

【原著・基礎】

腸管出血性大腸菌 O-157 に対する各種抗菌薬の抗菌力と
verotoxin 遊離作用の検討高田 利彦¹⁾・田端麻紀子¹⁾・菅野由美子¹⁾・平野 文也¹⁾・井上 松久²⁾¹⁾ 明治製菓株式会社薬品総合研究所*²⁾ 北里大学医学部微生物学教室

(平成 8 年 12 月 20 日受付・平成 9 年 3 月 6 日受理)

腸管出血性大腸菌 O-157 に *in vitro* で抗菌薬を作用させた場合の殺菌作用と verotoxin の遊離量を検討した。臨床由来の腸管出血性大腸菌 O-157: H7 型株に対する抗菌薬の好気条件下における抗菌力は、norfloxacin (NFLX) がもっとも優れ、fosfomycin (FOM), ampicillin (ABPC), chloramphenicol (CP) および kanamycin (KM) が、ほぼ同等の抗菌力を示した。FOM の抗菌力は、好気条件下の時に比べ、嫌気条件下では 16 倍増強され NFLX のそれとほぼ同等であった。しかし、KM の抗菌力は嫌気条件下では 16 倍減弱された。一方、各抗菌薬作用後の培養上清中の verotoxin 1 (VT 1) の遊離は、FOM の作用により短時間で一時的な遊離が認められるものの、作用時間に依存した増加は認められなかった。この遊離現象は、ABPC 作用時についてもほぼ同等であった。しかし、NFLX 作用時では、作用時間に依存した VT 1 の遊離量の増加が認められた。一方、CP および KM 作用における遊離は弱いものであった。Verotoxin 2 (VT 2) の遊離については、FOM の 1 MIC 濃度以上の作用により VT 1 の場合と同様に、VT 2 の一時的な遊離が認められたが、作用時間に依存した遊離量の増加は認められなかった。ABPC および NFLX の 1 MIC 濃度作用では、作用時間に依存した VT 2 の遊離量の増加が認められ、その遊離は NFLX 作用時がもっとも強いものであった。さらに、CP および KM の 1 MIC 濃度以上の作用における VT 2 の遊離は、作用時間に依存性がなく弱いものであった。

Key words: 大腸菌 O-157: H7, verotoxin, 殺菌効果, 抗菌力

腸管出血性大腸菌による下痢症については、1982 年にアメリカで最初に報告¹⁾されている。日本においては、1984 年に最初に腸管出血性大腸菌による集団下痢症が報告²⁾され、1996 年 5 月下旬以降さらに全国各地で大腸菌 O-157: H7 型株による大規模な食中毒が続発した³⁾。また、腸管出血性大腸菌による集団下痢症に対し、抗菌薬投与が有効かどうかについても議論の対象になっている。そこで今回、腸管出血性大腸菌 O-157: H7 型菌 (以下大腸菌 O-157) に対する抗菌力および verotoxin (以下 VT) 遊離作用という観点から数種の抗菌薬について基礎的検討を行った。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

臨床由来の大腸菌 O-157: H7 型菌 21 株および北里大学医学部微生物学教室保存の *Escherichia coli* KU 3342 (O-157: H7) を被験菌株とした。

2. 使用薬剤

Fosfomycin Na 塩 (FOM, FOSB 20224, 745 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 明治製菓), ampicillin (ABPC, PAS-12200, 917 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 明治製菓), norfloxacin (NFLX, 18 F 0428, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SIGMA), chloramphenicol (CP, 73 H

0174, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SIGMA), kanamycin (KM, RKD22901, 690 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 明治製菓) 以上のいずれも片価が明らかな 5 薬剤を使用薬剤とした。

3. 各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

Mueller-Hinton broth (MHB, DIFCO) を用いた日本化学療法学会標準法に準じた微量液体希釈法により MIC を測定した。なお、通常 FOM の感受性測定においては、FOM 小委員会法で定められた方法で検討するが、VT の遊離作用の検討において、他抗菌薬と同一条件で比較する必要があるとの考えから、日本化学療法学会標準法に準じた微量液体希釈法により実施した。また、嫌気条件下での MIC 測定は、AnaeroPack・ケンキ (三菱ガス化学株式会社) を用いて嫌気条件を設定することにより行い、この判定は、培養 48 時間後に行った。

