

耳科領域、とくに慢性中耳炎病巣の Gram 陰性桿菌の推移と薬剤耐性

吉 沢 一 太

関東中央病院臨床検査科

斉 藤 重 二

斉藤耳鼻咽喉科医院

新 井 武 利

昭和薬科大学微生物研究室

(昭和 47 年 6 月 8 日受付)

近年、化学療法の急速な発展に伴ない、耳科領域においても、耐性菌の増加および菌交代現象が問題とされている。中でもとくに Gram 陰性桿菌 (以下、G.N.B. と略す) は増加の傾向が著しく、各種化学療法剤に抵抗し、また、これら G.N.B. の同定も複雑 (腸内細菌を除く) で、その他の G.N.B. として処理されている場合が多い。

著者らは 1966 年から 5 カ年間に、とくに慢性中耳炎患者の耳漏から分離された G.N.B. の同定を行ない、各菌種の推移とその薬剤耐性について調査したので、その結果について報告する。

I. 材料および方法

1. 材 料

1966 年から 1970 年までの 5 カ年間に著者らの 1 人、斎藤が治療した慢性中耳炎患者の耳漏から分離された G.N.B. の 259 株である。

2. 分離培養および同定

滅菌綿棒にて耳漏を採取し、血液寒天培地および BTB 培地に塗布し、30°C、48 時間培養を行ない、生じた独立集落を釣菌し、寒天培地に保存し、その後、腸内細菌については TSI, SIM, クエン酸塩培地, VP 反応などの所見により、またブドウ糖非発酵菌については Gram 染色による形態、オキシダーゼ試験、O-F 試験、運動性、色素産生、5°C、42°C での増殖などにより同定した。

3. 薬剤耐性

Disc 法および平板希釈法によりスルファミン (SA)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、フラジオマイシン (FRM)、アミ

ノサイジン (AMD)、ゲンタマイシン (GM)、コリスチン (CL)、ポリミキシン B (PLB)、アンピシリン (AB-PC)、カルベニシリン (CB-PC)、セファロリジン (CER)、セファロシン (CET)、ナリジクス酸 (NA) の 14 薬剤について感受性を測定した。

II. 実験成績

1. G.N.B. の分離頻度

年度ごとの G.N.B. の分離頻度の推移は表 1 に示した。すなわち、1967 年までは 20~25% の頻度であつたのが 1968 年の 62% をピークとして、以後、36~56% の頻度に G.N.B. が分離された。

2. 菌種別分離状況

年度ごとの菌種別分離の推移は表 2 に示した。腸内細菌の *Proteus* グループは 1966 年には 5.3% であつたのが、以後、4, 3, 1% と減少していた。*E. coli* は 1966 年に 0.7%, 1967 年に 2% であつたが、1968 年、1969 年には 5% に分離された。

ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌の *Pseudomonas* 属の菌は 1966 年より 17, 16, 12, 9, 6% と減少していた。それに反し、*Acintobacter anitratus* は 1968 年より 6, 5, 6, 4%, *Moraxella* は 1968 年より 21, 33, 25% と増加していた。

また、Gram 陽性菌の *Staphylococcus* は 1966 年より 45, 46, 34, 38, 40% と分離菌中、最も多かつた。*Streptococcus*, *Diplococcus* は 1968 年より、ほとんど分離されなかつた。*Corynebacterium* は、ほとんど変動なく、*Neisseria* は 1968, 1969 年に減少したが、1970 年にまた増加していた。*Candida* は 1968 年から激減して、ほとんど分離されなかつた。

3. 薬剤耐性

Disc 法による主な菌種の薬剤耐性率を表 3 に示した。すなわち、(卅), (卅) を感受性, (+), (一) を耐性としたところ、*E. coli* は AB-PC に 20% と最も耐性率が低く、つづいて CER に 22.2%, GM に 25%, PLB に 27.2% と低かつた。*Proteus* は NA, CER, CET,

