

実験的菌交代現象に関する研究 I

In vitro: 大腸菌, 緑膿菌およびセラチアの混合培養系における実験条件の設定,
および β -lactam 系抗菌薬添加による生菌数の変動

辻 明良・小川正俊・金子康子・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 54 年 10 月 19 日受付)

緑膿菌やセラチアの感染が β -lactam 系抗菌薬の投与後に起る例の多いことが知られており、このことは緑膿菌やセラチアが多くの β -lactam 系抗菌薬に対し耐性であるための菌交代現象あるいは菌交代症と考えられている。

このような現象を大腸菌と緑膿菌の生態学的研究を基礎とした *in vitro* の実験的菌交代現象によって解析し、以下の結果を得た。

大腸菌と緑膿菌との混合培養で、大腸菌は緑膿菌の菌量の多少にかかわらず、単独培養時の増殖パターンと同じであるが、緑膿菌の場合は大腸菌の菌量が多いかあるいは同量であっても、培養の過程で増殖を抑制され、単独培養時の増殖曲線より下まわるカーブをえがいた。

大腸菌とセラチアとの混合培養では、大腸菌の菌量が多いかあるいは同等の場合、セラチアの増殖は単独培養の時と比べ抑制されるが、大腸菌の増殖は変化をうけない。しかしセラチアの菌量が多い場合、大腸菌の増殖は影響をうけ、単独培養時と比べ抑制された。

2 菌種の組合せ、すなわち大腸菌と緑膿菌、大腸菌とセラチアおよび大腸菌、緑膿菌、セラチアの 3 菌種混合培養にそれぞれ β -lactam 系抗菌薬を添加すると、大腸菌の増殖が抑えられ、菌数が減少するにしたがい、緑膿菌およびセラチアの増殖が促進された。

β -lactam 系抗菌薬添加による大腸菌から緑膿菌、大腸菌からセラチアへの実験的菌交代現象はそれぞれの菌の MIC 値の開きが大きい薬剤ほど菌交代を起しやすいことを実証した。

I はじめに

臨床各科領域において、グラム陰性桿菌による感染症が増加し、その原因菌として *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* などが分離されており、とくに *P. aeruginosa*, *Serratia* の感染が β -lactam 系の Penicillin 剤, Cephalosporin 剤などの投与後に起る例の多いことが報告されている¹⁻³⁾。このことはこの種の薬剤が *P. aeruginosa* や *Serratia* に抗菌作用を示さないための菌交代現象と考えられる。

1947 年 WEINSTEIN⁴⁾, 1952 年 BRISOU⁵⁾, 1969 年 FINLAND⁶⁾ 等による抗生物質投与後の菌交代現象および菌交代症に関する報告以来、国内、国外ともこの種の臨床報告が多い⁷⁻¹⁴⁾。しかし、その多くは臨床の見地からの原因の究明と対策であり、基礎的に菌交代現象を検討している研究は数少ない^{15,21)}。

私共は菌交代現象を *in vitro*, *in vivo* の両面から基礎的に解析するため、まず *in vitro* 実験系を設定した。2 種以上の菌の混合培養における状態を観察するため、

グラム陰性桿菌感染の中で、もっとも分離頻度の高い *E. coli* と菌交代現象によって出現しやすい *P. aeruginosa* および *Serratia* を選び、その単独、混合培養における β -lactam 系抗菌薬 (Cephalothin, Cefazolin, Cephalixin, Ampicillin) の生菌数にあたる影響をしらべ、菌交代の可能性を検討した。

II 実験材料および実験方法

1. 実験材料

1) 使用培地

増殖用: 普通ブイヨン栄研を用いた。

分離用: *E. coli* と *P. aeruginosa*, *Serratia* の分離用培地として、ドリガルスキー改良培地(BTB 培地)“栄研”および Cephalexin 10 μ g/ml を含む BTB 培地を併用して用いた。

2) 使用菌株: *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 および *S. marcescens* 16 を混合培養の試験菌として用いた。また、感受性測定には上記 3 菌株のほか、患者材料から分離した *P. aeruginosa* 18 株および

S. marcescens 19 株を使用した。

3) 使用薬剤

Cephalothin (以下 CET, 930 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 塩野義製薬

Cefazolin (以下 CEZ, 933 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 藤沢薬品

Cephalexin (以下 CEX, 930 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 鳥居薬品

Ampicillin (以下 ABPC, 911 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 藤沢薬品

Carbenicillin (以下 CBPC, 790 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 藤沢薬品

2. 実験方法

1) 感受性測定法

日本化学療法学会標準法¹⁶⁾に準じて測定した。すなわち、測定用培地として普通寒天培地“栄研”を使用し、接種菌量は普通ブイオン“栄研”に 37°C 18 時間培養した菌液を約 10^8 cells/ml および約 10^6 cells/ml になるよう調製し、その 1 白金耳量を薬剤含有寒天平板上に接種し、37°C 18~20 時間培養後、菌の発育の有無をもって薬剤の MIC (minimum inhibitory concentration) を判定した。なお、臨床分離の *P. aeruginosa* および *S. marcescens* では接種菌量を 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml および 10^3 cells/ml の 3 段階とした。

2) 分離用培地の検討

E. coli NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 を試験菌とし、普通ブイオン“栄研”で 37°C 18 時間培養した菌液をそれぞれ単独および等量混合した場合の菌数を下記の 5 種の培地を用いて測定した。

(1) BTB 培地“栄研”

(2) DHL 培地“栄研”

(3) Mac Conkey 培地“栄研”

(4) SS 培地“栄研”

(5) NAC 寒天培地“栄研”

なお、対照として普通寒天培地“栄研”を使用した。

同様な方法を用いて *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* 16 の場合について BTB 培地, DHL 培地, Mac Conkey 培地を用いて検討した。

3) 混合培養における生菌数測定による増殖曲線

a) 接種菌量の検討

E. coli NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* IFO 3445 株を用い、普通ブイオンに 37°C 18 時間培養した菌液を下記の菌量の組合せ (1), (2), (3) になるよう普通ブイオンに接種し、37°C で振盪培養した。菌接種後、2, 4, 8, 12 および 20 時間目に *E. coli*, *P. aeruginosa* のそれぞれの生菌数を BTB 培地および CEX 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む BTB 培地を用いて測定した。

同時に対照として、*E. coli*, *P. aeruginosa* のそれぞれ 10^6 cells/ml および 10^8 cells/ml 接種した単独培養についても同様に測定した。

