膀胱炎患者由来、大腸菌の薬剤耐性の年次変化

荒 木 康 久, 林 不二雄, 石 井 宏 志

伊予部 志津子, 橋 本 一

群馬大学医学部微生物学教室 (主任: 橋本 一)

(昭和63年 8月31日 受付)

はじめに

臨床分離細菌の薬剤耐性化は各菌種とも広く使用される薬剤によって選択されて生ずると考えられている。従って抗菌剤の使用種類と使用頻度の変化に伴い、新しい薬剤耐性型が生じてくる。しかし同一病院における同一疾患について、その起因菌を長年にわたり検討した報告例は少ない。そこで著者らは過去に報告¹⁾した例と今回調査した1983年、1987年の例とを比較し分離される起因菌に変化が生じているか、また従来、主たる起因菌であった大腸菌の薬剤耐性型、および薬剤耐性伝達株数の分離頻度に変化がみられるかどうかを検討した。

材料および方法

1. 菌 株

高崎市佐藤病院において、1975年、1978年、1983年および1987年に外来で、膀胱炎またはその疑いと診断された1,219名の患者尿より 10^3 /ml以上の菌数が分離された菌種を起因菌とし、分離した総数654株の菌種を検査室の常法に従い同定した。大腸菌の薬剤耐性伝達の受容菌は大腸菌K-12, ML1410 (met⁻, nal-r) およびK-12, W3110 (arg⁻)を用いた。なおarg⁻はアルギニン要求, met⁻はメチオニン要求, nal-rはナリジキシン酸耐性 (200 μ g/ml)を示している。

2. 培地および使用薬剤

液体培地、ブレンハートインフュージョン (BHI, Difco) は菌の増殖用培地として、BTB 寒天培地 (栄研) は伝達性薬剤耐性測定用培地としてそれぞれ用いた。サルファ剤 (Su) の薬剤耐性測定に限りミューラーヒントン培地を用いた。

耐性菌選択のためには各薬剤について次の略号と選択濃度を用いた。テトラサイクリン (Tc, 12.5 μ g/

ml), クロラムフェニコール (Cm, 12.5 μ g/ml), ストレプトマイシン (Sm, 12.5 μ g/ml), アミノペニシリン (Ap, 25 μ g/ml), ゲンタマイシン (Gm, 3.1 μ g/ml), スルホンアミド (Su, 800 μ g/ml), リファンピシン (Rp, 25 μ g/ml), カナマイシン (Km, 25 μ g/ml), セファロリジン (Cer, 6 μ g/ml), ナリジキシン酸 (Na, 25 μ g/ml)

3. 薬剤耐性測定と伝達株の検出

薬剤耐性測定は化学療法学会法²⁾によった。薬剤耐性伝達は BHI 液体培地で37°C一夜培養した供与菌0.1mlと受容菌0.9mlに新しくブイヨン0.5mlを加え、中試験管内で、37°C静置培養した。2時間後、混合菌液を直接または適当に滅菌 PBS (NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, 蒸留水 1l) で希釈した後、その0.1mlを各薬剤を含む選択平板に塗抹した。37°C一夜培養後、平板上に増殖した菌集落を各選択薬剤平板から数個のコロニーを釣菌し、それぞれの薬剤を含む平板に画線塗抹しその薬剤耐性型を調べた。薬剤耐性伝達頻度は用いた供与菌数当り得られた接合伝達株数で表わした³⁾。

結 果

1. 各菌種の分離率

表1に分離した654株の年次別内訳を示した。起因菌の分離頻度は高い順に大腸菌433株、表皮ブドウ球菌62株、クレブシエラ45株、プロテウス31株、緑膿菌30株、等であった。大腸菌は各年次とも60%以上分離され、膀胱炎の主たる起因菌と考えられる。表皮ブドウ球菌は1975年、1978年に比して最近の分離率はむしろ減少傾向にある。反面、クレブシエラ、アルカリゲネスおよびサイトロバクターの分離頻度は上昇している。高頻度に分離された大腸菌について、次に薬剤耐性型および耐性伝達の検討を加えた。

