減少が認められ, これらの耐性菌に対しては HBK は殺菌作用の強いことが推察された。比較のために耐性を示した AMK の経時的殺菌効果も測定しているが, その成績では 1/2 MIC 濃度 (12.5 µg/ml) で一時的な生菌数の減少が認められるものの, MIC 以上の AMK の添加によっても生菌数の減少は HBK に比して劣っていた。

III. 考 察

近年, 本邦では臨床検査材料からの GM 耐性菌の分離増加に加えて, GM には感性であるが AMK や TOB には耐性の新しい耐性型を示すブドウ球菌が分離され始

Fig. 9 Bactericidal effect of HBK, Amikacin, and Netilmicin on Gentamicin-resistant *S. epidermidis* TK 406 strain



め^{2,3)}、従来から分離されていた KM 耐性菌も含めると、本邦におけるブドウ球菌の AG_S 耐性は明らかに多様化しつつある。これらの耐性菌に対して、HBK は良好な抗菌力を示し、GM 耐性菌に対しても AMK より試験管でさらに 3~4 段階優れた MIC を示し、GM 感性菌に対する MIC とほぼ同じレベルの MIC を示すことが注目された。その理由は、HBK の 3' 位と 4' 位に修飾を受ける水酸基がないことと、新たにアミド結合した AHB が修飾され易い 2'' 位の水酸基をはじめ 6' 位のアミノ基を防禦しているものと推定される。HBK と同じように AHB を有する AMK の抗菌力が、NTL や HBK より劣る理由は、3' 位および 4' 位の水酸基があるため、修飾酵素が AMK と結合しやすいためと考えられる。

このことは、*S. aureus* と CNS の各菌株から抽出した 2''-APH と 6'-AAC の bifunctional な酵素や 4',4''-AAD に対する AG_S の基質特異性の検討によっても、HBK が明らかに基質となり難いことから裏付けられた。しかしながら、2''-APH と 6'-AAC の両活性を有する酵素によって、HBK はまったく修飾を受けないのではなく、GM の被修飾率を 100% とした時に 10% 前後の被修飾率を示すことから、*in vivo* において active transport system によって菌体内へ取り込まれた HBK が徐々に AG_S 修飾酵素の作用を受ける可能性も考えられる。経時的殺菌効果の成績からは、GM 感性のブドウ球菌に対しては、HBK の殺菌効果は非常に優れたものであったが、GM 耐性のブドウ球菌に対しては、MIC 以上の HBK 濃度であれば殺菌作用は示すものの、その

殺菌効果は MIC 以上の AMK や NTL を作用させた場合とほぼ同等であった。このことは、GM 耐性のブドウ球菌に対して、AMK や NTL に較べると、HBK は 0.78~1.56 μg/ml という低濃度で殺菌効果を示すということである。

したがって HBK はその使用量ならびに使用方法によっては、GM や AMK を含む従来の AG_S に耐性を示すブドウ球菌に対して、その有効性がかなり期待できるものと考えられた。

文 献

- 1) 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 1 編 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
- 2) 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
- 3) 野々口律子: 本邦において分離された 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, 58: 569~582, 1984
- 4) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA, A. GOTOH, M. KONNO: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents and Chemother. 25: 754~759, 1984
- 5) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度測定法再改

- 訂について. *Chemotherapy*, 29: 76~79, 1981
- 6) HAAS, M. and J. E. DOWDING: Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods Enzymol.* 43: 611~628, 1975
- 7) 生方公子, 紺野昌俊: 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2編 ゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌から誘発したフェージによる薬剤耐性の導入とプラスミドの解析. *Chemotherapy*, 30: 96~103, 1982

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HBK AGAINST STAPHYLOCOCCI RESISTANT TO AMINOGLYCOSIDES

NAOKO YAMASHITA, KIMIKO UBUKATA, RITSUKO NONOGUCHI

AKIRA GOTOH, MARI MATSUSHITA and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pathology, Teikyo University, School of Medicine

We investigated the antibacterial activity of HBK using 237 strains of gentamicin (GM)-resistant staphylococci (*S. aureus*: 102 strains, coagulase negative staphylococci (CNS): 135 strains) and 17 strains of tobramycin (TOB)-resistant staphylococci (*S. aureus*: 6 strains, CNS: 11 strains) isolated from clinical materials submitted to the Central Clinical Laboratory, Teikyo University Hospital from January to April 1983. The results obtained are as follows.

1. Compared with other aminoglycosides (AGs), HBK has the most excellent antibacterial activity against the above-described clinical isolates, and its MIC for *S. aureus* peaked at 1.56 $\mu\text{g/ml}$ whereas the MICs of HBK for CNS ranged from 0.2 to 0.78 $\mu\text{g/ml}$.

2. A few of the strains tested had MICs of 6.25 $\mu\text{g/ml}$ or higher, but of these only very small number had MICs higher than 100 $\mu\text{g/ml}$.

3. The substrate specificity of AGs-modifying enzymes extracted from strains resistant to GM, AMK, or TOB was also examined, HBK was the least modified by 2"-phosphotransferase, 6'-acetyltransferase, and 4',4"-adenylyltransferase.

4. It is considered from these results that the lowest modification of HBK by enzymes produced by staphylococci is the most important factor leading to the high antibacterial activity of HBK against these organisms.

5. When the bactericidal activity of HBK against GM-resistant staphylococci was determined with time, the viable cells were reduced by the addition of HBK at concentrations higher than the MIC.