

Bacteroides fragilis NCTC 11295 株の metronidazole 耐性と 感受性因子の関連について

井上京市・成川新一・鈴木 卓・中村正夫

聖マリアンナ医科大学臨床検査医学教室*

(昭和 63 年 1 月 16 日受付)

Bacteroides fragilis NCTC 11295 株は, metronidazole (以下 Mz と略す) 長期投与患者由来の例外的 Mz 耐性株である (MIC は 32 $\mu\text{g/ml}$)。今回我々は, この株の耐性機作を明らかにするために, この耐性株を含め, 6 株の *B. fragilis* の培養液について Mz を不活化する因子を検索したが, その存在を明らかにすることはできなかった。さらに, Mz 感受性因子と考えられている nitroreductase および pyruvate : ferredoxin oxidoreductase 活性と培地中 Mz 濃度との関連から, この株の耐性機作を検討した。その結果, この耐性株を Mz 無添加培地で培養した cell の抽出液の感受性因子活性は, 他の感受性株との間の差は認められないが, Mz 添加培地で培養した cell の抽出液については, 明らかにその活性が低下することを認めた。また, その cell を Mz 無添加培地に継代し, 培養したところ, 低下していた感受性因子活性は, 1 継代 18 時間培養で元に戻ることが認められた。一般に, 嫌気性菌において, 感受性親株から *in vitro* で mutagen 処理により生ずる耐性変異株は, Mz 感受性因子の活性が低下することが知られており, *B. fragilis* NCTC 11295 株の耐性機作についても培地中 Mz に対する, いわゆる適応と考えられる Mz 感受性因子の活性低下が関与していると推測される。

Key words: *B. fragilis*, Metronidazole, Resistance, Nitroreductase, Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase

B. fragilis NCTC 11295 株は, 1978 年, INGHAM らによって英国で分離された例外的 Mz 耐性株で実に 3 年半にわたって総量 2 kg もの Mz を投与された急性限局性小腸炎患者由来の株である¹⁾。その耐性機作については, Mz の細胞内取り込み能および代謝酵素活性の面から, 感受性株と比較検討した報告があるが^{2,3)}, 現在までのところ, この株が耐性を示す理由は明らかにされていない。今回我々は, Mz 不活化因子および Mz 感受性因子の活性を測定することによって, この株の耐性機作を検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

Bacteroides fragilis NCTC 11295 株, ATCC 25285 株および本学病院臨床検査部細菌検査室で, 臨床材料から分離され, *B. fragilis* と同定された No. 01113 株, 07190 株, 11101 株, 11287 株の計 6 株を用いた。

2. 使用培地および培養条件

Gifu Anaerobic Medium (GAM; 日水) の broth と GAM 寒天平板を用い, 嫌気性グローブボックス (Mod-

el 1024, Forma 社製) 内の嫌気条件 (85% N_2 , 10% CO_2 , 5% H_2), 37°C で培養した。

3. Metronidazole (化学名は, 2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol)

塩野義製薬(株)から, 分与されたフランスのローヌ・ブーラン社製の研究用原末を用いた。

4. Mz 感受性の測定

被験菌株に対する Mz の MIC は, 寒天平板希釈法で測定した。菌の接種は, マルチノキュレータを用い, 接種菌数は, 1 スポット当たり約 10^4 個とした⁴⁾。

5. 培養液による Mz の不活化活性の測定

成川らと同様, 培養液による broth 中の Mz の減少速度を不活化活性として測定した⁵⁾。なお Mz は, WOOD の方法⁶⁾に従い, broth に溶けている Mz を抽出してトリメチルシリル化し, GLC を用いて定量した。

6. 無細胞抽出液の作製

GAM 平板培地, および Mz をその濃度が 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した GAM 平板培地を作製し, 24 時間培養した被験菌 broth を接種し, 18 時間

* 川崎市宮前区菅生 2-16-1

培養を行なった。発育してきた菌体を、コンラージ棒を用いて集菌し、100 mM phosphate buffer pH 7.0 に浮遊させ、8,000 g 10 分間遠心した。1 回洗浄後、buffer に再浮遊させ、これを窒素噴射下で超音波細胞破砕器 (Sonifier, model W-200 P, Branson 社製) によって 20 kHz, 20 分間超音波処理し、菌体を破砕した。この抽出液の遠心上清をメンブランフィルター (pore size 0.45 μm) で過減菌し、cell-free extract (以下、抽出液と略す) とし、蛋白量を LOWRY 法⁷⁾により定量した。

