

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* における arbekacin の高度耐性化について

鈴木 隆 男

群馬大学医学部第一外科*

(平成 7 年 11 月 16 日受付・平成 7 年 12 月 20 日受理)

臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 15 株を用いて、アミノ配糖体耐性と arbekacin (ABK) 耐性変異株の出現を調べた。15 株のうち 12 株は gentamicin (GM), tobramycin (TOB) 耐性で、そのうち 2 株は ABK 耐性であった。残り 3 株は GM 感受性 TOB 耐性であった。これらの菌株のうち、GM, TOB 耐性 ABK 感受性である 5 株から 10^{-4} の頻度で ABK 耐性菌 (MIC: 25 or 50 $\mu\text{g/ml}$) が分離された。また、GM 感受性 TOB 耐性 ABK 感受性株からは ABK 耐性菌は 10^{-6} の頻度で分離され、その MIC は 12.5 または 25 $\mu\text{g/ml}$ であった。アミノ配糖体修飾酵素のうち、6' アセチル転移酵素 (AAC (6')) および 2" リン酸転移酵素 (APH (2")) の両活性を有する酵素 AAC (6') / APH (2") 産生遺伝子を保有するプラスミド pMS 91 をもつ黄色ブドウ球菌 MS 353 (pMS 91) から ABK 耐性変異株が 10^{-5} の頻度で分離され、この耐性変異株では AAC (6') / APH (2") 量が元株の約 6 倍に上昇していた。黄色ブドウ球菌のファージを用いた形質導入実験から、この変異、すなわち ABK 高度耐性は、プラスミド上のアミノ配糖体修飾酵素 AAC (6') / APH (2") 産生遺伝子の変異による AAC (6') / APH (2") の産生量の増加にもとづく結論された。

Key words: MRSA, ABK, 修飾酵素

欧米諸国においては、1960 年代にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が分離、報告されている。我が国においても、1980 年代半ばごろから MRSA の分離頻度が増加しはじめ、現在では分離される黄色ブドウ球菌の 50 % 前後まで増加し、これらは治療の上でも、また院内感染対策の上でも大きな問題となっている¹⁾。

現在、単独使用で MRSA に強い抗菌力を有する抗菌薬として vancomycin (VCM) と arbekacin (ABK) が知られているが、これらの抗菌薬が抗 MRSA 薬として使用されるようになったのはここ数年のことである。したがってそれまでは、MRSA に対しては β -ラクタム薬を中心とした併用療法が治療の主流であり、併用抗菌薬については種々の組み合わせが報告されている²⁻⁷⁾。そのような状況のなかで、VCM と ABK は単独でも高度耐性の MRSA に強い抗菌活性を示す抗菌薬として登場した。しかし、これらの抗菌薬も、その使い方によっては種々の問題点が生じてくることは容易に推測できた。たとえば、VCM は MRSA を含め β -ラクタム剤耐性のグラム陽性菌には有効であるが、グラム陰性菌に対しては抗菌力が弱い⁸⁾。一方 ABK は多くのグラム陰性菌に対しても強い抗菌活性を有するため⁹⁾、複数菌感染に対してはより有効であるが、臨床分離の MRSA 中にも一部耐性株が検出されているなど、耐性化の動向が注目される¹⁰⁾。

そこで我々は、黄色ブドウ球菌の ABK 高度耐性菌出現機構について生化学的および遺伝学的検討を行った。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

1989 年 6 月より 1990 年 5 月までの 1 年間に群馬大学医学部第一外科入院患者より分離された MRSA 15 株と、当科および九州、四国、東京の 4 施設由来の臨床分離 ABK 耐性 25 株、および群馬大学医学部薬剤耐性実験施設保存の、アミノ配糖体修飾酵素 AAC (6') / APH (2") 産生遺伝子を持つ *Staphylococcus aureus* MS 353/pMS 91 (PC^r, SM^r, KM^r, GM^r, TOB^r,) 株を使用した。

2. 抗菌薬耐性検査

抗菌薬感受性は日本化学療法学会標準法に従い、培地は感性ディスク N (日水) を用いた。3 % NaCl 含有培地で methicillin (DMPPC, 萬有製薬) 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上、または oxacillin (MPIPC, 萬有製薬) 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上、または ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品) 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す黄色ブドウ球菌を MRSA とし、それ以下の MIC のものをメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) とした。また各抗菌薬に対しては、それぞれの抗菌薬感受性菌が増殖できない濃度 (耐性限界値) の各抗菌薬含有寒天培地を作り増殖の有無で耐性、感受性を区別した。以上から使用検査抗菌薬の耐性限界値は、DMPPC: 3.13, 100 $\mu\text{g/ml}$; josamycin (JM, 山之内製薬): 1.56, 25 $\mu\text{g/ml}$; kanamycin (KM, 明治製薬): 25 $\mu\text{g/ml}$; gentamicin (GM, シェリング・

