

感染モデルとしての連続流動培養法による各種抗菌薬の 細菌発育抑制効果の観察

第2報: *E. coli* および *P. aeruginosa* 混合培養に対する場合

岡 田 敬 司

東海大学医学部泌尿器科学教室

(昭和 56 年 12 月 22 日受付)

連続流動培養を一つの感染モデルと考え、これを利用した *E. coli*, *P. aeruginosa* の混合培養の場合と、各々の単独培養の場合に対する GM, CFS, NA の抗菌効果を比較した。また菌種相互の作用をみるため、(1) *E. coli* が定常状態にある場合に *P. aeruginosa* を接種した場合、(2) *P. aeruginosa* が定常状態にある場合に *E. coli* を接種した場合、(3) 両菌種を同時に接種した場合の各菌種の生菌数、培地の pH および ORP を経時的に測定した。(1) の場合約 18 時間にわたって *P. aeruginosa* の増殖抑制がみられ、(2) では約 18 時間にわたって *P. aeruginosa* の増殖促進効果が認められたが、(3) ではこれらの作用を認めなかった。

各種抗菌薬の存在下では、どの薬剤の場合でも混合培養の場合の方が両菌種とも再増殖開始から定常状態に至るまでの時間が短かった。菌数の減少度は混合培養では GM の場合両菌種ともに単独培養に比べ小さく、CFS の場合 *P. aeruginosa* の減少度は単独培養の場合より小さく、*E. coli* のそれは単独培養の場合より大きかった。NA の場合は単独培養と混合培養で差がなかった。これらのことは混合培養において薬剤の細菌外膜透過性、細菌の代謝機構に何らかの変化が起こったことを思わせるものであるが、今後さらに検討を要する問題と考えられる。

以上のことと複数菌感染が難治であるといわれていることを結びつけ若干の考察を行なった。

尿路感染症のうち慢性複雑性尿路感染症は一般に難治であり、基礎疾患を除去しなければ有効と思われる抗菌薬を投与しても除菌しにくい。

また難治の理由の一つに複数菌感染の多いことがいわれている。

著者はすでに第1報で連続流動培養装置を実験的感染モデル、特に尿路感染モデルとして *E. coli*, *P. aeruginosa* 各々に対して各種抗菌薬を使用し、それらの抗菌効果について検討を加えた¹⁾。本報では複数菌感染が難治といわれている理由が必ずしも患者側の要因だけでなく、細菌側あるいは薬剤側にもあるのではないかと考え第1報と同じ連続流動培養装置を用い、各種抗菌薬を使用して上記両菌種の単独培養時と混合培養時における抗菌効果を比較検討し、若干の考察を加えた。

I. 実験方法

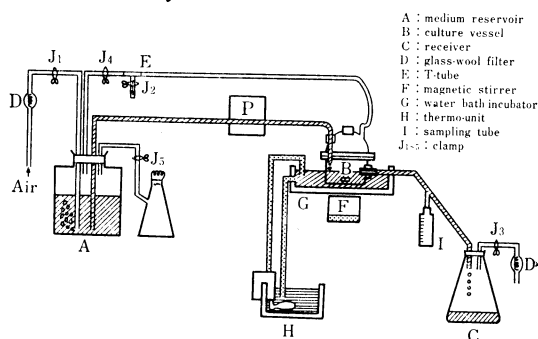
すでに第1報で述べた連続流動培養装置 (Fig. 1) を使用したので、ここではその概略を記すにとどめる。

Fig. 1 左側の medium reservoir (A) には第1報のように veal infusion broth (Difco) を入れ、装置全体を滅菌後、微量定量ポンプ (P) を使用して中央右の

vessel (B) 内に毎時 20 ml の流量で培地が流れ込むようにしてある。vessel 容量は 100 ml なので dilution rate は 20% per hour となる。また aeration も行なっている。

vessel 内の攪拌はマグネチックスターラーで 150 rpm に回転数を調節してあり、vessel 周囲には 37°C に保たれた温水が灌流しており、overflow した培地は右下の三角コルペン (C) に流入する。この vessel 内に

