— 原 著 —

胆汁酸および抗生物質関与下におけるエルトール型 コレラ菌と大腸菌の動態

青木 正明

日本医科大学衛生学・公衆衛生学教室 (主任: 乗木秀夫教授)
指導: 柚木 斉教授)

Growth responses of *Vibrio cholerae* biotype eltor and *Escherichia coli*
under the presence of bile acid and antibiotics

Masaaki Aoki

Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School

The present experiments were performed to investigate the influence of bile acid and antibiotics on the growth of *Vibrio cholerae* biotype eltor and *Escherichia coli*.

One strain of *V. cholerae* and two strains of *E. coli* which were different in sensitivity to antibiotics, were tested in vitro separately and together under the presence of sodium desoxycholate (DC) and antibiotics. DC was used at a concentration similar to that in the human small intestine. Six antibiotics were separately added at minimum inhibitory concentration (MIC) against *V. cholerae*.

The results were as follows:

1) DC easily inhibited *V. cholerae*. When a large number of *E. coli* was added, the inhibition increased.

2) *E. coli* was a little inhibited by DC. But when a small number of *E. coli* was cultured with *V. cholerae*, *E. coli* was inhibited by the presence of *V. cholerae* regardless the presence of DC.

3) DC strongly enhanced the antibacterial activity of ampicillin (ABPC), cephalothin (CET) and amikacin sulfate (AMK) against *V. cholerae* with increasing DC concentration, but had little effect on tetracycline (TC). The influence of DC on polymyxin B (PLB) and colistin (CL) varied with DC concentrations.

4) DC slightly enhanced the antibacterial activity of ABPC, CET and AMK against the sensitive strain of *E. coli* with increasing DC concentration, but had little effect on TC, PLB and CL. DC had no influence on all six antibiotics against the resistant strain of *E. coli*.

5) In the mixed culture of *V. cholerae* and a large number of *E. coli*, the antibacterial activity of ABPC, CET, AMK, and PLB against *V. cholerae* decreased as compared with that in a single culture. But DC inhibited the decrease.

6) The resistance to ABPC and CET transferred from resistant strain of *E. coli* to *V. cholerae*. DC inhibited the transfer of resistance to ABPC with increasing DC concentration, and completely inhibited that of resistance to CET, regardless of DC concentration.

Key words: *Vibrio cholerae* biotype eltor, *Escherichia coli*, sodium desoxycholate, antibiotics, transfer of resistance

緒 言

外来伝染病としてのコレラは、最近わが国において、
Present address: Department of Hygiene and Public
Health, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-
ku, Tokyo, 113 Japan

海外渡航者あるいは輸入食品を原因としての発生が散
発的にみられるようになった¹⁾。さらには、原因菌と
しての O1 *Vibrio cholerae* が河口水あるいはその上
流から検出され、その発生源は簡易浄化槽と推定され
た²⁾。血清学的性状が異なるだけの non-O1 *Vibrio*

cholerae にいたっては、今日では全国の河川から検出されており、わが国での常在化を裏付ける結果が得られている⁸⁾。

現在、世界的に流行しているエルトルコレラは、過去に流行したアジアコレラと異なり、軽症に経過するのが特徴である⁴⁾。発症率は 25% あるいはそれ以下とされ^{4,5)}、健康人の場合はほとんど胃液によって殺され、軽症または無症状のまま経過する。それに対して、低酸症・無酸症あるいは胃切除を受けたような、胃に障害を持つ者は罹患しやすく、胃液酸度の低下、すなわち生体側要因が発症に重要な役割を持つとされている⁶⁾。このように軽症あるいは無症状に経過する際、流行時の保菌者の存在も問題となる。

また、コレラの治療には輸液を第一とするが、排菌期間の短縮、治療期間の短縮には抗生物質が有効とされ、tetracycline-cloramphenicol などが現在輸液と併用されている⁷⁾。これに伴い耐性コレラ菌がみられるようになり、汚染地では耐性コレラ菌による流行例があった⁸⁾。

コレラ菌に関しては、分類学的研究^{9,10)}、コレラ菌毒素の性状の解明などの細菌学的研究^{11,12)}は急速に進展しているが、同門の木野の報告¹³⁾のようなコレラ菌の生態や生体側要因とコレラ菌の消長をとらえた研究は、まだ緒についたばかりで解明されない部分が多い。

同門では、わが国の常在伝染病の病原体である赤痢菌について、宿主-寄生体の観点から胆汁酸関与下での腸内常在菌との平衡の問題を取り上げ、混合培養法によってその要因解析を行ってきたが^{14,15)}、著者はコレラ菌と感受性大腸菌、あるいは耐性大腸菌の組み合わせによる混合培養実験を行い、腸内細菌の平衡を維持あるいは攪乱するものとしての胆汁酸および抗生物質を添加した場合のコレラ菌の動態について追求を試みた。

実験材料および方法

(1) 実験材料

1) 使用菌株

最近、東南アジア方面よりコレラ様症状をもって帰国した患者より分離した新鮮株で、都立衛生研究所より分与されたエルトル小川型コレラ菌（以下エルトル菌と略す）を用いた。大腸菌は、標準株 *E. coli* NIHJ-JC2（以下 EN 菌と略す）と、本教室で分離同定した臨床株で多剤耐性菌である *E. coli* No. 225（以下 E₂₂₅ 菌と略す）の 2 株を用いた。

2) 使用培地

増殖および培養用として、Mueller-Hinton broth (Difco) を用いた。

分離用として、BTB 培地（栄研）および TCBS 培地（栄研）を併用した。

感受性測定用として、感性ディスク用培地-N（ニッスイ）を用いた。

3) 使用胆汁酸

二次胆汁酸である Sodium desoxycholate (Difco)（以下 DC と略す）を用いた。

4) 使用抗生物質

抗生物質は ampicillin（以下 ABPC と略す）、cephalothin（以下 CET と略す）、amikacin sulfate（以下 AMK と略す）、tetracycline（以下 TC と略す）、polymyxin B（以下 PLB と略す）、colistin（以下 CL と略す）、cloramphenicol（以下 CM と略す、CM は最小発育阻止濃度測定 のみに用いた）を用いた。

(2) 実験方法

1) 感受性測定

本測定には、1974 年改訂された最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, 以下 MIC と略す) 測定法による寒天平板希釈法¹⁶⁾を用いた。

2) DC 発育性

37°C 18 時間培養したエルトル菌、EN 菌および E₂₂₅ 菌を 10⁶ cells/ml に調整し、DC 濃度が最終的に 0 (DC 無添加)、1, 3, 5, 7 および 9 mg/ml となるように添加した pH 7.4 の Mueller-Hinton broth 9 ml にそれぞれ単独に 1 ml 接種し、37°C 18 時間振盪培養して生菌数を測定し、各菌の DC に対する発育性を検討した。

