

## 【原著・基礎】

*Bacteroides* spp. の増殖抑制発現に関する実験的研究—*Bacteroides* spp. の増殖抑制株に対する *Pseudomonas aeruginosa* の影響—加藤 高明<sup>1)</sup>・中川 良英<sup>1)</sup>・佐藤 毅<sup>1)</sup>・古畑 久<sup>1)</sup>・奥村光治郎<sup>1)</sup>  
大塚 一秀<sup>1)</sup>・加藤 るな<sup>1)</sup>・伊藤裕美子<sup>1)</sup>・岩井 重富<sup>1)</sup>・矢越美智子<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 日本大学医学部第三外科\*<sup>2)</sup> 日本大学医学部附属板橋病院臨床検査部

(平成 10 年 12 月 25 日受付・平成 11 年 3 月 18 日受理)

消化器外科領域において嫌気性グラム陰性桿菌による腹腔内感染の発症頻度は高い。また、このほとんどの場合は他菌種との複数菌感染である。そこで、臨床的にもっとも問題となる菌種の 1 つである *Bacteroides* spp. と、検出率が高く治療に難渋する *Pseudomonas aeruginosa* を混合培養して、*Bacteroides* spp. の増殖状態に関して検討した。臨床材料から採取された *Bacteroides* 14 菌株 (*Bacteroides fragilis* が 9 株、*Bacteroides thetaiotaomicron* が 2 株、*Bacteroides caccae* が 2 株、*Bacteroides eggerthii* が 1 株) から低栄養状態または sub MIC 下 (cefmetazole 6.25 µg/ml) で作製された種々の程度の増殖抑制株の菌液および、これと *Pseudomonas aeruginosa* との混合菌液を嫌気条件下、37.5°C で振盪培養し経時的に生菌数を測定した。*Bacteroides* spp. 単独培養では、増殖抑制の程度により種々の増殖曲線を描いた。高度増殖抑制株は増殖が不安定で、途中で増菌が完全に止まった。中等度増殖抑制株では増殖は比較的安定していたが、10<sup>6</sup>CFU/ml までは増菌しなかった。軽度増殖抑制株では生菌数は 10<sup>9</sup>CFU/ml に達したが、培養に時間を要した。高度増殖抑制株を継代培養すると徐々に増殖の抑制の程度は軽快し、中等度増殖抑制株から軽度増殖抑制株に移行した (増殖抑制因子は継代されるも徐々に消失した)。これらの菌株に 10<sup>6</sup>CFU/ml の *Pseudomonas aeruginosa* を加えて培養すると増殖抑制の発現が制御され、生菌数は全株とも 10<sup>9</sup>CFU/ml 以上となった。増殖初期では速度が遅い場合もみられたが、その後は増殖が良好となった。以上の結果から、感染巣に感染している増殖抑制状態にある *Bacteroides* spp. が *Pseudomonas aeruginosa* との混合により再び対数増殖の状態に戻ってしまう可能性が示唆された。

**Key words:** 嫌気性菌, 好気性菌, バクテロイデス, 緑膿菌, 増殖抑制

消化器外科領域において嫌気性グラム陰性桿菌による腹腔内感染の発症頻度は高く、教室では同菌の検出率は 25~50%<sup>1,2)</sup> (膿汁: 日本大学板橋病院第三外科 1987 年~1997 年) である。この感染症の特徴は、重症感染症として発症する症例が多く、しかも、そのほとんどが複数菌感染例である<sup>2)</sup>。このため、治療においては嫌気性グラム陰性桿菌のみならず、他菌種を含めた考慮が必要となる。そこで、嫌気性グラム陰性桿菌のうちでもっとも検出率の高い *Bacteroides* spp. と、検出率が高く治療に難渋する *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3)</sup> を選択し、基礎的研究を行った。病巣に存在する *Bacteroides* spp. は性状や増殖に相違がみられることが予想されるので<sup>4-6)</sup>、各条件下で生存する *Bacteroides* spp. を用いて、*P. aeruginosa* が *Bacteroides* spp. の増殖におよぼす影響について検討した。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

日本大学板橋病院第三外科に入院中の感染症患者から

分離された *Bacteroides* spp. 14 菌株 (No.1~No.14) と *P. aeruginosa* 1 菌株を実験に使用した。これらの菌株は臨床材料から分離された後、20% スキムミルクを保護剤として -80°C で保存された。

## 2. 使用培地

*Bacteroides* spp. の増菌用には GAM agar (ニッスイ), GAM broth (ニッスイ) を使用した。選択培地として *Bacteroides* spp. の発育用に *Bacteroides* agar (ニッスイ), *P. aeruginosa* の発育用に DHL agar (ニッスイ) を使用した。

## 3. 生菌数の測定

菌液を GAM broth で 10 倍ずつ希釈し、各希釈液を選択培地に 10 µl 塗布、生菌数 (CFU: colony forming unit) を測定した。

4. *Bacteroides* spp. 菌液の作製

## 菌液 A

a. 保存菌株 (No.1~No.14) を GAM agar に画線

塗抹, 37.0°C で 30 時間嫌気培養 [アネロメイトー J (ニッスイ)] 後, 1 colony を釣菌し, 500  $\mu$ l の GAM broth に溶解, これを cefmetazole (CMZ) 6.25  $\mu$ g/ml 加 GAM broth で  $10^{-7}$  倍に希釈し, *Bacteroides* spp. 約 100 CFU/ml の菌液 5 ml (CMZ 6.25  $\mu$ g/ml) を作製した。

b. 嫌気条件 (炭酸ガス 100%) 下 37.5°C で 30 時間振盪培養後, 24 時間室温に放置。生菌数が  $10^6$  CFU/ml 以上であることを確認し, 2°C で 5 日間保存した。

