

コレラ菌の Dihydroxymethyl-furatrizine (Panfuran-S) に対する感受性

(1) 1941年から1971年に分離された *El Tor* 型コレラ菌の薬剤感受性

横田 健・藤井 暁美

順天堂大学医学部細菌学教室

(昭和 48 年 12 月 15 日受付)

はじめに

腸管感染症の起炎菌のなかには、赤痢菌のように腸管上皮細胞の中に侵入して病原性をあらわすものと、コレラ菌のように細胞外腸管腔で増殖し、毒素を産生して下痢を起こすものがある。この違いは病理学的に重要であるばかりでなく、経口薬剤による化学療法の場合にも注意が必要である。すなわち、細菌性赤痢の治療には細胞内に透過しにくい Streptomycin (SM) や、難溶性 Sulfa 剤内服の効果は少ないが、コレラ菌に対しては薬剤選択の範囲が広く、試験管内で強い抗菌力を示す薬剤は、腸管内で不活化されない限り、すぐれた治療効果が期待できる。現用のコレラ化学療法剤には、Chloramphenicol (CM), Tetracycline (TC), Erythromycin (EM) があるが、これらは開発以来歴史の長い薬剤で耐性菌の存在は無視できない。KOBARI, NAKATOMI ら (1970)^{1,2)} は Philippines で 1969年 CM, SM, SA あるいは CM, TC, SM, SA に耐性の多剤耐性のコレラ菌 (*El Tor* 型) 12 株を患者から分離したが、これらの患者では CM の内服は有効でなく、Dihydroxymethyl furatrizine (Panfuran-S) のほうがすぐれていることを明らかにした。野外から分離された多剤耐性コレラ菌が、R 因子 (グラム陰性桿菌の伝達性薬剤耐性因子) によるものかどうかはまだ明らかでないが、すでに KUWAHARA ら (1963³⁾, 1966⁴⁾ が R 因子が大腸菌 (*Escherichia coli*), 赤痢菌 (*Shigella flexneri*) からコレラ菌 (*Vibrio cholerae*), NAG ビブリオ (*Nonagglutinable vibrio*), アエロモナス (*Aeromonas*) に伝達可能なことを発見しており、著者ら⁵⁾ も温度感受性 R 因子を含め、 f_i^+ 型, f_i^- 型の R 因子がともにコレラ菌に伝達されることを追試確認し、その安定性についても報告した。今後コレラ菌に対する化学療法が普及し、コレラ菌の中でも安定な R 因子が選択されれば、自然界に R^+ の多剤耐性コレラ菌が急速に増加する危険がある。

Dihydroxymethyl-furatrizine (FT) は、わが国で開発された nitrofurantoin 誘導体 (NF) の 1 つで、その抗菌力は furazolidone の 200 倍以上も強く⁶⁾、しかも

NF 耐性を運ぶ R 因子の存在は腸内細菌においてさえまだ確認されていない。

著者らは、将来予想される多剤耐性コレラ菌の増加に対する有効な化学療法剤を確立する目的で、コレラ菌の FT に対する感受性を検討中であるが、本報においては、1940~1941年 India で分離された72株、1969~1971年 Philippines で得られた31株、合計 103 株の *El Tor* 型コレラ菌の CM, TC, SM, Sulfamethoxazole (SMX) および FT に対する感受性を比較した結果について報告したい。

材料ならびに方法

被検菌株: India の Calcutta および Kasauli で、1940~1941年に分離された72株は、北里研究所 合田部長が保存中のものを分与された。また 1969年 Philippines で得られた多剤耐性株 8 株、同じく 1970~1971年に無作為に分離された 23 株はそれぞれ国立予防衛生研究所 山田博士と大橋室長から分与された。

薬剤: Streptomycin sulfate (SM: 武田薬品工業・大阪), Chloramphenicol (CM: 山之内製薬・東京), Tetracycline (TC: 日本レダリー・東京) は滅菌蒸溜水にとかし、Dihydroxymethyl-furatrizine (Panfuran S, FT: 富山化学・東京) および Sulfamethoxazole (SMX: 塩野義製薬・大阪) はそれぞれ dimethylformamide および 1/8 N, NaOH 水溶液に溶かしたのち、滅菌蒸溜水で所定濃度に希釈して培地に添加した。