7. Nitroreductase 活性の測定

酵素活性は、菌の抽出液および培養液について、MCLAFFERTY らと同様、p-nitrobenzoic acid を基質として生成される p-aminobenzoic acid を定量することにより測定した⁹⁾。比活性は、成川らの単位で示した⁹⁾。

8. Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase 活性の測定

LINDMARK & MÜLLER および BRITZ & WILKINSON の方法に従い、酵素活性は菌の抽出液についてメチルピオロゲンの還元を計ることにより測定した⁹⁾。比活性は、TABAQCHALI らの単位で示した⁹⁾。

9. 統計処理法

卓上電子計算機 (Casio fx-3600 P) を用いて保温時間と反応量の回帰直線を求め、各 slope の比較を行な

た⁹⁾。

II. 成 績

Table 1 は各被験菌株の培養液による Mz の不活化活性および nitroreductase 活性を示す。*B. fragilis* NCTC 11295 株も、他の感受性株と同様に、Mz を不活化する因子の存在は認められなかった。なお、通性嫌気性菌における Mz 不活化因子とされる nitroreductase 活性も測定したが、認められなかった。

Table 2 は各被験菌株を Mz 無添加培地で 18 時間培養した菌体抽出液の Mz 感受性因子の活性 (3 回測定し、その平均値) と、それぞれの菌株の MIC を示す。耐性株の感受性因子活性は、他の株と同様の値を示し、何ら MIC との間に相関はみられなかった。

Table 3 は *B. fragilis* NCTC 11295 株を Mz 添加培地 (濃度は、1, 2, 4, 8 および 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 18 時間培養した菌体抽出液の Mz 感受性因子活性 (3 回測定し、その平均値) を示す。Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase 活性は、Mz 濃度 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で影響を受け始め、無添加~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養時の約 1/4 に低下した。さらに、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では活性が認められなかった。一方、nitroreductase 活性は、Mz 濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも影響を受け、無添加培養時の 1/3 に低下し、さらに、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上添加した場合には、1/6 の活性に低下した。なお、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培

Table 1. Metronidazole-inactivating and nitroreductase activities of cell-free filtrates of metronidazole-resistant and -susceptible *Bacteroides fragilis*

Strain	Mz*-inactivating activity	Nitroreductase activity
<i>B. fragilis</i> NCTC 11295	—	—
ATCC 25285	—	—
No. 01113	—	—
No. 07190	—	—
No. 11101	—	—
No. 11287	—	—

* Mz : metronidazole

Cultures were incubated for 18 h.

Table 2. Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase and nitroreductase activities of cell-free extracts of metronidazole-resistant and -susceptible *Bacteroides fragilis*

Strain	MIC of Mz* ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase activity (O.D. units/g protein/min)	Nitroreductase activity (μmol of PABA**/g protein/h)
<i>B. fragilis</i> NCTC 11295	32	+ (619)	+ (6)
ATCC 25285	0.5	+ (664)	+ (7)
No. 01113	0.5	+ (957)	+ (7)
No. 07190	1	+ (968)	+ (3)
No. 11101	1	+ (714)	+ (3)
No. 11287	1	+ (559)	+ (5)

* Mz : metronidazole

** PABA : paraaminobenzoic acid

Cultures were incubated for 18 h.

Table 3. Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase and nitroreductase activities of cell-free extracts of the resistant *Bacteroides fragilis* NCTC 11295 incubated at various concentration of metronidazole

Initial concentration of Mz* ($\mu\text{g/ml}$)	Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase activity (O.D. units/g protein/min)	Nitroreductase activity (μmol of PABA**/g protein/h)
0	+ (619)	+ (6)
1	+ (743)	+ (2)
2	+ (604)	+ (1)
4	+ (752)	+ (1)
8	+ (176)	+ (1)
16	- (0)	+ (1)
16 \rightarrow 0	+ (550)	+ (6)

* Mz : metronidazole

** PABA : paraaminobenzoic acid

Cultures were incubated for 18 h.