表1 膀胱炎の起因菌の年次別分離頻度

菌種	年次	1975	1978	1983	1987	合 計
<i>E. coli</i>		125(62.2)	166(69.2)	92(70.2)	50(61.0)	433
<i>S. epidermidis</i>		27(13.4)	28(11.7)	3(2.3)	4(4.9)	62
<i>K. pneumoniae</i>		10(5.0)	12(5.0)	13(9.9)	10(12.2)	45
<i>P. mirabilis</i>		9(4.5)	15(6.2)	4(3.1)	3(3.7)	31
<i>P. aeruginosa</i>		17(8.4)	9(3.8)	1(0.8)	3(3.7)	30
<i>A. faecalis</i>		3(1.5)	5(2.1)	9(6.5)	7(8.5)	24
<i>Micrococcus</i>		2(1.0)	2(0.8)	2(1.6)	1(1.2)	7
<i>C. freundii</i>		1(0.5)	1(0.4)	2(1.6)	2(2.4)	6
<i>S. marcescens</i>		1(0.5)	0	1(0.8)	0	2
<i>S. flexneri</i>		0	0	1(0.8)	0	1
<i>A. xylosoxidans</i>		0	0	1(0.8)	0	1
Others		6(3.0)	2(0.8)	2(1.6)	2(2.4)	12
合計		201	240	131	82	654

2. 大腸菌の薬剤耐性

各種抗菌剤に対する耐性菌の年次別分離頻度を表2に示した。Tc, Cm 耐性菌の分離はいずれも1975年に比して漸次減少傾向にある。Sm, Su 耐性も変化が大きいが1987年には低率となった。Ap 耐性に著変はないので現在は TC, Sm, Su と同程度の分離率になった。Km 耐性菌は1978年を除き5%の低率に変っていない。1978まで Rp, Cer 耐性菌は分離されていなかったが1983年以降わずかながら分離されている。しかし Gm や Na 耐性菌は今回の調査でも

分離されなかった。

3. 大腸菌の耐性型と伝達性

これらの耐性株を Tc, Cm, Sm, Su を中心とした耐性型として分類し、さらにその伝達性をみたのが表3である。古くから使用されてきた薬剤を反映して TC, Cm, Sm, Su 4 剤耐性菌が1978年以前は耐性菌の中で最も多く、70%以上の分離率を示しているにもかかわらず、1983年以降では25%以下に低下している。その分、3 剤, 2 剤, 単剤が増加している。3 剤耐性菌では Tc, Sm, Su 型が2 剤耐性菌では

表2 各薬剤に対する耐性大腸菌の分離率

薬剤耐性	年次	1975	1978	1983	1987	合計
Tc		62(50)	59(36)	28(30)	11(22)	160
Cm		52(42)	38(23)	24(26)	6(12)	120
Sm		63(50)	51(31)	42(46)	16(32)	172
Su		72(58)	64(39)	39(42)	13(26)	188
Km		6(5)	14(8)	5(5)	2(4)	27
Ap		31(25)	42(25)	30(33)	13(26)	116
Gm		0	0	0	0	0
Na		0	0	0	0	0
Rp		0	0	4(4)	1(2)	5
Cer		0	0	8(9)	3(6)	11
感受性株数		10(8)	27(16)	7(8)	15(30)	59
検査株数		125	166	92	50	433

