

# *Serratia marcescens* のウレアーゼ産生性と薬剤感受性について

四方田幸恵・高橋 綾子・田波 洋・小林 功

群馬大学医学部附属病院中央検査部\*

代 居 敬 子

九州大学医学部第一内科

井 上 松 久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

(平成2年6月2日受付・平成2年10月23日受理)

臨床分離 *Serratia marcescens* 107 株のうち 31 株 (29%) はウレアーゼ陽性であり、そのうち 22 株 (71%) は尿由来、4 株 (13%) は呼吸器由来であった。ウレアーゼ陽性株と陰性株について薬剤耐性菌の分離頻度を比較検討した結果、nalidixic acid (NA), norfloxacin (NFLX), tetracycline (TC) 耐性菌はそれぞれウレアーゼ陽性菌では 59%, 41%, 97%, 陰性菌では 30%, 20%, 53% であり、ウレアーゼ陽性菌から有意に高く分離された。ウレアーゼ陽性菌の任意の 5 株について、エチジウムプロミド法にてウレアーゼ陰性菌の出現を試みたところ、約  $10^{-3}$  頻度で 3 株から陰性菌が得られた。また、陰性菌の得られた 3 株の元株についてリファンピシン処理を行ったところ、 $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$  頻度でウレアーゼ陰性菌が得られた。ウレアーゼ陰性変異株の得られた 1 株は、ウレアーゼ陰性化に伴い、V-P 反応、ゼラチン液化能の微弱化、あるいは陰性化した変異株が含まれていた。

**Key words :** *S. marcescens*, ウレアーゼ, 薬剤感受性

最近臨床分離菌の中で、*Serratia marcescens* の分離率は低下している<sup>1,2)</sup>が、その多くは化学療法剤に多剤耐性を示すため、日和見感染症の起炎菌として注目されてきた<sup>3,4)</sup>。また、従来高い感受性を示すとされたアミノグリコシド系薬剤や、キノロン剤に対しても耐性化の傾向が認められ<sup>5-9)</sup>、慢性尿路感染をはじめとした感染症の中で依然として主要菌のひとつに挙げられる<sup>10)</sup>。我々は、本菌の臨床分離株の中に、生化学的性状のひとつであるウレアーゼ陽性菌と陰性菌とが分離されることに着目し、これらの性状と薬剤耐性との相関、およびウレアーゼ産生の生化学的性状は変異しやすい遺伝形質が否かについて検討したので報告する。

## I. 材料および方法

### (1) 使用菌株

本学中央検査部保存の分離菌 40 株と、薬剤耐性菌実験施設保存 67 株計 107 株を用いた。これらはいずれも 1984 年度分離菌である。

### (2) 生化学的性状検査

アピ 20 E (アスカ純薬) を用いた。

### (3) 薬剤感受性測定

日本化学療法学会標準法<sup>11)</sup>に基づき、ampicillin (ABPC, 万有製薬), piperacillin (PIPC, 富山化学), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), gentamicin (GM, 塩野義製薬), amikacin (AMK, 萬有製薬), nalidixic acid (NA, 第一製薬), norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), chloramphenicol (CP, 三共製薬), tetracycline (TC, 日本レタリー) について各々の MIC を測定した。培地は感受性ディスク用培地 N (日水製薬) を用いた。

(4) ウレアーゼ産生菌からのウレアーゼ非産生菌の分離

ウレアーゼ陽性株の中から任意の 5 株を選び、Penassay broth (PAB, Difco) で 1 夜培養した菌液を PAB で  $10^{-3}$  希釈し、これを用いて ethidium bromide (EtBr) の 2 倍希釈系列を作成した。42°C で 1 夜培養を行い、肉眼で濁りの見られるものの中で最も発育の悪いものと MIC の 2 点を選び buffered saline gelatin (BSG) にて希釈してその 0.1 ml を選択培地に塗布し、

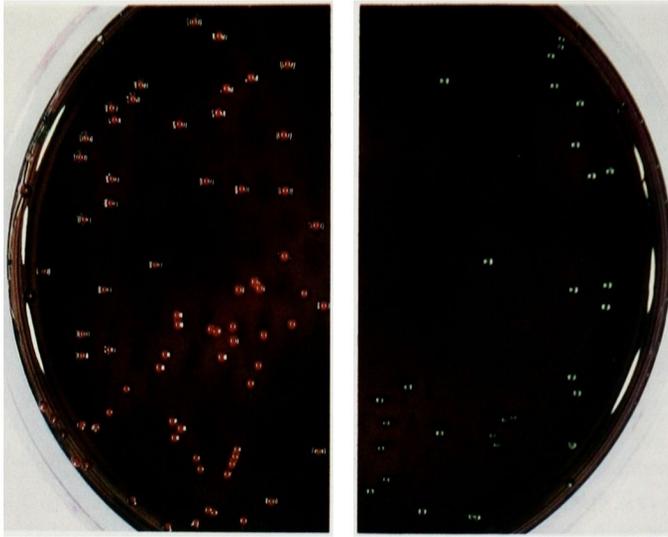


Fig. 1. Urease-positive and -negative colonies (eosin-methylene blue agar with urea)