3) DC 関与下での混合培養

i. 抗生物質無添加時

37°C 18 時間培養したエルトル菌、EN 菌および E₂₂₅ 菌を下記の組み合わせとなるように調整し、DC 濃度が最終的に 0, 1 および 2 mg/ml となるように添加した pH 7.4 の Mueller-Hinton broth 8 ml に 1 ml ずつ混合接種して 37°C 振盪培養し、接種後 1.5, 3, 6, 12 および 24 時間にて各生菌数を測定した。各菌の単独培養に関しても同様に実験を行った。

混合培養における接種菌量の組み合わせは次のとおりである。

エルトル菌 10⁶ cells/ml + 大腸菌 10⁸ cells/ml

エルトル菌 10⁶ cells/ml + 大腸菌 10⁶ cells/ml

エルトル菌 10^8 cells/ml + 大腸菌 10^7 cells/ml

ii. 抗生物質添加時

37°C 18 時間培養したエルトル菌, E_N 菌および E_{225} 菌を上記組み合わせとなるように調整し, DC 濃度が最終的に 0, 1 および 2 mg/ml となるように添加した pH 7.4 の Mueller-Hinton broth 7 ml に 1 ml ずつ混合接種し, 6 種類の抗生物質を単独にそれぞれの MIC 濃度 (CL については 200 μ g/ml を用いた) となるように滅菌精製水に溶解し, その 1 ml を加えて 37°C 振盪培養し同様に生菌数を測定した. 同時に各菌の単独培養に関しても同様に実験を行った.

4) 耐性伝達

37°C 18 時間培養したエルトル菌および E_{225} 菌を, 供与菌 (donor) 0.5 ml, 受容菌 (recipient) 4.5 ml として混合接種し, DC を 0, 1 および 2 mg/ml 添加して 37°C 24 時間培養した. 培養終了後, 滅菌精製水にて 10 倍段階希釈して生菌数を測定し, 各希釈段階の 0.1 ml ずつを, donor が E_{225} 菌で recipient がエルトル菌の場合, PLB 15 μ g/ml と ABPC 50 μ g/ml, TC 5 μ g/ml または CET 5 μ g/ml 加 BTB 培地に接種した. 37°C 24~48 時間培養後発生した集落数を数え, 釣菌し同一培地に再分離した後, 寒天平板希釈法にて感受性を測定した. また, donor がエルトル菌で recipient が E_{225} 菌の場合, BTB 培地に加える抗生物質を TC 5 μ g/ml と PLB 5 μ g/ml または CL 5 μ g/ml にして, 上記と同様の実験を行った.

成 績

1. 抗生物質感受性

エルトル菌は PLB および CL に対して感受性がきわめて低く, AMK に対する MIC は 12.5 μ g/ml とやや感受性が低く, ABPC, CET, TC および CM に対して感受性が高かった. E_N 菌はすべての抗生物質に対して感受性が高く, 特に PLB および CL に対して感受性がきわめて高かった. E_{225} 菌は, ABPC, TC および CM に対して感受性がきわめて低い. CET に対しても感受性が低く, その MIC は 50 μ g/ml であった. AMK に対する MIC は 1.56 μ g/ml で, PLB および CL に対する感受性がきわめて高かった (Table 1).

2. DC に対する発育態度

エルトル菌は DC 1 mg/ml 添加より 10^7 cells/ml に発育を抑制され, DC 9 mg/ml 添加にて 10^6 cells/ml

に発育をさらに抑制された. E_N 菌は, DC 7 mg/ml 添加より 10^7 cells/ml に発育を抑制された. E_{225} 菌は, いずれの DC 濃度においても 10^8 cells/ml に発育した (Table 2).

上記の結果から, 以下の実験における抗生物質および DC 濃度を設定した.

Table 1 MIC of antibiotics against Ch, E_N and E_{225} (μ g/ml)

Strain	ABPC	CET	AMK	CM	TC	CL	PLB
Ch	3.125	1.56	12.5	0.4	0.78	>200	100
E_N	3.125	3.125	1.56	3.125	1.56	0.4	0.4
E_{225}	>200	50	1.56	200	100	0.2	0.2

Ch: *V. cholerae* biotype eltor, E_N : *E. coli* NIHJ JC-2, E_{225} : *E. coli* No. 225, ABPC: ampicillin, CET: cephalothin, AMK: amikacin sulfate, CM: chloramphenicol, TC: tetracycline, CL: colistin, PLB: polymyxin B

Table 2 Effects of DC on the growth of Ch, E_N and E_{225}

Strain	Concentration of DC (mg/ml)					
	0	1	3	5	7	9
Ch	10^8	10^7	10^7	10^7	10^7	10^6
E_N	10^8	10^8	10^8	10^8	10^7	10^7
E_{225}	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8

DC: Sodium desoxycholate

Inoculum size 10^8 cells/ml

Incubation time 18 hours

Fig. 1 Effects of DC on the growth of Ch
Concentration of DC (mg/ml) —○— 0
···×··· 1
—△— 2
Inoculum size 10^8 cells/ml

Fig. 2 Effects of DC on the growth of *Ch* and *En* in mixed culture

Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{En } 10^5 \text{ cells/ml} \end{cases}$

3. DC 関与下での混合培養実験

(1) 抗生物質無添加時における生菌数の変動

単独培養の場合、エルトル菌は DC 添加に伴い 6 時間以後経時的に発育が抑制された (Fig. 1). それに対して *En* 菌および *E₂₂₅* 菌は, DC 添加により接種菌量が少ないとき増殖時間が遅れたが, 接種菌量が多いときは影響を受けなかった (Table 3). 混合培養においては, *En* 菌および *E₂₂₅* 菌の接種菌量が少ないときエルトル菌はほぼ単独培養時と同様の動きを示したが, *En* 菌および *E₂₂₅* 菌はいずれの DC 濃度においても単独培養時より発育を抑制された (Fig. 2, Table 4). 接種菌量が多くなると, エルトール菌は

Fig. 3 Effects of DC on the growth of *Ch* and *E₂₂₅* in mixed culture

Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{E}_{225} 10^7 \text{ cells/ml} \end{cases}$

添加 DC 濃度の上昇に伴い単独培養時より発育が抑制された. *En* 菌および *E₂₂₅* 菌はほぼ単独培養時と同様の動きを示した (Fig. 3, Table 4).

(2) 抗生物質添加時における生菌数の変動

1) ABPC 添加

単独培養において, エルトール菌は添加 DC 濃度の上昇に伴い抑制され, その抑制の度合は抗生物質無添加時よりも増強された (Fig. 4). *En* 菌は接種菌量が少ないときは抑制されたが, 接種菌量が多いときには経時的に増殖がみられた (Table 5 (1)). これに対して *E₂₂₅* 菌は接種菌量, DC 濃度に関係なく抑制されなかった (Table 5 (2)).