混合培養における接種菌量の組合せ

(1) *E. coli* 10^6 cells + *P. aeruginosa* 10^8 cells/ml

(2) *E. coli* 10^8 cells + *P. aeruginosa* 10^8 cells/ml

(3) *E. coli* 10^8 cells + *P. aeruginosa* 10^6 cells/ml

また、*E. coli* NIHJ JC-2 と *S. marcescens* 16 株を用い、上記と同様の方法を用いて検討した。

b) 各種培地の検討

培地として、普通ブイオン“栄研” pH 6.8, プレンハートインフュージョンブロス“栄研” pH 7.0, 健康ヒト尿 pH 7.2, 0.5% ブドウ糖加ペプトン水(ペプトン 10g, NaCl 5g, ブドウ糖 5g/l pH 6.8) および合成培地 (KH_2PO_4 3g, NaCl 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15g, Mg \cdot SO $_4$ 0.01g, NH_4Cl 1.8g, ブドウ糖 10g/l pH 6.8) の 5 種類を用いた。なお、ヒト尿, 0.5% ブドウ糖加ペプトン水および合成培地はミリポアフィルターによる無菌濾過をおこない使用した。

1 夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 をそれぞれ約 10^6 cells/ml・ 10^8 cells/ml になるよう 5 種の培地に混合接種し、37°C で振盪培養した。接種後 2, 5, 9 および 24 時間目にそれぞれの生菌数を前述の方法で測定した。また同時に *E. coli*, *P. aeruginosa* の 10^8 cells/ml および 10^3 cells/ml 接種した単独培養についても同様に測定した。

4) 薬剤添加による生菌数の変動

37°C 18 時間培養した *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 をそれぞれ約 10^6 cells/ml, 10^8 cells/ml になるよう混合接種した普通ブイオンに CET, CEZ, CEX および ABPC をそれぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、37°C で振盪培養した。菌接種後 2, 4, 8, 12 および 20 時間目にそれぞれの生菌数を測定し、同時に単独培養についても同様に測定した。

また、*E. coli* NIHJ JC-2 (約 10^6 cells/ml) と *S. marcescens* 16 (約 10^8 cells/ml) の 2 種混合、および *E. coli* NIHJ JC-2 (約 10^6 cells/ml) と *P. aeruginosa* IFO 3445 (約 10^8 cells/ml), *S. marcescens* 16 (約 10^8 cells/ml) の 3 種混合接種したブイオンに上記抗生剤を添加した場合についても、前述の方法にてそれぞれの生菌数を測定した。

III 実験成績

まず、*E. coli* から *P. aeruginosa* あるいは *E. coli* から *S. marcescens* への量的菌交代現象を、もつとも観察しやすい実験条件で行うため、培養条件および測定条件の検討を行った。その成績から最良の条件を選定し、ついで 2 菌種および 3 菌種混合培養での β -lactam 系抗菌薬添加の影響を生菌数測定による増殖曲線の変動から検討した。下記の順序に従い、その成績を記述す

る。

1. 実験条件の設定

1) 混合培養菌液からそれぞれの生菌数測定を同時に行うための培地の検討

2) 混合培養系における接種菌量の検討

(1) *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養

(2) *E. coli* と *S. marcescens* の混合培養

3) 混合培養液体培地の検討

4) 薬剤感受性

(1) 標準株の感受性

(2) 臨床分離株の感受性

2. β -lactam 系抗菌薬添加による生菌数の変動

1) 単独培養

2) 混合培養

(a) *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養

(b) *E. coli* と *S. marcescens* の混合培養

(c) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* の 3

種混合培養

1. 実験条件の設定

1) 混合培養からの各菌種の生菌数測定を同時に行うための培地の検討

大腸菌と緑膿菌または大腸菌とセラチアの2菌種を混合培養したものから、それぞれの生菌数測定により増殖状況を比較するには、(1) 大腸菌と緑膿菌およびセラチアのすべての生菌が増殖し、(2) それぞれの集落が明瞭に区別できることを条件にみえず培地が必要である。

E. coli NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 を普通ブイヨンで 37°C 18 時間培養した菌液を用い、それぞれ単独および等量混合した場合の生菌数を BTB 培地, DHL 培地“栄研”, Mac Conkey 培地“栄研”, NAC 寒天培地“栄研”を用いて測定した成績を Table 1 に示した。

普通寒天培地での集落数を 100 とした場合, BTB 培地での集落数が最も近く 97~100 を示し, 他の DHL

Table 1 Evaluation of selective media for viable counting of each species in mixed cultures (1)
organism : *E. coli* NIHJ JC-2
P. aeruginosa IFO 3445

Organism Medium	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445		Mixed(1 : 1)			
					<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	
Nutrient agar	7.3×10 ⁸	100	1.2×10 ⁹	100	1.1×10 ⁹			
					(3.7×10 ⁸)*	100	(6.0×10 ⁸)*	100
BTB agar	7.4×10 ⁸	100	1.2×10 ⁹	100	3.6×10 ⁸	97	5.8×10 ⁸	100
DHL agar	2.2×10 ⁸	30	4.0×10 ⁸	33	1.1×10 ⁸	30	2.3×10 ⁸	38
Mac Conkey agar	2.6×10 ⁸	35	5.6×10 ⁸	46	1.1×10 ⁸	30	1.7×10 ⁸	28
SS agar	2.7×10 ⁷	4	1.2×10 ⁸	10	2.8×10 ⁷	8	1.8×10 ⁷	3
NAC agar	—	—	2.0×10 ⁸	17	—	—	8.4×10 ⁷	14

* theoretical value

Table 2 Evaluation of selective media for viable counting of each species in mixed cultures (2)
organism : *E. coli* NIHJ JC-2
S. marcescens 16

Organism Medium	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>S. marcescens</i> 16		Mixed(1 : 1)			
					<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>S. marcescens</i> 16	
Nutrient agar	7.3×10 ⁸	100	1.8×10 ⁹	100	1.1×10 ⁹			
					(2.3×10 ⁸)*	100	(9.0×10 ⁸)*	100
BTB agar	7.4×10 ⁸	100	1.7×10 ⁹	94	2.2×10 ⁸	96	8.7×10 ⁸	97
DHL agar	2.2×10 ⁹	30	1.5×10 ⁹	83	not selected total cell counts 4.8×10 ⁸			
Mac Conkey agar	2.6×10 ⁸	35	1.2×10 ⁹	67	3.6×10 ⁷	16	4.3×10 ⁸	48

* theoretical value

培地, Mac Conkey 培地, SS 寒天培地, NAC 寒天培地では 4~44 で, 培地の選択成分のため発育が抑制され, 集落数は実際の菌数より少く表現された。緑膿菌の分離培地である NAC 培地では大腸菌は増殖できないが, 緑膿菌も 1/10 程度抑制された。以上の成績から, 大腸菌と緑膿菌混合培養からの生菌数測定には BTB 培地が適しており, 乳糖分解菌である大腸菌は黄色の集落, 非分解菌である緑膿菌は無色の集落を形成するので肉眼的に識別が容易である。