表 1 G.N.B. の分離頻度

| 年度 | 1966 | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 計 |
|--------|------|------|------|------|------|------|
| 区分 | | | | | | |
| 検査件数 | 154 | 127 | 126 | 133 | 116 | 656 |
| 検出件数 | 39 | 25 | 78 | 75 | 42 | 259 |
| 検出率(%) | 25.3 | 19.6 | 61.9 | 56.3 | 36.2 | 39.4 |

表2 菌種別分離状況

| 年 度 | | 1966 | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 計 |
|------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| グラム陽性球菌 | <i>S. aureus</i> | 33 | 19 | 24 | 24 | 24 | 124 |
| | <i>S. epidermidis</i> | 68 (45.0) | 47 (46.0) | 47 (34.3) | 41 (38.1) | 47 (40.2) | 250 (38.5) |
| | β - <i>Streptococcus</i> | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 |
| | α - <i>Streptococcus</i> | 7 (4.6) | 6 (5.8) | 1 (0.7) | 0 | 1 (0.8) | 15 (2.3) |
| | <i>Diplococcus</i> | 3 | 5 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| グラム陽性桿菌 | <i>Corynebacterium</i> | 4 (2.0) | 2 (1.9) | 0 | 0 | 0 | 5 (0.7) |
| | <i>Bacillus</i> | 7 (4.6) | 14 (13.7) | 9 (6.5) | 15 (11.2) | 19 (16.2) | 64 (9.8) |
| グラム陰性球菌 | <i>Neisseria</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.8) | 1 (0.1) |
| | <i>Candida</i> | 6 (4.0) | 10 (9.8) | 2 (1.4) | 1 (0.7) | 6 (5.1) | 25 (3.8) |
| 真 菌 | <i>Aspergillus</i> | 20 (13.3) | 8 (7.8) | 0 | 2 (1.4) | 0 | 30 (4.6) |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.8) | 1 (0.1) |
| 小 計 | | 111 (74.0) | 77 (75.4) | 59 (43.0) | 59 (44.0) | 75 (64.1) | 391 (60.1) |
| 腸 内 細 菌 | <i>E. coli</i> | 1 (0.6) | 2 (1.9) | 7 (5.1) | 7 (5.2) | 0 | 17 (2.6) |
| | <i>Klebsiella</i> | 0 | 0 | 2 (1.4) | 0 | 0 | 2 (0.3) |
| | <i>Proteus</i> | 5 (3.3) | 4 (3.9) | 4 (2.9) | 1 (0.7) | 1 (0.8) | 15 (2.3) |
| | <i>Providencia</i> | 3 (2.0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 (0.4) |
| <i>Aeromonas</i> | | 1 (0.6) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.1) |
| ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 | <i>Ps. aeruginosa</i> | 21 (14.0) | 13 (12.7) | 14 (10.2) | 12 (8.9) | 7 (5.9) | 67 (10.5) |
| | <i>Ps. fluorescens</i> | 5 (3.3) | 3 (2.9) | 2 (1.4) | 0 | 0 | 10 (0.1) |
| | <i>Alcaligenes</i> | 0 | 0 | 1 (0.7) | 1 (0.7) | 0 | 2 (0.3) |
| | <i>A. anitratus</i> | 1 (0.6) | 2 (0.1) | 9 (6.5) | 8 (5.9) | 5 (4.2) | 25 (3.8) |
| | <i>Moraxella</i> | 1 (0.6) | 1 (0.9) | 29 (21.1) | 45 (33.3) | 29 (24.7) | 105 (16.1) |
| 小 計 | | 39 (26.0) | 25 (24.5) | 78 (56.9) | 75 (55.9) | 42 (35.8) | 259 (39.8) |
| 合 計 | | 150 (23.0) | 102 (15.6) | 137 (21.0) | 134 (20.6) | 117 (18.0) | 650 (100) |

* 数字は菌株数, () 内は % を示す。

AB-PC, GM に耐性株がみられなかつた。*Ps. aeruginosa* は PLB に 11.2%, CL に 18.1%, GM に 22% の低い耐性率を示した。*Moraxella* は PLB の 33.9%, CB-PC の 36.3% とやや低い耐性率を示した。

