

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

(III) 緑膿菌の単一菌株に共存する感性細胞による多剤耐性細胞の増殖抑制

小林 寅吉^{1,2)}・長谷川美幸¹⁾・内野卯津樹¹⁾西 田 実^{1,2)}・五島達智子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10月31日受付・平成4年3月3日受理)

Pseudomonas aeruginosa の臨床分離株 (No. 1 株) の薬剤耐性細胞の Mueller-Hinton broth 中における増殖は、この菌株中に共存する感性細胞によって抑制されることが各種の検討によって確認された。この抑制作用に関与する物質は感性細胞培養時に産生され、培地中に放出される。この抑制因子は易熱性 (56°C, 30 分) で、*P. aeruginosa* の一部の菌株の増殖にのみ特異的に抑制作用を示すが、他のブドウ糖非発酵菌の増殖に対してはまったく影響しない。この物質の本体とその作用について引き続き検討中である。

Key words: *P. aeruginosa*, drug-resistant cell, drug-susceptible cell, growth inhibitor

前報において、我々は各種の呼吸器感染症の起炎菌¹⁾および緑膿菌²⁾のいくつかの臨床分離菌の中に serotype, coagulase 型, β -lactamase 産生能、その他の生物学的性状が異なるコロニーが共存することを報告した。さらにこの種のコロニー間では、各種の薬剤に対する感受性にも顕著な相違があることを認めた。

我々は緑膿菌についてのその後の検討において、*Pseudomonas aeruginosa* No. 1 から分離された感性細胞 (No. 1-S) が、共存する多剤耐性細胞 (No. 1-R) の増殖を抑制することを認めた。また両細胞の共存比率と薬剤感受性値の関連についても検討したのでそれらの結果を報告する。

I. 材料および方法

1) 試験菌株

既報²⁾のとおり分離した *P. aeruginosa* No. 1-S (抗菌薬感性) および No. 1-R (耐性) を用いた。この菌は呼吸器感染症患者の喀痰より分離されたものである。

2) 使用抗菌薬

次の各薬剤を用いた。

Piperacillin (PIPC, 富山化学), cefsulodin (CFS, 武田薬品), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), gentamicin (GM, 日本シエリング), sisomicin (SISO, 山之内製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬)。

3) 薬剤感性細胞 (No. 1-S) と耐性細胞 (No. 1-R) の種々の混合条件における MIC の測定

P. aeruginosa No. 1 より PIPC, CFS および CAZ などの抗緑膿菌性 β -ラクタム薬およびアミノ配糖体薬に、耐性のコロニーおよび感性のコロニーを選択採取し、それぞれ Mueller-Hinton broth (Difco) 中で 37°C, 20 時間培養した。これらを同 broth で調製した 2×10^5 CFU/ml の *P. aeruginosa* No. 1-S 懸濁液に、 2×10^1 , 2×10^3 および 2×10^5 CFU/ml の *P. aeruginosa* No. 1-R 懸濁液をそれぞれ混合し、ただちに各試験薬剤が 800~0.025 μ g/ml の 2 倍希釈系列となるように調製した。35°C, 18 時間培養後菌の発育の認められなかった最小濃度を MIC とした。また対照として、No. 1-S および No. 1-R をそれぞれ単独の場合も同様に MIC を測定した。これらの測定は、日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法³⁾に準じ、マイクロプレートを用い、1 ウェル 100 μ l で行った。

4) 薬剤耐性細胞と感性細胞の共存時の両細胞の増殖

a) *P. aeruginosa* No. 1 から得られた感性細胞と耐性細胞をそれぞれ、 10^5 : 10^3 CFU/ml, 10^5 : 10^5 CFU/ml および 10^3 : 10^5 CFU/ml の比率になるよう Mueller-Hinton broth に調製し、37°C, 18 時間培養し、培養液を適宜希釈して両細胞の生菌数を寒天平板法を用いて測定しその結果を colony forming unit

