

各種の臨床分離菌のコロニー・レベルに おける生物学的性状と薬剤感受性

(I) 呼吸器感染症分離菌について

小林 寅結¹⁾²⁾・長谷川美幸¹⁾・西田 実¹⁾²⁾・五島瑳智²⁾

¹⁾：三菱油化ビーシーエル・化学療法研究室*

²⁾：東邦大学医学部微生物学教室

(平成2年9月25日受付・平成2年11月13日受理)

呼吸器感染症の患者から分離され起炎菌と疑われた *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis* および *Staphylococcus aureus* の多数株を試験菌として、それらの初代分離コロニーの生物学的性状を検討した。まず呼吸器感染症由来の *Haemophilus influenzae* 33株のうち、7株は β -lactamase 産生コロニーと非産生コロニーが共存し、両種コロニーの混合比は一定ではなかった。これらの混合株から分離した β -lactamase 産生コロニーによって構成される7株に対する ampicillin の MIC は 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ 、非産生コロニーによって構成される7株に対する ampicillin の MIC は 0.2~0.39 $\mu\text{g/ml}$ であった。また同様な結果は、*Staphylococcus aureus* についても認められた。*Streptococcus pneumoniae* では、少ない頻度でオプトヒン耐性および感性コロニーが共存し、オプトヒン耐性株の大部分は ampicillin, cefazolin, cefmetazole および cefotaxime に耐性を示した。*Branhamella catarrhalis* については、生物学的性状の異なるコロニーの存在は認められなかった。以上の結果から、呼吸器感染症由来菌の分離後、薬剤感受性を測定する場合、コロニーによって β -lactamase 産生能が異なり、薬剤感受性がまったく異なることがあるので慎重な対応が必要である。また、このような事実が薬剤感受性と臨床結果との不一致の一因となる可能性がある。

Key words : colony, susceptibility, antibiotics, respiratory infections

一般に感染症が疑われる患者の検査材料から起炎菌を分離して薬剤感受性を測定する場合、患者から採取した試料を目的菌に応じた培地に接種し、培養後に平板から単一コロニーを釣菌し、同定および薬剤感受性検査を行う。しかし被検病原菌株に生物学的性状や薬剤感受性が異なるコロニーが混在している場合には、感受性成績にも問題が生じ、感染症の治療を誤らしめる結果となる。このような点を検討するため、主として呼吸器感染症から高頻度に分離される細菌を中心に、分離平板上の同一菌種と思われる複数のコロニーを釣菌し、それぞれの生化学的性状および薬剤感受性を検討した。その結果、興味ある知見を得たので以下に報告する。

I. 材料および方法

1) 試験菌株

1988年4月~12月にかけて、国内の多数の臨床機関において、上気道、下気道、肺炎等の呼吸器感染症患者から採取した各種臨床材料より分離され、起炎菌と

疑われた *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis* および *Staphylococcus aureus* の各多数株を使用した。なお、これらの分離菌は分離平板上に多量または純培養状態で検出されたため、起炎菌と推定した。

2) 使用薬剤

Ampicillin (ABPC 藤沢薬品), cefazolin (CEZ 藤沢薬品), cefmetazole (CMZ 三共), cefotaxime (CTX ヘキスト) 以上4薬剤を使用した。

3) 分離培養および同定

各種臨床材料を、5%ヒツジ脱繊維血液寒天培地 (OXOID)、チョコレート寒天培地 (BBL)、CLED 寒天培地 (OXOID) のそれぞれに画線塗抹し、チョコレート培地は微好気条件 ($\text{O}_2 : \text{CO}_2 : \text{N}_2 = 5 : 10 : 85$) で 35°C、48時間、他の2培地は 35°C、36時間好気培養を行った。培養後各平板上に発育した同一形態のコロニーを無作為に 8~16個釣菌しグラム染色性を確認した

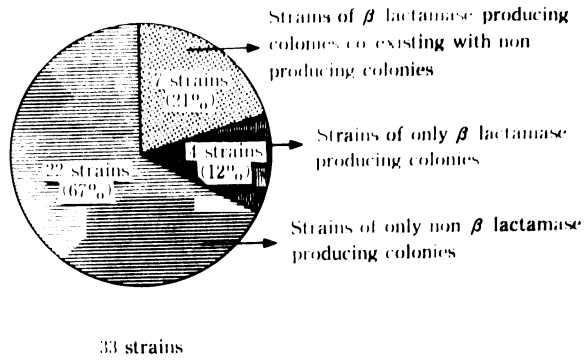


Fig. 1. Isolation pattern of β lactamase producing colonies from clinical isolates of *H. influenzae*

