臨床分離 Citrobacter freundii の病原性に 関する臨床的・実験的研究

神戸大学医学部泌尿器科学教室(主任:石神襄次教授)原 田 恭 善 善

CLINICAL AND FUNDAMENTAL STUDIES ON THE PATHOGENISITY OF CLINICAL ISOLATED CITROBACTER FREUNDII

Masuyoshi Harada

From the Department of Urology, School of Medicine, Kobe University
(Director: Prof. J. Ishigami)

Clinical and fundamental studies were performed using Citrobacter freundii isolated from urine specimens of in- and out-patients between January 1980 and July 1981.

The C. freundii (>104/ml) isolated from urine was closely related to chronic complicated urinary tract infection.

MICs of pyridonecarbonic acids (ENX, OFLX and NFLX) and CMX against Cfreundii were low.

Pyridonecarbonic acids (ENX, OFLX and NFLX) and CMX showed good therapeutic effects against the experimental ascending pyelonephritis of mice according to their MICs. Against the experimental ascending pyelonephritis of cyclophosphamide-treated mice, pyridonecarbonic acids (ENX, OFLX and NFLX) showed good therapeutic effects.

Experimental intraperitoneal infection of mice was made easily with a low inoculation dose by adding mucin. Pyridonecarbonic acids (ENX, OFLX and NFLX) and CMX showed good therapeutic effects against this experimental model.

Experimental respiratory tract infection could not be made in the mice with the organism isolated from urine.

Key words: Citrobacter freundii, Experimental infection, Pathogenicity, Urinary tract infection

緒 言

感染症の起炎菌は時代とともに変遷するとされ、事 実尿路感染症は1960年代後半まではグラム陰性菌に比 し陽性菌が、1970年代中葉ではグラム陰性菌とくに弱 毒菌とされていた Serratia marcescens や Pseudomonas aeruginosa などによる感染症が問題となってきた^{1,2)}.

近年神戸大学医学部附属病院泌尿器科において Citrobacter freundii の分離頻度が増加し、かつこれら菌株の多くが各種化学療法剤に対して高度耐性であるこ

とが注目され、またマウスを用いた感染実験においてそれら菌株のなかには強い病原性を有する菌株の存在が証明された。今回著者は尿中より C. freundii が分離された患者の臨床像の解析をおこない、臨床的にその病原性を検討するとともに、片岡30 が報告した各種化学療法剤の C. freundii に対する MIC に加え、最近開発された抗菌物質の MIC を測定した。さらにマウス感染実験やそれを用いた各種抗菌物質による治療実験をおこない、過去の臨床において尿路感染症の起炎菌としては Serratia などに比べ余り注目されていな

かった C. freundii の病原性についていくつかの興味 ある知見を得たので報告する.

実験材料および方法

C. freundii 尿路 感染症の 臨床像の解析: 臨床的に C. freundii の病原性を検索するため, 解析対象となった症例は1981年1月より7月までの7ヵ月間に, 尿中より本菌が 104/ml 以上分離された神戸大学医学部附 属病院泌尿器科外来および入院患者20例である.

臨床 分離 C. freundii に対する 各種 抗菌 物 質の MIC: 1980年1月から1981年7月までの間の当院患 者尿から新鮮分離同定された C. freundii 53 株を用い て各種 抗菌 物質の MIC を 測定 した. 測定 方法は Müller Hinton 寒天 培地 (Difco) にミクロプラン ター(佐久間製作所)を用いて 10⁶ CFU/ml の菌液 を接種し、日本化学療法学会標準法()によりおこなっ た. 使用した抗菌物質は Ampicillin (ABPC), Pivmecillinam (PMPC), Piperacillin (PIPC), Carbenicillin (CBPC), Sulbenicillin (SBPC), Aspoxicillin (ASPC), Amoxicillin + Potassium clavulanate (AMPC+CVA), Cefazolin (CEZ), Cephalexin (CEX), Cefoxitin (CFX), Cefotiam (CTM), Cefmetazole (CMZ), Cefmenoxime (CMX), Cefoperazone (CPZ), Cefotaxime (CTX), Ceftizoxime (CZX), Latamoxef (LM-OX), Cefbuperazone (CBPZ), Ceftazidime (CAZ), Cefpiramide (CPM), Cefminox (CMNX), Ceftriaxone (CTRX), Dibekacin (DKB), Gentamicin (GM), Sisomicin (SISO), Netilmicin (NTL), Astromicin (ASTM), Fosfomycin (FOM), Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST), Trimethoprim (TMP), Nalidixic acid (NA), Pipemidic acid (PPA), Cinoxacin (CINX), Norfloxacin (NFLX), Ofloxacin (OFLX) およ び Enoxacin (ENX) の計36剤である.

動物感染実験:用いた菌種は C. freundii No. 1, No. 7 No. 11, No. 12, No. 16, No. 21, No. 22, No. 30, No. 32, No. 43, No. 45 および No. 53 の計12株である. 対照として E. coli P-5101, P. morganii Kono, K. pneumoniae No. 13, S. marcescens S-9, P. aeruginosa No. 12 の計5株を用いた.

実験動物は静岡実験動物農業協同組合より購入したマウスで, (i)上行性 腎盂腎炎 治療 実験には ddY系,雄,体重 22~30g, (ii) Cyclophosphamide (以下 CP) 処理免疫能低下マウス上行性腎盂腎炎の感染・治療実験には ICR系,雌,体重 21~26g, (iii)

腹腔内感染・治療実験には ddY 系,雄,体重 $18\sim$ 20~g および (iv) 気道感染実験には ddY 系,雄,体重 $16\sim18~g$ をそれぞれ用いた.

