

Klebsiella pneumoniae の Indole 産生能と抗生物質感受性

浅野英夫・上村利明・横田好子・西田 実

藤沢薬品工業株式会社・中央研究所

(昭和 50 年 8 月 25 日受付)

筆者らは今日まで Cephalosporin 系抗生物質の評価に関連して、*Klebsiella pneumoniae* の Cefazolin および他の Cephalosporin 類に対する感受性を検討してきた。

いっぽう、*Klebsiella* の分類については多くの説があり、必ずしも見解は統一されていない。著者らは *Klebsiella pneumoniae* の臨床分離株の抗生物質感受性とそれらの菌株の生物学的性状との関連を検討し、*Klebsiella pneumoniae* の Indole 産生能と、ある種の抗生物質感受性との間に相関性を認めたので、これについて報告する。

実験材料および実験方法

1. 試験菌株およびその分離同定

国内の敷設の臨床検査室から提供された臨床材料から TSI 寒天培地 (栄研) で A/AG, SIM 培地 (栄研) で運動性がなく、Indole 陽性または陰性、VP 半流動培地 (栄研) で VOGES-PROSKAUER 反応陽性、SIMMON'S クエン酸ナトリウム培地 (栄研) でクエン酸利用能陽性を示す菌株を分離し、Table 1 に記載する各種の性状検査をおこない、*K. pneumoniae* と同定した。なおゼラチン液化能は 22°C の培養で 60 日間まで観察した結果である。

2. 使用抗生物質

Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品)

Cephaloridine (CER, 鳥居薬品)

Cephalothin (CET, 塩野義製薬)

Kanamycin (KM, 明治製菓)

Gentamicin (GM, 塩野義製薬)

Chloramphenicol (CP, 藤沢薬品)

Tetracycline HCl 塩 (TC, 日本レダグリー)

3. 感受性測定

日本化学療法学会・標準法に準じ、寒天平板希釈法で MIC を測定した。すなわち Trypticase soy broth (BBL) を用い、1 夜培養した菌液を各種の濃度に抗生物質を含む Heart infusion agar 上に、スタンプ法で接種し、37°C、20 時間培養後 MIC を判定した。

実験結果

1. 細菌学的性状

Table 1 に示すとおり、*K. pneumoniae* と同定した

Fig. 1 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to cefazolin

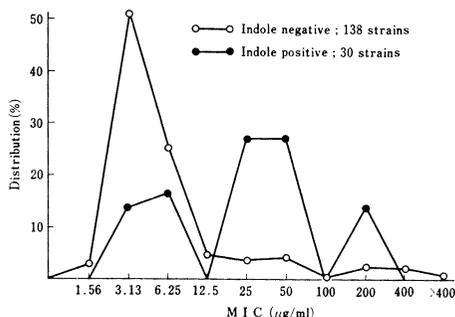


Fig. 2 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to cephaloridine

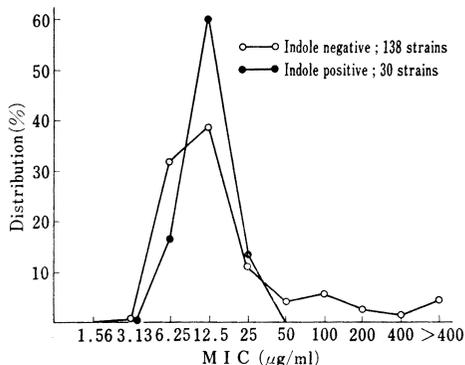


Fig. 3 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to cephalothin

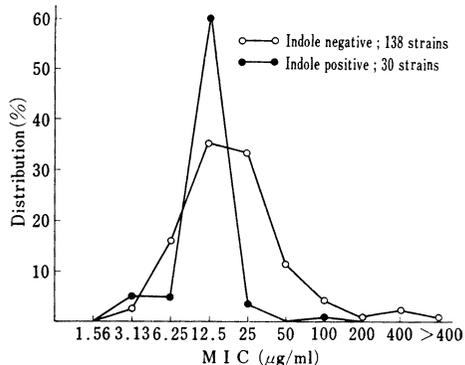


Table 1 Biochemical characterization of Indole-positive and Indole-negative strains of *Klebsiella pneumoniae*