4. 各種抗菌薬作用時の生菌数および verotoxin (VT) 遊離の測定

被験菌株 (*E. coli* KU 3342) を MHB で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜培養したものを同培地で 100 倍希釈した。さらに、この菌希釈液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間振盪培養後、各抗菌薬を最

終濃度が所定濃度になるように培養液中に添加して 37 °C で振盪培養した。その後、経時的に生菌数測定用に 200 μ l および VT titer 測定用に 500 μ l ずつサンプリングした。生菌数測定は、サンプリング液を 0.05% agar 入り生理食塩水で適宜希釈 (10 倍段階希釈) し、その 100 μ l を Mueller-Hinton agar (MHA, DIFCO) 平板に塗抹して、37 °C で一夜培養後観察されたコロニー数をカウントすることにより行った。一方、VT 遊離の測定は、サンプリング液を室温で 8,000 rpm, 10 min 間遠心後、その上清をミリポアフィルター (0.22 μ m, マイレックス HV 4, ミリポア社) で濾過し、この濾液を検体として、大腸菌ペロトキシン検出用キット (デンカ生研) を用いることによる逆受身ラテックス凝集反応により行った。

5. 各種抗菌薬作用時の VT 1 および VT 2 遊離量の統計処理

各種抗菌薬の 64, 1 および 1/16 MIC 作用時における VT 1, VT 2 遊離量における抗菌薬および時間を元とする 2 元配置の分散解析 (ANOVA) を行った。有意水準は、5% および 1% とした。

II. 実験結果

1. 臨床由来大腸菌 O-157 の各薬剤に対する感受性分布

臨床由来大腸菌 O-157 菌 21 株の各種抗菌薬に対する感受性分布を Fig. 1 に示した。その結果、大腸菌 O-157 菌 21 株に対し好気条件下では、NFLX がもっとも優れた抗菌力を示し、FOM, ABPC, CP および KM の抗菌力は、ほぼ同等であった。また、VT の遊離実験

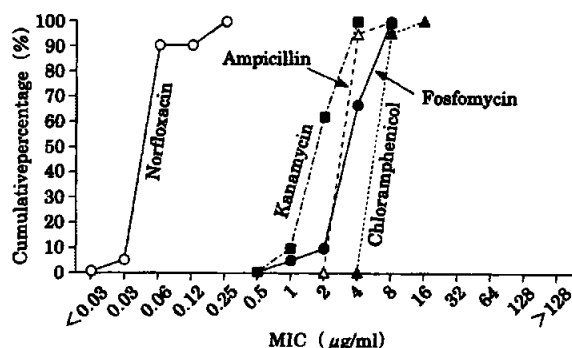


Fig. 1. Antibacterial activities of fosfomycin, norfloxacin, chloramphenicol, ampicillin and kanamycin against 21 strains of clinically isolated *Escherichia coli* O-157: H7.

に用いた *E. coli* KU 3342 に対する各種抗菌薬の好気および嫌気条件下での MIC を Table 1 に示した。*E. coli* KU 3342 に対する FOM の抗菌力は、好気条件に比較して嫌気条件下において 16 倍増強されほぼ NFLX の抗菌力と同等になるのに対し、KM の抗菌力は 16 倍減弱された。ABPC, NFLX および CP の抗菌力は培養条件の違いによる変化は認められなかった。

