

Vibrio cholerae non-01 の薬剤感受性成績および β -lactamase 基質特異性について

館田 一博・山口 恵三・石井 良和¹⁾
 下口 和矩・草野 展周²⁾・菅原 和行
 白井 敏明・河野 茂³⁾・原 耕平³⁾

長崎大学医学部附属病院検査部*

¹⁾: 長崎大学医学部附属病院薬剤部

²⁾: 琉球大学医学部附属病院検査部

³⁾: 長崎大学医学部第二内科

(平成元年11月1日受付・平成2年1月13日受理)

Vibrio cholerae non-01 は、いわゆるコレラ菌 (*V. cholerae* 01) と血清型においてのみ区別される菌種であり、本邦の河川、海洋に広く分布している。本菌のヒトにおける病原性は、コレラ菌感染症にみられる食中毒や感染性下痢症に加えて、肝疾患等を有する患者においては敗血症の起炎菌としても重要であることが知られている。今回、臨床分離株 (10 株) および環境分離株 (80 株) の *V. cholerae* non-01 の薬剤感受性試験を行うとともに、本菌の産生する β -lactamase の基質特異性について検討を加えた。今回検討した抗菌剤の中で ceftizoxime と ofloxacin の抗菌活性が最も優れており、すべての株が $0.025 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示した。また、臨床分離株の中には ampicillin (ABPC) に対する耐性株は認められなかったものの、環境分離株においては 80 株中 30 株 (37.5%) が ABPC に対して MIC 値 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。そして、これら ABPC に対して耐性を示した株のすべてが β -lactamase 産生株であった。そこで、 β -lactamase の基質特異性を測定したところ、*V. cholerae* non-01 の産生する β -lactamase は構成型 penicillinase であることが明らかになった。今後、環境における *V. cholerae* non-01 の薬剤耐性株の推移に目を向けるとともに、これら耐性株の臨床への蔓延に注意していく必要があると考えられた。

Key words: *Vibrio cholerae* non-01, 臨床分離株と環境分離株, 薬剤感受性成績, β -lactamase 基質特異性

Vibrio cholerae non-01 は、いわゆるコレラ菌 (*V. cholerae* 01) と形態学的、生化学的性状が一致しているにもかかわらず、コレラ菌抗 01 血清に凝集しないことから non-agglutinable vibrio (NAG-vibrio) と呼ばれてきた¹⁾。本菌のヒトにおける病原性は、コレラ菌感染症にみられる食中毒や感染性下痢症に加えて、肝疾患等の基礎疾患を有する患者においては敗血症の起炎菌として分離されることも多く、臨床上十分に注意する必要がある²⁾。今回、我々は下痢患者由来の *V. cholerae* non-01 について薬剤感受性試験を施行し、環境分離株のそれと比較検討した。また、本菌のペニシリン系抗菌薬に対する耐性機序の原因と考えられている β -lactamase 産生性、およびその基質特異性について検討を加えたので報告する。

I. 材料および方法

(1) 使用菌株

臨床分離株として下痢患者より分離された *V. cholerae* non-01 10 株を用いた。また、環境分離株として 1985 ~ 1986 年に長崎市中島川より分離された 34 株、および浦上川より分離された 46 株 (計 80 株) の *V. cholerae* non-01 を用いた。

(2) 使用抗菌薬

薬剤感受性の測定に使用した抗菌薬は、 β -lactam 剤として ampicillin (ABPC), piperacillin (PIP), cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX) を、その他の薬剤として streptomycin (SM), tetracycline (TC), sulfamethoxazole-tri-