Test or Substrate	<i>K. pneumoniae</i> NTC- 418	Indole (+) 30 strains	Indole (-) 138 strains
	G (-) Rod	G (-) Rod	G (-) Rod
Shape			
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
O-F test	F	F	F
IPA (SIM medium)	-	-	-
Hydrogen sulfide (SIM medium)	-	-	-
Indole (SIM medium)	-	+	-
Motility (SIM medium)	-	-	-
VOGES-PROSKAUER (37°C)	+	+	+
Methyl red	-	-	-
Citrate (SIMMON'S)	+	+	+
Gelatin (22°C)	-	-	-
Sorbitol (acid)	+	+	+
Rhamnose (acid)	+	+	+
Raffinose (acid)	+	+	+
Arabinose (acid)	+	+	+
Adonitol (acid)	+	+	+
Maltose (acid)	+	+	+
Dulcitol (acid)	+	- or +	- or +
Sucrose (acid)	+	+	+
Lactose (acid)	+	+	+
Glucose (gas)	+	+	+
Glycerol (gas)	+	+	+
Starch (gas)	+	+	+
Inositol (gas)	+	+	+
Cellobiose (gas)	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Malonate	+	+	+
Esculine	+	+	+
Gluconate	+	+	+
KCN	+	+	+
DNase	-	-	-
Urease	+	+	+

+ : 100% positive, - : 100% negative, - or + : 30~50% positive

臨床分離 168 株のうち、30 株(17.9%)は Indole positive で、他の 138 株(82.1%)は Indole negative であった。両群の *K. pneumoniae* は Indole 産生能以外の試験で、Dulcitol 分解性が、Indole positive の 30 株のうち 14 株(46.7%)、Indole negative の 138 株のうち 43 株(31.2%)がそれぞれ陽性であること以外は両群間に性状の相違が認められなかった。また Table 1 の検査結果から 168 株のすべては BERGEY 8 版の分類により *K. pneumoniae* と同定した。

2. 各種抗生物質感受性

a) Cephalosporin 類

Fig. 1 に Indole positive 30 株および negative 138 株のそれぞれについて CEZ の感受性分布を示した。まず positive group では CEZ の MIC 分布が多様で、6.25 $\mu\text{g/ml}$ に 5 株(16.7%)、25~50 $\mu\text{g/ml}$ に 16 株(53.3%)、200 $\mu\text{g/ml}$ に 4 株(13.3%)となった。この group に属する 30 株では MIC : 6.25 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下の高度感受性株は 9 株(30%)であった。

いっぽう、138 株の Indole negative group の CEZ の MIC 分布は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ に peak をもち 71 株(51.4%)、さらに 6.25 $\mu\text{g/ml}$ に 35 株(25.4%)と 84% の株の MIC は感受性域に分布した。すなわち上述の Indole positive group のそれと全く異なった MIC 分布を示した。

Fig. 2 には CER の感受性分布を示した。Indole positive および negative group とともに MIC 分布の peak は CEZ より高濃度で 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に 63.3% および 34.8% が存在し、CEZ の場合に認められたような Indole positive と negative group の感受性分布の相違は認められなかった。また CEZ と対比的に Indole positive group の MIC 値のほうが Indole negative group のそれよりも狭い濃度範囲に分布する傾向が認められた。

