

病原性 *Nocardia* の erythromycin および acetylspiramycin に対する感受性

矢沢勝清・三上 襄

千葉大学真核微生物研究センター化学療法分野*

松前昭廣

北里大学

(平成4年12月9日受付・平成5年1月8日受理)

5菌種、91株の病原性 *Nocardia* の erythromycin (EM) と acetylspiramycin (A-SPM) に対する感受性試験と、抗生物質不活化活性を検討した。その結果、*Nocardia nova* はこれら抗生物質に対して、感受性であったが、*Nocardia brasiliensis* は耐性を示した。*Nocardia asteroides* の感受性は菌株によって異なっていた。一方、*Nocardia farcinica* および *Nocardia otitidiscaviarum* は EM と比べ A-SPM に対して感受性が高かった。*N. brasiliensis* はすべての菌株で EM と A-SPM を不活化したが、他の *Nocardia* では菌株により不活化活性が異なっていた。

Key words: 病原性, *Nocardia*, 薬剤感受性, erythromycin, acetylspiramycin

これまでに我々は病原性 *Nocardia* の抗生物質に対する感受性試験を行い、病原性 *Nocardia* の抗生物質感受性パターンは種によって異なることを報告してきた¹⁻⁴⁾。また、アミノ配糖体抗生物質やβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性機構の研究を行い、これら抗生物質ではその耐性は不活化によること、さらにその不活化は *Nocardia* の種で異なることも報告してきた^{2,4)}。また、最近リファンピシンをグリコシル化することにより不活化し耐性となっていることも明らかにしている⁵⁾。

今回、病原性 *Nocardia* のマクロライド系抗生物質、特に erythromycin (EM) と acetylspiramycin (A-SPM) に対する感受性および抗生物質不活化活性について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1) 使用菌株

病原性 *Nocardia* の標準株および臨床分離株を含む *Nocardia asteroides* 21株、*Nocardia farcinica* 20株、*Nocardia nova* 20株、*Nocardia brasiliensis* 14株、*Nocardia otitidiscaviarum* 16株を使用した。

2) 使用薬剤および感受性測定法

Erythromycin (EM, Sigma) と acetylspiramycin (A-SPM, 協和発酵) を使用した。

感受性測定は化学療法学会標準法⁶⁾ に準じ、Mueller Hinton II agar (Becton Dickinson, USA) を用い

た寒天平板希釈法で行った。被験液作成は既報により行った¹⁾。

3) 薬剤不活化能の検討

被験液作成と同様な培養方法を用い、終濃度 5 μg/ml の薬剤を加えた後、植菌し、250 rpm, 30°C, 5日間振盪培養した。培養ろ液を酢酸エチルで抽出、溶媒溜去後、残渣を少量のメタノールに溶解し、ペーパーディスク法により活性を測定した。EM は *Bacillus subtilis* PCI 219, A-SPM は *Micrococcus luteus* を用いて活性の測定を行い、対照に比べ明らかに阻止円の減少したもの、および阻止円の観察されなかったものを不活化活性陽性株とした。

II. 結 果

1) EM および A-SPM に対する感受性

5種類の病原性 *Nocardia* の EM と A-SPM に対する MIC range, MIC₅₀ および MIC₉₀ の結果を Table 1 に示した。

N. nova は EM と A-SPM いずれに対しても低い MIC 値を示した。検討した 20 株すべてが 0.39 μg/ml 以下の MIC 値を示し、*N. nova* は他の *Nocardia* と異なり高い感受性を示した。

N. asteroides は EM と A-SPM に対する広い範囲の MIC 分布を示した。MIC₅₀ は EM は 9.17 μg/ml, A-SPM は 5.23 μg/ml であり、MIC₉₀ はいずれの場

* 千葉市中央区玄鼻 1-8-1

合も 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。 *N. farcinica* と *N. otitidiscaviarum* は EM に対し 85% 以上の株が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示し、MIC₅₀ は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、多くの株は高い MIC 値を示した。これらの菌株は A-SPM に対しては *N. farcinica* の MIC₅₀ が 5.23 $\mu\text{g/ml}$ 、*N. otitidiscaviarum* の MIC₅₀ が 16.7

