

Clindamycin に対する *Bacteroides fragilis*

の耐性獲得に関する研究 第1報

Clindamycin 服用による糞便内の Clindamycin 耐性

Bacteroides fragilis の出現

今 村 博 務

岐阜大学医学部微生物学教室

(主任 鈴木祥一郎教授)

(昭和 51 年 10 月 4 日受付)

Clindamycin (CLDM) は好気性グラム陽性菌およびほとんどすべての嫌気性菌に強い抗菌作用を有している。したがって多くの感染症において、とくに嫌気性菌感染症においてすぐれた化学療法剤として推奨されている。いっぽう、CLDM に対する嫌気性菌の耐性獲得については、きわめて少ないとされている^{1,2)}。

ところが著者は CLDM を服用したことのある成人の糞便から CLDM 耐性の *B. fragilis* を多数分離した。よって CLDM 服用歴のまったくないヒトにおいて、CLDM 服用と CLDM 耐性嫌気性菌の出現頻度についても検討を行なった。さらにヒトの糞便内の CLDM 耐性 *B. fragilis* が 1~2 年後にどのようなになっているかについても検討したので報告する。

実験材料および方法

1) 糞便からの *B. fragilis* の分離および同定

対象：25 歳~45 歳までの健康成人男子 5 名を対象とした。これらの対象者は当研究室における研究者であって、薬剤服用歴の明確な者である。5 名のうち 2 名は実験以前には CLDM の服用歴はまったくなく、残りの 3 名は過去 1 年以内に CLDM の服用歴を有していた。

糞便内嫌気性菌の定量培養法：自然排便便を試料とした。重量の明らかな試験管に排泄後 30 分以内の糞便の約 1g 量を取り、秤量後希釈液³⁾で 10^{-9} 倍まで 10 倍希釈系列を作製した。 10^{-5} 倍~ 10^{-9} 倍までの希釈液の 0.1 ml を後述の各平板培地に塗抹した。

使用培地：GAM 寒天培地、バクテロイデス培地および変法 FM 培地 (以上“ニッスイ”) を用いた。また糞便内 CLDM 耐性菌分離のスクリーニング用には、CLDM を 50 μ g/ml に含む GAM 寒天培地、バクテロイデス培地および変法 FM 培地を用いた。

嫌気培養法：スチールウール法を用いた。ガス環境は CO_2 10~20%, N_2 80~90% を用い、原則として 37°C で 48 時間培養した。

B. fragilis の同定：VPI manual⁴⁾ にしたがって菌種

を同定した。ただし性状検査は教室常用の方法によった⁵⁾。

2) CLDM 服用と糞便中の CLDM 耐性菌の出現

CLDM を未だ服用したことのない成人男子 (27 歳) が 1 日 900 mg, 7 日間経口投与され、服用直前と服用後 3 日目の自然排出糞便を検査した。

3) 薬剤感受性測定

薬剤を含有しない GAM 寒天培地から分離された嫌気性菌について、agar dilution method⁶⁾ で MIC を測定した。薬剤には力価の明らかな CLDM, Lincomycin (LCM) [以上 Upjohn], Erythromycin (EM) [塩野義製薬] を用いた。

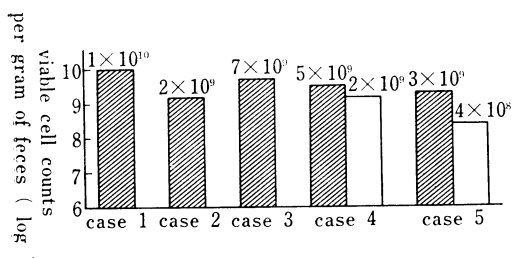
4) CLDM 耐性の *B. fragilis* ヒト腸管内での菌数の変動について

CLDM 耐性の *B. fragilis* を保有している成人男子 2 名 (27 歳および 45 歳) について、それぞれ 1 年および 2 年経過したのち、同一被検者の糞便内の CLDM 耐性 *B. fragilis* の菌数の変動を検討した。もちろんその間この 2 名は CLDM および LCM をまったく服用していない。