CP 処理マウス: 予備実験として CP (Endoxan 塩野義製薬)を ICR 系マウス腹 腔内に 300 mg/kg 注射後, 経時的に白血球数を測定, もっとも白血球数の低下したときを免疫能低下とし CP 処理免疫 能低下マウスとした.

感染方法および治療実験:

- (i)マウス上行性腎盂腎炎作製法;片岡*の方法に準じた.すなわちマウスを Pentobarbital-Na (25~50 mg/kg) 麻酔下に,下腹部 切開にて膀胱を露出させ,0.25 ml ツベルクリン注射筒 (26 G 注射針)にて菌懸濁液 (10³~10° CFU/ml) 0.1 ml を膀胱内に注入し直ちに腹壁を縫合閉鎖した.尿が貯留している場合は膀胱圧迫により排尿させた後にこの操作をおこなった.菌接種前後の24時間(計48時間)は絶水させた.膀胱内への異物挿入および膀胱粘膜上皮細胞への薬剤処理などの前処置は一切おこなわず,外尿道口閉塞もおこなわれなかった.
- (ii) マウス上行性腎盂腎炎 治療実験; 本実験に使用した薬剤は ENX, OFLX, NFLX, PPA, MINO, PMPC, CMX, CBPC および GM の 9 抗菌物質で,前 6 剤は経口投与,後 3 剤は皮下投与をおこなった.使用した菌株は片岡³⁾ の報告におけるマウス上行性腎盂腎炎感染実験に使用した C. freundii 12 株のうち比較的病原性の弱い No. 21 と病原性の強い No. 53 の2 株で, 菌接種量は No. 21 で 300 ID₅₀, No. 53では 100 ID₅₀ であった. 菌接種後 3,8,24,30,48 および54時間目にそれぞれ投薬された.5 日後のマウス生存率を求め Litchfield-Wilcoxon 法により ED₅₀ 値および95%信頼限界値を算出した.
- (iii) CP 処理マウス上行性腎盂腎炎作製法;ICR 系マウスに CP 300 mg/kg を腹腔内に 注射後4日目に菌を接種した. 感染方法は 前記の方法と 同様である. 使用した菌株は C. freundii No. 12, No. 21, No. 32 および No. 53 で, 対照として E. coli P-5101, P.morganii Kono, K. pneumoniae No. 13, S. marcescens S-9 および P. aeruginosa No. 12 を用いた.
- (iv) CP 処理マウス上行性 腎盂腎炎 治療実験;本実験に使用した抗菌物質は ENX, OFLX, NFLX, PPA, PMPC, CMX および GM の7剤で, 投与方法および投与時間は前述の方法と同様である. 使用した菌株は C. freundii No. 21 および No. 53 である.
 - (v)マウス腹腔内感染実験;ddY 系マウスの腹腔

内に 0.5 ml の菌懸濁液 (4%ムチン添加群 および非添加群) を注入し、7日後の死亡マウス数より LDso を求めた. 使用した菌株は C. freundii No. 1, No. 7, No. 11, No. 12, No. 16, No. 21, No. 22, No. 30, No. 32, No. 43, No. 45 および No. 53 の計12株で、対照として P. aeruginosa No. 12, S. marcescens S-9, P. morganii Kono, K. pneumoniae No. 13 およびE. coli P-5101 の計 5株を用いた。また使用したムチンは Difco Bacto Muchin Lot. No. 633046 である.

(vi) マウス腹腔内感染治療実験;前述の方法でマウスにムチン添加菌懸濁液を接種し,接種後 0 時間および 6 時間後に薬剤を投与し,7 日後のマウス生存率を求め Litchfield-Wilcoxon 法により EDso 値および95%信頼限界値を算出した.使用した菌株は *C. freundii* No.21 および No.53 の2株で,投与抗菌物質は ENX,OFLX, PPA, MINO, CMX, CBPCおよび GM の7剤である.

(vii) マウス気道 感染実験; ddY 系マウスをエーテルにて麻酔後, $50 \mu l$ の生理食塩水菌 懸濁液を鼻腔 に滴下し、自然吸引させ実験された。接種 5 日後のマウス死亡率より LD_{50} を求めた。使用した菌株は C. freundii No. 1, No. 7, No. 11, No. 12, No. 16, No. 21, No. 22, No. 30, No. 32, No. 43, No. 45 および No. 53 の計12株で、対照として P. aeruginosa No. 12, S. marcescens S-9, P. morganii Kono. K. pneumoniae No. 13 および E. coli P-5101 の計 5 株を用いた.

結 果

1) 臨床像の解析

対象症例20例のうち入院患者が18例と大半を占め、 感染診断名は慢性複雑性腎盂腎炎が9例,慢性複雑性 膀胱炎が8例,残り3例が前立腺術後感染症で、すべ て慢性複雑性尿路感染症であった(Table 1). その基 礎疾患は前立腺肥大症が4例,腎結石,膀胱腫瘍および 前立腺癌が3例づつで,以下Table に示すごとくで あった. 起炎菌として本菌単独によるものは20例中15 例で,他は複数菌感染症のひとつとして分離された. 20症例中カテーテル留置例は13例と65%を占めていた.

