

胆汁酸の細菌に対する影響

特に抗生物質存在下の胆汁酸適応大腸菌の態度について

松本義孝

北海道大学医学部第二内科(主任:真下啓明教授)

(昭和44年3月31日受付)

緒言

胆汁酸と腸内細菌の関係についての研究は主に生化学者により胆汁酸の代謝過程やその運命についてなされたものがほとんどであり、細菌の側からの研究は未だ未知の分野が多い。また臨床的に胆道感染症を治療する場合には細菌に対する化学療法剤の作用とともに胆汁酸の影響が問題となる。

胆汁酸が細菌にどのような影響を与えるかについては LEIFSON(1935)¹⁾ が Deoxycholate Agar および Deoxycholate-Citrate Agar の開発の研究のなかで Deoxycholate の抗菌作用を報告している。また PORTMAN(1962)^{2,3)} は大腸菌をコール酸含有培地で継代することにより胆汁酸培地で増殖の促進することを認め、これを適応現象と呼んでいる。したがって腸内細菌は腸管内である程度胆汁酸の影響をうけていることが予想される。著者はこの点をさらに追求するため胆道感染症のなかで最も高頻度に検出される大腸菌について、*in vitro* で各種抗生物質に対し胆汁酸の存在下で、どのような態度をとるかについて研究し、あわせて生体内での態度についても考察を加えた。

実験方法

I. 胆汁酸の主として大腸菌に対する影響

1. 胆汁酸の細菌発育抑制作用

ブドウ球菌 209 P, 腸球菌 C-3, 大腸菌 B, 大腸菌 C-43, 大腸菌 NIHJ, 変形菌 OX-19 株を用いて, Sodium cholate “ミノファーゲン製”(C), Sodium Deoxycholate “Difco 製”(DC), Sodium Taurocholate “東京化成”, Sodium glycocholate “東京化成”と牛胆末の最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) を Trypt-Soy Broth “栄研”(T. S. B.) を用いる Tube dilution method で行なった。

2. 胆汁酸継代培養大腸菌作成

大腸菌 C-43 株または NIHJ 株を 0.2, 0.6, 0.8, 1.0% C および 0.01, 0.2% DC 含有 T. S. B. に3代~5代継代培養を行ない、これを胆汁酸継代大腸菌とし、さらにこの大腸菌を C および DC の含有しない T. S. B. に継代しこれをリパース菌として使用した。

3. 生物学的性状

大腸菌 C-43 株を 1% C および DC 含有 T. S. B. に7代継代培養したものと継代しない大腸菌(原株)について TSI 培地, SIM 培地の性状並びにピオテスト “栄研”を用いて. Urea, VP, Mannit, Lactose, Maltose, Sucrose 分解能について検討した。

4. 胆汁酸培地での増殖速度

大腸菌 NIHJ 株を 0.2, 0.6, 0.8, 1.0% C および 0.01, 0.2% DC 含有 T. S. B. に3代と5代継代したものと、継代しない株を 0.2, 0.4, 1.5, 2.0% C および 0.01, 0.2% DC 含有 T. S. B. に接種し、その後の菌数の変動を3時間まで Trypt-Soy Agar “栄研”(T. S. A.) を用いる混釈定量培養とまた5時間まで、uv-vis Spectrophotometer を用いる比濁法(波長 600 m μ)で検討した。

II. 抗生物質の影響について

1. 胆汁酸の抗生物質の抗菌力に及ぼす影響

C, DC, Sodium Taurocholate, Sodium glycocholate の各胆汁酸の MIC 以下の濃度と Aminobenzyl-penicillin(AB-PC), Penicillin G(PC), Cephaloridine(CER), Tetracycline(TC), Chloramphenicol(CP), Kanamycin(KM), Erythromycin-base(EM), Dihydro-Streptomycin(SM) の各抗生物質を併用してブドウ球菌 209 P 株, 腸球菌 C-3 株, 変形菌 OX-19 株, 大腸菌 C-43 株について, T. S. B. を用いる Tube dilution method で行なった。ただし大腸菌 C-43 株は Heart Infusion Agar “栄研”(H. I. A.) を用いる Plate dilution method で行なった。

2. 胆汁酸含有培地継代大腸菌の感受性

H. I. A. を用いる Plate dilution method および T. S. B. を用いる Tube dilution method で 100 mcg/ml から 0.1 mcg/ml まで2倍稀釈で 1% C および 1% DC 継代大腸菌 C-43 の1代から5代まで、ならびにリパース5代までの AB-PC, CER, CP, KM の感受性を検討した。また Tube dilution method で MIC より1段階低い濃度の tube の濁度を uv-vis Spectrophotometer(日立)により比濁法(波長 600 m μ)で測定した。なお接種菌

量は Plate dilution method では T. S. B. にて 24 時間培養液 1 白金耳を接種し, Tube dilution method では 24 時間培養液 10 倍稀釈液 0.1 ml 接種した。なお判定時間は 18 時間培養後に行なつた。

3. 尿および十二指腸液 B 胆汁分離大腸菌の感受性について

昭和 43 年度北大中検で分離された大腸菌のうち, 任意に尿路感染症尿分離株 25 株, 十二指腸液 B 胆汁分離株 14 株を選び H. I. A. を用いる Plate dilution method で 100 mcg/ml より 0.1 mcg/ml まで 2 倍稀釈で CP, CER, AB-PC, KM, Cephaloglycin (CEG), Deoxy-Kanamycin (KNM) の MIC を測定した。

