

各種 β -lactam 系抗生物質に対するインドール陽性 *Klebsiella* の感受性

太田美智男・伊藤秀郎・荒川宜親・森 正司
小松孝行・木藤伸夫・山本秀子*・加藤延夫
名古屋大学医学部細菌学教室
* 名古屋大学付属病院中央検査部

(昭和 62 年 4 月 8 日受付)

Klebsiella 属細菌のうちインドール陽性株である *K. oxytoca* と *K. planticola* の β -lactam 系抗生物質、Ampicillin (ABPC), Piperacillin (PIPC), Cephaloridine (CER), Cefoperazone (CPZ), Latamoxef (LMOX), Aztreonam (AZT) に対する感受性を検討し、以下の成績を得た。

1. 11 総合病院の臨床検査材料より分離されたインドール陽性 *Klebsiella* 246 株のうち 48 株が *K. planticola* と同定された。
 2. *K. planticola* の β -lactam 系抗生物質に対する感受性分布は同じインドール陽性株である *K. oxytoca* よりむしろ *K. pneumoniae* と類似していた。
 3. *K. planticola* の β -lactamase は基質特異性から penicillinase 型であった。
 4. モノバクタムの AZT は *K. pneumoniae* および *K. planticola* に対して LMOX と同等かそれ以上の良好な抗菌力を示した。また *K. oxytoca* に対しても良好な抗菌活性を示した。
 5. AZT は *K. planticola* および *K. oxytoca* の β -lactamase によって全く加水分解されなかった。
 6. *K. oxytoca* の β -lactamase は cephalosporinase 型に近い基質特異性を示した。
- 今回の結果から、*K. planticola* は臨床検査室では独立の菌種として取り扱うべきであると考えられる。

近年新しく開発された β -lactam 系抗生物質の使用にともない、細菌感染症の原因菌が変化している。とりわけ従来高頻度に臨床検査室で分離された *Klebsiella pneumoniae* に代って、インドール陽性の *Klebsiella pneumoniae* が極めて高頻度に分離されている。このインドール陽性 *Klebsiella* は、習慣的に *Klebsiella oxytoca* として報告されている。実際我が国のはほとんどすべての病院検査室ではインドール陽性の *Klebsiella* を *K. oxytoca* としている。しかし Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984) によれば、インドール陽性株は、ペクチン分解能、ゲンチセイト利用能、色素生産能、メリチトース発酵能などにより、*K. oxytoca* と *K. planticola* に分類される。今回我々は、*K. planticola* の β -lactam 系抗生物質に対する感受性を *K. pneumoniae* および *K. oxytoca* と比較し、あわせてインドール陽性株のうち *K. planticola* を除いた本来の *K. oxytoca* の臨床分離株 196 株について、新しく開発されたモノバクタム系の Aztreonam をはじめとする β -lactam

系抗生物質数種に対する感受性を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

名古屋大学医学部付属病院中央検査部ならびに愛知県センター付属病院、中京病院、名古屋済生会病院、名城病院、名古屋第一赤病院、名古屋第二赤病院、国立名古屋病院、北病院、安城更生病院、八千代病院、各病院の中央検査部における *Klebsiella* のインドール陽性臨床分離株 (246 株)、対照として International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre, Copenhagen, I. ØRSKOV より分与された *Klebsiella pneumoniae* K 抗原標準菌株 23 株 (臨床分離株)、ならびに名古屋大学付属病院中央検査部における *K. pneumoniae* の臨床分離株 (68 株) を用いた。

2. 菌種の同定

分与された菌株はすべて柴研バイオテスト 1 号を用いて再同定した。また *Klebsiella* 属と同定されたインドール

ル産生陽性の株については、Bergey's Manual の記載に従ってペクチン分解能、色素産生能、ゲンチセイト利用能によって *K. oxytoca* と *K. planticola* に分類した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

試験薬剤は Ampicillin (ABPC), Piperacillin (PIPC), Cephaloridine (CER), Cefoperazone (CPZ), Latamoxef (LMOX), Astreonom (AZT) を用いた。MIC は各抗生物質につき 0.025 μ g-100 μ g/ml の 2 段階希釈濃度系列として、日本化学療法学会で定めた寒天平板希釈法で測定した¹⁾。増菌培地、測定培地はそれぞれ Mueller-Hinton broth (BBL), Mueller-Hinton II agar (BBL) を用い、約 10^8 cells/ml に希釈した新鮮培養液を 1 白金耳量、マイクロプランター (佐久間製作所) にて接種し、37°C で一夜培養後判定した。