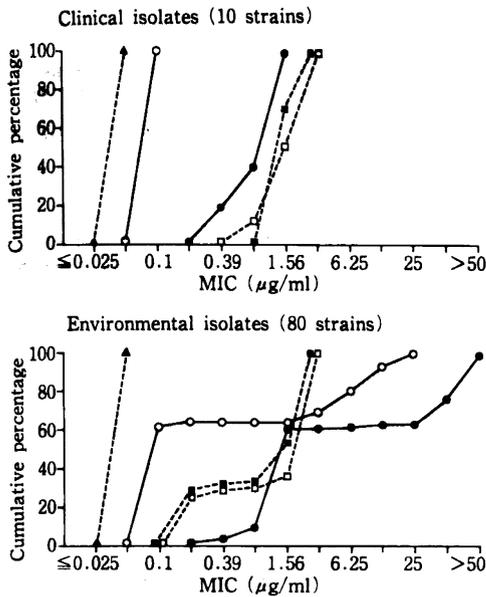


Fig. 1. MIC values obtained with five beta-lactam antibiotics tested against 10 clinically (upper) and 80 environmentally isolated strains (bottom) of *Vibrio cholerae* non-01.

- ampicillin (ABPC),
- piperacillin (PIPC),
- cefazolin (CEZ),
- cefmetazole (CMZ),
- ▲-▲ ceftizoxime (CZX).

methoprim (ST), chloramphenicol (CP), ofloxacin (OFLX) を用いた。本菌の産生する β -lactamase 基質特異性の決定には, penicillin-G (PCG), ABPC, carbenicillin (CBPC), cloxacillin (MCIPC), oxacillin (MIPIC), cephaloridine (CER), CEZ, cefoperazon (CPZ), CMZ, CZX を使用した。また, β -lactamase 阻害剤として clavulanic acid (CVA) を用いた。

(3) 薬剤感受性試験

各種抗菌薬における薬剤感受性の測定は, 96 穴マイクロプレートを用いた broth micro-dilution 法に行った。培地には Mueller-Hinton broth (MH-broth: BBL) を用い, これに 10^4 CFU/well となるように菌を接種し, 37°C, 18 時間培養後に最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

(4) β -lactamase の検出

V. cholerae non-01 における β -lactamase の産生は, β -lactamase 検出用ディスク (β -チェック, 台糖ファイザー) および nitorocefin 液体法 (ピーチャム) を用い, 菌を接種してから 37°C, 30 分間培養し

た後判定した。

(5) β -lactamase 阻害剤の影響

β -lactamase 阻害剤である CVA 添加による ABPC の薬剤感受性の変化について検討した。すなわち, ABPC 単独または ABPC に CVA 5 μ g/ml を加えた液体培地を用い, 上記の方法にて同様に V. cholerae non-01 の MIC を測定した。

(6) β -lactamase 粗酵素液の調整

Brain heart infusion broth (BHI-broth: BBL) にて 4 時間前培養した V. cholerae non-01 4 株をそれぞれ新鮮 BHI-broth に接種し, 37°C にて 2 時間培養後, 3,500 rpm, 15 分間, 4°C にて遠心することにより菌体成分を回収した。これをリン酸緩衝液 (PBS: 0.1M, pH 7.0) にて 2 回洗浄後, 同 PBS に再浮遊させ氷冷下に超音波破砕器で 30 秒間隔で 30 秒間破砕を 10 回繰り返した。この菌体成分破砕液を 15,000 rpm, 30 分間, 4°C, 次に 39,000 rpm, 30 分間, 4°C にて遠心することにより菌体成分を沈澱させた後, その上清を β -lactamase 粗酵素液として使用した。また, 本菌の産生する β -lactamase の抗菌剤による誘導を検討する目的で, 新鮮 BHI-broth に菌を接種してから 1 時間後に CMZ 0.05 μ g/ml を加えて以下同様に処置したものを誘導 (+) β -lactamase 粗酵素液として使用した。今回の β -lactamase 粗酵素液の調整に用いた 4 株の V. cholerae non-01 に対する CMZ の MIC 値はそれぞれ 0.2, 0.39, 1.56, 1.56 μ g/ml であった。

(7) β -lactamase 活性の測定

V. cholerae non-01 の産生する β -lactamase 活性の測定は, micro-iodometric assay にて³⁾, PCG (100 μ M) を基質として PBS (0.05 M, pH 7.0) 中で 30°C, 1 分間に 1 μ mole 分解する酵素量を 1 unit として測定した。本菌の β -lactamase の基質特異性は, PCG, ABPC, CBPC, MCIPC, MIPIC, CER, CEZ, CPZ, CMZ, CZX の各々 100 μ M を基質として測定した。結果は, 今回使用した V. cholerae non-01 4 株の β -lactamase の PCG 加水分解速度を 100 とした時の相対的加水分解速度を, 平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表わした。

