

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

(II) 緑膿菌について

小林 寅詔^{1,2)}・長谷川美幸¹⁾・内野卯津樹¹⁾

西田 実^{1,2)}・五島瑛智子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3年1月17日受付・平成3年5月9日受理)

各種の臨床材料より分離した *Pseudomonas aeruginosa* の各コロニーについて、生化学的および生物学的性状ならびに薬剤感受性を検討し、次の結果を得た。試験菌株 (138 株) のうち、異なった性状 (異種色素の産生, 色調の濃淡, R 型と S 型) をもつコロニーを含む菌株が 48 株存在した。これらの 48 株のうち、2 種以上の血清型のコロニーが混在する菌株は 17 株 (35.4%) 認められた。しかし、コロニー性状が同一の 90 株では、このような異種の血清型をもったコロニーの混在はまったくみられなかった。異種の血清型コロニーが共存する各菌株において、一般的に血清型の組み合わせ、血清型の種類などに一定の傾向は認められなかった。しかし、異種の色素を産生するコロニーが共存する菌株では、血清型が non-type のコロニーの出現傾向が認められた。さらに異種の血清型コロニーの共存する菌株において、各々の異種コロニー間でゼラチン液化能が異なることが多く、その他の生化学的性状ではウレアーゼ、キシロース反応が異なることがあった。血清型およびコロニー性状の異なる 4 株のうち、2 株の異種コロニー間で β -lactamase 産生能が大きく相違した。また、各種の β -ラクタム薬に対する感受性にも 4 倍以上の相違がみられた。同様な事実はアミノ配糖体 (gentamicin, sisomicin) 感受性についても観察された。

Key words: *P. aeruginosa*, colony, drug-susceptibility, β -lactamase, serotype

緑膿菌は *Pseudomonas* 属の中で臨床材料よりの分離頻度が最も高く、難治性感染症の起炎菌として重要な病原菌であることは周知のとおりである。前報で我々は呼吸器感染症より分離された *Haemophilis influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* では生物学的性状が異なるコロニーが共存する菌株が存在することを認め、これらのコロニー間では β -lactamase の産生能、薬剤感受性などが大きく相違することを報告した¹⁾。また緑膿菌の β -lactamase 産生量に対する誘導剤の影響の検討結果では、この細菌の誘導剤に対する反応が多様であることを報告した²⁾。このような事実をもとにして緑膿菌の各種の臨床分離株のコロニー間の生物学的性状を検討し、知見を得たので報告する。

I. 材料および方法

1) 試験菌株

1988 年 1 月～10 月の間、国内の 40 以上の臨床機関において、上気道、下気道の呼吸器感染症や慢性尿路感染症および皮膚軟部組織感染症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 *Pseudomonas aeruginosa* の多数株について検討した。

2) 使用薬剤

Piperacillin (PIPC 富山化学), sulbenicillin (SBPC 武田薬品), cefsulodin (CFS 武田薬品), cefoperazone (CPZ 富山化学), ceftazidime (CAZ 日本グラクソ), imipenem (IPM 万有製薬), aztreonam (AZT 日本スクイブ), gentamicin (GM 日本シエリング), sisomicin (SISO 山之内製薬), ofloxacin (OFLX 第一製薬)

以上、力価の判明した 10 薬剤を使用した。

3) 分離培養および同定

* 東京都板橋区志村 3-30-1

各種臨床材料を、5%ヒツジ脱繊維血液寒天培地 (OXOID)、チョコレート培地 (BBL)、CLED寒天培地 (OXOID)、EG寒天培地 (栄研) を用い、35°C、18~48時間で培養を行った。培養後、CLED培地上に発育したコロニーをそれぞれ無作為に8~16個釣菌し、グラム染色性を確認した後、各種性状試験による同定名の決定を行った。すなわち、釣菌したコロニーをTrypticase soy寒天培地 (BBL) に純培養させ、ブドウ糖非発酵菌同定用キット“バイオテスト2号 (栄研)”，アシルアミダーゼ試験および色素産生能により、*P. aeruginosa* と同定した。

4) 緑膿菌のコロニー性状の判定と分類

分離平板上の緑膿菌をコロニーが産生したピオシアニン、フローレンセイン、メラニン等の色素により分類した。また、これらの色素の色調の強弱を判定した。またコロニー形態をラフ型 (R)、スムーズ型 (S) に分類した。

