

Arbekacin 耐性 MRSA からの aminoglycosid 修飾酵素による arbekacin の不活化

藤村 茂^{1,2)}・徳江 豊²⁾・高橋 洋²⁾・貫和 敏博²⁾・渡辺 彰²⁾

¹⁾宮城大学看護学部基礎医学系微生物学*

²⁾東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

(平成 10 年 8 月 19 日受付・平成 10 年 11 月 19 日受理)

Arbekacin (ABK) 耐性を示す臨床分離のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 4 株, および試験管内継代培養により ABK 耐性を獲得させた 1 株, 対照として ABK 感受性 MRSA 1 株を, また PCR のコントロールとして ABK 修飾酵素として知られている aminoglycoside acetyltransferase {AAC (6')} -aminoglycoside phosphotransferase {APH (2'')} 保有 ABK 耐性 MRSA 1 株を用いて ABK 耐性の機序を分析的・酵素学的に検討した。被検菌株より分離した酵素活性画分に acetylCoA, ATP, ABK を添加し 37℃ 24 時間反応させた。この反応液から精製分離された ABK 修飾体の修飾部位を ¹H, ¹³C-NMR で, 修飾様式を質量分析法と赤外分光法で解析した。ABK 感受性 MRSA 由来の粗酵素液と反応させた ABK においては化学構造に変化がみられなかったが今回使用した ABK 耐性株では, すべて (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl (AHB) 基の 4''' 位のアミノ基のアセチル化による修飾が確認された。酵素による不活化の検討においても, 既報告の ABK 耐性株で見られるリン酸化はみられず, アセチル化のみが確認された。Bioassay と sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行ったところ, 耐性株では AAC (4''') 活性を有する 28 kDa の酵素が確認されたが, 感受性株では確認されなかった。この酵素の N 末端のアミノ酸配列は, AAC (6') -APH (2'') (bifunctional enzyme) の N 末端アミノ酸 30 残基とほぼ完全な homology を示した。以上の結果から, 今回確認された新たな修飾様式を示す 28 kDa の酵素は, 何らかの要因による AAC (6') -APH (2'') の変異体, あるいは分解産物であることが示唆された。

Key words: MRSA, arbekacin, arbekacin-resistance, AAC (4''')

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は, ペニシリン系やセフェム系の他, テトラサイクリン系およびアミノグリコシド (AGs) 系などの各種抗生物質に耐性を示し, それによる感染症が臨床で非常に大きな問題となっている^{1,2)}。本邦では MRSA 感染症に適応を有する初めての薬剤としてアミノグリコシド系抗生物質の arbekacin (ABK) が 1990 年に使用されるようになった³⁾。この ABK は, すでに MRSA が耐性を示すことが確認されている dibekacin (DKB) の 1 位に (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl (AHB) 基を結合させることによって, 不活化酵素による修飾を阻害することを目的とした薬剤である⁴⁾。Fig. 1 にその構造式を示した。しかし, 1994 年に ABK に耐性を示す MRSA が報告⁵⁾され, 他の報告でも全国の臨床分離 MRSA 株の 6~9% に ABK 耐性が確認されている^{6,7)}。AGs の薬剤耐性の生化学的機構には, 薬剤を不活化する酵素の産生, 標的部位 (リボソーム) に対する薬剤親和性低下, 薬剤透過性低下などが考えられている^{8,9)}。このうち *Staphylococcus aureus* における耐性機構については修飾酵素の産生が報告されている^{10,11)}。*S. aureus* の AGs 修飾

酵素には現在まで 4 種類あることが報告^{12~15)}されており, このうちアセチル化を行う修飾酵素は 2 種類^{12,13)}である。1 つは, 分子量 28 kDa で gentamicin (GM) と kanamycin (KM) の 2''-OH のリン酸化を主とし, また 6'-NH₂ のアセチル化活性をも有する酵素である¹²⁾。もう 1 つは, ABK をも修飾するとされている分子量 56 kDa の bifunctional enzyme である^{13,16,17)}。この酵素は, 2'' 位のリン酸化と 6' 位のアセチル化の同時修飾によって ABK を不活化させる。しかし, われわれは本邦における ABK 修飾酵素の分布状況を検討したところ, これまで報告のない ABK 修飾機構を有する MRSA の存在を示唆する成績を得た¹⁸⁾。今回は, その菌株を使用して新しい ABK 修飾機構の化学分析学

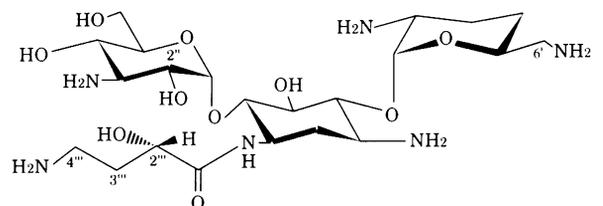


Fig. 1. Chemical structure of arbekacin.