4. *In vitro* での生菌数の変動

a) 抗生物質・胆汁酸存在下の胆汁酸培地継代大腸菌と非継代大腸菌

抗生物質は CP, KM, CER, AB-PC を使用し, 各抗生物質の濃度を 12.5 mcg/ml, C または DC 10 mg/ml を含有する T. S. B. に 0 時点で 10^6 個の菌数になるように大腸菌 C-43 株を接種し恒温振盪培養にて 1, 2, 3, 5 時間の生菌数を T. S. A. を用いる混釈定量培養を行ない算定した。

b) 抗生物質単独存在下の胆汁酸培地継代大腸菌・非継代大腸菌・リパース大腸菌

大腸菌 C-43 株で CP, KM, CER, AB-PC の濃度 12.5 mcg/ml 含有 T. S. B. 培地にて同様の時間について生菌数を算定した。

c) 尿路感染症患者尿分離大腸菌と同一人糞便分離大腸菌についての検討

尿路感染症患者尿分離大腸菌と糞便分離大腸菌にて両者の生菌数の時間的推移の比較を CP, KM, CER, AB-PC にて b) と同じ方法にて検討した。糞便より大腸菌の分離・同定は EMB 培地“栄研”を使用し, コロニーの性状, グラム染色性, 生物学的性状により行なつた。なお両分離大腸菌の血清学的同定は行なっていない。

d) イヌ実験的胆のう炎分離大腸菌についての検討
体重 10 kg 前後の正常なイヌを用いて ARONSOHN 等

の方法^{5,6)}に準じて 5% DC 3 ml と 24 時間 T. S. B. で培養した大腸菌 C-43 株ブイオン培養液 1 ml を経胆管的にピニール・チューブで胆のう内に注入して作製した。なお全経過を通じ無菌操作に注意をはらつた。

術後 5 日目に胆のう内に定着した大腸菌をとり出し, 生菌数の時間的推移を注入前大腸菌 C-43 株 (原株) と比較検討した。なお抗生物質は CP, KM, CER, AB-PC を使用し方法は b) に従つた。

実験成績

I. 胆汁酸の主として大腸菌に対する影響

1. 胆汁酸の細菌発育抑制作用

表 1 に示すとおり, 各種胆汁酸のうちで DC が最も強い抗菌力をしめし, とくに球菌類に対し著明で, 例えばブドウ球菌 209 P 株には 0.064 g/dl, 腸球菌 C-3 株には 0.25 g/dl である。また遊離型胆汁酸のほうが抗菌力が強く, 抱合型胆汁酸では著しく低下する。また牛胆末の抗菌力は抱合型胆汁酸とほぼ同程度であつた。

2. 生物学的性状

使用した大腸菌 C-43 株の生物学的性状は, 表 2 のとおりであり, 7 代胆汁酸含有培地で継代した大腸菌の糖分解等の性状の変化はみられなかつた。

3. 胆汁酸培地での増殖速度

培地中に 0.2% C を含有させて, これに継代した大腸菌 NIHJ 株を 0.4, 1.0, 1.5, 2.0% に C を含む液体培地に接種し, その後の菌数の変化を比濁法にて測定すると, 0.4% 含有培地では C 含有培地に継代した菌は継代しない菌にくらべむしろ発育がおくれるが, 1.0, 1.5, 2.0% C 培地では C 含有培地継代菌のほうが明らかに発育がはやかつた (図 1)。

次に 0.01, 0.2% DC 含有 T. S. B. で 3 代継代と 5 代継代大腸菌 NIHJ 株をそれぞれ 0.01, 0.2% DC 含有液体培地に接種し, その後の菌数の変化を混釈定量培養にて測定すると 5 代継代株の発育が最もはやく, 3 代継代株は非継代株よりやや発育がはやかつた。なお大腸菌接

表 2 Biochemical nature of non-adapted and adapted *E. coli* (C-43)

(1% DC and C 7 times transfer)

bile acid micro-organism	bile acid				bovine bile acid
	C	DC	TC	GC	
<i>Staph. aur.</i> 209 P	0.064	0.064	10>	4>	4>
<i>Enterococcus</i> C-3	15>	0.25	4>	>10	>10
<i>E. coli</i> B	10	4			
" C-43	>15	10			
" MIHJ	>15	10	>10	>10	8
<i>Proteus</i> OX-19	4	4			

	TSI	Indol	Lysin	Urea	VP
non-adapt	A/AG	+	-	-	-
	A/AG	+	-	-	-
	A/AG	+	-	-	-
C-adapt	Man- nit	Lactose		Maltose	
		Lactose		Maltose	
		Lactose		Maltose	
		Lactose		Maltose	
D-adapt	Lactose		Maltose		
	Lactose		Maltose		
	Lactose		Maltose		

図1 Adaptation of *E.coli*(NIHJ) to bile acid (Turbidometric method)

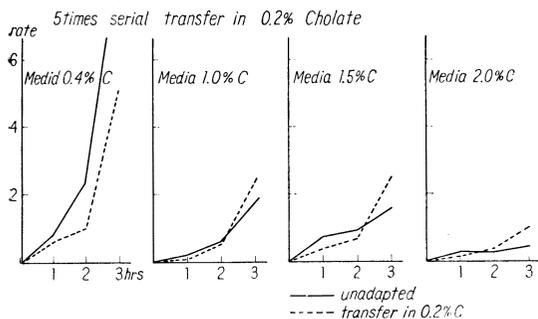


図2 Adaptation of *E.coli*(NIHJ) to bile acid (Plate count method: 0.2% containing T.S.B.)