同様に大腸菌とセラチアでの成績を Table 2 に示したが, この場合も BTB 培地が発育菌数, 両菌種の識別の上から, もっとも適していると判断された。今回用いたセラチアは色素産生株を用いたので, 培地上での大腸菌とセラチアの識別は明瞭であり, またセラチアの色素非産生株を用いた場合も集落の所見から大腸菌との識別は可能である。

大腸菌が多量存在し, 緑膿菌またはセラチアが少ない場合, 緑膿菌, セラチアの菌数測定には BTB 培地に CEX 10 µg/ml 添加すると大腸菌の発育が抑制され, 緑膿菌, セラチアには影響がなく, 両菌の菌数測定用として適していることを確認した。

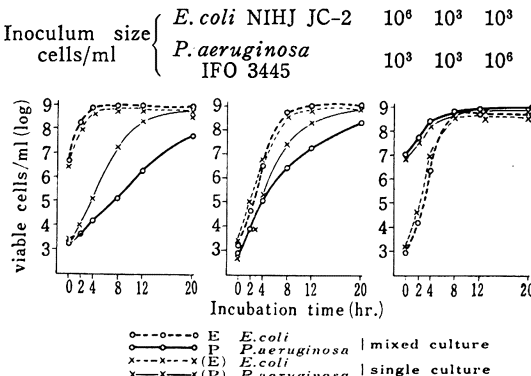
2) 混合培養系における接種菌量の検討

(1) *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養における増殖パターン

E. coli NIHJ JC-2 と *P. aeruginosa* IFO 3445 の混合培養を下記の接種菌量の組合せによって行い, その増殖パターンを Fig. 1 に示した。

- (a) *E. coli* 10⁶ cells/ml + *P. aeruginosa* 10³ cells/ml
- (b) *E. coli* 10³ cells/ml + *P. aeruginosa* 10³ cells/ml
- (c) *E. coli* 10³ cells/ml + *P. aeruginosa* 10⁶ cells/ml

Fig. 1 Growth curves of *E. coli* and *P. aeruginosa* in mixed cultures.



E. coli 10⁶ cells/ml と *P. aeruginosa* 10³ cells/ml の混合培養において, *E. coli* の増殖は単独培養での場合と同程度であるが, *P. aeruginosa* の増殖は *E. coli* の影響を受け, 単独培養時と比べ抑制されていた。

E. coli 10³ cells/ml と *P. aeruginosa* 10³ cells/ml での混合培養では *E. coli* の増殖は単独培養と同程度の増殖を示し, *P. aeruginosa* の増殖は *E. coli* が対数期に入る接種 4 時間目以降から, 単独培養でのそれと比べ抑制されていた。

E. coli 10³ cells/ml と *P. aeruginosa* 10⁶ cells/ml の混合培養では *P. aeruginosa* の菌数が多いにもかかわらず, *E. coli* の増殖は影響を受けず, 単独培養での増殖と同程度であった。

以上の結果から, *E. coli* と *P. aeruginosa* のそれぞれの組合せによる世代時間 (Generation time) を算出したのが Table 3 である。

E. coli では 10³ cells/ml 接種時の単独培養での generation time は 21.0 分であり, *P. aeruginosa* との混合培養で *P. aeruginosa* の菌量が多くても (10⁶ cells/ml), 少なくとも (10³ cells/ml) generation time に著明な変動はなかったが, *P. aeruginosa* は 10³ cells/ml 接種の単独培養時で 34.8 分, *E. coli* との混合培養では *E. coli* 10³ cells/ml で 49.3 分, 10⁶ cells/ml で 67.2 分と世代時間は著しく延長していた。

混合培養時には *E. coli* は *P. aeruginosa* の影響を受けにくく, *P. aeruginosa* は *E. coli* の影響を受けて増殖が抑制される現象が世代時間においても確認された。

(2) *E. coli* と *S. marcescens* の混合培養における増殖パターン

Table 3 Comparison of generation times of *E. coli* and *P. aeruginosa* in mixed cultures in response to the inoculum size

organism	culture	inoculum size	generation time
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	single culture	E ³	21.0 min.
	mixed culture	E ³ P ³	21.6
		E ³ P ⁶	21.2
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	single culture	P ³	34.8
	mixed culture	E ³ P ³	49.3
		E ⁶ P ³	67.2

Fig. 2 Growth curves of *E. coli* and *S. marcescens* in mixed cultures

Inoculum size { *E. coli* NIHJ JC-2 10⁶ 10⁸ 10⁹
 cells/ml { *S. marcescens* 16 10⁸ 10⁹ 10⁶

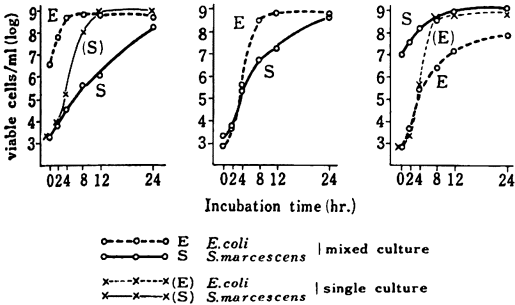


Table 4 Comparison of generation times of *E. coli* and *S. marcescens* in mixed cultures

E³ : *E. coli* NIHJ JC-2 10⁸ cells/ml
 E⁶ : *E. coli* NIHJ JC-2 10⁶ cells/ml
 S³ : *S. marcescens* 16 10⁸ cells/ml
 S⁶ : *S. marcescens* 16 10⁶ cells/ml

organism	culture	inoculum size	generation time
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	single culture	E ³	21.0 min.
	mixed culture	E ³ S ³	22.2
		E ³ S ⁶	45.5
<i>S. marcescens</i> 16	single culture	S ³	28.2
	mixed culture	E ³ S ³	47.3
		E ⁶ S ³	81.0

E. coli NIHJ JC-2 と *S. marcescens* 16 との混合培養による増殖パターンを、前述の *E. coli* NIHJ JC-2 と *P. aeruginosa* IFO 3445 の場合と同様の組合せで行った成績を Fig. 2 に示した。