4. β -lactamase 活性の測定

100 ml の L-broth にて 37°C 振とう培養後対数増殖期の菌を冷却遠心機で集め、0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) によって洗浄後、同一の緩衝液 10 ml に再浮遊し、音波破砕機 (トミー精工, UR 200 P) で氷冷しながら菌体を音波処理した。この液を IEC 410 ローターで 20,000 回転 30 分遠心し、上清を粗酵素液として β -lactamase 活性を測定した。なお *K. pneumoniae* の β -lactamase 活性は、*K. pneumoniae* LEN 1 株よりクロニングした染色体性 β -lactamase 遺伝子のクローン pMKamp 1-6 を β -lactamase 非産生株である大腸菌 HB 101 に移入し、発現させ抽出したのを用いて測定した²⁾。*K. oxytoca* の β -lactamase についても同様に、*K. oxytoca* E 23004 株よりクロニングした染色体性 β -lactamase 遺伝子のクローン pKO 5-3 を移入した HB 101 より抽出した酵素液を用いた。*K. planticola* の β -lactamase については *K. planticola* C 1 株より得た酵

素液を用いた。 β -lactamase の活性は SEEBERG ら³⁾および BUSH & SYKES の勧める方法⁴⁾に従って UV 吸収法によって測定した。反応は加温セル中で 30°C で行ない、日立 557 2 波長分光光度計で連続的に最長 1 時間まで測定した。測定波長はそれぞれ ABPC: 235 nm, PCG: 232 nm, CER: 295 nm, CEZ: 268 nm, CTX: 264 nm, PIPC: 235 nm, CPZ: 276 nm, AZT: 250 nm および 315 nm を用いた。基質としての各抗生物質の濃度はおよそ 0.5 μ M-300 μ M の範囲で 2 段階希釈液を用いた。 K_m および V_{max} 値は最小 2 乗法による [S]-v 曲線から求めた。

II. 結 果

1. 菌種の同定

Bergey's Manual 1984 年版における *Klebsiella* 属の分類を Table 1 に示す。インドール陰性株は *K. pneumoniae* および *K. terrigena*, インドール陽性株は *K. oxytoca* および *K. planticola* に分類される。今回は報告しないが *K. terrigena* の臨床材料からの分離頻度は極めて低かった。*K. oxytoca* と *K. planticola* についてはインドール陽性の *Klebsiella* 属細菌をペクチン分解能、色素産生能、ゲンチセイト利用能で同定した。愛知県下 11 総合病院で検査材料から分離されたインドール陽性株 246 株のうち、予想に反して 48 株 (19.5%) もの菌株が *K. planticola* と同定された。

2. β -lactam 系抗生物質に対する感受性

各菌種の MIC の分布および累積百分率を Fig. 1, 2, 3 に示した。Fig. 1 に示すように *K. pneumoniae* は ABPC に対して高度耐性の株が多かった。さらに、ほとんどすべての株が ABPC に対し軽度あるいは中程度以上の耐性を示した。PIPC および CER に対してはやや感受性であったがそれでもほとんどの株が軽度以上の

Table 1 Differential characteristics of genus *Klebsiella*

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>
Indole production	-	+	-	d
Pectate degradation	-	+	-	-
Gas production from lactose at 44.5°C	+	-	-	-
Growth at 10°C	-	+	+	+
Fermentation of sugar				
Inulin	-	+	d	d
D-Melzitose	-	d	-	-
L-Sorbose	d	+	+	+
Gentisate utilization	-	+	+	-
Methyl red test	-	-	+	d
Gelatin hydrolysis	-	d	-	-

Fig. 1 Sensitivity distribution of 91 clinical isolates of *K. pneumoniae* to various β -lactam antibiotics