5) 血清型別試験

血清型別試験はモノクロナール抗体を用いたメイヤ

ッセイ緑膿菌 (明治製菓) によるスライド凝集法³⁾ で測定を行った。

6) β -lactamase 活性の測定

既法²⁾と同様に測定した。すなわち、培養後、集菌、洗浄した菌懸濁液を超音波処理により破壊した。この液を酵素液とし、CERを基質として、水解速度を260 nmにおける紫外部吸収の変化によって求めた。試験菌の β -lactamase活性はLowry法によって求めた単位蛋白当たり、1分間にCERを1 μ mole分解した場合を1単位とした。

7) MIC 測定法

日本化学療法学会標準法⁴⁾に準じた寒天平板希釈法によって測定した。

II. 結 果

1) 異種の血清型コロニー混在株の出現頻度

臨床分離 *P. aeruginosa* 138株において、分離平板上で肉眼的に異なるコロニーが混在する株と単一のコロニーのみ分離される株に分類した (Table 1)。すなわちこれらは産生色素の相違、色調の強弱、R型かS

Table 1. Isolation frequency of strains which formed colonies with multiple kinds of serotype from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Number of strains tested	Colony appearance & morphology	Number of strains	Serotype			
			Number of serotypes	Number of strains	%	
138	Single	90	Single	90	121	87.7
	Multiple	48	Single	31		
			Double	13	13	9.4
			Triple	4	4	2.9

Table 2. Isolation frequency of strains which formed colonies with multiple kinds of serotype in 48 strains of *Pseudomonas aeruginosa* with different colony appearance or morphology

Colony appearance & morphology	Number of strains which formed colonies with multiple kinds of serotype / Number of strains tested (%)
Different pigment (A)	3/8 (37.5)
Different color density (B)	0/8 (0)
R and S types (C)	4/10 (40.0)
A+C	8/15 (53.3)
B+C	0/5 (0)
A+B+C	2/2 (100)
Total	17/48 (35.4)

Table 3. Isolation frequency of *Pseudomonas aeruginosa* strains which formed colonies with multiple kinds of serotype from various specimens

Source	Number of strains which formed colonies with multiple kinds of serotype	Number of strains tested (%)
Sputum	5/16	(31.3)
Urine	6/15	(40.0)
Pus	4/11	(36.4)
Ear pus	2/6	(33.3)
Total	17/48	(35.4)

Table 4. Kinds and ratio of serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains which formed colonies with multiple serotypes

a) Strains which formed colonies with two types

Colony appearance & morphology	Strain no.	Coexisting serotypes (ratio of colonies)
Different pigment (A)	309	G : non (7 : 1)
	355	non : B (6 : 2)
	370	non : G (7 : 1)
Different color density (B)	—	—
R and S types (C)	214	B : F (7 : 1)
	230	H : E (5 : 3)
	302	E : C (4 : 4)
	360	E : non (7 : 1)
A + C	277	A : G (5 : 3)
	283	G : non (7 : 1)
	294	non : A (6 : 2)
	324	E : C (4 : 4)
	332	B : H (7 : 1)
B + C	—	—
A + B + C	208	A : non (6 : 2)

Non: non-type

b) Strains which formed colonies with three types

Colony appearance & morphology	Strain no.	Coexisting serotypes (ratio of colonies)
Different pigment (A)	238	B : E : M (4 : 2 : 2)
	241	non : G : E (5 : 2 : 1)
	342	B : C : non (4 : 3 : 1)
Different color density (B)	227	G : E : non (3 : 2 : 3)

Non: non-type

型かという点から分類すると、コロニー性状が単一の菌株は138株中90株(65.2%)、性状の異なるコロニーが存在する菌株は48株(34.8%)で異種のコロニーを含む菌株が比較的高率に存在することが判明した。

このようなコロニーと血清型の相関をみると、コロニー性状が単一の90株はすべて血清型は1種類であった。一方、複数のコロニー性状を示す48株では、血清型が単一の株は31株(64.6%)で、残りの17株(35.4%)は異種の血清型のコロニーが共存していた。この17株のうち2種類の血清型の株が13株、3種類の血清型をもつ菌株が3株存在した。すなわちコロニー性状の異なる分離株では、かなり高率に血清型の異なるコロニーが共存することが認められた。