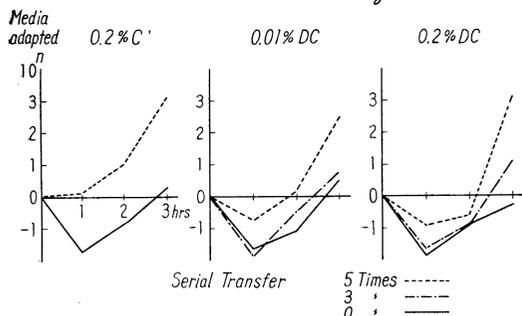
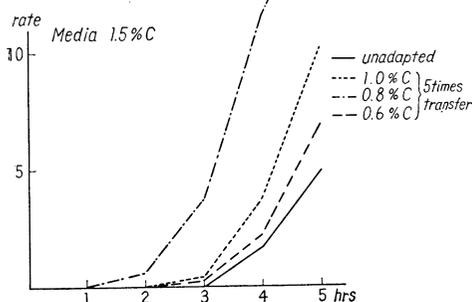


図3 Adaptation of *E.coli*(NIHJ) to cholic acid (Turbidometric method)



種後1時間ですれも生菌数の減少を認めたが5代継代株が最も減少度が少なかった(図2)。

また0.6, 0.8, 1.0% C含有T.S.B.に5代継代した大腸菌 NIHJ 株を1.5% C含有液体培地に接種し、その後の菌数の変化を比濁法で測定すると、いずれの継代株も非継代株より発育がはやかったが、なかでも0.8% C継代株が最も発育がはやかった(図3)。

II. 抗生物質の影響について

1. 胆汁酸の抗生物質の抗菌力に及ぼす影響

ブドウ球菌 209 P 株、腸球菌 C-3 株に対しては PC, EM, TC, CER と著明な併用効果がみられ、例えばブドウ球菌では PC の MIC 0.1 mcg/ml が DC の併用により 0.0015 mcg/ml 以下、CER の MIC 0.1 mcg/ml が

表3 Effect of antibiotic-bile acid combination in strains of *Staph. aur.* and *Enterococcus Staph. aur.* 209 P

antibiotics		PC-G	EM	CER	TC
bile acid	MIC	0.1	0.4	0.1	0.4
	%	0.1	0.4	0.1	0.4
C	0.016	0.1	0.4	0.1	0.4
DC	0.016	0.0015>	0.1	0.0015	0.025>
TC	1	0.006>		0.006	0.1
GC	1	0.05		0.025	0.006

Enterococcus C-3

antibiotics		PC-G	EM	CER	TC
bile acid	MIC	0.1	0.1	0.1	0.4
	%	0.1	0.1	0.1	0.4
C	10	0.006>	0.025>	0.025>	0.1
DC	0.063	0.006>	0.025>	0.025>	0.4
TC	1	0.006>		0.006	0.4
GC	10	0.006>		0.025>	1.6

表4 Effect of antibiotic-bile acid combination in strains of *Proteus vulg.* and *E. coli*

Proteus vulg. OX-19 (mcg/ml)

antibiotics		TC	CP	SM	KM
bile acid	MIC	25	6.4	25	25
	%	25	6.4	25	25
C	1	25	6.4	25	25
DC	1	1.6	0.4	>25	25

(mcg/ml)

antibiotics		CER	KM	AB-PC	CP
bile acid	MIC	3.12	6.25	6.25	12.5
	%	3.12	6.25	6.25	12.5
C	5	1.6	3.12	6.25	12.5
DC	2	1.6	3.12	3.12	6.25

DC の併用で 0.0015 mcg/ml となる。しかも遊離型ばかりでなく抱合型と併用した場合にも抗菌力の上昇は著明であり、例えば腸球菌では PC の MIC 0.1 mcg/ml が Taurocholate の併用で 0.006 mcg/ml 以下、Glycocholate の併用でも 0.006 mcg/ml 以下となる(表3)。しかし変形菌 OX-19 株、大腸菌 C-43 株に対しては胆汁酸との併用による抗菌力の増大はさほど著明ではないが MIC の軽度の低下を示した。例えば変形菌では CP の MIC 6.4 mcg/ml が DC の併用で 0.4 mcg/ml、大腸菌では CER の MIC 3.12 mcg/ml が DC の併用で 1.6 mcg/ml となる(表4)。

2. 胆汁酸含有培地継代大腸菌の感受性

1% C, 1% DC 1代継代から5代継代大腸菌 C-43 株および C, DC のリバース菌5代までの大腸菌の感受性

表 5 Turbidity of *E. coli* (C-43) after 18 hrs' incubation (Turbidimetric method)

antibiotics	(mcg/ml)			
	CER	AB-PC	KM	CP
conc.	3.12	3.12	3.12	6.25
c-adapt V	0.18	0.248	0.138	0.08
non-adapt	0.43	0.59	0.142	0.035

を Plate dilution method で検討すると非継代株(原株)が CP 12.2 mcg/ml, KM 6.25 mcg/ml, CER 3.12 mcg/ml, AB-PC 6.25 mcg/ml であり, 継代およびリバース後も C, DC 継代株ともに同じ MIC をしめし感受性の変化はみられなかつた。また 1% C, 1% DC 5代継代大腸菌の感受性を Tube dilution method で検討すると非継代株が CP 12.5 mcg/ml, KM 6.25 mcg/ml, CER 6.25 mcg/ml, AB-PC 6.25 mcg/ml であり C, DC 5代継代大腸菌の MIC もまた同じであつた。しかし Tube dilution method で tube の濁度の差がみられることから 1% C 5代継代大腸菌について MIC より1段階低い濃度の tube を比濁法で測定すると, 表5のとおり, CER, AB-PC にて濁度に著明な差を認めた。しかし KM, CP ではあまり著明な差が認められなかつた。すなわち 1% C 5代継代大腸菌と非継代大腸菌(原株)では CER, AB-PC にて発育阻止に差がみられ, その影響は 5代継代大腸菌のほうが強かつた。

3. 尿および十二指腸液 B 胆汁分離大腸菌の感受性について

尿路感染症尿分離大腸菌と胆道感染症胆汁分離大腸菌の各種抗生物質の感受性の分布について, 100 mcg/ml

以上の耐性株を除外して, 100 mcg/ml 以下の大腸菌で推計学的に検討すると, CER (P<0.05), KM (P<0.01), KNM (P<0.01), AB-PC (P<0.01) で有意の差がみられたが, CP, CEG では有意の差を認めなかつた。すなわち, 胆道感染症分離大腸菌は CER, KM, KNM, AB-PC の各抗生物質に対して尿路感染症分離大腸菌より MIC が低い傾向にあることが推測された(表6)。