平板希釈法による *Ps. aeruginosa* および *Moraxella* の薬剤耐性分布は、図1に示した。SM では *Ps. aeruginosa* は 12.5 mcg/ml にピークがあり、*Moraxella* はほとんど 100 mcg/ml 以上に分布しており、KM では両者とも耐性側に、FRM では *Ps. aeruginosa* は 6.25 mcg/ml 以下、*Moraxella* は 12.5 mcg/ml 以上に、GM では *Ps. aeruginosa* はほとんど 0.39 mcg/ml に分布していたが 12.5 mcg/ml 以上にも数株みられた。*Moraxella* は 12.5, 50 mcg/ml の2峰性を示したが、0.79 mcg/ml 以下にも数株みられた。AB-PC, CER では両者とも、ほとんど 100 mcg/ml 以上に、CB-PC では *Ps. aeruginosa* は 12.5 mcg/ml に、*Moraxella* は

1.56 mcg/ml にピークがあつた。NA では両者ともほとんど感性側に分布しており、耐性側にも数株みられた。CP では *Ps. aeruginosa* は 50, *Moraxella* は 25 mcg/ml にピークがあり、TC では *Ps. aeruginosa* は感性側より耐性側の広い間に、*Moraxella* は 25 mcg/ml にピークがあつた。

Moraxella に対する GM と FRM の交差耐性を、図2に示した。すなわち、FRM に 12.5 mcg/ml の菌株は GM にも 12.5~25 mcg/ml の耐性値を、また FRM に 50 mcg/ml の菌株は GM に 50~100 mcg/ml の耐性を示し、交差耐性がみられた。