2) MIC 分布

臨床分離 C. freundii 53 株に対するペニシリン系抗生物質の MIC 分布 (Fig. 1-1~2) は PMPC が50 μ g/ml にピークを有した以外,他の薬剤では大部分の株が $100~\mu$ g/ml 以上と高度耐性株であった. 現在市販されているセフェム系抗生物質の MIC 分布 (Fig. 1-3~4) も $100~\mu$ g/ml 以上の MIC を有する高

Table 1. Background factors of 20 cases of Citrobacter freundii urinary tract infection

I. Patients

	Number
In-patient	18
Out-patient	2
Total	20

2. Diagnosis

	Number
Chronic complicated pyelonephritis	9
Chronic complicated cystitis	8
Post prostatectomy infection	3
Total	20

3. Underlying condition

	Number
ВРН	4
Renal stone	3
BT	3
PC	3
Ureteropelvic stenosis	1
Ureter stone	1
BT + BPH + BS	1
BPH + BS	1
BPH + PC	1
Urethral stenosis	1
Urethral caruncle	1
Total	20

4. Type of infection

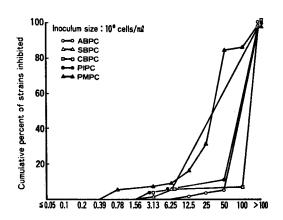
	Number
Monomicrobial	15
Polymicrobial	5
Total	20

BPH: Benign prostatic hypertrophy

BT : Bladder tumor PC : Prostatic cancer BS : Bladder stone

度耐性株が多いが、CMX は $100 \, \mu g/ml$ 以上の耐性株を認めず、かつ $6.25 \, \mu g/ml$ に MIC の ピークを有していた。LMOX も同様に $6.25 \, \mu g/ml$, CTX および CZX では $12.5 \, \mu g/ml$, CPZ は $25 \, \mu g/ml$ に MIC のピークを有し、これらいわゆる第 $3 \, \text{世代とされるセフェム系薬剤はきわめてすぐれたものとはいえないが、比較的良好な MIC 値を示した。これに対していわゆる第 <math>2 \, \text{世代とされるセフェム系薬剤である CTM の MIC は } 50 \, \mu g/ml にピークを有し、CMZ ではほとんどが <math>50 \, \mu g/ml$ 以上で、またいわゆる第

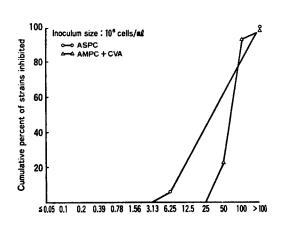
Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)



				М	ıc	(μ	g/m	e)					
Drug	≤0.05 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total
ABPC								1	1	1		50	53
SBPC						1	2					50	53
CBPC						2	1				1	49	53
PIPC						2	1			3		47	53
PMPC				3		1	1	4	8	28	1	7	53

Fig. 1-1

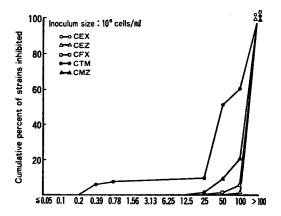
Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)



				M	C	(μ	g/mi	e)			MIC (μg/ml)													
Drug	≤0.05 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	> 100	Total											
ASPC							3					50	53											
AMPC+C\	/A									12	37	4	53											

Fig. 1-2

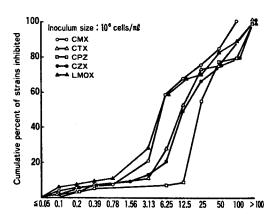
Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)



MIC (µg/ml) ≤0.05 0.1 0.2 0.39 0.78 1.56 3.13 6.25 12.5 25 50 100 >100 Drug Total CEX 53 CEZ 52 53 CFX 2 53 50 СТМ 3 1 22 5 53 CMZ 4 6 42 53

Fig. 1-3

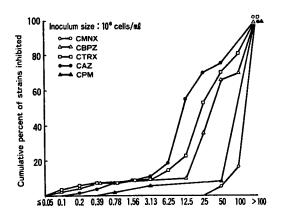
Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)



	MiC (μg/m²)													
Drug	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total
CMX		2	1		1		7	20	5	4	5	8		53
CTX		1	1	2			2	9	13	11	1		13	53
CPZ			2	1				1	1	24	12	1	11	53
CZX		1	2	1		1	2	4	15	9	5	2	11	53
LMOX		3	1	1	1		9	16	5	1	7	3	6	53

Fig. 1-4

Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)

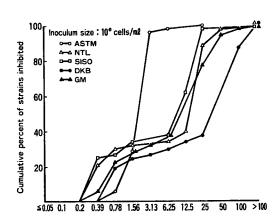


MIC (µg/ml)

Drug	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total
CMNX											3	6	44	53
CBPZ		1	1	2					1	14	16	2	16	53
CTRX		2	1	1			1	3	4	16	9	6	10	53
CAZ			1	1	2	1	1	4	19	8	3		13	53
СРМ					1		2				1		49	53

Fig. 1-5

Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)

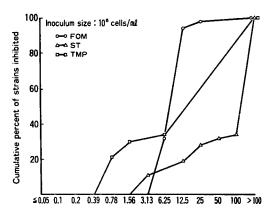


MIC (μg/ml)

Drug	≤0.05	0.1	0.2	0,39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Totai
ASTM		_			3	12	36	1		1				53
NTL				11	5	1		1	3	26	5		1	53
SISO				13	1	4		2	13	19			1	53
DKB					10	3	1	2	2	2		26	7	53
GM				3	9	3	2	3		21	9	2	1	53

Fig. 1-6

Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)

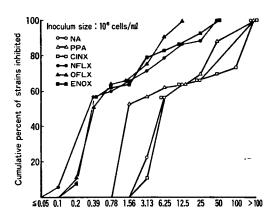


MIC (µg/ml)

Drug	≤0.05 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	> 100	Total
FOM							17	33	2			1	53
ST						6		4	5	2	1	35	53
TMP				11	5		2					35	53