* 東京都板橋区志村 3-30-1

(CFU) で示した。対照として、両細胞をそれぞれ 10^5 CFU/ml を単独でそれぞれ接種した場合の生菌数を同様に測定した。

b) 次に上記同様に調製した菌液を 37°C で培養を行い、0, 2, 4, 8, 24 時間後に経時的に両細胞の生菌数を測定した。また同一条件下で、培地に PIPC が感性細胞に対して 2 MIC (耐性細胞に対して $1/4$ MIC) となるように調製し、同様に経時的生菌数を測定した。さらに両細胞培養液中 PIPC 濃度は、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とした薄層 Disc 法による Bioassay 法で測定した。なお測定ポイントは、生菌数測定時と同じ経時的に測定した。

5) *P. aeruginosa* No. 1 の薬剤感性細胞の産生する耐性細胞および各種ブドウ糖非発酵菌の増殖抑制物質の検討

P. aeruginosa No. 1 の薬剤感性細胞 (No. 1-S) を Mueller-Hinton broth で 37°C , 20 時間培養後、培養液を 4°C , 5,000 rpm, 10 分間遠心し、得られた上清を $0.45\ \mu\text{m}$ のミリポアフィルター (ミリポア社) でろ過滅菌を行い、試験液とした。この試験液の一部は 56°C , 30 分間熱処理した。これらの試験液に *P. aeruginosa* No. 1 の薬剤耐性細胞およびその他の緑膿菌属と各種ブドウ糖非発酵菌の標準菌株を接種し、 37°C , 20 時間培養し、それぞれの増殖の有無を経時的に生菌数を測定して判定した。

II. 結 果

1) *P. aeruginosa* の薬剤感性および耐性細胞の共存比率と MIC 値との関係

P. aeruginosa No. 1 は、薬剤感性細胞と多剤耐性細胞が共存する株である。それぞれ両細胞を分離培養

し、Table 1 のように種々の比率で接種したときの各薬剤の MIC 値の変化を検討した。

まず、OFLX は両細胞に対する MIC が $25\sim 50\ \mu\text{g/ml}$ で、MIC は接種条件のすべてにおいて変化しなかった。しかし、GM および SISO では感性細胞と耐性細胞の MIC がそれぞれ $0.78\sim 1.56\ \mu\text{g/ml}$ および $200\sim 800\ \mu\text{g/ml}$ と大きな差があり、感性細胞 10^5 CFU/ml に耐性細胞を 10^1 CFU/ml の添加で MIC は急激に上昇した。これは耐性細胞の両薬剤に対する高い耐性を反映したものと考えられる。これに対して PIPC, CFS および CAZ では耐性細胞のこれらの薬剤に対する耐性は、感性細胞のその $4\sim 8$ 倍と比較的低く、接種菌量中の耐性細胞の比率の増加に伴って、MIC 値は緩やかに上昇した。すなわち、MIC 測定時接種菌量中の耐性細胞の比率が増加すると、*P. aeruginosa* No. 1 に対する MIC は耐性細胞の耐性を反映した値をとる。

2) *P. aeruginosa* No. 1 の感性細胞による耐性細胞の増殖の抑制

a) 抗菌薬の存在しない条件

P. aeruginosa No. 1 に共存する両細胞が、それぞれ *in vitro* でどのような増殖態度を示すかという点に検討を加えた。Fig. 1 の通り、Mueller-Hinton broth に感性細胞のみを 10^5 CFU/ml 接種した時、 37°C , 18 時間培養後に 10^9 CFU/ml にまで増菌する。また耐性細胞のみを 10^5 CFU/ml 接種してもほぼ 10^9 CFU/ml に増殖し、両細胞そのものの増殖に相違は認められない。次に、感性細胞 10^5 CFU/ml と耐性細胞 10^3 CFU/ml を同時接種すると、感性細胞は 18 時間培養後に 10^9 CFU/ml にまで増殖するが、耐性細胞

Table 1. MICs of six antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 when resistant and susceptible cells co-existed at different rates

Inoculum (CFU/ml) S ¹⁾ R ²⁾	(MIC: $\mu\text{g/ml}$)					
	Piperacillin	Cefsulodin	Ceftazidime	Gentamicin	Sisomicin	Ofloxacin
$10^5 + 0$	25	3.13	3.13	1.56	0.78	50
$10^5 + 10^1$	50	3.13	6.25	25	100	50
$10^5 + 10^3$	100	6.25	6.25	50	200	50
$10^5 + 10^5$	100	6.25	12.5	200	800	25
$0 + 10^5$	200	12.5	25	200	800	25