2. 各抗菌薬作用時の殺菌効果と VT の培養上清中の遊離

E. coli KU 3342 に対する各種抗菌薬の 64, 1 および 1/16 MIC 濃度作用時の生菌数と培養上清中の VT 遊離の経時変化を Figs. 2, 3 に示した。その結果、抗菌薬無添加においては、経時的な生菌数の増加と VT 1 (0 時間では検出限界であるが 6 時間後では約 32 ng/ml である) および VT 2 (0 時間では約 8 ng/ml であるが 6 時間後では約 2,048 ng/ml である) の遊離の増加が認められた。それに対し、FOM の 64 および 1 MIC 濃度添加群は、強い殺菌効果による生菌数の減少が認められると同時に、短時間での VT 1 および VT 2 の遊離が認められた。しかし、VT 1 および VT 2 の遊離は、経時的な増加が認められず、一定以上の遊離は認められなかった。一方、ABPC の 64 MIC 濃度作用では、その殺菌効果および VT 1, VT 2 の遊離において FOM 作用時とほぼ同等の効果であるが、ABPC の 1 MIC 濃度作用により VT 2 の経時的な遊離の増加が認められた。さらに、NFLX の 1 および 1/16 MIC 濃度作用では、VT 1 および VT 2 の経時的な増加が認められ、特に VT 2 の遊離は顕著であった。CP の 64 および 1 MIC 濃度作用では、その殺菌効果は弱いものの VT 1 および VT 2 の遊離については経時的な増加は認められず弱いものであった。KM の 64 および 1 MIC 濃度作用では、64 MIC 濃度作用により強い殺菌効果が認められると同時に VT 1 および VT 2 の遊離はほとんど認められなかった。一方、1 MIC 濃度作用では、わずかな殺菌効果が認められ VT 1 の遊離についてはかなり弱いものの、VT 2 の若干の経時的な遊離増加が認められた。

3. VT 遊離量の統計処理

大腸菌 O-157 からの VT 1 の遊離は、抗菌薬の濃度にかかわらず、薬剤間および時間経過のいずれにおいても、1% で有意差ありとなった。VT 2 の遊離は、

Table 1. MICs of fosfomycin, norfloxacin, chloramphenicol, ampicillin and kanamycin against *Escherichia coli* KU 3342 under aerobic or anaerobic conditions

	Fosfomycin	Norfloxacin	Chloramphenicol	Ampicillin	Kanamycin
Aerobic condition	8	0.25	8	4	1
Anaerobic condition	0.5	0.25	4	2	16

(μ g/ml)

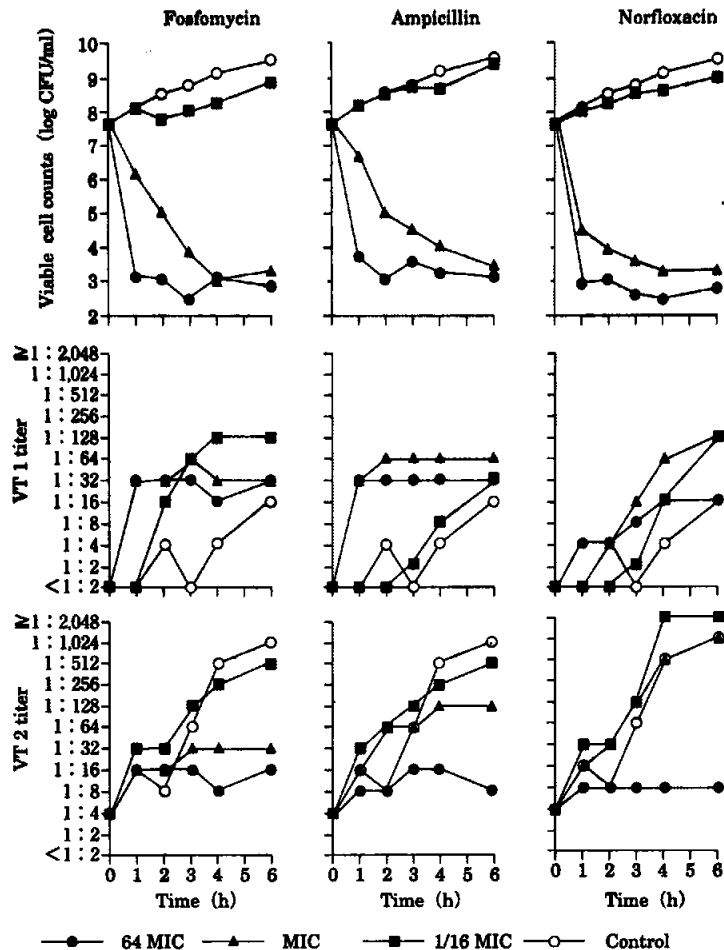


Fig. 2. Time-dependent changes in viable cells and verotoxin release after treatment with fosfomycin, ampicillin and norfloxacin.