的および修飾酵素について検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

使用菌株は Table 1 に示した。No.1~6 は東北地方の臨床分離株で、いずれも創傷部の膿より分離された ABK 耐性の MRSA である。ただし、No.2 の株は、No.1 の分離患者と同室に入院していた患者分離株であるが、当初は ABK に感受性を示した株を、次項に述べる方法¹⁹⁾によって耐性を獲得させた株である。No.7 の株は PCR のコントロールとして、すでに AAC (6')-APH (2'') の保有が確認されている ABK 耐性 MRSA であり、臨床分離菌サーベイランス研究会 (代表、山口恵三東邦大学教授) より分与を受けた。

2. 耐性獲得試験¹⁹⁾

No.2 の患者から分離され、当初 ABK に感受性を示した MRSA を使用し、ABK の 1 最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC=1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の 1/2 濃度で 37°C 24 時間培養後、生残した菌液を、さらに 24 時間ごとに新しい薬剤希釈系列 (100~0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の倍数希釈) に植え継ぐ操作を繰り返した。MIC の変化を毎回観察して 5 回継代し、最終的に ABK の MIC が 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す耐性株を作成した。

3. 薬剤感受性とコアグラマーゼ型

各菌株に対する抗生物質の MIC は試験管法²⁰⁾にて測定した。なお、MIC 測定に使用した抗生物質の原末は、arbekacin (ABK) と kanamycin (KM) は明治製菓から、gentamicin (GM) と sisomicin (SISO) は日本シェーリングから、minocycline (MINO) は日本レダリーから、vancomycin (VCM) と tobramycin (TOB) は塩野義製薬から、amikacin (AMK) と oxacillin (MIPIC) は萬有製薬から、netilmicin (NTL) は三共から供与を受けたものである。感受性測定に使用した培地は、MIC 測定用 Mueller-Hinton Broth (栄研化学) である。菌株のコアグラマーゼ型の測定は、ブドウ球菌コア

グラマーゼ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い、反応時間を 48 時間として判定した²¹⁾。

4. 修飾酵素の分離

各菌体を L-broth (Bacto Tryptone (Difco) 1%, NaCl 0.5%, 酵母エキス 0.5%) 250 ml に植菌し、37°C で 8 時間振盪培養後、4°C で遠心分離 (3,000 rpm, 20 min) を行い集菌した。菌体を 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) buffer で洗浄後、0.05 M Tris-HCl-10 mM MgCl₂ (pH 7.8) buffer に懸濁し、lysostaphin (SIGMA) を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加培養 (37°C 30 min) して溶菌させた。遠心分離 (30,000 \times g, 30 min) 後の上清を粗酵素液とした^{22,23)}。Sephacryl S-100 column (Pharmacia) を使用した Fast protein liquid chromatography (FPLC) で粗酵素液を分画し、各分画ごとに普通ブイヨン培地 (栄研化学) を加え、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を指示菌として ABK を 1 MIC (0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$) になるように添加した後、37°C で 24 時間培養した。以上の Bioassay による酵素活性画分を採取した。

5. ABK 修飾体の分離精製と同定

4. で採取した各菌株の酵素活性画分 (220 mg protein) に ABK 50 mmol, acetylCoA 0.2 mmol, ATP 0.2 mmol を添加し、37°C で 24 時間反応させた。この反応液を 0.22 μm フィルター (日本ミリポア) で濾過し、その濾液から Sep-Pak (Waters) カラムクロマトグラフィーにより ABK 修飾体画分を分取した。減圧留去後、得られた白色結晶を、内部標準物質として sodium 2,2-dimethyl-1,2-silapentane-5-sulfonate (DSS) を使用した ¹H, ¹³C-nuclear magnetic resonance (NMR: 日本電子) で修飾部位を同定し、また修飾様式の解明には、修飾体の分子量解析として、high-resolution mass spectrometry (MS: 日本電子) およびアセチル基およびリン酸基の存在を確認する方法として Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR: JASCO) の 3 つの方法で分子構造解析を行った。