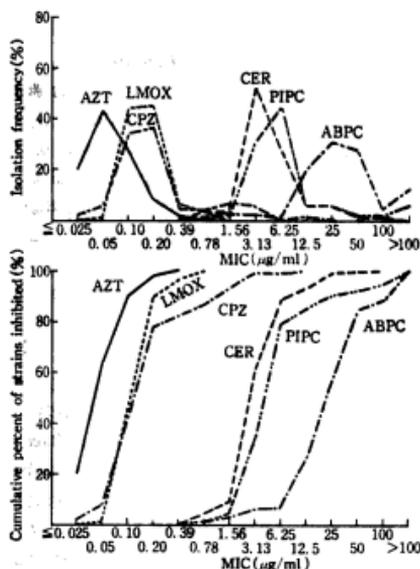
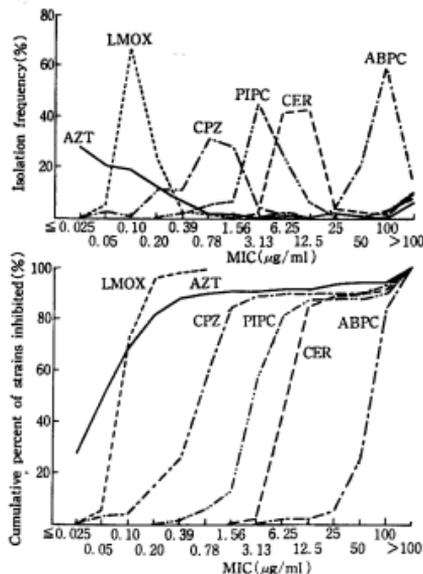


Fig. 2 Sensitivity distribution of 198 clinical isolates of *K. oxytoca* to various β -lactam antibiotics

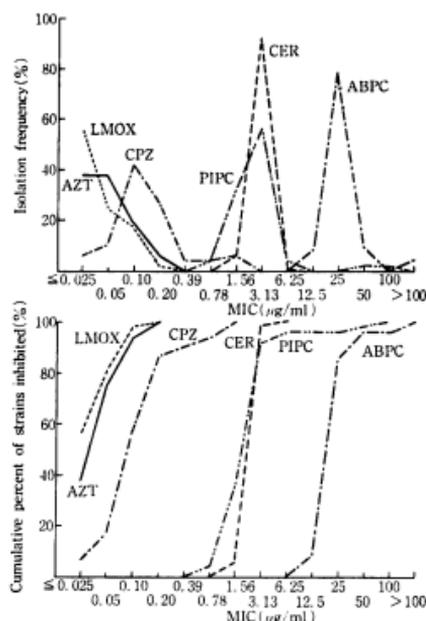


耐性を示した。LMOX および CPZ の感受性ピークは $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、AZT のピークは $0.05 \mu\text{g/ml}$ であり、これらは感受性のグループに属するが CPZ には軽度耐性菌が少数存在した。AZT は *K. pneumoniae* に対して今回調べたなかでは抗菌力が最も優れていた。

K. oxytoca は大部分の臨床分離株が ABPC に MIC $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性を示した。CER および PIPC に対する感受性ピークはそれぞれ $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ であり、高度耐性菌もみられた。CPZ の感受性ピークは $0.78 \mu\text{g/ml}$ であったが 中-高度耐性の株も少数みられた。AZT のピークは $0.025 \mu\text{g/ml}$ 以下にあり、感受性を示す株が多かったが、高度耐性を示す株もわずかに存在した。LMOX のピークは $0.1 \mu\text{g/ml}$ であったが高度耐性を示す株はみられなかった (Fig. 2)。

K. planticola は *K. pneumoniae* とほぼ同様の傾向を示した。すなわち ABPC には中-高度耐性であり、CER および PIPC に対する感受性のピークは $3.13 \mu\text{g/ml}$ で軽度-中程度耐性であった。CPZ、AZT、LMOX には感受性を示し、特に AZT および LMOX は *K. planticola* に対して優れた抗菌力をもっていた (Fig. 3)。なお Fig. 4 に示すように、CPZ に対する感受性分布は *K.*

Fig. 3 Sensitivity distribution of 48 clinical isolates of *K. planticola* to various β -lactam antibiotics



pneumoniae と *K. planticola* が類似し、比較的感受性であるのに対し、*K. oxytoca* はより耐性の傾向を示した。

3. β -lactamase 活性

Table 2, 3 に Relative V_{max} , K_m , Relative V_{max}/K_m の値を示した。*K. pneumoniae* の β -lactamase は従来報告されているように、ABPC に対する Relative V_{max} を 100 とすると CER は 6.46 であり、Relative V_{max}/K_m 値も ABPC を 100 としたとき CER は 1.25 と、明らかに penicillinase 型の基質特異性を示した。*K. oxytoca* の β -lactamase は CER に対する Relative V_{max} が 116 と ABPC よりも高く、また Relative $V_{max}/$