Table 3 Effects of DC on the growth of E_N or E_{225}
(1) No. of E_N (log/ml) (2) No. of E_{225} (log/ml)

		DC*	Incubation time (h)							DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
Inoculum size (cells/mL)	10 ⁸	0	4	5	8	8	8	10 ⁸	0	4	5	7	8	8	8
		1	4	5	7	8	8		1	4	5	7	8	8	8
		2	3	5	6	8	8		2	3	4	6	8	8	8
	10 ⁵	0	6	7	8	8	8	10 ⁵	0	6	7	8	8	8	8
		1	6	7	8	8	8		1	6	7	8	8	8	8
		2	6	7	8	8	8		2	6	6	8	8	8	8
	10 ⁷	0	8	8	8	8	8	10 ⁷	0	7	8	8	8	8	8
		1	8	8	8	8	8		1	7	8	8	8	8	8
		2	8	8	8	8	8		2	7	8	8	8	8	8

* concentration equals mg per ml

Table 4 Effects of DC on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture
(1) No. of Ch and E_N (log/ml) (2) No. of Ch and E_{225} (log/ml)

Inoculum size (cells/ml) Ch + E _N		DC	Incubation time (h)					Inoculum size (cells/ml) Ch + E ₂₂₅		DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
10 ⁸	Ch	0	6	7	8	8	8	10 ⁸	Ch	0	5	7	8	8	8
		1	6	7	7	6	7			1	5	6	8	7	7
		2	6	7	6	6	7			2	5	6	8	7	7
	E _N	0	6	7	8	8	8		E ₂₂₅	0	4	5	6	7	7
		1	6	7	8	8	7			1	4	5	6	7	7
		2	6	7	7	7	7			2	4	4	6	6	7
10 ⁹	Ch	0	5	6	8	8	8	10 ⁹	Ch	0	6	7	8	8	8
		1	5	6	7	7	7			1	6	7	7	7	7
		2	5	6	7	6	7			2	6	6	7	7	7
	E _N	0	7	8	8	8	8		E ₂₂₅	0	6	7	8	8	8
		1	7	8	8	8	8			1	6	7	7	7	7
		2	7	8	8	8	8			2	6	6	7	7	7

Table 5 Effects of DC and ABPC (3.125 μ g/ml) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E _N (log/ml)							(2) No. of E ₂₂₅ (log/ml)									
		DC	Incubation time (h)							DC	Incubation time (h)					
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24	
Inoculum size (cells/ml)	10 ⁸	0	3	1	—	—	—	Inoculum size (cells/ml)	10 ⁸	0	4	5	7	8	8	
		1	3	1	—	—	—			10 ⁸	1	3	5	7	8	8
		2	3	1	—	—	—				10 ⁸	2	3	4	6	8
	10 ⁵	0	5	3	3	3	1		10 ⁵			0	5	7	8	8
		1	5	3	2	2	—			10 ⁵		1	5	7	8	8
		2	5	2	2	1	—				10 ⁵	2	5	6	7	8
	10 ⁷	0	5	5	4	3	5		10 ⁷			0	7	8	8	8
		1	5	4	3	1	5			10 ⁷		1	7	8	8	8
		2	5	4	3	1	4				10 ⁷	2	7	8	8	8

— : None detected

Table 6 Effects of DC and ABPC (3.125 μ g/ml) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E _N (log/ml)							(2) No. of Ch and E ₂₂₅ (log/ml)								
		DC	Incubation time (h)							DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
Inoculum size (cells/ml) Ch + E _N	Ch	0	5	4	3	2	—	Inoculum size (cells/ml) Ch + E ₂₂₅	Ch	0	4	5	7	8	8
		1	4	2	—	—	—			1	4	5	7	6	7
		10 ⁵	2	4	1	—	—			—	2	4	—	2	4
	E _N	0	4	1	1	—	—		E ₂₂₅	0	6	7	8	8	8
		1	4	1	—	—	—			1	6	7	8	8	8
		10 ⁵	2	4	1	—	—			—	2	6	6	8	8
	Ch	0	5	4	3	2	1		Ch	0	5	7	8	8	8
		1	4	1	—	—	—			1	4	4	—	—	3
		10 ⁵	2	3	1	—	—			—	2	4	3	—	—
	E _N	0	4	3	3	2	—		E ₂₂₅	0	7	6	5	5	6
		1	4	3	1	—	—			1	6	6	4	3	6
		10 ⁵	2	4	2	—	—			—	2	6	6	4	3
Ch	0	5	5	5	5	6	Ch	0	5	7	8	8	8		
	1	4	4	—	—	3		1	4	4	—	—	3		
	10 ⁵	2	4	3	—	—		1	2	4	3	—	—	1	
E _N	0	7	6	5	5	6	E ₂₂₅	0	7	6	5	5	6		
	1	6	6	4	3	6		1	6	6	4	3	6		
	10 ⁷	2	6	6	4	3		6	2	6	6	4	3	6

Fig. 4 Effects of DC and ABPC (3.125 μ g/ml) on the growth of Ch
Inoculum size 10^8 cells/ml

エルトル菌と E_N 菌との混合培養においては、 E_N 菌の接種菌量が 10^6 cells/ml 以下では、両菌ともほぼ単独培養時と同様の動きを示したが、 10^7 cells/ml では両菌とも 12 時間より増殖に転じた。DC は両菌

Fig. 5 Effects of DC and ABPC (3.125 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and *E225* in mixed culture
Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{E}_{225} 10^8 \text{ cells/ml} \end{cases}$

Fig. 6 Effects of DC and ABPC (3.125 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and *E225* in mixed culture
Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{E}_{225} 10^7 \text{ cells/ml} \end{cases}$

に抗菌力増強効果を示したが、エルトル菌により強い作用があった (Table 6 (1)). *E225* 菌との混合培養においては、*E225* 菌はほぼ単独培養時と同様の動きを示したが、エルトル菌は単独培養時と大きく異なり DC 無添加では 10^8 cells/ml 以下に抑制されず、かつ *E225* 菌の接種菌量が多くなるにしたがい早期より増殖に転じた。DC 添加時にも同様に増殖に転じたが、添加濃度の上昇に伴い強い増殖抑制がみられた (Fig. 5, 6, Table 6 (2)).

2) CET 添加

単独培養において、エルトル菌は抑制傾向がみられ DC 添加によって完全に抑制され、DC は抗生物

質無添加時よりも強い抑制効果を示した (Fig. 7). *EN* 菌は接種菌量・DC 濃度に関係なく増殖がみられ、DC の抑制の程度は軽度であった。 *E225* 菌は、24 時間の経過でほとんど抑制されなかった。 (Table 7).