2) 異なったコロニー性状をもつ菌株における異種血清型混在株の出現状況

Table 2は異なったコロニー性状を示す48株のコロニーを色素、色の濃淡、R型とS型これらの混合というように分類し、それぞれの群について、血清型混在株の出現率を検討した。異種の複数の色素を産生するコロニーが共存する菌株(A)では8株中3株(37.5%)、RとS型のコロニーが共存する菌株(C)では10株中4株(40%)が異種血清型の混在株であった。色調の濃淡のある株(B)ではこのような混在株はなかった。次にコロニー性状が(A)と(C)のコロニーをもつ株では15株中8株(53.3%)、(A)と(B)と(C)のコロニーをもつ菌株2株は共に異種の血清型が混在する菌株であった。

Table 5. Main biological characteristics of colonies with multiple serotypes isolated from each strain of *Pseudomonas aeruginosa*

Number of Strains	Serotype	Number of colonies	Acid production (aerobic) from			urease production	gelatin liquefaction
			xylose	mannitol	maltose		
277	A	5	+	+	-	+	-
	G	3	+	+	-	-	-
302	E	4	-	+	-	-	+
	C	4	+	+	-	+	-
324	E	4	+	+	-	-	-
	C	4	-	+	-	-	+
332	B	7	+	+	-	-	-
	H	1	+	+	-	-	+
262	Non	3	+	+	-	+	-
	E	5	+	+	-	-	+
294	Non	6	+	-	-	+	-
	A	2	+	+	-	-	+
227	G	3	-	+	-	-	-
	E	2	+	+	-	-	+
	Non	3	-	+	-	-	-
238	B	4	-	+	-	+	-
	E	2	+	+	-	-	-
	M	2	+	+	-	+	-
342	B	4	+	-	-	-	+
	C	3	+	+	-	-	-
	Non	1	+	+	-	-	+
Control Positive (%)			+	+	-	-/+	+
			90	70	0	48	82

以上のとおり、コロニーの色調の濃淡は異種の血清型の混在株の出現と関係がなかったが、色素の相違およびR型とS型という形態の異なるコロニーが共存する場合は、血清型混在株が高率に出現することが認められた。

3) 異種の血清型コロニーの混在株の臨床材料別由来

コロニー性状の異なる菌株のうち、異種の血清型コロニーが共存する菌株の検出率を材料別に比較した。Table 3のとおり、喀痰、尿、膿、耳漏よりの検出率は31.3~40.4%となり、各試料間でそれほど大きな相違はなく有意差は認められなかった。

4) 異種血清型コロニー混在株における血清型の種類と割合

異種の血清型コロニーの混在株は Table 4 のとお

り、2種類のコロニーよりなる菌株と3種類のコロニーよりなる菌株がある。またa)の2種類の混在株は、コロニー性状によって6タイプに分類できる。Table 4-a)のとおり、各菌株のコロニー性状の特徴と共存するコロニーの血清型との間には関連はみられなかった。また各菌株中の異種コロニーの割合にも一定の傾向がみられなかった。また3種のコロニーよりなる菌株についてもコロニー性状と血清型、異種コロニーの割合などに相関はみられなかった。

5) 同一菌株より分離された血清型の異なるコロニーの生化学的性状

2種以上の異種の血清型コロニーが共存する9菌株について、それぞれのコロニーの生化学的性状を比較した (Table 5)。5種類の生化学的性状のうち、ゼラチン液化能は9株中7株のコロニー間で相違がみられ

Colony appearance & morphology	Strain no. (source)	Sero-types	Number of colonies	β -lactamase activity (mean \pm SD)					
				0.1	1	10	100	1,000	
R and S types	214 (urine)	B	7	1.36 \pm 0.41					
		F	1	3.82					
	230 (urine)	H	5	1.62 \pm 0.07					
		E	3	1.16 \pm 0.10					
Different pigment & R and S types	238 (urine)	B	4	2.03 \pm 0.03					
		E	2	1.26 \pm 0.27					
		M	2	0.92 \pm 0.05					
R and S types	302 (sputum)	E	4	0.46 \pm 0.13					
		C	4	0.64 \pm 0.18					
Different pigment & R and S types	332 (sputum)	B	7	0.93 \pm 0.05					
		H	1	1.01					
	324 (urine)	E	4	1.46 \pm 0.56					
		C	4	77.6 \pm 17.3					
	342 (urine)	B	4	1.06 \pm 0.36					
		Non	3	273 \pm 80.0					
		Non	1	27.0					

Unit: U/mg·protein

Fig. 1. β -lactamase activity of each colony isolated from 7 *Pseudomonas aeruginosa* strains which formed colonies with multiple serotypes.