6. 不活化率測定

前項で得られた粗酵素液を用いて薬剤不活化率を測定した。2 つある薬剤不活化反応系²³⁾のうち、アセチル化系については以下のように検討した。ABK (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.05 ml, 0.02 MATP (SIGMA) 0.05 ml, 0.5 mM acetyl CoA (SIGMA) 0.05 ml, 0.02 M MgAc₂ 0.05 ml, 粗酵素液 0.15 ml および 0.2 M Tris-malate buffer (pH 7.0) 0.15 ml を混合して 37°C で 3 時間反応させた。100°C で 2 分間熱処理を行って反応を停止させ、変性した蛋白を 30,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を用いてカップ法²⁴⁾により ABK の残存力価を測定した。リン酸化系については前述のアセチル化系の検討に準拠したが、acetyl CoA を除去し、MgAc₂ を MgCl₂ に変更して行った。対照としては同様の反応系

Table 1. Bacterial strains

Strain no.	Clinical department	Specimen	Remarks
1	orthopedics	wound/pus	ABK-resistant MRSA
2	orthopedics	decubitus/pus	ABK-resistant MRSA by <i>in vitro</i> study
3	brain surgery	wound/pus	ABK-resistant MRSA
4	brain surgery	wound/pus	ABK-resistant MRSA
5	brain surgery	wound/pus	ABK-resistant MRSA
6	orthopedics	decubitus/pus	ABK-susceptible MRSA
7	respiratory medicine	sputum	ABK-resistant MRSA with bifunctional enzyme (PCR control)

ABK: arbekacin

において、ATP, acetylCoA を除去し、蒸留水を添加して実施した。不活化率は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を混積培養した普通寒天培地 (栄研化学) を用いて、カップにさきの上清を分注し、37°C で 24 時間培養後、発育阻止円の測定により求めた。すなわち、この系における標準曲線をもとに、阻止円直径から残存薬剤量を算出して不活化率を計算した。粗酵素液の蛋白質量は、Lowry 法²⁵⁾に準拠して BCA protein assay (PIERCE) で吸光度を測定し、牛血清アルブミン (BSA; SIGMA) を用いて作成した標準曲線から算出した。

7. 修飾酵素の分子量測定

修飾酵素の分子量測定は以下のように行った。No.1 の菌株から調製した粗酵素液を FPLC で 2 ml ごとに分画し、4. で示した Bioassay による酵素活性画分の分子量は、BSA (MW 67,000), RNase (MW 13,700), vitamin B 12 (MW 1,350) を用いて作成した検量線により測定した。また、粗酵素液の sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) でも分子量の確認を行った。

8. DNA 抽出^{26,27)}

各菌株を Mueller-Hinton broth (栄研化学) で 37°C で 24 時間ずつ培養したものを Eppendorf tube に 1.5 ml ずつ分取し、遠心分離を行って集菌した。これを STET buffer (8% sucrose, 0.5% Triton X, 50 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 400 μ l に懸濁し、lysostaphin (SIGMA) 20 μ g を添加して室温で 3 分間放置した。100°C で 1 分間熱処理後、15,000 rpm で 15 分間遠心分離した。フェノール/クロロホルムで処理した後、エタノール沈殿させてから 70% エタノールで洗浄し凍結乾燥させた。さらにこれを TE buffer 50 μ l に溶解した。

9. オリゴヌクレオチドプライマーの作製

Bifunctional enzyme 遺伝子 (*aacA-aphD*) の増幅用 primer (5' primer: 5' CATTATACAGAGCCTTGG-

GA-3', 3' primer: 5'-CTGTATAATCTAAACCGTGC-3') を DNA 合成装置 (Bio-search) にて作製した。これを用いて *aacA-aphD* の一部を polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。これらの 2 つの primer で増幅される DNA 断片の長さは 802 bp である。また菌体からの DNA 抽出の確認として、すでに報告された²⁸⁾ *gyrA* (*gyrA*) の遺伝子を primer のセットで増幅した (増幅 DNA 断片の長さは 493 bp)。

10. PCR

PCR の反応組成液は次の通りである。

1 μ l DNA 抽出液, 10 \times PCR 緩衝液 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂) 終濃度 1 \times , 2.5 mM dNTP, 1 μ M 各 primer のセット, 0.25 単位 Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)。PCR は Thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus) を用いて 94°C 1 分, 55°C 2 分, 72°C 3 分のサイクルを 25 回繰り返して行った。得られた PCR 産物は 1.2% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色で確認した。