#### 菌液 B

a. *Bacteroides fragilis* (No.4) の保存菌株を GAM agar に画線塗抹, 37.0°C で 30 時間嫌気培養 [アネロメイトー J (ニッスイ)] 後, 1 colony を釣菌し, これを GAM broth 5 ml に接種した。

b. 嫌気条件 (炭酸ガス 100%) 下 37.5°C で 30 時間振盪培養し, 培養液を pH 5.5~6.0 に調節し, 2°C で 7 日間保存した。菌液の生菌数を測定し, *B. fragilis* 100 CFU/ml の GAM broth 5 ml を作製した。

c. これを嫌気条件下で 48 時間振盪培養し, 培養液を pH 5.5~6.0 に調節して, 2°C で 10 日間保存した。生菌数を測定し, *B. fragilis* 100 CFU/ml の GAM broth 5 ml を作製した。

d. c を 2 回繰り返した。

#### 継代培養

菌液 A または B から 0.5 ml を採取, これを GAM broth 4.5 ml に混和し, 嫌気条件下 37.5°C で 30~48 時間振盪培養した (継代培養)。菌液 A または B を第 1 世代, 継代培養した菌株を第 2 世代, これを継代培養した菌株を第 3 世代, さらに継代培養して作製された菌株を第 4 世代とした。

#### 5. *P. aeruginosa* 菌液の作製

保存菌株を DHL agar に画線塗抹し, 37.0°C で 24 時間好気培養後, 1 colony を釣菌し, これを 10 ml の GAM broth に接種, 好気条件下 37.5°C で 24 時間振盪培養した。

#### 6. *Bacteroides* spp. の増殖曲線の作成

##### a. *Bacteroides* spp. 単独培養

各世代の菌株を 100 CFU/ml になるように GAM broth 5 ml に接種した。ただし, 使用する各世代菌液の菌数が 100 CFU/ml 以下の場合は 4 ml の GAM broth に 1 ml の菌液を加えた。嫌気条件下 37.5°C で振盪培養し, 経時的に 300  $\mu$ l の菌液を採取, 生菌数を測定した。縦軸に菌数 (単位 log CFU/ml), 横軸に培養時間をプロットして増殖曲線を作成した。

##### b. *Bacteroides* spp. と *P. aeruginosa* の混合培養

各世代の菌株 100 CFU/ml, *P. aeruginosa*  $10^6$  CFU/ml の GAM broth 5 ml を作製し, 嫌気条件下 37.5°C で振盪培養し, 経時的に 300  $\mu$ l の菌液を採取, *Bacteroides* spp. 用に *Bacteroides* agar, *P. aeruginosa* 用に DHL agar を用いて生菌数を測定した。縦軸に *Bacteroi-*

*des* spp. の菌数 (単位 log CFU/ml), 横軸に培養時間をプロットして増殖曲線を作成した。

#### 7. 菌の形態変化

No.5 (*B. fragilis*) の形態変化を観察するために, a~d の菌液を作製してグラム染色した後, 光学顕微鏡で鏡顕した。

a. 正常発育菌株: *Bacteroides* spp. 保存菌株を *Bacteroides* agar に画線塗抹し, 37.0°C で 30 時間嫌気培養後, 1 colony を釣菌し, 5 ml の GAM broth に接種, これを嫌気条件下 37.5°C で振盪培養した。

b. 第 1 世代 (菌液 A): sub MIC 下の菌形態とした。

c. 第 2 世代: 第 1 世代 (菌液 A) の菌株 100 CFU/ml の GAM broth 5 ml を作製し, 37.5°C で 48 時間嫌気培養した。

d. 第 3 世代: 第 2 世代の菌株 100 CFU/ml の GAM broth 5 ml を作製し, 37.5°C で 48 時間嫌気培養した。

## II. 結 果

1. 菌液 A 中の第 1 世代株の生菌数 (Table 1) と, その増殖曲線 (Fig. 1)

*Bacteroides* spp. (No.1~No.14) の内訳は *B. fragilis* が 9 株, *Bacteroides thetaiotaomicron* が 2 株, *Bacteroides caccae* が 2 株, *Bacteroides eggerthii* が 1 株である。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌は 14 株中 12 株である (ニトロセフィン法)。生菌数では No.1 が  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml, No.3 が  $3.2 \times 10^6$  CFU/ml, No.5 が  $9.0 \times 10^6$  CFU/ml, No.8 が  $4.0 \times 10^6$  CFU/ml, No.9 が  $2.2 \times 10^6$  CFU/ml であった。他の菌株の生菌数はすべて  $10^2$  CFU/ml 以下であった。

No.1~No.14 の *Bacteroides* spp. の増殖曲線を見ると, 増殖の抑制された株は No.3, 5, 8, 9 の 4 株で, このうち No.3 がもっとも増殖が抑制され, 培養開始 30 時間後から増菌がなく, 48 時間後の生菌数は  $2.6 \times 10^6$

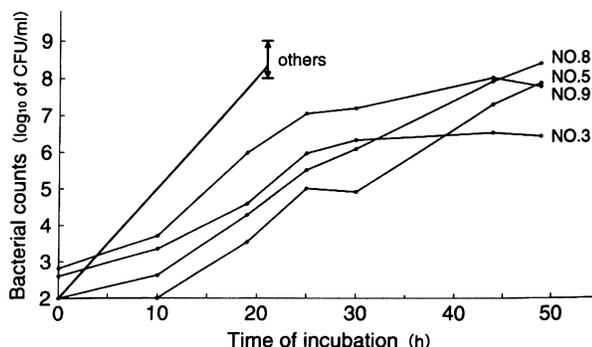


Fig. 1. Growth curve of *Bacteroides* species prepared by 6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole.

Four strains (No.3 *B. caccae*, No.5 *B. fragilis*, No.8 *B. eggerthii*, No.9 *B. caccae*) of 14 *Bacteroides* species became slow growing bacteria by sub MIC. Ten strains of 14 strains of *Bacteroides* species grew rapidly at 37.5°C in GAM broth in an anaerobic environment.