Fig. 1-7

Sensitivity distribution of clinical isolates Citrobacter freundii (53 strains)



MIC (µg/ml)

Drug	≤0.05 (0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	Total
NA							12	18	4	1			18	53
PPA						28	2	3	1	3	10		6	53
CINX							6	24	4	1	2	2	14	53
NFLX		3		27	2	3	3	4	4	1	6			53
OFLX			6	21	7	1	5	8	5					53
ENOX			4	26	3	1	8	2	2	3	4			53

Fig. 1-8

1世代とされるセフェム系 薬剤である CEZ では全 株が 100 μg/ml 以上であった. 現在開発中のセフェ ム系抗菌物質に対する MIC 値 (Fig. 1-5) では 12.5 μg/ml に MIC のピークを有する CAZ がもっとも よい成績で、他の抗菌物質には 100 µg/ml 以上と高 度耐性であった. $3.13 \, \mu g/ml$ に MIC のピークを有 する ASTM は 50 μg/ml 以上の MIC を有する菌 株を 認めず 良好な感受性を示した (Fig. 1-6). また NTL, SISO および GM は 25 µg/ml に MIC の ピークを示し比較的良好であったが、DKB では 100 $\mu g/ml$ と不良であった. FOM は 12.5 $\mu g/ml$ に MIC のピークがあり、1 株のみが $100 \mu g/ml$ 以上 の MIC を示した (Fig. 1-7). 最後のピリドンカルボ ン酸系 抗菌 物質の MIC 分布 (Fig. 1-8) をみると ENX, OFLX および NFLX の3剤はともに 0.39 $\mu g/ml$ に MIC のピークを有し、 本実験に 使用した 抗菌物質のうちもっとも良好な成績であった. CINX および PPA では 前者で 6.25 μg/ml および 後者で 1.56 μg/ml と比較的良好な成績であったが、100 μg/ ml 以上の MIC を示す株も認められた. NA は 6.25 μg/ml と 100 μg/ml 以上の二峰性の MIC ピークを 有した.

3)動物感染実験

- (i) マウス上行性腎盂腎炎治療実験:各種抗菌物質の治療効果が Table 2 に示されている. No.21 による感染例ではピリドンカルボン酸系の ENX および OFLX, セフェム系の CMX がその MIC と同様に良好な ED $_{50}$ を示した. No. 53 による感染例においても ENX および CMX が良好な ED $_{50}$ を示し、GM も良好であった.
- (ii) CP 処理によるマウス白血球数の変動: CP 処理によるマウス白血球数の変化 (Fig. 2) は CP 処理前マウスの白血球数 7,000/ml に対し, 2日目で1,200/ml と急激な低下を示し, 4日目には 560±60/ml と最低値を示した。その後回復傾向を示し, 8日目には 6,000/ml まで回復した。
- (iii) CP 処理マウス上行性腎盂腎炎感染実験:前述の実験結果より CP 処理後4日目に菌を感染させた (Table 3). C. freundii および 対照の菌株のうちでもっとも病原性が強かったものは P. aeruginosa No. 12 で LD50 が 1.5×10^{1} CFU/mouse, $1D_{50}$ が 1 桁台であった. C. freundii のうちでは No. 53 がもっとも高い病原性を示し、 LD_{50} が 10^{2} CFU/mouse, $1D_{50}$ は 1 桁台で, 10^{2} CFU/mouse, 10^{2

Table 2. Effect of various antibacterial agents against ascending kidney infections with C. freundii in mice

		fection				Treatment		
C. freundi	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	Drug	Route	Hour after challenge	ED₅ (mg Kidney	/kg/dose) Urinary bladder	- MIC (μg/ml) **
			ENX	ро	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.18(1.7-6.0)*	3.62 (2. 2-5. 9)	0.39
			OFLX	ро	"	2.87 (0.9-8.9)	3.56 (2.1-6.0)	0.39
			PPA	ро	"	35.0 (6.1-200)	53.6(16.1-179)	1.56
			MINO	ро	"	> 400	>400	50
91	1.6×10 ⁷	Intra-	PMPC	ро	"	> 200	> 200	50
21	(300 ID ₅₀)	vesical	CMX	sc	"	79.3	70.8	6. 25
			CBPC	sc	"	> 400	>400	>400
			GM	SC	"	>50	>50	25
			ENX	ро	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.43(1.6-4.4)	4.42 (1.4-14.0)	0.78
			NFLX	ро	"	12.3(2.9 -6 6.6)	10.9(2.7-44.1)	0.39
	1.0×10 ⁶		PPA	ро	"	61.0(30.7-121)	53.2(20.3-139)	3.13
53		Intra- vesical	PMPC	ро	"	28.9(6.6-126)	28.9(6.6-126)	0.78
	(100 ID ₅₀)		CMX	sc	"	1.27(0.5-3.5)	1.29(0.6-2.7)	0.2
			GM	sc	"	3.61 (0.8-15.7)	3.40(1.1-10.5)	0.78

^{*} Numbers in perentheses indicated 95% confidence limits.

^{**} The MICs were determined by the agar dilution method according to that recommended by Japan Society of Chemotherapy.