Table 1. Isolation ratio of β lactamase producing colonies and biotype of each colony

	Strain No.	No. of colonies		Biotype	
		Test colonies	β -lactamase activity		
Co-existing	MBC155	8	+	2	II
			-	6	II
	MBC166	16	+	5	II
			-	11	II
	MBC151	8	+	1	II
			-	7	II
MBC3022	16	+	1	II	
		-	15	II	
β -lactamase-producing	MBC189	8	+	8	II
			-	0	
	MBC1096	12	+	12	II
			-	0	
	MBC3003	16	+	16	II
			-	0	
MBC3017	8	+	8	II	
		-	0		
Non- β -lactamase-producing	MBC1091	16	+	0	
			-	16	II
	MBC1103	16	+	0	
			-	16	II
	MBC1109	8	+	0	
			-	8	V
MBC1119	12	+	0		
		-	12	II	

後、各種性状試験による同定名の決定と薬剤感受性を行った。

H. influenzae については、チョコレート培地からコロニーを釣菌し、X, V 因子要求性、溶血性および各種生化学的、生物学的性状試験による同定と Bio type を決定した。*S. aureus* は、血液寒天培地からコロニーを釣菌し、coagulase 試験、DNase 産生能、食塩耐性試験および Kloos & Schleifer の原法¹¹⁾による生化学的試験を行った。さらにブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清（デンカ生研）を用いた coagulase 型別試験を行った。

S. pneumoniae は、*S. aureus* 同様に血液寒天培地上に発育した α 溶血を示すコロニーについてオプトヒン感受性試験、胆汁溶解試験、免疫血清を用いた各種生物学的性状試験を行った。

B. catarrhalis は、チョコレート培地上のコロニーを

DNase 試験、硝酸塩還元能、普通寒天培地上での発育試験等により同定を行った。

4) その他の試験

β -lactamase 活性の定性は、*S. pneumoniae* を除くすべての試験菌に対して、オートセフィンスポットプレート法¹²⁾および β -lactamase detection paper を用いたアシドメトリー法¹³⁾によって測定した。

薬剤感受性は、化学療法学会標準法に従って寒天平板希釈法によって測定した。*H. influenzae* および *B. catarrhalis* については ABPC, CTX を、*S. aureus* については ABPC, CEZ および CMZ を、*S. pneumoniae* は ABPC, CEZ, CMZ および CTX をそれぞれ試験薬として測定した。

II. 結 果

1) *H. influenzae* コロニーの β -lactamase 産生能

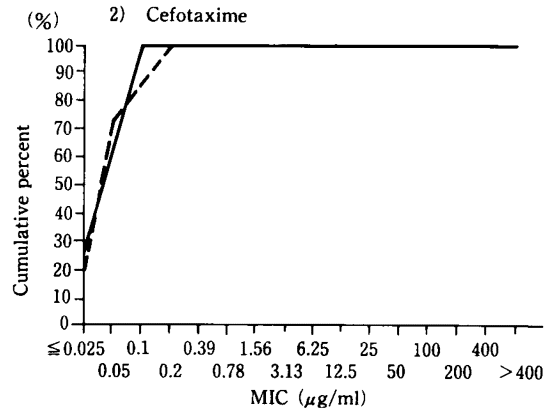
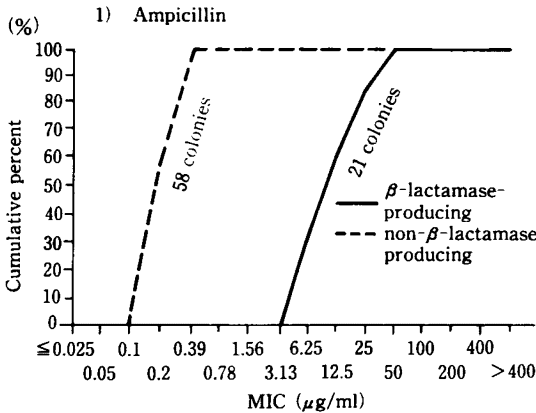