Table 1. Selective media for urease-negative *S. marcescens* (eosin-methylene blue agar with urea)

Component	g per 1,000 ml
Pepton	10 g
Mannitol	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Methylene blue	70 mg
Agar	18 g
10% urea	10 ml
4% eosin Y	10 ml

37°C 1 夜培養を行った。選択培地としては、我々が考案した尿素加 eosin-methylene blue (EMB) 変法培地 (Table 1) を用いた。尿素加 EMB 変法培地上では、ウレアーゼ陰性菌は糖分解によって産生された酸のためにエオジン Y を強く取り込み、黒色で金属光沢を有する集落を作る。一方ウレアーゼ陽性菌は尿素を分解してアンモニアを産生し、ウレアーゼ陰性菌に比べ高い pH となるため、エオジン Y の取り込みが弱く赤紫色の集落となる (Fig. 1)。各菌株当り 5,000 個前後の集落のウレアーゼ産生能を上記培地を用いて調べた後、ウレアーゼ陰性と思われる集落を分離培養し、アピ 20E を用いてウレアーゼの陰性を確認して、最終的なウレアーゼ陰性出現頻度を求めた。さらに、rifampicin

(RFP) 処理によるウレアーゼ陰性菌の出現頻度も同様に求めた。処理方法は、Mueller-Hinton broth (Difco, pH 7.2) を用いて 37°C 培養を行った以外は、EtBr 処理に準じた。

## II. 結 果

(1) 検体別ウレアーゼ陽性菌、陰性菌の分離頻度 *S. marcescens* 107 株のうち、ウレアーゼ陽性菌は 31 株 (29%)、陰性株は 76 株 (71%) であった。ウレアーゼ陽性株 31 株のうち 22 株 (71%) は尿由来、4 株 (13%) は呼吸器由来であり、その他胃液、耳漏、血液から各 1 株分離された (Table 2)。分離頻度の高い尿と呼吸器由来を比較したところ、両者のウレアーゼ陽性菌分離頻度に有意差は認められなかった。また、血清型とウレアーゼ産生性との関係についてみると、13, 14, 3, 4, 5 型および non typable は、ウレアーゼ産生、陰性両群に共通して認められ、その割合も多かった。しかし、少数ながら 2, 7 型はウレアーゼ陽性群にのみ認められ、8, 12, 17 型は陰性群にのみ認められた (Table 3)。

(2) ウレアーゼ陽性菌、陰性菌間における薬剤耐性率の比較

*S. marcescens* ウレアーゼ陽性菌と陰性菌について薬剤耐性菌の分離頻度を比較検討した。その結果 NA, NFLX, TC 耐性はそれぞれウレアーゼ陽性菌から 58.6%, 41.4%, 96.6%, 陰性菌から 30.3%, 19.7%, 53.0% と、明らかにウレアーゼ陽性菌から有意に高く分離された。その他の薬剤に関しては、両者間に

Table 2. Isolation frequency of urease positive and negative *S. marcescens* isolated from clinical specimens

Sample	Urease positive	Urease negative
Urine	22	42
Sputum	4	14
Gastric juice	1	0
Otorrhea	1	4
Blood	1	0
Other	1	9
Unknown	1	7
Total	31 (29%)	76 (71%)

Table 3. O-serotype of distribution urease positive and negative *S. marcescens*

Sample	O serotype (No. of strains)	
	Urease-positive	Urease-negative
Urine	13 (3), 14 (3), 5 (2), 2 (1), 3 (1), 4 (1), 7 (1), non-typable (8)	14 (8), 13 (2), 17 (2), 3 (2), 12/13 (1), 13/16 (1), 14/17 (1), 8 (1), 4 (1), 12 (1), non-typable (17)
Sputum	5 (2), 2 (1), 3 (1)	8 (3), 14 (2), 5 (1), non-typable (6)
Gastric juice	13 (1)	
Otorrhea	non-typable (1)	16 (1)
Blood	non-typable (1)	
Other	7 (1)	3 (2), 16 (1), 12/14 (1), 5 (1), non-typable (3)
Unknown		14 (2), 12 (1), 13 (1), 12/14 (1)