CFU/ml であった。その他の菌株はすべて 20 時間後に  $10^8$  CFU/ml 以上となった。

2. 菌液 A の第 2 世代株の増殖曲線 (Figs. 2~5 の細実線)

菌液 A の No.3 (*B. caccae*), No.5 (*B. fragilis*), No.8 (*B. eggerthii*), No.9 (*B. caccae*) を継代培養して作製した第 2 世代を培養すると第 1 世代 (Fig. 2~5; 太実

Table 1. 14 strains of *Bacteroides* species isolated from pus

No.	Organism	Number after 5 days* (CFU/ml)	$\beta$ -lactamase
1	<i>B. fragilis</i>	$1.0 \times 10^4$	+
2	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	+
3	<i>B. caccae</i>	$3.2 \times 10^8$	+
4	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	-
5	<i>B. fragilis</i>	$9.0 \times 10^3$	+
6	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	+
7	<i>B. fragilis</i>	$1.0 \times 10^4$	+
8	<i>B. eggerthii</i>	$4.0 \times 10^8$	+
9	<i>B. caccae</i>	$2.2 \times 10^8$	+
10	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	+
11	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	+
12	<i>B. fragilis</i>	$< 10^2$	+
13	<i>B. thetaiotaomicron</i>	$< 10^2$	+
14	<i>B. thetaiotaomicron</i>	$< 10^2$	+

\**Bacteroides* species which grew up to  $10^9$  CFU/ml by anaerobic culture in GAM broth including 6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole at 15–20°C for 24 hours. They were then stored at 2°C for 5 days in the same broth.

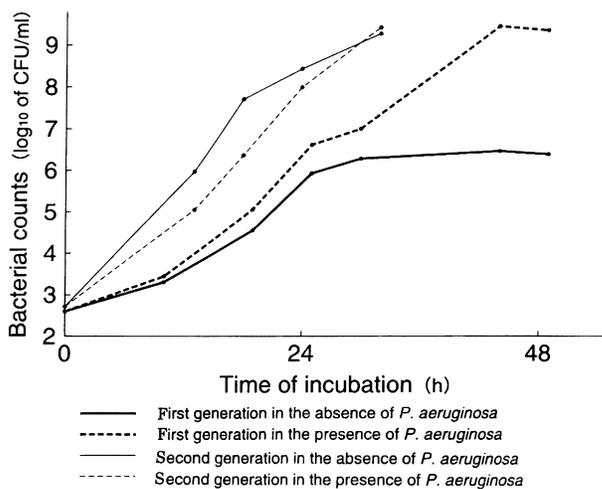


Fig. 2. Growth curve of No.3 *Bacteroides caccae* prepared by 6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole in the absence or presence of *Pseudomonas aeruginosa*.

*B. caccae* prepared by sub MIC (6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole) was named as the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation. The first generation and the second generation were then cultured anaerobically at 37.5°C in GAM broth in the absence of *P. aeruginosa* or in the presence of *P. aeruginosa*.

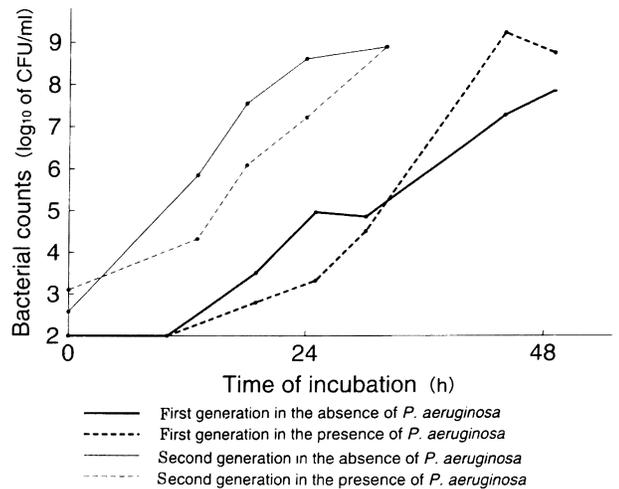


Fig. 3. Growth curve of No.5 *Bacteroides fragilis* prepared by 6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole in the absence or presence of *Pseudomonas aeruginosa*.

*B. fragilis* prepared by sub MIC (6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole) was named as the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation. The first generation and the second generation were then cultured anaerobically at 37.5°C in GAM broth in the absence of *P. aeruginosa* or in the presence of *P. aeruginosa*.

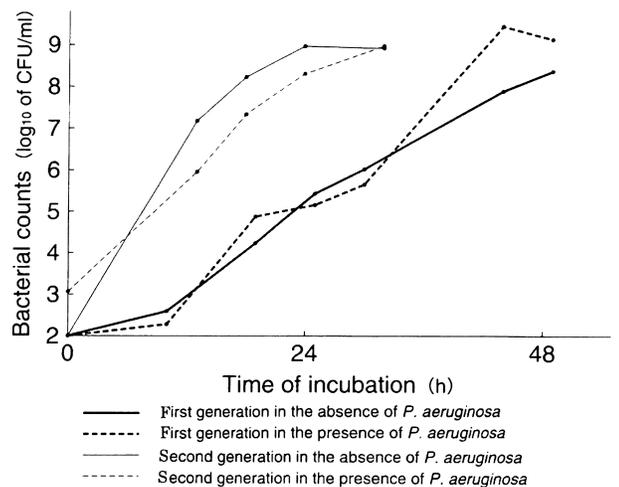


Fig. 4. Growth curve of No.8 *Bacteroides eggerthii* prepared by 6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole in the absence or presence of *Pseudomonas aeruginosa*.

*B. eggerthii* prepared by sub MIC (6.25  $\mu$ g/ml cefmetazole) was named as the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation. The first generation and the second generation were then cultured anaerobically at 37.5°C in GAM broth in the absence of *P. aeruginosa* or in the presence of *P. aeruginosa*.