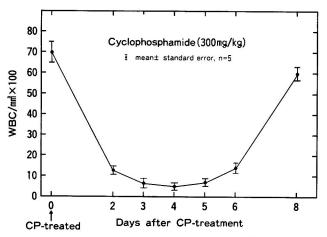


Fig. 2. The effect of cyclophosphamide (CP) on WBCs of female JCL-ICR mice

Table 3. Infectivity of *C.freundii* and other organisms in ascending kidney infections in cyclophosphamide treated mice

(Cyclophosphamide-treated)

Organisms	Mortality (LD ₅₀) (CFU/mouse)	Bacterial finding (ID ₅₀) (CFU/mouse) Kidney Urinary bladder			
C. freundii 12	3.4×10 ⁴	1.0×10'	1.0×10¹		
" 21	6.3×10 ⁴	2.1×10 ¹	2.1×101		
" 32	1.1×10 ⁵	1.0×10 ²	1.0×10 ²		
<i>"</i> 53	7.0×10 ²	1.45	1.45		
E. coli P 5101	>1.6×10 ⁷	6.3×10¹	8.8×10¹		
P. morganii Kono	5.5×10 ⁵	5.3×10 ³	5.3×10 ³		
K. pneumoniae No.13	8.0×10 ³	5.6×10 ¹	5.6×101		
S. marcescens S-9	1.9×10 ³	3.7×10 ²	3.7×10 ²		
P. aeruginosa No.12	1.5×10¹	1.5	1.5		

^{*} Cyclophosphamide (300mg/kg) was given intraperitoneally 96 hours before challenge.

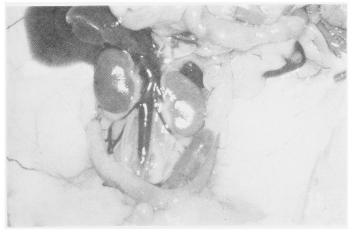


Fig. 3. The mouse 4 days after cyclophosphamide treatment

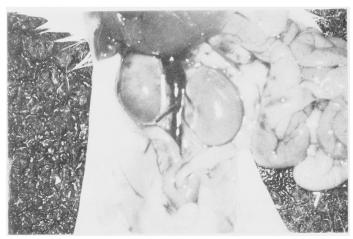


Fig. 4. The cyclophosphamide-treated mouse 3 days after inoculation with *C. freundii* No. 53

Table 4. Effect of various antibacterial agents against ascending kidney infections with C.freundii in cyclophosphamide treated mice

	Infection			Treatment						
	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	CP* (mg/kg)	Drug	Route	Hour after challenge	ED** (mg/kg Kidney	/dose) Urinary bladder	- MIC*** (μg/ml/)	
				ENX	ро	3, 8, 24, 30, 48, 54	2.8(1.6-4.9)	3.1 (1.9-5.2)	0.39	
				OFLX	ро	"	1.7(1.1-2.7)	1.7(1.1-2.7)	0.39	
				NFLX	ро	"	7.7(3.4-17.6)	7.7(3.4 -17.6)	0.39	
•	1×10³		200	PPA	ро	"	27.3(12.6-59.2)	29.2(2.9-66.7)	1.56	
21	(476 ID ₅₀)	Intravesical	300	CMX	sc	"	70.7(22.3-224)	114.0(67.9-191)	6.25	
				GM	sc	"	>50	>50	25	
				ENX	ро	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.51	3.51	0.78	
				NFLX	ро	"	11.0(5.5-21.8)	11.0(5.5-21.8)	0.39	
	4452			PPA	ро	"	31.5	35.4(23.9-52.5)	3.13	
53		Intravesical	300	PMPC	ро	"	45.7(19.1-109)	51.7(20.7-129)	0.78	
	(69 ID ₅₀)			CMX	sc	"	1.7(1.0-2.7)	1.9(0.7-5.0)	0.2	
				GM	sc	"	1.6(0.9-2.8)	1.8(0.9-3.8)	0.78	

^{*} Cyclophosphamide was given intraperitoneally at 96 hours before challenge.
** Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

CFU/mouse オーダー高いものの ID_{50} では 同等であった。本菌は他の対照菌と較べても LD_{50} , ID_{50} ともに低く, 病原性の強いことが示唆された。No. 12 および No. 21 では LD_{50} が 10^4 CFU/mouse, ID_{50} が 10^1 CFU/mouse であり,No.32 では LD_{50} および ID_{50} ともに 前 2 株に 比べ 10^1 CFU/mouse オー

ダー低い成績であった。CP 処理 4 日後の腎表面はやや腿色した茶褐色を示し腫脹は認められないが(Fig. 3),CP 処理 4 日後に C. freundii No. 53 を 4.0×10^2 CFU/mouse 感染させて 3 日経過後の腎の表面は乳白色を呈し,膿の貯留が認められ大きく腫脹していた(Fig. 4).

^{***} The MICs were determined by the agar dilution method according to that recommended by Japan Society of Chemotherapy.

Table 5. Mortality of mice intraperitoneally infected with C. freundii and five other organisms without mucin

LD so (CFU/mouse) Organisms C. freundii >2.75×10⁷ 7 >2.5 ×10° 11 <4.8 ×107 12 7.9 ×10⁷ 16 >3.5 ×107 21 1.2 ×107 22 >4.0 ×10⁷ 30 >3.3 ×107 32 1.26×107 43 3.5 ×107 45 >3.5 ×10⁷ 53 1.74×10° P. aeruginosa No.12 < 5.5 ×106 S. marcescens S-9 9.35×10° P. morganii Kono 3.0 ×10⁸ K. pneumoniaeNo.13 4.1 ×107 E. coli P-5101 >4.1 ×108

Table 6. Mortality of mice intraperitoneally infected with C. freundii and five other organisms with 4% mucin

Organism	LD so (CFU/mouse)	
C. freundii	1	4.7×10 ⁴
"	7	1.4×10 ⁷
"	11	7.9×10 ⁵
"	12	1.1×10 ³
"	16	2.0×10°
"	21	4.5×10 ⁴
"	22	>4.0×10°
"	30	3.3×10 ⁵
"	32	4.0×10^{3}
"	43	1.3×10 ⁶
"	45	< 3.5×10°
"	53	3.3
P. aeruginosa	No.12	1.3×10 ²
S. marcescens	S-9	2.6×10 ³
P. morganii	Kono	1.3×10 ³
K. pneumonia	No.13	4.5×10 ⁵
E. coli	P-5101	9.0×10 ⁶