差は認められなかった (Table 4)。

### (3) ウレアーゼ産生菌からの非産生菌の分離

ウレアーゼ陽性株から、耐性の異なる4株およびこれらの薬剤に感受性の1株の計5株についてウレアーゼ陰性菌の出現頻度を EtBr 法により調べた。その結果3株 (TY 5037, TY 5054, TY 5100) から約  $10^{-3}$  の頻度でウレアーゼ陰性変異株が得られた (Table 5)。しかし残りの2株は EtBr 処理, 非処理はいずれにおいても、ウレアーゼ陰性変異株は検出限界 ( $10^{-4}$ 以上) 以下であった。さらに、EtBr 法によりウレアーゼ陰性菌の得られた元株3株 (TY 5037, TY 5054, TY

5100) に RFP を作用させたところ  $10^{-1} \sim 10^{-2}$  の頻度でウレアーゼ陰性変異株が得られた。また、この元株2株 (TY 5037, TY 5100) より RFP 耐性菌を分離し、同様に調べたところ、この場合も  $10^{-1} \sim 10^{-2}$  頻度でウレアーゼ陰性菌が得られた (Table 6)。なお、両方法により得られたウレアーゼ陰性変異株は、元株同様すべて M 9 agar に発育し、栄養要求性の変化は認められなかった。また、耐性型、血清型とも変化は認められなかった (Table 7)。得られたウレアーゼ陰性菌から陽性菌への復帰率は、37°C 一晚培養条件下では  $10^{-8}$  以上の頻度では認められなかった。なお、TY 5054

Table 4. Isolation frequency of drug resistant strains in urease positive and negative *S. marcescens*

Drug	Total		Urease positive		Urease negative	
	No. of strains (N=95)	%	No. of strains (N=29)	%	No. of strains (N=66)	%
ABPC	66	69.5	19	65.5	47	71.2
PIPC	41	43.2	13	44.8	28	42.4
LMOX	15	15.8	5	17.2	10	15.2
CTX	17	17.9	5	17.2	12	18.2
CTM	64	67.4	19	65.5	45	68.2
GM	12	12.6	4	13.8	8	12.1
AMK	37	38.9	12	41.4	25	37.9
NA**	37	38.9	17	58.6	20	30.3
NFLX*	25	26.3	12	41.4	13	19.7
CP	14	14.7	5	17.2	9	13.6
TC**	63	66.3	28	96.6	35	53.0

Resistance to NFLX and AMK  $\geq 6.25 \mu\text{g/ml}$ , GM  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ , NA  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ ,  
other drugs  $\geq 25 \mu\text{g/ml}$  MIC

\*  $\chi^2$  Test  $P < 0.05$

\*\*  $\chi^2$  Test  $P < 0.01$

ABPC, ampicillin; PIPC, piperacillin; LMOX, latamoxef; CTX, cefotaxime; CTM, cefotiam;  
GM, gentamicin; AMK, amikacin; NA, nalidixic acid; NFLX, norfloxacin; CP, chloramphenicol;  
TC, tetracycline

Table 5. Isolation frequency of urease negative mutants from urease-positive *S. marcescens* by treatment with EtBr

Strain	Isolation frequency		Origin	O-Serotype	Resistance pattern
	with EtBr	without EtBr			
TY 5037	$9.5 \times 10^{-3}$	$< 10^{-4}$	Urine	2	TC
TY 5054	$3.3 \times 10^{-3}$	$< 10^{-4}$	Urine	non-typable	ABPC, CTM, AMK, NA, NFLX, TC
TY 5100	$1.0 \times 10^{-3}$	$< 10^{-4}$	Urine	non-typable	ABPC, PIPC, NA, TC
TY 5078	$< 10^{-4}$	$< 10^{-4}$	Sputum	3	sensitive
TY 5038	$< 10^{-4}$	$< 10^{-4}$	Urine	5	TC

EtBr: ethidium bromide

TC, tetracycline; ABPC, ampicillin; CTM, cefotiam; AMK, amikacin; NA, nalidixic acid;  
NFLX, norfloxacin; PIPC, piperacillin

のウレアーゼ陰性変異株の中には、ウレアーゼ陰性化に伴い V-P 反応、セラチン液化能の微弱化あるいは陰性化の認められる変異株が含まれていた (Table 7)。

### III. 考 察

*S. marcescens* は、分離率自体は減少している<sup>1,2)</sup>も

の、最近、第3世代セフェム剤やキノロン剤に対する耐性菌の分離率が高い傾向が認められることから、再び看過し得ない臨床的意義を有するものと考えられる。検体別ウレアーゼ陽性菌、陰性菌の分離頻度を比較すると、尿と呼吸器検体の間に統計的有意差は認め

