ベロ毒素産生 *Escherichia coli* O157 : H7 に対する Bicozamycin の抗菌作用

松 本 佳 巳

藤沢薬品工業株式会社・薬理研究所
〒532-8514 大阪市淀川区加島2-1-6

〔受付：2000年9月10日，受理：2000年12月11日〕

特異な蛋白合成阻害作用（作用点：rho 因子）を有する動物用抗菌薬 Bicozamycin (BCM) は腸管出血性大腸菌 (EHEC) に分類されるベロ毒素産生 *Escherichia coli* (VTEC) O157 : H7 に対し MIC が16~32 µg/ml と中等度ではあるが，一定の抗菌力を有し，二種のベロ毒素 (VT1 & VT2) の産生も抑制した。この BCM の抗 VTEC 作用は *in vivo* で，マウスを用いた VTEC 実験感染系において対照とした fosfomycin (FOM)，cefixime (CFIX) および norfloxacin (NFLX) より優れた盲腸内生菌数減少効果を示した。マウス盲腸内の VT 産生量の増加もなかったことから，BCM は VTEC による感染症の治療及び定着菌の除菌に用い得ることが示唆された。BCM の特徴を以下に記す。

1. 抗菌スペクトラムが狭く，腸内フローラを乱しにくい。
2. *in vitro* 抗菌力は中等度であるが，好気条件下より嫌気条件下での抗菌力がやや優れる。
3. 作用機作が特異であり，他剤と交差耐性を示さない。
4. *in vitro* よりも *in vivo* の効果が優れる。
5. 作用機作から選択毒性が高く，副作用はほとんどない。

ヒトの EHEC 感染症は人畜共通感染症であり，保菌する家畜に由来する可能性が示唆されている。家畜の除菌は今後の重要な課題であり，抗菌スペクトラムの狭い BCM は副作用の少ない EHEC 除菌薬としての有用性が期待される。

序 文

腸管出血性のベロ毒素産生大腸菌 (VTEC) は赤痢菌同様感染力が強く，特に血清型 O157 : H7 は100個程度の菌でも発病するために恐れられている (16, 23)。しかし，VTEC による感染で

O157 : H7 によるものは60~80%ぐらいであり，一般に考えられているよりは低い (16, 23)。O157 : H7 以外にベロ毒素 (5, 17, 25) を産生する *E. coli* の血清型は100種以上あり，最近では *Enterobacter* や *Citrobacter* にもベロ毒素を産生する菌株が存在することが知られている (22)。

VTEC 感染患者の約40%が入院し，約10%が溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症する。HUS や血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を起こした症例では0~35%の死亡率となる (23)。

O157 : H7 では抗菌薬に対する耐性菌は少な

Yoshimi MATSUMOTO
Activity of Bicozamycin against *Escherichia coli* O157 : H7 Producing Vero Toxin
Medicinal Biology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 2-1-6 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514

く、大腸菌に有効な抗菌薬に *in vitro* では概ね感受性である (12, 24)。しかし、臨床では抗菌薬は効果がなく、むしろ悪化させることがあるとの報告もあり (9)、抗菌薬の使用は毒素を遊離あるいは誘導し HUS の頻度を上げるとの懐疑的な意見もある (4, 7, 9, 12)。しかし、患者からの排菌期間の短縮はきわめて重要であり、1998 年に厚生省から出された治療の手引き (改訂版) (10) には、明確な根拠に基づくものではないが fosfomycin (FOM), norfloxacin (NFLX) または kanamycin (KM) の速やかな経口投与が推奨されている。

O157:H7 感染症の大規模な集団発生例は1996 年以降ないが、散発的な発生件数は依然減っていない (8, 24)。感染源のひとつとして家畜があり、特に O157:H7 の血清型 VTEC を保菌する確率の高い牛が最も危険視されている (6, 19)。屠殺場での食肉への混入による牛から人への感染経路があり、ハンバーガー、食肉加工品、未殺菌牛乳などの畜産食品が原因となった例が多く知られている (6)。牛以外の家畜や家禽も血清型は異なる株もあるが同種の大腸菌に感染することから (6, 19)、ヒトへの感染経路となる可能性を否定できない。また、人から人への接触感染も知られている (19)。VTEC 感染症は、このように動物に定着している菌による環境汚染が原因となっている可能性が指摘されていることから、感染症状の出ない菌の定着であっても無視することはできない。