4. *In vitro* での生菌数の変動

a) 抗生物質・胆汁酸存在下の胆汁酸培地継代大腸菌と非継代大腸菌の検討

i CER 12.5 mcg/ml + C 10 mg/ml + 1% C 5代継代菌 CER 12.5 mcg/ml + C 10 mg/ml + 非継代菌

この両者を比較検討すると, C 継代大腸菌の生菌数の減少が非継代大腸菌(原株)にくらべて著明で5時間目に 10² の生菌数の差を認めた(図4)。

ii CER 12.5 mcg/ml + DC 10 mg/ml + 1% DC 5代継代菌

図4 Cephaloridine

Conc. 12.5 mcg/ml + C 10 mg/ml

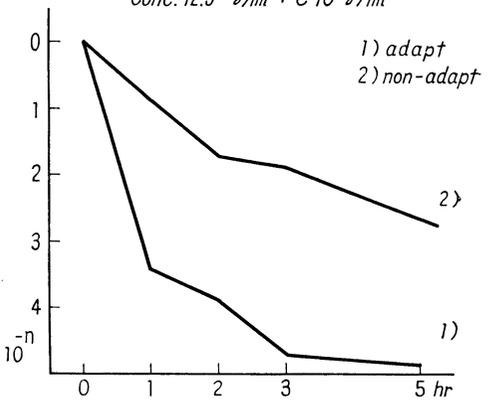


表 6 Susceptibility of *E. coli* isolated from urine and duodenal juice

antibiotics	mcg/ml	>100	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.6	0.8	0.4	0.2	P
CER	D. J.	1			1	1	4	7					P < 0.05
	U.	6	2		4	2	2	9					
CEG	D. J.	1		1	1		5	4	2				
	U.	2	2	2	4	4	7	3		1			
AB-PC	D. J.	2					3	6	2				P < 0.01
	U.	12		2			1	9					
CP	D. J.	3				3	4	4					
	U.	14				4	2	4					
KM	D. J.				1	4		4	2	2			P < 0.01
	U.	5	1		1	3	4	5	3	3		1	
KNM	D. J.					1	3	3	6		1		P < 0.01
	U.	6				2	1	1	9	6			

CER 12.5 mcg/ml + DC 10 mg/ml + 非継代菌
 この場合も DC 継代大腸菌の生菌数の減少が非継代大腸菌にくらべ著明であり、5時間目に 10^2 の生菌数の差を認めた (図 5)。

図5 *Cephaloridine*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml + DC 10^{mg}/ml

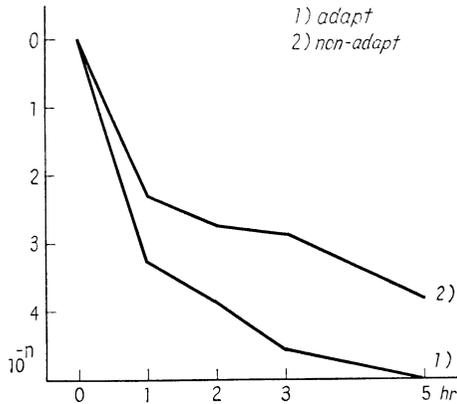


図6 *Ampicillin*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml + C 10^{mg}/ml

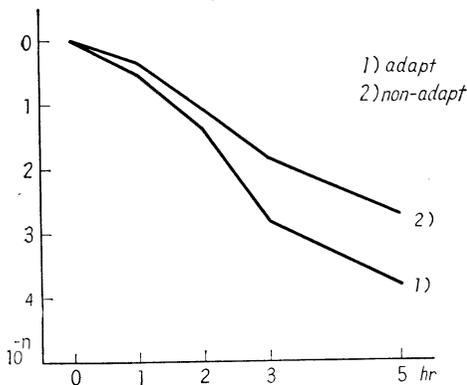
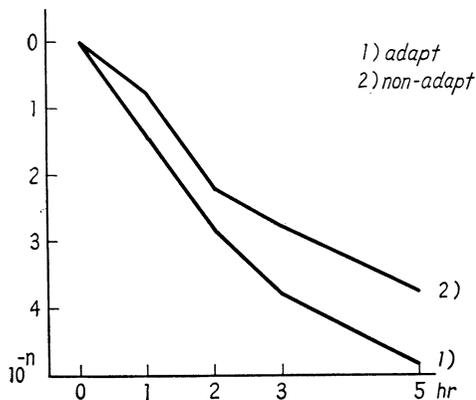


図7 *Ampicillin*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml + DC 10^{mg}/ml



iii AB-PC 12.5 mcg/ml + C 10 mg/ml + 1% C 5 代継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml + C 10 mg/ml + 非継代菌
 この場合も C 継代大腸菌の生菌数の減少が著明で、5時間目に非継代大腸菌にくらべ 10^2 の生菌数の差を認めた (図 6)。

iv AB-PC 12.5 mcg/ml + DC 10 mg/ml + 1% DC 5代継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml + DC 10 mg/ml + 非継代菌
 この場合も DC 継代大腸菌は非継代大腸菌にくらべ生菌数の減少がみられ、5時間目に 10^1 の生菌数の差を認めた (図 7)。

b) 抗生物質単独存在下の胆汁酸培地継代大腸菌・非継代大腸菌・リバーズ菌の検討

図8 *Cephaloridine*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml C-adapt *E. coli*

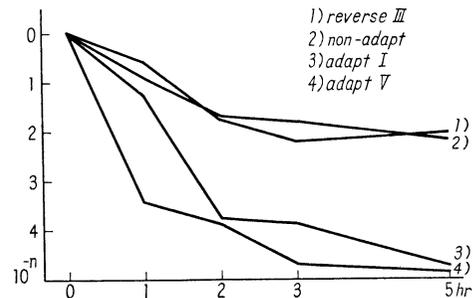


図9 *Cephaloridine*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml D-adapt *E. coli*

