臨床分離肺炎桿菌におけるフルオレセイン酢酸水銀 (FMA) 耐性の誘導と FMA の不活化

Induction of Fluorescein Mercuric Acetate (FMA)-Resistance and Inactivation
of FMA in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*

東京薬科大学第二微生物学教室

河野 恵・荒井 好裕・福田 秀行
大宮 敬一・小原 康治

山梨医科大学第一保健学教室

浅川 美咲・中原 英臣・佐藤 章夫

Megumi Kono, Yoshihiro Arai, Hideyuki Fukuda, Keiichi Ohmiya and Koji O'hara

Department of Microbiology, Tokyo College of Pharmacy, Tokyo

Misaki Asakawa, Hideomi Nakahara and Akio Sato

Department of Environmental Health, Medical University of Yamanashi, Yamanashi

Susceptibility of 63 clinical isolates of *Klebsiella* (*K.*) *pneumoniae* to various metals and antibiotics was determined. Eighteen of them were found to be resistant to both fluorescein mercuric acetate (FMA) and HgCl_2 . It was clear that resistance to FMA of *K. pneumoniae* JK9 was induced by exposure to subinhibitory concentration of FMA and the antibacterial activity of FMA was lost by incubation with FMA resistant strains. It was also suggested that FMA-inactivating enzyme was inductively produced by preincubation with FMA.

This indicates that a new type of FMA-resistance mechanism in *K. pneumoniae* clinically isolated was found out.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Organomercurial compounds, Fluorescein mercuric acetate (FMA), Induction of FMA-resistance, Inactivation of FMA

肺炎桿菌, 有機水銀化合物, フルオレセイン酢酸水銀 (FMA), FMA 耐性の誘導, FMA の不活化

緒 言

現在, 水銀, ヒ素, コバルト, ニッケル等の各種重金属に対する微生物の耐性については多くの報告があり, 総説にもまとめられている¹⁻⁵⁾。我が国においては特に自然界における水銀化合物の構造変化が問題となってきた。

水銀化合物は HgCl_2 等の無機水銀化合物とフェニル酢酸水銀 (PMA), チメロサル (THI), マープロミン (MB), フルオレセイン酢酸水銀 (FMA) などの有機水銀化合物の 2 種類に分類される。

以上の水銀化合物に対して, 有機水銀分解作用をもつ *Pseudomonas* K62 株⁶⁾ や水銀メチル化作用をもつ *Clostridium cochlearium* T2 株⁷⁾ などが分離された。更に,

HgCl₂, PMA, THI の耐性機構が分解、還元、気化によることがすでに明らかにされている^{8,9)}。しかし、FMA, MB の耐性機構に関してはそれら薬剤を分解しないことや気化しないことが報告されているにすぎない¹⁰⁾。

我々は臨床分離肺炎桿菌 *Klebsiella (K.) pneumoniae* JK9 株を主として用い、FMA 耐性機構について若干の新しい知見を得たので報告する。

実験材料と実験方法

1. 使用菌株

臨床分離肺炎桿菌 *K. pneumoniae* のうち耐性菌としては JK9, JK1304, JK1305, JK1306, JK1308, JK1350 株を、感受性菌としては JK66 株を用いた。微生物検定用の菌としては、*Bacillus subtilis* ATCC6633 株を用いた。

2. 使用培地

ミュラーヒントン (MH) 培地、MH 寒天培地は BBL 社のものを、又、微生物検定には普通軟寒天培地（栄研化学株式会社）を用いた。

3. 使用薬剤

HgCl₂, CdCl₂, NaHAsO₄・3H₂O, FMA は和光純薬工業株式会社、MB は明治薬品株式会社、THI は三晃製薬工業株式会社、PMA, テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM) は Sigma 社、カナマイシン (KM), ピペラシリン (PIP) は三共株式会社、セファロリジン (CER) は塩野義製薬株式会社之物を用いた。

4. 実験方法

1) 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会 MIC 測定法¹¹⁾に基づいて行った。即ち、MH 培地を用いた菌の一夜培養液を100倍希釈し、10⁶ cells/ml として各薬剤濃度含有 MH 寒天平板に接種し、18時間、37°Cで培養後、判定した。

2) FMA による50%発育阻止濃度 (ID₅₀) の決定

JK9 又は、JK66 株を MH 培地で一夜培養し、新鮮 MH 培地で600 nm における吸光度 (OD) が0.08になるまで希釈した。この希釈液に種々濃度の FMA を加え、37°Cで振とう培養し、一時間毎に600 nm における OD を測定した。一方、それぞれの株を1/4MIC の FMA 含有培地で前培養し、先と同様に種々濃度の FMA を加え OD を測定し、耐性誘導時の増殖変化を調べた。そして、この値から Treffers の方法¹²⁾によって50%発育阻止濃度 (ID₅₀) を求め耐性誘導時と非誘導時について比較した。