1/16 MIC 濃度において、薬剤間は 5%，時間経過は 1% で有意差ありとなった。MIC 濃度においては、薬剤間および時間経過のいずれについても 1% で有意となった。また、64 MIC 濃度においては、薬剤間は 1% で有意となったが、時間経過には有意差が認められなかった (Tables 2, 3)。

III. 考 察

大腸菌 O-157: H7 型菌による感染は、腸管部を中心とした感染症の 1 つであり、抗菌剤投与による生体内からの菌の早期排除は大きな意義を持つものと考えられる。この観点から今回使用した 5 種の薬剤の抗菌力は強いものであり、特に NFLX については優れた抗菌力が認められ、菌の早期排除という点においては大きな武器となることが考えられる。FOM の抗菌力は好気条件に比較し、嫌気条件下において増強されることが報告されているが⁽⁴⁾、今回の実験結果においても、嫌気条件下において FOM の抗菌力の増強が認められ、ほぼ NFLX の抗菌力に匹敵するものであった。すなわち、嫌気状態に近いと考えられる腸管内部において FOM はより強い抗菌力を発揮するものと考えられ、こ

のことは菌の早期排除という点で臨床的に大きな意義を持ち、臨床所見の早期改善が期待できる。

一方、大腸菌 O-157: H7 型菌による感染症においては、薬剤の抗菌力による菌の早期排除とともに、その時の verotoxin (VT) の遊離をいかに抑制するという観点からも抗菌剤使用について考える必要があり、実際この点について多くの議論の対象になっている。しかし、VT 1 および VT 2 の作用についての詳細は明確化されていない。VT 1 は非放出型であり VT 2 は放出型の toxin であると言われ、VT を産生する大腸菌の感染により 0.2~1% の割合で溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) に進展することが報告されている^(6,7)。しかし、HUS への関与についてはどちらの VT が主であるかについても議論されている。また、LPS が VT の作用 (HUS に進展する) に関係しているとも言われている。さらに、構造および機能、マウスに対する致死毒性 (VT 2 の方が VT 1 より強い)、細胞傷害作用および免疫学的性質等多くの報告がある⁽⁸⁻¹²⁾。しかし、抗菌剤投与による VT の遊離については抗菌作用とともに重要なポイントであるが、そ

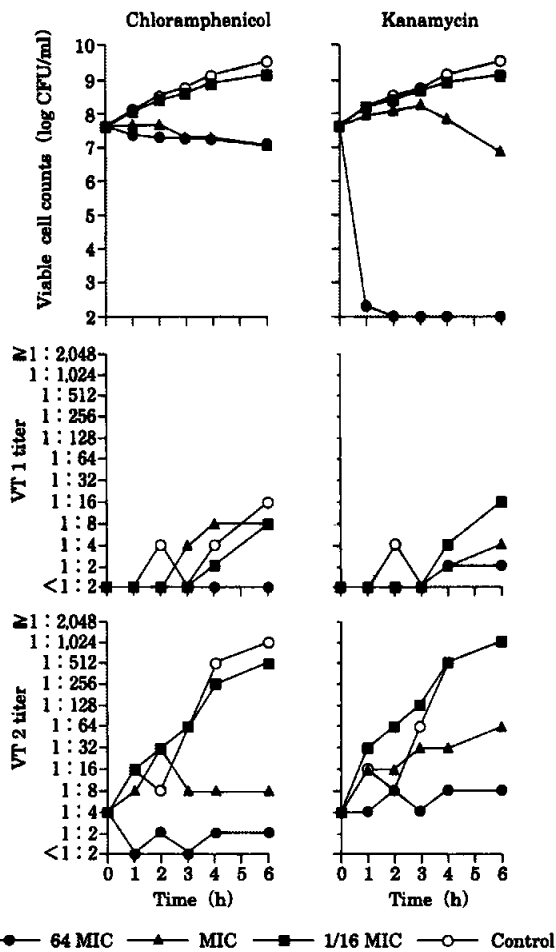


Fig. 3. Time-dependent changes in viable cells and verotoxin release after treatment with chloramphenicol and kanamycin.