ブラウ): 0.78, 100 $\mu\text{g/ml}$; tobramycin (TOB, 塩野義製薬): 0.78 $\mu\text{g/ml}$; amikacin (AMK, 萬有製薬): 6.25 $\mu\text{g/ml}$; norfloxacin (NFLX, 杏林製薬): 6.25 $\mu\text{g/ml}$; minocycline (MINO, 日本レダリー): 0.78 $\mu\text{g/ml}$; ABK (明治製薬): 3.13 $\mu\text{g/ml}$; VCM (塩之義製薬): 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を用い、この濃度で増殖したものを耐性菌とした。

3. 抗菌薬感受性測定法

抗菌薬感受性測定は感受性測定ブイオン (ニッスイ) および感性ディスク用培地 N (ニッスイ) を用い、化学療法学会標準法に準拠した。接種菌量は菌数のばらつきを少なくするため、30 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養菌液を用い、約 5×10^6 CFU/ml になるように Buffered Saline Gelatine (BSG) にて調整し、この 5 μl をマイクロプランター (佐久間製作所) にてスタンプ接種した。35 $^{\circ}\text{C}$ にて 18 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

また ABK に対する耐性限界値 ($\mu\text{g/ml}$) は、感受性分布から求めた 3.13 $\mu\text{g/ml}$ をもって決定し、この濃度で増殖したものを耐性菌とした。

4. 耐性変異株の分離

元株の ABK の MIC 濃度の 2 倍にあたる ABK を含有する Mueller-Hinton 平板 (MHA) を作成し、30 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養菌液をこの平板に 0.1 ml 植える。これを 35 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養後、増殖した耐性変異株のコロニー数を調べた。

同時に、抗菌薬を含まない MH 平板にも同様に菌液を 0.1 ml 植え 35 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養し、この平板に増殖したコロニー数から菌液の菌数を調べ、これと耐性変異株のコロニー数から耐性変異株の出現頻度を求めた。

5. 形質導入

1) ファージ液の作成

耐性菌液を一夜培養する。N 寒天培地に耐性菌培養液 (10^6 CFU/ml) および、N プロスで 10^3 倍希釈した S 1 ファージ液 (10^6 PFU/ml) をそれぞれ 0.1 ml 混合し、これに soft agar 3 ml を入れて平板上に均一に流し込んだ。これを 30 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養して、耐性プラスミドをとりこんだファージ液を作った。ファージ液は soft agar をかきとり、これに N プロス 3 ml を加えて 10,000 r. p. m. \times 10 分間遠心し、その上清をミリポアで濾過して菌体を除いて、用意した。

2) 形質導入

一夜培養した受容菌液と耐性プラスミドをとりこんだファージ液とを等量ずつ混ぜ、この混合液 0.1 ml を GM 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 含有 MH 平板に植え、30 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養する。この平板上にできたコロニーをもう一度、GM 含有平板に植え、次に GM 非含有平板に植え純培養した。

6. Ethidium Bromide (EB) 処理による薬剤感受性株の分離

菌液を 35 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養する。Ethidium Bromide (EB) 入り Penassay プロス (pH 7.0) は、EB の濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ から 2 倍希釈を繰り返して、10 段階の濃度の溶液を調製する。これに一夜培養液を $3 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml になるように植え、42 $^{\circ}\text{C}$ で一夜培養する。各濃度のなかで、菌の増殖がはじめて認められた濃度 (1/2 MIC) の培養液を希釈して、MHA に平板あたり 200 個前後のコロニーができるように塗抹する。次に、アンプルン 1%・寒天 1% 液 10 ml に、benzylpenicillin (PCG) 20 mg/ml 溶液、およびヨード液各 1 ml ずつを注ぎ、2~10 分後平板上から退色しないコロニーを選択し、薬剤感受性を調べ、分離した。

7. 修飾酵素粗酵素液の調整と定量

粗酵素液の調整は以下の方法で行った。一夜振盪培養液を L 液体培地に植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 時間振盪培養、対数後期で集菌する。冷 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて菌体を洗浄した後、同 buffer に懸濁する。菌体を 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl₂ (pH 7.8) 溶液 5 ml に懸濁し、Lysostaphin を 25 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間反応させて溶菌し、Sonicator (TOMY, UD-201) に 10 分間かける。これを 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm、20 分間遠心し、その上清を粗酵素液とする。