III. 考 察

G. N. B. の同定法に関し、腸内細菌および *Vibrio*, *Aeromonas* については坂崎の法¹⁾によるのが便利であるが、ブドウ糖非発酵 Gram 陰性桿菌については、わが国においては、いまだ同定法が確立されていない現状

図1. 薬剤耐性分布

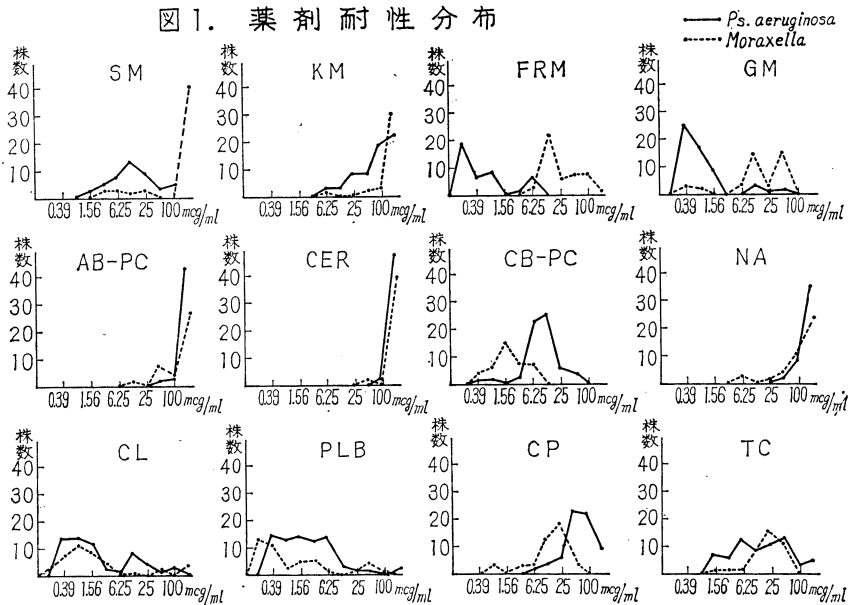


表3 主な菌種の Disc 法による薬剤耐性率

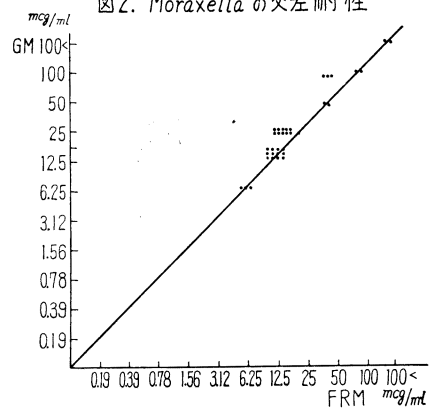
| 菌種 | <i>E. coli</i> | <i>Proteus</i> | <i>Ps. aeruginosa</i> | <i>Moraxella</i> |
|-------|----------------|----------------|-----------------------|------------------|
| 菌株数 | 17 | 15 | 67 | 105 |
| SA | 90.9 | 50.0 | 100 | 95.4 |
| SM | 63.6 | 21.4 | 66.7 | 82.3 |
| CP | 30.7 | 30.7 | 93.7 | 73.5 |
| TC | 35.7 | 64.2 | 65.8 | 61.7 |
| KM | 38.4 | 21.4 | 85.7 | 80.8 |
| CL | 46.6 | 100 | 18.1 | 48.9 |
| PLB | 27.2 | 100 | 11.2 | 33.9 |
| NA | 50.0 | 0 | 100 | 81.8 |
| CER | 22.2 | 0 | 100 | 94.1 |
| CET | 42.8 | 0 | 100 | 95.2 |
| AB-PC | 20.0 | 0 | 100 | 61.5 |
| CB-PC | | | 60.0 | 36.3 |
| GM | 25.0 | 0 | 21.9 | 60.5 |
| FRM | 41.6 | 50.0 | 63.8 | 64.8 |

* 数字は % を示す。

である。

著者らは COWAN & STEEL²⁾, BUTTIAUX *et al.*³⁾ の Manual および BEER⁴⁾ の方法を基礎とし, Gram 染色による形態, O-F, オキシダーゼ, 運動性により *Pseudomonads*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter anitratus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Moraxella* の5つの群に分け, さらに *Pseudomonads* は色素産生, 5°C および 42°C の増殖により *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* に分ける鑑別法を

図2. Moraxella の交差耐性



考案し, これら菌種の同定を行なつた。

1. G. N. B. の分離頻度

G. N. B. の分離頻度に関し, 加藤ら⁵⁾は 1963 年から 1967 年までの5カ年間に慢性中耳炎患者 364 例について細菌検査を行ない, それぞれ 59.3, 57.1, 67.3, 60.5, 79.3%, 平均 67.8% の高率に G. N. B. を検出し, 多少の変動はあるが, 年毎に増加していることを報告している。また酒井ら⁶⁾は 1965 年から3カ年間に 157 例について細菌検査を実施し, それぞれ 30.7, 58.3, 48.1% に G. N. B. を検出したとし, いずれも増加していることを報告している。著者らの調査でも 1966 年の 25.3% に対し, 1968 年に 2.4 倍, 1969 年に 2.2 倍, 1970 年に 1.4 倍と増加していた。

2. 菌種別分離状況

分離頻度の年次推移について山下ら⁷⁾は 1961 年より 1967 年までの 6 カ年間に *Ps. aeruginosa* は 30~35% と著変がなく、*Staphylococcus aureus* は減少傾向がやみられ、*Proteus* は著変がないが、その他の G. N. B. は明らかに漸増の傾向にあつたとし、酒井ら⁸⁾は 1965 年から 1967 年までの 3 カ年間に *Staphylococcus* は 30~42% と著変なく、*Ps. aeruginosa*、*Proteus* は減少傾向にあつたが、その他の G. N. B. は増加していると報告している。

著者らの場合、1969 年には *Staphylococcus* をはじめ *Proteus*、*Pseudomonads*、*Candida* など各種の菌が分離されたが、以後、*Proteus*、*Pseudomonads* は減少傾向にあり、とくに *Streptococcus*、*Diplococcus*、*Candida* などは、ほとんど分離されなくなり、代つて *Moraxella* が 1968 年より急激に増加した。これは使用薬剤が TC 製剤から CP および FRM に切替えられたのと同様であるように考えられる。