Fig. 2. Drug-susceptibility of β -lactamase-producing and non-producing colonies from co-existing strains of *H. influenzae*

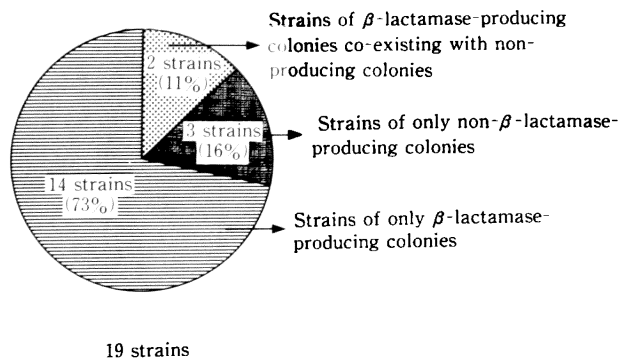


Fig. 3. Isolation pattern of β -lactamase-producing colonies from clinical isolates of *S. aureus*

H. influenzae 臨床分離株 33 株よりコロニーを前述のとおり分離し、 β -lactamase 産生および非産生コロニーの出現分布を Fig. 1 に示した。図から、 β -lactamase の産生コロニーおよび非産生コロニーの混在している菌株は 7 株 (21%)、 β -lactamase 産生コロニーのみが存在する菌株は 4 株 (12%)、非産生コロニーのみの株は 22 株 (67%) であった。この実験で分離された β -lactamase 産生コロニーの β -lactamase 産生能は継代によって変化しなかった。次に β -lactamase 産生コロニーと非産生コロニーが混在する菌株 4 株について両タイプのコロニーの出現の割合と各コロニーについての Bio type を Table 1 に示した。混在型 4 株における β -lactamase 産生および非産生コロニーの割合はそれぞれ 2:6, 5:11, 1:7 および 1:15 と一定ではなかった。また混在型コロニーの Bio type はすべて II 型で β -lactamase 産生および非産生コロニー間で差は認められなかった。さらに β -lactamase 産生または非産生コロニーのみで形成される菌株では Table 1 のとおり 1 株を除きすべて II 型となり混在型と同様な結果となった。

2) *H. influenzae* の混在型株の各コロニーの ABPC および CTX 感受性

混在型株より分離した β -lactamase 産生の 21 コロ

ニーおよび非産生の 58 コロニーの ABPC および CTX 感受性累積分布を Fig. 2 に示した。 β -lactamase 非産生コロニーの ABPC に対する MIC_{50} は 0.2 μ g/ml, MIC_{100} でも 0.39 μ g/ml で良好な感受性を示した。 β -lactamase 産生コロニーでは MIC_{50} で 12.5 μ g/ml, MIC_{100} で 50 μ g/ml と明らかに耐性を示した。しかし、CTX では両コロニーともに MIC_{50} は 0.05 μ g/ml と優れた感受性を示した。

3) *S. aureus* の各コロニーの β -lactamase 産生能、薬剤感受性、coagulase 型

S. aureus の場合、Fig. 3 のように β -lactamase 産生および非産生コロニーの混在している菌株は 19 株中 2 株 (11%) 存在し、非産生コロニーのみの菌株が 3 株 (16%)、産生コロニーのみによって構成される菌株は 14 株 (73%) であった。混在型株における β -lactamase 産生コロニーの出現の割合は No. 348 株で 12 コロニー中 3 コロニー、No. 2052 株 8 コロニー中では 1 コロニーのみであった (Table 2)。

次にこれらのコロニーの coagulase 型別は、 β -lactamase 産生または非産生型の株では VII 型が中心であったが、混在型では、 β -lactamase 非産生コロニーでは IV 型および III 型であるのに対し、 β -lactamase 産生コロニーはともに non type であった。このように混

Table 2. Isolation ratio of β -lactamase producing colonies from clinical isolates of *S. aureus* and coagulase type of each colony