実験成績

1) 糞便から CLDM 耐性 *B. fragilis* の分離

CLDM 服用歴のまったくない 2 名では CLDM 不含 GAM 寒天培地で、糞便 1g あたり 10^9 ~ 10^{10} 個の *B. fragilis* が分離されたが、50 μ g/ml CLDM 含有 GAM 寒天培地には糞便 1g あたり 10^6 個以下であって、糞便中の CLDM 耐性嫌気性菌数は少ないことが判明した。しかし服用歴のある 3 名のうち、実験の約 1 年前に 1 日 900 mg, 7 日間以上服用した 2 名からは CLDM 含有 GAM 寒天培地に、糞便 1g あたり 10^8 ~ 10^9 個の CLDM 耐性 *B. fragilis* が分離された。いっぽう CLDM 不含 GAM 寒天培地から求められた、これらの糞便中の *B. fragilis* の総菌数は 1g あたり 10^9 個であって、糞便内の *B. fragilis* のほとんどが CLDM 耐性である

Fig. 1 Isolation of clindamycin resistant strains of *B. fragilis* from human feces

■ on GAM plate

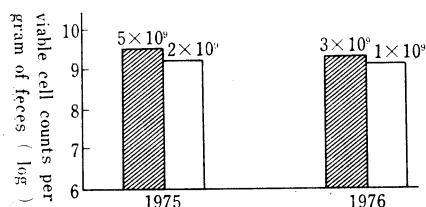
□ on GAM plate containing 50 µg of clindamycin per ml

History of administration of clindamycin

case 1, case 2: none

case 3: 900 mg per day for 2 days about one year ago

case 4, case 5: 900 mg per day for more than 7 days about one year ago

Fig. 2 Isolation of clindamycin resistant *B. fragilis* before and after administration of clindamycin 900 mg per day for 7 days

■ on GAM plate

□ on GAM plate containing 50 µg of clindamycin per ml

ことを知った。しかし実験の約1年前に1日900 mg, 2日間の服用歴しか有しない1名では, CLDM 耐性嫌気性は糞便 1g あたり 10^6 個以下であって, 本実験方法では検出できなかった (Fig. 1)。

2) 糞便由来の *B. fragilis* の CLDM, LCM および EM に対する感受性

CLDM 服用歴のある対象者 Case 3 (1日 900 mg, 2日間服用) および Case 5 (1日 900 mg, 7日間以上服用) の糞便中から分離した *B. fragilis* のうち, 任意に選んだ菌株の3薬剤に対する感受性を MIC で示した。対象者 Case 3 から分離された *B. fragilis* 8 株に対する CLDM の MIC は $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。また同一株に対して LCM は $3.13 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ の MIC を

Table 1 Susceptibility of the isolates from case 3 against clindamycin (CLDM), lincomycin (LCM) and erythromycin (EM)

Organism**	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CLDM	LCM	EM
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	0.19	3.13	3.13
" ss <i>vulgatus</i>	0.39	12.5	3.13
" "	0.39	12.5	3.13
" "	0.39	12.5	6.25
" "	0.19*	6.25	1.56
" "	0.39	12.5	1.56
" "	0.39	12.5	3.13
" ss <i>distasonis</i>	0.78	6.25	6.25

* less than 0.19

** These eight strains were isolated on GAM plate without clindamycin.

Table 2 Susceptibility of the isolates from case 5 against clindamycin (CLDM), lincomycin (LCM) and erythromycin (EM)

Organism**	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CLDM	LCM	EM
<i>B. fragilis</i> ss <i>fragilis</i>	100*	100*	100*
" "	100*	100*	100*
" ss <i>vulgatus</i>	100*	100*	100*
" "	100*	100*	100*
" ss <i>distasonis</i>	0.39	6.25	6.25
<i>Bacteroides</i> sp.	100*	100*	100*
"	100*	100*	100*