11. AAC (4ⁱⁱⁱ) 活性を有する酵素のアミノ酸配列

No.1 株の粗酵素液を SDS-PAGE にかけて蛋白を分離した。泳動後、クーマシーブリリアントブルーで染色を行い、PVDF 膜 (日本ミリポア) に転写した後、28 kDa のバンドについて、N 末端アミノ酸 30 残基の配列を全自動アミノ酸シーケンサー (PE Applied Biosystem) にかけて、そのアミノ酸配列を Edman 分解法で決定した。

II. 結 果

1. MIC とコアグララーゼ型

被検菌株の各種抗生物質に対する MIC を Table 2 に示した。耐性菌の ABK の MIC は、6.25 から 25 μ g/ml の中等度耐性を示し、KM と TOB に対しては高度耐性を示した。またコアグララーゼ型はすべて II 型であった。

2. ABK 修飾体の解析

Table 2. MIC (μ g/ml) of antibiotics against clinical isolates of MRSA

Strain no.	ABK	GM	KM	TOB	AMK	SISO	NTL	MINO	VCM	MPIPC
1	12.5	50	>100	>100	25	12.5	25	0.78	0.78	50
2	25	50	>100	>100	50	25	25	0.78	0.78	100
3	12.5	50	>100	>100	50	12.5	25	6.25	0.78	100
4	12.5	25	>100	>100	50	12.5	12.5	0.78	0.78	100
5	6.25	6.25	>100	>100	50	12.5	12.5	0.78	0.78	50
6	0.78	25	>100	>100	50	25	25	0.78	0.78	100

No. 1, No. 3-5: clinical isolates of ABK-resistant MRSA

No. 2: *in vitro* ABK-resistant MRSA

No. 6: ABK-susceptible MRSA

ABK: arbekacin, GM: gentamicin, KM: kanamycin, TOB: tobramycin, AMK: amikacin, SISO: sisomicin, NTL: netilmicin,

MINO: minocycline, VCM: vancomycin, MPIPC: oxacillin

$^1\text{H-NMR}$ の解析結果をTable 3に示した。耐性株ではアセチル基の存在を示す2.21 ppmに化学シフトがすべてに確認されたが、感受性株では確認されなかった。2''と6'位は耐性株(No.1~5)と感受性株(No.6)の双方とも化学シフトに変化が見られなかった。しかし、耐性株においてはAHB基の2''', 3''', 4'''位のプロトンが低磁場側に0.2~0.3 ppmシフトしていた。 $^{13}\text{C-NMR}$ 解析においてもAHB基の2''', 3''', 4'''位のカーボンシグナルが高磁場側にシフトしており $^1\text{H-NMR}$ の結果を指示する成績であった(Table 4)。MSではABK(MW 552)のmonoacetyl体の存在を示す分子量(594)のピークが確認されたが、リン酸化体(633)とリン酸化+アセチル化体(675)のピークは確認されなかった。FT-IRにおいては、耐性菌においてのみアセチル基のカルボニルの存在と考えられる $1,650\text{ cm}^{-1}$ の赤外吸収スペクトルが確認された。しかしリン酸エステルの赤外吸収スペクトル($1,230\sim 1,260\text{ cm}^{-1}$)は被検菌株6株すべてに確認されなかった。耐性株(No.1~5)ではMSとFT-IRによりリン酸基の存在が確認されず、つまりリン酸化ではなくアセチル化によりABKが修飾され、NMRでは近藤らが報告¹⁶⁾した2''と

6'位の化学修飾は見られず、直鎖であるAHB基の2''', 3''', 4'''位に変化がみられたことから4'''位のアミノ基にアセチル基が化学結合したと考えられた。

3. 修飾酵素によるABK不活化率

得られた修飾酵素によるABKの不活化率をカップ法で測定した結果をTable 5に示した。No.1~5の耐性株では、アセチル化酵素系では阻止円直径の減少が見られてABKの不活化が確認されたが、リン酸化の系では阻止円直径に変化が見られなかった。阻止円直径から算出されたアセチル化系での不活化率は、No.1とNo.2では40~60%、No.3~No.5では21~29%であった。

4. 修飾酵素の分子量

Bioassayにより確認された活性画分は、Void volume (Vo) から48分(fraction No.13)に確認され、FPLCの溶出曲線(Fig. 2)の最大ピークと一致し、その分子量は28 kDaであった。