の報告は少ない。

今回の実験は、この点について検討を行った。その結果、抗菌作用の強い FOM, ABPC および NFLX については、ほぼ類似の VT 遊離作用が認められた。MIC 以上の濃度域において、FOM は ABPC と同様に一時的な VT 1 の遊離増加が認められた。これは、抗菌作用の標的が、ともに細胞壁であることに起因するものと考えられる。NFLX は VT 1 および VT 2 の経時的な遊離の増加が他剤に比較して強い傾向にあった。MIC 以上の FOM を作用させた場合では、VT 1 および VT 2 の遊離の経時的な増加は認められなかった。蛋白合成障害の CP および KM については、殺菌効果において CP は弱いものの、両薬剤とも作用機序による菌の VT 産生抑制のため、VT 1 および VT 2 の遊離作用については弱い傾向にあった。VT 1 は、菌体の溶菌により放出されるため、薬剤無添加群においても時間とともに増加しているが、薬剤間で有意差が認められたのは、薬剤による殺菌効果あるいは作用機序の違いにより、菌体の溶菌する時間に差ができたためと考え

Table 2. ANOVA (verotoxin 1 release into culture medium)

1/16 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	42.58	5	8.51	5.98**
Time	116.58	5	23.31	16.38**
Error	35.58	25	1.42	
Total	194.75	35		

1 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	95.58	5	19.12	10.04**
Time	77.58	5	15.52	8.15**
Error	47.58	25	1.9	
Total	220.75	35		

64 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	96.89	5	19.38	15.41**
Time	35.58	5	7.11	5.65**
Error	31.44	25	1.25	
Total	163.89	35		

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 3. ANOVA (verotoxin 2 release into culture medium)

1/16 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	6.47	5	1.29	2.61*
Time	243.47	5	48.69	98.48**
Error	12.36	25	0.49	
Total	262.31	35		

1 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	39.47	5	7.89	4.77**
Time	98.81	5	19.76	11.94**
Error	41.36	25	1.65	
Total	179.64	35		

64 MIC	Sum of squares	Degree of freedom	Variance	Ratio
Drug	73.92	5	14.78	7.71**
Time	16.92	5	3.38	1.77
Error	47.92	25	1.92	
Total	138.75	35		

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

られる。一方、恒常的に菌体外に放出される VT 2 については、1/16 MIC 濃度での結果より、低濃度の薬剤が経時的に遊離量の増加を招いていることが推定された。しかし、FOM は投与後糞便中で 197~605 $\mu\text{g/g}$ の濃度と高濃度となる¹⁰⁾ため、今回高濃度の薬剤の効果を検討した。64 MIC 濃度では、経時変化に有意差がなく、早期の殺菌効果が、以後の産生・遊離を抑制しているものと推察される。

今回、*E. coli* KU 3342 株 (O-157: H7) について詳細に検討したが、各抗菌薬の一定濃度（たとえば、MIC の何倍か）を作用させた場合、他の菌株に対してもほぼ同様の傾向にあった。しかし、一度に多数の菌株を本実験の系で処理することは、非常に難しいことである。したがって、今回の報告は、1 株の結果であるが、その結果については十分に情報として価値があるものと考えられる。

以上の *in vitro* 試験については、今後、使用菌量、抗菌薬作用濃度および菌の接着等 *in vivo* での状態をより反映した系で検討を進める必要がある。また、腸管出血性大腸菌の感染症に対し、抗菌薬の投与がどの程度有効かどうかを殺菌効果および VT の遊離作用という観点から、基礎的立場で報告するためには、培養細胞系および *in vivo* の実験系での抗菌薬の有効性についての検討など、より臨床の場を反映した実験系での検討が必要になると考えられる。今回の実験結果より、蛋白合成阻害作用を有する CP の VT 遊離作用は弱いものの、抗菌作用は静菌的である。このように菌が静菌的で増殖しないことは、菌を排除する意味においても有利である可能性がある。また、殺菌的な作用を持つものは、毒素の遊離においても強い傾向にあり、完全に殺菌されれば問題は少ない。ただし、殺菌力が増強されると毒素の遊離が増加するかというところでもない。FOM は、1/16, 1, 16 MIC と作用濃度が増加するとその殺菌作用も増強されるが、毒素の産生量も対照と比較して同等かむしろ少ない傾向にある。KM は殺菌効果が強く VT の遊離作用も弱いという点において、その有効性が期待されるが、嫌気条件下においてその抗菌力が減弱されることも考慮に入れる必要がある。また、NFLX の作用により、VT 1 について経時的な遊離の増加が認められる。これに対し FOM は、嫌気条件下においてその抗菌力が増強されること、強い殺菌作用を有すること、および VT の遊離については作用後短時間に一時的遊離があるものの、作用時間に依存した遊離量の増加は認められないことなど、他剤には認められない FOM 特有の作用や前述のごとく対照と比較して VT の遊離量が少ないこと等を考え合わせると、大腸菌 O-157: H7 型菌による感染症に対し、より優れ