(8) 蛋白量の測定

各酵素液中の蛋白量は, bovine serum albumin を standard として Lowry の改良法⁴⁾により測定した。

II. 結 果

(1) V. cholerae non-01 の各種抗菌剤における薬剤感受性成績

Fig. 1 に V. cholerae non-01 の β -lactam 剤にお

ける感受性成績を示した。臨床分離株に対して CZX および PIPC の抗菌力が最も優れており、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度ですべての株の発育が阻止された。ABPC, CEZ, CMZ においては MIC 値がやや高い傾向にあったものの、耐性を示す株は認められなかつ

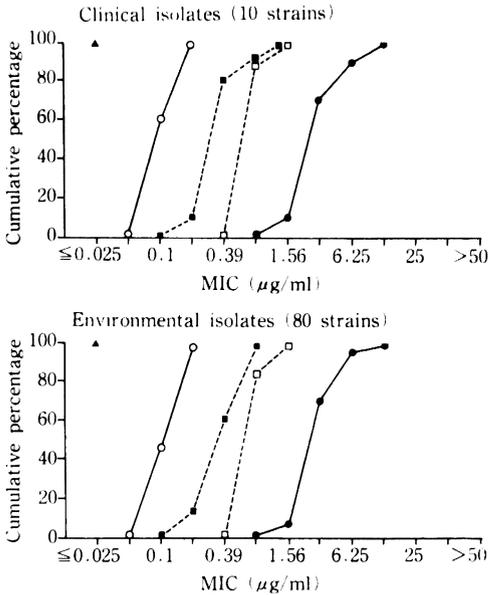


Fig. 2. MIC values obtained with five other antibiotics tested against 10 clinically (upper) and 80 environmentally isolated strains (bottom) of *Vibrio cholerae* non-01.

●—● streptomycin (SM),
○—○ tetracycline (TC),
■—■ sulfamethoxazole-trimethoprim (ST),
□—□ chloramphenicol (CP),
▲—▲ ofloxacin (OFLX).

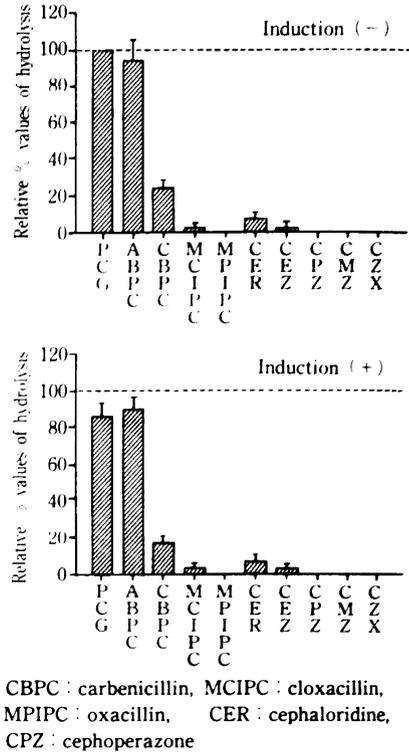


Fig. 3. Substrate profiles of beta-lactamase produced by *Vibrio cholerae* non-01. The hydrolysis rate of each antibiotics was showed as relative percent values in hydrolysis of penicillin-G (PCG) 100 $\mu\text{M}/\text{min}$ and results were expressed as (mean \pm SD) of 4 strains. For induction of beta-lactamase, cefmetazole 0.05 $\mu\text{g/ml}$ was added at 1 h after incubation and then substrate profiles were determined as for the control group (bottom).

Table 1. Effects of clavulanic acid (CVA) on MIC values of ampicillin against environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-01

Antibiotics tested		Number of strains at MIC ($\mu\text{g ml}$)								
		≤ 0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
ABPC	β -lactamase (+)					1		10	12	7
	β -lactamase (-)	8	42							
ABPC + CVA ^a	β lactamase (+)	18	6	5	1					
	β lactamase (-)	8	42							

ABPC : ampicillin

^a CVA 5 $\mu\text{g/ml}$ was added to each medium of serial ABPC two-fold dilution.