この粗酵素液の蛋白定量は Bio-Rad protein assay 法で、標準蛋白の各濃度をプロットした標準曲線を作成し、サンプルの吸光度から蛋白量を算出した。

8. 修飾率の測定

反応系は次の組成、次の通りで行った。すなわち、200 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.15 ml, 20 mM ATP 2 Na 0.05 ml, 0.5 mM acetyl CoA 0.05 ml, 抗菌薬 (100 $\mu\text{g/ml}$) 0.05 ml, 20 mM MgCl₂ 0.05 ml, 粗酵素液 0.15 ml よりなる。粗酵素液は、まず 10 mg/ml の濃度で作製し、これを 50 mM リン酸 buffer (pH 7.2) で 2 倍希釈して 10 段階の濃度を調整する。一方対照は、ATP, acetyl CoA の代わりにそれぞれ等量の滅菌蒸留水を加える。以上の抗菌薬修飾の反応系を、37 $^{\circ}\text{C}$ 3 時間反応させた後、100 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間熱処理して酵素反応を停止させる。変性蛋白は、30,000 rpm 10 分間遠心して除き、上清の反応液の抗菌薬の残存力価はカップ法にて定量を行った。指示菌は *Bacillus subtilis* とし、その孢子液を希釈して 2.5×10^7 CFU/ml の濃度にして、この 1 ml を普通寒天培地 100 ml に混合し、分注する。次いでこの平板上にカップをたて、その中に反応液と対照液を入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養し阻止円を測定する。既知濃度の抗菌薬溶液から標準曲線を作成し、これをもとに残存の抗菌薬量を求め、修飾率を算出した。次に各濃度の粗酵素液における修飾率をプロットし、この曲線から KM および ABK を 50% 修飾する時の酵素蛋白量を菌株ごとに求め、一定酵素蛋白量あたりの相対修飾率を KM と ABK で比較した。

9. Penicillinase (PCase) 比活性の測定

測定菌株の粗酵素液を調製し、これらの蛋白量を Bio Rad protein assay 法により、吸光度から算出する。50 mM リン酸 Buffer (pH 7.2) で溶かした 100 μ M PCG 液を調製し、この PCG 液 3 ml に酵素液 50 μ l を入れ、島津 UV-240 Spectrophotometer を用いて Spectrophotometric assay 法により、PCase 活性曲線を作成する。この活性曲線から Δ OD を求め、次式※から (A) u/ml を算出し、蛋白定量により求めた蛋白量 (B) mg/ml から、PCase 比活性を (A)/(B) u/mg として算出する。

$$\begin{aligned} & \ast \Delta OD / \Delta E \times (3 + \text{酵素量}) / \text{酵素量} \times 1/t(\text{分}) = (A) \text{ u/ml} \\ & \Delta E = 1.64(\text{PCG}) \end{aligned}$$

II. 結 果

1. ABK 耐性菌および耐性変異株出現頻度

1) 使用菌株の耐性型

臨床分離 MRSA 15 株は、1989 年 6 月より 1990 年 5 月までの群馬大学第一外科入院患者 14 症例から分離された菌株であり、14 症例中 12 症例 (85.7%) が悪性腫瘍の患者であった。15 株を DMPPC の耐性値から分けると、中等度耐性 MRSA (MIC < 200 μ g/ml) が 4 株 (26.6%)、高度耐性 MRSA (MIC \geq 200 μ g/ml) が 11 株 (73.4%) であった。これらの菌株の抗菌薬耐性型を Table 1 に示したが、15 株はいずれも多剤耐性であった。アミノ配糖体に対する耐性のなかで、GM および TOB 耐性株は 12 株 (80%) あり、GM 感受性で TOB 耐性株は 3 株 (20%) あった。ABK の耐性限界値を 3.13 μ g/ml とした場合、ABK 耐性株は存在しなかった (Table 2)。また VCM 耐性株も存在しなかった。

また 15 株の ABK および GM の MIC を Table 2 に示したが、ABK の MIC の分布は、0.78 ~ 3.13 μ g/ml で、GM の MIC の分布は、0.78 ~ \geq 200 μ g/ml であった。ABK 耐性と GM 耐性の相関性をさらに調べるため、地域的に離れた 4 医療施設より分離された ABK 耐性菌 18 株 (MIC 3.13 ~ 25 μ g/ml) の GM の MIC を調べた。その結果これら 18 株はすべて GM 高度耐性であり、GM の MIC の分布は 400 ~ \geq 1,600 μ g/ml であった。これらの臨床分離 GM、TOB 耐性菌 12 株および ABK 耐性菌 18 株における ABK と GM の MIC の相関係数 (R) は 0.807 であり、ABK 耐性と GM 耐性の間には相関関係が認められた。