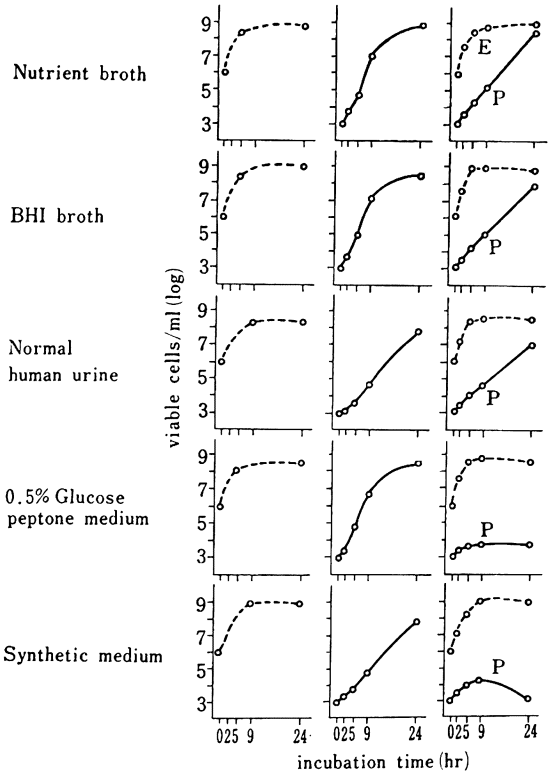
E. coli の菌量が *S. marcescens* のそれより多いか、同等の場合、*S. marcescens* の増殖は *E. coli* の影響を受け、単独培養時と比べ抑制されたが、*E. coli* の増殖は単独培養時とほぼ同レベルであった。しかし、*S. marcescens* の接種菌量が *E. coli* より多い場合、*E. coli* の増殖は単独培養時と比べ抑制された。

E. coli および *S. marcescens* を接種菌量 10⁸ cells/ml で行った場合のそれぞれの generation time を比較した成績を Table 4 に示した。

E. coli では 10⁸ cells/ml 単独培養の場合、21.0 分の generation time を示し、同量の *S. marcescens* との混合培養では 22.2 分であったが、*S. marcescens* の菌量を 10⁶ cells/ml とした場合では 45.5 分となり、単独

Fig. 3 Comparison of growth curves in single and mixed cultures in various culture media

Single culture Mixed culture
E. coli *P. aeruginosa* (*E. coli* / *P. aeruginosa*)



培養時と比べ発育は抑制された。*S. marcescens* では単独培養 (10⁸ cells/ml 接種) での generation time は 28.2 分であったが、*E. coli* との混合培養では *E. coli* の菌量が 10⁶ cells/ml となると generation time も著しく延長し、81.0 分となった。

3) 混合培養用液体培地の検討

P. aeruginosa や *S. marcescens* による菌交代現象は尿路感染での頻度が高いため、そこでヒト (健康人) 尿を含む 5 種の培地を用い、混合培養での増殖パターンをしらべたのが Fig. 3 である。なお、接種菌量は混合培養で *E. coli* NIHJ JC-2 と *P. aeruginosa* IFO 3445 の増殖パターンにおいて、もっとも差の著しい 10⁶ cells/ml (*E. coli*)、10⁸ cells/ml (*P. aeruginosa*) の組合せを用いた。

ヒト尿中における混合培養での増殖パターンは普通ブイヨン、BHI ブイヨンとはほぼ同じであった。また、合成培地 (1% ブドウ糖) と 0.5% ブドウ糖加ペプトン水での混合培養では *E. coli* によるブドウ糖分解のため、pH が低下し、*P. aeruginosa* の発育は著明に抑制

された。以上の実験成績から、今後実験に用いる培地は普通ブイヨンとした。

4) 薬剤感受性

(1) 標準株の感受性

混合培養の実験に用いた *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 および *S. marcescens* 16 の CET, CEZ, CEX, ABPC に対する感受性をしらべ、その成績

Table 5 Susceptibilities of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens* to β -lactam antibiotics
MIC: $\mu\text{g/ml}$

Test strain	i. s./ml*	CET	CEZ	CEX	ABPC
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	10^8	12.5	6.25	12.5	6.25
	10^6	6.25	3.13	6.25	3.13
<i>P. aerug.</i> IFO 3445	10^8	>3,200	>3,200	>800	3,200
	10^6	>3,200	>3,200	>800	400
<i>S. marces.</i> 16	10^8	>3,200	>3,200	>800	800
	10^6	>3,200	>3,200	800	25

* inoculum size cells/ml

を Table 5 に示した。

E. coli の CET, CEZ, CEX および ABPC の 4 剤に対する感受性はほとんど同じで、 10^6 cells/ml 接種で 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ を示し、*P. aeruginosa* では CET, CEZ は 3,200 $\mu\text{g/ml}$ 以上、CEX は 800 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示したが、ABPC では接種菌量が 10^6 cells/ml で 400 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。*S. marcescens* では CET, CEZ は 3,200 $\mu\text{g/ml}$ 以上、CEX は 800 $\mu\text{g/ml}$ 、ABPC は 25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC であった。

(2) 臨床分離株の感受性

患者材料から分離した *P. aeruginosa* の 18 株および *S. marcescens* の 19 株の CET, CEZ, CEX, ABPC および CBPC に対する感受性をしらべ、その成績を Table 6, Table 7 に示した。

P. aeruginosa において、CET, CEZ は接種菌量が減少しても感受性値に著明な変動は認められず、3,200 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した。ABPC, CBPC では菌量が 10^8 cells/ml のとき 3,200 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示したが、菌量が減少するにつれ MIC 値に変動がみられ、 10^8 cells/ml 接種の場合、ABPC の感受性ピークは 800 $\mu\text{g/ml}$ で、CBPC

Table 6 Susceptibility distribution of *P. aeruginosa* (clinical isolates)

Antibiotics	Inoculum: 10^8 cells/ml									
	≤ 25	50	100	200	400	800	1,600	3,200	3,200<	Total
CET									18	18
CEZ									18	18
CEX							18*			18
ABPC									18	18
CBPC									18	18

Antibiotics	: 10^6 cells/ml									
	≤ 25	50	100	200	400	800	1,600	3,200	3,200<	Total
CET									18	18
CEZ									18	18
CEX							18*			18
ABPC					1	2	1	13	1	18
CBPC	2	7	1	3	5					18

Antibiotics	: 10^8 cells/ml									
	≤ 25	50	100	200	400	800	1,600	3,200	3,200<	Total
CET								1	17	18
CEZ						1			17	18
CEX						1	17*			18
ABPC				2		10	4	2		18
CBPC	9	2	2	5						18

* : >800 $\mu\text{g/ml}$

Table 7 Susceptibility distribution of *S. marcescens* (clinical isolates)

Antibiotics	Inoculum : 10 ⁸ cells/ml											Total
	≤6. 25	12. 5	25	50	100	200	400	800	1, 600	3, 200	3, 200<	
CET											19	19
CEZ											19	19
CEX									19*			19
ABPB									1	1	17	19
CBPC											19	19