た。これに対して環境分離株では ABPC において 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した株が 80 株中 30 株 (37.5%) に、また PIPC において 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した株が 80 株中 25 株 (31.3%) に認められた。

Fig. 2 に SM, TC, ST, CP, OFLX における感受性成績を示した。これらの薬剤においては臨床分離株と環境分離株 *V. cholerae* non-01 の間にはっきりした薬剤感受性の違いはなく、SM を除けば耐性株は認められなかった。この中でも OFLX, TC は *V. cholerae* non-01 に対して特に優れた抗菌力を示しており、それぞれ 0.025 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下の薬剤濃度にてすべての株の発育を阻止した。

(2) β -lactamase 産生株の頻度および β -lactamase 産生株に対する CVA の効果

今回検討した臨床分離株 *V. cholerae* non-01 10 株の中には β -lactamase 産生株は認められなかった。これに対し環境分離株 80 株における β -lactamase 産生株の頻度を調べたところ、ABPC に対して 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した 30 株すべてが β -lactamase 陽性であった。一方、 β -lactamase 非産生株 (50 株) の MIC 値はすべて 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。

そこで、環境分離株 *V. cholerae* non-01 の ABPC に対する MIC 値を CVA 5 $\mu\text{g/ml}$ を一律に添加して測定したところ、 β -lactamase 産生株の MIC 値は β -lactamase 非産生株の MIC 値まで偏位した (Table 1)。

(3) *V. cholerae* non-01 の産生する β -lactamase の基質特異性 (Fig. 3)

V. cholerae non-01 の産生する β -lactamase の PCG を加水分解する速度を 100 とした時、ABPC, CBPC の相対的加水分解速度はそれぞれ 95 ± 11 , 25 ± 4 であった。これに対し CZX, CMZ, CPZ, MIPIC はほとんど分解されず、CER, CEZ, MCIPC がわずかに分解されただけであった。また、CMZ 0.05 $\mu\text{g/ml}$ を β -lactamase inducer として添加した場合にも β -lactamase 産生能および基質特異性に変化は見られなかった。

III. 考 察

V. cholerae non-01 株の中には、抗コレラ抗血清で中和されるコレラ様 enterotoxin を産生する株の存在が知られており⁹⁾、これらの株によってコレラ菌と同様な腸管感染症の流行も報告されている⁶⁾。また、コレラ菌感染症においては、抗菌薬治療中に多剤耐性プラスミドを有した株の出現が報告されており⁷⁾、コ

レラ菌と同じ *Vibrio* 属で、しかも生化学的性状が同じである *V. cholerae* non-01 においても、同様な薬剤耐性株の出現に注意する必要がある。また、*V. cholerae* non-01 による感染症においては、その 20.1% (42/202 症例) が血液より分離されているという報告もあり²⁾、肝炎等基礎疾患を有する患者においては本菌感染症の発症に充分注意しなければならない。このような事実を踏まえ、今回 *V. cholerae* non-01 の各種抗菌薬における薬剤感受性試験を行い、その耐性化の頻度、耐性機序について検討を加えた。

今回検討した臨床分離株 10 株の *V. cholerae* non-01 に対して、 β -lactam 剤の中では CZX と PIPC が、その他の薬剤の中では OFLX と TC が優れた抗菌力を示した。この中でも OFLX の *V. cholerae* non-01 に対する抗菌活性が最も強く、すべての株の発育が 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で阻止された。OFLX はその優れた抗菌力と経口投与が可能であるという点から、臨床における *V. cholerae* non-01 腸管感染症の治療に有用であると考えられた。松下ら⁸⁾は 1981 ~ 1984 年に本邦でヒトから分離された *V. cholerae* non-01 127 株の薬剤感受性成績について報告している。これによると TC, CP に 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示した株がそれぞれ 6 株, 3 株, SM, ST に 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した株がそれぞれ 7 株, 1 株, ABPC に 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した株が 6 株認められたと報告している。今回の我々の成績においてはこのような耐性株は認められなかったものの、これらの事実を踏まえ本菌感染症の治療に当たることが必要であると考えられた。

