

Serratia marcescens のクロールヘキシジン耐性株の特徴について*

上田 勝・坂田 政幸・柴田 元雄・等 泰三**

熊本大学薬学部生物薬品製造学教室

(** 久留米大学医学部附属病院薬剤部)

(昭和 56 年 6 月 18 日受付)

さきに著者らは *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* などのグラム陰性桿菌のクロールヘキシジンに対する耐性化およびその安定性について報告したが¹⁾が、このうち、セラチアはクロールヘキシジンに対する耐性獲得が著しく、試験管内で原株の MIC 15.6 $\mu\text{g/ml}$ に対し、最終的に MIC 10,000 $\mu\text{g/ml}$ (最高生育濃度 5,000 $\mu\text{g/ml}$) のクロールヘキシジン耐性株が得られ、また緑膿菌や変形菌もセラチアと同様の耐性獲得の傾向を示したが、大腸菌はきわめて耐性化しにくかった。

一方、セラチアが獲得した本耐性は、クロールヘキシジンを含有しない培地に継代培養しても比較的安定であった。(F₂₀ で MIC 1,000 $\mu\text{g/ml}$)。

さらに、上記の耐性菌に対し塩化ベンザルコニウムや塩化ベンゼトニウムなどの第四級アンモニウム系消毒剤が有効であり、したがって院内での常用消毒剤を 1 種類に限定せず、異なる種類の消毒剤で少なくとも二度消毒するか、あるいは一定期間ごとに消毒剤の交互使用を実施することにより、消毒剤に起因する院内感染は防止しようと考えられた。

今後、院内感染においてこのセラチアがますます注目されるのではないかとと思われるが、著者らはセラチアのクロールヘキシジン耐性はクロールヘキシジンの分解に起因するのではないかと考えて実験を進めているが、現在までのところ、この分解は耐性化に直接関与していないように思われる。すなわち、セラチアとクロールヘキシジンを接触させたのち、培養液を薄層クロマトグラフ法で検したところ、耐性に起因すると考えられるクロールヘキシジンの分解産物のスポットは見い出されていない。

このことから、セラチアの本耐性には菌体の膜構造の変化に基づく膜透過性の減少が関与しているのではないかと考えて実験を進めた。

本報では、セラチアによるプロテアーゼの産生を比較したのち、セラチア菌体に及ぼすクロールヘキシジンの影響を調べ、さらに菌体由来の脂質含量、およびその脂肪酸組成を調べ、セラチアのクロールヘキシジン耐性株の特徴を明らかにしようとした。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

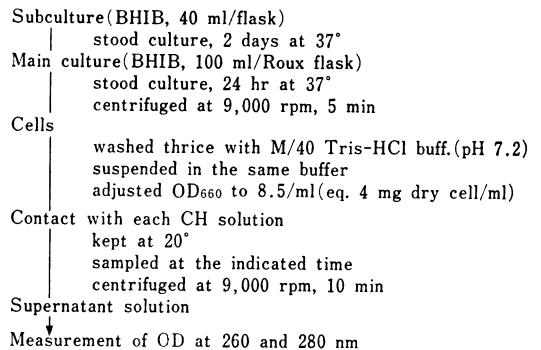
ヒビテン・グルコネート液 (Chlorhexidine digluconate, 20% (w/v) 溶液, ICI ファーマ (株)-住友化学工業製)。以下本薬剤を CH と略。

2. 使用菌株

Serratia marcescens IFO 3046 の原株と、これから先に述べた方法¹⁾で育成した CH 耐性株とを使用した。なお、CH に対する MIC は原株が 15.6 $\mu\text{g/ml}$ に対し、耐性株のそれは 10,000 $\mu\text{g/ml}$ である。

3. 使用培地

Fig. 1 Procedure for leakage test from *Serratia* cells



* 病院環境汚染の微生物学的考察 (第 2 報)

液体培養には Brain Heart Infusion Bouillon (以下 BHIB と略) を、また固体培養には Brain Heart Infusion Agar (以下 BHIA と略) (いずれも日本製薬製) を用いた。