2) ABK 耐性変異株の分離

臨床分離 15 株中、ABK の MIC が 1.56 μ g/ml 以下の耐性型の異なる 7 株について、ABK 耐性変異株の出現を調べた。調べたすべての株から ABK 耐性変異株が出現した。そのうち GM の MIC が 25 μ g/ml 以上の GM 耐性菌 5 株 (すべて TOB 耐性) からは比較的高頻度で ABK 耐性変異株が分離された (Table 3)。得られ

Table 1. Resistance patterns of clinically isolated MRSA

Resistance patterns	No. of strains (%)
DMP JM KM GM TOB AMK ABK NFLX MINO	1 (7)
DMP JM KM GM TOB AMK NFLX	6 (40)
DMP JM KM GM TOB AMK ABK	1 (7)
DMP JM KM GM TOB AMK	4 (26)
DMP JM KM TOB	1 (7)
DMP JM KM TOB AMK NFLX	2 (13)

Number of MRSA strains was 15, all isolated from surgical in-patients at Gunma University from 1989 to 1990.

Break point (μ g/ml):

DMP: methicillin 3.13, 100 JM: josamycin 1.56, 25

KM: kanamycin 25 GM: gentamicin 0.78, 100

TOB: tobramycin 0.78 AMK: amikacin 6.25

ABK: arbekacin 1.56 NFLX: norfloxacin 6.25

MINO: minocycline 0.78

Table 2. Distribution of MICs of arbekacin and gentamicin against MRSA

MIC (μ g/ml)		No. of strains (%)
ABK	GM	
0.78	0.78	3 (20)
0.78	25	2 (13)
0.78	50	1 (7)
1.56	50	1 (7)
1.56	100	1 (7)
1.56	\geq 200	5 (33)
3.13	\geq 200	2 (13)

Number of MRSA strains was 15, all isolated from surgical in-patients at Gunma University from 1989 to 1990.

ABK: arbekacin, GM: gentamicin

た変異株の ABK の MIC は 25 μ g/ml または 50 μ g/ml を示し、GM の MIC も 200 μ g/ml 以上の高度耐性に変化していた。

一方 GM 感受性菌 (MIC = 0.78 μ g/ml) からの ABK 耐性菌出現頻度は GM 耐性菌からの変異率に比べ 1 ~ 2 桁低かった。得られた変異株の ABK の MIC は 12.5 μ g/ml または 25 μ g/ml で、GM の MIC は 12.5 μ g/ml または 25 μ g/ml に上昇していた (Table 3)。

2. GM および TOB 耐性プラスミドを含む黄色ブドウ球菌の ABK 耐性変異

プラスミド pMS 91 は、アミノ配糖体修飾酵素の中の、6'アセチル転移酵素/2"リン酸転移酵素の両活性を有する酵素 (AAC (6')/APH (2")) 産生を決定する遺伝子を有し、GM 耐性 (MIC = 100 μ g/ml)、TOB 耐性 (MIC = 800 μ g/ml) に加えて、その他 SM、PC 耐性を示す。しかし、ABK の MIC は 0.78 μ g/ml と感受性を示す。MS 353 は臨床分離 *S. aureus* 実験株で、MIC は GM が 0.2 μ g/ml、ABK が 0.2 μ g/ml である。プラスミド pMS 91 を持つ MS 353 (pMS 91) を ABK 濃度 1.56 μ g/ml で選択して、 10^{-5} の頻度で ABK 耐性変異株を得た。耐性変異株の ABK の MIC は 25 μ g/ml

Table 3. Isolation frequency of arbekacin (ABK) resistant mutants and its MICs against ABK and gentamicin

No. of wild type	MIC of wild type ($\mu\text{g/ml}$)		Frequency of mutants	MIC of mutants ($\mu\text{g/ml}$)	
	ABK	GM		ABK	GM
MS 15578	0.78	0.78	8.2×10^{-4}	12.5 or 25	12.5 or 25
MS 15582	0.78	0.78	4.4×10^{-4}	25	25
MS 15579	0.78	25	2.5×10^{-4}	25 or 50	≥ 200
MS 15590	0.78	50	6.4×10^{-4}	25 or 50	≥ 200
MS 15577	1.56	50	1.8×10^{-4}	25 or 50	≥ 200
MS 15591	1.56	100	1.2×10^{-4}	50	≥ 200
MS 15584	1.56	≥ 200	3.6×10^{-4}	50	≥ 200
MS 353 (pMS 91)	0.78	100	4.5×10^{-4}	25	≥ 200

7 MRSA strains (MS 15578~MS 15584) were clinically isolated.

Plasmid pMS 91 is encoded determinant for AAC (6')/APH (2').

