

表5. 各種抗菌剤の腸管出血性大腸菌に対するMIC-3方法による比較

Drug	Walk Away		VITEK		栄研	
	MIC50	MIC90 range	MIC50	MIC90 range	MIC50	MIC90 range
ABPC	≦ 4.0	< 1.0 - 16 <	2.0	2.0 < 1.0 - 32 ≦	≦ 2.0	≦ 4.0 1.0-128 <
PIPC	< 8.0	< 8.0 - 64 <	≦ 8.0	< 8.0 < 8.0 - 128	ND	ND
CEZ	< 1.0	< 1.0 - 16 <	≦ 8.0	< 8.0 < 8.0 - 16	ND	ND
CCL	< 2.0	< 2.0 - 16 <	ND		≦ 2.0	≦ 4.0 0.5-128 <
CVA/AMPC	≦ 2.0	< 1.0 - 16 <	≦ 8.0	< 8.0 - 32 <	ND	ND
IPM	< 0.5	< 0.5 - 1.0	≦ 4.0	≦ 4.0	ND	ND
GM	< 0.5	< 0.5 - 2.0	≦ 0.5	< 0.5 - 1.0	ND	ND
MINO	< 1.0	< 1.0 - 8.0 <	≦ 2.0	< 2.0 - 16 ≦	≦ 1.0	≦ 2.0 0.5 - 16
FOM	< 4.0	< 4.0 - 16 <	≦ 16	< 16 - 32	≦ 2.0	≦ 16 0.5 - 512
ST	< 0.5	< 0.5 - 2.0 <	≦ 0.5	≦ 0.5	ND	ND
NFLX	ND		≦ 4.0	≦ 4.0	≦ 0.06	≦ 0.12 0.06-1.0
CP	ND		4.0	< 1.0 - 8.0	≦ 8.0	≦ 8.0 4.0 - 64

表6. 低感受性株に対する抗菌剤のMIC -3方法による比較

株No.	薬剤	MIC(μg/ml)		
		Walk Away	VITEK	70-ジンプレート(栄研)
10	ABPC	16<	32 ≧	128<
18	MINO	4	16 ≧	16<
37	FOM	16<	16<	32
49	FOM	16	32	32
52	FOM	< 4	≧ 16	256
61	ABPC	16<	32 ≧	128<
66	ABPC	16<	32 ≧	128<
	C/AM	16<	32 ≧	ND
	CCL	16<	ND	128<
68	ABPC	16<	32 ≧	128<
72	ABPC	16<	32 ≧	128<
73	ABPC	16<	32 ≧	128<
74	MINO	8	16 ≧	8
78	MINO	8<	≧ 2	8
79	CCL	< 2	ND	128<
	FOM	< 4	≧ 16	512
80	MINO	8<	16 ≧	8
82	ABPC	16<	32 ≧	128<
85	FOM	16<	≧ 16	16
113	ABPC	16<	32 ≧	128<