3) FMA 耐性誘導における至適条件の検討

まず、FMA 耐性誘導における FMA 前処理濃度の至

適条件を Kono, M. らの方法¹³⁾に準じて検討した。即ち、JK9 株を振とう培養し、OD 0.3の時に種々濃度の FMA (0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml) を加え、OD 0.7まで振とう培養した。この FMA で前処理された菌を培地で OD 0.08に希釈した後、FMA 濃度を50 µg/ml とし振とう培養した。以後、培養液の OD を一時間毎に測定し、その増殖の最も速いものを耐性誘導における至適 FMA 濃度とした。

また、FMA 耐性誘導における FMA 前処理時間について検討した。即ち、JK9 株を振とう培養し、OD 0.3の時に前述の各濃度の FMA を加え、種々の時間 (0, 5, 20, 30, 60分間)振とう培養した。これを培地で OD 0.08に希釈し、以後は前述の通りに行って一時間毎に OD を測定した。

一方、希薄溶液の短時間処理による耐性誘導現象を明確にするために次の条件で検討を行った。FMA 前処理濃度を1.6 µg/ml 以下とし、前処理時間を 0, 2, 5, 20, 30分とした時は最終添加 FMA 濃度を25 µg/ml とした。

4) HgCl₂ 前処理による各種水銀化合物耐性への影響

JK9 株の HgCl₂ 3.13 µg/ml 含有及び非含有 MH 培地一夜培養液に新鮮培地を加え、OD 0.08になるように希釈した。この希釈液に、FMA 無処理菌の発育を約8時間阻止する薬剤濃度 (HgCl₂ 12.5 µg/ml, PMA0.8 µg/ml, THI0.8 µg/ml, MB400 µg/ml, 又は FMA50 µg/ml) を加え、37°Cで振とう培養し、0.5時間毎に OD を測定した。

5) FMA 抗菌力の測定

JK9 株、JK66 株の FMA 12.5 µg/ml 含有、及び非含有 MH 培地一夜培養液 1 ml に新たに FMA 100 µg/ml 含有新鮮培地 1 ml を加え、これを37°Cで培養し、一時間毎に培養液25 µl を滅菌ペーパーディスク (Toyo Paper DISK, size 8 mm dia) にしみこませ、これを *Bacillus subtilis* ATCC6633 株を用いて微生物検定した。

実験結果

1. 薬剤耐性

臨床分離肺炎桿菌の各種重金属および抗生剤耐性を示す株を Table 1 に示した。全63株中、18株は FMA および HgCl₂ に同時に耐性を示した。この FMA, Hg 耐性株は総検査株の28%を占めていた。又、FMA 耐性18株においては特定の抗生剤耐性との関連性は見られなかった (Table 2)。Table 3 は FMA 耐性株中、実験に使用した

Table 1 Drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*.

Drugs	FMA	Hg	As	Cd	TC	CP	SM	KM	CER	PIP
No. of strains	18	18	37	63	7	10	16	9	13	15
Percentage (%)	28	28	59	100	11	16	25	14	21	24

FMA: Fluorescein mercuric acetate 213.5 $\mu\text{g}/\text{disk}$, Hg: HgCl_2 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, As: $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cd: $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TC: Tetracycline 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CP: Chloramphenicol 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SM: Streptomycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, KM: Kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CER: Cephaloridine 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PIP: Piperacillin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 2 Drug resistance in 18 FMA-resistant strains.

Drugs	FMA	Hg	As	Cd	TC	CP	SM	KM	CER	PIP
No. of resistant strains	18	18	15	18	6	8	8	7	10	12
Percentage (%)	100	100	83	100	33	44	44	39	56	67

Table 3 Resistance of *K. pneumoniae* strains to organomercuric and inorganomercuric compounds.