Table 6. Drug-susceptibility of each colony isolated from 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains which formed colonies with multiple serotypes (MIC: µg/ml)

Colony appearance & morphology	Strain no. (source)	Serotype	Number of colonies	PIPC	SBPC	CFS	CPZ	CAZ	IPM	AZT	GM	SISO	OFLX	
Different pigment & R and S types	238 (urine)	B	4	3.13	50	3.13	6.25	3.13	1.56	6.25	3.13	1.56	0.78	
		E	2	1.56	12.5	1.56	3.13	0.78	0.78	1.56	3.13	1.56	0.78	
		M	2	3.13	25	3.13	6.25	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	1.56	
	332 (sputum)	B	7	3.13	25	3.13	6.25	1.56	1.56	1.56	6.25	3.13	0.78	1.56
		H	1	6.25	50	3.13	6.25	3.13	1.56	1.56	6.25	3.13	1.56	0.78
	324 (urine)	E	4	25	50	6.25	25	6.25	6.25	1.56	6.25	12.5	3.13	50
		C	4	100	100	25	100	50	50	25	12.5	200	200	50
		B	4	3.13	25	1.56	6.25	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13	0.78	1.56
	342 (urine)	C	3	>400	>400	200	200	1.56	1.56	3.13	3.13	>400	>400	3.13
		Non	1	50	100	12.5	100	12.5	12.5	1.56	6.25	50	12.5	3.13

PIPC, piperacillin; SBPC, sulbenicillin; CFS, cefsulodin; CPZ, cefoperazone; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; AZT, aztreonam; GM, gentamicin; SISO, sisomicin; OFLX, ofloxacin

た。これに次いでウレアーゼ反応が9株中5株、キシロース反応では4株、マンニトール反応では2株のコロニー間で相違がみられた。以上の結果から明らかとなり、一つの菌株中に共存する異種の血清型のコロニー間で、ゼラチン液化能、ウレアーゼ反応が比較的高率に相違することが認められた。

6) β -lactamase 活性

尿または喀痰より分離された *P. aeruginosa* のうち、コロニー性状および血清型が異なる7株について、それぞれのコロニーの β -lactamase 活性を検討した。Fig. 1のとおり7株中5株では、形態および血清型の異なるコロニー間で β -lactamase 活性に大差はみられなかった。しかし No.324 および No.342 株では、共存する異種コロニーの β -lactamase 活性に大きな相違が認められた。尿由来の No.324 株中の血清型 E および C のコロニーでは、前者の β -lactamase 活性 1.46 unit/mg protein に対して、後者では 77.6 unit/mg protein であった。No.342 株の3種のコロニー間でも同様に β -lactamase 活性に大きな差がみられた。

7) 薬剤感受性

コロニー形態と血清型が異なるコロニーが共存する4株について、 β -ラクタム薬7種およびアミノ配糖体薬2種、ニューキノロン薬1種の計10薬剤の薬剤感受性を検討した。Table 6のとおり、尿由来の No.238 の菌株では、血清型 B および M のコロニーは E に比較して β -ラクタム薬に対して若干耐性となった。喀痰由来の No.332 株は前者とは異なり、血清型が異なっても薬剤感受性にはほとんど差は認められなかった。No.324 の尿由来株では、血清型 C のコロニーは E より一般的に耐性傾向でアミノ配糖体薬剤に対し顕著であった。No.342 の株については、3種の血清型が存在し、CAZ, IPM, AZT, OFLX を除く薬剤に対する感受性は異なり、C型, non-type, B型と耐性であった。また全株共通して OFLX には薬剤感受性の異なるコロニーは認められなかった。

III. 考 察

前報において、呼吸器感染症の起炎菌として分離された *H. influenzae* および *S. aureus* などでは β -lactamase 産生能、*S. pneumoniae* ではオプトヒン産生能などの生物学的性状が異なるコロニーが共存する菌株が存在することを報告した¹⁾。これは異種の菌種による複数菌感染と同様、生物学的性状の異なる同一菌種による混合感染と考えられる。