4. プロテアーゼ活性測定法

培養液を透析して酵素源とし、カゼインを基質として pH 9.5 で 37°C, 15 分間反応後、過塩素酸液で反応停止し、その濾液について LOWRY 法²⁾で比色定量した。

5. CH による細胞質成分の漏出に関する実験

本実験は、CH の作用機作について行われた Hugo ら³⁾の方法に準拠して Fig. 1 に示す方法で行った。すなわち、静置培養によって得られたセラチアの原株と耐性株の洗浄菌体を、それぞれ OD₆₆₀=8.5 (1.1×10¹⁰ cells/ml) のけん濁液として、この 10 ml と各 CH 濃度の溶液 10 ml とを 20° で接触させ、所要時間 (0.5, 2, 6, 22 hr.) 後、各 5 ml をサンプリングして、この上清液について OD₂₆₀, および OD₂₈₀ を測定し、前者は核酸系、後者は蛋白質系の細胞質成分の漏出量とみなした。しかし、上記の吸光度には残存する CH の吸収があるため、別途、Fig. 2 の方法で CH 由来の OD₂₆₀ および OD₂₈₀ を定量して、この値を差し引いて真の漏出量とした。

Fig. 2 Procedure for the photometric determination of chlorhexidine

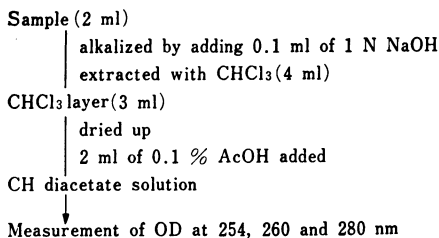
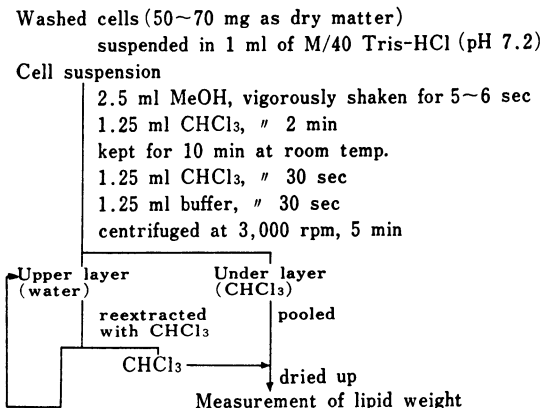


Fig. 3 Extraction procedure for extractable lipids



6. 菌体脂質に関する実験

1) 脂質含量：脂質含量については、まず、Fig. 3 に示した BLIGH and DYER の抽出法⁴⁾により菌体から脂質を抽出乾固後、乾燥菌体に対する含量 (%) として表示した。この脂質には毒性あるいは抗原性に関与するといわれるリポ多糖 (LPS) の成分であるリピド A は含まれない。

2) 脂肪酸組成：上記脂質を 5% 無水塩酸メタノールによりメタノリシス後、脂肪酸メチルエステルとしてガスクロマトグラフに負荷し、標準脂肪酸メチルエステルの retention time と比較して同定した。

II. 実験結果

1. 金属プロテアーゼ産生について

Serratia marcescens は serratiopeptidase⁵⁾ (商品名, Dasen ; 武田薬品工業) と呼ばれる金属プロテアーゼを産生することが知られている。先ず、CH 耐性と高分子蛋白質の菌体外産生との関連性をみるため、原株および CH 耐性株を BHIB 培地でそれぞれ振とう培養して経時的にサンプリングして遠心上清を透析後、プロテアーゼ活性を比較すると Fig. 4 のようになる。この種の実験を数回繰り返したが、図のように原株の方が常に 10% 程度活性が高く、このことは原株の菌体からのプロテアーゼ産生が盛んなためか、あるいは逆に、耐性株の方が原株よりも細胞膜が rigid なためにプロテアーゼの分泌が悪くなっているのではないかと考えられた。