Strains	MICs ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	FMA	MB	PMA	THI	HgCl_2
JK9	200	≥ 1600	6.25	3.13	25
JK1304	100	≥ 1600	3.13	3.13	25
JK1305	100	≥ 1600	3.13	3.13	25
JK1306	100	≥ 1600	3.13	3.13	25
JK1308	100	≥ 1600	1.56	1.56	25
JK1350	100	≥ 1600	3.13	3.13	25
JK66	3.13	12.5	6.25	1.56	1.56

6 株および感受性菌 JK66 株の種々水銀化合物に対する MIC を示した。JK9 株は FMA, MB, HgCl_2 耐性で PMA, THI には感受性であった。

2. 薬剤耐性の誘導

JK9 株の種々濃度 FMA 含有培地中での成長曲線を調べた。データには示していないが、JK9 株は FMA 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度以下の含有培地中では薬剤非含有培地の場合とほぼ同じ程度に増殖した。しかし、FMA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中では約 8 時間増殖しないことが分かった。このことから、FMA 耐性誘導に関する FMA の前処理濃度を 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と決めた。そして、種々の濃度の FMA 含有培地中での FMA 前処理菌の増殖曲線と、無処理菌のそれとを比較した。FMA 耐性が誘導された菌の場合は、FMA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中でも増殖が認められた。一方、感受性菌 JK66 株では FMA 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前処理時、無処理時ともいずれも FMA 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中での増殖は認められなかった。これらの結果を ID_{50} 値であらわしたものが Table 4 である。JK9 株の

Table 4 Comparison of ID_{50} values of FMA to *K. pneumoniae* JK9 and JK66 with FMA treatment and without.

Strain	ID_{50} values ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Induction*	
	—	+
JK9	15	100
JK66	2	3

* Pretreatment with 12.5 μg and 1.6 μg of FMA/ml to strain JK9 and JK66, respectively.

ID_{50} は前処理時の方が無処理時より約 7 倍高かった。一方、感受性菌 JK66 株ではほとんど差は見られなかった。

次に、FMA 希薄溶液 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の短時間処理による耐性上昇について検討した (Fig. 1)。この場合は、速やかな耐性上昇を調べるために最終 FMA 濃度を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として行った。その結果、0, 2 分間の FMA 前処理では菌の増殖が FMA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中で 5 時間の

Fig. 1 Bacterial growth in the broth containing 25 μg of FMA/ml after treating bacteria with FMA. *Induction of FMA resistance was carried out by pretreatment with 1.6 μg of FMA/ml.

問みられなかったが、FMA 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で5分間処理することによってFMA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中での増殖が明確に認められた。

JK9株において、 HgCl_2 前処理による他の水銀化合物耐性への影響を調べた。データには示していないが、 HgCl_2 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で前処理した場合、FMA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MB 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は HgCl_2 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地中での増殖が観察され、これら水銀化合物に対して耐性上昇の生じることが明らかとなった。しかしながら、PMA 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ や THI 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地での菌の増殖は見られず、耐性上昇は生じなかった。

3. FMA 耐性菌の FMA 不活化

Fig. 2 に示すように、JK9 株では FMA 無処理の場合は FMA 抗菌力は4時間後に消失した。又、FMA で前処理することにより、一時間以内に FMA の抗菌力が消失した。JK66 株では、6時間後も抗菌力の消失は見られ

なかった。対照として用いた100°Cで10分加熱殺菌したJK9 株の培養液や FMA のみを含有する培地の場合には、その FMA の抗菌力は6時間後も殆ど変化していなかった。従って、FMA 不活化に関しては加熱処理による失活を伴う酵素反応が関係していると考えられる。

又、JK9 株以外の臨床分離 FMA 耐性株5株においても、前述の JK9 株の結果と同様であった。このことは FMA 不活化酵素が誘導的に産出されていることを示唆していた。

考 察

臨床分離肺炎桿菌において、各種重金属、各種抗生剤に対する耐性パターンを調べ、FMA 耐性と HgCl_2 耐性が同時に存在することを確認した。一方、FMA 耐性と抗生剤耐性との間には一定の相関関係は見い出せなかった。

FMA 耐性の6株については、有機水銀化合物に対する MIC を調べた。その結果、FMA、MB に耐性を示したが、PMA、THI には感受性であった。

FMA 前処理による耐性変化について、FMA 耐性の JK9 株では低濃度、短時間の前処理をすることにより、速やかな耐性上昇が見られたが、FMA 感受性の JK66 株では見られなかった。又、耐性上昇時にはより速やかな FMA 不活化が見られた。このような耐性誘導および不活化酵素誘導現象に関しては、ブドウ球菌における薬剤耐性プラスミド支配のペニシリン・ペーダーラクタマーゼ^(14,15)やクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ^(13,16,17)において既によく知られている。従って、JK9 株の FMA 耐性が FMA 前処理により誘導されるとともに FMA 不活化酵素活性も誘導されたことは FMA 耐性誘導遺伝子が存在していることを強く示唆し

Fig. 2 Decrease of antibacterial activity of FMA with *K. pneumoniae* JK9 and the inducibility. *: Induction with 12.5 μg of FMA/ml. Remaining antibacterial activity of FMA in the reaction with bacteria was measured by microbioassay. The concentration of drug was 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in broth. A background decrease of antibacterial activity during reaction with medium and FMA was subtracted from the values obtained.