Mutants were selected by ABK at $2 \times \text{MICs}$.

ABK: arbekacin, GM: gentamicin

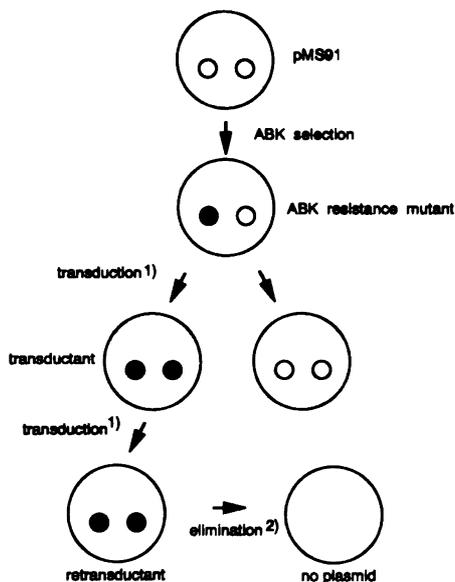


Fig. 1. Transduction analysis of arbekacin (ABK) resistance in *Staphylococcus aureus* pMS 91.

Transduction¹, transduced by phage S1 and selected by kanamycin.

Elimination², eliminated by ethidium bromide at 42°C.

○ shows a sensitive to ABK in pMS 91.

● shows a mutant resistant to ABK in pMS 91.

で、GM の MIC も 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性に変化していた (Table 3)。

ABK, GM 高度耐性がプラスミド pMS 91 上の変異であるか否かを検討するため、MS 353 を受容菌として、これらの高度耐性の形質導入を行った。その結果、形質導入株は 2 種類分離され、その一つは変異株と同じ MIC (ABK 25 $\mu\text{g/ml}$, GM $\geq 800 \mu\text{g/ml}$) を示すもので、他の形質導入株は元株の MIC (ABK 0.78 $\mu\text{g/ml}$, GM 100 $\mu\text{g/ml}$) を示すものであった (Fig. 1)。このことより、ABK, GM 高度耐性変異が細胞内に複数存在するプラスミドの中の 1 部のプラスミド上の変異で

あり、前者がその変異株であることが考えられた。この変異株から得たファージを用いて再度 MS 353 に形質導入を行った結果、すべての株の MIC は ABK 25 $\mu\text{g/ml}$, GM $\geq 800 \mu\text{g/ml}$ であった。この形質再導入株から材料と方法の項で述べた方法 (EB 法) に従って ABK 感受性株を分離した (Fig. 1)。得られた感受性株は同時に GM 感受性を示し、各薬剤に対する MIC は元株 MS 353 の MIC (ABK 0.2 $\mu\text{g/ml}$, GM 0.2 $\mu\text{g/ml}$) と同じであった。この結果は、ABK 耐性と GM 耐性が関連しており、その高度耐性の決定因子はプラスミド pMS 91 上に存在することを示唆するものである。

3. アミノ配糖体修飾酵素と PCase 比活性

1) 修飾酵素と修飾率

元株 MS 353 (pMS 91), およびそこから得た変異株の耐性プラスミド形質再導入株の両者の修飾酵素量を測定し、元株の活性を 1 とした時の形質再導入株の酵素産生量増加率を Table 4 に示した。この結果から形質再導入株の修飾酵素量の増加率は、KM を基質とした場合 6.2 倍、ABK が 6.1 倍とほぼ両者は同倍率であった。

また用いた基質の 50 % を修飾する時の KM に対する ABK の相対修飾率は、KM を 100 とした場合、元株 MS 353 (pMS 91) では 2.1, 形質再導入株でも 2.0 と両者ほぼ同値であった (Table 5)。このことは、今回分離した変異株の ABK 高度耐性を決定する AAC (6')/APH (2') は酵素の基質特異性が変化していないことを示している。

2) PCase 比活性

プラスミド pMS 91 はペニシリン耐性遺伝子を保有していることから、元株 MS 353 (pMS 91) と耐性変異株および変異株由来の形質再導入株について PCase を測定し、その比活性で比較検討した (Table 6)。酵素活性は、MS 353 (pMS 91)-1 では耐性変異株は比活性で 1.2 倍、形質再導入株では 1.5 倍であった。また

Table 4. Relative rate of enzyme activity of AAC (6')/APH (2")

Substrate	Relative rate of AAC (6')/APH (2") activity	
	Wild type (MS 353 (pMS 91))	Transductant
KM	1.0	6.2
ABK	1.0	6.1

Enzyme activity of each substrate is expressed as the relative rate of inactivation, taking the absolute rate of KM or ABK as 1.0.