なお、酵素の種類については、1) 原株および耐性株から得られたプロテアーゼは、同様に 2 mM の EDTA で完全に阻害を受けること、2) ディスク電気泳動的に両者とも ダーゼン類似のバンドを示すことから serratiopeptidase と同種のものと考えられた。また、CH の濃度を 0~0.2% の範囲で 37°, 10 分間作用させた限りでは本酵素そのものへの CH の阻害は認められなかった。

Fig. 4 Production of protease by parent and CH-resistant *Serratia*

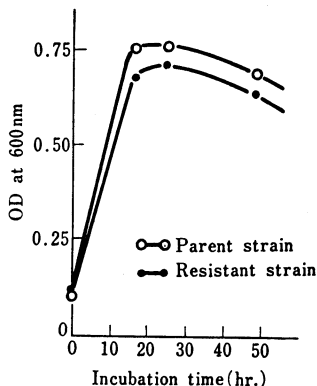
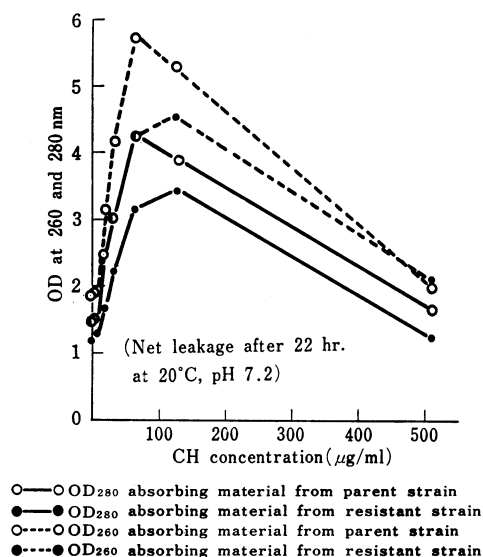


Fig. 5 Net leakage of protein and nucleic acid from parent and CH-resistant *Serratia*



2. 細胞質成分の漏出に及ぼす CH 濃度の影響

CH の作用機作については、すでに Hugo ら³⁾により明らかにされているように、CH が細胞表面の負電荷基に吸着し、低濃度では細胞質成分の不可逆的漏出を起こし、さらに高濃度になると細胞質成分中の核酸や蛋白質と反応して沈殿を生じさせるといわれており、これらのことよりセラチアの前株と耐性株とは細胞質成分の漏出量、あるいは最大漏出を惹起する CH 濃度に相違があるのではないかと考えられたので本実験を行った。各濃度の CH と菌体けん濁液を接触させたのち、0.5, 2, 6, 22 hr. と経時的に追跡すると、各成分の漏出量は次第に増大したが、このうち、差の著しい接触時間 22 hr 後の結果を Fig. 5 に示した。これによると、細胞質成分の漏出のパターンは蛋白質系物質も核酸系物質もともに類似しており、原株はどちらも CH 64 μg/ml に漏出の最大ピークを示し、一方、耐性株では 128 μg/ml に漏出の最大ピークを示し、かつその漏出量が原株の方が上回っていることから、耐性株の細胞膜の方が原株のそれよりも構造的により rigid ないしは thick になっているのではないかと考えられた。

Hugo ら³⁾は *Staphylococcus aureus* と *Escherichia coli* を比較しつつ、この種の漏出実験を行い、最大漏出のピークが *Staphylococcus* の場合は CH 40 μg/ml に、*Escherichia* の場合は 93.6 μg/ml に存在することを認めている。

今回の原株と耐性株とで最大漏出をもたらす CH 濃度が 2 倍に上昇する点は興味深い。

Table 1 Comparison of extractable lipid content between parent(P) & CH-resistant(R) *Serratia*

| Strain | Cell density (OD ₆₈₀) | Dry weight (mg) | Lipid (mg) | Lipid Dry cell (%) |
|--------|-----------------------------------|-----------------|------------|--------------------|
| P | 110 | 66.2 | 7.4 | 11.2 |
| R | 100 | 59.1 | 7.7 | 13.0 |
| P | 108.3 | 70.5 | 6.3 | 8.9 |
| R | 98.3 | 61.8 | 6.1 | 9.9 |
| P | 85.3 | 49.9 | 9.4 | 18.8 |
| R | 84.8 | 50.3 | 10.8 | 21.5 |
| P | 84.9 | 48.9 | 11.0 | 22.5 |
| R | 83.0 | 48.5 | 11.8 | 24.3 |
| P | Average | | | 15.4(100) |
| R | Average | | | 17.2(112) |