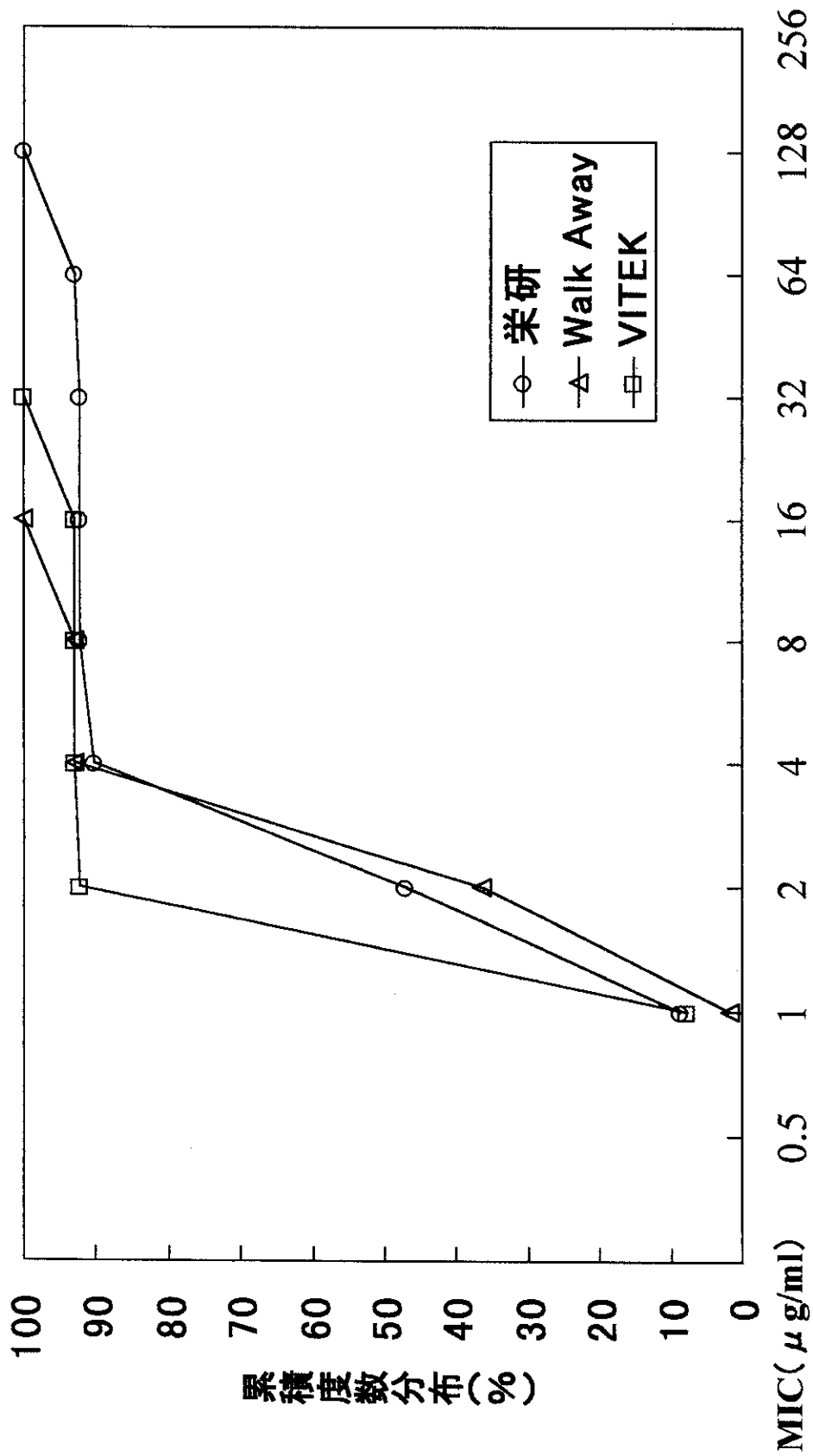


図1. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—ABPC—

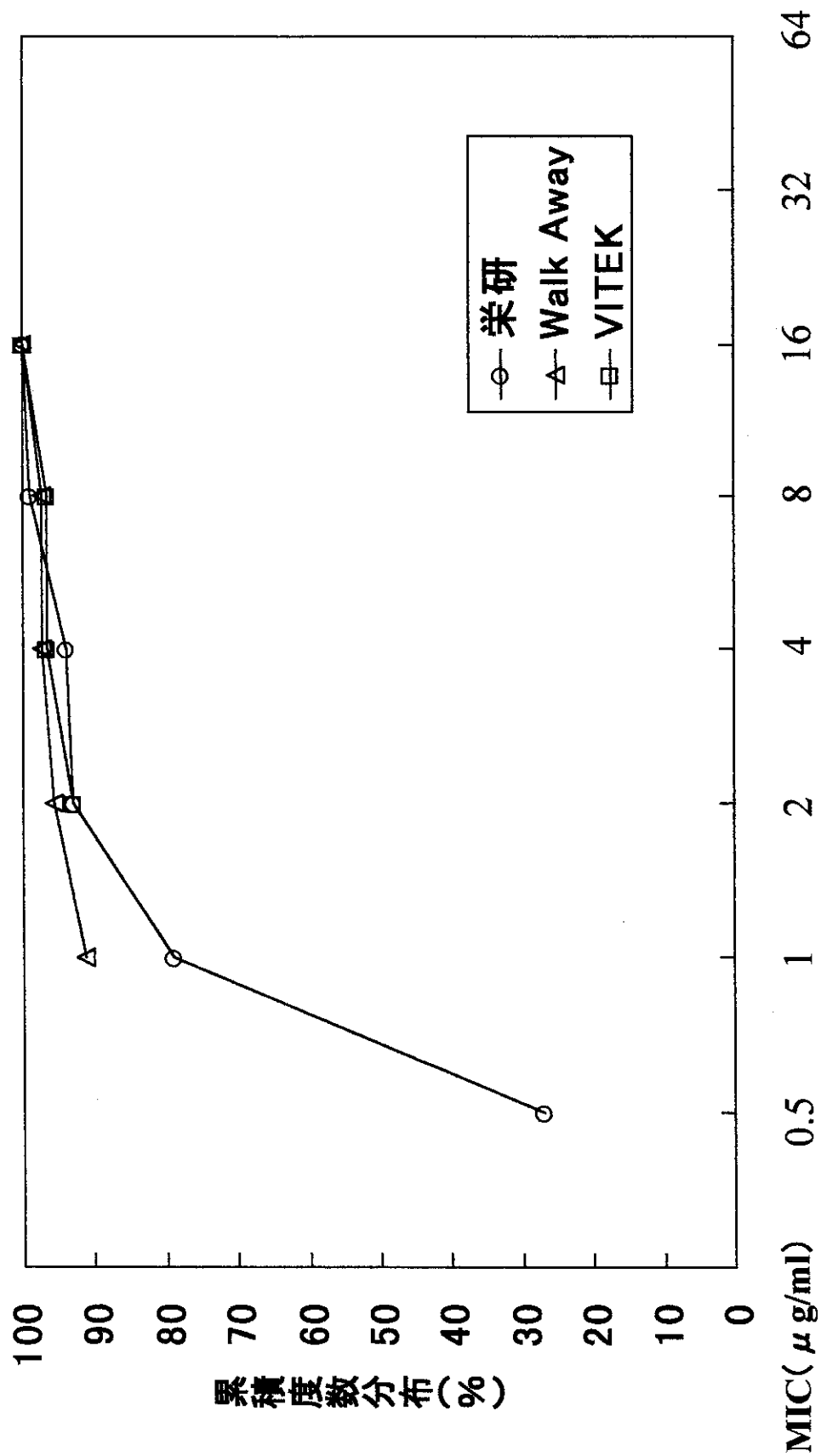


図2. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布 - MINO -

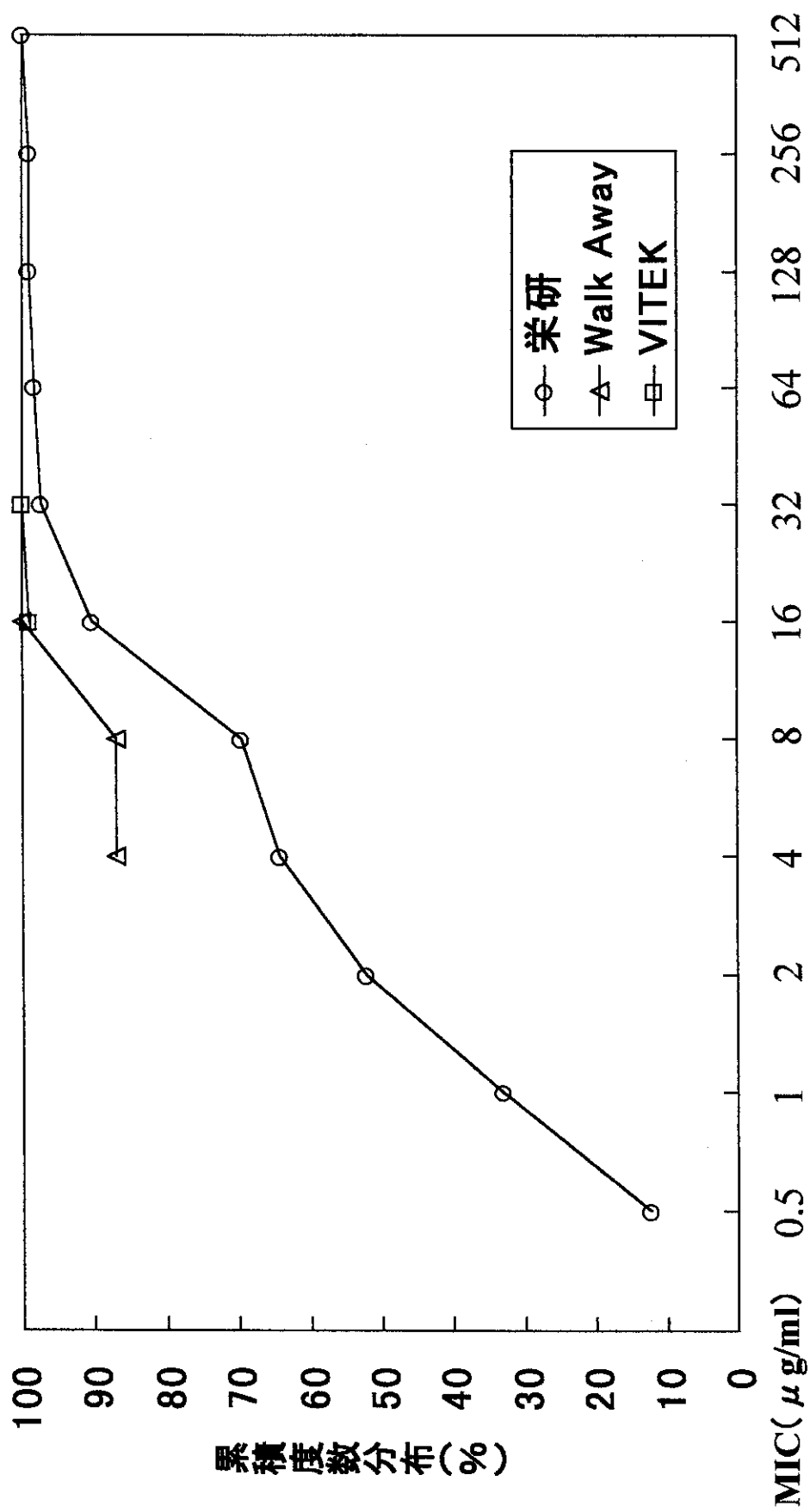


図3. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—FOM—

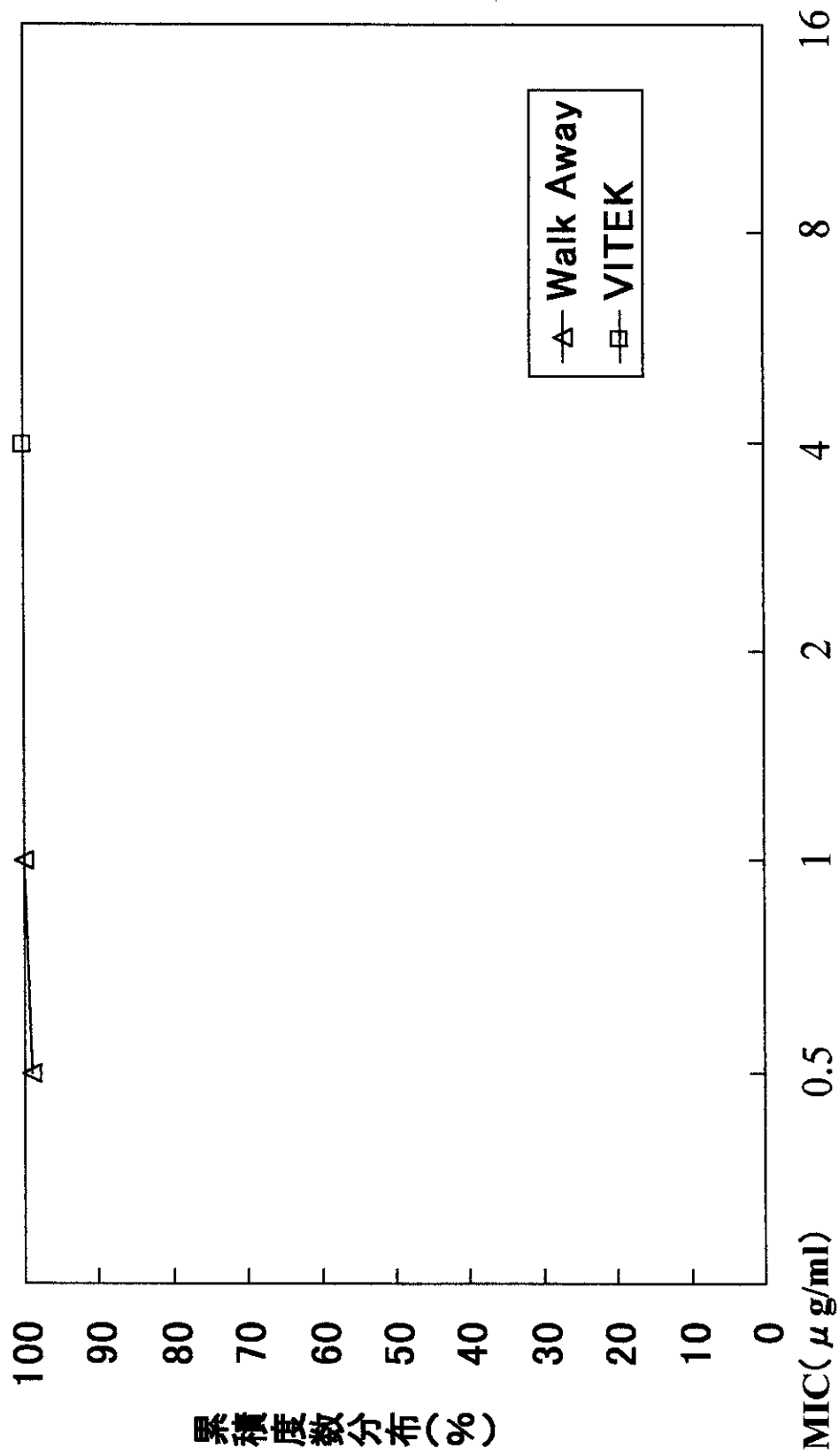


図4. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—IPM—

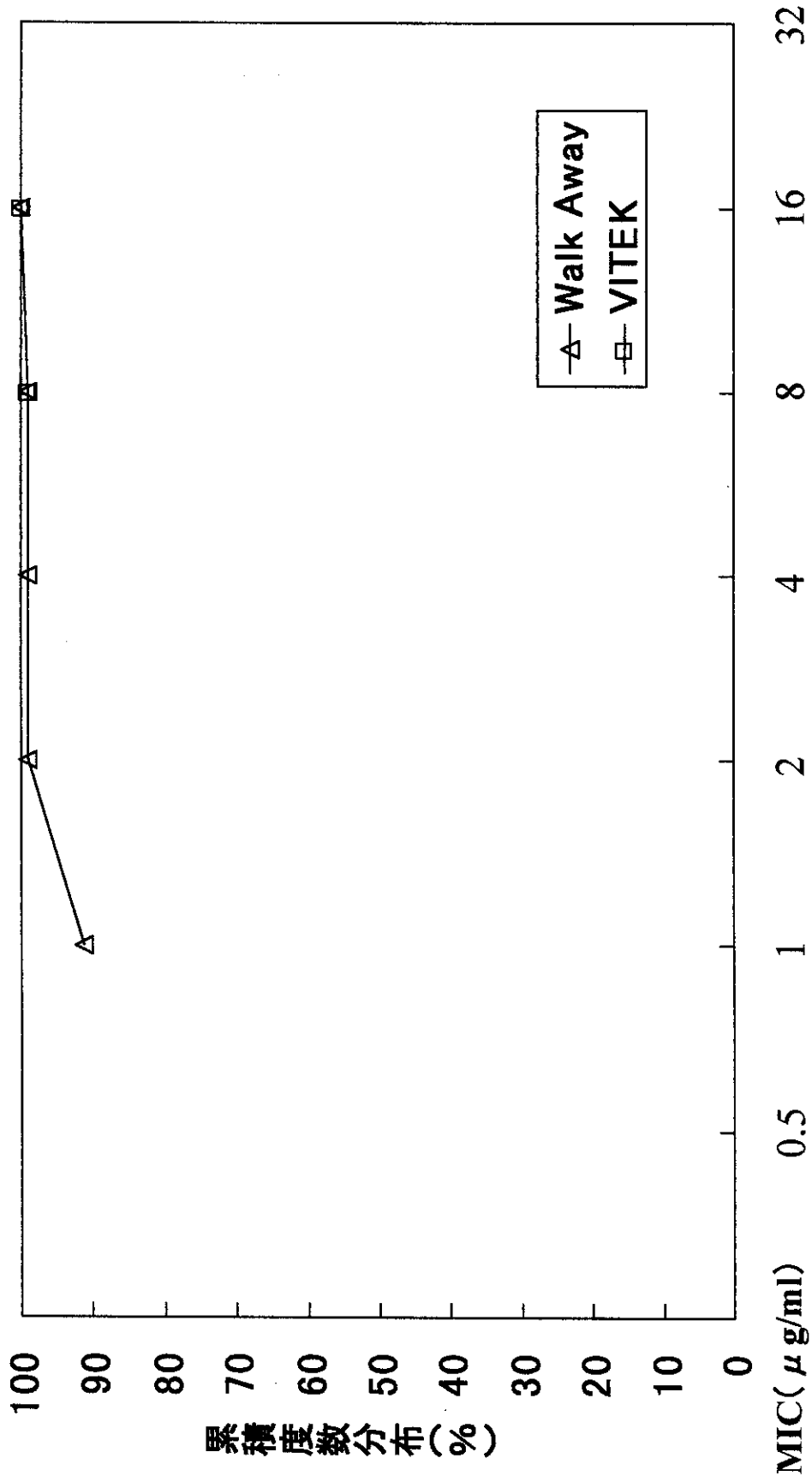


図5. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—CEZ—

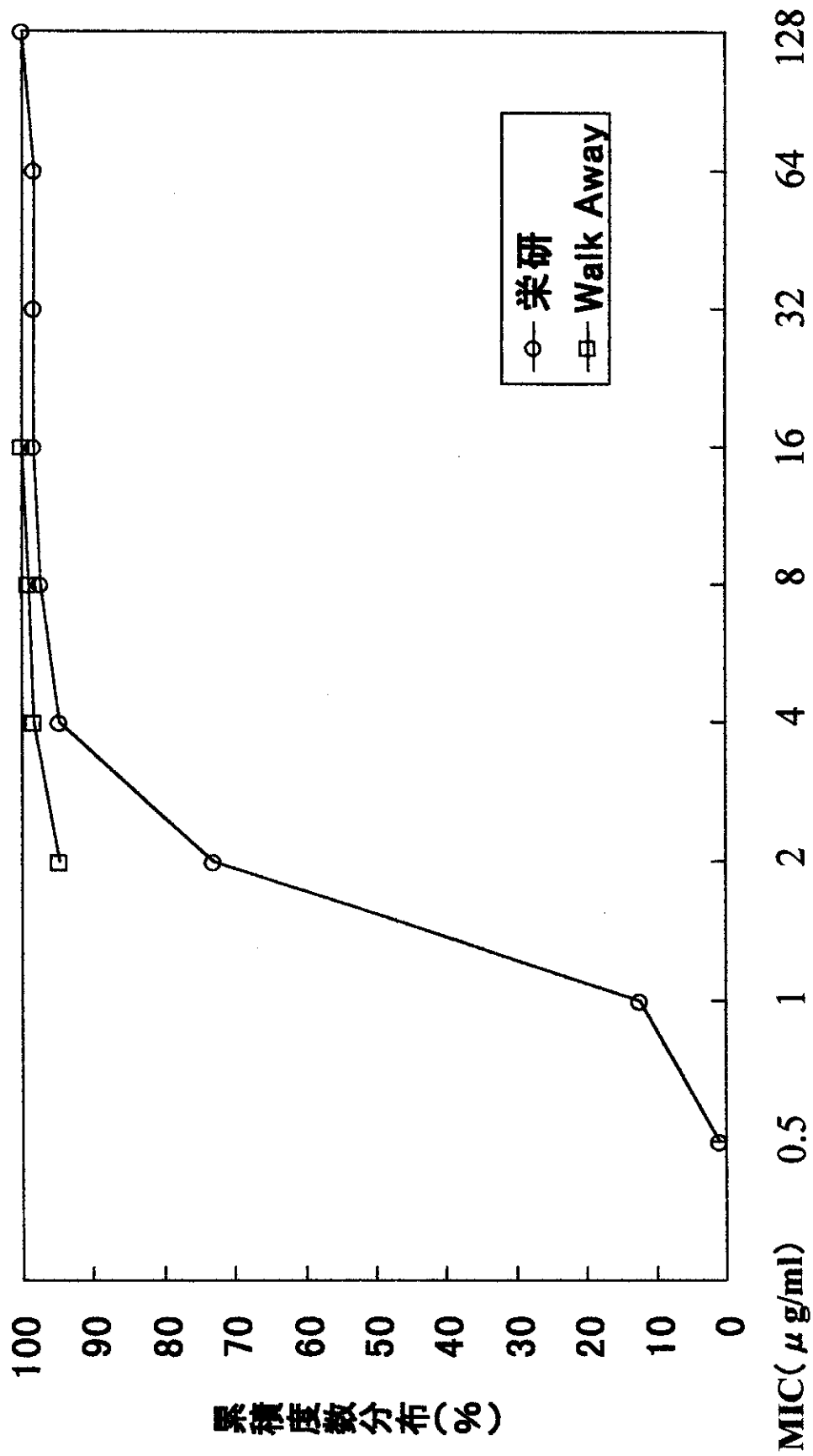


図6. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—CCL—

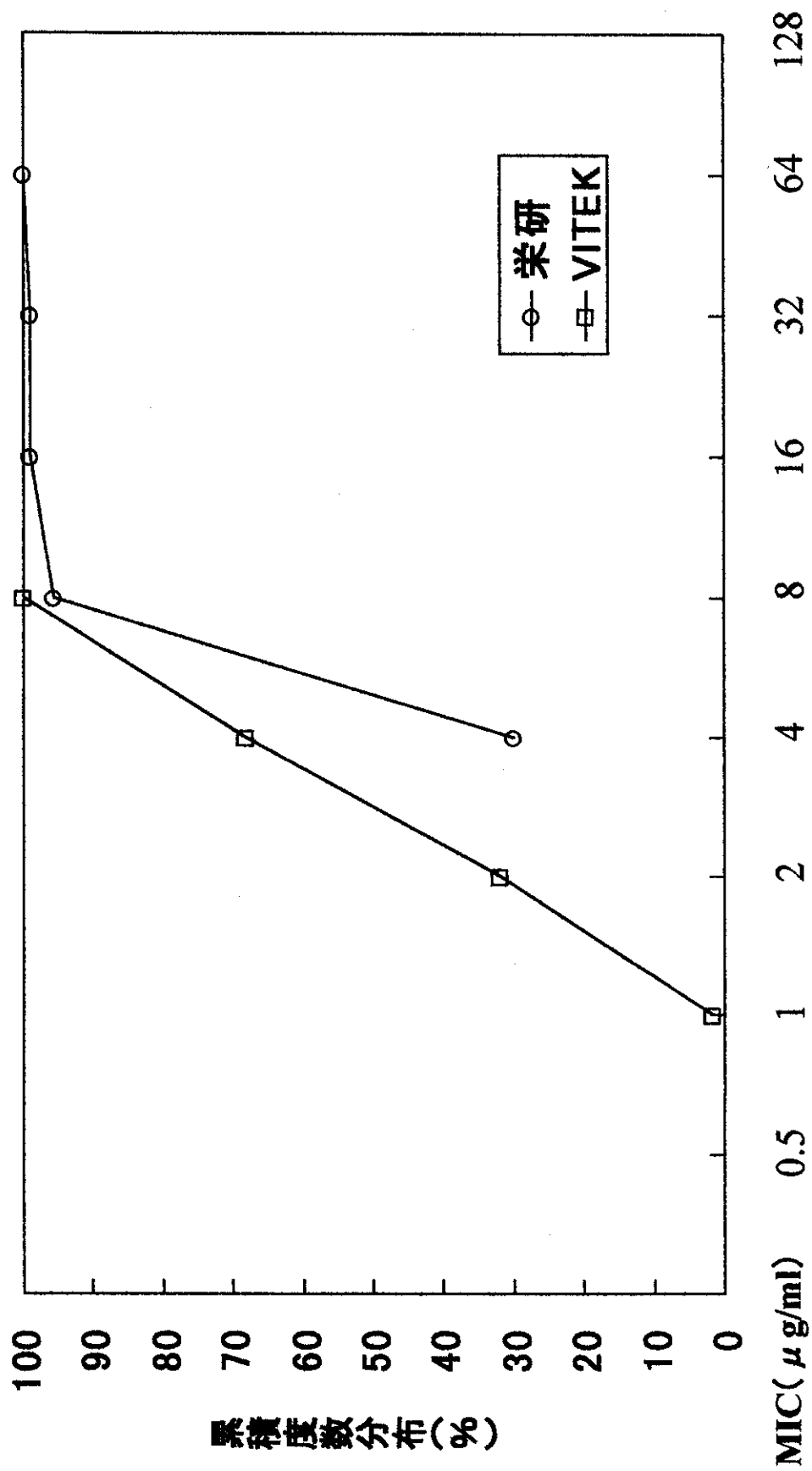