Fig. 1 Schematic representation of continuous flow culture system



A : medium reservoir
B : culture vessel
C : receiver
D : glass wool filter
E : T-tube
F : magnetic stirrer
G : water bath incubator
H : thermo-unit
I : sampling tube
J₁₋₃ : clamp

第1報で使用したのと同じ尿路感染症由来の *E. coli* および/もしくは *P. aeruginosa* を接種し、経時的に生菌数の測定を行なった。

菌数計算は 10 倍希釈による寒天平板培地上の集落数を数えた。この培地には colony の鑑別が容易であることから DHL 寒天培地(栄研)を使用した。この装置で aeration を行ない、培地を常に流している状態で以下の実験を行なった。

実験 1

vessel 内に接種した細菌相互の間に拮抗作用あるいは増殖促進作用があるかをみるために、(1) *E. coli* を接種して定常状態まで増菌した後に *P. aeruginosa* を 3×10^2 コ接種、(2) *P. aeruginosa* を接種して定常状態まで増菌した後に *E. coli* 3×10^8 コを接種、(3) *E. coli* 6×10^2 コと *P. aeruginosa* 7×10^3 コを同時に接種することを行ない、各々の場合における両菌種の菌数変化を経時的にみた。この場合第1報で行なったように pH, 酸化還元電位 (ORP) の測定も行なった。

実験 2

定常状態となっている *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養系に対して *P. aeruginosa* もしくは *E. coli* に対する Gentamicin(GM), Cefsulodin(CFS), Nalidixic acid(NA) の、MIC 値を基準とした濃度で各薬剤を vessel 内へ添加し、両菌種の経時的生菌数の変化を調べた。

両菌種の各薬剤に対する MIC は日本化学療法学会標準法に準じて測定したが、veal infusion agar を培地とし、接種菌数を 2×10^7 コ/ml とした。測定値は Table 1 に示した。

II. 結 果

実験 1

(1) *E. coli* を加えて定常状態になってから *P. aeruginosa* を加えた場合(Fig. 2)。 *E. coli* は約 2×10^7 コ/ml まで増加し、定常状態となるが、ここで *P. aeruginosa* を接種するとこれは 10^6 コ/ml 程度までしか増殖せず、*E. coli* にその増殖が抑制された形をとる。しか

し *P. aeruginosa* の接種 24 時間後には *P. aeruginosa* が増加し、また *E. coli* の減少がみられ、両菌種ともほぼ 10^7 コ/ml の菌数となり、そのままの菌数で経過する。

このとき pH, ORP の増減は第1報で示したように菌数の増加で pH がゆるやかに上昇し、ORP は減少する。

(2) *P. aeruginosa* を最初に接種し、定常状態になってから *E. coli* を加えた場合 (Fig. 3)。 *E. coli* の増殖に伴って *P. aeruginosa* も少し増加傾向を示すが、*E. coli* 接種 24 時間後には両菌種とも約 6.5×10^6 コ/ml の菌数まで減少し、その菌数が持続する。この時の pH, ORP の変化は(1)の場合と同様の变化を示す。

(3) *E. coli* と *P. aeruginosa* を同時に vessel 内へほぼ同量接種した場合(Fig. 4)。両菌種とも約 10^7 コ/ml まで同様に増殖する。定常状態になって 6~7 時間

Fig. 2 Mixed culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* without drug. *P. aeruginosa* (3×10^2 cfu) was added into the culture vessel after *E. coli* reached to stationary state growth (2×10^7 cfu/ml).