3. 薬剤耐性

山下ら⁷⁾は 3 濃度 Disc 法により感受性測定を行ない、*Ps. aeruginosa* は CL に 87%、TC に 56%、SM に 43%、*Proteus* は NA に 100%、KM に 90%、CP に 69%、SM に 60% の感性を示したと報告している。酒井ら⁸⁾は *Ps. aeruginosa* は TC、PLB にそれぞれ 50%、*Proteus* は NA、KM に 60%、*E. coli* は NA に 66.7% の感性を示したとしている。また加藤ら⁹⁾は *Ps. aeruginosa* は PLB に高い感性を、*Proteus*、*E. coli* は KM に高い感性を示したとしている。

著者らの場合は *E. coli* は AB-PC、CER に高い感性を示し、*Proteus* は GM、AB-PC、CER、CET、NA に最も高い感性を、*Ps. aeruginosa* は PLB、CL、GM に高い感性、*Moraxella* は PLB、CB-PC に感性を示した。

平板希釈法による *Ps. aeruginosa* の薬剤感受性分布について五島ら⁸⁾は KM、CER、NA などには、まったく感受性を示さず、SM、CP、TC の中、TC には、あるていど感性株がみられ、CL 125 u/ml に 50%、PLB 125 u/ml に 80%、GM 6.25 mcg/ml に 60% と高い感性を示したと報告している。なお *Moraxella* についての報告には接していない。

著者らは、各薬剤に対する *Ps. aeruginosa* と *Moraxella* の薬剤耐性分布について調査したところ、SM、KM では *Ps. aeruginosa* には感性株が少数みられたが、*Moraxella* はほとんど耐性株であり、FRM、GM では *Ps. aeruginosa* は大部分の株が高度感性を示したが、*Moraxella* は、それぞれ 12.5 および 50 mcg/ml にピークがあつた。AB-PC、CER、NA では両者とも、ほとん

どの株が耐性を示し、CB-PC では *Ps. aeruginosa* は 12.5 mcg/ml、*Moraxella* は 1.56 mcg/ml にピークがあつた。CL、PLB では両者とも感性株がほとんどを占めていたが、耐性株も少数みられた。CP では *Ps. aeruginosa* は 50 mcg/ml に、*Moraxella* は 25 mcg/ml にピークがあり、TC では *Ps. aeruginosa* は感性側から耐性側に分布し、*Moraxella* は 25 mcg/ml にピークがあつた。

さらに、菌の年次推移のところで、薬剤が TC から CP および FRM に代つた頃から *Ps. aeruginosa*、*Candida* が減少し、*Moraxella* が急激に増加したことを述べたが、FRM における *Ps. aeruginosa* および *Moraxella* の耐性分布によつて、これらの菌交代現象があるていど証明できると考えられる。

4. 交差耐性

従来、アミノ配糖体系抗生剤においては、SM、KM、AMD、FRM はそれぞれ完全な交差耐性が成立するが、BUSCH & LANE¹⁰⁾ によれば GM とそれら薬剤の間には完全な交差耐性は成立せず、SM、KM、AMD、FRM 耐性株は GM に感性であるが、GM 耐性株は SM、KM、AMD、FRM に耐性化するという。しかし著者らは *Moraxella* において、FRM および GM に交差耐性があり、しかも GM のほうが 1 段階高い MIC を示す菌株が多かつた。このことは耳科領域においては FRM が高濃度で局所治療に用いられているので、自然耐性か、FRM との接触により耐性が獲得されたのか不明であるが、著者らの用いた菌株は安定した耐性パターンを示すので、自然耐性菌の可能性が強い。

IV. 結 論

1966 年から 1970 年までの 5 カ年間に慢性中耳炎患者の耳漏から分離された G. N. B. の推移と薬剤耐性について調査し、次の結果を得た。

1. G. N. B. の分離率は 1966 年より 1970 年までの 5 カ年間それぞれ 25.3、19.6、61.9、56.3、36.2%、平均 39.4% であつた。

2. 菌種別推移は *Ps. aeruginosa* は 14、12.7、10.2、8.9、5.9%、*Proteus* は 3.3、3.9、2.9、0.7、0.8% と減少しており、代つて *Moraxella* が 0.6、0.9、21.1、33.3、24.7% と増加していた。

3. 薬剤感受性は *E. coli* は AB-PC、CER、*Proteus* は GM、AB-PC、CER、CET、NA に、*Ps. aeruginosa* は PLB、CL、GM、*Moraxella* は PLB、CB-PC の順に感性を示した。