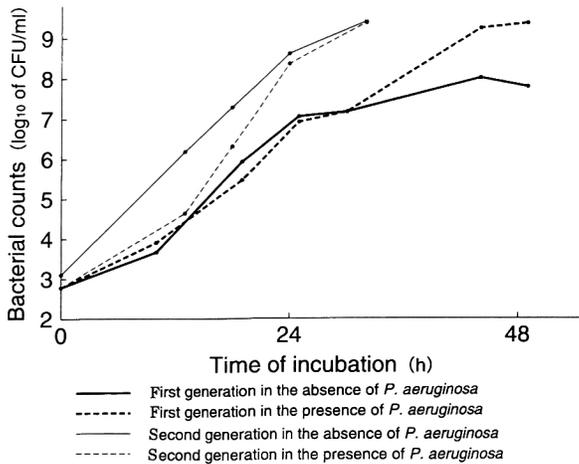


Fig. 5. Growth curve of No.9 *Bacteroides caccae* prepared by 6.25  $\mu\text{g/ml}$  cefmetazole in the absence or presence of *Pseudomonas aeruginosa*.

*B. caccae* prepared by sub MIC (6.25  $\mu\text{g/ml}$  cefmetazole) was named as the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation. The first generation and the second generation were then cultured anaerobically at 37.5  $^{\circ}\text{C}$  in GAM broth in the absence of *P. aeruginosa* or in the presence of *P. aeruginosa*.

線)に比較して増殖が著しく良好で, 4株とも培養開始30時間後に菌数は $10^9\text{CFU/ml}$ または, それ以上に達した。

3. 菌液A第1世代株または第2世代株と, *P. aeruginosa*との混合培養における *Bacteroides* spp. の増殖曲線 (Figs. 2~5の点線)

No.3, 5, 8, 9の第1世代(菌液A)と, これを継代培養した第2世代を用いて, *P. aeruginosa* ( $10^6\text{CFU/ml}$ )との混合培養を行った。第2世代に *P. aeruginosa*を混合した場合(細点線)は, 同株単独培養(細実線)に比較すると増殖期に軽度の増殖抑制がみられた(菌数の相違は $1/10\sim 1/100$ )が, 30時間後には菌数は $10^9\text{CFU/ml}$ となった。第1世代に *P. aeruginosa*を混合した場合(太点線), 培養開始30時間以後では同株単独培養(太実線)に比較すると増殖勾配は急で, 44時間後には $10^9\text{CFU/ml}$ に達した。

なお, *P. aeruginosa*の菌数は各時間とも $10^6\sim 10^7\text{CFU/ml}$ の値であった。

4. No.5 (*B. fragilis*)の形態変化(多様性)(Fig. 6)

a. 正常発育形態では, ほとんどの増殖株が桿状の細長い形態をしていた。

b. 第1世代(菌液A)では, 多くの増殖株がフィ

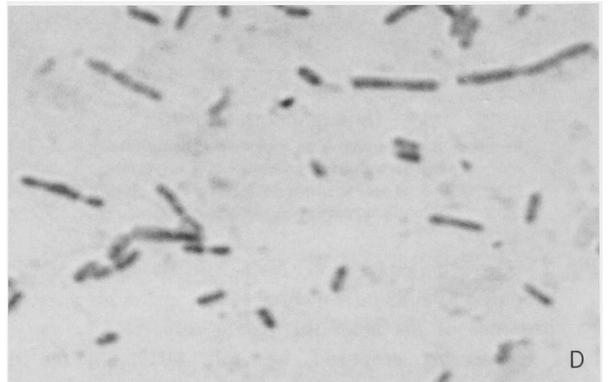
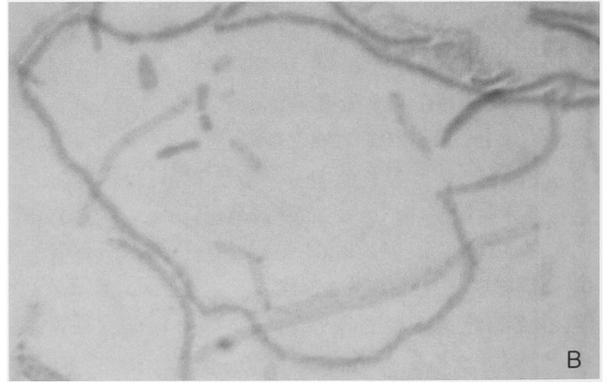
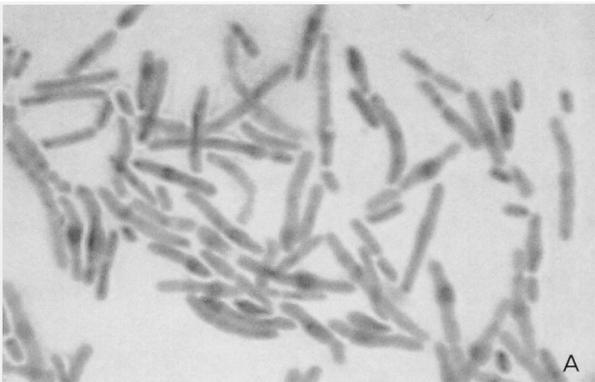


Fig. 6. Photomicrograph showing the morphological changes of No.5 *Bacteroides fragilis* ( $\times 500$ ).

A. Rapid growing *B. fragilis*

B. First generation: Most *B. fragilis* cells prepared by 6.25  $\mu\text{g/ml}$  cefmetazole showed formation of long filaments.