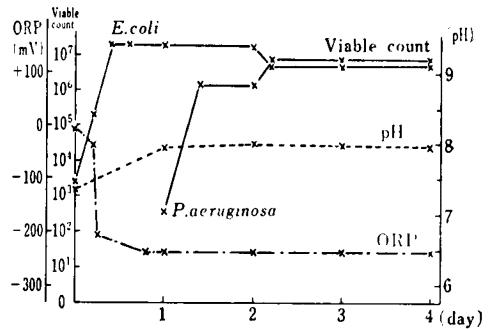


Fig. 3 Mixed culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* without drug. *E. coli* (3×10^2 cfu) was added into the culture vessel after *P. aeruginosa* reached to stationary state growth (2×10^7 cfu/ml).

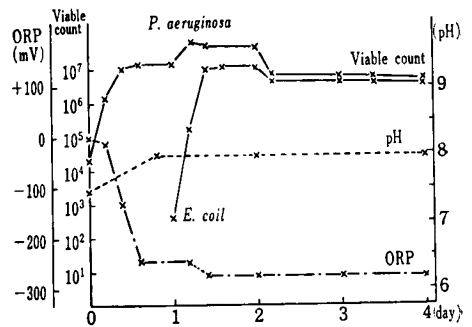
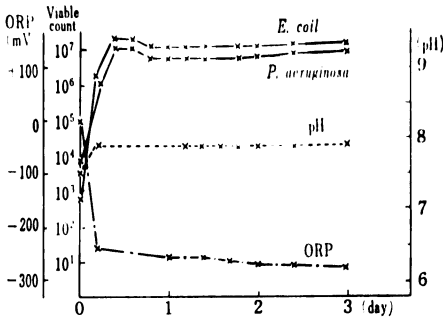


Table 1 Minimum inhibitory concentrations of nalidixic acid (NA), gentamicin (GM) and cefsulodin (CFS) against *E. coli* and *P. aeruginosa* used throughout this experiment

	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>P. aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$)
NA	6.25	50
GM	1.56	12.5
CFS	100	3.13

Fig. 4 Mixed culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* without time lag. Both *E. coli* (6×10^2 cfu/ml) and *P. aeruginosa* (7×10^8 cfu/ml) were added into the culture vessel at time zero.



後両菌種とも心持ち菌数が減少し、そのままの菌数が持続する。pH, ORP の変化は、(1), (2) の場合と変わらない。

実験 2

両菌種を同時に接種した場合、実験1から24時間後にはすでに定常状態になっていると考えられたのでその時点で GM, CFS, NA の各薬剤を vessel 内へ添加し菌数の変化を経時的にみた。なお vessel 内における薬剤濃度の経時的推移は、第1報で述べたように薬剤の1回静注時の血中濃度推移に相当すると考えられる。またその際本装置による *E. coli* あるいは *P. aeruginosa* 単独培養時における各薬剤の抗菌効果も同様の方法でみて、混合培養における場合と比較した。

結果

(1) GM を vessel 内へ添加した場合、vessel 内の GM の添加時濃度は *P. aeruginosa* に対して MIC 値の2倍、*E. coli* に対しては MIC 値の16倍となる濃度である。*E. coli*, *P. aeruginosa* を各々単独で培養した場合と混合培養した場合とで抗菌効果にどの程度の差が生ずるかを示したものが Fig. 5 である。

混合培養の場合 *P. aeruginosa* は減少せず、*E. coli* も1オーダー程度の減少しかせず、両菌種とも単独培養の場合に比べて菌数減少度が少ない。また *E. coli* における静菌時間も混合培養の場合短い。

そこで GM の濃度を上げ、*P. aeruginosa* に対して MIC 値の8倍の濃度となるようにした (Fig. 6)。この場合も *P. aeruginosa* は減少せず、*E. coli* は 10^3 コ/ml 近くまで減少するものの単独培養の場合より明らかに抗菌効果が劣っていると見える。

(2) CFS を vessel 内へ添加した場合、GM の場合と同様に CFS の抗菌効果を比較した (Fig. 7)。*E. coli* に対して MIC 値の2倍の濃度、*P. aeruginosa* に対し

Fig. 5 Comparison of viable cell number between mixed culture and single culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of gentamicin. Steady state growth of *E. coli* and *P. aeruginosa* was attained as described in the text and $25 \mu\text{g/ml}$ of gentamicin, that is equivalent to 2 fold and 16 fold MIC for *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively, was added into the vessel at time zero. Flow culture was made as described in methods.