養した菌体については、集菌、洗浄後、再び Mz 無添加培地に接種、培養し、同様に活性を測定したところ、両感受性因子活性は、1 継代、18 時間培養ではほぼ元の活性に戻ることが認められた。

III. 考 察

B. fragilis NCTC 11295 株の Mz 耐性機作を明らかにするためには、まず Mz の抗菌作用の機序を手がかりとして検討する方法が考えられる。Mz は、嫌気性菌にのみ抗菌力を示し、その耐性菌の出現が極めて稀であることから、特異な作用機序が考えられている。しかしながら、その詳細については、完全には明らかにされておらず、現在のところ大別して2つの説がある。一つは嫌気性菌のみが酸素感受性の nitroreductase 活性をもち、Mz の5位の nitro 基を還元して、nitroso 基あるいは N-hydroxyamino 基を生じ、嫌気性菌の DNA と結合するという説^{10,11)}で、nitroreductase を Mz 感受性因子とする考え方である^{8,12,13)}。したがって、TALLY らは NCTC 11295 株は nitroreductase 活性が低いとのデータを報告し²⁾、MCLAFFERTY らも同様に nitroreductase 活性の低いことを、Mz 耐性の一つの要因と考えている³⁾。今回、我々が用いた被験菌6株については、nitroreductase 活性と MIC との間に何ら関連がみられず、彼らの成績と異なるが、その理由の一つとして、彼らが対照として用いた Mz 感受性株が1株だけであったことが考えられる。また、この耐性株の DNA に関しては、詳細な検討はなされていないが、extrachromosomal DNA いわゆる R 因子の存在は、TALLY らによって否定され、当然のことながら、その耐性の伝達も不可能であったと報告されている²⁾。一方、成川らは、*Enterococcus faecalis* の生菌および抽出液に Mz を不活化する因子の存在を報告しているが⁵⁾、その後の検討により、この因子の活性は通性嫌気性菌における nitroreductase 活性

の存在と一致しており、Mz の抗菌活性化を誘導しない5位の nitro 基の還元であることを示唆している¹⁴⁾。嫌気性菌においては、このような不活化因子の報告はなく^{8,15)}、今回、我々も被験菌の培養濾液を用いて、nitroreductase も含め不活化因子の検索を行なったが、そのような活性は見出せなかった。Mz の作用機序のもう一つの説は、嫌気性菌はエネルギー産生における電子伝達系で、ferredoxin と呼ばれる酸化還元電位の低い電子運搬体を利用するが、Mz の5位の nitro 基が還元型 ferredoxin より電子をうばい、嫌気性菌は電子伝達系を阻害されるという説である^{8,10,15)}。Mz が嫌気性菌を殺菌するとき、5位の nitro 基が還元されるのは前述の説と共通であるが、その還元に関与すると思われる電子伝達系の酵素である pyruvate : ferredoxin oxidoreductase を Mz 感受性因子とする考え方である⁹⁾。したがって、TABAQCHALI らは、NCTC 11295 株も含め Mz の MIC が少しずつ異なる *B. fragilis* 4 株の pyruvate : ferredoxin oxidoreductase 活性を測定したが、その活性と MIC との間に何ら相関を認めなかったとし¹⁶⁾、今回の我々と同様の成績を報告している。しかし、今回我々は、さらに Mz 添加培地を用いて実験を進めたところ、そこに発育してきた菌体の抽出液の nitroreductase および pyruvate : ferredoxin oxidoreductase 活性は、明らかに培地中 Mz に対する適応と思われる低下を示した。一般に嫌気性菌において、感受性親株から *in vitro* で mutagen 処理により生ずる耐性変異株は、Mz 感受性因子の活性が低下することが知られており^{8,15)}、*B. fragilis* NCTC 11295 株の耐性機作も同様であると考えられる。さらに Mz 感受性因子のうち、pyruvate : ferredoxin oxidoreductase は嫌気性菌におけるエネルギー産生系にかかわる酵素であるため、この耐性株が Mz 添加培地で発育してするために利用する代替エネルギー産生系について、