動物用細菌性下痢症治療薬として用いられている bicozamycin (BCM) は、1969年北海道札幌市の土壌から分離された新種の放線菌 *Streptovermicillium sapporonense* ATCC21532 が産生する抗生物質である。当初 bicyclomycin と命名されたが、1977年より bicozamycin (BCM) として国際一般名に登録された。BCM は大腸菌、サルモネラ、赤痢菌等のグラム陰性菌に抗菌力を示すが、グラム陽性菌には抗菌力を示さない動物専用の抗生物質であり、人への適用はない。BCM は、極めて特異な作用点 (rho-因子) を持つ蛋白合成阻害薬であることが明らかにされており (1, 11, 21, 26, 29)、他剤と交差耐性を示さず、耐性獲得されにくく耐性伝達もみとめられていない

(2)。

BCM のこれらの性状は動物に定着した VTEC の除菌や VTEC 感染症の治療に有用であると考えられ、*in vitro* 及びマウスを用いた感染実験系において検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 使用菌株

MIC の測定には臨床分離のベロ毒素産生 *Escherichia coli* O157:H7 27株を用いた。マウス感染実験には streptomycin (SM) に耐性の FP1962 株を用いた。

2. 使用薬剤

BCM, cefixime (CFIX), amoxicillin (AMPC) は標準品 (藤沢薬品工業株式会社) を用いた。Ofloxacin (OFLX) は藤沢薬品工業株式会社の研究所において合成した。FOM (明治製菓株式会社), KM (明治製菓株式会社), minocycline (MINO: 武田薬品工業株式会社), NFLX (杏林製薬株式会社) 及び sulfamethoxazole-trimethoprim (ST: 塩野義製薬株式会社) は市販の製剤を用いた。

3. MIC 測定

Mueller-Hinton agar (Difco) を用い、日本化学療法学会標準法に従って測定した (35°C, 18 時間培養)。嫌気培養には、嫌気培養装置 (CONCEPT300: RUSKINN TECHNOLOGY Ltd., Bradford, West Yorkshire, UK) を用いた。

4. 抗菌薬のベロ毒素産生に及ぼす影響

Mueller-Hinton agar にて 35°C、一夜培養した被検菌を CAYE broth (デンカ生研の処方により調製) に懸濁し ($10^6 \sim 10^7$ CFU/ml), 35°C で好気培養の場合は1時間、嫌気培養の場合は2時間さらに培養した後、抗菌薬を指定濃度に添加し、好気培養の場合は振盪、嫌気培養の場合は静置で3時間培養した。それぞれの1ml ずつを採取し、12,000 rpm×5 min の遠心により上清と沈殿 (菌体) に分け、VT1 および VT2 の含有量を VTEC-RPLA (デンカ生研) を用いた逆受身ラテックス凝集反応により測定した。菌体中の毒素量は、遠心後の沈殿を 5000 unit の polymyxinB 含有生理食塩水 1ml に懸濁し、35°C, 30 min 静置して抽出後、12,000 rpm×5 min 遠心上

表 1. Bicozamycin の *Escherichia coli* O157 : H7 (27株) に対する抗菌力

培養 条件	抗菌薬	MIC distribution (μg/ml)														MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)
		≤0.031	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128		
好気	Bicozamycin										9	18				32	32
	Amoxicillin							1	23						3	4	>128
	Cefixime			6	21											0.25	0.25
	Fosfomycin										1	5	14	7		64	128
	Norfloxacin	1	5	21												0.1	0.1
	Ofloxacin	1	4	22												0.125	0.125
	Kanamycin					1	22	2	1	1						1	2
	Minocycline					1	13	8	1	3	1					1	8
	ST*				1	19	3	1	3							0.5	4
	Bicozamycin										27					16	16
嫌気	Amoxicillin						1	20	3						3	2	>128
	Cefixime			1	25			1								0.25	0.25
	Fosfomycin							1		23	3					8	16
	Norfloxacin			25	2											0.125	0.125
	Ofloxacin	1	26													0.125	0.125
	Kanamycin									1	25	1				16	16
	Minocycline					3	20		3	1						1	4
	ST*			16	9	2										0.125	0.25
	Bicozamycin																
	Amoxicillin																