エルトル菌と *EN* 菌との混合培養においては、*EN* 菌はいずれの接種菌量にてもほぼ単独培養時と同様の動きを示した。エルトル菌は単独培養時と異なり、*EN* 菌の接種菌量が 10^6 cells/ml のとき DC 無添加にて 24 時間で 10^6 cells/ml に増殖し、接種菌量が 10^7 cells/ml のときいずれの DC 濃度にも 3 時間より増殖に転じたが、DC は添加濃度の上昇に伴い増殖抑制作用を示した (Fig. 8, Table 8 (1)). *E225* 菌

Fig. 7 Effects of DC and CET (1.56 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch
Inoculum size 10^8 cells/ml

Table 7 Effects of DC and CET (1.56 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E_N (log/ml)							(2) No. of E_{225} (log/ml)							
Inoculum size (cells/ml)		DC	Incubation time (h)						DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24			1.5	3	6	12	24
	10^8	0	4	3	4	6	8		0	4	5	7	8	8
		1	3	3	4	5	7		1	4	5	7	8	8
		2	3	2	1	4	7		2	3	4	6	7	8
	10^5	0	5	5	7	8	8		0	6	7	8	8	8
		1	5	5	5	8	8		1	6	7	8	8	8
		2	5	4	4	6	7		2	5	7	7	7	8
	10^7	0	7	7	8	8	8		0	7	8	8	8	8
		1	7	7	8	8	8		1	7	7	8	8	8
		2	7	7	7	7	8		2	7	7	7	7	8

との混合培養においては、 E_{225} 菌はほぼ単独培養時と同様の動きを示したが、エルトル菌は単独培養と大きく異なり DC 無添加ではどの接種菌量にても 24 時間で 10^8 cells/ml に増殖しており、DC 1 mg/ml 添加にては、 E_{225} 菌の接種菌量が $10^5 \cdot 10^7$ cells/ml のとき 1.5~6 時間で増殖に転じた。DC 2 mg/ml 添加にては、 E_{225} 菌の接種菌量が 10^7 cells/ml のとき 1.5 時間より増殖に転じた (Fig. 9, Table 8 (2))。

3) TC 添加

単独培養においては、エルトル菌は 24 時間にわたり抑制され、添加 DC 濃度の上昇に伴いその抑制は軽度に強まったが、抗生物質無添加時の DC の抑制

Table 8 Effects of DC and CET (1.56 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E_N (log/ml) (2) No. of Ch and E_{225} (log/ml)

		DC	Incubation time (h)								DC	Incubation time (h)						
			1.5	3	6	12	24	1.5				3	6	12	24			
Inoculum size (cells/ml)	Ch + E _N	Ch	0	4	3	2	5	6	Inoculum size (cells/ml)	Ch + E ₂₂₅	Ch	0	4	3	1	6	8	
			10 ⁸	1	3	—	—	—				1	3	—	—	—		
			2	2	—	—	—	2				2	—	—	—			
		E _N	0	4	3	3	6	8			E ₂₂₅	0	4	5	7	7	8	
			10 ⁸	1	3	3	3	5				8	1	4	4	7	7	8
			2	3	2	1	4	7				2	4	4	6	7	8	
	10 ₅	Ch	0	5	1	2	4	8		Ch	0	4	1	3	5	8		
			1	3	1	—	—	1			4	—	—	2	5			
			2	1	1	—	—	2			3	—	—	—	—			
		E _N	0	6	5	7	7	8		E ₂₂₅	0	6	7	8	8	8		
			1	5	5	5	7	8			1	6	7	8	8	8		
			2	5	3	3	6	8			2	6	7	8	8	8		

Table 9 Effects of DC and TC (0.78 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch

No. of Ch (log/ml)					
DC	Incubation time (h)				
	1.5	3	6	12	24
0	4	4	3	2	2
1	4	3	2	1	1
2	4	2	2	1	1
Inoculum size 10 ⁶ cells/ml					

Inoculum size 10^8 cells/ml

Table 10 Effects of DC and TC (0.78 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E_N (log/ml) (2) No. of E_{225} (log/ml)

		DC	Incubation time (h)								DC	Incubation time (h)					
			1.5	3	6	12	24	1.5				3	6	12	24		
Inoculum size (cells/ml)	10 ⁸	0	3	3	3	3	2	10 ⁸	0	4	5	7	8	8			
		1	3	3	3	3	2		1	4	5	7	8	8			
		2	3	3	3	3	1		2	3	5	6	7	8			
	10 ⁵	0	5	5	5	5	5	10 ⁵	0	6	7	8	8	8			
		1	5	5	5	5	5		1	5	7	8	8	8			
		2	5	5	5	5	4		2	5	6	7	8	8			
	10 ⁷	0	7	7	7	7	7	10 ⁷	0	7	8	8	8	8			
		1	7	7	7	7	7		1	7	8	8	8	8			
		2	7	7	7	7	7		2	7	8	8	8	8			

作用に比べ顕著ではなかった (Table 9)。 E_N 菌は、いずれの条件下でも接種菌量以下に発育を抑制された (Table 10 (1))。これに対し E_{225} 菌は全く抑制され

Fig. 8 Effects of DC and CET (1.56 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of *Ch* and *EN* in mixed culture

Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{EN } 10^7 \text{ cells/ml} \end{cases}$

なかった (Table 10 (2)).

混合培養では、いずれの組み合わせにおいてもほぼ単独培養時と同様であった (Table 11).

4) AMK 添加

単独培養においては、エルトル菌は DC 無添加時 12 時間まで抑制されたが、それ以降増殖に転じた。DC 添加時は、24 時間にわたって完全に抑制された (Table 12). *EN* 菌および *E₂₂₅* 菌は、いずれの組み合わせにおいても抑制された (Table 13).

エルトル菌と *EN* 菌との混合培養時、*EN* 菌の接種菌量が 10^5 cells/ml 以下では両菌ともほぼ単独培養と同様の動きを示したが、 10^7 cells/ml にはエル

Fig. 9 Effects of DC and CET (1.56 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of *Ch* and *E₂₂₅* in mixed culture

Inoculum size $\begin{cases} \text{Ch } 10^5 \text{ cells/ml} \\ \text{E}_{225} 10^7 \text{ cells/ml} \end{cases}$

トル菌は、DC 無添加時 6 時間より増殖に転じた (Table 14 (1)). *E₂₂₅* 菌との混合培養においては、*E₂₂₅* 菌の接種菌量が 10^5 cells/ml 以下では両菌ともほぼ単独培養と同様の動きを示したが、 10^7 cells/ml では両菌とも DC 無添加時 1 mg/ml 添加にて 12 時間より増殖に転じた (Table 14 (2)).

5) PLB 添加

単独培養においては、エルトル菌は DC 1 mg/ml 添加時完全に抑制されたが、無添加時は 6 時間より、2 mg/ml 添加時は 3 時間より増殖に転じた (Fig. 10). *EN* 菌および *E₂₂₅* 菌は、いずれの組み合わせにおいても完全に抑制された (Table 15).