最小発育阻止濃度の測定: 各薬剤のコレラ菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC: minimum growth inhibitory concentration) の測定は原則として化学療法学会法に準拠し⁷⁾、平板希釈法でおこなった。すなわち、被検菌株を TCBS 平板 (Oxoid, London) に画線培養して再分離し、5 ml のブイヨン中に接種して 37°C 18 時間振盪培養した。これを滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈し、その標準 1 白金耳を倍々希釈濃度の薬剤を含む感受性試験用寒天平板 (栄研化学・東京) 上に塗布して 37°C 24 時間培養したのち、その増殖の有無から MIC を判定した。SMX (Sulfa 剤) に対する感受性試験には MUELLER

Fig. 1 Influence of inoculum size on minimum inhibitory concentrations (MIC) of various antibiotics to *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*).

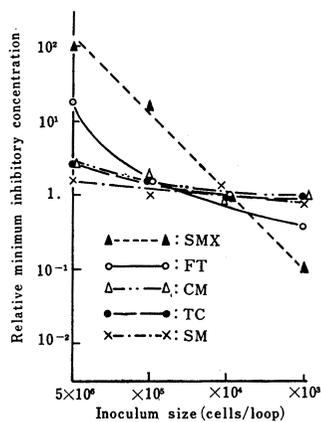


Fig. 3 Susceptibility distribution of 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*) to tetracycline.

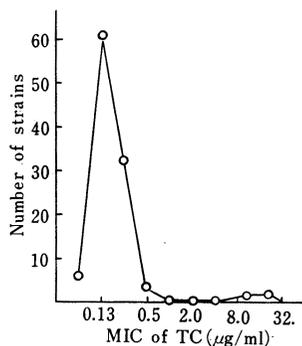


Fig. 5 Susceptibility distribution of 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*) to sulfamethoxazole.

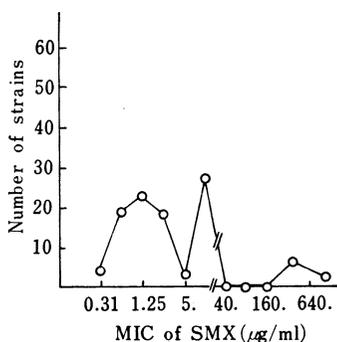


Fig. 2 Susceptibility distribution of 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*) to chloramphenicol.

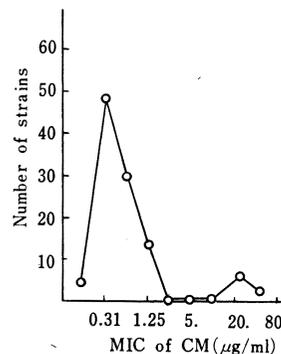


Fig. 4 Susceptibility distribution of 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*) to streptomycin.

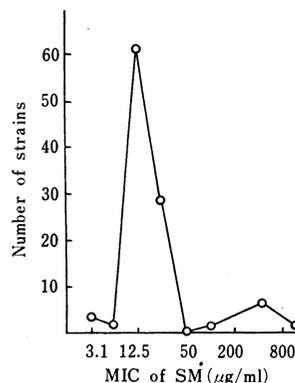
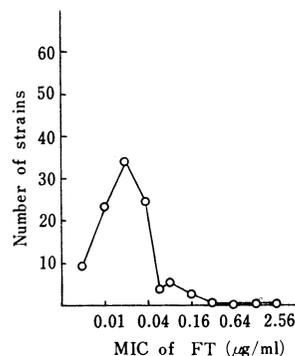


Fig. 6 Susceptibility distribution of 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*) to panfuran-S.