* ; Sulfamethoxazole: Trimethoprim = 5 : 1

図1. ペロ毒素産生におよぼす Bicozamycin の影響—好気培養時と嫌気培養時の比較—。

被検菌: *E. coli* O157: H7 FP1962, 抗菌薬処理: 35°C, 3時間, ■: VT1 上清, □: VT1 菌体内, ▨: VT2 上清, ▩: VT2 菌体内, ◆: O157 生菌数

清を試料とした。感作ラテックスの凝集を示す最高希釈倍数を凝集価とした。同時に薬剤作用3時間後の生菌数も測定した。

生菌数は、0.05 $\mu\text{g/ml}$ CFIX および 2.5 $\mu\text{g/ml}$ potassium tellurite を加えた MacConkey-sorbitol agar (日水) に段階希釈した菌液をコンラージ塗抹し、35°C にて18時間培養後発育したコロニー数を計測して求めた。

5. マウス感染治療効果

評価に用いたマウス経口感染系は福田らが報告した SM の投薬により腸内フローラを攪乱させて VTEC を定着させる方法に準じた (3)。

4週令の DBA/2 系雄マウスに SM (SIGMA) 5 g/l を3日間飲水投与した後、1日絶食・絶水した。*Escherichia coli* O157: H7 FP1962 を SM 5 g/l 含有 Trypticase-soy broth (BBL) に前培養し、35°C にて4～5時間振とう培養後集菌して20% sucrose に懸濁し、OD=2.0 に調製した菌

液 0.5 ml/mouse (2.2×10^9 CFU/mouse) を経口接種した。抗菌薬は感染翌日から1日2回、4日間経口投与し、control 群には0.5%メチルセルロースを10 ml/kg 経口投与した。6日後、摘出した盲腸の重量を測定して生理食塩水を加え10 ml としホモジネートした。盲腸内の O157 生菌数およびペロ毒素量は前述の方法に準じて測定した。

結 果

1. BCM の抗菌力

臨床分離株27株の MIC 値を表1に示した。

BCM は、*E. coli* O157: H7 に対し好気条件下で MIC 16～32 $\mu\text{g/ml}$ 、嫌気条件下で全株 16 $\mu\text{g/ml}$ と中等度の抗菌力を示し、嫌気条件下の方が活性がやや優れる傾向にあった。FOM 及び ST においても嫌気条件下での活性増強が見られたが、KM では逆に嫌気条件下で活性が低下し

た。嫌気条件下における BCM の抗菌力は KM や FOM とほぼ同等で、比較した CFIX, NFLX, OFLX, MINO および ST より劣っていた。

2. BCM のペロ毒素産生に及ぼす影響

BCM のペロ毒素産生に及ぼす影響についての検討結果を図 1 に示した。

用いた VTEC FP1962 は好気培養時には VT1 及び VT2 をほぼ同量産生したが、嫌気培養時には VT1 をほとんど産生せず VT2 を大量に産生した。これらの条件において BCM は好気条件下においては 2 種のペロ毒素を共に、嫌気条件下においては VT2 の産生を顕著に抑制した。嫌気条件下の方が殺菌作用も顕著であり、MIC 以上の濃度である 25 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ において毒素産生量は低く抑えられた。一方、FOM, CFIX および NFLX では好気・嫌気両培養条件において菌数は control 群よりも少ないにもかかわらず毒素産生量の増大傾向が見られ、抗菌薬により毒素産生が誘導されていた。NFLX の 1 $\mu\text{g/ml}$ では特に好気培養時、著明な菌数減少が見られたにも関わらず毒素産生量が増大していた。