	Strain No.	No. of colonies		Coagulase type	
		Test colonies	β -lactamase activity		
Co-existing	MBC348	12	+	3	Non type
			-	9	IV
	MBC2052	8	+	1	Non type
			-	7	III
β -lactamase-producing	MBC302	10	+	10	VII
			-	0	
	MBC2099	8	+	8	VII
			-	0	
	MBC2128	8	+	8	V
			-	0	
Non- β -lactamase-producing	MBC857	10	+	0	
			-	10	VII
	MBC2138	8	+	0	
			-	8	VII
	MBC2267	8	+	0	
			-	8	III

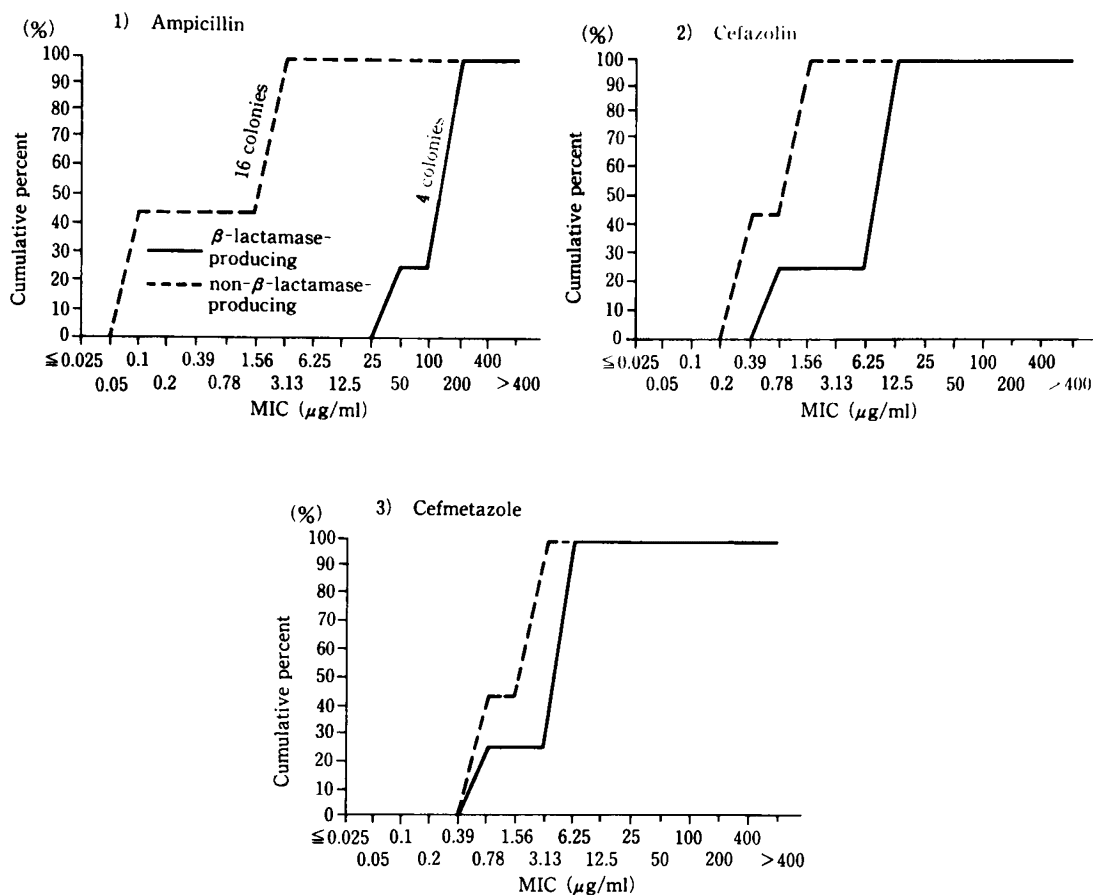


Fig. 4. Drug-susceptibility of β -lactamase-producing and non-producing colonies from co-existing strains of *S. aureus*