C. Second generation: The form is small.

D. Third generation: The extent of growth was almost recovered, but their form is still small and not long.

ラメント化し、溶菌した菌体も多数認められた。死菌と生菌の数の比は約 1,000:1 であった (表 1: 生菌数  $9.0 \times 10^5$  CFU/ml)。

c. 第 2 世代は、大小種々の大きさの菌が散在し、小さいものは球形に近かった。

d. 第 3 世代は、a に比べて大小種々の大きさの菌が散在し、c に類似していた。

5. 菌液 B 第 1 世代株およびその継代培養株 (第 2~4 世代) の増殖曲線 (Fig. 7)

高度増殖抑制株 (菌液 B) である第 1 世代と、これを継代培養した第 2~4 世代を用いて増殖曲線を描いた。第 1 世代は培養開始 10 時間をピークに菌数は減少し ( $1.1 \times 10^4$  CFU/ml), 29 時間後では  $3.2 \times 10^3$  CFU/ml となった。第 2 世代は培養開始 10 時間まで増殖曲線は一定の勾配をもって、菌数増加を示した ( $1.2 \times 10^2$  CFU/ml  $\rightarrow$   $1.3 \times 10^4$  CFU/ml)。その後 8 時間はまったく増加がなく、その後も不安定な曲線を描いた。第 2 世代を継代培養した第 3 世代では増殖が安定して、培養開始 29 時間後には生菌数は  $7.0 \times 10^7$  CFU/ml に達したが、第 4 世代に比較すると、増殖の速度は明らかに遅かった。

6. 菌液 B 第 1 世代株または第 2 世代株と、*P. aeruginosa* との混合培養における *B. fragilis* の増殖曲線 (Fig. 8 の点線)

*B. fragilis* の第 1 世代 (菌液 B) およびその第 2 世代

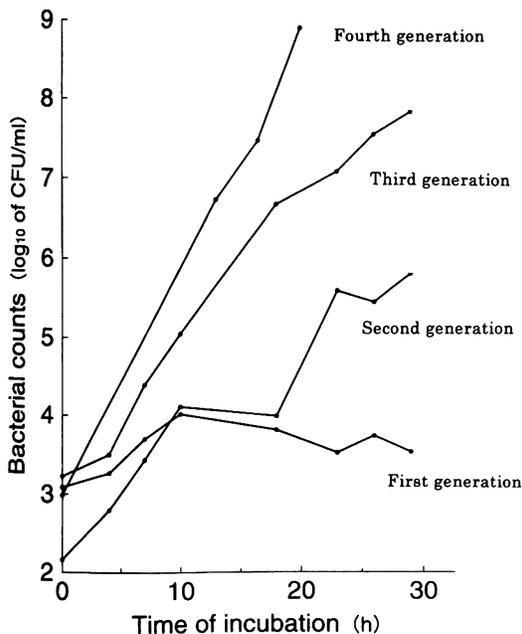


Fig. 7. Growth curve of *Bacteroides fragilis* prepared by limiting nutrition.

*B. fragilis* strain prepared by limiting nutrition was called the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation, and likewise for the third and fourth generations.

の単独培養 (Fig. 8 の実線) では培養開始 10 時間後の菌数が  $10^4$  CFU/ml であった。これに対して、 $10^6$  CFU/ml の濃度の *P. aeruginosa* を加えて混合培養すると (Fig. 8 の点線), 培養開始 10 時間までは単独培養の場合と同一の増殖軌線を描いたが、それ以後は単独培養の時と異なり *B. fragilis* の増殖は抑制されることなく増殖し、29 時間で  $10^9$  CFU/ml となった。

### III. 考 察

腹腔内感染症において検出される嫌気性菌のうち、*Bacteroides* spp. の検出率は高く、(1) 抗菌活性を低下させる<sup>7)</sup>、(2) 膿瘍を形成させる、(3) 種々の病原性<sup>8,9)</sup> を有する、などのために治療の上で十分に考慮しなければならない主な治療対象菌種である。*Bacteroides* spp. の検出率が高い理由として、下部腸管の常在菌叢の優勢菌であることがあげられる。しかし、これだけの理由ではない。なぜならば、下部腸管の常在菌叢の優勢菌として、他に *Bifidobacterium* spp. や *Eubacterium* spp. などがあるが腹腔内の感染巣からの検出率は *Bacteroides* spp. より低い。この理由として、*Bacteroides* spp. の、①病原性や組織親和性、②他菌種との共生<sup>10)</sup>、などが考えられる。そこで、今回、②について検討するために、感染巣からの検出率の高い *P. aeruginosa* を混合し、*Bacteroides* spp. の増殖への影響を *in vitro* で調べた。*Bacteroides* spp. のうち、検出率が高い *Bacteroides fragilis* を中心に臨床検体から分離された 14 株を用いた。

*Bacteroides* spp. は Fig. 6 にみるように環境によって種々の形態をとり、また、同一条件で増殖した場合で

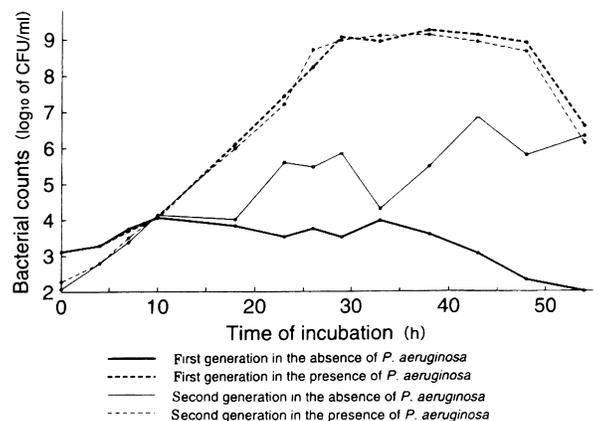


Fig. 8. Growth curve of No.4 *Bacteroides fragilis* prepared by limiting nutrition in the absence or presence of *P. aeruginosa*.

*B. fragilis* prepared by limiting nutrition was named as the first generation. Nutrient culture of the first generation provided the second generation. The first generation and the second generation were then cultured anaerobically at  $37.5^\circ\text{C}$  in GAM broth in the absence of *P. aeruginosa* or in the presence of *P. aeruginosa*.