: 10⁸ cells/ml

Antibiotics	Inoculum : 10 ⁸ cells/ml											Total
	≤6. 25	12. 5	25	50	100	200	400	800	1, 600	3, 200	3, 200<	
CET											19	19
CEZ											19	19
CEX							1	1	17*			19
ABPC			1	4	1	1					12	19
CBPC	2	4	1								12	19

: 10⁸ cells/ml

Antibiotics	Inoculum : 10 ⁸ cells/ml											Total
	≤6. 25	12. 5	25	50	100	200	400	800	1, 600	3, 200	3, 200<	
CET											19	19
CEZ											19	19
CEX					1	2	1	2	13*			19
ABPC	2	3	1		1				1	5	6	19
CBPC	7									1	11	19

* : >800 μg/ml

では 200 μg/ml 以下に分布していた。また、CEX は CET, CEZ と同様、菌量が 10⁸ cellt/ml の場合でも感受性値に著明な変動が認められず 800 μg/ml 以上であった。

S. marcescens の感受性は CET, CEZ では接種菌量が減少しても MIC 値に変動が認められず 3, 200 μg/ml 以上であった。ABPC, CBPC では 10⁸ cells/ml 接種で MIC 値は 3, 200 μg/ml 以上を示したが、接種菌量が減少するにつれ、MIC 値に変動がみられ、感受性側に移行する群と 1, 600 μg/ml 以上を示す群の 2 峰性のピークが認められた。また、CEX も 10⁸ cells/ml 接種で 800 μg/ml 以上の MIC 値であったが、菌量が減少するに従い、感受性側に移行した。

以上のとおり、*P. aeruginosa*, *S. marcescens* に対する抗菌力は Cephalosporin 系抗生剤と Penicillin 系抗生剤との間に明らかな差がみられ、接種菌量の小さい場合には Penicillin 系抗生剤の抗菌力が Cephalosporin 系のそれに比べて強いことが確認された。しかし、Cephalosporin 系のなかでは CEX が *S. marcescens*

に対し、CET, CEZ より抗菌力がすぐれていることが確認された。

2. β-lactam 系抗菌薬添加による生菌数の変動

1) 単独培養の場合

E. coli NIHJ JC-2 10⁸ cells/ml, *P. aeruginosa* IFO 3445, 10⁸ cells/ml および *S. marcescens* 16, 10⁸ cells/ml になるよう接種した各ブイヨンに CET, CEZ, CEX および ABPC をそれぞれ 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml となるよう添加したときの成績を Fig. 4 に示した。

E. coli は CET, CEZ, CEX および ABPC に対して感性なので、それぞれ 10 μg/ml 添加で菌数は培養時間の経過とともに減少し、MIC 12.5 μg/ml の CET, CEX では 8 時間目以降に再増殖がみとめられたが、MIC 6.25 μg/ml の CEZ, ABPC では再増殖が認められなかった。

P. aeruginosa の場合、CET, CEZ, CEX とも 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml 添加で *P. aeruginosa* の増殖は抑制されず、増殖曲線はすべて薬剤無添加時と同じレベルであった。しかし、ABPC は添加濃度が増すに従

Fig. 4 Effects of β -lactam antibiotics on the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens*
E. coli *P. aeruginosa* *S. marcescens*

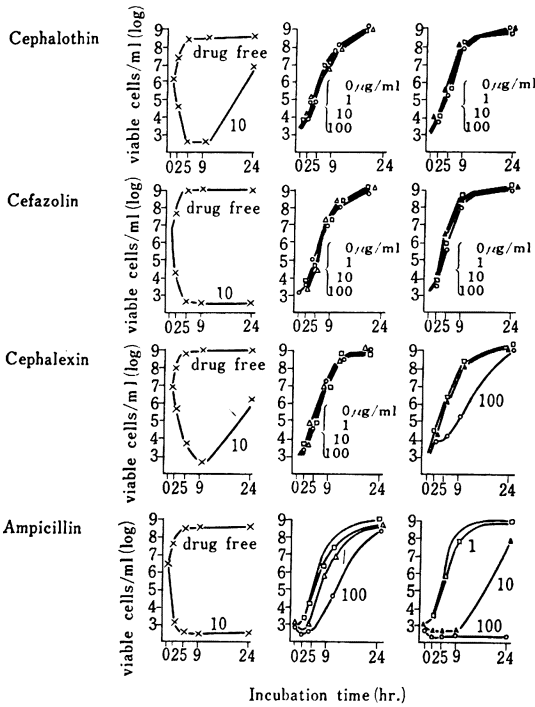
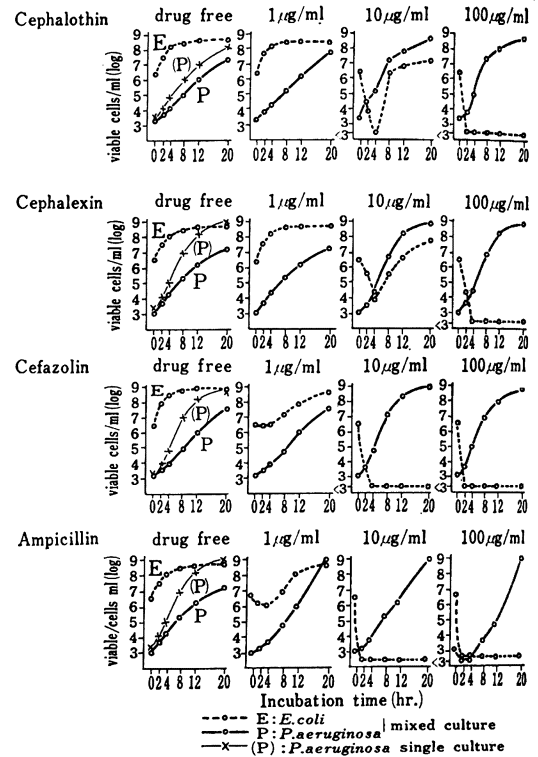


Fig. 5 Effects of β -lactam antibiotics on the growth of *E. coli* and *P. aeruginosa* in mixed cultures



い、少しずつ抑制された。

S. marcescens の場合, CET, CEZ は 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 添加しても増殖曲線に著明な変化が認められず, 薬剤無添加時と同レベルであった。CEX では 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 添加では著明な変動が認められなかったが, 100 μ g/ml 添加で, わずかに抑制された。また, ABPC は添加濃度が増すに従い, 著明な増殖抑制が認められた。