S¹⁾: Susceptible cell

R²⁾: Resistant cell

Agar dilution method

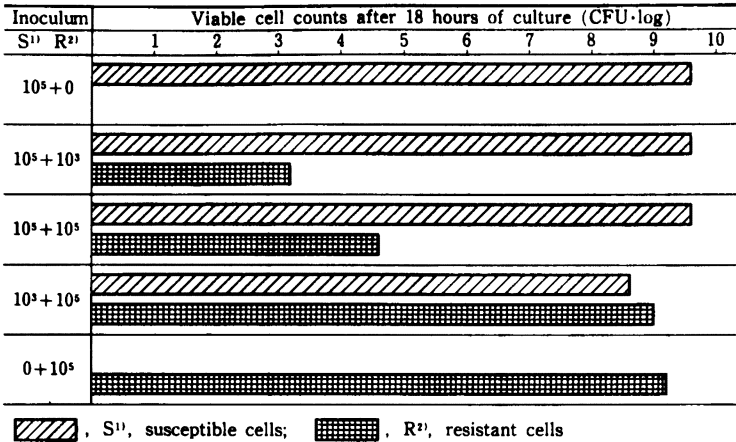


Fig. 1. Counts of drug-susceptible and resistant cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 at different inocula of both cells.

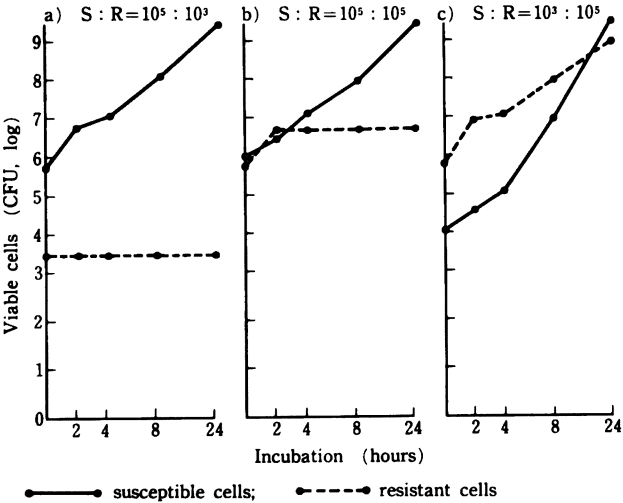


Fig. 2. Growth curve of drug-susceptible and resistant cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 during mixed culture without a drug.

は接種した 10³ CFU/ml から増殖しない。さらに両細胞をそれぞれ 10⁵ CFU/ml 同量接種した場合でも同様な傾向が認められた。さらに感性細胞を 10³ CFU/ml, 耐性細胞を 10⁵ CFU/ml の接種では、両細胞とも 10⁴~10⁹ CFU/ml と同程度に増殖した。この結果から、感性細胞の優勢時に耐性細胞の増殖が抑制されると判断した。

以上の 3 条件で両細胞を接種した際の生菌数の変化を Fig. 2 に示した。Fig. 1 の 18 時間培養後の結果をそれぞれ裏付ける growth curve が得られた。

b) PIPC の存在下で感性細胞の増殖を一時阻止する条件

PIPC を感性細胞に対して 2 MIC (耐性細胞の 1/4 MIC に相当) の濃度に添加し、両細胞の接種量を種々に変化して、それぞれの増殖パターンを観察した。