SDS-PAGEにおいては、No.1~5には28 kDa付近に酵素の存在を示すバンドが確認されたが、対照のNo.6では確認されなかった(Fig. 3)。

5. PCR

Fig. 4に*aacA-aphD* (bifunctional enzyme 遺伝子)と*gyrA* 遺伝子についてのPCRの結果を示した。被検菌株すべてにおいて*gyrA* 遺伝子(493 bp)のDNA fragmentが増幅された。またABK耐性のNo.1~5とコントロールとして用いたNo.7 (bifunctional enzyme 保有株)ではbifunctional enzyme 遺伝子(802 bp)が増幅されたが、No.6 (ABK感受性株)では確認されなかった。

6. 修飾酵素のアミノ酸配列

28 kDaの蛋白のN末端アミノ酸配列をFig. 5に示した。決定されたアミノ酸残基については、56 kDaの分子量がすでに確認されているbifunctional enzymeと完全なhomologyを示すことが確認された。

Table 3. $^1\text{H-NMR}$ spectral data

Strain no.	Chemical shifts δ : ppm (from dss in D_2O at 400 MHz)			
	$-\text{NCOCH}_3$	2''-CHOH	6'- CH_2NH_2	4''- CH_2CH_2
1	2.21 s	3.71 dd	3.10 dd 3.25 dd	3.47 t
2	2.21 s	3.72 dd	3.07 dd 3.22 dd	3.47 t
3	2.21 s	3.71 dd	3.10 dd 3.25 dd	3.47 t
4	2.21 s	3.71 dd	3.07 dd 3.20 dd	3.47 t
5	2.21 s	3.71 dd	3.07 dd 3.22 dd	3.46 t
6	-	3.74 dd	3.02 dd 3.21 dd	3.17 t

Abbreviations: s: singlet, dd: double double, t: triplet

Table 4. $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data

Strain no.	Chemical shifts δ : ppm (from DSS in D_2O at 400 MHz)				
	$-\text{NCOCH}_3$	$-\text{NCOCH}_3$	2''-CHOH	3''- CH_2	4''- CH_2NH_2
1	177.0 s	22.7 q	67.8 d	29.5 t	35.2 t
2	177.0 s	22.7 q	67.9 d	29.5 t	35.2 t
3	177.0 s	22.7 q	67.8 d	29.5 t	35.2 t
4	177.0 s	22.7 q	67.9 d	29.5 t	35.1 t
5	177.0 s	22.7 q	67.9 d	29.6 t	35.3 t
6	-	-	70.3 d	31.6 t	37.7 t

Abbreviations: s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet

Table 5. Diameter of growth inhibitory zone and inactivation ratio of arbekacin by acetylation

Strain no.	Diameter (mm)			Inactivation ratio (%)
	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	
1	15.2	19.9	19.9	40
2	12.6	19.9	20	61
3	17.5	19.8	19.8	21
4	16.7	19.8	19.8	28
5	16.6	19.8	19.9	29
6	19.9	20	20	0

¹⁾Reaction mixture for determination of the acetylation ratio

²⁾Reaction mixture for determination of the phosphorylation ratio

³⁾Reference without reaction mixture

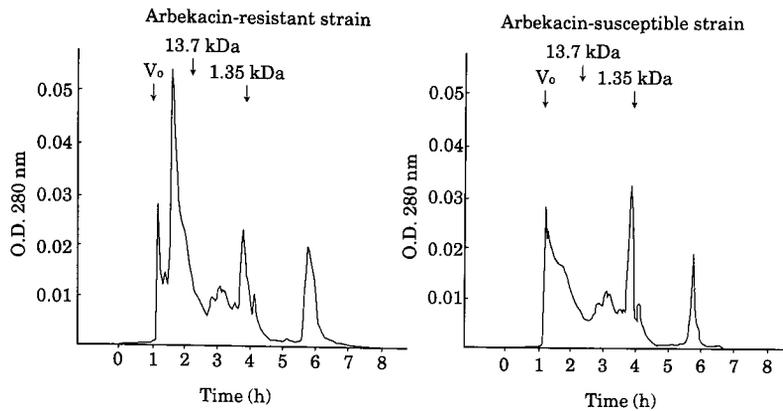


Fig. 2. Elution profile of crude enzyme solution by FPLC. 13.7 kDa: RNaseA, 1.35 kDa: Vitamin B 12. The peak at 1.8 h indicates an enzyme (28 kDa; AAC (4^{'''}) activity) from ABK-resistant strain. Column, Sephacryl S-100 (16×600 mm); Flow rate, 0.5 ml/min; Eluent, 50 mM dibasic sodium phosphate and 0.15 M sodium chloride.