K_m 値も ABPC を 100 とすると CER は 36.9, CEZ は 95.6 と、*K. pneumoniae* と比較するとより cephalosporinase 型に近い基質特異性を示した。さらに軽度ではあるが、CTX の分解がみられた。なお、AZT は 30°C, 1 時間の反応によっても *K. oxytoca* の β -lactamase による分解が全く検出されなかったことは興味深い。*K. planticola* の β -lactamase は ABPC に対する Relative V_{max} を 100 としたときに CER が 14.6, CEZ が 4.94 と、*K. pneumoniae* と類似する penicillinase 型基質特異性を示した。しかし Relative V_{max}/K_m 値は ABPC を 100 としたときに CER は 22.6 と、CER も比較的よく分解することを示した。なお AZT は 1 時間の反応によっても *K. planticola* の β -lactamase に全く分解されなかった。

III. 考 察

Klebsiella の分類については歴史上混乱があり、現在もなお尾をひいている。すなわち COWAN ら(1974)による分類、Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunology, 7th Ed., Vol. 3(1983)における分類、そして Bergey's Manual (1984)による分類と、それぞれの分類で内容が異なっているために、*Klebsiella* の菌種名を記載するときにはどの分類によるかを記さなくてはならない。比較的最近に改訂された Topley and Wilson および Bergey の版では *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, あるいは *K. aerogenes* は

Fig. 4 Sensitivity distribution of *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. planticola* to CPZ

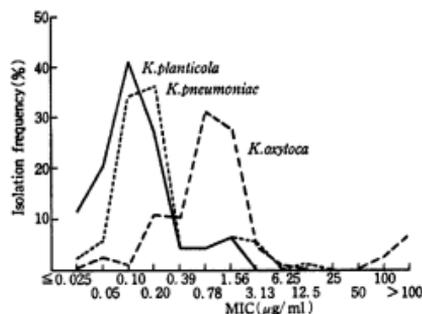


Table 2 β -lactamase activities of *K. planticola*

Substrate	Relative V_{max}	K_m ($\times 10^{-4}$ M)	Relative V_{max}/K_m
ABPC	100	42.1	100
PCG	90.2	12.8	296
CER	14.6	27.2	22.6
CEZ	4.94	19.5	10.6
CPZ	17.1	46.3	15.5
PIPC	14.6	27.1	22.7
AZT	Not detected	Not detected	

Table 3 β -lactamase activities of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*

	Substrate	Relative V_{max}	K_m ($\times 10^{-4}$ M)	Relative V_{max}/K_m
<i>K. pneumoniae</i>	ABPC	100	75.5	100
	CER	6.46	391	1.25
<i>K. oxytoca</i>	ABPC	100	49.2	100
	PCG	198	31.4	311
	CER	116	155	36.9
	CEZ	20.6	10.6	95.6
	CTX	2.09	387	0.266
	AZT	Not detected	Not detected	

subspecies として *K. pneumoniae* に統一され、*K. oxytoca* および *K. terrigena* が独立の種として分類されている。*K. planticola* については Bergey だけが独立の種として分類している。我々は病原性、K抗原との関係などから Bergey の分類が最も適当と考える⁴⁾。

今回の結果で、主として植物や土壌から分離されるといわれた *K. planticola* がインドール陽性の *Klebsiella* の約 20% も臨床検査材料から分離されたことは予想外であった。同一菌の反復分離を避けるため、広範囲の病院から菌株を入手したので地域特異性あるいは施設特異性の結果ではないと考えられる。*K. planticola* の β -lactam 系抗生物質に対する感受性の分布は同じインドール陽性の *K. oxytoca* よりもインドール陰性である *K. pneumoniae* に似た傾向を示し、また β -lactamase もより penicillinase 型の活性を示した。このことは抗生物質による治療の面からみると、臨床細菌学的には *K. planticola* を *K. oxytoca* とは独立に取り扱う必要があることを示している。