Table 7. Effect of various antibacterial agents against systemic infections with C. freundii in mice

C. freundii	Infection			Treatment				MIC
No.	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	mucin	Drug	Route	Hour aft challens		(μg/mℓ) [*]
				ENX	ро	0,6	2.02(1.49-2.75)*	0.39
				OFLX	ро	"	1.63 (1.25-2.13)	0.39
				PPA	ро	"	8.17 (4.54-14.7)	1.56
				MINO	po	"	>100	50
21	2.5×10 ⁶	ip	+	CMX	sc	"	23.6	6.25
	(55LD ₅₀)			CBPC	sc	"	> 400	>400
				GM	sc	"	12.6 (9.57-16.5)	25
				ENX	ро	0,6	2.93 (2.06-4.16)	0.78
				OFLX	ро	"	4.09 (2.49-6.74)	0.78
				PPA	ро	"	10.5	3.13
				MINO	ро	"	5. 26	6.25
53	2.5×10 ³	ip	+	CMX	sc	″	0.47 (0.29-0.78)	0.2
	(757LD ∞)			CBPC	sc	"	17.7	6. 25
				GM	sc	"	0.51	0.78

Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.
 The MICs were determined by the agar dilution method according to that recommended by Japan Society of Chemotherapy.

Table 8. Mortality of mice intranasally infected with C. freundii and five other organisms

Organism	LD _∞ (CFU/mouse)		
C. freundii	1	>5.0×10 ⁷	
"	7	>5.0×10 ⁷	
"	11	>5.0×10 ⁷	
"	12	>5.0×10 ⁷	
"	16	>5.0×10 ⁷	
"	21	>5.0×10 ⁷	
"	22	>5.0×10 ⁷	
"	30	>5.0×10 ⁷	
"	32	>5.0×10 ⁷	
"	43	>5.0×10 ⁷	
"	45	>5.0×10 ⁷	
"	53	>5.0×10 ⁷	
P. aeruginos	a No.12	5.0×10°	
S. marcescer	18 S-9	>5.0×10 ⁷	
P. morganii Kono		>6.0×10 ⁷	
K. pneumoni	>7.5×10 ⁷		
E. coli	P-5101	>5.0×10 ⁷	

(iv) CP 処理マウス上行性腎盂腎炎治療実験 (Table 4): C. freundii No. 21 の感染例では OFLX の ED $_{50}$ が 1.7 mg/kg ともっともすぐれており, GM の ED $_{50}$ は 50 mg/kg 以上ともっとも悪かった. No. 53 では GM および CMX の ED $_{50}$ が $1.6\sim1.9$ mg/kg ともっともすぐれていた.

(v) マウス腹腔内感染実験 (Table 5, 6) ムチン非添加群では C. freundii No.53 の LD50 のみが 106 CFU/mouse オーダーで他の株は 107 CFU/mouse であった. 対照菌では P. aeruginosa No. 12 および S. marcescens S-9 のみが 106 CFU/mouse のオーダーで, 他の菌種は 107 あるいは 108 である. 4% ムチン添加群では C. freundii No. 53 の LD50 は 3.3 CFU/mouse と非常に強い病原性を示し, ついで No.12、No. 32 が 103 CFU/mouse, No.1 および No. 21 が 104 CFU/mouse のオーダーを示した. 対照菌では P. aeruginosa No.12 が 102 CFU/mouse と強い病原性を有し, S. marcescens S-9 および P. morganii Kono の 103 CFU/mouse の順であった.

(vi) マウス腹腔内感染治療実験 (Table 7): C. freundii No. 21 による感染例では OFLX が 1.63 mg/kg, ENX が 2.02 mg/kg の ED₅ と良好な治療効果を示し、ついで PPA, GM, CMX の順で MI-NO および CBPC は無効であった. No. 53 による感染例では CMX の ED₅ が 0.47 mg/kg でもっとも良好な治療効果を示し、ついで GM の 0.51 mg/

kg であり、他の5剤も比較的良好な ED50 を示した。

(vii) マウス気道感染実験 (Table 8): P. aeruginosa No. 12 のみが 10^6 CFU/mouse オーダーの LD_{50} を示したが、他の 菌株ではすべて 10^7 CFU/mouse 以上の LD_{50} であった。このことから今回の実験方法では、これら C. freundii はマウスに気道感染を起こしえないことが示された。

考 察

Citrobacter は陽内細菌科に属するグラム陰性の運動性を有する桿菌で、自然界にも広く分布し、ヒトの正常腸内細菌叢の一種でもある。古くは Bethesda-Ballerup 菌群といわれ、生物学的性状から Escherichia と Salmonella の中間型とされる。現在 International Committee on Systemic Bacteriology において認められているものは C. freundii, C. diversus および C. koseri の3種である。わが国の Citrobacter は尿検体からの検出が多く、なかでも freundii が大部分を占め、残りが diversus である。諸外国においては Citrobacter に関する報告は少なく、欧米においては C. freundii より C. diversus の検出率の方が高い。5~9)。この両者の検出率の差がなにに起因するかは興味のある、また今後あきらかにされるべき問題である。

先に当教室の片岡³ が臨床分離 C. freundii の当院 泌尿器科および他科における年次推移,各種化学療法 剤のディスク感受性 および MIC, さらに マウス感染 実験などにより,本菌が尿路系の起炎菌として留意す べきことを示した.今回は本菌感染例の臨床像の解析, 現在開発中の抗菌物質の本菌に対する MIC ならび に動物尿路感染モデルに対する各種抗菌物質の治療効 果について検討した.

