

# 薬剤耐性菌の疫学とR因子の分布 第1報

## *Proteus* の薬剤耐性について

### 耐性菌感染症研究会

藤井良知 帝京大医小児科	古屋 曉一 国立病院医療センター	原 耕平 長崎大医内科
市橋保雄 慶応大医小児科	石神 襄次 神戸大医泌尿器科	金 沢 裕 豊栄病院内科 (前)新潟鉄道病院内科
勝 正 孝 国立霞ヶ浦病院内科	川 淵 純一 群馬大医脳外科	小林 章 男 千葉大医検査部
黒川一男 徳島大医泌尿器科	真下 啓明 医科研内科	松田 静 治 順天堂大医産婦人科
松本慶蔵 長崎大熱帯医学研内科	松角 康彦 熊本大医脳外科	武藤 輝一 新潟大医外科
名出 頼 男 名古屋保健衛生 大学病院泌尿器科	中川 圭一 東京共済病院内科	中 沢 進 昭和大医小児科
仁平 寛 己 広島大医泌尿器科	新島 端 夫 東京大医泌尿器科 (前)岡山大医泌尿器科	西 浦 常 雄 岐阜大医泌尿器科
大越 正 秋 東海大医泌尿器科	大久保 滉 関西大医大内科	大森 弘之 岡山大医泌尿器科
三辺 武右衛門 関東通信病院耳鼻咽喉科	柴田 清 人 名古屋市中大医外科 (前)名古屋市立東市民病院外科	島 田 馨 東京都養育院附属病院内科
清水喜八郎 東京女医大内科 (前)東京大医中検	塩 田 憲 三 大阪市大医内科	白羽 弥右衛門 大阪市大医外科
田 島 達 也 新潟大医整形外科	高瀬 善次郎 川崎医大産婦人科	高 安 久 雄 山梨医大 (前)東京大医泌尿器科
武 田 元 新潟大医内科	滝 上 正 横浜船員保健病院内科	田 波 洋 群馬大医中検
谷 本 晋 一 虎の門病院呼吸器科	上 田 泰 慈恵医大内科	梅 沢 浜 夫 微生物化学研究所
山 本 浩 川崎病院内科	山作 房之輔 水原郷病院内科	吉 岡 一 旭川医大小児科

三 橋 進  
群馬大医微生物

伊予部 志津子  
群馬大医微生物

田 中 徳 満  
群馬大医微生物

(昭和 55 年 2 月 4 日受付)

病巣由来の *Proteus* 菌を集めその疫学的調査と R 因子の分布を調査した。分離菌の 80% は、*P. mirabilis* で残り 40% がインドール陽性菌に属していた。後者の大部分は、*P. morganii* と *P. vulgaris* であった。

TC 耐性の多いことが目を惹くが、その大部分は伝達性の R 因子上になく、非伝達性(r)プラスミド上にあることが大きい特長である。

次に  $\beta$ -ラクタム抗生剤耐性菌が多い。*P. mirabilis* のそれは主に R 因子の存在による PCase 産生が主で、インドール陽性菌のすべては染色体依存の CSase と R 因子による PCase であることが注目された。

2 施設において同一の薬剤耐性型の R 因子が高い頻度で検出されたことは、R 因子による耐性伝播を示唆している。

薬剤耐性菌の分離頻度の上昇と、その広い拡散は治療上の問題であるばかりでなく、病院の衛生管理の上から大きい課題である。吾々はここに 35 施設を中心として、薬剤耐性菌感染症研究会を組織し、各施設から分離された菌を分離蒐集し、その薬剤耐性型を調査し、耐性菌から R 因子を検出した。またそのデータは各施設に送附され、各施設においては耐性菌と治療上の効果との関係が追及された。

1971 年から 74 年にかけて得られた菌株は *Proteus* の 98 株、*E. coli* 169 株、*Klebsiella* 115 株、*P. aeruginosa* の 394 株で総計 776 株に達した。調査対象の菌種は、ある程度の統計上の有意性を持たせるため、菌種の種類の分散を防ぐ目的で 4 菌種に限定した。