図7. 腸管出血性大腸菌の各種抗菌剤に対する感受性分布—CP—

10. 腸管出血性大腸菌O157:H7集団感染における抗生剤投与の有効性と安全性に関するretrospective study

分担研究者：佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座）

共同研究者：森田友明（森田小児科医院）、吉田新二（岩手県医師会）

一戸貞人（岩手医科大学小児科学講座 講師）

研究目的

O157等腸管出血性大腸菌感染症に対する殺菌性抗生剤の使用に関してはStxを放出させ溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome:HUS)の誘因になるために使用すべきでないとする考えがある。しかし、我々は、盛岡市の小学校におけるO157:H7の集団感染時にfosfomycin (FOM)、あるいはnorfloxacin (NFLX)などが感染者全員に投与されたが、一例もHUSが発生せずに感染が終息した経験をもつため、この集団の中で医療機関を受診し細菌検査および血液検査等のデータが得られている症例に対し、抗生剤投与の有効性と安全性についてretrospectiveに解析することを目的とした。

研究方法

(1) 抗生剤の有効性に関しては発症から抗生剤投与までの日数と発症から細菌培養が陰性化するまでの日数、下痢持続日数、腹痛持続日数との関係を統計解析した。(2) 安全性に関しては重傷化の指標の一つである白血球数また、その他の血液化学のデータも参考にした。