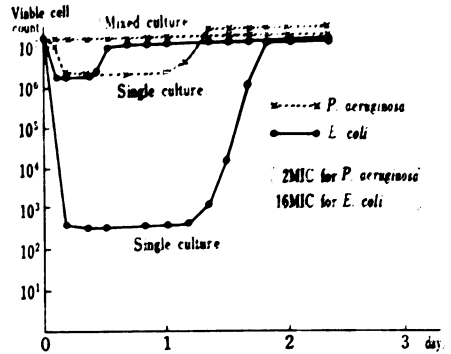
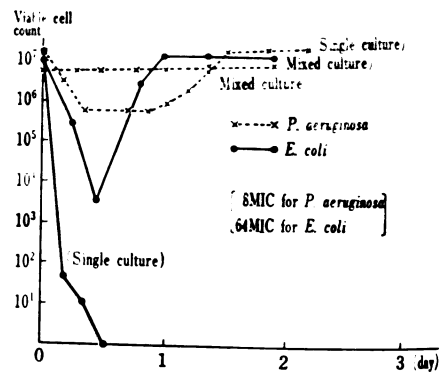


Fig. 6 Comparison of viable cell number between mixed culture and single culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of gentamicin. Experimental details were given at legend to fig. 5. except that gentamicin concentration in the vessel was raised to $100 \mu\text{g/ml}$, 8 folds and 64 folds of MIC for *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively.



ては MIC 値の 64 倍の濃度が添加時濃度となる。*E. coli* は混合培養では 10^3 コ/ml 近くまで減少し、単独培養の場合より菌数減少度は大きい。また *P. aeruginosa* は単独培養で 10^3 コ/ml まで減少し、混合培養では 10^4 コ/ml 近くまでしか菌数が減少しない。再増殖開始から定常状態に至る時間は短い。

Fig. 7 Comparison of viable cell number between mixed culture and single culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of cefsulodin. Experimental details are similar to that of fig. 5, except that 200 $\mu\text{g/ml}$ of CFS (2 folds and 64 folds MIC for *E. coli* and *P. aeruginosa* respectively) was used.

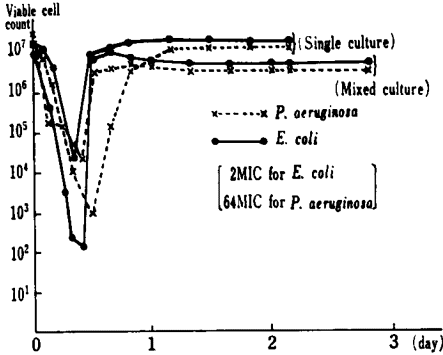
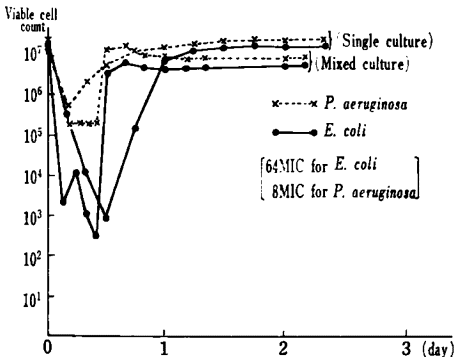


Fig. 8 Comparison of viable cell number between mixed culture and single culture of *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of nalidixic acid. Experimental details are similar to that of fig. 5, except that 400 $\mu\text{g/ml}$ of NA (64 folds and 8 folds MIC for *E. coli* and *P. aeruginosa* respectively) was used.