Transductant, see in the text.

KM: kanamycin, ABK: arbekacin

Table 5. Relative rate of enzyme activity of MS 353 (pMS 91)
(50% inactivated)

Substrate	Relative rate of enzyme activity	
	Wild type (MS 353 (pMS 91))	Transductant
KM	100	100
ABK	2.1	2.0

Enzyme activity of each substrate is expressed as the relative rate of inactivation, taking the absolute rate of KM as 100.

Plasmid pMS 91 is encoded determinant for AAC (6')/APH (2").

Transductant, see in the text.

KM: kanamycin, ABK: arbekacin

Table 6. β -Lactamase activity of MS 353 (pMS 91)
(u/mg protein)

Strain	MS 353 (pMS 91)-1	MS 353 (pMS 91)-2
Wild type	1.44	1.31
Mutant ^{a)}	1.68 ($\times 1.2$)	1.51 ($\times 1.2$)
Transductant ^{b)}	2.13 ($\times 1.5$)	1.43 ($\times 1.1$)

Numbers indicate the β -lactamase activity (u/mg protein) of PCG as a substrate.

^{a)} Mutant selected by arbekacin (1.56 μ g/ml).

^{b)} Transductant from mutant^{a)} to MS 353 selected by kanamycin (25 μ g/ml).

MS 353 (pMS 91)-2 に関しては、耐性変異株で比活性が 1.2 倍、形質再導入株では 1.1 倍であり、いずれの場合も PCase 比活性が 2 倍以上の上昇は認められなかった。

III. 考 察

ABK や VCM などのごく限られた抗菌薬にのみ感受性を示す多剤耐性の MRSA について、いかなる抗菌薬をどのように使用して治療すべきか、また院内感染として猛威をふるう MRSA に、どう対処していくのか、数年来盛んに論議されているが、施設間の対応が異なるなど難しい問題である。

ABK は MRSA に対して、すぐれた抗菌力を発揮する抗菌薬であり、グラム陰性菌に対しても抗菌力を有する。しかし、1983 年の臨床分離 MRSA のなかでも、すでに ABK の MIC が 6.25 μ g/ml 以上を示す菌株が報告されている¹⁰⁾。我々の検査で臨床分離黄色ブドウ球菌 100 株の ABK 感受性菌が増殖できない濃度 (耐性限界

値) が 3.13 μ g/ml であったことから、ABK の MIC が 6.25 μ g/ml 以上を耐性菌とすれば、1988、1989 年の群馬大学医学部附属病院における ABK 耐性菌は、分離された MRSA 549 株中 11 株 (2.0%) 存在していた。ただし、関連 4 施設から分離された ABK 耐性菌 18 株を含めても、MIC が 50 μ g/ml 以上の高度耐性菌は存在しなかった。

しかし今回、臨床分離 MRSA について、元株の ABK の MIC の 2 倍の濃度の ABK で選択して得た耐性変異株の出現頻度は $10^{-4} \sim 10^{-6}$ と比較的高頻度であることから、今後 ABK の使用とともに耐性菌の増加が予想される。しかし一方で、ABK 耐性菌は小さい colony となり、これは白血球に貪食され易いという報告もある¹¹⁾。現在 ABK 耐性菌がそれほど増えたという報告がないのは、このことが一因となっているとも考えられる。