本報では *P. aeruginosa* について同様な検討を行った。*P. aeruginosa* の場合、重症感染症または複数菌

感染の起炎菌として、複雑な感染症との関わりが強く⁸⁻⁹⁾、コロニーレベルでは Indirect pathogen としての共存等かなり複雑な現象が存在するものと予想された。さきに我々は、*Pseudomonas* 属間で β -lactamase 産生能または誘導能に大きな差異があるとともに、菌株間でも β -lactamase 誘導剤に対する反応がかなり異なることを報告した²⁾。このような現象の原因には同一菌株に異なった性状をもったコロニーの共存が考えられる。

異種の色素産生、色調の濃淡、R型とS型などのコロニー性状の判定は病原菌の分類と決定の原点である。特に疫学的な調査では病原菌の血清型は重要な判定因子である。本報の結果では、*P. aeruginosa* の同一の菌株でもコロニーの形態などの性状の相違と関連して血清型が異なる2~3種類のコロニーが混在することが判明した。このような事実は当然疫学的調査の結果に影響を与えるものと考えられる。

またコロニー形態の相違は単に血清型との関連のみでなく、一部の菌株では β -ラクタム薬およびアミノ配糖体薬の感受性にも関連した。これらに対する薬剤感受性がコロニー間で100倍以上相違する例があり、薬剤選択に十分な配慮が必要である。

なお、本文中には記さなかったが、一臨床材料中に共存したこれらの血清型の異なるコロニーを抗菌剤含有およびフリーの培地で継代培養を5回繰り返したが、色調の強弱に差が生じたコロニーが出現したが、血清型別は変化しなかった。この結果から、感染部位に血清型の違う性状の異なる複数の緑膿菌が存在する可能性が示唆された。

また実際に我々は、緑膿菌感染症患者の投与前試料から分離された緑膿菌と投与中および投与後に検出された緑膿菌では血清型および薬剤感受性が異なる症例を経験している。このような現象は前述の可能性を裏づけるものと考えられる。したがって、臨床材料から緑膿菌を分離する場合、その色素の形態に充分注意し以後の検査を進める必要があると思われる。

以上のとおり、臨床分離の *P. aeruginosa* の異種コロニーの共存とその問題点を述べたが今後はその他の病原菌について検討を加える予定である。

文 献

- 1) 小林寅詰, 長谷川美幸, 西田 実, 五島瑳智子: 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. *Chemotherapy* 39(2): 129~137, 1991
- 2) 小林寅詰, 手塚孝一, 佐藤弓枝, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 金子康子, 西田 実, 五島瑳智子: 抗緑膿菌用 β -ラクタム剤による緑膿菌の β -lactamase 誘導と

- 薬剤感受性について。Chemotherapy 37(12):1453~1457, 1989
- 3) 吉田健治, 他: 日本細菌学雑誌, 38(1): 333, 1983
- 4) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) 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(2): 246~255, 1990
- 6) 代居敬子, 井上松久, 橋本 一: 臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性。Chemotherapy 38(3): 214~219, 1990
- 7) 大泉耕太郎: 緑膿菌感染症, 特集: 難治性呼吸器感染症。日本臨床 45: 526~530, 1987
- 8) 谷本普一, 立花昭生: 難治気道・中間領域感染症における緑膿菌ワクチン療法の検討。日内会誌 71: 1384~1388, 1982

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DRUG-SUSCEPTIBILITY OF CLINICALLY ISOLATED BACTERIA IN COLONY LEVELS

Intetsu Kobayashi^{1,2)}, Miyuki Hasegawa¹⁾, Utsuki Uchino¹⁾,
Minoru Nishida^{1,2)} and Sachiko Goto²⁾

¹⁾: Chemotherapy Division, Mitsubishi-Yuka Bio-Clinical Laboratories,
3-30-1, Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174 Japan

²⁾: Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

We investigated the biological characteristics and drug-susceptibility of 138 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical specimens. Of the individual colonies formed, 48 differed in pigment, color density and colony type, and strains with different serotypes accounted for 17 of these. In contrast, no difference in serotype was found among 90 strains which formed colonies with uniform biological characteristics, and there was no correlation between serotype and colony type among the strains with different biological characteristics. Moreover, in the strains producing different pigments, many colonies were non-typable with regard to serotype. Among the strains forming two different colony types, each pair also differed in the ability to liquefy gelatin, and some of these also differed in their acid production from xylose and urease production. In particular, two strains which formed colonies of different serotype and with different biological characteristics differed markedly in their β -lactamase activity and susceptibility to the β -lactams and 2 aminoglycosides tested.