(3) NA を vessel 内へ添加した場合 (Fig. 8)。NA の添加時濃度は *E. coli* に対する MIC 値の 64 倍, *P. aeruginosa* に対する MIC 値の 8 倍となる。

E. coli は 10^2 cfu/ml 近くまで減少し, 単独培養の場合と差がほとんどない。

P. aeruginosa も 10^3 cfu/ml 近くまで減少し, この場合も単独培養の場合とそれほど差がない。しかし混合培養の場合両菌種とも再増殖開始後の増殖は急激で, 定常状態に達するまでの時間が単独培養にくらべて早い。

III. 考 察

複数菌感染は尿路感染症の場合, そのほとんどが慢性複雑性のものに認められ難治といわれている。その原因として基礎疾患があること, compromised host が多く感染防御機構が充分働かないことなどがあげられているが, 単独感染よりも薬剤による除菌効果が複数菌感染で劣るということは証明されたわけではない。

また複数菌感染の定義も確立しておらず病原性をもった複数の菌種をとらえているのか, 常在菌を含めた複数の菌種が有意に検出された場合も含まれるのか定まっていない。

尿路感染症では本来侵入細菌は複数菌種であるが, 宿主側の感染防御機構が健全な場合には病原性の強い菌しか生着しえず, 感染防御機能が減弱した状態では複数の菌種が生着しようともいわれている²⁾。

さらに検出方法にも問題があり, 菌数の少ないものは検出できない場合もある。

ここでは慢性複雑性尿路感染症の起炎菌として検出率の高い *P. aeruginosa*, *E. coli* を用い, 連続流動培養法によって混合培養の場合と, 単独培養の場合とで GM, CFS, NA の各菌種に対する抗菌効果に差が出るかどうかをみた。また各々の菌種が先住菌として存在する場合, あとから加えられた菌種との間にどのような関係があるのかについても検討した。これは混合培養において, 菌種間に何らかの相互作用がある場合, 抗菌薬の混合培養における各種細菌に対する抗菌効果が修飾される可能性があると考えられるために行なった。

しかしながら Fig. 2~4 に示したように, *E. coli* と *P. aeruginosa* の組み合わせでは両菌種ともよく共存することが示されている。すなわち *E. coli* が先住菌の場合, *P. aeruginosa* の増殖は多少抑制されるが *P. aeruginosa* 接種 24 時間後には抑制が解除される。

P. aeruginosa が先住菌の場合は *E. coli* の増殖抑制はみられず逆に先住菌である *P. aeruginosa* の増殖が少し促進される。この場合も *E. coli* 接種 24 時間後には *P. aeruginosa* は元の菌数にもどり, *E. coli* とほぼ同じ菌数となる。

両菌種と同時に接種した場合, 上記のようなことは起こらず各々の菌種を単独で培養した場合と大差ない増殖態度を示す。

in vitro における *E. coli* と *P. aeruginosa* の増殖に関して 辻ら³⁾は *E. coli* の増殖が優勢であるとしているが, 静置培養下の実験であり, 増殖速度の差も影響していると考えられる。また名出ら⁴⁾は逆に *P. aeruginosa* の方が優勢になるとしているが, 菌株によっては何らかの発育阻害物質が出ている可能性は否定できない。

HENTGES ら¹⁾は連続流動培養法 (Chemostat による) を用いて *Shigella flexneri* と各種細菌 (*E. coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter*, *P. aeruginosa*) を混合培養し、*S. flexneri* に対する増殖抑制効果を観察し、*E. coli* による増殖抑制効果が最も著明で、*Proteus* sp., *Enterobacter* は中等度の抑制効果、*P. aeruginosa* では増殖抑制効果はほとんど認められなかったとしている。

小澤²⁾はセロファン膜バックを使用し、嫌気条件下でセロファンバック内外の液体培地中に *E. coli* を接種し、セロファン膜バック外の *E. coli* の増殖阻止効果を検討し、ブドウ糖添加もしくは通気によって増殖阻止効果が消失したと述べ、先住菌が侵入菌の増殖を抑制する機構は、先住菌の増殖による酸化還元電位の低下と、その条件下において侵入菌が利用するエネルギー源の消費という2つの因子によるものであろうと述べている。