結果

発症から抗生剤投与までの日数と発症から細菌培養が陰性化するまでの日数に関しては相関係数(R)0.875と非常に高い相関を示し(図1)、抗生剤の投与が早ければ早いほど腸管内のO157を排除できていた。下痢持続日数との関係は相関係数(R)0.694であり、抗生剤投与が早かった症例においては下痢の持続日数が少ない傾向が認めら

れた(図2)。腹痛持続日数との関係は相関係数(R)0.261であり相関は認められなかった(図3)。安全性に関しては白血球数の推移をみたが、症例1から5まで検査初日の白血球数が最も高かったが、その後すべて正常範囲内で低下してゆき、白血球数が増多する症例はなかった。これに反し、散発性のHUS2症例(死亡例:HUS1は70歳男性、HUS2は4歳女児)では白血球数は増多するか減少しない傾向にあった(図4)。

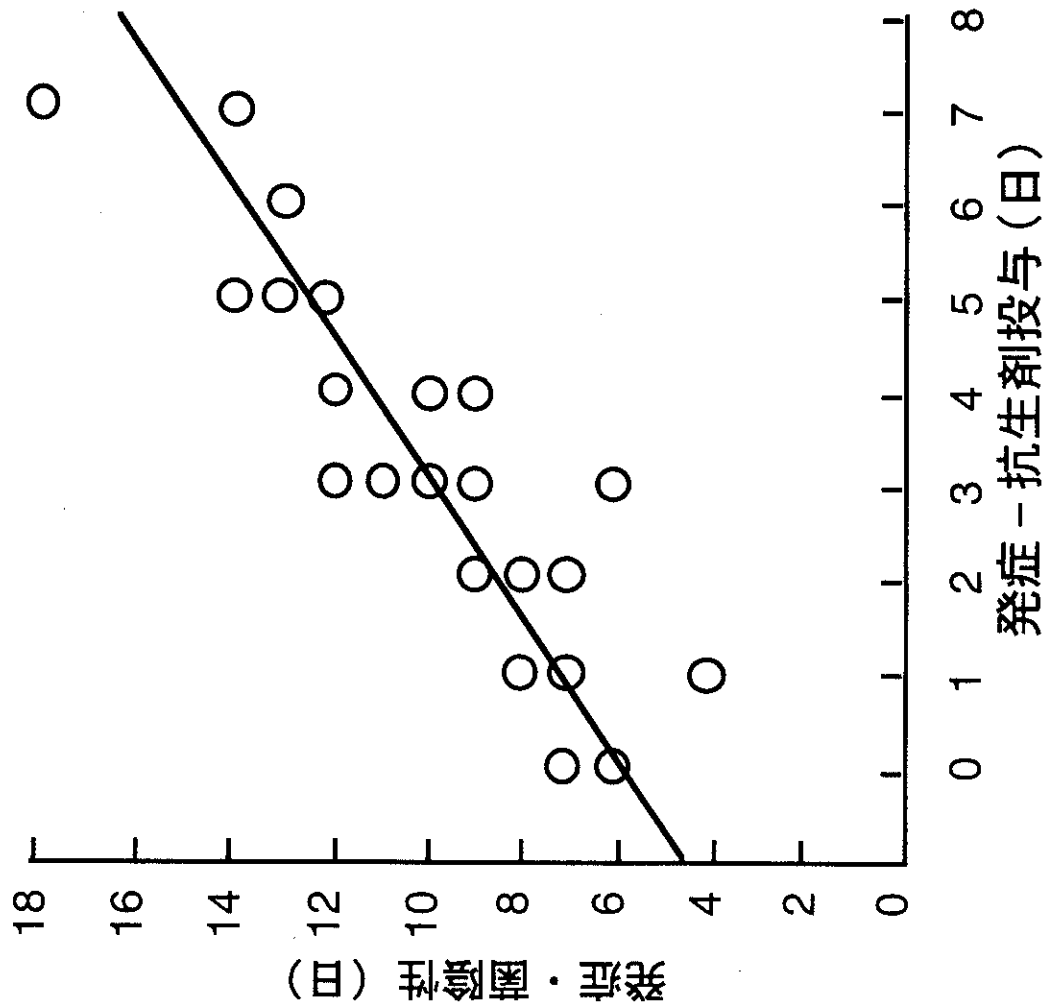
考察

O157:H7の小学生集団感染において、FOM、NFLXを主とした抗生剤の治療は腸管内の菌の陰性化に有用であり、かつ白血球の増多を招き、HUSを誘導するようなデータは得られていなかった。また、ヘモグロビン値、血小板数、CRP、腎機能検査、肝機能検査においても異常値を示す症例はみられなかったことから、今回の集団感染に対する抗生剤投与についての有効性、安全性は、ともに確認される結果となった。さらに、その後これら症例について、事件発生後4年を経過した今日まで、腎機能異常等の症候を示す症例は出ていない。