4. 薬剤耐性分布は FRM では *Ps. aeruginosa* は 0.19 mcg/ml に、*Moraxella* は 12.5 mcg/ml に、GM では *Ps. aeruginosa* は 0.38、*Moraxella* は 12.5 およ

び 50 mcg/ml に, CB-PC では *Ps. aeruginosa* は 12.5, *Moraxella* は 1.56 mcg/ml にピークが, CL, PLB では両者とも 6.25 mcg/ml 以下に分布していた。

5. *Moraxella* においては FRM と GM はよわい交差耐性を示した。

稿を終わるにあたり指導と論文の校閲をいただいた美甘義夫博士および桑原章吾博士に深謝する。

なお, 本論文の要旨は第 19 回日本化学療法学会総会において発表した。

文 献

- 1) 坂崎利一: 腸内細菌とその類似菌の簡易なしらべかた。栄研化学 K K, 東京, 1962
- 2) COWAN, S. T. & STEEL, K. J.: Manual for the Identification of Medical Bacteria. 66~82, Cambridge University Press, 1966
- 3) BUTTIAUX, R., BEERENS, H. & TACQUET, A.: Manuel de techniques bactériologiques 259~272, Editions Médicales Flammarion, Paris, 1962
- 4) BEER, H.: Zur Diagnostik gramnegativer, aerobier stäbchen. Path. Microbiol. 26: 607~634, 1963
- 5) 加藤純彦, 加賀谷禎祐: 最近 5 年間の耳漏中の細菌学的検査成績とポリミキシン B 耳浴の効果。耳鼻咽喉科臨床 61: 222~229, 昭 43
- 6) 酒井正美, 維田宗夫: 耳鼻咽喉科領域における検出菌とその薬剤感受性について。医療 22: 853~857, 昭 42
- 7) 山下敏夫, 岡野安雄, 岩井 一: 慢性中耳炎の検出菌とその薬剤感受性について。耳鼻咽喉科臨床 60: 311~316, 昭 42
- 8) 五島瑳智子, 三宅修, 篠崎寛二, 湯沢重夫: 主なグラム陰性桿菌群の薬剤感受性。Chemotherapy 16: 87~89, 1968
- 9) BUSCH, H. & LANE, M.: Chemotherapy: 84~88, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1967

CHANGES OF THE GRAM-NEGATIVE FLORA IN CHRONIC OTITIS MEDIA AND THE DRUG SENSITIVITY PATTERNS

ICHITA YOSHIZAWA

Department of Laboratory, Kanto Chuo Hospital

SHIGEJI SAITO

Saito Oto-laryngological Clinic

TAKETOSHI ARAI

Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences

The authors studied on the rates of isolation and drug sensitivities of Gram-negative bacilli isolated from the chronic otitis media during the period from 1966 to 1970.

1. Gram-negative bacilli were isolated in the percentage of 25.3, 19.6, 61.9, 56.3, 36.2 in each of the year 1966~1970, respectively.

2. In the rates of isolation of each group, *Ps. aeruginosa* and *Proteus* showed a tendency of gradual decrease, whereas *Moraxella* showed a sudden increase from 1968.

3. Many strains of *E. coli* were found sensitive against AB-PC and CER, *Proteus* were sensitive against GM, AB-PC, CER and NA, and *Ps. aeruginosa* were sensitive against PLB, CL, and GM, while *Moraxella* were sensitive against PLB, CL and CB-PC.

4. The peak of minimum inhibitory concentration distribution of FRM against *Ps. aeruginosa* and *Moraxella* were each 0.19 and 12.5 mcg/ml, that of GM were 0.38 and 12.5~50 mcg/ml respectively.

Against CB-PC *Moraxella* were more sensitive than *Ps. aeruginosa*, the peak of the MIC distribution being 1.56 mcg/ml, whereas in *Ps. aeruginosa* the peak was found 12.5 mcg/ml.

5. The majority of the strains of both *Moraxella* and *Ps. aeruginosa* was suppressed by CL and PLB at the concentration below 6.25 mcg/ml.