* 100 or more

** These seven strains were isolated on GAM plate without clindamycin.

示し, EM は $1.56 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示した (Table 1)。いっぽう, 対象者 Case 5 から分離された *B. fragilis* 7 株のうち6株に対して, CLDM は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。これらの菌株は LCM および EM にも $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した (Table 2)。すなわち CLDM 耐性菌は同時に LCM および EM に対しても交叉耐性を示した。

3) CLDM 服用と糞便中の CLDM 耐性 *B. fragilis*

CLDM の服用歴がまったくなく, 糞便内の *B. fragilis* が CLDM に対して感受性である対象者 Case 2 に CLDM を1日 900 mg, 7日間経口投与し, 投与中止後3日目の糞便内の CLDM 耐性 *B. fragilis* の増加を検討した。Fig. 2 のとおり, 投与前では *B. fragilis* をはじめ他のすべての嫌気性菌の CLDM 耐性菌の菌数は,

Fig. 3 Distribution of MTC against clindamycin of *B. fragilis* strains isolated from feces before and after clindamycin administration

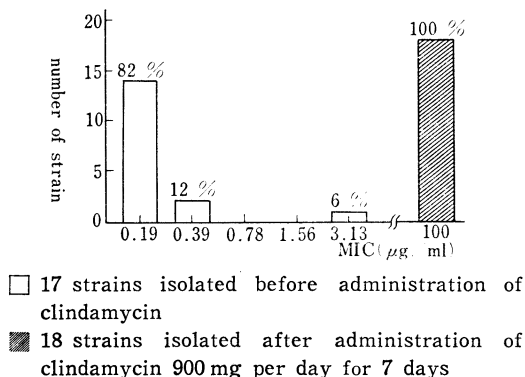
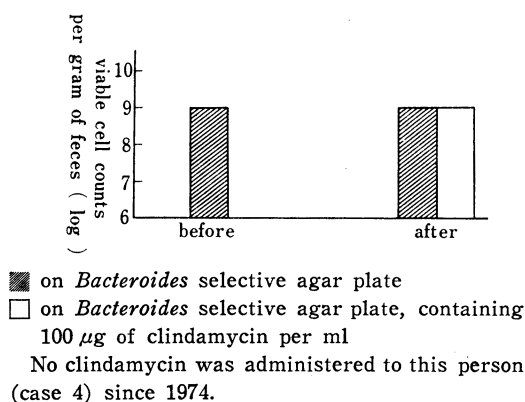


Fig. 4 Isolation (persistence) of clindamycin resistant *B. fragilis* from case 4 in 1975 and 1976

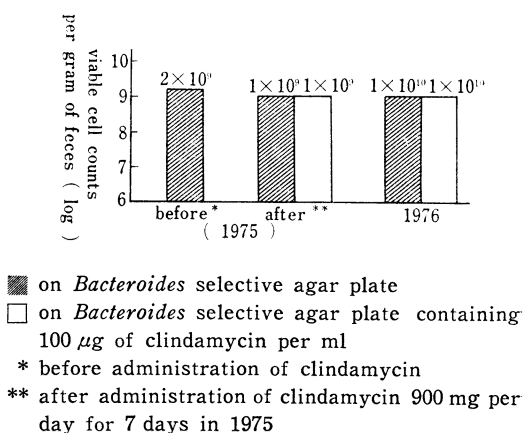


糞便 1g あたり 10^6 個以下で検出することができなかった。しかし投与後では糞便 1g あたり 10^9 個に検出することができた。すなわち、糞便の最高希釈液を CLDM 不含 GAM 寒天培地に培養して発育した集落のうち、*B. fragilis* と同定された 18 株はすべて CLDM に対して 100 µg/ml 以上の MIC を示した。いっぽう、投与前の糞便最高希釈液から分離された *B. fragilis* 17 株はすべて 3.13 µg/ml 以下の MIC を示していた (Fig. 3)。すなわち、CLDM のわずか 7 日間の経口投与によって、糞便内のすべての *B. fragilis* は 100 µg/ml 以上の高度耐性菌となった。