臨床像の解析では、本菌は尿路感染症のなかでも難治性感染症例で高頻度に分離されることが示唆された。すなわち、すべての症例が尿路に基礎疾患を有する慢性複雑性尿路感染症で、とくにカテーテル留置例が多い。またその原因をここで明確にすることはできないが、基礎疾患のなかでも下部尿路のものが多かった。以上が本菌による尿路感染症の臨床的な特徴と考えられるが、今回検討された症例数が20例と少ないため、さらに検討を要するとも考えられる。前述したような特徴をもつ臨床像から分離された本菌は、長時間にわたる種々の化学療法を受けざるをえず、その結果多剤耐性菌として分離されることが多いものと考えられる。

各種抗菌物質に 対する 本菌の MIC は 片岡3 の報告に続き、さらに新しく開発された抗菌物質12剤を加えた計36剤の MIC を測定した. 片岡が良好な MIC を示したと報告した PMPC, CMX, GM, FOM および PPA については同様の成績を得た. 今回新しく検討された抗菌物質のうちでは ASTM, ENX, OFLX および NFLX が良好な MIC を示した. 全体としてみると、本実験に供した C. freundii に対する in vitro の抗菌性はピリドンカルボン酸系の抗菌物質がもっとも強く、これらの薬剤感受性パターンは岡本10, 出口111, 後藤120および小酒井ら130の報告とよく一致していた.

マウス感染実験において片岡3³ が指摘した病原性の強い C. freundii No. 53 と、中等度の病原性をもつNo. 21 を用いた上行性腎盂腎炎の治療実験をおこなった。No. 21 による感染に対しては ENX、OFLXがすぐれた治療効果を示し、No. 53 には ENX、NFLX、CMX および GM がすぐれていた。これらの成績とそれぞれの MIC 測定成績とを比較すると ENX、OFLX、NFLX、CMX および PPA はその MIC と一致して良好な治療成績を示した。 GM のNo. 21 に対する MIC は No. 53 に対するよりやや悪く、その治療成績も 同様に悪かったが、MINO、PMPC、CBPC に比べると有効であった。全般的に みると in vitro と in vivo の成績は比例する結果といえる.

臨床像の解析から本菌は慢性複雑性尿路感染症から 分離されていることが判明した. この事実から, いわ ゆる compromised host における本菌の病原性を調 べる目的で、CP 処理法による免疫能低下マウスモデ ルを用いた感染実験をおこなった. CP 処理後4日目 で白血球数が正常時の1/10 以下に低下(Fig. 2) し た時点をもっとも免疫能が低い状態とした14~16). CP 処理後4日目の免疫能低下マウスにおいては C. freundii No. 53 で 1.45 CFU/mouse の菌接種で感染が 成立し、感染を成立させるにもっとも多い菌量を必要 とした P. morganii Kono でも 5.3×103 CFU/mouse と、片岡3)の報告した上行性腎盂腎炎感染実験での菌 接種量の 1/10~1/10 とあきらかに低濃度で感染が 成立した. とくに No. 53 においては P. aeruginosa と同等の病原性を有していた. C. freundii No. 21 お よび No.53 を用いた免疫能低下マウスの感染モデル 治療実験をおこ なった ところ, No. 21 に対 しては CP 未処理の感染治療実験と同様にピリドンカルボン 酸系の ENX, OFLX および NFLX ですぐれた治 療効果が得られたが、CMX ではその MIC と一致 せず CP 処理マウスでの成績が不良であった. これは CMX の薬剤そのものになんらかの原因があるのか,すなわち本剤の抗菌性には生体の免疫能,とくにここでは白血球に関与する何らかの要因が影響したものかとも考えられるが, No.53 に対しては CMX も良好な治療効果が得られているので,この原因については不明である. No.53 に対しては ENX,NFLXに加え GM もすぐれた治療効果を示した.

本邦における C.freundii の臨床分離株は大部分が尿 由来であり、このことは片岡3)の報告においても述べ られている. しかし Hodges らら および Lipsky らら の本菌による呼吸器系および外傷を原因とする化膿性 疾患あるいは敗血症などの臨床例が示されていること から,腹腔内および気道感染実験をおこなった.ムチン 非添加の腹腔内感染実験においては尿路感染実験でも っとも高い病原性を示した No.53 のみが 10⁶ CFU/ mouse の LD50 を示し, 他の株では 107 のレベルで あった. ムチン添加においては No. 53 では 3.3 CFU/mouse とムチン非添加に較べ 1/10⁶ の菌量で 感染が惹起され、P. aeruginosa No. 12 を含むすべて の対照菌より感染力が強かった. またその他の C, freundii もすべてそれぞれのムチン非添加の成績に比 べより少ない菌量で感染が起こっていた. この感染系 に対する治療実験では尿路系感染治療実験と同様にピ リドンカルボン酸系および CMX がすぐれた 治療効 果を示しており、これらの抗菌物質が高濃度に各臓器 に移行すること、 および 良好な MIC などの条件か ら当然の成績と推察される.

気道感染実験においては対照菌の P. aeruginosa No. 12 のみが 10^6 CFU/mouse の LD_{50} を示したのみで,他の対照菌およびすべての C. freundii で感染が起こらなかった.本実験に供した C. freundii が尿路系由来であることから気道感染を惹起し難いとも考えられるが,この詳細については本菌による気道感染の臨床例の検討をはじめとして今後さらに検討を加える考えである.