Table 11 Effects of DC and TC (0.78 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E _N (log/ml)							(2) No. of Ch and E ₂₂₅ (log/ml)								
		DC	Incubation time (h)							DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
Inoculum size (cells/ml) Ch + E _N	Ch	0	4	4	3	2	2	Ch	0	4	4	2	2	2	
		10 ⁵	1	4	3	1	1		1	10 ⁵	1	4	3	1	—
		2	3	3	1	1	1		2	3	2	1	—	—	
	E _N	0	3	3	3	3	3	E ₂₂₅	0	3	5	7	8	8	
		10 ⁵	1	3	3	3	3		2	10 ⁵	1	3	5	7	8
		2	3	3	3	3	2		2	3	4	6	7	7	
	Ch	0	5	4	3	2	2	Ch	0	5	3	2	2	2	
		10 ⁵	1	4	3	3	—		—	10 ⁵	1	5	2	1	1
		2	4	3	3	—	—		2	4	2	1	1	1	
	E _N	0	5	5	5	5	4	E ₂₂₅	0	5	7	8	8	8	
		10 ⁵	1	5	5	5	5		4	10 ⁵	1	5	7	8	8
		2	5	5	5	5	4		2	5	6	8	8	7	
	Ch	0	4	4	4	3	2	Ch	0	4	3	3	3	3	
		10 ⁵	1	3	3	2	—		—	10 ⁵	1	3	2	2	2
		2	3	2	2	—	—		2	3	2	2	1	1	
E _N	0	7	7	7	7	7	E ₂₂₅	0	7	8	8	8	8		
	10 ⁷	1	7	7	7	7		7	10 ⁷	1	7	8	8	8	
	2	7	7	7	7	7		2	7	8	7	7	7		

Table 12 Effects of DC and AMK (12.5 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch

No. of Ch (log/ml)	
DC	Incubation time (h)
	1.5 3 6 12 24
0	4 — — — 7
1	3 — — — —
2	2 — — — —

Inoculum size 10^6 cells/ml

エルトル菌と E_N 菌または E_{225} 菌との混合培養においては、 E_N 菌または E_{225} 菌の接種菌量が 10^6 cells/ml 以下では両菌ともほぼ単独培養と同様の動きを示したが、 10^7 cells/ml では E_N 菌は 12 時間より、 E_{225} 菌は 6 時間より増殖に転じ、エルトル菌は DC 1 mg/ml 添加時でも増殖に転じた (Table 16)。

6) CL 添加

単独培養においてはエルトル菌は DC 1 mg/ml 添加時完全に抑制されたが、無添加時は 3 時間より、2 mg/ml 添加時は 6 時間より増殖に転じ、PLB 添加時と逆の動きを示した (Fig. 11)。 E_N 菌および E_{225}

Table 13 Effects of DC and AMK (12.5 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E_N (log/ml)					(2) No. of E_{225} (log/ml)										
Inoculum size (cells/ml)		DC	Incubation time (h)					Inoculum size (cells/ml)		DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
	10^8	0	—	—	—	—	—	10^8	0	—	—	—	—	—	
		1	—	—	—	—	—		1	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—		2	—	—	—	—	—	
	10^5	0	1	—	—	—	—	10^5	0	1	1	1	—	—	
		1	1	—	—	—	—		1	1	—	—	—	—	
		2	1	—	—	—	—		2	1	—	—	—	—	
	10^7	0	6	5	4	2	2	10^7	0	6	5	5	3	—	
		1	6	4	1	—	—		1	5	2	2	—	—	
		2	6	3	—	—	—		2	5	2	2	—	—	

Table 14 Effects of DC and AMK (12.5 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E _N (log/ml)						(2) No. of Ch and E ₂₂₅ (log/ml)									
		DC	Incubation time (h)							DC	Incubation time (h)				
			1.5	3	6	12	24				1.5	3	6	12	24
Inoculum size (cells/ml) Ch + E _N	Ch	0	—	—	—	—	7	Ch	0	1	—	—	—	7	
		1	—	—	—	—	1		—	—	—	—	—		
		10 ⁵	2	—	—	—	—		2	—	—	—	—		
	E _N	0	—	—	—	—	—	E ₂₂₅	0	—	—	—	—		
		1	—	—	—	—	1		—	—	—	—			
		10 ⁵	2	—	—	—	—		2	—	—	—			
	Ch	0	2	1	—	—	7	Ch	0	2	—	—	—	7	
		1	2	—	—	—	1		2	—	—	—	—		
		10 ⁵	2	2	—	—	—		2	2	—	—	—		
	E _N	0	2	2	—	—	—	E ₂₂₅	0	1	—	—	—	—	
		1	2	1	—	—	1		1	—	—	—	—		
		10 ⁵	2	2	—	—	—		2	1	—	—	—		
	Ch	0	5	5	4	5	7	Ch	0	4	2	—	—	8	
		1	3	3	1	1	—		1	—	—	—	—	6	
		10 ⁵	2	3	2	—	—		2	—	—	—	—	—	
	E _N	0	6	5	4	3	3	E ₂₂₅	0	5	4	1	—	3	
		1	6	4	2	2	—		1	5	1	—	—	2	
		10 ⁷	2	6	3	—	—		2	4	1	—	—	—	

菌はいずれの組み合わせにおいても完全に抑制された (Table 17)。

混合培養においては、いずれの組み合わせにてもほぼ単独培養時と同様の動きを示した (Table 18)。

Table 15 Effects of DC and PLB (100 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E_N (log/ml)			(2) No. of E_{225} (log/ml)		
Inoculum size (cells/ml)	DC	Incubation time (h)	Inoculum size (cells/ml)	DC	Incubation time (h)
		1.5 3 6 12 24			1.5 3 6 12 24
10^3	0	— — — — —	10^3	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^5	0	— — — — —	10^5	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^7	0	1 — — — —	10^7	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —

Table 16 Effects of DC and PLB (100 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E_N (log/ml)			(2) No. of Ch and E_{225} (log/ml)		
Inoculum size (cells/ml) Ch + E_N	DC	Incubation time (h)	Inoculum size (cells/ml) Ch + E_{225}	DC	Incubation time (h)
		1.5 3 6 12 24			1.5 3 6 12 24
Ch	0	— — — — 4	Ch	0	— — — 1 4
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	1 — 1 5 7		2	2 2 1 5 7
E_N	0	— — — — —	E_{225}	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^3	0	— — — — 2	10^3	0	— — — 1 3
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	1 2 3 5 7		2	— — — 3 7
10^5	0	— — — — —	10^5	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^7	0	1 — — 1 5	10^7	0	— — — — —
	1	— — — — 4		1	— — — — —
	2	2 4 4 6 6		2	— — — — —

4. DC 関与下での耐性伝達実験

上記の一連の実験より大腸菌とエルトル菌との間で耐性移行が考えられたので、両菌間での耐性伝達実験を行った。

(1) E_{225} 菌からエルトル菌への伝達

Table 17 Effects of DC and CL (200 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of E_N or E_{225}

(1) No. of E_N (log/ml)			(2) No. of E_{225} (log/ml)		
Inoculum size (cells/ml)	DC	Incubation time (h)	Inoculum size (cells/ml)	DC	Incubation time (h)
		1.5 3 6 12 24			1.5 3 6 12 24
10^3	0	— — — — —	10^3	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^5	0	— — — — —	10^5	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^7	0	1 — — — —	10^7	0	1 — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —

Table 18 Effects of DC and CL (200 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of Ch and E_N or E_{225} in mixed culture

(1) No. of Ch and E_N (log/ml)			(2) No. of Ch and E_{225} (log/ml)		
Inoculum size (cells/ml) Ch + E_N	DC	Incubation time (h)	Inoculum size (cells/ml) Ch + E_{225}	DC	Incubation time (h)
		1.5 3 6 12 24			1.5 3 6 12 24
Ch	0	4 5 7 6 6	Ch	0	3 4 6 6 5
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— 1 2 3 6		2	— — — 2 5
E_N	0	— — — — —	E_{225}	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^3	0	— — — — —	10^3	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —
10^5	0	5 6 7 7 7	10^5	0	5 6 7 8 6
	1	1 — — — —		1	1 — — — —
	2	2 2 3 3 4		2	3 3 3 4 5
10^7	0	— — — — —	10^7	0	— — — — —
	1	— — — — —		1	— — — — —
	2	— — — — —		2	— — — — —

ABPC についてはいずれの添加 DC 濃度においても耐性伝達が認められたが、添加濃度の上昇に伴い伝達頻度は低下し、選択培地接種時の donor および recipient の生菌数と比較すると、その頻度は DC の持つ発育抑制作用による効果よりも低下していた。伝

Fig. 10 Effects of DC and PLB (100 µg/ml) on the growth of Ch
Inoculum size 10^5 cells/ml

Fig. 11 Effects of DC and CL (200 µg/ml) on the growth of Ch
Inoculum size 10^5 cells/ml

Table 19 Effects of DC against transfer of resistance between Ch and E_{225}

(1) Transfer frequency* from E_{225} to Ch

DC (mg/ml)	No. of cells/ml**		Transfer frequency		
	donor	recipient	ABPC selection	CET selection	TC selection
0	3.9×10^7	2.9×10^8	7.1×10^{-4}	3.4×10^{-6}	0
1	3.8×10^7	3.6×10^7	3.4×10^{-5}	0	0
2	3.5×10^7	1.4×10^7	1.4×10^{-6}	0	0

* No. of recipient cells receiving transfer per No. of donor cells

** No. of donor cells or recipient cells after mixed culture for 24 h at 37°C

(2) Transfer frequency from Ch to E_{225}

DC (mg/ml)	Transfer frequency	
	PLB selection	CL selection
0	0	0
1	0	0
2	0	0

Table 20 MIC of antibiotics against Ch after receiving transfer of resistance

	Strain		MIC of antibiotics (µg/ml)	
			ABPC	CET
Donor	E_{225}		200	50
Recipient	Ch	before transfer	3.125	1.56
		after transfer	100~200	6.25~12.5

達を受けたエルトル菌は E_{225} 菌とほぼ同様の感受性を示した。CET については DC 無添加時に耐性伝達が認められたが、その伝達は DC 添加によって完全に阻止された。伝達を受けたエルトル菌は E_{225} 菌より低い感受性を示した。TC については、DC 無添加および添加時とも耐性伝達は認められなかった (Table 19 (1), 20)。

(2) エルトール菌から E_{225} 菌への伝達

PLB および CL による選択で耐性伝達は認められなかった (Table 19 (2))。

考 察

大腸菌を中心とする腸内常在菌が、経口的に侵入する病原菌の消化管内での増殖を阻止するメカニズムは多様なものがあるが、その過程において胆汁酸の関与は重要である¹⁷⁾。また、抗生物質の投与によって腸内菌叢の攪乱が起き、外来菌による腸管感染が容易になることが知られている。さらには、腸管内の耐性菌と病原菌間の耐性移行の問題もある。

著者が、腸管内における胆汁酸と抗生物質という腸内菌叢に影響を与える二要因を組み立て、エルトル菌と大腸菌の消長を検討した理由は上記の目的からである。

今回の実験では、胆汁酸として、腸内細菌に対して選択作用を持つとされているデオキシコール酸¹⁸⁾を用いたが、そのヒト腸管内濃度は明らかでなく、胆汁酸プール内では Sjövall¹⁹⁾ は 22%、日本では 13%²⁰⁾

あるいは 18%²¹⁾ という報告と、胆汁酸として小腸内では平均値約 5.7 mg/ml²²⁾、また約 0.9~4.3 mg/ml の間にあるとしているもの²³⁾や、上部小腸において平均 4.15 mg/ml であるとの報告²⁴⁾から推測して、予備実験として 9 mg/ml までの濃度における影響を調べ、次に小腸内濃度に近いと思われる 1 および 2 mg/ml の 2 段階の濃度を用いて無添加時との比較実験を行った。

その結果、エルトール菌のほうが DC に強く影響を受け 1 mg/ml の低濃度から発育を抑制された。大腸菌は標準菌が 7 mg/ml 添加より軽度で発育を抑制されたが、耐性菌は影響を受けなかった。

本実験での単独培養にては、予備実験結果と同様にエルトール菌は DC 添加によって発育を抑制されたが、大腸菌は標準および耐性菌とも接種菌量が少ないとき、DC は増殖時間を遅らせる効果のみを示した。

混合培養においては、混合大腸菌量が少ないとき DC 添加に関係なくエルトール菌の存在によって大腸菌のほうが影響を受け発育を抑制され、大腸菌量が多いときは DC 添加によって逆にエルトール菌のほうが影響を受け発育を抑制された。結局エルトール菌は DC により発育を抑制され、そこに大腸菌が多量に存在すれば、さらに抑制効果が強まることが分かる。この結果は、侵入菌に対する胆汁酸と腸内菌叢との相互作用による効果に拡大して考えてみると非常に興味深い。

胆汁酸の細菌に対する発育抑制作用については古くから知られており、グラム陽性菌、大腸菌などに対する抑制効果が報告^{25), 26)}されているが、今回の実験でも標準大腸菌およびエルトール菌に対する抑制効果が認められた。

腸内常在菌叢は通性嫌気性菌、嫌気性菌などより成り立ち、感染防御作用と逆に増強作用を持つことがあるのが知られているが²⁷⁾、代表的な菌の一つである大腸菌を用いた実験で、マウス腸管では定着したエルトール菌は後に大腸菌を投与すると共存するとの報告²⁸⁾や、*in vitro* では大腸菌が 10^8 cells/ml でコレラ菌が 10^4 cells/ml の混合培養でコレラ菌の増殖がかなり抑制されたとの報告²⁹⁾があるが、今回の結果をみると *in vitro* における拮抗現象は両菌の接種菌量によってかなり影響を受けると推測される。

胆汁酸の抗生物質に対する影響に関して、大腸菌に対する ABPC, CER (cephaloridine), KM の抗菌力を増強させるとの報告³⁰⁾があるが、本実験では標準大