ている。

JK9株を無機水銀化合物である HgCl_2 で前処理したところ、FMA, MB 耐性は上昇したが、PMA, THI 耐性は変化しなかった。このことは、FMA, MB 耐性と HgCl_2 耐性に関する耐性機構においては何かの共通点をもっていることを示している。この結果と先の MIC の結果は FMA, MB 耐性と PMA, THI 耐性における耐性機構が異なっていることを示唆している。

有機水銀化合物中、FMA, MB 耐性は分解、還元、気化を伴わないとされている。しかし今回の研究結果より JK9 株と FMA を反応させることにより FMA の抗菌力が時間の経過と共に消失することから、FMA 耐性が FMA の抗菌力の低下によっていることが明らかとなった。これは FMA 耐性が FMA 不活化によっていることを示すものである。

又、JK9 株以外の FMA 耐性肺炎桿菌 5 株においても、FMA 耐性が FMA 前処理により誘導されることや FMA 耐性機構が FMA の抗菌力の消失によることがわかった。

以上より *K. pneumoniae* において同じ FMA 耐性を持つ菌が一般的に広まっていることが明らかとなった。

文 献

- 1) 三橋進編, 外村健三: 土壌や汚水から分離した細菌の水銀耐性について, p. 207-218, 学会出版センター, 東京 (1981).
- 2) 三橋進編, 伊崎和夫: 重金属耐性の生化学, p. 219-244, 学会出版センター, 東京 (1981).
- 3) 三橋進編, 中原英臣: 水銀化合物に対する耐性, p. 245-262, 学会出版センター, 東京 (1981).
- 4) Foster, T.J.: Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria, *Microbiological reviews*, **47**, 361-409 (1983).
- 5) 中原英臣, 浅川美咲, 米倉郁美, 佐藤章夫, 大嶋一英, 北村正樹: 臨床分離のプロテウス菌における重金属耐性について, *日衛誌*, **39**, 812-818 (1984).
- 6) Furukawa, K., Suzuki, T. and Tonomura, K.: Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 128-130 (1969).
- 7) Yamada, M. and Tonomura, K.: Formation of methylmercury compounds from inorganic mercury by *Clostridium cochlearium*, *J. Ferment. Technol.*, **50**, 159-166 (1972).
- 8) Komura, I., Funaba, K. and Izaki, K.: Mechanism of mercuric chloride resistance in organisms. NADP-dependent reduction of mercuric chloride and vaporization of mercuric chloride by a multiple drug resistant strain of *Escherichia coli*, *J. Biochem.*, **70**, 895-901 (1971).
- 9) Furukawa, K. and Tonomura, K.: Enzyme system involved in the decomposition of phenyl mercuric acetate by mercury-resistant *Pseudomonas*, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 604-610 (1971).
- 10) Weiss, A.A., Schottel, J.L., Clark, D.L., Beller R. G. and Silver, S.: In "Microbiology-1978" (Editor: D. Schlessinger), p. 121, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C. (1978).
- 11) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について, *日本化学療法学会雑誌*, **26**, 76-79 (1981).
- 12) Treffers, H.P.: The liner representation of dosage-response curves in microbial-antibiotic assays, *J. Bacteriol.*, **72**, 108-114 (1956).
- 13) Kono, M., O'hara, K., Nagawa, M. and Mitsuhashi, S.: Drug resistance of *Staphylococci*. Ability of chloramphenicol related compounds to induce chloramphenicol resistance in *Staphylococcus aureus*, *Jap. J. Microbiol.*, **15**, 219-227 (1971).
- 14) Kono, M. and Sasatsu, M.: Association of penicillin resistance gene with a tetracycline resistance plasmid (pTP-2) in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 706-712 (1976).
- 15) 笹津備規, 小原康治, 早坂 健, 河野 恵: ブドウ球菌のセファゾリン (CEZ) 耐性菌株における β -ラクタメースの関与とセフメタゾール (CMZ) 感受性に関する研究, *Chemotherapy*, **30**, 1313-1318 (1982).
- 16) Kono, M., Ogawa, K. and Mitsuhashi, S.: Drug resistance of staphylococci. VI. Genetic determination for chloramphenicol resistance, *J. Bacteriol.*, **95**: 886-892 (1968).
- 17) Kono, M., O'hara, K., Honda, M. and Mitsuhashi, S.: Induction of chloramphenicol resistance by its derivatives and analogues, *J. Antibiot.*, **22**, 603-607 (1969).

(受付 1985年2月26日)