現在検討中である。

文 献

- 1) INGHAM, H R EATON S VENABLES C W and ADAMS P C: *Bacteroides fragilis* resistant to metronidazole after long-term therapy. *Lancet* 1: 214, 1978
- 2) TALLY, F P SNYDMAN D R SHIMELL M J and GOLDIN B R: Mechanisms of antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. In *Metronidazole* (Phillip, I and Collier J) The Royal Society of Medicine and Academic Press, London, pp.19~27, 1979
- 3) MCLAFFERTY, M A KOCH R L and GOLDMAN P: Interaction of metronidazole with resistant and susceptible *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 21: 131~134, 1982
- 4) WASHINGTON, J A: *Manual of Clinical Microbiology*. 4th Ed., Amer Soc Microbiol. 2, Susceptibility test: Agar dilution (Lennette, E H Ballow A Hausler W J and Shadomy H J) pp.967~971, 1985
- 5) 成川新一, 原沢 功, 中村正夫: *Streptococcus faecalis* の無細胞抽出物による metronidazole の不活化について。日細菌誌 40: 501~509, 1985
- 6) WOOD, N F: GLC analysis of metronidazole in human plasma. *J Pharm Sci* 64: 1048~1049, 1975
- 7) LOWRY, O H ROSENBOUGH N J FARR A L and RANDALL R J: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 8) BRITZ, M L and WILKINSON R G: Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 19~27, 1979
- 9) CERKASOVA, A CERKASOV J and KULDA J: Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of *Trichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 11: 105~118, 1984
- 10) EDWARD, D I DYE M and CARNE H: The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *J Gen Microbiol* 76: 135~145, 1973
- 11) MÜLLER, M: Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93: 165~171, 1983
- 12) CHRYSTAL, E J T KOCH R L MCLAFFERTY M A and GOLDMAN P: Relationship between metronidazole metabolism and bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 566~573, 1980
- 13) YEUNG, T BEAULIEU B B MCLAFFERTY M A and GOLDMAN P: Interaction of metronidazole with DNA repair mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 65~70, 1984
- 14) NARIKAWA, S: Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J Antimicrob Chemother* 18: 565~574, 1986
- 15) SINDAR, P BRITZ M L and WILKINSON R G: Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Clostridium perfringens*. *J Med Microbiol* 15: 503~509, 1982
- 16) TABAQCHALI, S PANTOSTI A and OLDFIELD S: Pyruvate dehydrogenase activity and metronidazole susceptibility in *Bacteroides fragilis*. *J Antimicrob Chemother* 11: 393~400, 1983

RELATIONSHIP BETWEEN METRONIDAZOLE
RESISTANCE AND SUSCEPTIBILITY FACTORS
IN *BACTEROIDES FRAGILIS* NCTC 11295

KYOICHI INOUE, SHINICHI NARIKAWA, TAKASHI SUZUKI and MASAO NAKAMURA
Department of Laboratory Medicine, St. Marianna University School of Medicine,
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 213, Japan

Bacteroides fragilis NCTC 11295—which was isolated from the faeces of a patient who was on long-term therapy with metronidazole for Crohn's disease—is known to be exceptionally resistant to metronidazole (The minimum inhibitory concentration is 32 $\mu\text{g/ml}$ of metronidazole).

We studied why this strain is so resistant. First, we searched for possible metronidazole-inactivating factors in cell-free filtrates from six *Bacteroides fragilis* strains, including NCTC 11295. No such factors were detected. We then cultured the test strain on agar plates containing metronidazole, and determined nitroreductase and pyruvate : ferredoxin oxidoreductase activities (both being regarded as susceptibility factors) in its extract.

Extract of the test strain grown in the absence of metronidazole showed similar activities of both enzymes to those of susceptible strains. However, the extract of the resistant strain grown in the presence of metronidazole showed lower activity than in the absence of the drug.

The cells with lower activity were transferred to plates without metronidazole and cultured for 18 hours. The extract of this strain showed activity of both enzymes similar to those grown in the absence of the drug from the beginning. In general, metronidazole-resistant mutants of anaerobic bacteria, isolated after mutagenesis from the sensitive parent strains, showed lower activity of the susceptibility factors than did the parents.

The metronidazole resistance of *Bacteroides fragilis* NCTC 11295 is presumably attributable to decreased activity of the two enzymes as adaptation to the drug.