#### 材料および方法

**菌株** 施設内における耐性菌の分布を知る目的で、1 施設について 1 診療科を選んだ。患者の病巣から起因菌と思われる 1 菌種を選んで調査の対照とした。R 因子の受けとり菌として *E. coli* K 12 ML 1410 (*met*, F, NA<sup>r</sup>) (NA<sup>r</sup>: nalidixic acid 耐性) を用い、nalidixic acid (NA) 耐性菌からの R 因子の検出および ML 1410 NA<sup>r</sup>R<sup>+</sup> 菌からの R 因子の伝達には R 因子の受けとり菌として *E. coli* K 12 ML 1410 Rf<sup>r</sup>(Rf<sup>r</sup>: rifampicin 耐性) を使用した。

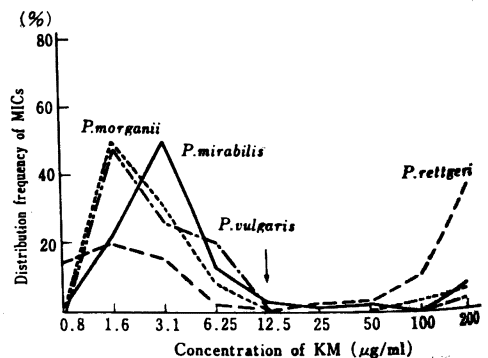
**培地** 通常の液体培養には brain heart infusion (BHI, Difco) 培地を使用した。耐性検査における被検菌の前培養にはペプトン水を用いた。耐性検査用の培地には heart infusion agar (HIA, 栄研化学) を使用した。サルファ剤に対する耐性測定は半合成培地 (medium A) を用いた<sup>1)</sup>。R 因子検出における培地として BTB 乳糖寒天培地および medium A に乳糖を 1% 添加した

培地 (AL) を使用した。

**薬剤 耐性の測定および R 因子選択の薬剤** として、chloramphenicol (CM), tetracycline (TC), dihydrostreptomycin (SM), sulfanilamide (SA), kanamycin (KM), aminobenzylpenicillin (ABPC), cephalodine (CER), nalidixic acid (NA), rifampicin (RFP), gentamicin (GM) の 10 薬剤を用いた。

**耐性の測定** 被検株の耐性の測定は化学療法学会標準法に従い平板希釈法を用いて測定した。すなわち、ペプトン水にて 18 時間前培養し、10<sup>8</sup> 個/ml の菌液をミクロプランター (佐久間製作所, 東京) を用いて種々の薬剤濃度を含む、平板上に接種、37°C, 18 時間培養後測定した。耐性菌選択の薬剤濃度は被検菌 100 株を用いて各薬剤に対する MIC 値の分布からそれぞれの薬剤に対する耐性を設定した。例えば KM に対する耐性限界値は Fig. 1 に示すとおり、感受性菌群の分布の終った点す

Fig. 1 Antibacterial activity of KM against *Proteus* strains



なわち、12.5 µg/ml またはそれ以上の MIC 値を示すものを KM 耐性菌とした。他薬剤においても同様に検討した結果、耐性限界 MIC 値は CM, TC, SM, ABPC, CER, NA および GM は 12.5 µg/ml, SA は 100 µg/ml に設定した。

**R 因子の検出** R 因子の検出は、病巣分離の耐性菌 (donor) と R 因子の受容菌 (recipient) の BHI 培地に 18 時間培養菌の 1 ml を、9 ml の新鮮 BHI 培地に接種し、L 字管で 37°C 約 3 時間培養して対数増殖期に達した donor と recipient をそれぞれ等量混合し 37°C に培養した。3 時間静置培養後、recipient が ML 1410 NA<sup>r</sup> の場合には NA と選択薬剤の 1 つ、ML 1410 Rf<sup>r</sup> の場合には RFP と選択薬剤の 1 つを含む BTB 培地に接種し、37°C、24 時間培養後 R 因子が伝達し耐性を獲得した recipient (transconjugant) を選別した。SA 耐性 R 因子の場合には AL 培地に methionin (10 µg/ml) を加えた培地を用い 2 日培養後判定した。