実験1でみられた *P. aeruginosa* の増殖抑制は辻ら³⁾の静置培養の結果と差がないように思われるが、その後両者がほぼ同じ菌数で共存することまでは確かめられていない。小澤²⁾の酸化還元電位によるという意見には適合しているように思われるが本実験とは菌種差もあり、抑制の度合も一致しているわけではない。

また *E. coli* の追加接種による *P. aeruginosa* の増殖促進は、*E. coli* から *P. aeruginosa* の増殖に役立つ何らかの物質が出ていることを示唆させるが、このような増殖抑制、増殖促進は複数の因子によって決定されると考えた方が妥当と思われ、両者のうち強く働いた方の作用が現象としてとらえられるものと考えたい。これらの因子についてはさらにほり下げた研究が必要と考えられる。

実験2では *E. coli* と *P. aeruginosa* が定常状態にある時の各薬剤の抗菌効果をみたが、混合培養の場合 GM では両菌種いずれに対しても単独培養の場合より殺菌効果が劣り、静菌時間も短い。このことがアミノ配糖体系薬剤全般についていえるものかどうか、さらに検討を加える予定である。

CFS の場合、混合培養では *P. aeruginosa* に対しては殺菌効果が1オーダー程度劣っていたが、*E. coli* では逆に混合培養の場合で殺菌効果が優れていた。しかし両菌種に対する静菌時間は単独培養の場合より短くなっている。

NA の場合、殺菌効果は単独培養と混合培養で両菌種とも差がないが、静菌時間には差が認められ混合培養のほうが短かった。

vessel 内における薬剤濃度の推移に関しては第1報で述べたように、抗菌薬1回静注時の血中濃度変化に類似したものと考えられ、各薬剤間に差がないと考えられ

る。また pH, ORP の変動も単独培養と混合培養で差を認めておらず、培地、温度、希釈率など条件的に差がない。

このような条件下で *E. coli* と *P. aeruginosa* の単独培養と混合培養で各種抗菌薬の抗菌効果に差が認められることが何に起因するのか、考えてみたい。

第1報において同じ MIC 値を示す薬剤でも連続流動培養という動的環境においては、細菌外膜透過性や薬剤の作用機序の差によってその抗菌効果に差が認められるであろうことを述べた。

抗菌薬がグラム陰性桿菌に作用するためにはまず細菌外膜を通過する必要がある、その経路としていわゆるポーリン蛋白が考えられている。

三量体で形成されるこの親水性小孔は低分子水溶性物質の非特異的膜透過に関与するといわれ薬剤分子が小さい程よく通過しうると考えられており、薬剤分子の構造、荷電状態などにも影響される⁴⁾。

また細菌側からいえば、菌種によって外膜の構造に差があり、*P. aeruginosa* は他のグラム陰性桿菌とは多少異なっている。

ここで使用した CFS, GM, NA の分子量は各々 554.52, 425±21, 232.24 であり、NA の外膜透過性が最も良いと考えられる。

混合培養と単独培養で殺菌効果に差がなかったのは NA だけであり、この成績は直接透過性の良さを示しているだけでないとしても分子量というものがかなりの程度まで抗菌効果に関与していることを思わせる。

GM, CFS を使用した場合、特に *P. aeruginosa* の殺菌効果が混合培養で劣っていたことは *P. aeruginosa* における外膜透過性の変化がありうることを示唆しているように思われる。

逆に *E. coli* に対しては GM では殺菌効果が混合培養で低下し、CFS では多少良くなっているが、このことも複数菌種の存在下で外膜透過性の変化がありうることを示していると考えられる。