4) ヒト腸管内の CLDM 耐性 *B. fragilis* の変動について

これまでの実験で、CLDM の 1日 900 mg, 7 日間の投与によって、腸管内 normal flora 中のほとんどすべての *B. fragilis* は容易に 100 µg/ml 以上の耐性菌と

Fig. 5 Isolation (persistence) of clindamycin resistant *B. fragilis* from case 2 in 1975 and 1976



なることが明らかとなった。この CLDM 耐性 *B. fragilis* の菌数の変動を 1~2 年にわたって追求した。対象者 Case 4 および Case 2 は実験の期間中 (1~2 年間) は CLDM および LCM の服用はまったくない。

その結果、Case 4 では 2 年後の現在も依然として、糞便中の normal flora はほとんどすべてが 100 µg/ml 以上の CLDM 耐性 *B. fragilis* によって構成されている (Fig. 4)。また Case 2 では CLDM 服用 1 年後の現在においても糞便中の normal flora はすべて 100 µg/ml 以上の CLDM 耐性の *B. fragilis* によって構成されている (Fig. 5)。すなわち、CLDM 服用によって腸管内で容易に CLDM 耐性菌となった *B. fragilis* は、1 年および 2 年後においても耐性を保持し、きわめて安定であることが明らかとなった。

考 察

CLDM は *B. fragilis* に対して *in vitro* で強い抗菌力を示す。SUTTER⁷⁾ らは臨床材料分離株および化学療法剤を服用したことのないヒトの糞便由来の *B. fragilis* 117 株を用いて、CLDM に対する感受性値を測定し、全株 12.5 µg/ml で発育が阻止されたと報告した。また二宮⁸⁾ らも *B. fragilis* 37 株の CLDM に対する感受性を測定し、全株 6.25 µg/ml で発育が阻止されたと報告した。こうして CLDM は嫌気性菌感染症に対してすぐれた化学療法剤として推奨されている。また、望月⁹⁾ らは CLDM 服用により嫌気性菌の菌数は変動しないが、耐性菌はふえたと報告した。この望月らの知見にもとづいて、CLDM の服用歴の有無と糞便中の CLDM 耐性 *B. fragilis* の出現状況を検討した。CLDM 服用歴のある 3 名のうち、1日 900 mg, 7 日間以上の服用歴のある 2 名から CLDM 高度耐性の *B. fragilis* を多数分離した。

なお、この CLDM 耐性の *B. fragilis* は LCM および EM にも交叉耐性を有し、それぞれ CLDM と同様 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。CLDM 服用歴のまったくない2名と、1日 900 mg, 2日間の服用歴しか有しない1名からは、CLDM 耐性の *B. fragilis* は分離できなかった。したがって、CLDM の7日間以上の経口投与によって、糞便内の *B. fragilis* は CLDM に対して 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性となったと考えられた。そこで CLDM の服用歴のないことが明確な当教室内の研究者に CLDM を1日 900 mg, 7日間服用させ、糞便中の CLDM 耐性 *B. fragilis* の出現状況を検討した。その結果、CLDM 服用により糞便内の *B. fragilis* は容易に高度耐性となることが明らかとなった。今回の実験で、CLDM 耐性菌の出現は嫌気性菌のなかで、*B. fragilis* においてもっともはやく行なわれるものと考えられた。すなわち、*B. fragilis* 以外の他の菌種あるいは他の嫌気性菌の高度耐性菌株を検出することはできなかった。望月⁹⁾らは *in vitro* の実験で *Fusobacterium varium* は CLDM に対して比較的はやく耐性となることを認めている。著者の実験においては糞便内から検出した *F. varium* はすべて CLDM 感受性で、CLDM 耐性の *F. varium* は検出できなかった。