HINTON 培地でも不正確な価を表現することが多いので⁹⁾ Wellcotest Sensitivity Test Agar (Wellcome, London: 溶血ウマ血液添加培地¹⁰⁾と同程度の正確さで Sulfonamide 抗菌力を表現する)を使用した。

MIC に対する接種菌量の影響の検討: コレラ菌の各薬剤に対する感受性が接種菌量の多少によつてどの程度変化するか, 代表菌株のブイヨン培養原液, 10 倍, 100 倍, 1000 倍希釈菌液を用いて平板希釈法をおこない, MIC の変動を検討した。

実験成績

1) コレラ菌の薬剤感受性におよぼす接種菌量の影響

平板希釈法によるコレラ菌の CM, TC, SM, SMX および FT に対する感受性度測定に際し, 接種菌量がどの程度影響するかしらべた。Fig. 1 に示すとおり, 接種菌量の多少に最も強く影響されるのは Sulfa 剤(SMX)で, ブイヨン18時間培養原液 1 白金耳ずつ(約 5×10^6 cells/loop)を塗布した時の MIC は, 1000 倍希釈菌液 (5×10^3 cells/loop)を使用した時にくらべ500~1000 倍の高い価を示す。これについて nitrofurantoin 類 (FT) が接種菌量により抗菌価に影響を受けやすく, 前培養菌液を1000倍希釈すると, MIC は $0.005 \mu\text{g/ml}$ という低い価を示し, 無希釈菌液使用時の $0.63 \mu\text{g/ml}$ にくらべ約100分の1の激しい開きになる。両薬剤の MIC はこれ以上被検菌液を希釈してもそれほど低くならない。

SMX および FT にくらべ, CM, TC および SM の抗菌価は接種菌量が変わつてもその影響を受けにくく, 接種菌量が1/1000になつても CM および TC の MIC は1/4までしか低下せず, SM ではわずかに1/2の変動にとどまることがわかった。接種菌量の差による各薬剤抗菌価の変動の特性には菌種特異性は認められず, 大腸菌を被検菌としても全く同じ傾向が認められる。したがつて平板希釈法による感受性度測定には, ブイヨン前培養液を少なくとも100倍希釈する方法(化学療法学会法⁹⁾)をとらなければ正確を期しにくいことが再認識された。

2) 1941年から1942年に India で分離されたコレラ菌の薬剤感受性

抗生物質普及以前に分離された72株の *El Tor* 型コレラ菌は, すべて CM, TC および SM に対してそれぞれ $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以下, $0.25 \mu\text{g/ml}$ 以下, および $25 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性を示したが, SMX に対しては $1/3$ 強が $10 \mu\text{g/ml}$ 程度の中等度耐性をもち, 残り $2/3$ 弱が $2.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性菌であつた。FT に対しては全株とも $0.08 \mu\text{g/ml}$ 以下という非常に高い感受性を示した。

3) 1969年から1971年に Philippines で分離されたコレラ菌の薬剤感受性

1970年から1971年に無作為に得られた23株の *El Tor* 型コレラ菌は, CM, TC および SMX に対してそれぞれ $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以下, $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下および $2.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性を示したが, SM に対しては1株 $1000 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性を示すものが見出された。

また1969年に KOBARI ら¹¹⁾によつて Philippines で分離された8株の多剤耐性コレラ菌は, 4年間の研究室保存にもかかわらず, 安定した耐性を示し, そのうち, 2株は CM に $25 \mu\text{g/ml}$, TC に $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$, SM に $100 \sim 500 \mu\text{g/ml}$, SMX に $500 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ の抵抗性を示して CM, TC, SM, SA 耐性パターンをもつ, いわゆる4剤耐性コレラ菌であり, 残り6株は CM, SM, SA 耐性パターンの3剤耐性菌であつた。

特筆されるべきことは, これら多剤耐性菌8株を含む, 小計31株の近年分離された *El Tor* 型コレラ菌がすべて FT に対しては, $0.25 \sim 0.007 \mu\text{g/ml}$ 以下というきわめて高い感受性を示すことである。