3. BCM の *E. coli* O157:H7 によるマウス感染防御効果

感染 6 日後の control 群において $10^6 \sim 10^8$ CFU の菌の盲腸内定着が見られたが、死亡例はなかった (図 2)。ペロ毒素は 3/6 例において VT2 が検出されたが、VT1 は検出されなかった (図 3)。BCM は比較抗菌薬中最も顕著に盲腸内生菌数を減少させ、10, 32, 100 mg/kg 投与群のそれぞれ 1 例ずつに VT2 が僅かに検出された以外は毒素も殆ど検出されなかった。FOM および CFIX では、32 mg/kg でも殆ど菌数が減少せず毒素産生量が control より増えていた。さらに NFLX では、1 mg/kg 及び 3.2 mg/kg 投与群において 6 例全例、10 mg/kg 投与群において 5/6 例が死亡し、感染増悪が著しく、10 mg/kg 投与群で生残した 1 例では VT2 産生量の亢進が見られた。

考 察

VTEC 感染症の怖さはペロ毒素 (17, 25) の産生による。志賀毒素に類似する VT1 と、より

図 2. *E. coli* O157:H7 によるマウス経口感染に対する Bicozamycin の治療効果。(1) 治療後の盲腸内生菌数。

図3. *E. coli* O157:H7 によるマウス経口感染に対する Bicozamycin の治療効果。(2) マウス毎の盲腸内生菌数及び毒素量。

■: VT1, ▨: VT2, ◆: O157 生菌数, NFLX の 1 & 3.2 mg/kg 投与群は全例死亡

毒性が強いと言われる VT2 の産生は複雑に制御されており (5), 培地や好気・嫌気といった培養条件により産生量に変化したり, 各種の抗菌薬により菌体外への毒素の遊離が促進されたり, 産生自体が誘導されることも知られている (4, 7, 12)。いくら抗菌力の優れた抗菌薬を用いても, 毒素を誘導する作用が強ければむしろ感染を増悪してしまい, 死亡率を上げる可能性もあることから, VTEC 感染症の抗菌薬投与による治療

には慎重にならざるを得ない。FOM 投与は臨床でおおむね良好な結果が得られたとの報告 (15, 27) があるが, 本研究で用いたマウス実験感染における治療効果は顕著ではなかった。

BCM は *in vitro* において *E. coli* O157:H7 に対し中等度ながら均一な抗菌力を有し, ペロ毒素の産生も抑制した。プラスミド由来の耐性も認められていない (2)。嫌気条件下で活性が増強することも腸管感染症の治療には有利に作用すると

考えられる。KM 耐性菌にも有効であることと共に嫌気培養では明らかに抗菌力が低下した KM に比較してメリットとなることが想定される。FOM, NFLX, KM および ST との併用効果についても検討したが、相乗効果はみられなかったものの相加効果が得られ、いずれの抗菌薬とも拮抗現象はみられなかった (Data not shown)。

BCM の VTEC に対する効果は *in vivo* でさらに優れていた。SM によりマウスの腸内フローラを攪乱し O157 を経口接種すると、死亡には至らないが菌の腸管 (盲腸) 内定着が見られた。この系を用いて BCM の治療効果を検討したところ、10 mg/kg の低用量から明らかな菌数減少が見られ、対照とした FOM, CFIX および NFLX より優れた菌数減少効果を示した (図 2)。加えて BCM 投与群ではベロ毒素がほとんど検出されなかったが、これは蛋白合成を阻害する作用に基づくと考えられる。一方、他の抗菌薬では用量によりベロ毒素の増加傾向が見られた。さらに NFLX の 1, 3.2 および 10 mg/kg では、マウスが死亡し、10 mg/kg で生残した 1 匹では菌数はやや減少していたものの VT2 が増加しており、*in vitro* における毒素産生誘導作用から推定して毒素産生量の増加が死亡原因となっている可能性が示唆された。

臨床ではセフェムとキノロンは VTEC には有効ではなく、FOM も KM も 100% 有効とは言えないようである。何らかの抗菌薬投与が必要であり、特効薬と言える薬が待ち望まれている。