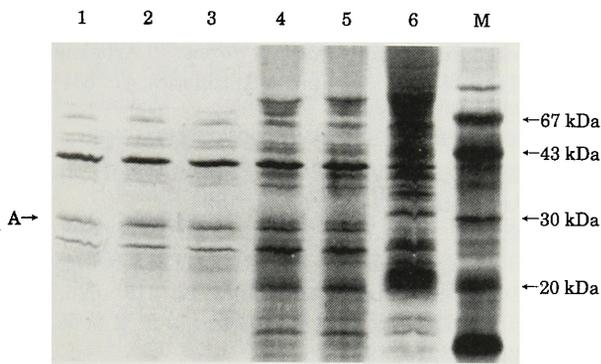


Fig. 3. Silver-stained SDS-PAGE of crude enzyme solution. Lane No.1, 3-5, arbekacin (ABK)-resistant MRSA; No.2, *in vitro* ABK-resistant MRSA; No.6, ABK-susceptible MRSA. Molecular weight of A is 28 kDa.

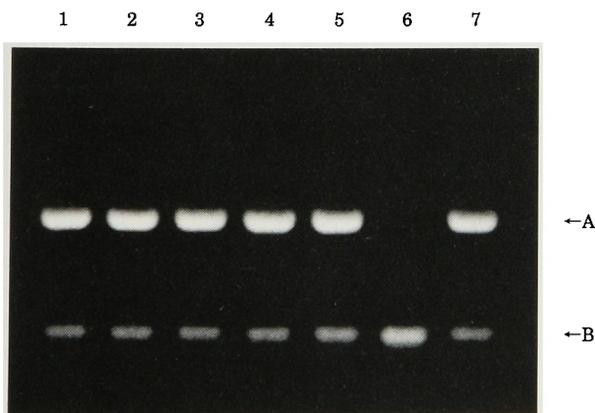


Fig. 4. Agarose gel analysis of PCR products after amplification. Lane. 1-5, strain No.1-5 (arbekacin (ABK)-resistant MRSA); 6, strain No.6 (ABK-susceptible MRSA); 7, strain No.7 (Bifunctional enzyme produce MRSA). A (802 bp), Bifunctional enzyme gene; B (493 bp), *gyrA* gene.

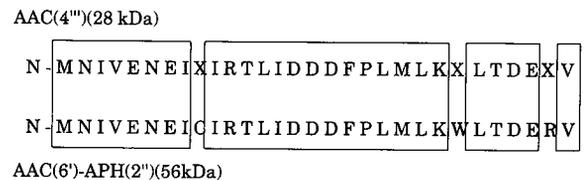


Fig. 5. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of enzyme (28 kDa) with AAC (6['])-APH (2[']) homologs. The boxed residues indicates an identified amino acid.

III. 考 察

S. aureus の保有する AAC は現在まで 2 種類報告されている。1 つは分子量 28 kDa の蛋白質で、GM と KM の 2[']-OH のリン酸化と 6[']-NH₂ のアセチル化活性を有する酵素¹²⁾である。もう 1 つは MRSA 由来の ABK 不活化に関与する分子量 56 kDa の bifunctional enzyme¹³⁾であり、2[']-OH のリン酸化と 6[']-NH₂ のアセチル化修飾により ABK を不活化する。しかし、今回の検討からはそれ以外の部位を修飾する酵素の存在することが初めて明らかになった。この酵素は ABK の 4^{'''} 位をアセチル化する性質を有することを確認した。この AAC (4^{'''}) 活性を有する 28 kDa の酵素は、ABK と同様に AHB 基を有する amikacin (AMK) の同じ 4^{'''} 位を同様にアセチル化修飾するが、AHB 基を有しない GM においては 6['] 位のみをアセチル化修飾することを確認している (投稿中)。

PCR とアミノ酸シーケンスの結果から、この酵素は、これまで報告のない類似酵素である可能性があるが、一方で Le Goffic ら¹²⁾が報告した酵素と分子量が同一であることから、この酵素が、何らかの影響によりリン酸化能を欠落させ、6['] 位活性を有しながら AHB 基の 4^{'''} 位に基質特異性を有する酵素活性に変異

したものとも考えられる。また、既知のABK不活化作用を有する bifunctional enzyme (分子量 56 kDa) の蛋白質分解産物である可能性も考えられた。すなわち、蛋白質の分子量が約半分になっていることから bifunctional enzyme 遺伝子のアセチル化活性部位を含んだ領域で terminator codon になるような mutation が起こり、すべての領域が translation されず、低分子蛋白質になる translational disregulation の可能性が考えられた。