集団感染以後、岩手県では毎年散発性のHUS患者を経験し、細菌分離された症例のすべてがO157感染であったが、FOMなどの抗生剤投与でHUSの予後が悪化した症例は一例もでていない。従って、HUSへ進展する症例はO157感染の潜伏期の段階ですでに病態が決定していると考えられ、抗生剤投与については、HUS発症の時点からFOM、NFLXを使用してもHUSを悪化させ

ることではないと考えられる。また、FOM、NFLXはそれ以外の患者においても菌の消失を早め病態を終息させる方向にもって行くことはあっても、病態をHUSの方向へ加速させるような作用は示さないと考えられる。

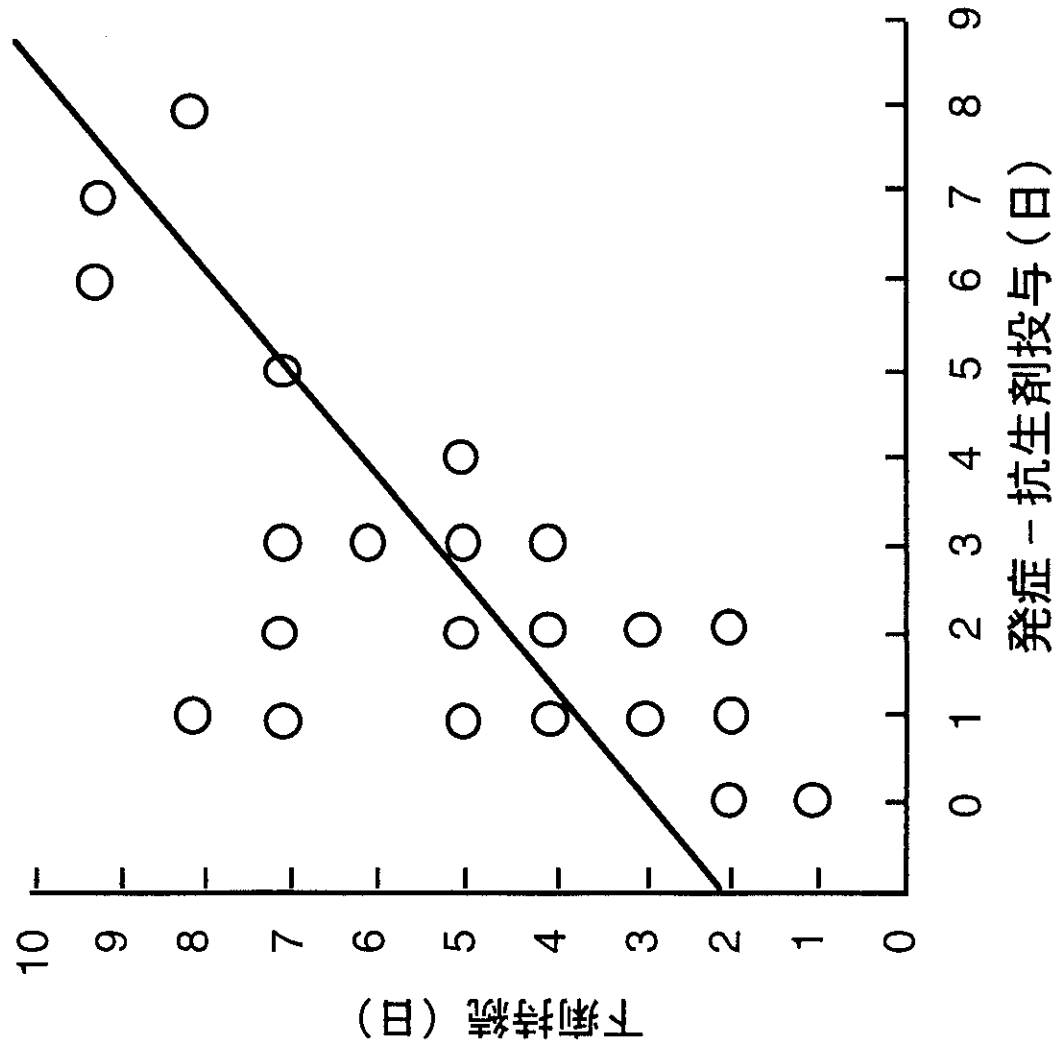
抗生剤投与時期と発症から菌陰性までの日数の関係 (図 1)



回帰分析概要
下痢持続 対 投与 - 下痢消失

例数	32
欠側値数	0
相関係数 (R)	.875
R ² 乗	.765
自由度調整 R ² 乗	.757
RMS 残差	1.443

抗生剤投与時期と下痢持続日数の関係 (図 2)