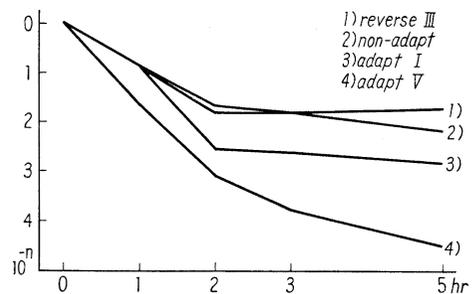
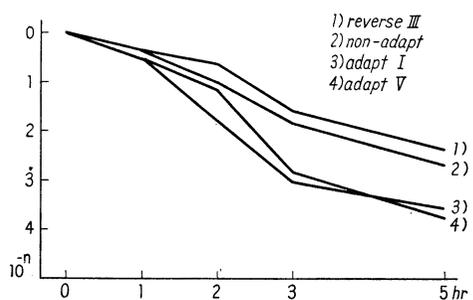


図10 *Ampicillin*
 Conc. 12.5^{mcg}/ml C-adapt *E. coli*



i CER 12.5 mcg/ml+1% C 5代継代菌

CER 12.5 mcg/ml+非継代菌

CER 12.5 mcg/ml+1% C 3代リバーズ菌

この3者について比較検討すると、C継代大腸菌は非継代菌、リバーズ菌にくらべ生菌数の減少が著明で、5時間目に 10^2 の生菌数の差を認めた。また非継代菌は3代リバーズ菌よりも生菌数が減少する傾向がみられた(図8)。

ii CER 12.5 mcg/ml+1% DC 5代継代菌

CER 12.5 mcg/ml+非継代菌

CER 12.5 mcg/ml+1% DC 3代リバーズ菌

この場合もDC継代菌の生菌数の減少が著明であり、5時間目の生菌数は非継代菌、リバーズ菌にくらべ 10^2

の差を認めた。また非継代菌は3代リバーズ菌より生菌数の減少する傾向がみられた(図9)。

iii AB-PC 12.5 mcg/ml+1% C 5代継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml+非継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml+1% C 3代リバーズ菌

C継代大腸菌では非継代大腸菌、リバーズ菌にくらべ生菌数の差を認め、5時間目に 10^1 の生菌数の差がみられた。また非継代菌は3代リバーズ菌より生菌数の減少する傾向がみられた(図10)。

iv AB-PC 12.5 mcg/ml+1% DC 5代継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml+非継代菌

AB-PC 12.5 mcg/ml+1% DC 3代リバーズ菌

図11 Ampicillin
Conc.12.5mcg/ml D-adapt E.coli

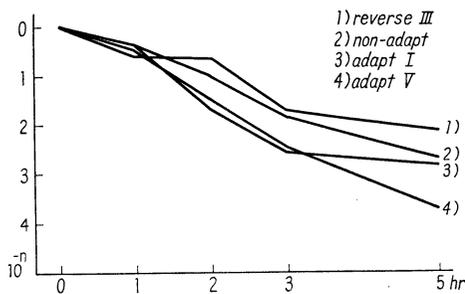


図12 Kanamycin
Conc.12.5mcg/ml C-adapt E.coli

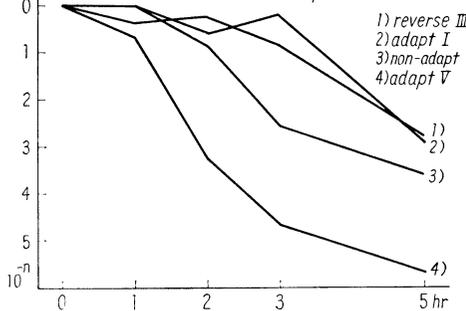


図13 Kanamycin
Conc.12.5mcg/ml D-adapt E.coli

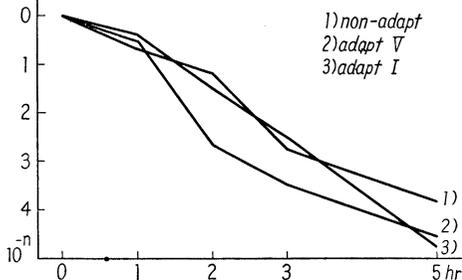


図14 Chloramphenicol
Conc.12.5mcg/ml C-adapt E.coli

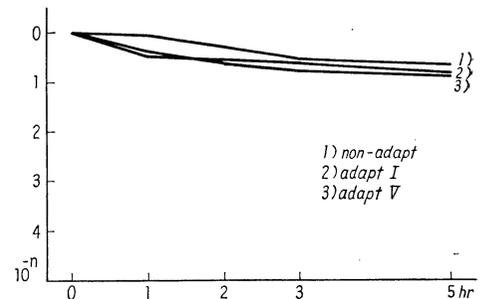


図15 Chloramphenicol
Conc.12.5mcg/ml D-adapt E.coli

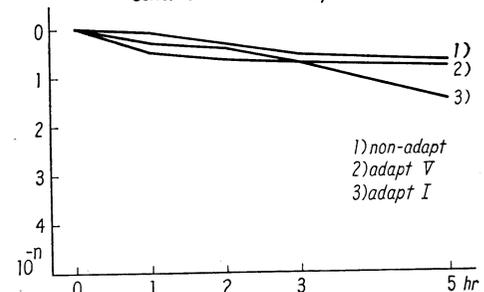
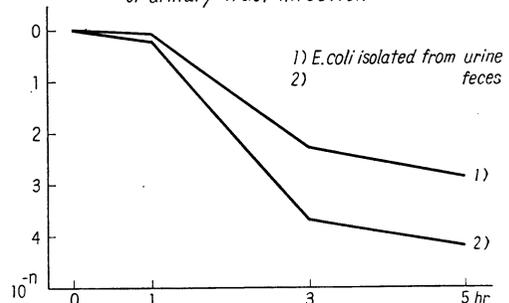