なお、全国で分離された ABK 耐性 MRSA 51 株を用いて修飾様式の検討を行ったところ、45 株では従来から報告されている分子量 56 kDa の bifunctional enzyme による修飾が確認されたが、東北地方の分離 5 株中 4 株と北海道地方の分離 3 株中 2 株の計 6 株においては今回の新しい AAC (4'') を確認した¹⁸⁾。まだ少数での検討ではあるが、不活化酵素の分布に地域差が存在することも考えられ、今後の検討課題である。

今回使用した菌株の臨床背景について検討すると、由来検体はいずれも整形外科および、脳外科の病棟に長期入院していた患者の手術創部の膿であった。No.1 の患者は手術創部膿の MRSA の除菌を目的とした ABK の長期外用投与例であり、No.2 は No.1 の患者と同室に在室した患者の褥瘡部膿から分離した株であるが、この患者では ABK を使用していなかった。しかし今回の検討では、試験管内で耐性を獲得させたこの No.2 の株においては AAC (4'') 活性の存在することが確認された。その理由としては、No.2 の患者では、No.1 の患者から分離されていた耐性のコロニーが少数感染していたものの、ABK が投与されていなかったためにこのコロニーが増殖せず、もっぱら感受性コロニーが増殖していたものと考えられる。

ABK の投与適応は、MRSA 感染症に対する全身投与 (静脈内投与および筋肉内投与) であるが、実際の臨床では創部膿からの MRSA の除菌を目的とする ABK の外用投与がしばしば見られる。しかし、褥瘡に対する外用投与などの本来の適応から外れた投与方法によって MRSA が耐性を獲得した抗 MRSA 薬も報告されており²⁹⁻³¹⁾、投与方法を厳守すべきと考える。抗生物質の正しい使用方法が守られなければ、今回の検討で確認されたように、これまで報告のなかったような新しい薬剤耐性機構を持つ耐性株が出現するので、ABK に限らず抗生物質の適正使用はきわめて重要である。

本論文は第 44 回日本化学療法学会東日本支部総会に発表し、編集委員会より投稿推薦を受けたものである。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻賜りました東北薬科大学教授廣井邦雄先生、同助教授三上 健

先生、同講師久道周彦先生に厚く御礼申し上げます。

最後に終始ご助力賜りました結核予防会本宮雅吉先生、東北労災病院院長吉永 馨先生に心から感謝致します。

文 献

- 1) Barrett F F, McGehee R F Jr, Finland M: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston city hospital. N. Engl. J. Med. 279: 441~448, 1968
- 2) Klimek J J, Marsik F J, Barflett R C, et al.: Clinical, epidemiologic observation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. Am. J. Med. 61: 340~345, 1976
- 3) 新島端夫: [最新の抗菌薬 XL] Arbekacin. Jpn. J. Antibiotics. 44: 705~717, 1991
- 4) Kondo S, Iinuma K, Yamamoto H, et al.: Syntheses of 1-N-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl) kanamycin B and -3',4 dideoxy-kanamycin B active against kanamycin resistant bacteria. J. Antibiotics. 26: 412~415, 1973
- 5) 鈴木隆男, 藤田欣一, 長町幸雄, 他: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の Arbekacin 耐性菌出現について. Jpn. J. Antibiotics. 47: 634~639, 1994
- 6) 井田孝志, 野々山勝人, 長曾部紀子, 他: 近年分離された MRSA に関する全国的疫学調査. Jpn. J. Antibiotics. 47: 585~594, 1994
- 7) 橋本 一, 井上松久, 林 泉: 1992 年 93 年度日本における黄色ブドウ球菌の型別と薬剤感受性の広域調査. Jpn. J. Antibiotics. 47: 618~626, 1994
- 8) 三橋 進: 薬剤耐性菌の現状. 診療と新薬 17: 3201~3215, 1981
- 9) 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
- 10) Mitsuhashi S: Proposal for a nomenclature for phenotype, genotype and aminoglycoside-aminocyclitol modifying enzymes. Drug-inactivating Enzymes and Antibiotic Resistance. p.115~119, Prague, 1974
- 11) 岡本了一, 大久保豊司: アミノ配糖体耐性 MRSA: 耐性機構の分子遺伝学的研究. 日本臨床 50: 1036~1041, 1992
- 12) Le Goffic F, Martel A, Moreau N, et al.: 2''-O-Phosphorylation of gentamicin components by a *Staphylococcus aureus* strain carrying a plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. 12: 26~30, 1977
- 13) Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A et al.: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzyme from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 754~759, 1984
- 14) Santanam P, Kayser F H: Enzymatic adenylation by aminoglycoside 4'-adenylyltransferase and 2''-adenylyltransferase as a means of determining concentrations of aminoglycoside antibiotics in serum. Antimicrob. Agents Chemother. 10: 664~667, 1978
- 15) Kawabe H, Mitsuhashi S: Inactivation of dihydro-