さらにどの薬剤を使用した場合でも再増殖開始から定常状態に至るまでの時間が両菌種ともに単独培養の場合に比べて混合培養で短くなっている。

ここでは *E. coli* と *P. aeruginosa* による実験結果のみであるが、混合培養で再増殖開始から定常状態に達するのに短時間で済むことは、また複数菌感染の難治性の一因とも考えられる。このことは細菌の代謝機構に関与していることと推測されるが、外膜透過性の問題とともに、今後さらに研究をつみ重ねてゆく必要がある問題と考える。

以上、連続流動培養法により、*E. coli* と *P. aerugi-*

nosa を用い、混合培養を行なった時の菌相互の関係を含め、GM, CFS, NA の抗菌効果について単独培養の場合と比較しながら若干の考察を加えた。

稿を終えるにあたり、御助言を頂いた大越正秋教授、微生物学教室小澤敦教授ならびに廣應義塾大学医学部田崎寛教授に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 11 回国際化学療法学会および第 19 回 Interscience 学会、ならびに第 27 回日本化学療法学会において発表した。

文 献

- 1) 岡田敬司：感染モデルとしての連続流動培養法による各種抗菌薬の細菌発育抑制効果の観察 第 1 報：*E. coli* 及び *P. aeruginosa* 単独培養に対する場合。Chemotherapy 30：499～508, 1982
- 2) 熊本悦明：尿路感染症における複数菌感染。臨床と細菌 8：141～150, 1981
- 3) 辻 明良，小川正俊，金子康子，五島瑳智子：実験的菌交代現象に関する研究 I *In vitro*：大腸

菌，緑膿菌及びセラチアの混合培養系における実験条件の設定、及び β -lactam 系抗菌薬添加による生菌数の変動。Chemotherapy 28：343～357, 1980

- 4) 名出頼明，鈴木忠三，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
- 5) HENTGES, D. J. & R. FRIETER: *In vivo* and *in vitro* antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri* 1. Correlation between various tests. J. Inf. Dis. 110：30～37, 1962
- 6) 微生物生態研究会編：微生物の生態 3 (増殖をめぐって)，連続流動培養菌及び腸管内細菌の増殖制御機構 (小澤 敦)。pp. 232～258, 東京大学出版会, 1976
- 7) DIRIENZO, J. M.; K. NAKAMURA & M. INOUE: The Outer Membrane Proteins of Gram-negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly, and Functions. Ann. Rev. Biochem. 47：481～532, 1978

EFFECT OF ANTIBIOTICS ON THE GROWTH OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN CONTINUOUS FLOW CULTURE

II. STUDIES ON MIXED CULTURE OF *ESCHERICHIA COLI* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

KEISHI OKADA

Department of Urology, School of Medicine, Tokai University

Effect of antibiotics on single culture of *E. coli* or *P. aeruginosa* and the mixed culture of these two organisms were studied using a continuous flow culture apparatus, as a model experiment for the polymicrobial infection in a urinary tract.

When 3×10^8 cfu of *P. aeruginosa* was added into steady state growth of *E. coli* (2×10^7 cfu/ml) or in vice versa, a slight growth inhibition of *P. aeruginosa* after 6 hrs of inoculation during 18 hrs or a light growth promotion after 6 hrs of inoculation during 18 hrs, were observed, respectively.

Growth inhibition of neither *P. aeruginosa* nor *E. coli* was observed in the culture inoculated these organisms without time lag.

The increment of cell population after temporarily decrease of viable cell by administration of antibiotics (gentamicin, cefsulodin, or nalidixic acid) occurred much earlier in the case of mixed culture than in the case of single culture.

Changes of viable numbers in mixed culture after addition of gentamicin, cefsulodin and nalidixic acid resulted that a lighter decrease of both strains than in the case of the single culture, that population of *E. coli* dropped much more than *P. aeruginosa* and that no significant change of cell populations was observed, respectively.

Several possible mechanisms to interpret these results especially the drug permeability of cell outer membrane are discussed.