野外では VTEC の血清型は O157:H7 だけでなく多様であるが、BCM は野外での研究において VTEC による子牛の下痢治療及び除菌にそれぞれ 87.5% 及び 86.6% 有効であったとの報告があり (14), VTEC による豚の浮腫病の治療に生菌製剤との併用にも問題がなく明らかな治療効果を示したことが報告されている (28)。

BCM を筋注すると、変化を受けることなく速やかに種々の組織内に分布し、大部分が変化を受けることなく尿に排泄されるが、経口投与での吸収性は良好ではない (18)。経口投与された BCM の大部分は消化管内に留まり、ほとんどは未変化体のまま糞便に排泄される (20) ため副作用もほとんどない。

ヒトの VTEC 感染症の原因となる可能性から、家畜の VTEC 除菌が問題となっている。抗菌スペクトラムの狭い BCM は腸内フローラを乱しにくく (13)、副作用の少ない VTEC 除菌薬としての有用性が期待される。

謝 辞

非会員共同研究者である若井好美、池本晶子研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) Carrano, L., Bucci, C., Pascalis, R.D., Lavitola, A., Manna, F., Corti, E., Bruni, C.B., Alifano, P. (1998): Effects of bicyclomycin on RNA-and ATP-binding activities of transcription termination factor rho. *Antimicrob Agents Chemther* **42**, 571-578.
- 2) 深田志計美, 横田 建 (1976): グラム陰性桿菌の Bicyclomycin 耐性と R 因子. *Chemotherapy* **24**, 493-497.
- 3) 福田 靖, 網 康至, 永田典代, 須崎百合子, 小宮貴子, 長岡芳昭, 荒川宜親, 倉田 毅, 渡辺治雄, 高橋元秀 (1997): 大腸菌 O157 感染マウスにおける発症機序の解析. 第78回日本細菌学会関東支部総会
- 4) 本田武司 (1997): 腸管出血性大腸菌 O157 の毒素と抗菌薬. *小児感染免疫* **9**, 163-168.
- 5) 飯島義雄, 本田武司 (1997): EHEC 産生毒素 Verotoxin の毒性発現機序. *日本臨床* **55**, 646-650.
- 6) 伊藤 武 (1998): 人畜共通感染症としての腸管出血性大腸菌感染症. *小児内科* **30**, 740-744.
- 7) 伊藤輝代, 秋野恵美, 平松啓一 (1997): 腸管出血性大腸菌 O157 に用いる抗生物質の検討. *感染症学雑誌* **71**, 130-135.
- 8) 伊豫田淳, 寺島 淳, 和田昭仁, 泉谷秀昌, 田村和満, 渡辺治雄 (2000): 腸管出血性大腸菌の分子疫学. *日本細菌学雑誌* **55**, 29-36.
- 9) 城 宏輔 (1998): 腸管出血性大腸菌感染症と抗菌薬治療. *小児内科* **30**, 787-793.
- 10) 厚生省 (1997.8.21): 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157 等) 感染症治療の手引き (改訂版), *小児内科* **30**, 808-812.
- 11) Magyar, A., Zhang, X., Kohn, H., Widger, W.R. (1996): The antibiotic bicyclomycin affects the secondary RNA binding site of *Escherichia coli* transcription termination factor Rho. *J.Biol.Chem.* **271**, 25369-25374.