$\mu\text{g/ml}$ であり、*N. asteroides* と同様な広い範囲の MIC 分布を示した。 *N. brasiliensis* は EM に対し 1 株が 25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示したが、残りすべての菌株は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示し、耐性であった。 A-SPM に対してもすべての菌株が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した。

Table 1. Sensitivity of five species of pathogenic *Nocardia* to erythromycin and acetylspiramycin

<i>Nocardia</i> species		Erythromycin			Acetylspiramycin		
		($\mu\text{g/ml}$)			($\mu\text{g/ml}$)		
		MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>N. asteroides</i>	(21)*	<0.2 ->100	9.17	>100	0.39->100	5.23	>100
<i>N. farcinica</i>	(20)	0.39->100	>100	>100	0.39->100	5.23	>100
<i>N. nova</i>	(20)	<0.2 - 0.39	0.27	0.36	0.2 - 0.39	0.29	0.37
<i>N. brasiliensis</i>	(14)	25 ->100	>100	>100	100 ->100	>100	>100
<i>N. otitidiscaviarum</i>	(16)	0.39->100	>100	>100	0.2 ->100	16.7	47.0

* Denotes numbers of strains used in this study.

Table 2. MICs against *Nocardia asteroides* and its inactivation activity

	IFM no.	Erythromycin		Acetylspiramycin	
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity
<i>Nocardia asteroides</i>	0001	25	-	6.25	+
	0002	25	-	12.5	+
	0042	25	-	6.25	-
	0258	12.5	-	25	-
	0262	>100	+	100	+
	0263	1.56	NT	6.25	-
	0265	50	-	50	-
	0271	<0.1	NT	0.2	NT
	0280	>100	+	100	+
	0282	0.2	NT	0.78	NT
	0299	>100	+	>100	+
	0319	100	-	25	-
	0323	0.2	NT	0.78	NT
	0330	0.78	NT	1.56	NT
	0338	0.78	NT	1.56	NT
	0339	>100	+	>100	-
	0342	0.78	NT	1.56	NT
	0344	0.1	NT	0.78	NT
0347	>100	+	>100	+	
0349	0.39	NT	0.78	NT	
0360	1.56	NT	6.25	+	

NT: not tested

Table 3. MICs against *Nocardia farcinica* and its inactivation activity

	Erythromycin			Acetylspiramycin	
	IFM no.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity
<i>Nocardia farcinica</i>	0178	3.13	NT	3.13	NT
	0179	3.13	NT	3.13	NT
	0185	>100	-	50	+
	0186	>100	-	6.25	+
	0188	>100	-	6.25	+
	0189	>100	-	6.25	+
	0191	>100	-	25	+
	0221	>100	-	>100	+
	0225	25	-	6.25	-
	0228	>100	-	6.25	-
	0247	25	-	6.25	+
	0248	25	-	12.5	-
	0261	0.39	NT	0.39	NT
	0275	>100	-	6.25	-
	0284	>100	-	100	+
	0294	>100	-	>100	+
	0320	>100	-	25	+
	0345	50	+	50	+
	0348	25	-	3.13	NT
	0363	>100	-	25	+

NT: not tested

Table 4. MICs against *Nocardia brasiliensis* and its inactivation activity

	Erythromycin			Acetylspiramycin	
	IFM no.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Inactivation activity
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0223	>100	+	>100	+
	0226	>100	+	>100	+
	0227	>100	+	>100	+
	0229	>100	+	>100	+
	0230	>100	+	>100	+
	0233	>100	+	>100	+
	0234	>100	+	>100	+
	0235	>100	+	>100	+
	0236	>100	+	>100	+
	0246	>100	+	>100	+
	0249	>100	+	>100	+
	0256	>100	+	>100	+
	0279	25	+	>100	+
	0281	>100	+	100	+

NT: not tested

Table 5. MICs against *Nocardia otitidiscaviarum* and its inactivation activity

	IFM no.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Erythromycin	Acetylspiramycin
			Inactivation activity	MIC ($\mu\text{g/ml}$) Inactivation activity
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	0167	>100	+	12.5 +
	0181	100	+	6.25 +
	0192	>100	+	50 +
	0205	>100	+	50 +
	0239	>100	+	50 +
	0273	25	-	3.13 NT
	0300	>100	+	50 +
	0301	>100	+	25 +
	0302	>100	+	25 +
	0303	>100	+	50 +
	0304	100	-	0.78 NT
	0313	6.25	+	0.39 NT
	0314	6.25	+	0.2 NT
	0337	>100	+	100 +
	0354	0.39	NT	6.25 -
	0362	>100	+	25 +