3. 菌体脂質含量の比較

膜を構成する脂質の含量および後述の脂肪酸組成について、原株及び耐性株と比較し、CH 耐性化の機構を推察しようとした。

まず、BLIGH と DYER の抽出法により得られた脂質含量について両菌株で比較した結果の 4 例およびそれらの平均値を Table 1 に示した。4 例については多少のばらつきはあるが、脂質含量が原株より耐性株の方が常に高いことがわかる。この脂質含量が高いということが CH 耐性と何らかの関連があるのではないかと考えられる。

4. 脂肪酸組成の比較

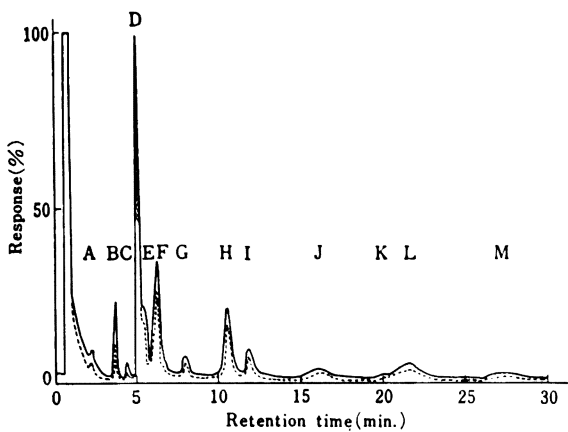
CH 耐性株に特異的な脂肪酸が存在するのではないかと考えられたので、上記の脂質をメタノリシスして得られた脂肪酸メチルエステルにつきガスクロマトグラフを行った。得られたチャートを Fig. 6 に示したが、構成脂肪酸は C₁₆ のパルミチン酸をはじめとして微小なピークまで含めると 13 成分からなり、各脂肪酸の、全脂肪酸量に対する比率、および同定した脂肪酸名を Table 2 に示した。これより原株と耐性株とは脂肪酸組成およびその比率はほとんど変わらず、脂肪酸の種類と成分比は CH 耐性には直接関与していないと考えられた。

III. 考 察

セラチアの前株と CH 耐性株につき、金属プロテアーゼの産生を比較したところ、原株の方が常に 10% 程度その産生量が大きく、耐性株の方が酵素蛋白をより分泌しにくいのではないかと考えられた。

次に、両菌株について細胞質成分の漏出に及ぼす CH 濃度を検討した結果、この場合の漏出量も常に原株の方

Fig. 6 Gas chromatograph of fatty acid methyl-esters obtained from parent and CH-resistant *Serratia*



Running conditions;

Column, Diethyleneglycol succinate (DEGS)
25% on Chromosorb W, 3 mm × 3 m
Temperature, 200° in column; 230° in detector
Carrier gas, N₂, 60 ml/min
Model, Shimadzu GC-4BMPF

--- Parent; — Resistant strain

Alphabetical Nos. are corresponding to next Table 2

Table 2 Fatty acid composition of *Serratia* lipids

| Component | Fatty acid | Parent (%) | Resistant (%) |
|-----------|--|------------|---------------|
| A | Lauric acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂) | 0.4 | 0.3 |
| B | Myristic acid (C ₁₄ H ₂₈ O ₂) | 5.9 | 5.9 |
| C | Unid.* | 1.3 | 1.3 |
| D | Palmitic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂) | 49.6 | 45.5 |
| E | Unid. | 0.3 | 0.3 |
| F | Palmitoleic acid (C ₁₆ H ₃₀ O ₂) | 14.0 | 16.9 |
| G | Azelaic acid ((CH ₂) ₇ (CO ₂ H) ₂) | 3.2 | 2.9 |
| H | Oleic acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂) | 11.1 | 12.3 |
| I | Unid. | 6.0 | 6.4 |
| J | Unid. | 2.6 | 2.1 |
| K | Unid. | 0.6 | 0.6 |
| L | Unid. | 3.6 | 3.9 |
| M | Unid. | 1.6 | 1.6 |