2 MIC の PIPC は感性細胞の増殖を完全に抑制するが、培養液中で耐性細胞の増殖に伴って分解を受ける。Fig. 3-a) では、PIPC によって培養初期に感性細胞の増殖が抑制され、それに伴い耐性細胞は著しい

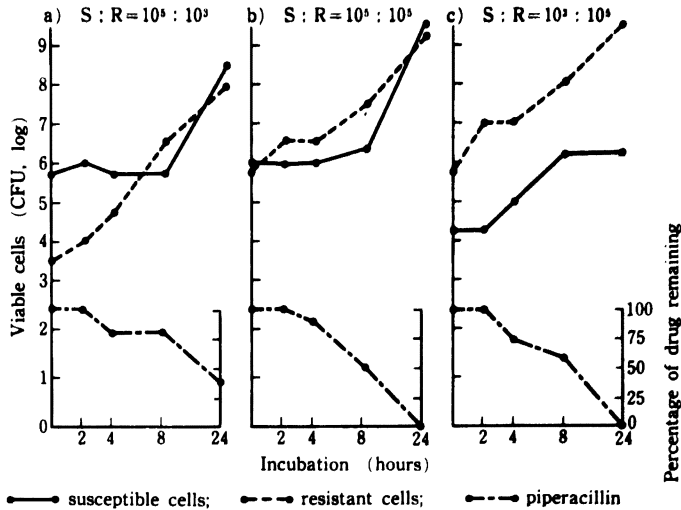


Fig. 3. Growth curve of drug-susceptible and resistant cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 during mixed culture in the presence of piperacillin (susceptible cells, 2 MIC; resistant cells, 1/4 MIC).

増殖がみられる。Fig. 3-b) の両細胞をほぼ同量 (10^5 CFU/ml) 接種した条件では、PIPC による感性細胞の増殖抑制がみられる培養初期では耐性細胞の増殖がやや阻止され、PIPC の分解の進行とともに増殖傾向を強めた。Fig. 3-c) のように耐性細胞の接種量を感性細胞のそれよりも多くすると、耐性細胞の増殖は培養初期からより顕著となった。

以上の成績から、耐性細胞と感性細胞を接種菌量の種々の組み合わせで接種した場合、両細胞の増殖パターンから、Fig. 2 に示した抗菌薬無添加時の結果を確認した。

3) *P. aeruginosa* No. 1 の感性細胞の培養上清液の耐性細胞の増殖抑制作用

前述の通り、感性細胞と耐性細胞を混合培養すると、耐性細胞の増殖が感性細胞により抑制される傾向が認められた。この原因を検討するため、まず Mueller-Hinton broth で感性細胞を 37°C 、20 時間培養し、その遠心上清またはその 56°C 、30 分熱処理液に耐性細胞を接種した。 37°C 、24 時間それぞれ培養した。

Fig. 4 の通り、熱処理上清液中では、耐性細胞はよく増殖した。しかし、無処理上清液中では耐性細胞の増殖は接種後 8 時間まで完全に抑制され、8 時間以降は接種した水準の生菌数まで回復した。

この結果から、*P. aeruginosa* No. 1 の感受性細胞の増殖によって培地中に産生された易熱性の物質によ

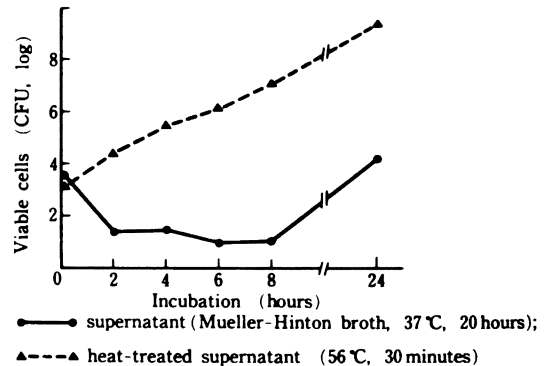


Fig. 4. Inhibition of growth of drug-resistant cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 by supernatants from broth cultures of susceptible cells.

って、同株に共存する耐性細胞の増殖が阻止されることが判明した。この物質の本体については、引き続き検討中である。

4) *P. aeruginosa* No. 1 の感性細胞の培養上清液の各種ブドウ糖非発酵菌の増殖におよぼす影響

前述の感性細胞の培養上清中の耐性細胞の増殖抑制物質が、他の緑膿菌属およびブドウ糖非発酵菌の増殖に影響を与えるかどうかを検討した。その結果 No. 1-R 株を阻止するような現象はまったく認められず、用いた試験菌の発育にはまったく影響を与えない事実