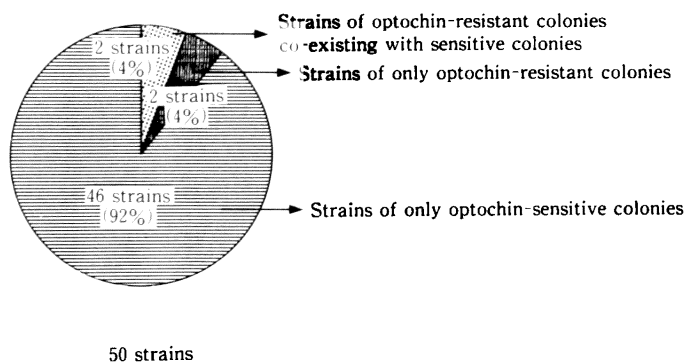


Fig. 5. Isolation pattern of optochin-resistant colonies from clinical isolates of *S. pneumoniae*

在型の β -lactamase 産生コロニーと非産生コロニー間で coagulase 型に相違があること、すなわち異なった生物型を示すコロニーが存在する点は興味のある事実で、*H. influenzae* の場合と対照的である。

また、これらの混合型株のコロニー別の薬剤感受性では Fig. 4-1 に示すとおり、ABPC に対しては *H. influenzae* の感受性パターンと同様 β -lactamase 産生コロニーは耐性側に β -lactamase 非産生コロニーは感受性側に分布した。CEZ に対しても β lactamase 産生コロニーは中等度耐性、 β lactamase 非産生コロニーは感受性側に分布した。また CMZ の場合も CEZ の場合と同様なパターンが得られたが、両者の感受性は CEZ よりも差が少なかった。

4) *S. pneumoniae* コロニーのオプトヒン感受性分布と薬剤感受性

S. pneumoniae の呼吸器感染分離株のコロニー別オプトヒン感受性について検討した。Fig. 5 のとおり、試験株 50 株中、オプトヒン耐性および感性コロニーの

混在するものは 2 株 (4%)、耐性コロニーのみのもの 2 株 (4%)、感性コロニーのみの株は 46 株 (92%) であった。混在株におけるオプトヒン耐性コロニーの出現の割合は、感性コロニー 7 に対して 1 であった (Table 3)。また上記の各群より分離されたオプトヒン耐性およびオプトヒン感性コロニーのオプトヒン感受性は継代によって変化しなかった。

次に Fig. 6 には *S. pneumoniae* のオプトヒン耐性型および感性型の各 30 菌株について、4 種の β -lactam 剤に対する感受性を比較した。ABPC に対してオプトヒン耐性株の MIC₅₀ は 3.13 μ g/ml、MIC₁₀₀ は 12.5 μ g/ml に対し、オプトヒン感性株では、それぞれ 0.025 μ g/ml 以下および 0.1 μ g/ml と両群間で顕著な差が認められた。CEZ や CMZ に対する感受性についても同様な傾向が認められた。すなわち両薬剤に対してオプトヒン感性株は MIC₅₀ が 0.05~0.2 μ g/ml に分布するが、オプトヒン耐性株は 3.13~25 μ g/ml と中等度耐性域に分布した。さらに、CTX に対しては、オ

Table 3. Isolation ratio of optochin resistant colonies of clinical isolates of *S. pneumoniae*

	Strain No.	No. of colonies		
		Test colonies	Optochin sensitivity	
Co-existing	MB 2	16	R	2
			S	14
	MB 36	8	R	1
			S	7
Optochin resistant	MB 1	12	R	12
			S	0
	MB 4	8	R	8
			S	0
Optochin sensitive	MB 3	8	R	0
			S	8
	MB 9	12	R	0
			S	12
	MB 12	8	R	0
			S	8
	MB 13	8	R	0
			S	8
	MB 24	8	R	0
			S	8
MB 30	8	R	0	
		S	8	