4) 耐性分布曲線

前述の合計103株の *El Tor* 型コレラ菌の CM, TC, SM, SMX および FT に対する耐性分布を Fig. 2 から Fig. 6 までに示した。CM は大多数の菌株に対して $0.31 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示し, 多剤耐性菌8株だけが $25 \mu\text{g/ml}$ に耐性で, いわゆる2峰性の耐性分布曲線となる (Fig. 2)。TC および SM に対しても同じような2峰性の耐性分布を示すが, 多剤耐性菌のうち TC 耐性をもつものが少ないために, TC に対する耐性分布曲線の第2峰(耐性菌の割合)は低い。これに対し SM 耐性菌は多剤耐性菌のほかにも単独耐性菌も稀れてないので耐性分布曲線の第2峰が若干高くなる (Fig. 3, 4)。SMX に対しては1941~1942年分離のコレラ菌のなかに $10 \mu\text{g/ml}$ 程度の中等度単独耐性菌が比較的多く, 1969~1971年分離菌の多剤耐性菌は $500 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性を持っているので, Fig. 5 にあげたような3峰性の分布曲線を示した。これらすべてのコレラ菌株は多剤耐性菌, SM または SMX 単独耐性菌を問わず, Fig. 6 に示すとおり FT に対しては $0.02 \mu\text{g/ml}$ に最頻値を持つ高い感受性を示し, $0.32 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性度を有するものは1株も認められなかつた。

考 察

コレラ菌の治療は特有の下痢による脱水症状を防ぐための輸液(対症療法)と, 起炎菌を除去するための化学療法とを併行して実施することが理想的である。さらに近年コレラ菌の産生する外毒素(cholera toxin)が腸管上皮

細胞の *adenyl cyclase* を活性化し、細胞内 *cyclic AMP* 濃度を急上昇させることが下痢（透過性の上昇）の主原因であることがわかつたので¹¹⁾、強力な *adenyl cyclase* 阻害剤または *cyclic AMP* の analogue を経口投与することによつてコレラを治療できる可能性も考えられる。しかしこの方法は残念ながらまだ完成していない。また万一この方法が開発されたとしても疫学的にコレラの蔓延を防止するには化学療法を欠くことはできない。現在コレラの化学療法には CM および TC が主として使用されているが、これらの薬剤に対する耐性コレラ菌はすでに患者から分離されており¹⁾、しかもこれらのものはすべて多剤耐性菌であることは興味深い。自然界分離の多剤耐性コレラ菌における R 因子の存在はまだ証明されていないが、実験的には R 因子を腸内細菌その他からコレラ菌に接合によつて伝達することが可能である。³⁻⁶⁾ しかし腸内細菌から得られる R 因子の大部分はコレラ菌中に入るときわめて不安定で、薬剤のないところで菌を増殖させると自然に脱落して感受性化してしまう場合が多い。この事実は腸内細菌その他のグラム陰性桿菌にくらべ、コレラ菌ではまだ多剤耐性株が少ないことの原因かとも考えられるが、例外的にはコレラ菌のなかでも安定な R 因子もあり⁶⁾、また不安定な R 因子も宿主菌染色体に組みこまれば安定化するので¹²⁾、R 因子によるコレラ菌の多剤耐性化の可能性は依然として否定できない。

1940年代分離のコレラ菌に Sulfa 剤中等度単独耐性菌が比較的多く、1970年前後に得られたものでは、多剤耐性菌以外はほとんどサルファ剤感受性であることは興味深い。これは医療に使用される薬剤の変遷と、耐性菌の種類の変化とが密接な関係にあることを示す例ではなからうか。

特筆すべきことは、今回しらべた 103 株のコレラ菌が、すべて FT に対して高い感受性を有したことである。すでに臨床的にも FT の経口投与がコレラ患者の症状軽減、排菌期間の短縮にきわめて有効なことが知られているので²⁾、この薬の経済的負担の軽いことも考えあわせ、コレラに対するすぐれた化学療法剤として評価できるとと思われる。これをより明らかにするために現時点におけるコレラ常在地区の新鮮分離株の FT その他の薬剤に対する耐性菌の割合を比較することは興味ある研究課題であろう。

ま と め

1940年代に India で分離された 72 株、および 1970 年後に Philippines で得られた 8 株の多剤耐性株を含む 31 株、合計 103 株の *El Tor* 型コレラ菌の CM, TC, SM,