R 因子の耐性型は、同時に伝達した耐性の薬剤耐性型をもって示した。多くの R 因子の中には、著るしく伝達率の低いものがあることがこれまでの調査で知られている。その頻度は R 因子全体の 2~5% である。本報で用いた疫学的調査法ではこのような R 因子の検出は困難である。従って R 因子をもっている菌全体からの R 因子検出率は 95~98% と考えてよい。

### 結果

得られた *Proteus* は 98 株に達した。菌種別分離頻度は Table 1 に示した。*P. mirabilis* が最も多く、*P. morganii*, *P. vulgaris* がそれについで。耐性菌の分離頻度は Table 2 に示した。テトラサイクリン (TC) 耐性菌の分離頻度の著るしく高いのが、*Proteus* の最も大きい特長で、ついで β-ラクタム剤耐性菌、ストレプトマイシン (SM), スルホンアミド剤 (SA) 耐性菌がこれについで。

インドール陰性、陽性別にみた耐性型は Table 3 に示した。インドール陰性菌に TC 耐性が圧倒的に多く、他の薬剤耐性はインドール陽性菌に比較して著るしく低い。インドール陽性菌にはアンピシリン (ABPC) 耐性、

Table 1 Isolation frequency of *Proteus* strains

Species	Number of isolates
<i>P. mirabilis</i>	58 (59.2)
<i>P. morganii</i>	18 (18.4)
<i>P. vulgaris</i>	12 (12.2)
<i>P. rettgeri</i>	8 (8.2)
<i>P. inconstans</i>	2 (2.0)
Total	98

Table 2 Isolation frequency of drug-resistant *Proteus* strains

Test drug	Number of resistant strains	Frequency of isolation
CM	27	27.6
TC	79	80.6
SM	32	32.7
SA	36	36.7
KM	22	22.4
APC	41	41.8
CER	44	44.9
NA	14	14.3
GM	11	11.2
Total	98	

セファロリジン (CER) 耐性の多いのが特長的である。インドール陰性菌の、ABPC 耐性の殆んどは R 因子による。インドール陰性の CER 耐性はこれらの菌の染色体遺伝子の支配によるセファロスポリナーゼ (CSase) による。インドール陽性菌のクロラムフェニコール (CM), TC, SM, SA 耐性の出現頻度はほぼ等しく、これらは主にこれらの 4 剤耐性をもつ R 因子の存在による。

インドール陽性菌の菌種別にみた耐性を Table 4 に示した。*P. rettgeri*, *P. inconstans* の分離頻度は低いが、多剤耐性菌の多いのが目につく。ABPC, CER 耐性菌は極めて多い。インドール陽性菌の ABPC 耐性は必ずしも R 因子によるペニシリナーゼ (PCase) によるものでなく、大部分は染色体性の CSase によって CER および ABPC に耐性を示しているものが多い。

Table 3 Isolation frequency of drug-resistant strains in indole (+) and indole (-) *Proteus* strains

Indole reaction	Number of strains	Number of resistant strains								
		CM	TC	SM	SA	KM	APC	CER	NA	GM
negative	58	10 (17.2)	56 (96.6)	13 (22.4)	17 (29.3)	7 (12.1)	8 (13.8)	6 (10.3)	5 (8.6)	2 (3.4)
positive	40	17 (42.5)	23 (57.5)	19 (47.5)	19 (47.5)	15 (37.5)	33 (82.5)	38 (95.0)	9 (22.5)	9 (22.5)

Table 4 Isolation frequency of drug-resistant strains in indole (+) *Proteus*

Species	Number of isolates	Number of resistant strains								
		CM	TC	SM	SA	KM	APC	CER	NA	CM
<i>P.morganii</i>	18	8 (44.4)	8 (44.4)	8 (44.4)	8 (44.4)	6 (33.3)	16 (88.9)	17 (94.4)	2 (11.1)	3 (16.7)
<i>P.vulgaris</i>	12	2 (16.7)	6 (50.0)	3 (25.0)	3 (25.0)	3 (25.0)	11 (91.7)	11 (91.7)	0	1 (8.3)
<i>P.rettgeri</i>	8	5 (5/8) a	7 (7/8)	6 (6/8)	6 (6/8)	4 (4/8)	4 (4/8)	8 (8/8)	5 (5/8)	3 (3/8)
<i>P.inconstans</i>	2	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)	2 (2/2)

a percentage was not computed when the number of strains was less than 10.