接種菌量: 10^5 /ml 相当菌液より 5μ l接種

大腸菌の薬剤耐性

表3 大腸菌から得られた薬剤耐性伝達株の分離頻度

耐性型	分離株数	薬剤耐性伝達株数	年次別伝達株分離頻度			
			1975	1978	1983	1987
Tc, Cm, Sm, Su, Km, Ap	17	15	3/3	10/10	1/3	1/1
Tc, Cm, Sm, Su, AP	53	36	12/21	20/23	3/7	1/2
Tc, Cm, Sm, Su, Km	2	1	1/2			
Tc, Cm, Sm, Su	107	69	32/50	30/41	5/11	2/5
小計	179	121(68) ^{a)}	48/76(63)	60/74(81)	9/21(43)	4/8(50)
Tc, Sm, Su, Km, AP	1	0				0/1
Tc, Sm, Su, Ap	3	1			1/3	
Tc, Sm, Su, Km	1	0			0/1	
Tc, Sm, Su	14	5	3/3	1/3	1/6	0/2
Tc, Cm, Su, Ap	1	0		0/1		
Tc, Cm, Su	8	2		2/8		
Cm, Sm, Su, Km, Ap	1	1			1/1	
Cm, Sm, Su, AP	3	1			1/3	
Cm, Sm, Su	7	3	1/1	0/1	2/5	
Tc,Cm,Sm	2	0				0/2
小計	41	13(32)	4/4(100)	3/13(23)	6/19(32)	0/5(0)
Sm, Su, Ap	7	2			1/3	1/4
Sm, Su	25	8	3/7	1/2	3/11	1/5
Tc, Sm, Km, Ap	1	1		1/1		
Tc, Sm, Ap	1	0			0/1	
Tc, Sm	9	4	0/1	2/2	1/5	1/1
Tc, Cm, Ap	2	1		1/2		
Tc, Cm	5	3	0/1	2/2	1/2	
Cm, Sm, Ap	1	0			0/1	
Cm, Sm,	2	0			0/2	
Tc, Su	9	1	1/3	0/5	0/1	
小計	62	20(32)	4/12(33)	7/14(37)	6/26(24)	3/10(30)
Tc, Ap	3	1		1/1	0/1	0/1
Tc	21	8	3/4	5/11	0/4	0/2
Su, Ap	2	2		2/2		
Su	25	8	0/7	8/15	0/1	0/2
Sm,Ap	2	1			1/2	
Sm	10	3		2/3	1/5	0/2
Ap	16	8	2/2	5/5	1/5	0/4
小計	79	31(39)	5/13(39)	23/37(62)	3/18(17)	0/11(0)
総計	361	185(51)	61/105(58)	93/138(67)	24/84(29)	7/34(21)

^{a)}薬剤耐性伝達株数/分離株数(%)

Sm, Su 型が最も多く, これは表 2 でみられるように先ず Cm 耐性が次に TC 耐性が減少してきたことを反映している. それぞれの耐性型において, 伝達性, つまり伝達性 R プラスミドの有無を調べると表 3 に示すごとく, 全体で以前は約 60% も分離されていたにもかかわらず 1983 年には 29%, 1987 年には 20% に減少していた.

考 察

新井⁴⁾, 田波⁵⁾, 下口⁶⁾ らの報告では尿から検出率の高かった大腸菌が最近著減しており, それに代って腸球菌の著増がみられたとし, その原因は最近のセフェム系抗生物質多用の結果と報告している. しかし膀胱炎起因菌を外來患者と入院患者にわけて調べた他の報告例では外來患者例で依然として大腸菌が高頻度に分離されている^{7,8)}. 材料別にみた報告例でも尿からは最も多く大腸菌が検出されている^{9,10)}.

腸球菌の交代は第 3 世代セフェム抗生剤を多用する大病院, 特に入院患者にみられる現象と考えられる. 我々の調査では 10 年前と変わらず膀胱炎患者の主たる起因菌は大腸菌で分離菌の 60% を占めた. 菌交代が著明でないのは病院の規模が小さく, 外來患者が多いためと考えられた. 大腸菌の薬剤耐性菌分離報告例はすでに多数見られる. それによると治療薬剤の変遷に伴って耐性菌が変わってゆく傾向にある. 現在では Tc, Cm, Sm は膀胱炎をはじめとする尿路感染症にほとんど使用されず, 代って Penicillin 系抗生剤や新キノロン剤が主流になっている. 大川¹¹⁾ らによると膀胱炎患者からの β -lactamase 産生菌の分離頻度が比較的增加傾向にあるとしている. 我々の例で Ap 耐性株が 1975 年以来 1987 年まで減少傾向がみられない原因も上述した点にある.