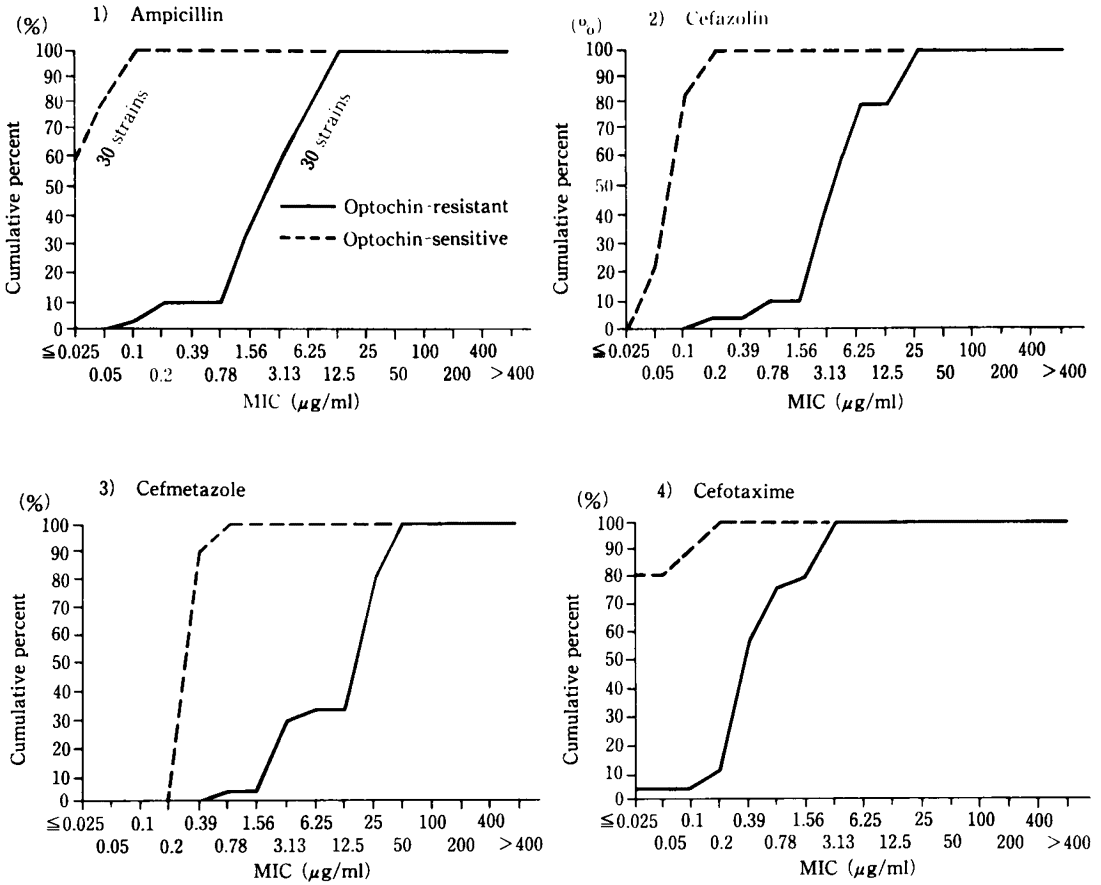


Fig. 6. Drug-susceptibility of optochin-resistant and -sensitive strains of *S. pneumoniae*

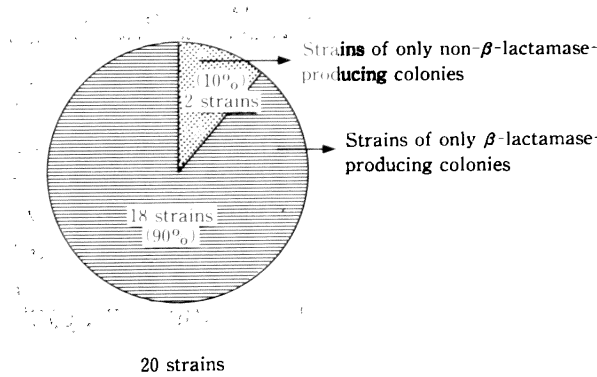


Fig. 7. Isolation pattern of β -lactamase-producing colonies from clinical isolates of *B. catarrhalis*

プトヒン感受性株は MIC₁₀₀が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ と全株とも低濃度で発育が阻止されたが、オプトヒン耐性株では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ となった。以上、*S. pneumoniae* のオプト