も1個1個の菌形態もさまざまである。これが *Bacteroides* spp. の特徴 (特に後者) であるが、大腸内で変化する環境の中で増殖・生存が可能で、常に常在菌叢内で優勢に一定の菌数を保つ理由の1つと考えている。環境によって形態を変化させる現象は他菌種でもみられることが知られている。*Helicobacter pylori* では低温、栄養素の欠乏、酸素の欠乏、抗菌薬の存在などにより球状体 (コッコイド) になる<sup>11</sup>。自然界 (体外) に存在している時はこの形態をしている。*Escherichia coli* などでも球状体形成がみられる。このような状態にある細菌では増殖が抑制され、そして自己に不利な環境でも生存している<sup>11-13</sup>。本実験でも sub MIC 下で抵抗性を示し長期間生存している菌株は増殖抑制が強いという結果が出ている。このような細菌の形態、性状の変化は過酷な環境に対応して生存する手段かもしれない。

*Bacteroides* spp. は腸管内では通常、栄養や環境などに障害がなく十分な増殖がされているものと考えられるが、なんらかの原因で遊離腹腔内に遊出されるとまったく異なる環境で増殖 (感染) することになる。この環境とは生体防御、抗菌薬、栄養障害、酸素の存在などである。このような環境 (以下、ストレス状態と言う) で、前述のごとく菌形態に変化を起こすことになる。ストレス状態では *Bacteroides* spp. は徐々に死滅していくが、生き残ったものは菌形態変化とともに増殖能力が低下している<sup>4-6, 14</sup>。したがって、腹腔内感染巣では増殖抑制株が遺残または出現する可能性が高い。そこで、腹腔内感染症において、より *in vivo* に近い状態を研究する目的で、*Bacteroides* spp. 増殖抑制株を作製し、これに *P. aeruginosa* を混合培養した場合の *Bacteroides* spp. の増殖の様子を検討した。

*Bacteroides* spp. 増殖抑制株は増殖速度が不安定で、高度抑制株においては一定の濃度に達すると抑制が発現した。CMZ 処理をした場合、postantibiotic effect (PAE) によって増殖抑制されたか、*Bacteroides* spp. の増殖抑制株が選択されたか、*Bacteroides* spp. のなんらかの増殖抑制因子が発現したかは不明である。しかし、今回の実験で「①抗菌薬処理を行わなくても高度増殖抑制株が得られたこと。しかも、この増殖抑制株の培養中、突然に増殖抑制が発現し正常な増殖ができなくなったこと。②CMZ 処理で生存菌数が多かった *Bacteroides* spp. はほとんど増殖抑制がみられ、菌数が激減した *Bacteroides* spp. には増殖抑制株がみられなかったこと。」から PAE 効果よりも、何らかの増殖抑制因子が発現または同因子を有する菌株が選択された可能性が高い。*E. coli* のストレス抵抗性のある球状体形成は *rpoS* 遺伝子が関与している。また、*H. pylori* や淋菌など環境変化のための性状変化も遺伝子が関与している<sup>15</sup>。*Bacteroides* spp. において増殖抑制株を継代培養した場合、この性状が受け継がれていくことから遺伝子変化によって増殖抑制が発

現した可能性が高い。詳細な原因説明は今後の検討課題である。この増殖抑制株と *P. aeruginosa* を混合すると (嫌気条件下のために *P. aeruginosa* は増殖しない)、*Bacteroides* spp. は増殖初期では増殖速度が遅い場合もみられたが、その後は対数またはそれに近い速さで増殖して、最終濃度は  $10^8$  CFU/ml に達した。*P. aeruginosa* は、この実験で作製された *Bacteroides* spp. 増殖抑制株5株の増殖抑制の発現を制御したことになる (Figs. 2~5, 8)。Fig. 8 では *B. fragilis* の増殖抑制程度の異なる2タイプにおいて *P. aeruginosa* を混合すると *B. fragilis* の増殖曲線はまったく同一の軌線を描いた。*P. aeruginosa* が *Bacteroides* spp. 増殖抑制を制御する機序として、① *P. aeruginosa* の産生する蛋白質などが *Bacteroides* spp. に直接作用するのか、②代謝物質などが間接的に作用するのか (*Bacteroides* spp. が増殖するのに必要なものを産生するか、増殖する環境を調整するのか) は不明であるが、増殖抑制を制御していることは確かである。一方、*Bacteroides* spp. の増殖そのものに対しては *P. aeruginosa* の存在は軽度の障害になっていると思われる。Figs. 2~5 の継代培養株 (細線) の増殖期では *P. aeruginosa* が混合することにより増殖速度が遅くなっている。*P. aeruginosa* は biofilm を形成する<sup>16</sup>。これは菌周辺に alginate を産生し、個々の菌体が集合している状態である。今回の研究において *P. aeruginosa* は酸素が無く、増殖できない環境にあって alginate を産生している可能性もある。実際に *P. aeruginosa* と *Bacteroides* spp. の混合培養液をグラム染色し、鏡顕すると各菌が集合し、colony を形成しているのが確認された。このような環境で軽度の *Bacteroides* spp. の増殖障害がみられているが、明確な原因は定かでない。

以上述べたように、① *Bacteroides* spp. の増殖抑制株は増殖が不安定であること、② *P. aeruginosa* は増殖抑制発現の制御および増殖抑制などの相反した作用を有すること、などから *Bacteroides* spp. は種々の増殖曲線を描くことになる。この曲線は *Bacteroides* spp. の増殖抑制程度によってまったく異なるため、増殖抑制程度別に分けて、本研究で確認された4タイプの *Bacteroides* spp. の増殖曲線を提示する (Fig. 9)。a タイプから徐々に増殖抑制の程度が強くなり、d タイプがもっとも高度に抑制されている。

a タイプ; 増殖抑制株は単独培養において最終の最高濃度が  $10^8$  CFU/ml 近くまで増殖する。*P. aeruginosa* 混合時の増殖期では *P. aeruginosa* の増殖抑制作用により増殖抑制株単独培養の方が菌数が多い (Fig. 2~5 の細線)。

b タイプ; 最終の最高濃度が  $10^8$  CFU/ml に達せずに増殖が停止する増殖抑制株であるが、増殖期の一時期では a タイプと同様に抑制株単独培養の方が菌数が多い