* Unid.: unidentified

Data are based on Fig. 6

が大きく、その最大漏出を惹起する CH 濃度は耐性株の方が原株のその 2 倍となった。このことから、著者らは CH 耐性化機構はセラチアの菌体の細胞質膜の構造的変化 (loose→rigid あるいは thin→thick) に起因するのではないかと考えた。

このことに関連して、菌体内脂質 (BLIGH と DYER の抽出法により抽出可能な脂質、通称リピド B) の含量を比較した結果、若干ではあるが耐性株の方が原株よりも高かった。WINSHELL ら⁶⁾は、*Serratia marcescens* を色素産生の有無と抗生物質感受性の差により 3 グループに分け、各グループと細胞膜の脂質含量の関連性を調べ、セラチアにおける各抗生物質に対する感受性の違いは細胞膜の脂肪含量に基づいては説明できない (3 グループとも総脂質含量、phospholipid および脂肪酸エステルに差は認められない) という結論に達している。今回の著者らの実験に関しては、CH 耐性と脂質含量の大小に関連があると考えられるので、強塩基性の CH に著しい耐性を示すには耐性株の細胞表層に何らかの構造的、化学的变化が生じているのではないかと結論せざるを得ない。

さらに、脂肪酸組成について比較したが、それらの種類および成分比は両菌株でほとんど差がなく、このことよりセラチアの CH 耐性には脂質の量が問題であって、脂肪酸の組成および成分比は関与しないものと考えられる。

原株と CH 耐性株との相違については、他に諸酵素系の関与が考えられ、目下検討中である。CH 耐性のメカニズムとして次報で報告する。

文 献

- 1) 上田 勝, 三浦昭代, 柴田元雄, 等 泰三: *Serratia marcescens* のクロールヘキシジン耐性菌の育成とその対応策について. *Chemotherapy* 29: 731, 1981
- 2) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951
- 3) HUGO, W. B. & A. R. LONGWORTH: Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 16: 655, 1964
- 4) BLIGH, E. G. & W. J. DYER: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911, 1959
- 5) 山崎英正, 辻 秀憲, 佐伯清美: *Serratia* 属菌産生蛋白分解酵素 TSP の抗炎症作用. *日本薬理学雑誌* 63: 302, 1967
- 6) WINSHELL, E. B. & H. C. NEU: Relation of cell wall lipid contents of *Serratia marcescens* to resistance to antimicrobial agents. *Antimicro. Ag. Chemoth.* 6: 73, 1974

SOME PROPERTIES OF CHLORHEXIDINE-RESISTANT STRAIN OF *SERRATIA MARCESCENS*

MASARU UYEDA, MASAYUKI SAKATA, MOTOO SHIBATA and TAIZO HITOSHI*

Laboratory of Medicinal Microbiology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 862, Japan

* Department of Pharmacy, School of Medicine, Kurume University

Some properties of chlorhexidine(CH)-resistant *Serratia* were compared with the parent strain.

Extracellular production of serratiopeptidase (a kind of metal protease) by CH-resistant *Serratia* was about 10% less than that of the parent strain, may be because of the rigidity of cell envelope.

CH concentration which brought about maximum leakage of cell constituents was 64 $\mu\text{g/ml}$ in the parent, and twice as much in the CH-resistant strain.

Lipid content in the CH-resistant strain was higher than that of the parent, however, there was no differences in the kind and the ratio of fatty acids between both strains. Therefore, difference in the lipid content was thought to be significant in relation to the structural difference of the cell envelope of CH-resistant strain.