図16 Cephaloridine Conc.12.5mcg/ml
E.coli isolated from urine and feces in patient of urinary tract infection



この場合も DC 継代大腸菌が非継代大腸菌、3代リバース菌にくらべ、5時間目で 10^1 の生菌数の差を認めた。また非継代菌は3代リバース菌より生菌数の減少する傾向がみられた(図 11)。

- v KM 12.5 mcg/ml+1% C 5代継代菌
- KM 12.5 mcg/ml+非継代菌
- KM 12.5 mcg/ml+1% 1C 3代リバース菌

C 継代大腸菌の生菌数の減少は著明で、5時間目の生菌数は非継代大腸菌にくらべて 10^2 、3代リバース菌にくらべて 10^3 の差を認めた。すなわちリバース菌の減少度が一番悪かつた(図 12)。

- vi KM 12.5 mcg/ml+1% DC 5代継代菌
- KM 12.5 mcg/ml+非継代菌

この場合も DC 継代大腸菌が非継代大腸菌にくらべ5時間目で 10^1 の生菌数の差を認めた(図 13)。

- vii CP 12.5 mcg/ml+1% C 5代継代菌
- CP 12.5 mcg/ml+非継代菌

5時間までの生菌数を比較検討すると、C 継代大腸菌と非継代大腸菌の間に生菌数の差を認めなかつた(図 14)。

- viii CP 12.5 mcg/ml+1% DC 5代継代菌
- CP 12.5 mcg/ml+非継代菌

この場合も DC 継代大腸菌と非継代大腸菌の間に生菌数の差を認めなかつた(図 15)。

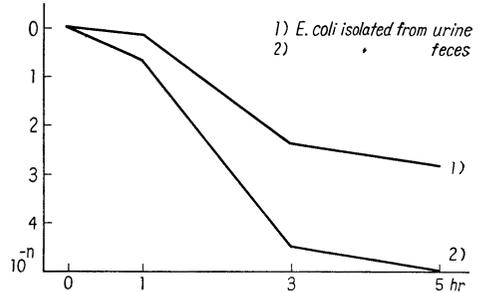
以上の結果から、胆汁酸含有培地5代継代大腸菌は CER で最も生菌数が減少し、次いで AB-PC, KM であり、CP ではほとんど影響をうけない(表 7)。

表 7 Effect of 5 times transfer in bile acid containing media (*E. coli* C-43)

antibiotics	transferred media	tested media	effect
CER	C	1% C	++ ++
	DC	1% DC	++ ++
AB-PC	C	1% C	++ +
	DC	1% C	+ +
KM	C		++
	DC		+
CP	C		-
	DC		-

N. B. ++: decrease in number (10^2)
 +: " (10^1)

図 17 Ampicillin Conc. 12.5 mcg/ml
E. coli isolated from urine and feces in patient of urinary tract infection



c) 尿路感染症患者尿分離大腸菌と同一人糞便分離大腸菌についての検討

尿路感染症患者尿分離大腸菌と同一人糞便分離大腸菌の5時間までの生菌数を測定すると、AB-PC, CER で後者のほうの生菌数の減少が著明である例がみられた(図 16, 図 17)。この例では KM, CP では差がみられなかつた。

d) イヌ実験的胆のう炎分離大腸菌についての検討
 イヌ胆のう炎分離大腸菌 C-43 株と注入前大腸菌 C-43 株(原株)で CER, AB-PC, KM, CP について、5時間までの生菌数の減少について検討したが、いずれも著明な差がみられなかつた。

総括および考案

胆汁が細菌発育に及ぼす影響については、古くから数多く報告があり^{7,8)}、それは胆汁酸に起因するもので選択的発育抑制である。LEIFSON(1935)¹⁾も DC の抗菌作用について詳述しているが、著者の実験でも DC が C にくらべて特に抗菌力が強く、グラム陽性菌群に対しては 1 mg/ml 以下であり、また遊離型が抱合型に比して抗菌力はまさっていた。抗生物質と胆汁酸の併用の結果は、かなり強い協力効果がみられ、球菌に対して著明であり桿菌に対してはそれほど著明ではないが MIC の低下がみられた。

このように胆汁酸には抗菌力があり胆汁中での細菌の発育には不利な点が多いが、一度胆道系に感染を起こした細菌は長期にわたり生存、死滅しないことがしばしばみられる。この場合、肝機能異常、胆汁うっ滞、胆汁成分の変化、胆石の存在等、種々の生体側の条件があると考えられるが、細菌の側からは胆汁酸に対する耐性の獲得ないしは胆汁酸に対する適応が考えられる。この点に関しては DC により大腸菌が DC 耐性を獲得したと考えている報告もある。

いつぼう、PORTMAN(1962)^{2,3)}は培地中に 0.2% C を含有させて、これに継代した大腸菌を 0.01, 0.1,

0.4% に C を含む液体培地に接種しその後の菌数変化を比濁法にて測定すると、C で継代した大腸菌が明らかに発育がはやいと報告し、これを適応現象と呼んでいる。なお大腸菌の他に变形菌、腸球菌、Clostridia についても適応を認めている。著者も 0.2% C 含有培地で継代した大腸菌を 0.4~2.0% に C を含む液体培地に接種し、その後の菌数変化を比濁法で測定すると、0.4% C 含有培地では C 培地に継代した菌は対照菌にくらべむしろ発育がおくれるが、1.0~2.0% C 培地では継代菌のほうが明らかにはやい。この事実から C の含まれる濃度が低い時には著明な差はないが、高濃度の場合には適応が大きい意味をもつと思われる。また DC についても 0.01%, 0.2% の濃度で継代した時にもこの事実を認めた。なおこの現象は胆汁酸との接触をたつと少なくとも 3 代~5 代で消失してしまうが、胆汁酸培地に継代すると容易に復帰する。この点から著者は種々薬剤に対する耐性獲得機構と異なり胆汁酸に対する適応現象と考える。ヒトの正常の胆汁中あるいは肝臓内に細菌を証明する (ANDREWS 1935)¹⁰⁾ ことから、腸内細菌叢は胆汁酸に適応して、この適応した細菌が胆道内に定着する可能性がある。