一方、環境分離株 80 株の *V. cholerae* non-01 においては、ABPC の MIC 値 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した株が 37.5% (30/80)、PIPC の MIC 値 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した株が 31.3% (25/80) に認められた。そして、ABPC において 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した株のすべてが β -lactamase 陽性であり、かつ β -lactamase 阻害剤である CVA の添加によりその MIC 値が β -lactamase 非産生株のそれに偏位した。これらの結果から、本菌の ABPC における耐性機序は β -lactamase の産生によることが明らかになった。

そこで次に、*V. cholerae* non-01 の産生する β -lactamase の基質特異性について検討した。PCG の加水分解速度を 100 とした時、ABPC, CBPC における相対的加水分解速度はそれぞれ 95, 25 であったが、本菌の産生する β -lactamase によって MIPIC, CPZ, CMZ, CZX はほとんど分解されなかった。ま

た、CMZ 0.05 $\mu\text{g/ml}$ を加えることにより本菌の産生する β -lactamase の誘導能を検討したところ、非誘導時に比べ β -lactamase の産生能および基質特異性に変化は認められなかった。この結果から、今回検討した *V. cholerae* non-01 の産生する β -lactamase は構成型 penicillinase であることが明らかになった。一般に構成型 penicillinase はプラスミド支配の頻度が高いが、*Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* などの一部のグラム陰性桿菌においては染色体性 penicillinase の存在も報告されている⁹⁾。松下⁸⁾は *V. cholerae* non-01 の薬剤耐性プラスミドについて報告している。これによると *V. cholerae* non-01 の ST, CP に対する多剤耐性プラスミドの存在は認められたものの、ABPC 単剤に耐性を示した5株においてはプラスミドは検出できなかったとしている。これらの事実から、本菌の産生する β -lactamase については、染色体性 penicillinase の可能性も考えて検討して行く必要があると思われる。

今回の臨床分離株と環境分離株 *V. cholerae* non-01 の薬剤感受性の比較において、環境分離株中に ABPC に耐性を示す株が高い頻度で認められた。臨床分離株に比べ環境分離株の *V. cholerae* non-01 に ABPC 耐性株の多いことは新井¹⁰⁾によっても報告されている。また、同じ *Vibrio* 属で *V. cholerae* non-01 と生化学的性状の類似した *V. mimicus* においても同様に環境分離株中に ABPC 耐性株の頻度が高いという報告も見られる¹¹⁾。一般に、抗菌薬の使用と耐性菌の出現頻度には正の相関関係が認められ、臨床において耐性菌の増加が問題となっている。このような状況の中で、*V. cholerae* non-01 においては臨床分離株に比べ環境分離株中に耐性菌の頻度が高いという相反する結果が得られた。この理由は現在のところ明らかではないが、近年の環境における抗菌薬の大量使用¹²⁾や自然界に広く存在するペニシリン産生性真菌¹³⁾との接触による耐性の獲得などの可能性が考えられた。今後、環境における *V. cholerae* non-01 の薬剤耐性株の推移に目をむけるとともに、これら耐性株の臨床への蔓延に注意していく必要があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、長崎市中島川および浦上川より *V. cholerae* non-01 を分離・同定して頂いた長崎