NT: not tested

2) EM, A-SPM の不活化能

Tables 2~4 に *N. asteroides*, *N. farcinica* および *N. otitidiscaviarum* の EM と A-SPM に対する MIC 値, さらにこれら抗生物質の不活化活性を示した。不活化活性の検討はこれら抗生物質に対し MIC 値 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株について行った。

N. asteroides は EM と A-SPM 両者に 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した 11 株で, A-SPM のみを不活化する菌株が 2 株, いずれにも不活化活性を示さない菌株が 4 株, EM, A-SPM 両者を不活化する菌株が 4 株認められた (Table 2)。今回検討した病原性 *Nocardia* で, ただ 1 株 IFM 0339 が例外的に EM のみを不活化し, A-SPM を不活化しなかった。*N. farcinica* は不活化能を検討した 16 株中 12 株が A-SPM 不活化能を示し, このうち 1 株 (IFM 0345) にのみ A-SPM と EM 不活化が認められた (Table 3)。また, 両者共に不活化しない菌株が 4 株認められた。

N. brasiliensis では検討した 14 株すべてにおいて EM および A-SPM の不活化活性が認められた (Table 4)。

N. otitidiscaviarum は, EM と A-SPM 両者に 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した菌株すべてが EM および A-SPM を不活化した。EM または A-SPM のい

ずれかに 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示した菌株は抗生物質を不活化しなかった (Table 5)。

III. 考 察

一般に *Nocardia* 症の治療には古くからサルファ剤や S-T 合剤, さらには, ミノサイクリンの治療例の報告がある⁷⁾。またアミカシンやチエナムによる治療報告もわずかではあるが認められる。しかし, 依然として *Nocardia* 症の第一次選択剤はサルファ剤であり, サルファ剤やミノサイクリンの投与が困難な患者における新しい薬剤の開発は, 重要な研究課題である。最近の我々の研究は, *Nocardia* が種によって異なった薬剤感受性を示すことを明らかにしてきた。

Nocardia はマクロライド系抗生物質に対して株により異なった感受性を示すことが報告されてきた。最近の, *Nocardia* の新しい分類体系では, *Nocardia* 症でもっとも多い割合で疾患を引き起こすとされる *N. asteroides* は 3 菌種 (*N. asteroides*, *N. farcinica* および *N. nova*) に細分された。そこで, これら細分された *Nocardia* のマクロライド系薬剤に対し検討した結果, 菌種間で感受性に明らかな差が認められた。特に, *N. nova* のすべての菌株がマクロライド系抗生物質に感受性であった。したがって, これまで EM に対する *Nocardia* の菌株間での感受性の差は菌種間で

の違いによることが明らかになった。*Nocardia* 症に対する EM の有効例が Bach⁷⁾ 等によって報告されているが、EM の臨床的有効性を明らかにするためには、今後 *N. nova* と同定された疾患に対する治療を含めた検討が必要である。

マクロライド系抗生物質の耐性機構として、リボソーム 50 S サブユニットの構成蛋白の変化による抗生物質の親和性低下⁸⁾、さらに 50 S サブユニットの 23 S RNA のメチル化による耐性が報告されている⁹⁾。また、リン酸化¹⁰⁻¹³⁾、グリコシル化¹⁴⁾、さらにエステラーゼによる不活化^{15,16)} の 3 種類の不活化による耐性が報告されている。

上記の結果から、病原性 *Nocardia* のマクロライド系抗生物質耐性にはリボソーム等の作用点の変化による耐性と抗生物質の不活化による耐性の 2 種類が存在するものと考えられる。

14 員環 (EM) と 16 員環 (A-SPM) マクロライドをして比較したとき、*N. brasiliensis* や *N. otitidis-caviarum* では両者の不活化活性が認められ、*N. farcinica* では 16 員環マクロライドのみを不活化する菌株が多くみられた。このことは病原性 *Nocardia* は種により不活化パターンが異なることを示唆しているものと考えられる。また、14 員環マクロライドだけを不活化する病原性 *Nocardia* は例外と考えられ、病原性 *Nocardia* 91 株中 1 株にのみその活性が認められた。*Nocardia* による EM の不活化については、*N. brasiliensis* による EM の不活化物質について単離精製が進み、質量分析の結果からリン酸化による不活化であることを示唆するデータが得られており、その詳細な構造研究を進めている。