MRSA は通常多剤耐性を示す¹²⁾。アミノ配糖体耐性は、細菌がアミノ配糖体修飾酵素を産生することによるもので、アミノ配糖体修飾酵素を産生する菌が、アミノ配糖体に耐性であるか、感受性であるかは、その抗生物質がその菌の産生する修飾酵素の基質となり得るか否かで決まることが多い¹³⁾。*S. aureus* が産生する主なアミノ配糖体修飾酵素は、6'-アセチル転移酵素 (AAC (6')) と 2'-リン酸転移酵素 (APH (2")) の両活性を有する酵素、4'-アデニル転移酵素 (AAD (4')) および 3'-リン酸転移酵素 (APH (3')) である^{14,15)}。そして、APH (2") は GM と TOB に高度耐性を示し、AAD (4') は GM 感受性、TOB 耐性、APH (3') は GM、TOB 感受性、KM 耐性を示す^{16,17)}。また本邦で分離される GM 耐性の *S. aureus* の多くは AAC(6')/APH (2") を産生する¹⁸⁾。15 株の MRSA では、12 株 (80%) が GM 耐性 TOB 耐性であったことから、これらの菌株は少なくとも AAC (6')/APH (2") 産生株と考えられ、3 株 (20%) が GM 感受性 TOB 耐性で、AAD (4') 産生株であると考えられた。これらの耐性型の異なる株の ABK 耐性菌の出現頻度は、GM 感受性菌より GM 耐性菌の方が高かった。また ABK 耐性変異株の GM の MIC は、元株より高度耐性を示した。これは、GM 耐性菌において、ABK 耐性と GM 耐性が相関していることを示しており (相関係数 0.807)、ABK 高度耐性変異はアミノ配糖体修飾酵素の中でも AAC (6')/APH (2") が強く関係していることが示唆された。一方、GM 感受性菌から ABK 耐性菌が分離されたが、この変異株は同様に GM に対しても中等度耐性を示したことから、これらの変異株の耐性機構は上述のそれとは異なるものと推定されるが、その詳細は不明である。

プラスミド pMS 91 は、AAC (6')/APH (2") 産生遺伝子を保有し GM、TOB 耐性を与えるプラスミドで

ある。このプラスミドを含む *S. aureus* を用いて、ABK, GM 高度耐性変異株を得ることができた。この変異株の修飾酵素 AAC (6')/APH (2") 産生量は元株より 6 倍増加していた。さらにこの耐性変異株を形質導入した結果、宿主側の変異は認められず、耐性変異はプラスミド pMS 91 上のアミノ配糖体修飾酵素 AAC (6')/APH (2") 産生遺伝子の変異であることが推測された。

しかし、ABK は *S. aureus* の産生するアミノ配糖体修飾酵素の基質になりにくいことが知られているが、それは ABK がリン酸化される 2" 位の水酸基を有している、1 位に 4-amino-2-hydroxybutyryl 基 (AHB 基) が存在するためである¹⁰⁾。今回の我々の結果でも基質の 50% 相対修飾率は、KM を 100 とした時に ABK は MS 353 (pMS 91) で 2.1、耐性再導入株では 2.0 であった。これは ABK が KM に比べて、アミノ配糖体修飾酵素によって、はるかに修飾されにくいことを示すとともに、耐性変異は酵素の基質特異性の変化などの、質的な変異ではないことを示している。一方、PC の耐性遺伝子をも保有するプラスミド pMS 91 において、元株と耐性変異株および形質導入株では PCase 比活性が約 1.1 ~ 1.5 倍であった。これらの結果から、ABK の耐性化は pMS 91 のコピー数の増加によるものではなく、AAC (6')/APH (2") 産生遺伝子の増加や転写活性が増えたことによるものと考えられる。この点については今後の課題であろう。

以上から ABK 耐性 MRSA の出現は、主としてアミノ配糖体修飾酵素 AAC (6')/APH (2") の産生量増加によって 2" 位水酸基が修飾されることによるものであり、さらにそれは単一プラスミド上の酵素産生遺伝子の量的変異によると考えられた。

謝 辞

終わりにあたり、本研究に終始御指導、御校閲を賜った群馬大学第一外科長町幸雄教授に深く感謝の意を表しますとともに、菌株その他でご協力願った群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設大久保豊司氏に心より感謝申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 39 回日本化学療法学会総会および第 38 回日本化学療法学会東日本支部総会において発表した。