結 語

神戸大学医学部附属病院における尿中分離 C. freundii の病原性について基礎的, 臨床的検討を加え, 次の結果を得た.

(1)尿中より 10⁴/ml 以上の C. freundii が分離同定された患者20例の臨床像から、本菌は尿路、性器に基礎疾患を有する慢性複雑性尿路感染症と密接な関係にあることが示唆され、かつそのうち尿道カテーテル留置例が13例、65%を占めていた。

(2)新鮮分離 C. freundii 53 株に対して36種の抗菌物質の MIC を測定したところ,近年開発された,あるいは 開発中のビリドンカルボン酸 系合成 抗菌 物質 ENX, OFLX および NFLX がすぐれた MIC を示し、 β -ラクタム系の抗生物質では CMX をはじめとするいわゆる第 3 世代とされるセフェム剤がすぐれた MIC を示した.

(3)マウス上行性腎盂腎炎治療実験においては ENX, OFLX, NFLX および CMX が MIC の成績と同様にすぐれた治療効果を示した.

(4) CP 処理マウス上行性腎盂腎炎感染実験では CP 未処理マウスの感染実験と比べ 1/10~1/10 の低濃度で感染が成立した. また その治療 実験に おいては CP 未処理の治療実験成績と同様に ENX, OFLX, NFLX が良好な治療成績を示した.

(5)マウス腹腔内感染実験ではムチン添加の感染実験が、ムチン非添加に比べ低濃度で感染を惹起した. またこの治療実験に おいても ENX、OFLX、NFLX および CMX がすぐれた治療効果を示した.

(6)マウス気道感染実験では実験に供した C. freundii はいずれも感染を成立させることはできなかった.

以上, C. freundii は病原性が強く, 尿路感染症の 起炎菌として留意すべきものであることを報告した.

稿を終わるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師 石神襄次教授に感謝の意を捧げ、また直接御指導をいただい た守殿貞夫助教授ならびに神戸大学医療技術短期大学部衛生 技術学科片岡陳正助教授に深謝するとともに、御協力をいた だいた教室の諸先生方に感謝いたします。

参考文献

- 1) 占部慎二:尿路感染症に関する研究(第一報). 皮 と巡 23:357~368, 1961
- 中牟田誠一・坂本泰樹・熊沢浄一・百瀬俊郎・竹 森紘一: 尿路感染分離菌の年次的変遷(第10報). 西日泌尿 43:703~712, 1981
- 3) 片岡陳正:臨床分離 Citrobacter freundii の病 原性に関する研究. 泌尿紀要 **28**: 629~647, 1982
- 4)日本 化学 療法 学会 理事会: 最小 発育 阻止 濃 度 (MIC) 測定法再検討について. Chemotherapy 29:76~79, 1981
- 5) Altmann G, Sechter I, Cahan D and Gerichter CHB: Citrobacter diversus isolated from clinical material. J Clin Microbiol 3: 390~392, 1976
- 6) Hodges GR, Degener CE and Barnes WG: Clinical significance of Citrobacter isolates.

- AJCP 70: 37~40, 1978
- Barton LL and Walentic C: Citrobacter diversus urinary tract infection. Am J Dis Child 136: 467~468, 1982
- 8) Lund ME, Matsen JM and Blazevic DJ: Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H₂ S-negative Citrobacter. APPL Microbiol 28: 22~25, 1974
- 10) 岡本緩子・前原敬悟・上田良弘・那須 勝・神木 照雄・入 久巳・永井龍夫・熊本悦明・酒井 茂・ 茂田士郎・小酒井望・小栗豊子:尿路感染症分離 菌 E. coli, Klebsiella, Citrobacter および Proteus に対する経口抗菌剤の抗菌力比較. Jap J Antibiotics 34:959~975, 1981
- 11) 出口浩一: 臨床分離高頻度分離菌株の主な抗菌性 物質に対する感受性, 経年的推移に関する検討. 第1報. Jap J Antibiotics 34: 1263~1277, 1981
- 12) 後藤俊弘・池村紘一郎・野辺 崇・角田和之: 尿 路感染分離菌とその薬剤感受性について. 西日泌 尿 39:276~285, 1977
- 13) 小酒井 望・猪狩 淳・熊本悦明・酒井 茂・西 尾彰・永井龍夫・茂田士郎・白岩康夫・阿部和夫 ・田崎 寛・入 久巳・内田 博・安藤泰弘・古 谷 博・松田静治・添田 昇・横松 守・小栗豊 子・古澤太郎・竹内泰子・土田洋美・山下伸幸・ 岡本緩子・下江庄司・神木照雄・那須 勝・山口 恵三: 尿路感染症分離菌 E. coli, Klebsiella, Citrobacter および Proteus に対する経口なら びに 注射用 抗菌・抗生剤の抗菌力 比較. Jap J Antibiotics 35: 1022~1044, 1982
- 14) 川崎賢二・関ロ金雄・小川正俊・辻 明良・五島 瑳智子: Opportunistic pathogen と宿主防衛機 能の関連について. Chemotherapy 28:14~21, 1980
- 15) 内田耕三郎・厚井文一・依光聖一・高橋 功・喜 多嶋康一・木村郁郎: Bestatin による cyclophosphamide 誘発骨髄抑制からの回復促進効果. 癌と化学療法 9:220~224, 1982
- 16) 亀岡陽子・六浦聖二・吉本幸子・田村正和・螺良 英郎: Cyclophosphamide による感染防御能の 変化に果たす好中球とマクロファージ機能の解 析. 感染症学雑誌 58:285~292, 1984

(1984年12月20日受付)