Table 5 Conjugal transferability of drug resistance in *Proteus* strains

Drug	Indole(+)	Indole(-)	Total (%)
CM	7/10 a (70.0)	8/17 (47.1)	15/27 (55.6)
TC	2/56 (3.6)	2/23 (8.7)	4/79 (5.1)
SM	6/13 (46.2)	12/19 (63.2)	18/32 (56.3)
SA	7/17 (41.2)	12/19 (63.2)	19/36 (52.8)
KM	4/7	10/15 (66.7)	14/22 (63.6)
APC	4/8	5/33 (15.2)	9/41 (22.0)
GM	1/2	3/9	4/11 (36.4)

a Percentage was not computed when the number of strains was less than 10. Number of R<sup>+</sup> strains/total number of strains examined.

R 因子の分離 カナマイシン (KM) 耐性菌の分離頻度は必ずしも高くないが、これらの菌から KM 耐性 R 因子の検出率の高いのが注目される。*Proteus* に TC 耐性の多いことを先に述べたが、TC 耐性 R 因子の検出率は著るしく低く、*E. coli*<sup>2)</sup>, *Shigella*<sup>1,3)</sup>, *Salmonella*<sup>4,5)</sup> などと著るしく異なる点である (Table 5)。*Proteus* の TC 耐性の大部分、とくに、*P. mirabilis* の TC 耐性の殆んどは非伝達性の耐性因子 (r 因子) による (井上, 他,

Table 6 Isolation frequency of resistant strains correlated with resistance patterns to TC, CM, SM and SA

Resistance pattern against TC, CM, SM, SA	Number of resistant strains				
	ABPC	CER	KM	NA	GM
quadruple	16 (39.0)	16 (36.4)	15 (68.2)	9 (64.3)	8 (72.7)
triple	4 (9.8)	5 (11.4)	5 (22.7)	1 (7.1)	1 (9.1)
double	2 (4.9)	2 (4.5)	2 (9.1)	0	2 (18.2)
single	3 (7.3)	5 (11.4)	0	4 (28.6)	0
sensitive	16 (39.0)	16 (36.4)	0	0	0
Total	41	44	22	14	11

未発表)。CM, SM, SA 耐性の多くは R(CM, SM, SA) による。ゲンタマイシン (GM) 耐性菌の分離頻度は低いが、その 36% は R 因子による。

TC, CM, SM, SA の 4 剤耐性と他の薬剤耐性型を Table 6 に示した。ABPC, CER, KM, GM, NA 耐性の多くが (TC, CM, SM, SA) 耐性型に付加された形で出現していることを示している。つまり多剤耐性型として出現し易いことを示している。

しかし TC, CM, SM, SA に感受性の菌からかなり高率に ABPC (39%), CER (36.4%) 耐性の出現していることは注目される。その多くは CSase による耐性である。

R 因子検出率はインドール陽性菌に高く (48%) インドール陰性菌はその 4 分の 1 低度に少い (Table 7)。

Table 7 Isolation frequency of R plasmids from resistant *Proteus* strains

Indole reaction	Number of resistant strains	Number of R factor-bearing strains
negative	57	7 (12.3)
positive	25	12 (48.0)

Table 8 Isolation frequency of R plasmids correlated with resistance patterns to TC, CM, SM and SA