従来から胆のう症患者胆汁内に異型大腸菌の存在することが知られ^{11,12,13)}、各種胆汁培地および胆汁酸培地での異型菌の発生に関する実験的研究は古くから行なわれ^{9,11,12,13)}、また細菌の核酸に対する影響も研究されている。これに関して飯田¹⁴⁾は大腸菌電子顕微鏡の研究で、発育増殖期における大腸菌体は DC 濃度の高濃度になるに従って細胞壁の融解、原形質の凝塊あるいは逸脱の像が確認され、高濃度の DC 存在下で細胞壁あるいは細胞膜の崩壊を来し、原形質内部の核あるいは核様物質に影響をうけ、その発育が抑制されると云っている。さらに DC の菌発育抑制作用が、SH 基物質により阻害されること等から、DC による大腸菌体中の核酸に対する影響について研究され RNA, DNA の減少、とくに RNA の顕著に減少することが報告されている。

著者はこれらの適応大腸菌の糖分解等の生物学的性状の変化について検討したが、他の報告⁹⁾と同様に変化がみられなかつた。

以上の事実から、胆汁酸含有培地で継代した大腸菌、すなわち適応現象を得た大腸菌は抗生物質による影響が非適応大腸菌と相違することが予想される。この点を検討するため、胆汁酸適応大腸菌、非適応大腸菌で *in vitro* での生菌数の減少を 5 時間まで CP, KM, CER, AB-PC を用いて検討した。その結果は C, DC 適応大腸菌は共に、CP 以外の抗生物質で非適応菌にくらべ 5 時間で $10^1 \sim 10^2$ の生菌数の減少を認めた。また 1% C および

1% DC 含有培地を使用して、胆汁に類似した環境での検討を行なつたが、AB-PC, CER では適応菌が非適応菌よりも 5 時間で生菌数の減少することを認めた。このように適応菌は抗生物質の作用をうけ易いことが判明した。

抗生物質はその種類により作用機序が異なり、AB-PC, CER は共に細胞壁ムコペプチド合成障害剤として働き、KM, CP は蛋白合成障害剤として働く。すなわち、KM はとくにリボソームによる蛋白合成障害をおこし、CP は蛋白を合成するリボソームの形成を阻害する^{15,16)}。しかし胆汁酸の細菌に対する作用機序は未だほとんど解明されていないが、電顕所見から細胞壁に影響を及ぼすと考えられ、このように胆汁酸と併用した場合抗生物質の作用がどのように modify されるかについても全く不明であるが、すくなくとも薬剤の菌体への透過性の亢進するところが考えられる。この問題はなお今後検討されなければならない問題である。

また胆汁酸適応菌の抗生物質に対する感受性は、Plate dilution method, Tube dilution method とともに非適応菌にくらべ変化はみられなかつたが、MIC より 1 段階低い濃度で CER, AB-PC にて濁度に差を認めたことは、弱いながらも感受性に差をしめしたと考える。

次に尿および十二指腸液 B 胆汁分離大腸菌について、CP, CER, CEG, KM, KNM, AB-PC の各抗生物質で感受性の分布について検討したが、この場合 100 mcg/ml 以上の株については抗生物質の作用機序が異なると考えられる¹⁷⁾から除外して、100 mcg/ml 以下について推計学的に考察すると、CP, CEG を除いた他の抗生物質でいずれも有意の差 (CER は $P < 0.05$, AB-PC, KM, KNM は $P < 0.01$) を認め一般に胆道感染症分離大腸菌の抗生物質感受性が尿路感染症分離大腸菌にくらべ上昇していることが推測される。

以上の事実から、*in vivo* の実験のモデルの 1 つとして、尿路感染症患者尿分離大腸菌と同一人糞便分離菌について、各抗生物質で 5 時間までの生菌数の減少を検討した。糞便分離大腸菌はある程度胆汁酸に適応を得ていると考えられ、この場合も図 16, 17 にしめすように明らかに *in vitro* と同様の成績をしめた例がみられた。しかしながらこの場合、胆汁酸は Entero-hepatic circulation で大部分再吸収されること、正常人では Ileocecal valve より上部、すくなくとも上部小腸には大腸菌が存在しないこと^{19,20)}、2 次胆汁酸は糞便中に排泄される量がすくないこと¹⁸⁾など *in vitro* とは異なる条件であるため必ずしもこういう事実の認め難い例もみられた。

さらに生体内において *in vitro* と同様の適応現象が

予想されることから、正常なイヌ胆のう内に胆汁酸とともに大腸菌を接種して5日後にとり出し、原株と抗生物質による生菌数の差を比較検討したが著明な差を認め得なかつた。しかしながら *in vivo* では胆汁内の胆汁酸の種類・濃度、適応させる期間および炎症巣の状態、たとえば閉塞などによる胆汁の流入流出障害など、*in vitro* と異なる条件もあると考えられ、さらにとり出した大腸菌を24時間胆汁酸を含有しない培地で増菌するためリバースしたこととなり適応がとれてしまう可能性があり、この点はなお検討する必要がある。またこのようなことは選択培地、分離培地、増菌培地を用いて胆道分離菌の感受性を検討する場合、胆汁酸を含有しない培地で継代することになり適応がとれてしまい、生体内での真の感受性より低い感受性をしめす可能性を暗示する。

以上のような事実は胆道感染症、腸管感染症の化学療法をおこなう場合影響を与えられ、ことに胆汁中に高濃度に排泄され、しかも細菌の細胞壁に作用する抗生物質の使用がすぐれた治療になると考える。