文 献

- 1) Mikami Y, Yazawa K: Susceptibility patterns of pathogenic *Nocardia* to some selected antimicrobial agents and their usefulness in the identification work in a clinical laboratory. *Bull. JFCC* 5: 89~95, 1989
- 2) Yazawa K, Mikami Y, Uno J: *In vitro* susceptibility of *Nocardia* spp. to new fluoroquinolone, tosufloxacin (T 3262). *Antimicrob Agents Chemother* 33: 2140~2141, 1989
- 3) Yazawa K, Mikami Y, Ohashi S, Miyaji M, Ichihara Y, Nishimura C: In-vitro activity of new carbapenem antibiotics: comparative studies with meropenem, L-627 and imipenem against pathogenic *Nocardia* spp. *J Antimicrob Chemother* 29: 169~172, 1992
- 4) Yazawa K, Mikami Y, Maeda A, Kudo T, Suzuki K, Saito N, Kubo A: Inactivation of kanamycin A by phosphorylation in pathogenic *Nocardia*. *Microbiol Immunol* 35: 39~48, 1991
- 5) Yazawa K, Mikami Y, Maeda A, Akao M, Morisaki N, Iwasaki S: Inactivation of rifampin by *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* in press, 1993
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 7) Bach M C, Monaco A P, Finland M: Pulmonary Nocardiosis, therapy with minocycline and with erythromycin plus ampicillin. *J Am Med Assoc* 224: 1378~1381, 1973
- 8) Tanaka K, Teraoka H, Tanaka M, Otake E, Osawa S: Erythromycin-resistant mutant of *Escherichia coli* with altered ribosomal protein component. *Science* 162: 576~578, 1968
- 9) Lai C J, Weisblum B: Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 68: 856~860, 1971
- 10) Wiley P F, Baczynskyj L, Dolak L A, Cialdella J L, Marshall V P: Enzymatic phosphorylation of macrolide antibiotics. *J Antibiot* 40: 195~201, 1989
- 11) Tsuji N, Kobayashi M, Kamigauchi T, Yoshimura Y, Terui Y: Structure of a phosphorylated derivative of oleandomycin, obtained by reaction of oleandomycin with an extract of an erythromycin-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Antibiot* 41: 823~827, 1988
- 12) Marshall V P, Cialdella J I, Baczynskyj L, Liggett W F, Johnson R A: Microbial O-phosphorylation of macrolide antibiotics. *J Antibiot* 42: 132~134, 1989
- 13) O'hara K, Kanda T, Ohmiya K, Ebisu T, Kono M: Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1354~1357, 1989
- 14) Kuo M, Chirby D C, Argoudelis A D, Cialdella J I, Coats J H, Marshall V P: Microbial glycosylation of erythromycin A. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 2089~2091, 1989
- 15) Barthelemy P, Autissier D, Gerbaud G, Courvalin P: Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*, a new mechanism of resistance. *J Antibiot* 37: 1692~1696, 1984
- 16) Arthur M, Andermont A, Courvalin P: Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 404~409, 1987

Susceptibility of pathogenic *Nocardia* to erythromycin and
acetylspiramycin and their inactivation

Katsukiyo Yazawa and Yuzuru Mikami

Division of Chemotherapy, Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses,
Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuou-ku, Chiba 260, Japan

Akihiro Matsumae

Kitasato University

The susceptibility of five species of pathogenic *Nocardia* including 91 strains to erythromycin (EM) and acetylspiramycin (A-SPM) was studied. Inactivation of EM and A-SPM by these pathogenic *Nocardia* was also tested. Among these *Nocardia* species, *Nocardia nova* was found to belong to the most sensitive group, and *Nocardia brasiliensis* was resistant to both EM and A-SPM. The susceptibility of *Nocardia asteroides* varied depending on the strain. *Nocardia farcinica* and *Nocardia otitidicaviarum* were resistant, but both species are more sensitive to EM than A-SPM. All *N. brasiliensis* tested inactivated EM as well as A-SPM, and the possible structure of the inactivated product is discussed. No inactivation products were obtained from *N. nova*.