Fig. 3 に示した CET の感受性分布も、Fig. 2 の CER のそれと極めて類似している。両群とも感受性分布の peak は MIC : 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、Indole positive group の MIC 値は CER と同様、狭い濃度範囲に集中する傾向にある。CET と CER の感受性の相違点をあえて求めると、Indole negative 138 株の MIC 値が CET では耐性側に、CER では感受性側に shift していることである。

b) CP および TC 感受性

Fig. 4 には CP の感受性分布を示した。CP では Indole positive group に属する 30 株の全てが MIC : 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、12.5 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上の耐性株は全く認められなかった。いっぽう、Indole

Fig. 4 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to chloramphenicol

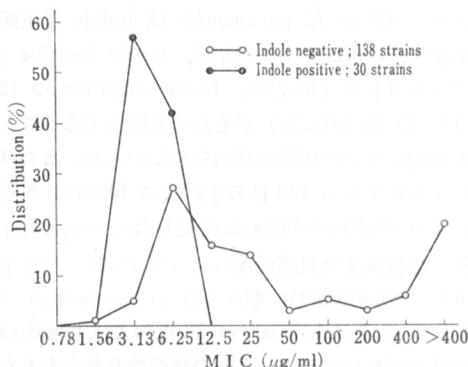
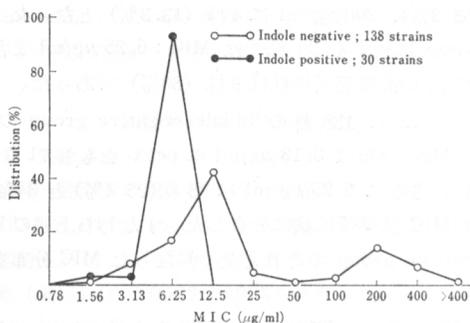


Fig. 5 Susceptibility of clinical isolates to *Klebsiella pneumoniae* to tetracycline



度範囲にまたがり、CP 耐性の *K. pneumoniae* の全ては Indole negative であることがわかった。両 group の CP 感受性の傾向は CEZ のそれと全く対角的であった。Fig. 5 に示した TC の感受性分布も、CP のそれと極めて類似した傾向を示した。すなわち Indole positive group では、93.4% が MIC : 6.25 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、残りの株はさらに感受性で、耐性株は全く認められなかった。いっぽう、Indole negative group の MIC は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ を peak として 1.56 ~ >400 $\mu\text{g/ml}$ の広い濃度範囲に分布した。したがって *K. pneumoniae* の TC 耐性株の全ては CP の場合と同様、Indole negative であることが明らかになった。

c) KM および GM 感受性

Fig. 6 は KM の感受性分布を示した。KM では Indole positive および negative group とともに MIC 値の peak は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ にあり、それぞれ 53.3% および 65.9% であった。Indole positive group では MIC : 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の感受性株以外に中等度耐性および高度耐性株が低率ながら存在する。しかし Indole negative group では中等度耐性株はほとんどなく、>400 $\mu\text{g/ml}$ の高度耐性株が約 10% 存在する。

Fig. 6 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to kanamycin

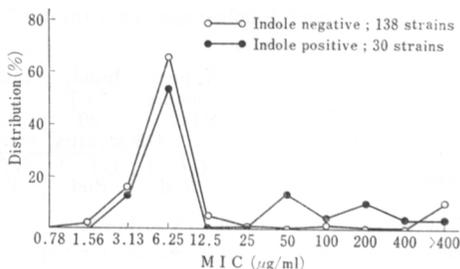


Fig. 7 Susceptibility of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to gentamicin