結 論

- 1) 大腸菌の Cholate, Deoxycholate に対する適応現象を確認した。
 - 2) 適応菌の生物学的性状の変化は認めなかつた。
 - 3) 適応菌、リバース菌の感受性の変化はほとんどみられなかつた。
 - 4) 尿路感染症患者尿分離大腸菌と胆道感染症患者胆汁分離大腸菌では CER, AB-PC, KM, KNM で感受性の分布に推計学的に有意の差を認めた。
 - 5) *In vitro* で適応大腸菌は非適応菌、リバース菌にくらべ CER, AB-PC, KM に対して生菌数の減少が著明であり、CP では認められなかつた。
 - 6) 尿路感染症患者で糞便分離大腸菌が尿分離大腸菌よりも抗生物質による生菌数の減少が著明な例がみられた。
- 御指導御校閲をたまわつた真下教授に深謝致しますとともに教室員各位の御協力に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) LEIFSON, E. : New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Patho. Bact.* 40 : 581~599, 1935
- 2) PORTMAN, O. W., S. SHACH, A. ANTONIS & B. JORGENSEN : Alteration of bile salts by bac-

- teria. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 109 : 959~965, 1962
- 3) PORTMAN, O. W. : Importance of diet, species, and intestinal flora in bile acid metabolism. *Fed. Proc.* 21 : 896~902, 1962
- 4) 真下啓明, 他 : 胆道感染症。治療 47 : 1061~1075, 1965
- 5) ARONSOHN, H. G. & E. ANDREWS : Experimental cholecystitis. *Surg. Gyne. & Obst.* 66 : 748~768, 1938
- 6) 小島愛司 : 実験的胆嚢炎に関する研究。Chemo-therapy 15 : 549~559, 1967
- 7) CONRADI, H. : Ueber Zuchtung von Typhusbazillen aus dem Blut Mittel der Gallenkultur. *Münch. Med. Wochenshr.* 34 : 1654~1655, 1906
- 8) KAYSER, H. : Ueber die einfache Gallenröhre als Anreicherungsmittel und die Bakteriologie des Blutes bei Typhus sowie Paratyphus. *Münch. Med. Wochenshr.* 34 : 823~826, 1906
- 9) 小玉益生 : 人胆汁内大腸菌変異に関する実験的研究。福岡医学雑誌 53 : 641~657, 1962
- 10) ANDREWS, E. : Bacteriology of normal and diseased gallenbladders. *Arch. Int. Med.* 56 : 1171~1188, 1935
- 11) 問田亮次 : 胆汁の無菌問題並に滅菌力について。日外会誌 14 : 119~121, 1913
- 12) 横田秀策 : 胆石症の腸管内細菌に関する臨床的並に実験的研究。福岡医科大学雑誌 20 : 42~87, 1927
- 13) 清水民之助 : 経皮的穿刺胆汁所見から見た胆道炎症の手術適応について。日外会誌 58 : 1097~1110, 1957
- 14) 飯田安彦 : 胆石症の研究。特に胆汁中胆汁酸と細菌の胆道感染に関する臨床的並に実験的研究。日消誌 62 : 24~56, 1965
- 15) CARTER, W. & K. S. MC CARTY : Molecular mechanism of antibiotic action. *Ann. Int. Med.* 64 : 1087~1113, 1966
- 16) 田中信男 : 抗生物質の作用機序。医学のあゆみ 56 : 274~284, 1966
- 17) 横田 健 : 耐性化の生化学的機構。医学のあゆみ 56 : 374~385, 1966
- 18) BERGSTRÖM, S. : Metabolism of bile acids. *Fed. Proc.* 21 : 28~32, 1962
- 19) GORBACH, S. L. & A. G. PLAUT : Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology* 53 : 856~867, 1967
- 20) CREGAN, I. & N. J. HAYWARD : The bacterial content of the healthy human small intestine. *Brit. Med. J.* 1 : 1356~1359, 1953

THE STUDY ON INFLUENCE OF BILE SALTS ON PATHOGENIC MICROORGANISMS

With Special Reference on the Behaviour of Microorganism Adapted to Bile Salts under
the Presence of Antimicrobial Agents

YOSHITAKA MATSUMOTO

The Second Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine
(Director : Prof. K. MASHIMO)

- 1) The ability of *E. coli* (NIHJ) to grow in bile salt containing media was studied. *E. coli* was adapted by serial transfer in cholate and deoxycholate containing media to grow more rapidly than unadapted cultures.
- 2) No changes of biochemical nature of *E. coli* adapted by 7 times transfer in 1% cholate and 1% deoxycholate were shown comparing with unadapted *E. coli*.
- 3) In study of antibiotic susceptibility of unadapted, adapted and reversed *E. coli*, these 3 microorganisms showed the same values of minimal inhibitory concentration to cephaloridine (CER), kanamycin (KM), ampicillin (AB-PC) and chloramphenicol (CP).
- 4) Antibiotic susceptibility to CER, cephaloglycin (CEG), KM, deoxykanamycin, CP and AB-PC was studied in 25 strains of *E. coli* isolated from the patients with urinary tract infection and 14 strains isolated from those with biliary tract infection. The patterns of susceptibility between these 2 groups of *E. coli* were different except CEG and CP. These differences were statistically significant ($P < 0.01 \sim 0.05$).
- 5) Between adapted and unadapted *E. coli*, a marked difference in viable numbers in media with several antibiotics was demonstrated. The adapted *E. coli* grown in media containing CER, AB-PC or KM decreased more rapidly after 5 hours than the unadapted *E. coli*.
- 6) In 5 hours' culture in media containing CER and AB-PC, the decrease in viable counts of *E. coli* isolated from feces of the patients with the urinary tract infection was often found to be more significant than *E. coli* in urine from the same patients.