文 献

- 1) 井上松久, 大久保豊司, 宮本 泰: グラム陽性球菌。薬剤耐性菌による環境汚染 (三橋 進, 五島瑳智子, 清水喜八郎編), p 9~36, 学会出版センター, 東京, 1985
- 2) 四方田幸恵, 高橋綾子, 角田佐徳里, 小林 功: 群馬大学附属病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分離状況。Chemotherapy 39: 813 ~ 821, 1991
- 3) Alvarez S, Jones M, Berk S L: In vitro activity of fosfomicin, alone and combination against methicillin-resistant *S. aureus*. Antimicrob Agent Chemother 28: 689~690, 1988
- 4) Utui Y et al.: Antibacterial activity of cefmetazole alone and in combination with fosfomicin against methicillin- and cephem-resistant *S. aureus*. Antimicrob Agent Chemother 30: 927~932, 1986
- 5) 井上松久, 大久保豊司, 岡本了一, 橋本 一: MRSA に対する併用効果の解析。—特に IPM を中心とした in vitro 併用効果—。日本細菌学雑誌 46: 289, 1991
- 6) 鈴木隆男, 長町幸雄, 橋本 一, 藤田欣一: 外科入院患者より分離された MRSA の薬剤耐性と β -ラクタム剤の併用効果について。北関東医学 41: 661~670, 1991
- 7) 藤田欣一, 長町幸雄, 橋本 一, 鈴木隆男: MRSA に対する cefuzonam と他抗菌剤との併用効果について。北関東医学 41: 671~675, 1991
- 8) 藤田欣一, 鈴木隆男, 長町幸雄, 井上松久, 大久保豊司, 橋本 一: ブドウ球菌に対する Vancomycin の基礎的検討。Chemotherapy 40: 694, 1992
- 9) 岡本了一, 伊豫部志津子, 三橋 進: HBK の細菌学的検討。Chemotherapy 34 (S-1): 1~10, 1986
- 10) 山下直子, 生方公子, 野々口律子, 後藤 朗, 松下真理, 紺野昌俊: 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。Chemotherapy 34 (S-1): 33~40, 1986
- 11) Aoki Y: Bactericidal activity of arbekacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Comparison with that of vancomycin. Jap J Antibiotics 47: 640~646, 1994
- 12) 大久保豊司, 岡本了一, 伊豫部志津子, 高橋綾子, 四方田幸恵, 井上松久: 臨床分離黄色ブドウ球菌の薬剤耐性とフェージ型別。Jap J Antibiotics 47: 357~364, 1994
- 13) 後藤 朗: ブドウ球菌の産生するアミノ配糖体修飾酵素の現状について。Chemotherapy 33: 12~23, 1985
- 14) Ubukata K, et al.: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agent Chemother 25: 754~759, 1984
- 15) Le Goffic F: The resistance of *S. aureus* to aminoglycoside antibiotics and pristinamycins in France in 1976~1977. Jap J Antibiotics 30 (S): 286~291, 1977
- 16) 近藤信一: アミノ配糖体の耐性機構。薬剤耐性機構の生化学 (三橋 進編): p 27~58, 学会出版センター, 東京, 1981
- 17) 近藤信一: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する各種抗生物質の抗菌活性アミノグリコシド修飾酵素による分類と MRSA に有効な物質。Jpn J Antibiotics 44: 1211~1215, 1991
- 18) 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
- 19) 松橋祐二, 山本治夫: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌の産生するアミノ配糖体系抗生物質不活化酵素に関する研究。Jap J Antibiotics 41: 523~529, 1988

High resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to arbekacin

Takao Suzuki

The First Department of Surgery, Gunma University School of Medicine 3-39-22 Showa-machi,
Maebashi-shi, Gunma 371, Japan

Arbekacin (ABK)-highly resistant mutants were isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of clinical isolates which showed low resistance (1.56 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) or sensitivity (0.78 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) to ABK. The mutants derived from gentamicin (GM) (25 $\mu\text{g/ml}$ to 100 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) and tobramycin (TOB) resistant strains expressed ABK resistance at a level of 12.5 $\mu\text{g/ml}$ or 25 $\mu\text{g/ml}$ of MIC, and at highly GM resistant levels equal to or exceeding 200 $\mu\text{g/ml}$. Plasmid pMS 91 is a laboratory plasmid and confers GM (100 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) and TOB (800 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) resistances but is sensitive to ABK (0.78 $\mu\text{g/ml}$ of MIC) in *S. aureus*, and encodes a determinant for bifunctional aminoglycoside modifying enzymes of 6'-aminoglycosides acetyltransferase (AAC (6')) and 2"-aminoglycosides phosphotransferase (APH (2")). ABK resistant mutants were isolated from *S. aureus* MS353 carrying pMS91, and the mutants expressed ABK and GM resistances at a level of 25 $\mu\text{g/ml}$, and at levels equal to or exceeding 200 $\mu\text{g/ml}$ of MIC, respectively. The amount of the aminoglycoside modifying enzyme AAC (6')/APH (2") in the mutant strain was six times more than that of the parent strain. The relative enzyme activities to ABK of the parent and mutant strains were 2% that of kanamycin (KM). These results indicate that the ABK-highly resistant mutant of GM-TOB resistant *S. aureus* resulted from an increased amount of the aminoglycoside modifying enzyme of AAC (6')/APH (2").