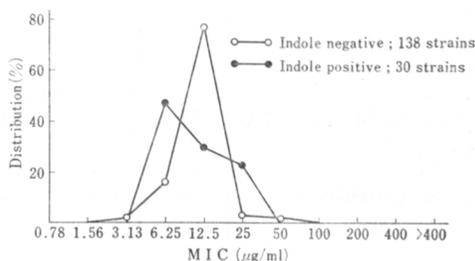
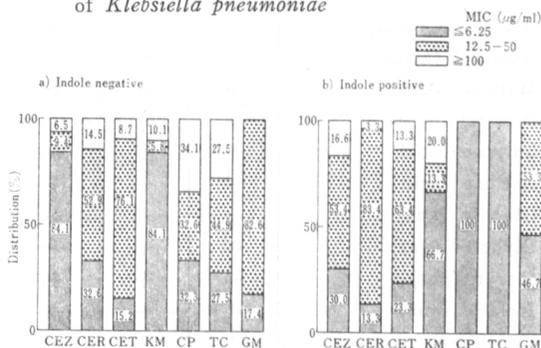


Fig. 8 Summarized results on antibiotic-susceptibilities of indole negative and positive groups of *Klebsiella pneumoniae*



negative 138 株の MIC は 1.56 ~ 400 $\mu\text{g/ml}$ と広い濃

Fig. 7 は GM の感受性分布を示した。GM では両群とも 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株は全く存在しない。Indole positive group の MIC は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (46.7%) を peak として 6.25 ~ 25 $\mu\text{g/ml}$ に全ての株が分布する。Indole negative group では MIC : 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に約 78% が集中する。

以上の各抗生物質の感受性を MIC : $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$, 12.5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$, および $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ に区分し、Indole positive および negative group について分布を集計すると Fig. 8 a) および b) のとおりになる。すなわち Indole negative の 138 株は CEZ および KM 感受性株 (MIC : $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$) がともに 84.1% と最も多く、

ついで CER および CP の 32~33%, TC の 27.5%, CET および GM は 15~17% となった。CER, CET および GM では中等度耐性株 (MIC: 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$) が多く、それぞれ 52.9%, 76.1% および 82% となり、とくに GM では高度耐性株は全く存在しなかった (Fig. 8-a)。

いっぽう、Fig. 8-b) に Indole positive 30 株の結果を要約した。全ての株は CP および TC に感受性 (MIC: $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$) で、ついで KM および GM ではそれぞれ 66.7% および 46.7% が感受性株であった。これらの抗生物質と比較して、一般に Cephalosporin 類は、感受性株は少なく、多くの株は中等度耐性と区分した MIC 範囲に分布した。

考 察

Klebsiella 属の分類については BERGEY¹⁾, COWAN *et al.*²⁻³⁾, SLOPEK *et al.*⁴⁾, BASCOMB *et al.*⁵⁾, EDWARDS *et al.*⁶⁾ および坂崎ら⁷⁾ によって論じられているが、それらの見解は必ずしも一致しない。われわれは BERGEY 8 版の分類に従って *Klebsiella pneumoniae* と分類した。いっぽう、*Klebsiella* 属をはじめ *Citrobacter* 属、*Proteus* 属の Indole 産生能と薬剤感受性については、最近、竹森⁸⁾らは臨床分離の *Klebsiella* 属の Indole positive strain (Gelatin の液化陽性株 91.8%) と Indole negative strain の抗生物質感受性を、3 濃度ディスク法で測定し、Indole negative strain と比較して Indole positive strain には CP, SM および TC 感受性株が多いと述べている。

また MARLYS⁹⁾ らは、 H_2S -Negative *Citrobacter* の抗生物質感受性を検討し、*Citrobacter freundii* の Indole positive strain と negative strain の間で ampicillin, carbenicillin の感受性に明らかな差異のあることを報告している。

われわれの行なった臨床分離 *Klebsiella* の寒天平板希釈法による MIC の測定結果では、Indole positive strain と Indole negative strain の間に、CEZ, CP および TC 感受性に著明な差異を認めた。すなわち Indole positive strain の全てが CP, TC に感受性で、CEZ 感受性株は 30% であった。いっぽう、Indole negative strain では CP, TC 感受性株はそれぞれ 33.3%, 27.5% であるのに対し、CEZ 感受性株は 84.1% であった。