- treptomycin by *Staphylococcus aureus*. Jpn.J.Microbiol. 15: 545~548, 1971
- 16) Kondo S, Tamura A, Gomi S, et al.: Structure of enzymatically modified products of arbekacin by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antibiotics. 46: 310~315, 1994
 - 17) Vanhoof R, Godard C, Content J, et al.: Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. J. Med. Microbiol. 41: 282~290, 1994
 - 18) 藤村 茂, 貫和敏博, 久道周彦, 他: 本邦における Arbekacin (ABK) 耐性 *Staphylococcus aureus* の ABK 修飾酵素の分布状況。化学療法の領域 14: 100~104, 1998
 - 19) 青木泰子, 柏木平八郎: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 院内感染における医療従事者鼻腔保有株の意義に関する検討。感染症学雑誌 64: 549~556, 1990
 - 20) 坂崎利一: 試験管法。図解臨床細菌検査 (坂崎利一編), p.102~105, 文光堂, 東京, 1989
 - 21) 寺山 武: 黄色ブドウ球菌のコアグラエゼ型別。臨床と微生物 15: 10~15, 1988
 - 22) Haas M J, John E D: Aminoglycosidemodifying enzymes. Methods in enzymology 43: 611~628, 1975
 - 23) 日本細菌学会教育委員会: R プラスミドの分子遺伝学的実験法。細菌学技術叢書4, p.34~39, 菜根出版, 東京, 1983
 - 24) 深沢義村, 鈴木益子, 篠田孝子: 抗生物質の力価測定法。微生物学実習書第二版, p.103~112, 廣川書店, 東京, 1985
 - 25) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
 - 26) Tokue Y, Shoji S, Satoh K, et al.: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using polymerase chain reaction amplification. Tohoku J. Exp. Med. 163: 31~37, 1991
 - 27) Tokue Y, Shoji S, Satoh K, et al.: Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 6~9, 1992
 - 28) Sreedharan S, Peterson L R, Fisher L M: Ciprofloxacin resistance in coagulase-positive and-negative Staphylococci: Role of mutations at Serin 84 in the DNA gyrase A protein of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 2151~2154, 1991
 - 29) Baird D, Coia J: Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2: 387~388, 1987
 - 30) Rahman M, Noble W C, Cookson B: Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2: 387, 1987
 - 31) Smith G E, Kennedy C T C: *Staphylococcus aureus* resistant to mupirocin. J. Antimicrob. Chemother. 21: 141~142, 1988

Inactivation of arbekacin by aminoglycoside-modifying enzymes from arbekacin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Shigeru Fujimura^{1,2)}, Yutaka Tokue²⁾, Hiroshi Takahashi²⁾,
Toshihiro Nukiwa²⁾ and Akira Watanabe²⁾

¹⁾School of Nursing, Miyagi University, 1 Gakuen, Taiwa-cho, Miyagi pref., 981-3298, Japan

²⁾Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Division of Cancer Control, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

A novel pathway of arbekacin (ABK) acetylation was found in four ABK-resistant clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as well as one strain of MRSA that had acquired resistance to ABK *in vitro*, one strain of ABK-resistant strain of MRSA including the bifunctional AAC (6')-APH (2''), and an ABK-susceptible strain of MRSA. Analysis of the ABK metabolites in suspension cultures of ABK-resistant MRSA by ¹H, ¹³C-nuclear magnetic resonance, high-resolution mass spectrometry and Fourier transform infrared spectrometry detected the (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl (AHB) group in ABK, while only unmetabolized ABK was detected in suspension culture of the ABK-susceptible MRSA. The cell lysate of the ABK-resistant MRSA exhibited only acetylation without phosphorylation. This acetylation activity was attributed to a 28 kDa enzyme detected in all the ABK-resistant but not in ABK-susceptible MRSA by gel permeation chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial cell lysate. This enzyme has AAC (4''') activity. The N-terminal amino acid sequence of this enzyme had proteins which showed a strong similarity (>90 identity over 30 amino acid) to the ABK modifying enzyme AAC (6')-APH (2''). These results suggest that this enzyme is a mutant and/or degradation protein of AAC (6')-APH (2'').