Resistance pattern	Number of isolates(%)	Number of R factor bearing strains(%)
CM, TC, SM, SA	22 (22.4)	13 (59.1)
TC, SM, SA	5 (5.1)	1
CM, SM, SA	2 (2.0)	2
CM, TC, SA	3 (3.1)	1
SM, SA	1 (1.0)	1
TC, SA	3 (3.1)	0
TC, SM	2 (2.0)	1
TC	44 (44.9)	0 0/44
sensitive	16 (16.3)	0
Total	98	

Table 9 Resistance patterns of R plasmids isolated from *Proteus* strains

Resistance pattern	Number of R plasmids
CM, TC, SM, SA, KM, ABPC	5 (20.8)
CM, SM, SA, KM, ABPC	2
CM, SM, SA, KM, GM	2
CM, SM, SA, KM	1
CM, SM, SA, ABPC	2
CM, SM, SA	1
TC, SM, SA	1
SM, SA, KM, GM	2
SM, SA, KM, ABPC	3
SM, SA, ABPC	3
SM, SA	1
CM, SA	1
Total	24

TC, CM, SM, SA 耐性型からみた R 因子の検出率を Table 8 に示した。(CM, TC, SM, SA) 耐性菌から 59% の割合に R 因子が検出され、これらの薬剤の 3 剤耐性菌から 40% の割合に R 因子が得られた。しかし *E. coli*, *Shigella* のそれに比べると極めて R 因子の検出率は低いことが本菌種の特長である<sup>5)</sup>。

R 因子の耐性型は、TC 耐性が非伝達のものが多いため、これまでに知られた *E. coli*, *Shigella*, *Klebsiella* とは著しく異なって (CM, SM, SA), (SM, SA) 耐性を基本にした R 因子が多く、これに KM, ABPC, GM 耐性が付加した型で出現しているのが特長である (Table 9)。

**R 因子の分布** 34 施設から得られた菌が 98 株であるため、正確な R 因子汚染の姿をとらえるためにはデータが少ないが、1 つの外科施設から (CM, SM, SA) を基本としこれに (KM, GM) 耐性が付加された R 因子が得られた *Proteus* 菌の 40% から分離され、R (SM, SA, KM, ABPC) 因子が分離菌の 30% から得られ、R 因子の病棟内伝播の可能性を否定できない。

また 1 内科施設から R (CM, SM, SA) 因子が送付された菌の 50% から分離され、分離菌の菌種別に違いのあることから、同一 R 因子の *Proteus* 間でのひろがりを用意させる。

#### 考 察

病棟由来の *Proteus* 菌の菌種別分離頻度をみると、その 60% は *P. mirabilis* で残り 40% はインドール陽性 *Proteus* であった。

薬剤耐性型は、*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*<sup>5)</sup> に比較して TC 耐性、 $\beta$ -ラクタム剤耐性の多いことが特長である。

さらに TC 耐性の殆んどが、伝達性のある R 因子上にないことも興味深い。

*P. mirabilis* による  $\beta$ -ラクタム剤耐性の殆んどは R 因子によるもので PCase 産生によって惹き起こされる耐性である。これに反しインドール陽性株のすべては染色体上の遺伝因子による CSase 産生と、R 因子による PCase 産生による耐性で従って  $\beta$ -ラクタム剤による治療に際してはその薬剤選択に注意が必要である。

病棟内における *Proteus* 菌、および R 因子による汚染の実状を知るには分離菌数が少く確実な結論が得られないが、2 施設において同じ耐性度を示す R 因子が高い頻度で検出されたのは注目に値する。

#### 文 献

- 1) TANAKA, T.; M. TSUNODA & S. MITSUHASHI: Distribution of R factors among *Shigella* strains isolated in Japan. *Japan J. Microbiol.* 17: 291~295, 1973
- 2) TANAKA, T.; A. KOBAYASHI, K. IKEMURA, H. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI: Drug resistance and distribution of R factors among *Escherichia coli* strains. *Japan. J. Microbiol.* 18: 343~347, 1974
- 3) TANAKA, T.; Y. NAGAI, H. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI: Distribution of R factors among *Shigella* strains isolated in Japan. *Japan. J. Microbiol.* 13: 187~191, 1969
- 4) MITSUHASHI, S.; H. HASHIMOTO, E. EGAWA, T. TANAKA & Y. NAGAI: Distribution of R factors in gram-negative bacteria from clinical sources. *J. Bact.* 93: 1242~1245, 1967