- 12) 松本佳巳, 池本晶子, 横田好子 (1997): 腸管出血性大腸菌 O157:H7 検出用培地への cefixime の添加効果及び毒素産生に及ぼす各種抗菌薬の影響, 日本臨床微生物学雑誌 **7**, 111-119.
- 13) 峰 靖弘, 浅野英夫, 野々山重男, 西田 実 (1975): サルの腸内細菌叢に対する Bicyclomycin の影響, Chemotherapy **23**, 2585-2589.
- 14) Misawa, N., Sueyoshi, M., Uemura, R., Kakemizu, Y., Kawashima, K., Nagatomo, H., Kondo, F., Murakami, T., Takahashi, Y. (2000): Effect of bicozamycin on the eradication of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in calves. Microbiol. & Immunol. **44**, 891-896.
- 15) 森口直彦, 八木和郎, 山本 隆, 吉岡加寿夫, 久保修一 (1997): 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性と抗菌剤投与について一堺市での集団食中毒から一, The Japanese J. of Antibiotics **50**, 591-596.
- 16) 中 篤子, 本田武司 (1998): 腸管出血性大腸菌感染症の細菌学的特徴, 小児内科 **30**, 701-704.
- 17) 名取泰博 (1998): 腸管出血性大腸菌が産生する病原毒素と毒性発現機序, 小児内科 **30**, 705-708.
- 18) Nishida, M., Mine, Y., Matubara, T. (1972): Bicyclomycin, a New antibiotic IV. Absorption, excretion and tissue distribution. J. Antibiotics. **25**, 594-601.
- 19) 仁科徳啓, 品川邦汎 (1996): 家畜および食肉における Vero 毒素産生性大腸菌汚染. 臨床と微生物 **23** (臨増), 835-842.
- 20) 岡野圭介 (1986): ビコザマイシンについて. 家畜抗菌剤研究会報 No. 7, 72-89.
- 21) Park, H., Zhang, X., Moon, H., Zwiefka, A., Cox, K., Gaskell, S.J., Widger, W.R., Kohn, H. (1995): Bicyclomycin and dihydrobicyclomycin inhibition kinetics of *Escherichia coli* rho-dependent transcription termination factor ATPase activity. Arch. Biochem. Biophys. **323**, 447-454.
- 22) 竹田多恵 (1997): エマージング腸管病原菌. 科学 **67**, 112-118.
- 23) 渡辺治雄 (1998): 腸管出血性大腸菌 O157 の病原性と分子疫学. 臨床と微生物 **25**, 167-172.
- 24) 山本達男, 脇阪紀子 (1998): 本邦における抗菌薬耐性腸管出血性大腸菌の出現状況と対策. 日本臨床 **56**, 2718-2729.
- 25) 山崎伸二, 竹田美文 (1996): Vero 毒素の構造と生物活性. 臨床と微生物 **23** (臨増), 785-799.
- 26) Yanofsky, C., Horn, V. (1995): Bicyclomycin sensitivity and resistance affect rho factor-mediated transcription termination in the *tna* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**, 4451-4456.
- 27) 余 明順, 青木隆一, 赤尾 満, 坂上賀洋, 螺良英郎, 本田武司 (1997): 1996年堺市を中心に発生した腸管出血性大腸菌 O157 食中毒に関するアンケート集計報告, 感染症学雑誌 **71**, 1144-1154.
- 28) 由地裕之, 辻 厚史, 末吉益雄 (2000): 生菌製剤および抗菌剤の併用による豚の浮腫病防除対策. 家畜診療 **47**, 423-428.
- 29) Zwiefka, A., Kohn, H. (1993): Transcription Termination Factor rho: The Site of Bicyclomycin Inhibition in *Escherichia coli*. Biochemistry. **32**, 3564-3570.

Activity of Bicozamycin against *Escherichia coli* O157 : H7 Producing Vero Toxins

Yoshimi MATSUMOTO

Medicinal Biology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka, 532-8514, Japan

Bicozamycin (BCM) which inhibits protein synthesis by inhibiting Rho-dependent transcription termination factor ATPase activity is used for treatment of animal infections.

BCM had moderate activity of MIC 16–32 µg/ml against enterohemorrhagic Verotoxin (VT)-producing *Escherichia coli* (EHEC) O157 : H7 and inhibited production of VT1 and VT2. The activity of BCM against EHEC was slightly higher in anaerobic conditions, and was more evident *in vivo*. BCM decreased CFUs of EHEC in caecum more effectively than fosfomycin, cefixime and norfloxacin in a mouse infection model. Moreover, BCM did not increase the amount of either VT1 or VT2 in caecum in mice. In contrast, norfloxacin increased mortality of mice infected with EHEC by inducing VT production. The results suggest that BCM is useful for the treatment of EHEC infection and eradication of EHEC.

Dairy live stock, especially young animals, have been implicated as a principal reservoir of EHEC. Eradication of EHEC from live stock will become an important problem in the near future. The narrow spectrum antibiotic BCM is expected to be a safe and effective antibiotic to eradicate EHEC from live stock.