ヒン感受性と試験した β -lactam 剤の感受性の間には、明らかに相関が認められた。

5) *B. catarrhalis* のコロニーの β -lactamase 産

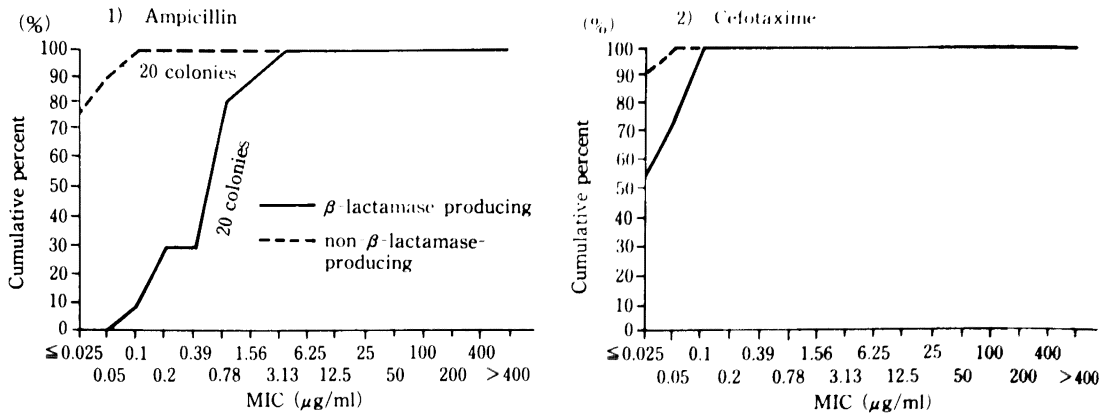


Fig. 8. Drug-susceptibility of β -lactamase-producing and non-producing colonies from clinical isolates of *B. catarrhalis*

生能

Fig. 7に *B. catarrhalis* についての検討結果を示した。この結果から明らかとなり、本菌には β -lactamase 産生コロニーおよび非産生コロニーの混在する菌株は認められなかった。試験した20株中、 β -lactamase 産生コロニーのみの株が18株(90%)とほとんどを占め残り2株(10%)が非産生株であった。

Fig. 8は *B. catarrhalis* の β -lactamase 産生コロニーおよび非産生コロニーをそれぞれ20個分離し、増菌後両群コロニーのABPCおよびCTXに対する感受性を比較した。ABPCに対しては、 β -lactamase 産生コロニーおよび非産生コロニー間で感受性が異なり、非産生コロニーからの試験株では、0.1 μ g/ml以下で全株の増殖が阻止されたが、 β -lactamase 産生コロニーからの菌株では3.13 μ g/mlで阻止された。CTXではABPCほど顕著な差は認められなかった。

III. 考 察

日常的な臨床検査では多数の検体を迅速に処理し、臨床診断と治療のために正確な情報を提供することが使命であるが、実際には様々な混乱が生じることが珍しくない⁴⁻⁹⁾。

我々は最近、呼吸器感染症の患者由来の *H. influenzae* の平板上に生育したコロニーを注意深く観察したところ、コロニー形態がやや異なるものが混在すること、およびコロニー間で β -lactamase 産生能が異なる菌株を認めた。検討した *H. influenzae* のうち β -lactamase 産生コロニーと非産生コロニーが共存する菌株は33株中7株(21%)とかなり高率であった。両コロニーをそれぞれ分離して得られた菌株はABPCなどの β -lactam 剤に対する感受性に大きな差があり、

コロニーの選択によっては抗菌薬の選択を誤ることがある。また両群のコロニーをそれぞれ分離し継代を試みたが、 β -lactamase 産生コロニーおよび非産生コロニーからはそれぞれ同じ性状のコロニーのみが分離された。

同様に β -lactamase 産生能があるコロニーと、ないコロニーの共存は例数は少ないが呼吸器感染症の患者より分離された *S. aureus* にも認められた。この場合、共存株の β -lactamase 産生コロニーのcoagulase型は2株とも型別不能であった。一方、これらの混在株の β -lactamase 非産生コロニーのcoagulase型はIV型またはIII型であった。このような性状は *H. influenzae* の場合と同様、継代によって変化しなかった。以上の結果は、生物学的性状の異なる混在コロニー株による感染症は同一菌種の2種類の菌株による感染とも考えられる。

次に呼吸器感染症より分離された *S. pneumoniae* のコロニーレベルにおけるオプトヒン感受性を検討したが、試験菌株の2%はオプトヒンに耐性と感性のコロニーが共存することを見出した。同一菌株より得られたオプトヒン耐性コロニー由来株はオプトヒン感性株よりもABPC, CEZ, CMZおよびCTXなどの各 β -lactam 剤に例外なく耐性で両群間に明らかな相違が見られた。これらのオプトヒン耐性と薬剤感受性に関する成績は小栗ら⁹⁾の成績と同様であったが、オプトヒン耐性株の検出率は我々の成績が若干高い値となった。