(2) 混合培養

(a) *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養

E. coli, *P. aeruginosa* をそれぞれ 10^6 cells/ml, 10^8 cells/ml になるよう混合接種した普通ブイオンに CEX, CET, CEZ および ABPC を 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 添加したときの成績を Fig. 5 に示した。

CET, CEX, CEZ に対し, とともに感性である *E. coli* は薬剤濃度が増すに従い, 菌数は減少したが, 耐性である *P. aeruginosa* は *E. coli* の MIC 濃度以上の薬剤が添加された場合には対照 (drug free) に比べ菌数が増加し, *P. aeruginosa* の単独培養時での菌数と同レベルに達した。濃度によって *E. coli* の増殖曲線は多少, 変動したが, 3 剤とも *E. coli* が *P. aeruginosa* の菌

数より少なくなると *P. aeruginosa* の増殖は促進され, 単独培養時の増殖曲線と同レベルとなる点は共通の現象であった。

ABPC の場合も感性である *E. coli* は添加濃度が増すに従い, 菌数は著明に減少した。*P. aeruginosa* は ABPC 10 μ g/ml の添加で前述の Cephalosporin 剤の場合と同様, *E. coli* の菌数が減少すると増殖が促進されたが, 100 μ g/ml 添加では対照 (drug free) と比べ, その増殖はわずかに抑制された。

(b) *E. coli* と *S. marcescens* の混合培養

E. coli および *S. marcescens* をそれぞれ 10^6 cells/ml および 10^8 cells/ml になるよう混合接種したブイオンに CET, CEZ, CEX, ABPC を 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 添加したときの成績を Fig. 6 に示した。

CET, CEZ ではともに感性である *E. coli* は添加濃度が増すに従い, 菌数は減少したが, 耐性である *S. marcescens* は 10 μ g/ml および 100 μ g/ml 添加で対照 (drug free) と比べ菌数は増加し, その増殖は単独培養での *S. marcescens* の増殖と同レベルであった。CEX の 10 μ g/ml 添加では CET, CEZ の 10 μ g/ml 添加とほぼ同様の成績を示したが, 100 μ g/ml 添加で *E. coli*

Fig. 6 Effects of β -lactam antibiotics on the growth of *E. coli* and *S. marcescens* in mixed cultures

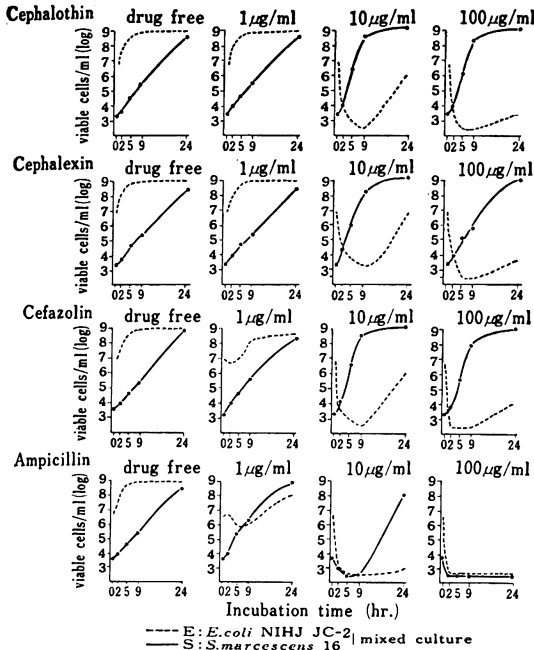
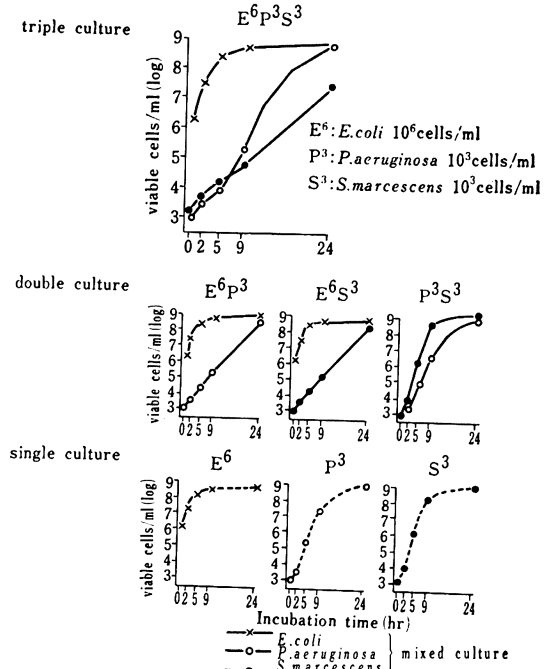


Fig. 7 Comparison of growth curves in various cultures



は著明な菌数の減少が認められ、また *S. marcescens* の増殖もわずかに抑制作用がみられた。ABPC では *E. coli* に対する作用は Cephalosporin 剤とほぼ同様の成績を示したが、*S. marcescens* に対しては Cephalosporin 剤と異なり、10 μ g/ml および 100 μ g/ml 添加では著明な増殖抑制が認められた。

(c) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* の3種混合培養

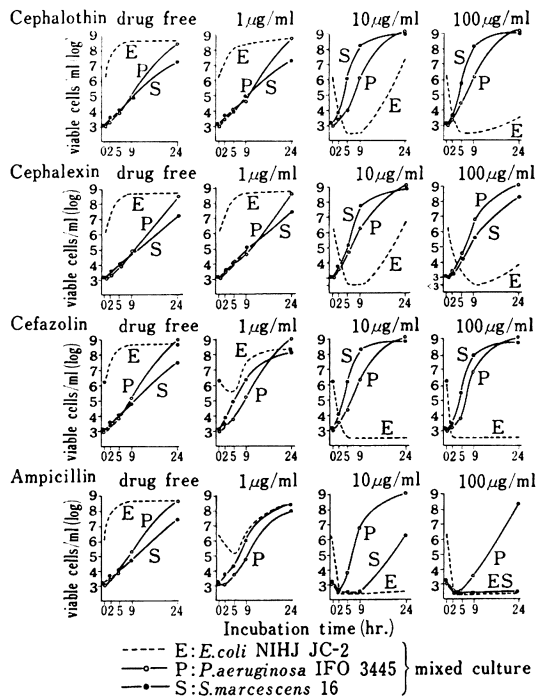
E. coli 10⁶ cells/ml, *P. aeruginosa* 10³ cells/ml, *S. marcescens* 10³ cells/ml になるよう3種混合接種したときの増殖曲線を Fig. 7 に示した。

上記の条件で混合培養すると *P. aeruginosa*, *S. marcescens* の増殖は *E. coli* により著明に抑制され、*E. coli* との2種混合培養での増殖とほぼ同様の増殖曲線を示した。