腸菌に対してやや ABPC, CET, AMK の抗菌力を増強させたが、TC ではほとんど影響がなく、耐性大腸菌に対しては影響がみられなかった。エルトール菌に対しては標準大腸菌と同様に ABPC, CET, AMK の抗菌力を増強させ、PLB, CL では添加 DC 濃度によって抗菌力を強めたり、逆に減弱させる働きを示した。TC に対する影響は顕著でなかった。

結局 DC はエルトール菌、標準大腸菌に対して、静菌的作用を持つ抗生物質の抗菌力には顕著な影響をみせず、殺菌的作用を持つ抗生物質の抗菌力を増強させる働きを示すことが分かる。飯田²⁹⁾は、DC は高濃度において大腸菌の細胞壁あるいは細胞膜を崩壊させ、原形質内部の核あるいは核様物質に影響を与えて発育を抑制すると推察しているが、その効果がエルトール菌に対しても同様に起き、細胞膜 (PLB, CL)、細胞壁 (ABPC, CET) に作用する抗生物質の効果を相乗させているのかどうか、今後解明すべき課題である。

抗生物質耐性に関して、大腸菌、エルトール菌、赤痢菌など多くの腸内細菌より R 因子が見出され、接合により他菌へ容易に耐性が伝達されることが知られている^{31, 32)}。阿部ら³³⁾は TC, CM, SM (dihydrostreptomycin), SA (sulfisoxazole) に対する耐性が大腸菌よりエルトール菌へ伝達することを報告し、Davey ら³⁴⁾は ABPC の耐性も伝達することを示した。今回の結果では TC の耐性は伝達しなかったが、ABPC, CET の耐性が耐性大腸菌よりエルトール菌に伝達した。

β -ラクタム系抗生物質 (ABPC, CET など) 耐性の原因は、菌の産生する β -ラクタマーゼによる加水分解作用によるとされ、R 因子上に産生遺伝子があるものと染色体支配の 2 通りがあり、菌から菌に伝達可能であるが³⁵⁾、実験結果より耐性大腸菌の ABPC, CET の耐性に関与する β -ラクタマーゼが、エルトール菌に移行したものと推察され、ABPC に対する耐性伝達のほうが CET より高い頻度を示した。

秋葉ら³⁶⁾は、耐性大腸菌から感性赤痢菌へ、両菌の混合培養により CM の耐性が伝達可能であるが、その過程において胆汁酸は耐性伝達阻止作用を持ち、特に DC が最も強い効果を持っていることを報告したが、それによると DC 1 mg/ml 添加でかなり強く阻止され、10 mg/ml 添加によって完全に伝達は阻止されたとしている。今回の実験では、ABPC に対する耐性伝達は DC 添加濃度の上昇に伴い阻止され、CET

では DC 1 mg/ml 添加以上で完全に阻止されており、DC は耐性大腸菌からエルトル菌への耐性伝達を阻止する作用を持つが、その作用は耐性である抗生物質の種類によって異なることが示された。

今回の抗生物質と DC を添加した耐性大腸菌とエルトル菌との混合培養実験では、ABPC および CET 添加時に、標準大腸菌との混合に比べ明らかにエルトル菌への抗菌力低下が認められ、かつ耐性大腸菌の接種菌量の増加によりその抗菌力低下が増強した。しかし伝達実験と比較すると、伝達が阻止される DC 濃度においても抗菌力低下がみられ、また標準大腸菌との混合でも、大腸菌接種量が多い場合同様の効果がみられ、この点では AMK、PLB 添加時でも同様であった。三橋³⁷⁾らは、MIC は接種菌量が多いと大きく変動して感受性が低下すると述べているが、上記の結果は接種総菌量の増加による抗生物質の抗菌力の低下によるものと思われる。

以上、腸管内における DC 濃度に近いと思われる濃度を使用して、胆汁酸と抗生物質の2要因によるエルトル菌と大腸菌の動態に対する影響に関して考察を行ったが、実際ヒト腸管内には一つかそれ以上の抗生物質に耐性の大腸菌が存在することがあるとの報告³⁸⁾もあり、コレラ菌が腸管内に侵入した場合、耐性菌と出会う可能性があると思われる。その場合に胆汁酸の存在は重要であると考えられ、コレラへの治療として抗生物質を使用するときには、その抗菌力のみではなく腸内菌叢の動態、胆汁酸濃度に関しても考慮する必要があると思われる。

結 論

胆汁酸関与下でのエルトル菌と腸内常在菌との関連と、抗生物質使用時の動態に関して解析するため、エルトル菌と標準および多剤耐性大腸菌を用いて、デオキシコール酸および抗生物質を添加して単独および混合培養実験を行い、次の成績を得た。

1) 各菌の DC に対する影響に関して、エルトル菌は 1 mg/ml 添加より発育が抑制され、標準大腸菌は 7 mg/ml 添加ではじめて抑制がみられた。耐性大腸菌は 9 mg/ml の DC にもほとんど影響されなかった。

2) DC 無添加および 1, 2 mg/ml 添加時のエルトル菌と大腸菌の混合培養において、大腸菌接種量が少ない場合、エルトル菌は DC 添加により発育を抑制され、大腸菌は DC 添加、無添加に関係なく単独

培養時より発育を抑制された。

3) 2) の条件下で大腸菌接種量が多い場合、エルトル菌は DC 添加により単独培養時よりもさらに発育を抑制され、大腸菌は影響を受けなかった。

4) DC 無添加および 1, 2 mg/ml 添加時で、抗生物質をそれぞれエルトル菌の MIC 濃度に添加した条件下にて各菌の増殖態度を観察したところ、DC はエルトル菌に対して ABPC, CET, AMK および CL の抗菌力を強く増強した。ただし CL では 1 mg/ml 添加時が最高で、PLB では 1 mg/ml 添加で抗菌力を増強し、2 mg/ml 添加で逆に減弱させた。TC では増強作用は顕著ではなかった。

5) DC は標準大腸菌に対して ABPC, CET および AMK の抗菌力をやや増強したが、TC, PLB および CL ではほとんど影響がみられなかった。耐性大腸菌に対しては、いずれの抗生物質でもほとんど影響がみられなかった。

6) 4) の条件下でエルトル菌と大腸菌の混合培養を行ったところ、耐性大腸菌よりエルトル菌への ABPC および CET に関する耐性伝達が認められたが、DC は ABPC に対しては軽度、CET に対しては完全に耐性伝達を阻止した。

7) ABPC, CET および AMK では標準または耐性大腸菌量の増加によりエルトル菌への抗菌力低下がみられたが、DC は添加濃度の上昇に伴いその低下を抑制した。PLB でも同様の作用がみられたが、1 mg/ml 添加時が最高であった。TC および CL に対しては影響がみられなかった。