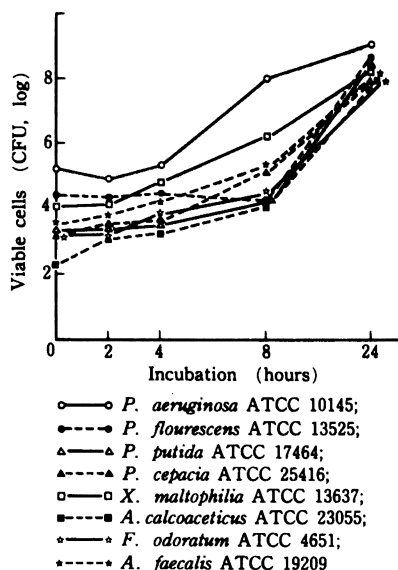


Fig. 5. Growth curves of various non-glucose fermentative rods in supernatants from broth cultures of drug-susceptible cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1.

が得られた。

III. 考 察

さきに我々は、臨床材料より分離された各種の病原菌には、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報告した^{1,2)}。その結果、このような菌株による感染症では疫学的な問題、抗菌薬の選択上の混乱、臨床効果と *in vitro* 評価結果の不一致などの原因となる可能性があることを指摘した。特に *P. aeruginosa* では、同一菌株のコロニーで serotype の異なるものが共存し、このようなコロニー間では β -lactamase 産生能や各種の薬剤に対する感受性が相違する。*P. aeruginosa* の同一菌株に serotype の異なる細胞が共存する原因としては、ファージの感染ま

たはプラスミドの導入による細胞形質の転換、または異なった性状をもつ同一菌種の混合感染の可能性が考えられる。

今回はまず、*P. aeruginosa* No. 1 中に共存する感性細胞と耐性細胞が、各種の抗菌薬の本菌株に対する MIC 値にどのような影響をおよぼすかという問題を検討した。その結果、MIC 値は耐性の程度および耐性細胞の比率に対応した値をとることが明らかになった。

また *P. aeruginosa* No. 1 の増殖に対する両細胞の相互作用を検討したが、耐性細胞の増殖は感性細胞の増殖によって抑制される傾向がみられた。一般に薬剤耐性株の発育速度は感性株より遅いと言われているが、我々の検討では *P. aeruginosa* No. 1 中の耐性細胞の発育速度は感性細胞のそれと相違しない。しかし、感性細胞は培養液中に耐性細胞の発育を抑制する易熱性の物質を産生することを認めた。この物質は、特定の緑膿菌に特異的で、その他のブドウ糖非発酵菌の発育には影響をおよぼさない。この本体については引き続き検討中である。

P. aeruginosa No. 1 を含めてこの菌種の一部の菌株に共存する耐性細胞と感性細胞は、感性症の過程に何らかの影響をおよぼす可能性が考えられる。

文 献

- 1) 小林寅詰, 長谷川美幸, 西田 実, 五島瑛智子: 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: 129~137, 1991
- 2) 小林寅詰, 長谷川美幸, 西田 実, 五島瑛智子: 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, (II) 緑膿菌について. *Chemotherapy* 39: 753~760, 1991
- 3) 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法) —日本化学療法学会標準法—. *Chemotherapy* 38: 103~105, 1990

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CLINICAL ISOLATES OF BACTERIA AT THE COLONY LEVEL

(III) INHIBITION OF GROWTH OF MULTIDRUG RESISTANT CELLS BY SUSCEPTIBLE CELLS CO-EXISTING IN A SINGLE ISOLATE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

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

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of six drugs for *Pseudomonas aeruginosa* No. 1, a typical isolate, which forms colonies of different serotypes and drug-susceptibilities, were determined and compared in regard to degree of resistance of the cells in a single inoculum and the ratio of the resistant cells to susceptible cells. MIC values of the drugs varied according to the number of resistant cells in an inoculum and the degree of the resistance to each drug. The interaction between the drug-resistant and susceptible cells of *P. aeruginosa* No. 1 in the mixed culture was investigated. The growth of drug-resistant cells in Mueller-Hinton broth was inhibited by drug-susceptible cells inoculated. For the reason, the inhibitory factor was produced in the culture broth of susceptible cells at 37°C, but was unstable to heating at 56°C for 30 minutes. Furthermore, the factor specifically inhibited growth of some isolates of *P. aeruginosa*, but did not inhibit the other species of gram-negative bacteria tested.