このような3種混合接種したブイヨンに CET, CEX, CEZ および ABPC をそれぞれ 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 添加したときの成績を Fig. 8 に示した。

CET, CEX, CEZ を 10 μ g/ml および 100 μ g/ml 添加すると、感性である *E. coli* は著明な菌数の減少が認められたが、耐性である *P. aeruginosa*, *S. marcescens* の増殖は対照 (drug free) より増加し、ほぼそれぞれの単独培養での増殖と同レベルを示した。しかし、CEX 100 μ g/ml 添加では *E. coli* の著明な菌数の減少と *P.*

Fig. 8 Effects of β -lactam antibiotics on the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens* in mixed cultures



aeruginosa の増殖がはやく、*S. marcescens* は drug free とほぼ同様の増殖を示した。

また、ABPC では *E. coli* の MIC 濃度以上の添加濃度 (10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$) で Cephalosporin 剤と異なり、*E. coli* と *S. marcescens* の増殖は著明に抑制され、100 $\mu\text{g/ml}$ 添加ではさらに *P. aeruginosa* の増殖もわずかに抑制された。

IV 考 察

現在、臨床各科領域において、グラム陰性桿菌による感染症が増加し、その原因菌には大腸菌をはじめとする腸内細菌の頻度が高く、ブドウ糖非発酵菌では緑膿菌がもっとも多い^{17,18)}。このことは菌の分布状態や微生物界での菌種間の相互作用あるいはそれぞれの菌種ないし菌株と宿主との関係などが関与していると考えられる¹⁹⁾。また、これらの感染のなかで、緑膿菌やセラチアの感染が広域抗生剤である Cephalosporin 剤や Penicillin 剤の投与後に多く認められることが報告されている¹⁻³⁾。

今回の実験において、大腸菌、緑膿菌の混合培養、大腸菌、セラチアの混合培養および大腸菌・緑膿菌・セラチアの混合培養に β -lactam 系抗生剤を添加した結果、*E. coli* の増殖が抑えられ、菌数が減少するにしがたい、*P. aeruginosa* および *S. marcescens* の増殖が促進される現象を確認した。

In vitro でのこの現象が直ちに、生体内での菌交代現象と同等に結びつくものではないが、少なくとも臨床での β -lactam 剤投与後の緑膿菌あるいはセラチアの出現を裏付けるものと考えられる。

興味あることは大腸菌と緑膿菌を同時に培養すると、緑膿菌の増殖は単独培養時に比べて抑制されるが、大腸菌は緑膿菌の存在とは無関係に増殖することである。また大腸菌とセラチアにおいても大腸菌の菌量が多いかあるいは同等の場合、セラチアの増殖は単独培養の時と比べ、抑制されるが、大腸菌の増殖は変化しない。しかし、セラチアの菌量が多い場合、大腸菌の増殖は影響をうけ、単独培養時と比べ、抑制される。

大腸菌の菌数が、同時に存在する緑膿菌あるいはセラチアの菌数を下回ると、緑膿菌あるいはセラチアの増殖が促進され、緑膿菌、セラチアの単独培養時と同レベルに達することは、2 菌種間の生態学的現象として注目される。おそらく生体内でも大腸菌は、緑膿菌やセラチアと共存した場合、自然の状態であれば優位の population を保つてであろうことが推察される。緑膿菌やセラチアが優位となるには何らかの因子が加わらなければならないことが想像される。

この大腸菌優位の現象を大腸菌と緑膿菌の場合について、1) 混合培養時の pH の変化が大腸菌には無関係で

緑膿菌に抑制的に作用するのではないか、2) 大腸菌の代謝産物が緑膿菌の発育に抑制的に作用するのではないかと、との2点から検討したが、いずれも否定される成績であった。

1) については、はじめに用いられた5種の培地のうち、0.5% ブドウ糖加ペプトン水、合成培地では緑膿菌は著明に抑制され、24 時間後でも接種した菌数とほとんど変らなかった。このことは培地中のブドウ糖が大腸菌により分解され、培地 pH が酸性側に傾いたため、抑制されたのではないかとと思われる。紺野²⁰⁾ は 0.5% ブドウ糖加ペプトン水を用いて、大腸菌と緑膿菌を同じ菌量 (10 cells/ml) 接種した場合、緑膿菌の発育は単独培養に比して、12 時間まで明らかに抑制されたと報告している。しかしながら、本実験に用いた普通ブイヨン、ヒト尿では、混合培養時の pH は 24 時間までほとんど変化がなく、pH の影響とは考えられない。

また、2) については大腸菌を 10^8 cells/ml になるようブイヨンに接種したのち、培養2時間目および24時間目の培養液 (遠心後、ミリポアーで無菌濾過) を用いて、緑膿菌を培養したが、増殖阻止効果は認められなかった。

今1つ問題となるのは β -lactam 系抗菌薬の添加により、大腸菌の減少とともに緑膿菌の増殖が良好となる現象である。この理由として β -lactam 系抗菌薬が緑膿菌の増殖促進作用を示す可能性が考えられる。そこで、緑膿菌の単独培養時に Cephalosporin 系薬剤 (CET, CEZ, CEX) を種々の濃度添加したが、緑膿菌の増殖曲線に全く変化を示さなかった。このことは Cephalosporin 系薬剤は緑膿菌に対し、増殖抑制作用も増殖促進作用もないことを示している。石山²²⁾ もまた化学療法剤はその使用によって菌交代現象を誘発するが、交代菌の発育を直接促進するものではないとしている。したがって、大腸菌の菌数が減少した時に緑膿菌の増殖が促進される現象についてはまだ充分な説明がつかない。

本実験で今1つ注目されるのは、大腸菌と緑膿菌の組合せで、CET, CEZ, CEX 添加時には大腸菌の菌数は減少するが、緑膿菌は全く抑制作用をうけず、逆に drug free の単独培養時と同様の増殖曲線を示したが、ABPC においては大腸菌の菌数は減少し、緑膿菌も 100 $\mu\text{g/ml}$ でわずかに ABPC の抗菌作用をうけ、菌交代はみとめられたものの、その増殖曲線は単独培養時よりも抑制されていることである。

この差は緑膿菌に対する4剤の MIC にあらわれており、ABPC は他の Cephalosporin 3 剤に比べ、わずかながら抗菌作用のあることがわかる。しかし、Cephalosporins 3, 200 $\mu\text{g/ml}$, ABPC 400 $\mu\text{g/ml}$ という MIC

では実際に生体内でこの差がどの程度、意味があるかは明らかではないが、少なくとも緑膿菌への菌交代は Cephalosporin 系3剤より ABPC のほうがおこりにくいと考えられる。