(Fig. 3 の太線)。

c タイプ; *Bacteroides* spp. の増殖の抑制発現が強くなるため、単独培養では混合培養時の菌数より常に少ない値を示す (Fig. 2 の太線)。Fig. 4 と Fig. 5 の太線は b タイプと c タイプの中間型である。

d タイプ; c タイプよりさらに増殖の抑制発現が強くなる

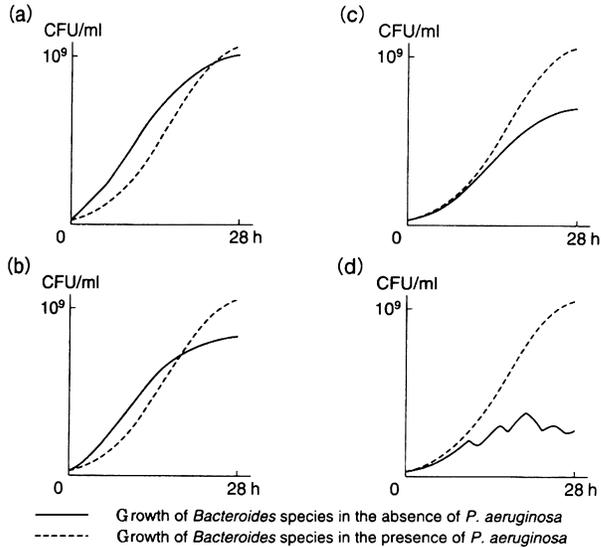


Fig. 9. Growth curve of *Bacteroides* species.

なるため、増殖が非常に不安定となる。これに *P. aeruginosa* が混合すると増殖が安定し、増殖曲線がなだらかなカーブを描く (Fig. 8)。

腹腔内に遊出された *Bacteroides* spp. による感染症のほとんどが *P. aeruginosa* を含む好気性菌との複数菌感染症<sup>2)</sup>であるが、以上の成績は、*Bacteroides* spp. 感染症において、*P. aeruginosa* の菌量を減少させることは治療上 (*Bacteroides* spp. の菌量を減少させる上で) 効果的であることを意味している。

近年、*P. aeruginosa* は術後感染症の起炎菌として増加傾向にある<sup>1)</sup>。特に、重症腹腔内感染症では *P. aeruginosa* が出現してくる頻度が高く、術中の腹水から検出され (Table 2) 術直後より菌量が急激に増加していく症例をしばしば経験する。急性虫垂炎などでは重症化するほど術中腹水からの *P. aeruginosa* の検出率は高くなる<sup>17)</sup>。また、軽症の急性虫垂炎でも術中腹水から同菌は 20~30% 程度検出される。これらのことから、*P. aeruginosa* は下部腸管内では増殖できないものの、存在 (通過) しているものと推測される。そして、腹腔内に遊出、または壊死腸管の存在などによって酸素が供給され増殖していくのであろう。生体内では他の因子などいろいろな条件が複雑に関与するために、単純に結論づけることは危険であるが、以上のことを総合的に判断すると、重症 *Bacteroides* 感染症では *P. aeruginosa* の

Table 2. Organisms isolated with *Pseudomonas aeruginosa* in purulent fluid from the operative site

		Aerobes	Anaerobes	
Perforative appendicitis 74 y, M (12 h)	<i>P. aeruginosa</i>	few	anaerobic gram-negative rod	2+
	<i>E. coli</i>	+	anaerobic gram-positive cocci	2+
	<i>Streptococcus</i> spp.	+		
Perforative appendicitis 79 y, F (18 h)	<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>B. fragilis</i>	+
	<i>E. coli</i>	+	anaerobic gram-positive rod	+
Perforative appendicitis 67 y, F (24 h)	<i>P. aeruginosa</i>	very few	<i>B. fragilis</i> group	+
	<i>E. coli</i>	very few	<i>B. melaninogenicus</i> group	very few
	<i>Streptococcus</i> spp.	very few	anaerobic gram-negative rod	3+
	<i>Bacillus</i> spp.	very few	anaerobic gram-positive cocci	3+
Perforative appendicitis 33 y, M (72 h)	<i>P. aeruginosa</i>	3+	<i>B. fragilis</i>	3+
			<i>B. melaninogenicus</i>	3+
			anaerobic gram-negative rod	3+
			anaerobic gram-positive rod	3+
Perforation of descending colon 64 y, F (10 h)	<i>P. aeruginosa</i>	3+	<i>Bacteroides</i> spp.	3+
	<i>E. coli</i>	3+		
	<i>E. faecalis</i>	3+		
Perforation of descending colon 77 y, M (unknown)	<i>S. marcescens</i>	3+		
	<i>E. cloacae</i>	2+		
	<i>E. faecalis</i>	3+		
	<i>E. faecium</i>	2+		
	<i>P. aeruginosa</i>	2+		
	<i>T. glabrata</i>	2+		

Note; very few: <math>10^3</math> CFU/ml  
 few:  $10^3$  CFU/ml  
 +:  $1 \cdot 10^4 \sim 10^6$  CFU/ml  
 ++:  $2 \cdot 10^6 \sim 10^7$  CFU/ml  
 +++:  $> 10^7$  CFU/ml