られなかった。しかし、呼吸器由来菌ではウレアーゼ陽性率が4/18 (28.6%)であるのに対し、尿では22/67 (52.4%)と約2倍高い分離率を示している (Table 2)。このウレアーゼ陽性率の相違は薬剤耐性菌の分離率にも反映しており、NA, NFLX, TC 耐性菌はウレアーゼ陽性菌において有意に高く分離された (Table 4)。丸茂らは、*S. marcescens* のO抗原血清型別、生化学的性状、薬剤感受性について検討を行っており<sup>12)</sup>、特定の血清型が耐性化を伴って増加していると報告している。また、ウレアーゼ陽性株が増加していると報告しているが、ウレアーゼ陽性株と陰性株間の耐性解析は行っていない。我々の結果では、ウレアーゼ陽性株にキノロン耐性が有意に高くなっており、丸茂らのウレアーゼ陽性株の分離頻度の増加は、キノロン耐性化を示す血清型の増加の結果とも考えられる。今回調べ

た血清型とウレアーゼ産生性との関係については、2, 7型がウレアーゼ陽性群に、8, 12, 17型が陰性群にのみ認められたが、株数が少なく、はっきりとした傾向はつかめなかった (Table 3)。キノロン剤は、培地中のpHをアルカリ側にすると、その抗菌力が2~3倍増すことが知られている<sup>13)</sup>。この事実と、ウレアーゼ産生菌から非産生菌が $10^{-3}$ 頻度で分離される結果 (Table 5) から、今後、尿由来 *S. marcescens* においてウレアーゼ陰性菌でかつキノロン剤耐性菌の上昇に注目する必要性が示唆されるため、十分な疫学的調査を続ける必要がある。

EtBrは、DNAの形状によりその結合の割合が異なることが知られており、この性状を利用し、プラスミドの除去に頻繁に用いられている<sup>14)</sup>。今回は、ウレアーゼ陽性菌をEtBr処理することにより、 $10^{-3}$ 頻度で陰性菌が分離された。一方RFPは、RNAポリメラーゼの阻害剤であり、この作用機作を利用することにより一部のプラスミドを除去することもできる<sup>14)</sup>。RFP処理によってもウレアーゼ陰性菌が $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$ の頻度で得られた。その出現頻度は実験的に作製したRFP耐性株においても同様であった (Table 6)。また、得られた陰性変異株のRFPに対するMICは処理前の元株と同じであった。さらに両方法によって得られたすべての陰性変異株の栄養要求性に変化は認められなかった。以上の観察から、ある菌株の *S. marcescens* におけるウレアーゼ産性能は、EtBrやRFPにより影響を受け易い遺伝学的性状と考えられる。考えられる可能性としては、これらの遺伝子がプラスミドと密接に関

Table 6. Isolation frequency of urease-negative mutants from urease positive *S. marcescens* by treatment with RFP

Strain	Isolation frequency
TY 5037	$2.7 \times 10^{-1}$
TY 5054	$8.0 \times 10^{-2}$
TY 5100	$2.9 \times 10^{-1}$
TY 5037 RFP <sup>r</sup>	$1.0 \times 10^{-1}$
TY 5100 RFP <sup>r</sup>	$3.1 \times 10^{-1}$

RFP, rifampicin

Table 7. Biological properties of urease-negative mutants

	Resistance pattern	Serotype	Urease	V-Ptest	Gelatin liquefaction
TY 5037	TC	2	+	+	+
Mutant	TC	2	-	+	+
TY 5054	ABPC, CTM, AMK, NA, NFLX, TC	NT	+	+	+
Mutant type 1	ABPC, CTM, AMK, NA, NFLX, TC	NT	-	+	+
Mutant type 2	ABPC, CTM, AMK, NA, NFLX, TC	NT	-	+	-
Mutant type 3	ABPC, CTM, AMK, NA, NFLX, TC	NT	-	-	-
TY 5100	ABPC, PIPC, NA, TC	NT	+	+	-
Mutant	ABPC, PIPC, NA, TC	NT	-	+	-

NT: non-tytable

TC, tetracycline; ABPC, ampicillin; CTM, cefotiam; AMK, amikacin; NA, nalidixic acid; NFLX, norfloxacin; PIPC, piperacillin