要 約

BERGEY 第 8 版に準じて、*K. pneumoniae* と同定した臨床分離 168 株のうち、Indole 産生能をもち、Gelatin を液化しない菌株が 30 株 (18%) 存在し、それらは Indole 産生能のない 138 株 (82%) と比較して抗生物質感受性が顕著に異なることを認めた。

Indole 非産生の菌株は CEZ および KM に高い感受性をもち、138 株のうち 84.1% は両抗生物質の 6.25 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下の濃度で増殖が完全に阻止された。しかし Indole 産生の 30 株は CEZ 感受性が多様で、それらの 30% が感受性、53% が中等度耐性、17% が高度耐性であった。

両群の *K. pneumoniae* の CP および TC 感受性は、CEZ の場合とは逆の傾向を示した。すなわち CP および TC は Indole positive なすべての株の増殖を 6.25 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下の濃度で完全に阻止したが、Indole negative な株に対する作用は一定したものではなかった。

また *K. pneumoniae* の CER および CET 感受性は CEZ および CP, TC でみられたような Indole 産生能との相関性はなかった。

稿を終るに当たり、本実験に御援助をいただいた当研究所 中野所長および熊田副所長に感謝します。

また実験に協力いただいた恵木由美子および山本きみよの両嬢に感謝します。

文 献

- 1) BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. (1974)
- 2) COWAN, S. T.; K. J. STEEL, C. SHAW & J. P. DUGUID: A classification of the *Klebsiella* group. J. Gen. Microbiol. 23(3): 601~612 (1960)
- 3) COWAN, S. T.: Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. (1974) 坂崎利一訳; 医学細菌同定の手びき
- 4) SLOPEK's & I. DURLAKOWA: Studies on the taxonomy of *Klebsiella bacilli*. Arch. Immunol. Ther. Exp. 15(4): 481~487 (1967)
- 5) BASCOM, S.; S. P. LAPAGE, W. R. WILLCOX & M. A. CURTIS: Numerical classification of the tribe Klebsiellae. J. Gen. Microbiol. 66(6): 279~295 (1971)
- 6) EDWARDS, P. R. & W. H. EWING: Identification of Enterobacteriaceae. 2nd ed. 中谷林太郎, 坂崎利一訳; 腸内細菌同定法 (1964)
- 7) 坂崎利一: 腸内細菌学講座 (理論編) 1, A. 概論 Media circle 17(3): 107~112 (1972)
- 8) 竹森絃一, 他: 臨床材料から分離された *Klebsiella* 属の分類 (第 1 報)。臨床検査 19(1): 72~75 (1974)
- 9) LUND MARLYS, E.; JOHN M. MATSEN & DONNA J. BLAZEVIC: Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H_2S -negative *Citrobacter*. Appl. Microbiol. 28(1): 22~25 (1974)

STUDIES ON RELATIONSHIP BETWEEN INDOLE PRODUCTION AND
ANTIBIOTIC-SUSCEPTIBILITY OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

HIDEO ASANO, TOSHIAKI KAMIMURA, YOSHIKO YOKOTA
and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

The 168 clinical isolates of *K. pneumoniae* were tested on biochemical property and antibiotic-susceptibility. On the basis of the indole reaction, 30 isolates (18%) were indole-positive and 138 isolates (82%) were indole-negative. A significant difference in antibiotic-susceptibility was found in each of the two isolates. Of indole-negative isolates, 84.1% was susceptible to CEZ at 6.25 $\mu\text{g/ml}$ or lower, while indole-positive isolates showed variable susceptibility to CEZ; 30%-susceptible, 53%-moderately resistant and 17%-highly resistant. All of the indole-positive isolates were susceptible to CP and TC, but the indole-negative isolates were varied in susceptibility to CP and TC. There was no relationship between the indole production and the susceptibilities to CER and CET in *K. pneumoniae* studied.

It appears that the indole reaction is directly related to the susceptibility of *K. pneumoniae* to CEZ, CP and TC.