我々は最近、*K. pneumoniae* の染色体性 β -lactamase の遺伝子をクローニングしその塩基配列を決定した⁵⁾。それによれば *K. pneumoniae* の β -lactamase はアミノ酸配列が TEM 1 型の β -lactamase と 68% の相同性をもち、抗原性がこれらの β -lactamase では共通性があるという以前の報告⁶⁾をうらぐれた。このことは、TEM 1, TEM 2, SHV 1 など分子構造的に共通性が高く、臨床分離菌に広く分布する R 因子上の β -lactamase 遺伝子が、*K. pneumoniae* の染色体性 β -lactamase 遺伝子由来であることを示唆している。*K. planticola* の β -lactamase を含めてこれらの penicillinase 型の β -lactamase をもつ菌は LMOX など第 3 世代セフェムやモノバクタムの AZT に極めて感受性であることは既に報告されているが、我々も今回の結果からそれを確認した。

K. pneumoniae の β -lactamase によって AZT が全く分解されないことは既にいくつかの報告があり、*K. planticola* および *K. pneumoniae* が AZT に非常に感受性であることはこれらの菌種の β -lactamase が AZT を

分解しないことから説明できる。しかし *K. oxytoca* の β -lactamase は AZT を全く加水分解しないにもかかわらず、耐性菌が低頻度に見られる。これは β -lactamase の産生量の増加と関係していると考えられるが、この耐性化の機構を明らかにするために現在クローニングした *K. oxytoca* の β -lactamase 遺伝子の解析を行なっている。

<謝辞> 終りに、本研究のために *Klebsiella* の各菌株を分与していただきました各病院検査部細菌検査室の皆様、菌の分与を快く許していただきました検査部の責任者のみなさまに心から感謝致します。

文 献

- 1) 日本化学療法学会 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
- 2) ARAKAWA, Y.; M. OHTA, N. KIDO, Y. FUJII, T. KOMATSU & N. KATO: Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. FEBS LETTERS 207(1) : 69~74, 1986
- 3) SEEBERG, A. H.; R. M. TOLXDORFF-NEUTZLING & B. WIEDEMANN: Chromosomal β -lactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third-generation cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 23 : 918~925, 1983
- 4) BUSH, K. & R. B. SYKES: Methodology for the study of β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 30 : 6~10, 1986
- 5) 加藤延夫, 太田美智男, 森正司, 岩田仁: *Klebsiella* 感染症。日本臨床 44(9) : 143~149, 1986
- 6) SAWAI, T.; S. YAMAGISHI & S. MITSUHASHI: Penicillinases of *Klebsiella pneumoniae* and their phylogenetic relationships to penicillinases mediated by R factors. J. Bacteriol. 115 : 1045~1054, 1973

SENSITIVITIES OF INDOLE-POSITIVE *KLEBSIELLA* TO VARIOUS β -LACTAM ANTIBIOTICS

MICHIO OHTA, HIDEO ITOH, YOSHICHIKA ARAKAWA,
MASASHI MORI, TAKAYUKI KOMATSU, NOBUO KIDO,
HIDEKO YAMAMOTO* and NOBUO KATO

Department of Bacteriology, Nagoya University School of Medicine

* Clinical Laboratory, Nagoya University Hospital

Indole-positive strains of *Klebsiella* are classified into *Klebsiella oxytoca* and *K. planticola* in Bergey's Manual (1984 ed.). We studied the sensitivities of clinical isolates of these two *Klebsiella* species to ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), cephaloridine (CER), cefoperazone (CPZ), lammoxef (LMOX), and aztreonam (AZT). The results were as follows.

1. Forty-eight strains of 246 indole-positive *Klebsiella* isolated in eleven general hospitals were identified as *K. planticola*.

2. The sensitivity distribution of *K. planticola* to β -lactam antibiotics was similar to that of *K. pneumoniae* rather than to *K. oxytoca*.

3. The β -lactamase of *K. planticola* was identified as penicillinase from its substrate specificity.

4. AZT, a monobactam antibiotic, showed a high degree of antibacterial activity to *K. oxytoca* as well as to *K. pneumoniae* and to *K. planticola*.

5. AZT was not hydrolyzed by either the β -lactamase of *K. planticola* or that of *K. oxytoca*.

6. The β -lactamase of *K. oxytoca* was identified as a cephalosporinase from its substrate specificity.

The present results indicate that *K. planticola* should be carefully differentiated from *K. oxytoca* in clinical laboratories.