連して存在することである。TC 耐性プラスミドの除去を行い、得られた TC 感受性株のウレアーゼ産生性を元株と比較したが、ウレアーゼは陽性であり、この TC 耐性プラスミドとウレアーゼ産生遺伝子はたがいに独立した遺伝形質であった。また、プラスミドの検出を試みたが、調べた限りでは明確なプラスミド DNA の検出はできなかった。プラスミド DNA サイズには 1,500 bp 程度のものから  $3 \times 10^5$  bp 以上のものまで存在し、分子量の大きいプラスミド DNA の抽出は困難をきわめている。ウレアーゼ産生遺伝子が巨大プラスミド上に存在すると仮定すると、その宿主内存在を証明することは難しいと考えられる。また、ウレアーゼの変化に伴い V-P あるいはゼラチン液化の性状も同時に変化する場合が認められることから、本菌におけるウレアーゼ、V-P、ゼラチン液化等の生化学的性状は、なんらかの関連性を有している可能性も考えられ、今後詳細な検討を行う予定である。

この論文の主旨は第 35 回化学療法学会において発表した。

#### 文 献

- 1) 代居敬子, 他: 高度耐性 *Serratia marcescens* に対する新セフェム系抗生物質と新鮮血清との協力的殺菌効果について。Chemotherapy 38: 46~51, 1990
- 2) 岸 洋一: 分離菌の臨床的評価。臨床と微生物 13: 577~582, 1986
- 3) Hawkey P M, Constable H K: Selection of netilmicin resistance, associated with increased 6' aminoglycoside acetyl transferase activity, in *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother 21: 535~544, 1988
- 4) 橋本 一: 腸内細菌の薬剤耐性。臨床と細菌 9: 399~413, 1982
- 5) 木村光子, 他: *Serratia marcescens* の Aminoglycosid 抗生物質耐性と R Plasmid に関する研究。Chemotherapy 34: 115~124, 1986
- 6) 上田 泰, 他: *Serratia marcescens* に関する基礎的研究, 第 2 報, アミノグリコシド系抗生剤に対する感受性の検討。Chemotherapy 28: 1~8, 1980
- 7) Tran G Van Nhieu, Collatz E: Heterogeneity of 6'-N-Acetyltransferases of Type 4 Conferring Resistance to Amikacin and Related Aminoglycosides in Members of the Family *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agent Chemother 32: 1289~1291, 1988
- 8) 奥田俊郎, 他: 尿路感染症の起因菌として分離された *Serratia marcescens* の血清型別および薬剤感受性。感染症学雑誌 58: 483~490, 1984
- 9) 柳岡正範, 他: *S. marcescens* におけるニューキノロン系, モノバクタム系薬剤の感受性について。Chemotherapy 36: 479, 1988
- 10) 名出頼男: 難治性尿路性器感染症と臓器障害。臨床と細菌 9: 288~292, 1982
- 11) 最小発育濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 12) 丸茂健治, 他: 臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の O 抗原血清型別, 生化学的性状および薬剤感受性について。臨床病理 35: 555~560, 1987
- 13) 甲畑俊郎, 他: AM-715 の嫌気性菌に対する抗菌作用について。Chemotherapy 29 (S-4): 45~48, 1981
- 14) 三橋 進編: 薬剤感受性測定法—薬剤耐性菌の理論と実際—。講談社, 1980

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN UREASE-POSITIVE  
AND -NEGATIVE *SERRATIA MARCESCENS*

Sachie Yomoda, Ayako Takahashi, Yoh Tanami and Isao Kobayashi  
Clinical Laboratory, Gunma University Hospital,  
3-39-15 Showamachi, Maebashi 371, Japan

Takako Yosue

First Department of Internal Medicine, Kyushu University School of Medicine

Matsuhisa Inoue

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, Gunma University School of Medicine

Of 107 strains of *Serratia marcescens* isolated from clinical specimens, 31 (29%) were urease-positive, and of these 22 (71%) were obtained from urine and 4 (13%) from respiratory organs. We compared the isolation frequency of drug-resistant strains in urease-positive and -negative *Serratia marcescens*. NA-, NFLX- and TC-resistant strains were 59%, 41% and 97% of urease-positive, and 30%, 20% and 53% of urease-negative cases, indicating that the isolation frequency of urease-positive strains was significantly higher. Of five unselected urease-positive strains three were changed to urease-negative using the ethidium bromide method at a frequency of  $10^{-3}$ , and a change in these three original strains to urease-negative strains using rifampicin at a frequency of  $10^{-1} \sim 10^{-2}$ . In addition, mutant types with reduced or abolished V-P reaction and gelatin liquefaction capacity were found in one strain of urease-negative mutants, associated with urease-negative cases.