また、同様の傾向が大腸菌とセラチアの組合せからもみられ、大腸菌からセラチアへの菌交代は Cephalosporin 剤のなかでも異なり、CEX は CET, CEZ より菌交代をおこしにくく、さらに ABPC は Cephalosporin 剤よりおこしにくくと考えられた。

これらの現象には菌の産生する β -lactamase に対する薬剤の安定性の差、または薬剤による菌体内部への透過性の差などが関与する可能性が考えられ、今後、検討すべき課題である。

以上の成績から、生体内でも大腸菌から緑膿菌、セラチアへの菌交代現象はそれぞれの菌の MIC 値の開きが大きいものほど菌交代を起しやすく、MIC 値の開きが小さいものほどおこりにくいと推測される。むしろ生体内での菌交代現象は菌側の因子と宿主側の因子とが複雑にからみあって生ずるものであって、実験モデルのように単純ではないであろう。しかし、以上の成績は共存する菌種間の増殖のバランスと薬剤の組合せから菌交代現象を推察する上の参考となり、薬剤の選択に役立つ見知と考えられる。

文 献

- 1) 清水喜八郎, 奥住捷子, 人見照子, 長野百合子, 千葉房子, 千葉紀江, 大塚正和, 坂上ノリ子: 感染症の変遷, セラチア感染症. 総合臨牀 23: 1694~1701, 1974
- 2) 清水喜八郎: 病原菌の最近の推移, グラム陰性菌. 最新医学 31: 1300~1305, 1976
- 3) 那須 勝, 斎藤 厚, 提 恒雄, 岩永正明, 広田正毅: *Serratia* 感染症に関する臨床的研究. 最新医学 31: 1370~1375, 1976
- 4) WEINSTEIN, L.: Spontaneous occurrence of new bacterial infection during course of treatment with streptomycin or penicillin. Am. J. Med. Sci. 214: 56~63, 1947
- 5) BRISOU, J.: Affections chroniques par microbisme sélectionné et substitué. Presse Méd. 60: 353, 1952
- 6) TILLOTSON, J. R. & M. FINLAND: Bacterial

colonization and clinical superinfection of the respiratory tract complicating antibiotic treatment of pneumonia. J. Inf. Dis. 119: 597~624, 1969

- 7) 久保郁哉, 東郷 靖, 横山 敏, 竹本忠良: 交代菌現象とその関連問題について. 最新医学 9: 455~467, 1954
- 8) 久保郁哉: 菌交代症——その臨床と発病の機序について——. 日本医師会雑誌36: 541~547, 1956
- 9) 市橋治雄: 小児科領域における菌交代現象について. 小児科 4: 15~22, 1963
- 10) 螺良英郎, 山村雄一, 清水洋子: 感染症の変貌——菌交代現象, 菌交代症, opportunistic infection について. 日本医事新報 2462: 9~13, 1971
- 11) 池本秀雄: 菌交代症——内科の立場から——. 感染症 4: 133~137, 1974
- 12) 西村忠史: 抗生剤と菌交代現象ならびに菌交代症. 小児科 16: 1219~1231, 1975
- 13) WEINSTEIN, L.; M. GOLDFIELD & T. W. CHANG: Infections occurring during chemotherapy. A study of their frequency, type and predisposing factors. New Eng. J. Med. 251: 241~255, 1954
- 14) WEINSTEIN, L. & D. M. MUSER: Antibiotic-induced superinfection. J. Inf. Dis. 119: 662~665, 1969
- 15) 桑原章吾: 菌交代症——主としてその発現についての考察——. 東邦医学会雑誌 4: 91~96, 1957
- 16) MIC測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について. Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 17) 小酒井 望: 起炎菌の動向について. 東京都医師会雑誌 26: 564~574, 1973
- 18) 上田 泰, 西村忠史, 酒井克治: 院内感染. 感染症 5: 140~148, 1975
- 19) 五島瑛智子: 微生物生態と opportunistic infection. 防菌防黴誌 6: T 129~T 140, 1978
- 20) 紺野昌俊, 生方公子: 緑膿菌感染症の治療上の問題点. 小児科臨牀 26: 269~276, 1973
- 21) 名出頼男, 鈴木恵三, 長瀬信良, 小沢英夫: 尿路の緑膿菌・大腸菌混合感染モデルを用いた生態学的研究. 医学と生物学 94: 9~12, 1977
- 22) 石山俊次: 菌交代現象及び菌交代症. 第 15 回日本医学会総会学術集會記録 II: 300~310, 1959

STUDIES ON THE EXPERIMENTAL ALTERATION OF MICROBIAL POPULATION. I

In vitro : The Establishment of Experimental Condition and the Effects of
 β -Lactam Antibiotics on the Growth of *Escherichia coli*,
Pseudomonas aeruginosa and *Serratia marcescens*
in Mixed Cultures

AKIYOSHI TSUJI, MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO
and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University of Medicine

It is known that many cases of infection with *Pseudomonas aeruginosa* or *Serratia marcescens* occur after administration of β -lactam antibiotics. Such phenomenon may result from alteration of microbial flora by overgrowth of *P. aeruginosa* or *S. marcescens* that are resistant to many β -lactam antibiotics.

Attempts were made to analyze such phenomenon by experimental alteration of microbial population based on the ecological studies on *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*. The results may be summarized as follows :

In mixed cultures of *E. coli* and *P. aeruginosa*, the former showed a growth pattern similar to that in a single culture regardless of the inoculum size of *P. aeruginosa*. The growth of *P. aeruginosa*, on the other hand, was inhibited when the inoculum size of *E. coli* was larger than or even the same as that of *P. aeruginosa*, showing growth curves lower than that of a single culture.

In mixed cultures of *E. coli* and *S. marcescens*, the growth of the latter was inhibited as compared with that in a single culture when the inoculum size of *E. coli* was larger than or the same as that of *S. marcescens*.

When the inoculum size of *S. marcescens* was larger, the growth of *E. coli* was inhibited as compared with that in a single culture.

In mixed cultures of two species, namely *E. coli* and *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. marcescens* and in those of three species, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. marcescens*, the addition of a β -lactam antibiotic inhibited the growth of *E. coli*. The smaller the inoculum size of *E. coli*, the more the inhibition of the growth by *P. aeruginosa* or *S. marcescens* or both.

Experimental alteration of the dominant species from *E. coli* to *P. aeruginosa* or from *E. coli* to *S. marcescens* induced with a β -lactam antibiotic proved that the larger the difference in M. I. C. between the two species, the easier the alteration of the microbial flora to occur.