県衛生公害研究所、野口英太郎先生に心より御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 山本耕一郎：食中毒原因菌としてのナグヒブリオ。臨床と微生物 12 (3)：13～19, 1985
- 2) LENNETTE E H, BALOWS A, HAUSLER W J, SHADOMY H J: Manual of Clinical Microbiology. 4th Ed., Amer Soc Microbiol., *Vibrio* (FARMER J J, BRENNER F W, KELLY M T) pp 282～301, 1985
- 3) NOVICK R P: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem J* 83: 236～240, 1962
- 4) HARTREE E F: Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422～427, 1972
- 5) 島田俊雄, 坂崎利一, 小迫秀正: Non-01 *Vibrio cholerae* の分布 (1976-1981) および毒素産生性について。感染症学雑誌 56 (11)：1017～1024, 1982
- 6) ZINAKA Y, CARPENTER C C: An enterotoxin produced by non-cholera vibrios. *Johns Hopkins Med J* 131: 403～411, 1972
- 7) THRELFALL E J, ROWE B, HUQ I: Plasmid encoded multiple antibiotic resistance in *V. cholerae* El Tor from Bangladesh. *The Lancet* 1247～1248, 1980
- 8) 松下 秀, 山田澄夫, 工藤泰雄, 大橋 誠: 近年分離されたヒト由来 *Vibrio cholerae* 01, *V. cholerae* non-01, *V. fluvialis* 及び *V. parahaemolyticus* の薬剤耐性と保有伝達性 R プラスミド。感染症学雑誌 61 (2)：109～117, 1987
- 9) 井上松久: 耐性の生化学的機構。臨床と細菌 9 (4)：65～79, 1982
- 10) 新井武利, 濱島 肇, 長谷川浩子: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* および NAG vibrio の抗生物質感受性。Chemotherapy 31 (5)：517～521, 1983
- 11) CHOWDHURY M A, AZIZ K M, RAHIM Z, KAY B A: Antibiotic resistance patterns of *V. mimicus* isolated from human and environmental sources in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* 30 (4)：622～623, 1986
- 12) 三橋 進, 五島瑳智子, 清水喜八郎, 編: 薬剤耐性菌による環境汚染。7. 淡水養殖魚由来の細菌 (林不二雄) pp 153～165, 学会出版センター, 1985
- 13) LENNETTE E H, BALOWS A, HAUSLER W J, SHADOMY H J: Manual of Clinical Microbiology. 4th Ed., Amer Soc Microbiol., *Aspergillus* Species and other opportunistic saprophytic hyaline hyphomycetes (SWATEK F, HALDE C, RINALDI M J, SHADOMY H J) pp 584～594, 1985

DRUG SUSCEPTIBILITY AND BETA-LACTAMASE SUBSTRATE
PROFILE OF *VIBRIO CHOLERAE* NON-01

KAZUHIRO TATEDA, KEIZO YAMAGUCHI, YOSHIKAZU ISHII¹⁾, KAZUNORI SHIMOGUCHI,
NOBUCHIKA KUSANO²⁾, KAZUYUKI SUGAHARA, TOSHIKI USUI, SHIGERU KOHNO³⁾
and KOHEI HARA³⁾

Department of Clinical Laboratory Medicine, Nagasaki University School of Medicine,
7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852, Japan

¹⁾: Department of Pharmacy, Nagasaki University Hospital

²⁾: Department of Clinical Laboratory Medicine, Ryukyu University School of Medicine

³⁾: Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

Vibrio cholerae non-01 are organisms that are biochemically indistinguishable from *V. cholerae* but do not agglutinate in vibrio group 1 antiserum. Some of these strains have been known to produce a cholera-like toxin and cause dehydrating gastroenteritis in humans. Some reports state that more than 20% of *V. cholerae* isolated from blood are non-01 especially in patients with liver disease. We investigated drug susceptibility and resistance mechanisms to beta-lactam antibiotics in clinical (10 strains) and environmental isolates (80 strains) of *V. cholerae* non-01. Of the antibiotics tested, ceftizoxime and ofloxacin were extremely active against *V. cholerae* non-01: both antibiotics inhibited growth of all strains with 0.025 mg/l. None of the 10 strains of the clinical isolates was resistant to other antibiotics tested. On the other hand, 30 strains of the 80 environmental isolates (37.5%) were resistant to ampicillin (ABPC). All these strains showed MICs of ≥ 12.5 mg/l and all produced beta-lactamase. In a substrate profile study of this enzyme, it was clarified that the beta-lactamase produced by *V. cholerae* non-01 was basically penicillinase. There is a possibility that thus resistance to ABPC in environmental isolates of *V. cholerae* will spread to clinical isolates. We therefore need to be on our guard against the emergence of resistant strains in clinical *V. cholerae* non-01 infection.