SMX および FT に対する感受性を平板希釈法で測定した。CM および TC 耐性をもつものはすべて多剤耐性菌であり、SM および SMX に対しては多剤耐性菌の他に単独耐性菌が認められた。これらのものと対照的に FT に対してはすべての菌株が高い感受性を示した。

謝 辞

貴重な菌株を分与して下さつた北里研究所 合田博士、国立予防衛生研究所 大橋博士および同研究所山田博士に感謝いたします。

文 献

- 1) KOBARI, K., I. TAKAKURA, M. NAKATOMI, S. SO. GAME & C. UYLANGCO: Antibiotic-resistant strains of *El Tor Vibrio* in the Philippines and the use of furazolidone for chemotherapy. Bull. Wld. Hlth. Org. 43: 365-371, 1970
- 2) NAKATOMI, M.: Evaluation of effectiveness of chemotherapy in cholera. Trop. Med. (Japan) 13: 26-43, 1971
- 3) KUWAHARA, S., T. AKIBA, K. KOYAMA & T. ARAI: Transmission of multiple drug resistance from *Shigella flexneri* to *Vibrio comma* through conjugation. Jap. J. Microbiol. 7: 61-68, 1961
- 4) 阿部久夫, 五島瑳智子, 桑原章吾: 赤痢菌から *Aeromonas* および非凝集性ビブリオへの多剤耐性の接合による伝達。日本細菌学雑誌 21: 266-273, 1966
- 5) YOKOTA, T.: Thermosensitive and nonthermosensitive R factors in *Enterobacteriaceae* and *Vibrio comma*. p. 514-524. In Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy (Proceedings of the 6th International Congress on Chemotherapy). Vol. 2. University Tokyo, Press.
- 6) YOKOTA, T., T. KASGA, M. KANEKO & S. KUWAHARA: Genetic behavior of R factors in *Vibrio cholerae*. J. Bact. 109: 440-442, 1972
- 7) 木村義民: 新しいニトロフラン剤。モダンメディア 9: 366-373, 1963
- 8) 日本化学療法学会効果判定基準研究会, MIC 小委員会: 最小発育阻止濃度測定法の標準化について。Chemotherapy 16: 98-99, 1968
- 9) ST 合剤研究会, MIC 測定法のための小委員会: Sulfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法。Chemotherapy 21: 67-76, 1973
- 10) WALKER, N., R. P. PHILIP, M. W. SMYTH & W. MCLEOD: Observations on the prevention of bacterial growth by sulphonamides with special reference to the Harper and Cawston effect. J. Path. & Bact. 59: 631-645, 1947
- 11) SHARP, G. W. G. & S. HYNIE: Stimulation of intestinal *adenyl cyclase* by cholera toxin.

Nature 229 : 266~269, 1971

非温度感受性変異。日本細菌学雑誌 28 : 85, 1973

12) 藤井暁美, 横田健 : 多形質温度感受性耐性因子の

SENSITIVITY OF *VIBRIO CHOLERAE* (BIOTYPE *EL TOR*)
TO PANFURAN-S

1. DRUG SENSITIVITIES OF *V. CHOLERAE* ISOLATED DURING
THE PERIOD OF 1940-1971

TAKESHI YOKOTA and AKEMI FUJII

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

Drug sensitivities were examined by the plate dilution method for 103 strains of *Vibrio cholerae* (biotype *El Tor*), of which 72 and 31 strains had been isolated in India in 1940 and in Philippines in the period of 1969 to 1971 respectively. Strains resistant to chloramphenicol and/or tetracycline were found to be simultaneously resistant to streptomycin and sulfonamide, *i. e.* multiple drug resistant strains. Whereas, strains resistant to streptomycin or sulfonamide were not only multiple resistant but also single resistant strains. It was noteworthy that all tested strains of *V. cholerae* (biotype *El T. r*) were highly sensitive to Panfuran-S, regardless of multiple resistant or single resistant strains to other drugs.

It was confirmed that inoculum size of the test bacteria affected markedly on the minimum growth inhibitory concentrations of sulfonamide and Panfuran-S but not of chloramphenicol, tetracycline and streptomycin.