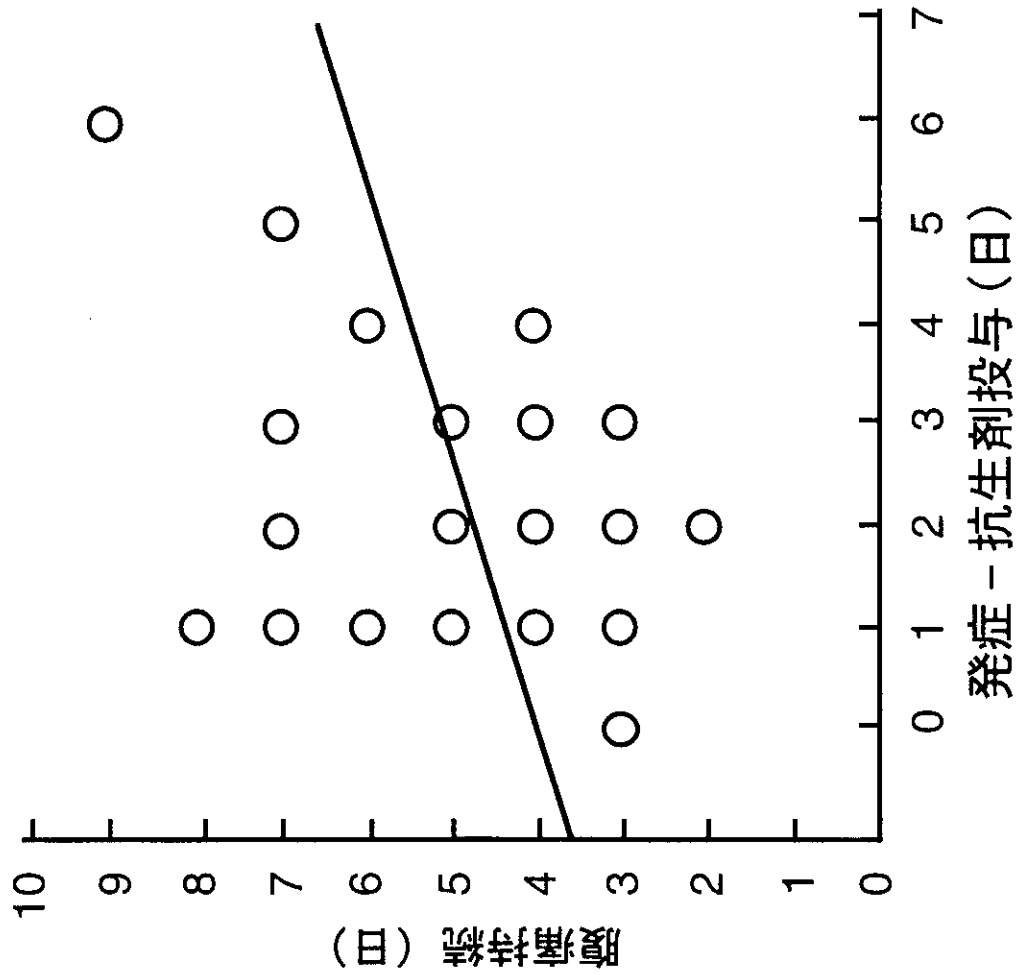


回帰分析概要

下痢持続対投与 - 下痢消失

例数	35
欠側値数	0
相関係数 (R)	.694
R ² 乗	.482
自由度調整 R ² 乗	.466
RMS 残差	1.679

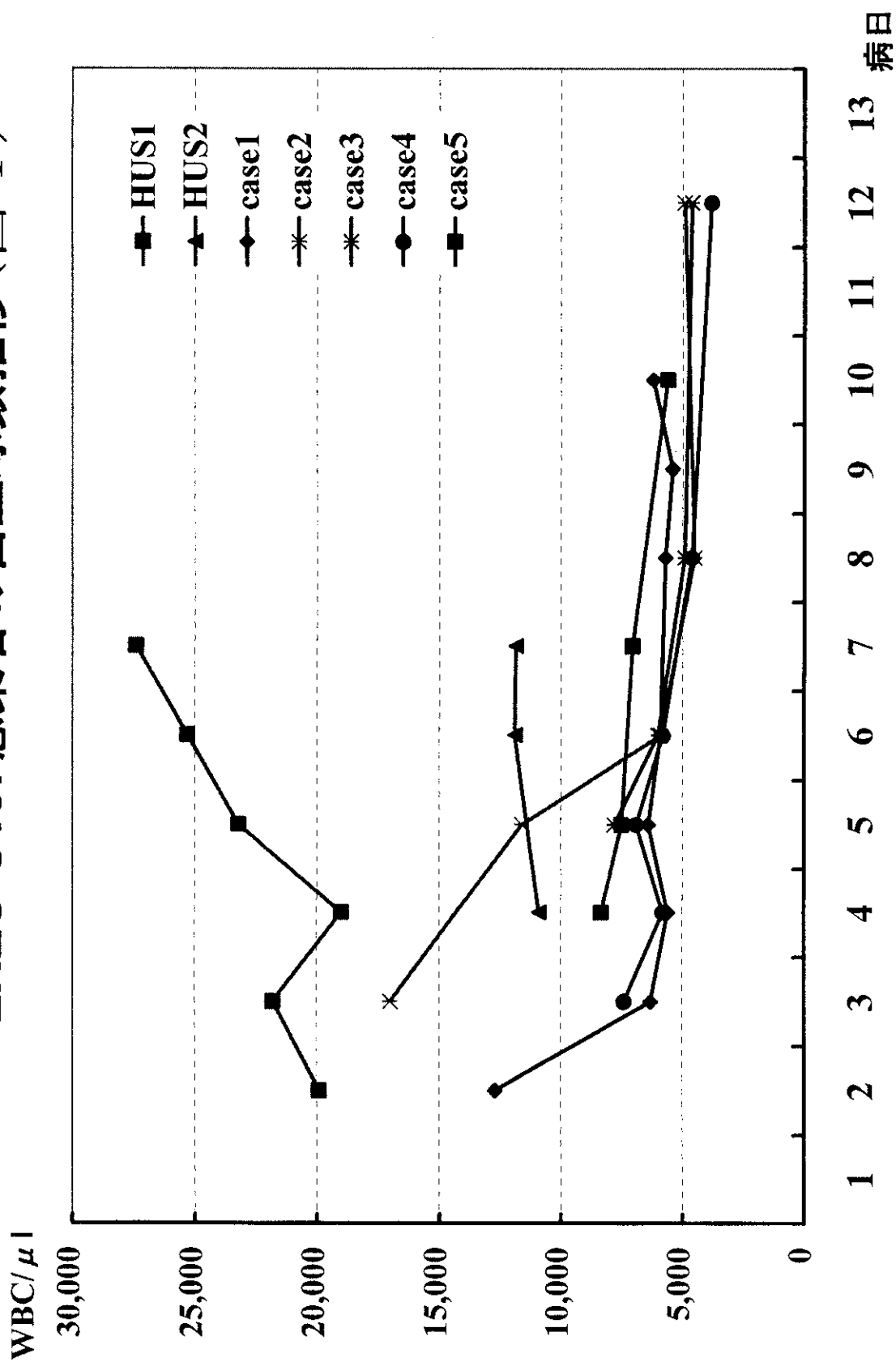
抗生剤投与時期と腹痛持続日数の関係 (図3)



回帰分析概要
腹痛持続対投与 - 腹痛消失

例数	36
欠側値数	0
相関係数 (R)	.261
R ² 乗	.068
自由度調整 R ² 乗	.041
RMS 残差	1.749

EHEC O157感染者の白血球数推移 (図 4)



11. 病原性大腸菌のDNA安定性の研究

研究協力者： 小林昌彦，池田代子，根本優子，木村重信
(岩手医科大学・口腔微生物学講座)

Francois Taddei, Miroslav Radman

(ジャック・モノー研究所・微生物学講座)

研究内容の要旨：大腸菌において，酸化ストレス適応機構である SoxRS レギュロンと，活性酸素に起因する変異との関係とその修復遺伝子の欠損株を用いて解析した結果，酸化ストレス適応機構はヌクレオチドの酸化を抑えることはなく，逆に酸化を促進する傾向を示した．さらに，スーパーオキシドディスムターゼの発現促進がその一原因である可能性が示唆された．

A. 研究目的

スーパーオキシドラジカルや酸化窒素ラジカルなどの活性酸素は，宿主において細菌感染の防御に働くが，一方で細菌内の好氣的代謝副産物としても産生される．活性酸素は高い変異原性を持つため，細菌の多様化や薬剤耐性化に関連すると考えられている．通常，大腸菌は SoxR タンパク質によって活性酸素を監視し，活性酸素を感知した SoxR は，SoxS タンパク質の発現を促進する．大量に合成された SoxS は酸化ストレスに抵抗するための様々なタンパク質の合成を促す．これが SoxRS レギュロンである (Fig. 1; Greenberg, JT *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990))．本研究では，細菌の酸化ストレス耐性化機構である SoxRS レギュロンと DNA 変異の関係を明らかにしようと試みた．

B. 研究方法と結果

活性酸素はヌクレオチドプール内の dGTP を酸化し，高い変異原性を持つ 8-oxo-dGTP を産生する．8-oxo-dGTP は通常 MutT によって分解除去される (Fig. 2;

Maki, H and Sekiguchi, M *Nature* (1992)) ．

そこで，高コピープラスミドを用いて SoxS を強制発現させた *mutT* 欠損株を用いて，酸化ストレスの DNA に対する影響を 8-oxo-dGTP による DNA 変異として測定した．通常，活性酸素濃度が高ければ細菌は死に，ある程度低ければ変異を誘発するが，*mutT*⁺ の野生型では MutT の変異抑制能力が高いため，細胞死と変異率とを分けて観察することはできなかった．一方，*mutT* 欠損株は内因性活性酸素に対しても高い感受性を示し，細胞死を起こさない低い活性酸素濃度で変異を起こすので，SoxS 発現による，つまり酸化ストレス防御体勢状態での活性酸素の細菌 DNA への影響を測定することが可能となる．

SoxS を組み込んだ高コピープラスミド (pSoxS) と SoxS を含まない同プラスミド (pVector) を用い，大腸菌の生育能力に対する影響を調べ，pSoxS を保持する野生型 (WT/pSoxS)，*mutT* 欠損型 (T/pSoxS) の両株は，pVector を保持する場合 (WT/pVector, T/pVector) にくらべて生育能力が低下することを認めた (Fig. 3)．さらに，SoxS 発現が *mutT* 欠損株の

変異率におよぼす影響を、抗菌薬リファンピシン、およびストレプトマイシンに対する耐性化変異株の出現率を用いて測定し、pVectorにくらべpSoxSを保持する*mutT*欠損株は高い変異率を示すことを見出した (Fig. 4) . SoxSを発現させ酸化ストレス防御機構であるSoxRSレギュロンを誘導した場合に、活性酸素による変異が上昇した. SoxRSレギュロン下のタンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、活性酸素種のスーパーオキシドラジカルを過酸化水素に変換する. 過酸化水素は金属イオンと反応して強力な活性酸素種のヒドロキシルラジカルを生み出すことが知られている (Fig. 5) . SoxS発現による変異率の上昇がSODによるものと予想し、SOD遺伝子である*sodA*の欠損株を作製して、同様の実験を行った. *mutT**sodA*欠損株においてもpSoxSによる生育能力の低下が観察された (Fig. 6; *TsodA*/pVector, *TsodA*/pSoxS) が、*sodA*⁺の親株に比べて生育能力の上昇がみられた (Fig. 6; *T*/pSoxS, *TsodA*/pSoxS) . また、SOD遺伝子を欠損させた株は親株に比べて変異率が低下し、保持するプラスミドによる差異もみられなくなった (Fig. 7, 8) .