Tc, Cm, Sm, Su 4 剤耐性菌の分離率は減少し代って 3 剤, 2 剤, 単剤耐性菌が増加している. この原因は臨床で, Cm, Sm, Tc 薬剤と接触しなくなった結果, 何んらかの理由で耐性マーカーを失った臨床分離株の出現が生じてきているものといえる. 10 年以上, 薬剤に触れることのなかった保存株をそのまま調べてみると, 薬剤耐性伝達株の耐性マーカーが失われていることが認められた (データ, 未発表). in vivo 同様, in vitro でも薬剤に触れないと一度獲得したマーカーも自然脱落するものと思われる. その際, 多剤耐性が一度に脱落する

とは限らず, いずれかの耐性マーカーを失い多剤からより簡単な耐性型に変化したものもあった. これはプラスミド性の薬剤耐性遺伝子の一部欠損による場合もあり, また多剤耐性株が複数のプラスミドの存在による場合, 一方を失って少数の耐性遺伝子をもつプラスミドだけが残ることも考えられる. 非伝達性 Sm, Su 耐性プラスミドが多剤耐性 R プラスミドと共存する例はよく知られており¹²⁾, 近年の耐性型の変化は Cm, Tc マーカーを含む R プラスミドの脱落のためと考えられる.

一般に各菌種とも多剤化の傾向にあるというのが定説であるが, これらの報告は大学病院や大病院で難治性疾患より分離される菌株が対象で, 当然新薬等の治療による薬剤耐性菌の選択維持を意味する場合が多く, 薬剤の多用されない病院または外來では感受性化の傾向も考えられる. 薬剤耐性伝達株の分離率をみると 1975 年, 1978 年頃は 60% 検出されていたにもかかわらず 1983 年は 30%, 1987 年には 20% と減少している. これは伝達を支配するプラスミド上の伝達領域に何んらかの変異が生じて伝達不能になった結果なのか, もともと伝達性株が減少し非伝達株が増加したのか不明である. 田中¹³⁾ らによると赤痢菌で最近 Ap 耐性株が増加し, しかも Ap 耐性株の薬剤耐性伝達が認められないのにプラスミドとして存在する株が増加している. 遺伝学的に検討した結果, Ap 耐性遺伝子がプラスミド上の伝達領域にトランスポジションして伝達能力を失わせている可能性を示唆している. 今回の調査では Ap 耐性株の伝達株分離頻度は, Tc, Cm, Sm, Su 耐性株の場合と同じく 50~60% 程度で大差はないが, 今後の推移を検討する必要がある.

1987 年分離株で伝達のみられなかった単剤, 2 剤耐性菌より簡便法で DNA を抽出するとプラスミドとして存在している場合が多く (データ, 未発表), しかも DNA の大きさが小さくコピー数も多いことから, 非伝達性プラスミドとして存在し易いとも推定された. 1978 年までは Rp, Cer の抗菌剤に対する耐性菌は認められなかったが 1983 年以降, わずかながら出現してきた. Gm, Na 耐性菌は現在のところ検出されていない. 今後, これらの耐性菌の出現にも注目してゆく予定である.