た有効性が期待される抗菌剤であると考えられる。

文 献

- 1) Riley L W, Remis R S, Heigerson S D: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681~685, 1983
- 2) 伊藤 武, 甲斐明美, 斎藤香彦, 他: Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* O 145: H-による集団食中毒の細菌学・免疫学的検討。東京都立衛生研究所研究年報 36: 16~22, 1985
- 3) 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況。医学のあゆみ 178 (13): 909~914, 1996
- 4) Inouye S, Watanabe T, Tsuruoka T, et al.: An increase in the antimicrobial activity *in vitro* of fosfomycin under anaerobic conditions. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 657~666, 1989
- 5) Freedberg W B, Lin E C C: Three kinds of controls affecting the expression of the *glp regulon* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 115: 816~823, 1973
- 6) 竹田多恵: 腸管出血性大腸菌感染症と赤痢。化学療法領域 12 (4): 662~669, 1996
- 7) Fujii J, Kita T, Yoshida S, et al.: Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O 157: H-in mitomycin C-treated mice. *Infect. Immun.* 62: 3447~3453, 1994
- 8) 山崎伸二, 竹田美文: Vero 毒素の構造と機能。医学のあゆみ 178 (13): 915~920, 1996
- 9) Takeda Y, Kurazono H, Yamasaki S: Vero toxins (Shiga-like-toxins) produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-producing *E. coli*). *Microbiol. Immunol.* 37: 591~599, 1993
- 10) Lingwood C A, Law H, Richardson S, et al.: Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 262: 8834~8839, 1987
- 11) Tesh V L, Ramegowda B, Samuel J E: Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 62: 5085~5094, 1994
- 12) Schmidt H, Beutin L, Karch H: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63: 1055~1061, 1995
- 13) 佐藤 肇, 中西好子, 鈴木博之, 他: Fosfomycin 内服による感染性腸炎に対する有用性の検討 - *Campylobacter jejuni* 腸炎を中心に -。小児科臨床 37: 2189, 1984

The effects of various antibacterial agents on the release of verotoxin against
Escherichia coli O-157: H7 strains

Toshihiko Takata¹⁾, Makiko Tabata¹⁾, Yumiko Kanno¹⁾,
Fumiya Hirano¹⁾ and Matsuhisa Inoue²⁾

¹⁾ Meiji Seika Kaisha, LTD. Pharmaceutical Research Center, 760 Morooka-cho,
Kohoku-ku, Yokohama-city, Kanagawa, Japan

²⁾ Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

Among the five antimicrobials tested, norfloxacin (NFLX) showed the strongest antimicrobial activity against clinical isolated strains of *Escherichia coli* O157: H7. The other four antibiotics, fosfomycin (FOM), ampicillin (ABPC), chloramphenicol (CP) and kanamycin (KM) also showed antibiotic activity against this organism, and this potencies were similar. Antibacterial activity of FOM was much greater under anaerobic conditions than under aerobic conditions. This potency was similar to that of NFLX. Whereas the activity of KM was greatly decreased under anaerobic conditions. In terms of verotoxin release, *E. coli* treated with FOM released verotoxin 1 (VT 1) in a few hours after treatment and the amount of toxin did not increase time dependently. Treatment with ABPC induced the toxin release in the same manner as FOM. In contrast NFLX-treated *E. coli* released VT 1 time dependently during the observation period. The amounts of VT 1 release after treatment with CP or KM were not very high. The release of verotoxin 2 (VT 2), after treatment with more than the MIC of FOM was very little and the time-dependent increase in the release could not be observed, in contrast with the control release. The treatment by other antibiotics gave similar results. On the other hand, the treatment by antibiotics at a concentration around the MIC did not inhibit the increase in the control release of VT 2, and NFLX treatment tended to increase the release.