C.まとめと考察

*mutT*欠損株を用い、SoxS発現下の大腸菌は生育能力が低下し、変異率が上昇することを示し、その一要因がSOD活性にあること示した. SODはスーパーオキシドラジカルを除去する酵素であり、酸化ストレス下での発現増加は細菌にとって不可欠である. しかし、その反応産物である過酸化水素は、細胞内の金属イオンと反応して、酸化作用の強いヒドロキシルラジカルに変化する (Fig. 5; Fenton

reaction) . 生成したヒドロキシルラジカルはヌクレオチドの酸化を促すことが知られており、結果として変異率を上昇させるという可能性を実験的に示した. しかし、SoxS発現による変異率の上昇は、日本での追試において、同様の結果を得られず、安定して結果が得られる条件の解明には至っていない. その過程にはさらに別の因子が存在すると考えられる. 今回得られた結果をもとに、SODによる変異への影響を明らかにしていくことは、細菌が宿主の免疫系や酸化ストレスに抵抗して、多様性を獲得する機構の解明において重要な知見をもたらすものと考えられる.

D.学会発表

小林昌彦、池田代子、根本優子、木村重信：*mutT*欠損大腸菌の*sodA*による変異と生育阻害についての解析 第41回歯科基礎医学会 1999

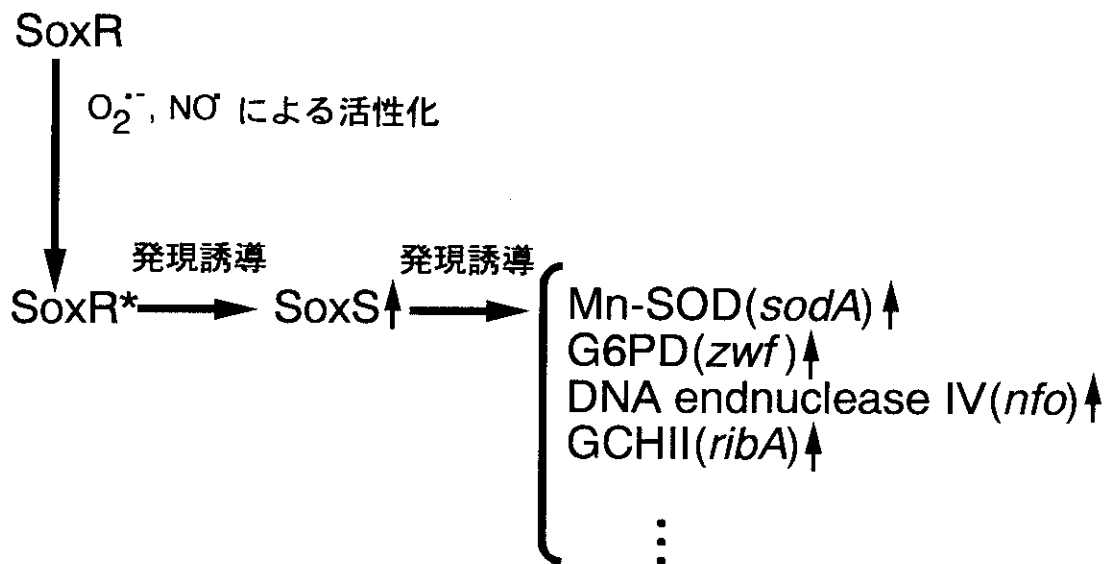


Fig. 1 大腸菌の酸化ストレスに対する防御系

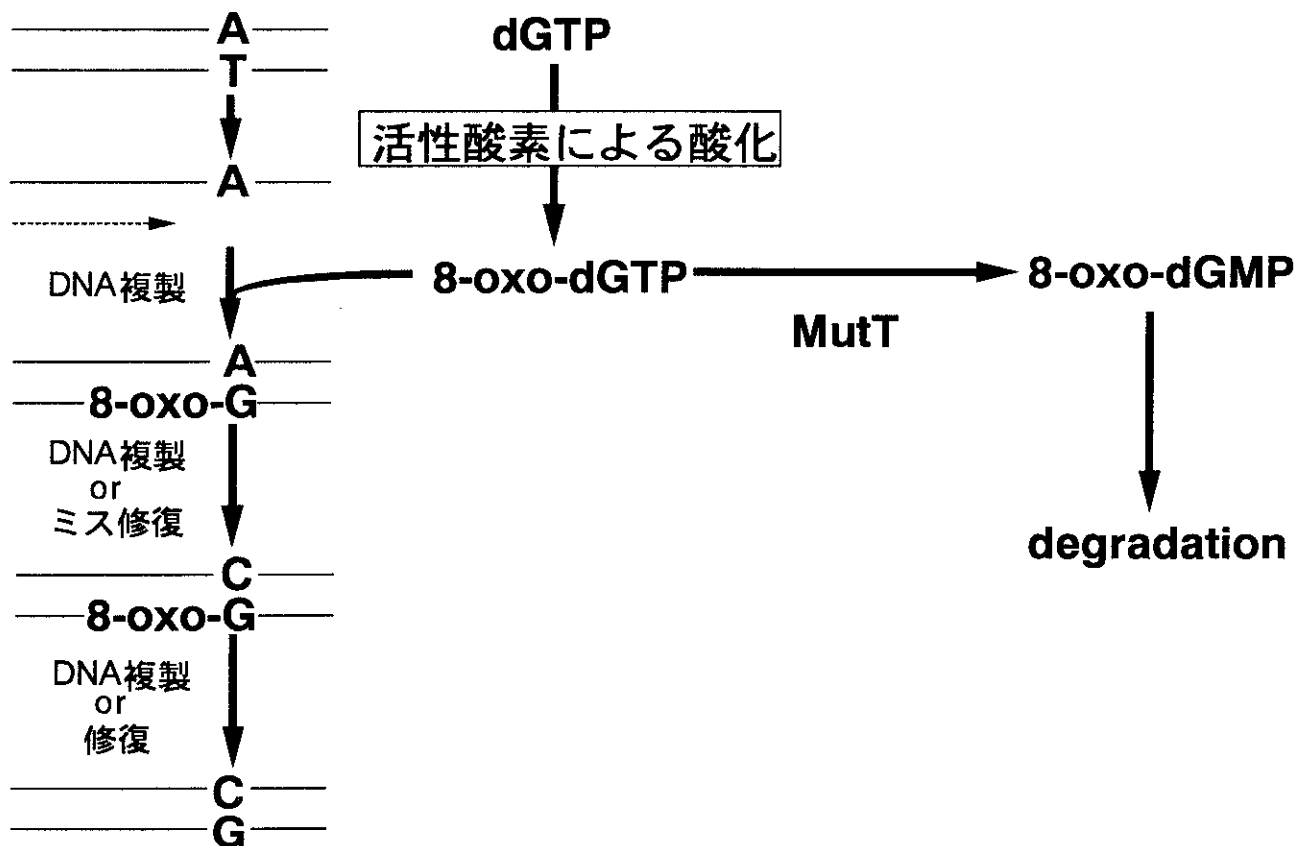


Fig. 2 活性酸素誘発A:T → C:G transversion 変異機構

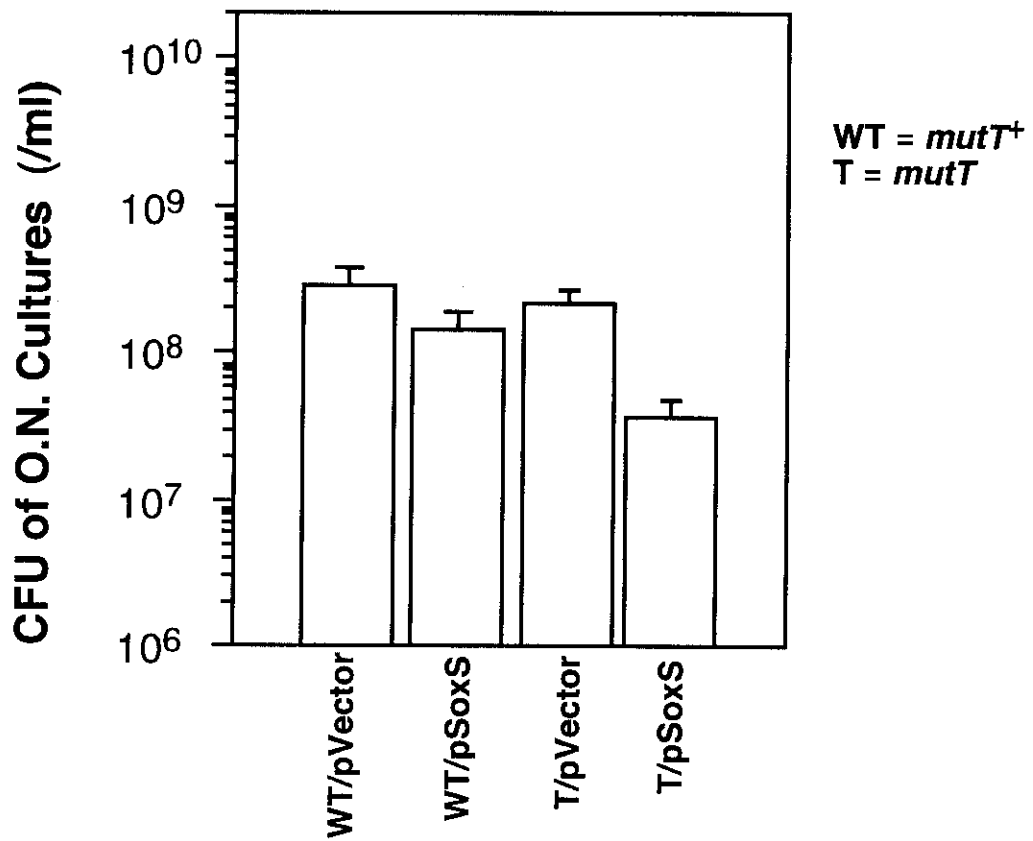


Fig. 3 Over Night 培養後の菌数の変化

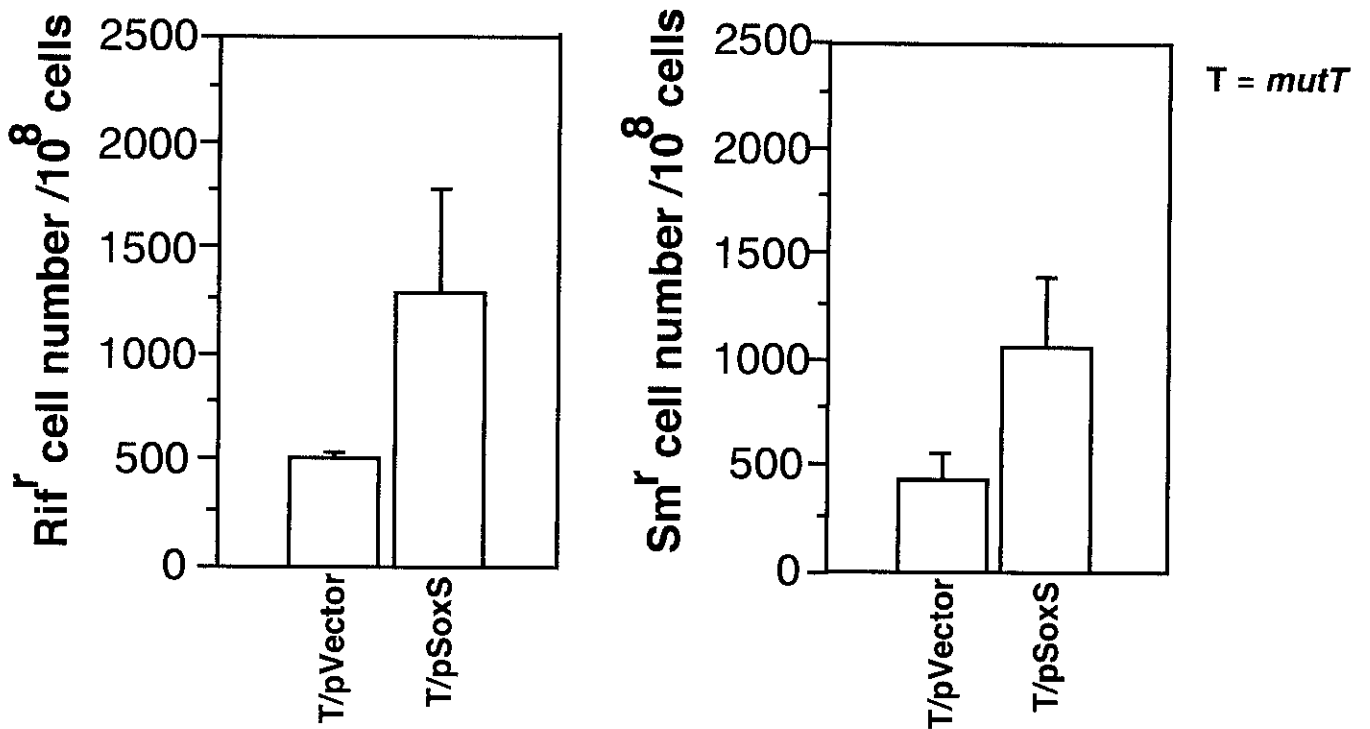


Fig. 4 抗菌薬耐性変異率

Superoxide dismutase (SOD)



Fenton reaction



Catalase



Fig. 5 SOD, Fenton, Catalase反応

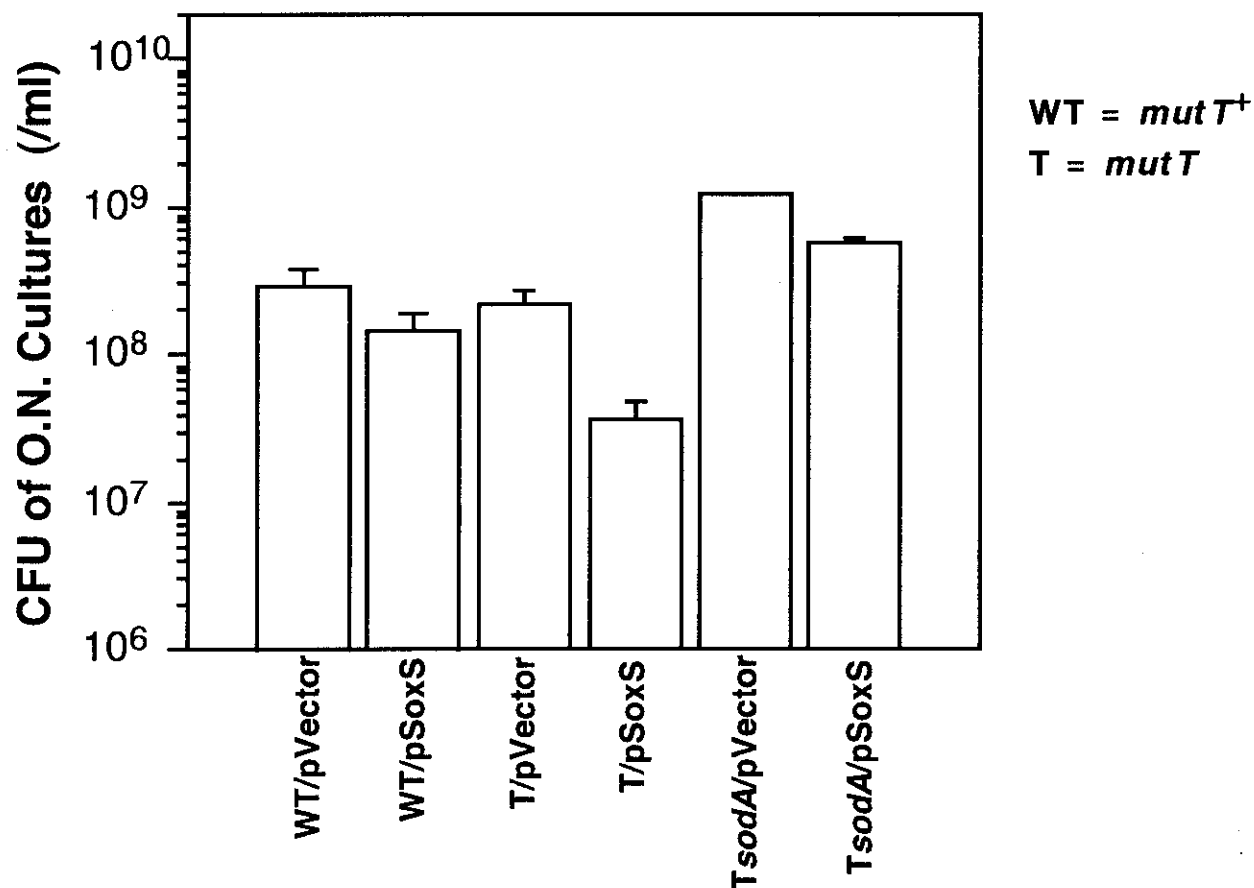


Fig. 6 Over Night培養後の菌数の変化