要 約

1975~1987 年に分離した膀胱炎起因菌の分離およ

び大腸菌の薬剤耐性型、耐性伝達株の検出から下記のことがわかった。

1. 膀胱炎起因菌分離頻度は大腸菌が一番高く60%台を維持し、それに次いで表皮ブドウ球菌、クレブシエラ、プロテウス、緑膿菌、アルカリゲネスの順であった。ブドウ球菌は減少し、クレブシエラ、アルカリゲネス菌は増加傾向にあった。
2. 各薬剤に対する耐性大腸菌の推移では Ap 耐性株は変わらず、Tc, Cm, Su 耐性株の分離が減少傾向と認められた。また Rp, Cer 耐性株がわずかながら出現してきた。
3. 大腸菌から検出される薬剤耐性伝達株は少なくとも当病院で見る限り分離率に減少傾向が認められた。

文 献

- 1) 荒木康久他：膀胱炎患者から分離された菌種およびその薬剤耐性についての研究。産科と婦人科., 48 (6): 97-101, 1981.
- 2) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy., 29: 76-79, 1981.
- 3) 中谷林太郎他：R プラスミドの分子遺伝学的実験法, 1 版, 菜根出版, 東京, 1983, 8-11.
- 4) 新井俊彦, 鈴木恵三：最近の尿路感染症, 特に急性膀胱炎を中心として分離される細菌とその薬剤感受性。The Japaness. J. Antibiotics, XXXVI-10, P2750-2756, 1983.
- 5) 田波 洋：臨床分離株の薬剤感受性の現在値。診療と新薬., 第21巻, 第12号, P47-64, 1984.
- 6) 下口和矩他：長崎大学医学部附属病院における臨床分離菌の変遷と薬剤感受性。化学療法の領域, 3: 78-86, 1987.
- 7) 屋形 稔他：新潟大学医学部附属病院における臨床分離菌の変遷と薬剤感受性。化学療法の領域, 3: 97-104, 1987.
- 8) 川上由行他：信州大学医学部附属病院における臨床分離菌の変遷。化学療法の領域, 4: 96-104, 1988.
- 9) 橋本 一他：群馬県における1986年分離病巣由来菌の同定と薬剤耐性。北関東医学, 38: 289-296, 1988.
- 10) 河村信夫：膀胱炎。臨床と微生物, 13: 23-29, 1986.
- 11) 大川光央他：急性単純性膀胱炎患者からの β -lactamase 産生菌の分離頻度。泌尿紀要, 33: 1800-1805, 1987.
- 12) Yasuhisa Araki, et al: Characterization and Mobilization of Nonconjugative Plasmids Encoding Resistance to Streptomycin and Sulfanilamide. Microbiol. Immunol. 31: 1107-1111, 1987.
- 13) 田中徳満, 橋本一：赤痢菌の薬剤耐性と R プラスミド。日本の感染性腸炎, 初版, 菜根出版, 東京, 75-91, 1986.

**INCIDENCE OF BACTERIAL SPECIES ISOLATED FROM CYSTITIS
AND DRUG RESISTANCE PATTERN OF *ESCHERICHIA. COLI***

**YASUHISA ARAKI, FUJIO HAYASHI, HIROSHI ISHII
SHIZUKO IYOBE, HAJIME HASHIMOTO**

Department of Microbiology, Gunma University School
of Medicine, Maebashi 371, Japan.
(Director : Prof. Hajime Hashimoto)

A total of 654 bacterial strains were isolated from urine specimens of 1,219 female patients with uncomplicated cystitis from 1975 to 1987 in Sato Hospital, Takasaki City. *Escherichia coli* strains were isolated at the highest frequency 66%, followed by *Staphylococcus epidermidis* (9.5%), and *Klebsiella pneumoniae* (6.9%). Strains of the major causative bacterium, *E. coli*, were then examined for their drug resistance and their conjugal transferability. The frequency of isolation Ap-resistant strains and km-resistant strains did not change during 12 years, while those of Tetracycline-, Chloramphenicol- or Streptomycin-resistant strains decreased. The frequency of isolation of strains that could transfer their drug-resistance was about 60% in 1975 and decreased to 20% in 1987.

Key words : Cystitis, *E. coli*, Drug-resistance, Transfer