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御助言、御指導を頂いた麻布大学教授高倉剛二先生に心から感謝いたします。また御協力を頂いた教員各位に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 春日齊：わが国に発生したコレラ。医のあゆみ, 129, 1372~1373, 1984.
- 2) 福見秀雄：鶴見川のコレラ菌汚染事件。日医新報, No. 2822, 12~17, 1978.
- 3) 島田俊雄, 坂崎利一, 小迫芳正：Non-01 *Vibrio cholerae* の分布 (1976~1981) およびその毒素産生性について。感染症誌, 56, 1017~1024, 1982.
- 4) Bart, K.J., Hug, Z., Khan, M. and Mosley, W.H.: Seroepidemiologic studies during a simultaneous epidemic of infection with El Tor Ogawa and classical Inaba *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., 121 (Suppl.), s 17~s 24, 1970.
- 5) 大橋誠：最近のコレラ情勢。臨と細菌, 6, 8~20, 1979.
- 6) Nalin, D.R., Levine, R.J., Levine, M.M., Hoover,

- D., Bergquist, E., McLaughlin, J., Libonati, J., Alam, J. and Hornick, R.B.: Cholera, non-Vibrio cholera, and stomach acid. *Lancet*, **II** (8095), 856~859, 1978.
- 7) Wallace, C.K., Anderson, P.N., Brown, T.C., Khanra, S.R., Lewis, G.W., Pierce, N.F., Sanyal, S.N., Segre, G.V. and Waldman, R.H.: Optimal antibiotic therapy in cholera. *Bull. WHO*, **39**, 239~245, 1968.
 - 8) Kobari, K., Takakura, I., Nakatomi, M., Sogame, S. and Uylangco, C.: Antibiotic-resistant strains of El Tor vibrio in the Philippines and the use of furazolidone for chemotherapy. *Bull. WHO*, **43**, 365~371, 1970.
 - 9) Takeya, K. and Shimodori, S.: "Prophage-typing" of El Tor vibrios'. *J. Bacteriol.*, **85**, 957~958, 1963.
 - 10) Sakazaki, R., Tamura, K., Gomez, C.Z. and Sen, R.: Serological studies on the cholera group of vibrios. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **23**, 13~20, 1970.
 - 11) Ohtomo, N., Muraoka, T., Tashiro, A., Zinnaka, Y. and Amako, K.: Size and structure of the cholera toxin molecule and its subunits. *J. Infect. Dis.*, **133** (Suppl.), s 31~s 40, 1976.
 - 12) Lai, C.Y., Cancedda, F. and Chang, D.: Primary structure of cholera toxin subunit A₁. *FEBS Lett.*, **100**, 85~89, 1979.
 - 13) 木野一晴: 腸内細菌叢との関連におけるエルトール型コレラ菌の抗生剤に対する動態について. *日医大誌*, **50**, 702~715, 1983.
 - 14) 伊藤文夫: 腸内細菌叢特に大腸菌と腸球菌の平衡における赤痢菌の態度の基礎的研究. *日医大誌*, **28**, 156~161, 1959.
 - 15) 庄子忠良: 腸管内での大腸菌と赤痢菌相互間の抗生物質耐性移行に関する基礎研究. *日医大誌*, **29**, 1~9, 1962.
 - 16) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy*, **29**, 76~79, 1981.
 - 17) 佐々木正五: 腸内細菌とその意義. "消化管機能と実態" (織田敏次, 岡博編), p. 455~464, 中外医学社, 東京, 1981.
 - 18) 今井弘: Desoxycholate citrate agar の大腸菌に対する発育抑制作用に関する研究. *日医大誌*, **23**, 765~778, 1956.
 - 19) Sjövall, J.: Bile acids in man under normal and pathological conditions. *Clin. Chim. Acta*, **5**, 33~41, 1960.
 - 20) 泉公美: 胆汁及び胆石内諸成分について; 特にコレステロール系石とビリルビン系石との差異に関して. *福岡医誌*, **56**, 488~523, 1965.
 - 21) 牧野勲, 中川昌一: 胆汁酸. p. 64, 中外医学双書, 東京, 1980.
 - 22) Fordtran, J.S. and Locklear, T.W.: Ionic constituents and osmolality of gastric and small-intestinal fluids after eating. *Am. J. Dig. Dis.*, **11**, 503~521, 1966.
 - 23) Northfield, T.C. and McColl, I.: Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*, **14**, 513~518, 1973.
 - 24) Van Deest, B.W., Fordtran, J.S., Morawski, S.G. and Wilson, J.D.: Bile salt and micellar fat concentration in proximal small bowel contents of ileectomy patients. *J. Clin. Invest.*, **47**, 1314~1324, 1968.
 - 25) Floch, M.H., Gershengoren, W., Elliot, S. and Spiro, H.M.: Bile acid inhibition of the intestinal microflora—a function for simple bile acids? *Gastroenterology*, **61**, 228~233, 1971.
 - 26) 飯田安彦: 胆石症の研究; 特に胆汁中胆汁酸と細菌の胆道感染に関する臨床的並に実験的研究. *日消病会誌*, **62**, 24~56, 1965.
 - 27) Itoh, K., Maejima, K., Ueda, K. and Fujiwara, K.: Effect of intestinal flora on megaenteron of mice. *Microbiol. Immunol.*, **22**, 661~672, 1978.
 - 28) 佐々木正五: 腸管と感染. p. 50~56, 朝倉書店, 東京, 1971.
 - 29) 宇都宮明剛, 林敏明, 重野秀明, 岩永正明, 内藤達郎: コレラ菌の侵入に対するマウスの抵抗性について. 第 52 回日本細菌学会総会, 神奈川, 1974-04, *日細菌誌*, **34**, 305, 1979.
 - 30) 松本義孝: 胆汁酸の細菌に対する影響. *Chemotherapy*, **18**, 157~166, 1970.
 - 31) 加納亮子: コレラ菌由来伝達性 R プラスミッド. *日細菌誌*, **36**, 465~474, 1981.
 - 32) Arai, T., Yao-Sugawara, K. and Aoki, T.: The stability of R plasmids in *Vibrio cholerae*. *Keio. J. Med.*, **29**, 125~132, 1980.
 - 33) 阿部久夫, 五島瑳智子, 桑原章吾: 大腸菌から *Vibrio* への多剤耐性の接合による伝達. *Jpn. J. Antibiot. Ser. B.*, **19**, 346~349, 1966.
 - 34) Davey, R.B. and Pittard, J.: Potential for in vivo acquisition of R plasmids by one strain of *Vibrio cholerae* biotype *el tor*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **8**, 111~116, 1975.
 - 35) 横田健: β -lactam 薬剤の抗菌力. *Chemotherapy*, **27**, 211~221, 1979.
 - 36) 秋葉朝一郎, 小山恒太郎: 細菌の耐性伝達の機序と耐性の機構. 第 12 報 胆汁および胆汁酸の耐性伝達阻止作用について. *医と生物学*, **61**, 35~38, 1961.
 - 37) 三橋進: 薬剤感受性測定法. p. 71~72, 講談社, 東京, 1980.
 - 38) Datta, N.: R factors in *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **182**, 59~64, 1971.

(受付: 1984 年 12 月 12 日)