また、CLDM 服用によって CLDM 耐性の *B. fragilis* を腸管内に保有している2名について、それぞれ1年および2年経過後の追跡実験を行なったところ、糞便内の normal flora は依然として CLDM 高度耐性の *B. fragilis* によって構成され、きわめて安定であることが明らかとなった。*B. fragilis* は嫌気性菌感染症の起因菌となることが多いが、今後 CLDM 耐性の *B. fragilis* の増加が考えられる。したがって一般の感染症における化学療法に CLDM の使用は慎重でなければならない。

結 論

1) CLDM の1日 900 mg, 7日間の服用により、ヒト腸管内の *B. fragilis* は CLDM に対し高度耐性となった。CLDM 服用歴のまったくない者および2日間の服用歴しか有しない者の糞便内 *B. fragilis* は CLDM

に対し感受性であった。

2) CLDM 耐性の *B. fragilis* は LCM および EM にも 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の交叉耐性を有した。

3) CLDM 服用によるヒト腸管内の CLDM 耐性嫌気性菌の出現は *B. fragilis* において、もっともはやくみられると考えられる。

4) CLDM に対し高度耐性となったヒト腸管内の *B. fragilis* はきわめて安定で、1年および2年後にも高度耐性と、normal flora の最優位菌数を保持していた。

文 献

- 1) BARTLETT, J. G.; V. L. SUTTER & S. M. FINEGOLD: Treatment of anaerobic infections with lincomycin and clindamycin. New Engl. J. Med. 287: 1006~1010, 1972
- 2) BLAZEVIC, D. J.: Antibiotic susceptibility of the subspecies of *Bacteroides fragilis*. Agents Chemoth. 9: 481~484, 1976
- 3) 小酒井 望・鈴木祥一郎編: 嫌気性菌と嫌気性菌症。医学書院, 1968
- 4) HOLDEMAN, L. V. & W. E. C. MOORE: Anaerobe Laboratory Manual. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State Univ., 1972
- 5) 岐阜大学医学部微生物学教室編: 臨床嫌気性細菌学。1976
- 6) 渡辺邦友: 嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について, 第2報, 再現性について。Chemotherapy 22: 1495~1501, 1974
- 7) SUTTER, V. L.; Y. KWOK & S. M. FINEGOLD: Susceptibility of *Bacteroides fragilis* to six antibiotics determined by standardized antimicrobial disc susceptibility testing. Antimicrob. Agents & Chemoth. 3: 188~193, 1973
- 8) 二宮敬宇・渡辺邦友・上野一恵・鈴木祥一郎・毛泉・坂 義人・清水保夫・磯貝和俊・西浦常雄: Lincomycin と Clindamycin の嫌気性菌に対する抗菌作用。Jap. J. Antibiotics 26: 157~162, 1973
- 9) 望月 泉・清水保夫・磯貝和俊・西浦常雄・二宮敬宇・渡辺邦友・三和敏夫・上野一恵・鈴木祥一郎: Lincomycin と Clindamycin の嫌気性菌に対する抗菌作用: 統報。Chemotherapy 22: 1052~1057, 1974

ACQUIREMENT OF RESISTANCE TO CLINDAMYCIN IN *BACTEROIDES FRAGILIS*. I

Appearance of Clindamycin Resistant *B. fragilis* in Human
Feces Administered Clindamycin

HIROMU IMAMURA

Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

A number of clindamycin resistant *B. fragilis* were isolated from feces of two subjects, who had been administered clindamycin in the past twelve months. These strains showed MIC of 100 μ g per ml or more and cross resistance to both lincomycin and erythromycin. In neither of the two subjects without the past experience of clindamycin therapy was there evidence of resistant *B. fragilis*.

Clindamycin (900 mg per day for a week) was given to a volunteer who had never been administered this drug in the past. Clindamycin resistant strains of *B. fragilis* were developed in his feces. These strains remained resistance to clindamycin after two years.

It was suggested in this studies that *B. fragilis* tends to readily acquire drug resistance to clindamycin.