2種類の病原菌による複数菌感染は、一般に難治性感染症との関連において論議の対象となってきた^{10,11)}。今回我々は呼吸器感染症由来の3菌種において、同一

菌種の異種コロニーによる感染の例を指摘した。このような実験結果は、ワールドワイドの医学文献検索システム：MED LINE を利用し検索を行ったが、過去に同類の報告はなかった。この種の感染症に対する対応は、細菌検査の能率化や迅速化の方向にあるのではなく、むしろそれとは逆行するかも知れないが、病原菌分離、同定の初段階における観察力の強化というような基本的な問題に当面する。我々はさらに各種の病原菌について、同様な問題を解明するつもりである。

文 献

- 1) Wesley E K, Karl H S: Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*: 82~88, Jan. 1975
- 2) 五島瑳智子, 武藤弓子, 小川正俊: β -ラクタマーゼ検出法。感染症, Vol. 13, No. 2, 73~76, 1983
- 3) O'Callaghan C H, Morris A, Kerby S M, Shindler A H: Novel method for detection of betalactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1: 283~288, 1970
- 4) 鈴木幹三, 他(2施設): 末期肺炎における複数菌検出例の臨床病理学的検討。感染症誌 58: 223~228,

1984

- 5) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠村一, 国松幹和, 成田口啓, 浜田 薫, 播金 取: 慢性下気道感染症における複数菌感染の実態に関する経気管吸引法による研究。感染症誌 58: 469~476, 1984
- 6) 宇塚良夫, 松本慶蔵, 力富直人, 永武 毅, 原田知行, 野口行雄, 大戸春美, 渡辺貴和雄: 喀痰定量培養法に基づく呼吸器感染症における複数菌感染の解析。Chemotherapy 31: 212~219, 1983
- 7) 中浜 力, 山田真理恵, 副島林造: 慢性気道感染症における化学療法。化学療法の領域 6: 246~255, 1990
- 8) 五島瑳智子: 複数菌感染の基礎的諸問題。Prog. Med. 2: 322~332, 1982
- 9) 小栗豊子: 肺炎球菌の臨床細菌学的研究, 臨床材料からの検出状況, 菌型分布, 薬剤感受性の推移, 特に β -ラクタム耐性菌について。Jap. J. Antibiotics 39: 783~805, 1986
- 10) 山口恵三: 臨床側と検査室の情報交換。化学療法の領域 5: 1640~1643, 1989
- 11) 片岡陳正: 検査室の立場から。化学療法の領域 5: 1679~1684, 1989

BIOLOGICAL PROPERTIES AND DRUG-SUSCEPTIBILITY OF DIFFERENT COLONIES OF CLINICALLY ISOLATED BACTERIA

(I) BACTERIA CAUSING RESPIRATORY INFECTIONS

Intetsu Kobayashi¹⁾²⁾, Miyuki Hasegawa¹⁾, Minoru Nishida²⁾ and Sachiko Goto²⁾

Chemotherapy Division, Mitsubishi-Yuka Bio-Clinical Laboratories¹⁾,

3-30-1, Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University²⁾

We investigated the biological properties of individual colonies of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* isolated from patients with respiratory infections. In 7 of the 33 strains, β -lactamase-producing colonies co-existed with non- β -lactamase-producing colonies. The ratio of the two types differed among these seven strains. Beta-lactamase-producing colonies of the strains were resistant to ampicillin (MIC, 12.5~25 μ g/ml), but the non- β -lactamase-producing colonies were susceptible to the drug (MIC, 0.20~0.39 μ g/ml). Similar results were also obtained for *S. aureus*. In the case of *S. pneumoniae*, optochin-resistant colonies co-existed with -sensitive colonies in some of the strains tested, and most optochin-resistant colonies were resistant to ampicillin, cefazolin, cefmetazole and cefotaxime. In contrast the optochin-susceptible colonies were susceptible to these drugs. There were no differences in biological properties among colonies of the clinical isolates of *B. catarrhalis*. These results suggest that attention should be paid to the colony selection of bacterial specimens isolated from patients with respiratory infections, for the determination of drug-susceptibility.