- 5) INOUE, M.; T. TANAKA, S. IYOBE & S. MITSUHASHI: Drug resistance of bacteria isolated from clinical specimens. *In* Bacterial Drug

Resistance (ed. S. MITSUHASHI), pp. 37~90, 1980, Kodansha, Tokyo

## GENETIC AND EPIDEMIOLOGIC STUDIES OF DRUG RESISTANCE IN BACTERIA. 1

### DRUG RESISTANCE IN *PROTEUS* STRAINS

#### Research Group on the Infection with Drug-resistant Bacteria

RYOCHI FUJII Teikyo University	GYOICHI KOYA National Hospital Medical Center	KOHEI HARA Nagasaki University
YASUO ICHIHASHI Keio University	JOJI ISHIGAMI Kobe University	YUTAKA KANAZAWA Toyosaka Hospital
MASATAKA KATSU National Kasumigaura Hospital	JUNICHI KAWABUCHI Gunma University	AKIO KOBAYASHI Chiba University
KAZUO KUROKAWA Tokushima University	KEIMEI MASHIMO Institute of Medical Science, University of Tokyo	SEIJI MATSUDA Juntendo University
KEIZO MATSUMOTO Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University	YASUHIKO MATSUKADO Kumamoto University	TERUICHI MUTO Niigata University
YORIO NAIDE Fujitagakuen University	KEIICHI NAKAGAWA Tokyo Kyosai Hospital	SUSUMU NAKAZAWA Showa University
HIROMI NIHIRA Hiroshima University	TADAO NIJIMA Faculty of Medicine, University of Tokyo	TSUNEO NISHIURA Gifu University
MASAAKI OKOSHI Tokai University	HIROSHI OKUBO Kansai Medical University	HIROYUKI OMORI Okayama University
BUEMON SANBE Kanto Teishin Hospital	KIYOHITO SHIBATA Nagoya City University	KAORU SHIMADA Tokyo Metropolitan Geratric Hospital
KIHACHIRO SHIMIZU Tokyo Womens' Medical School	KENZO SHIOTA Osaka City University	YAEMON SHIRAHA Osaka City University

TATSUYA TAJIMA Niigata University	ZENJIRO TAKASE Kawasaki Medical College	HISAO TAKAYASU Yamanashi Medical College
HAJIME TAKEDA Niigata University	TADASHI TAKIGAMI Yokohama Seamen Insurance Hospital	HIROSHI TANAMI Gunma University
HIROICHI TANIMOTO Toranomon Hospital	YASUSHI UEDA Jikei University	HAMAO UMEZAWA Institute of Microbial University
HIROSHI YAMAMOTO Kawasaki City Hospital	FUSANOSUKE YAMASAKU Suiibarago Hospital	HAJIME YOSHIOKA Asahikawa Medical College
SUSUMU MITSUHASHI Gunma University	SHIZUKO IYOBE Gunma University	TOKUMITSU TANAKA Gunma University

Epidemiologic and genetic studies on drug resistance in *Proteus* were performed using clinical isolates from inpatients at 34 hospitals geographically dispersed in Japan. Sixty percent of *Proteus* isolates was *P. mirabilis* strains and the remaining indole(+) *Proteus* strains were found mostly to be *P.morganii* and *P. vulgaris*. It was characteristic that TC-resistant strains were isolated most frequently and their resistance was conjugally non-transferable. Beta-lactam antibiotic resistant strains were often seen, and the resistance in *P. mirabilis* was due to the production of PCase mediated by R plasmid. Beta-lactam resistance in indole (+) *Proteus* strains were due to either the production of CSase mediated by the chromosome or the production of PCase mediated by R plasmids, or to the both.

Resistance patterns of R plasmids isolated at two hospitals implied the possibility of R plasmid contamination in the same care-units.