( ): time between operation and onset

菌量を減少させることは重要な概念(治療理論)の1つと言える。

今後、*Bacteroides* spp. の増殖が抑制される機序の解明と、これに対して *P. aeruginosa* がどのように作用するかを検討する予定である。また、*P. aeruginosa* 以外の菌種の影響も調べる必要があると考えている。

本論文の要旨は、下記で発表した。

第47回日本感染症学会東日本地方会総会、第45回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会シンポジウム(嫌気性菌感染症)、東京、平成10年11月27日。

第11回日本外科感染症研究会イブニングシンポジウム(外科感染症治療薬の選択理論とその実際)、名古屋、平成10年12月10日。

#### 文 献

- 1) 加藤高明, 佐藤 毅, 岩井重富, 他: 過去10年間におけるMRSAの検出状況。日本外科感染症研究第10巻(日本外科感染症研究会編), p 98~102, サイエンス・パブリケーションズ, 東京, 1998
- 2) 加藤高明: 腹腔内感染症。臨床検査増刊号42(11): 1353~1368, 1998
- 3) 加藤高明: 消化器外科領域における腹腔内感染症。日本醫事新報3894: 1~6, 1998
- 4) Eudy W W, Burrous S E: Generation times of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* in experimental infections. *Chemotherapy* 19: 161~170, 1973
- 5) Maw J, Meynell G G: The true division and death rates of *Salmonella typhimurium* in the mouse spleen determined with superinfecting phage. *Br. J. Exp. Pathol.* 49: 597~613, 1968
- 6) Meynell G G: Use of superinfecting phage for estimating the division rate of lysogenic bacteria in infected animals. *J. Gen. Microbiol.* 21: 421~437,

1959

- 7) 西川 享: *Bacteroides fragilis* 感染に関する実験的研究; 特に $\beta$ -lactamase高度産生株による抗菌剤の抗菌活性に及ぼす影響について。日大医誌48: 609~618, 1989
- 8) 稲松孝思: 消化器感染症—肝・胆道感染症を中心に—。臨床と微生物19: 43~47, 1992
- 9) 上野一恵, 渡辺邦友: バクテロイデス・フラジリス。化学療法の領域6: 1915~1925, 1990
- 10) Beena V K, Kumai N, Shivananda P G: Inhibition of phagocytosis of *E. coli* by *B. fragilis* group—an in vitro study. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 40: 373~376, 1997
- 11) 白井睦訓: *Helicobacter pylori* の病原性。現代医療30: 67~76, 1998
- 12) Onderdonk A B, Cisneros R L, Finberg R, et al: Animal model system for studying virulence of and host response to *Bacteroides fragilis*. *Rev. Infect. Dis.* 12: S 169~177, 1990
- 13) Cozens R M, Tuomanen E, Tosch W, et al: Evaluation of the bactericidal activity of  $\beta$ -lactam antibiotics on slowly growing bacteria cultured in the chemostat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 797~802, 1986
- 14) Eng R H K, Padberg F T, Smith S M, et al: Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemotherapy* 35: 1824~1828, 1991
- 15) Tom J F, White O, Kerlavage A R, et al: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539~547, 1997
- 16) 小林宏行: 細菌 biofilm に関する基礎的ならびに臨床的研究。Chemotherapy 45: 977~985, 1997
- 17) 岩井重富, 西川 享, 石崎かおり: 術後感染予防の化学療法, 虫垂切除術。化学療法の領域6: 2571~2580, 1990

An *in vitro* study of mixed culture with slowly growing *Bacteroides* species and  
*Pseudomonas aeruginosa*

Koumei Kato<sup>1)</sup>, Yoshiteru Nakagawa<sup>1)</sup>, Takeshi Sato<sup>1)</sup>, Hisashi Huruhashi<sup>1)</sup>,  
Kojirou Okumura<sup>1)</sup>, Kazuhide Otsuka<sup>1)</sup>, Runa Kato<sup>1)</sup>, Yumiko Ito<sup>1)</sup>,  
Shigetomi Iwai<sup>1)</sup> and Michiko Yagoshi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>The Third Department of Surgery, Nihon University School of Medicine, 30-1 Kamimachi, Oyama,  
Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

<sup>2)</sup>Division of Clinical Laboratory, Nihon University School of Medicine, Itabashi Hospital

The growth of *Bacteroides* species in the environment of mixed infection was studied. The growth of *Bacteroides* species in a nutritionally limited *in vivo* environment with antibiotics is different from that under optimum conditions in the laboratory. In an attempt to mimic possible *in vivo* conditions, slow growing *Bacteroides* species were produced by limiting nutrition or in a sub-mic antibiotic (6.25 µg/ml cefmetazole) environment. Clinical strains of *Bacteroides* species were used, and five strains of *Bacteroides* species (*Bacteroides fragilis* 2, *Bacteroides caccae* 2, *Bacteroides eggerthii* 1) were obtained; which grew slowly at 37.5°C in GAM broth under 100% CO<sub>2</sub>. About 100 colony forming units per ml (CFU/ml) *Bacteroides* species were cultured alone or in the presence of 10<sup>6</sup>CFU/ml *Pseudomonas aeruginosa* at 37.5°C in GAM broth in an anaerobic environment. The numbers of viable cells were counted at various times of incubation. One slowly growing *B. fragilis* strain prepared by the limiting nutrition showed optimal growth without dormant or slow growing states in the presence of *P. aeruginosa*, and the number of viable cells after 30 hours was about 10<sup>9</sup>CFU/ml. Four *Bacteroides* strains prepared with cefmetazole exposure showed slow growth in the absence of *P. aeruginosa*. On the otherhand, they showed optimal growth in the presence of *P. aeruginosa*. All slow growing strains in this study almost recovered their optimal growth in the presence of *P. aeruginosa*. Therefore, the choice of antimicrobial agents should include at least agents with activity against both *Bacteroides* species and *P. aeruginosa* in treatment of polymicrobial aerobic/anaerobic bacterial infections.