

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 益 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* ($>10^4$ /ml) isolated from urine was closely related to chronic complicated urinary tract infection.

MICs of pyridonecarboxylic acids (ENX, OFLX and NFLX) and CMX against *C. freundii* were low.

Pyridonecarboxylic 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, pyridonecarboxylic 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. Pyridonecarboxylic 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³⁾ 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* などと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カ月間に、尿中より本菌が 10^4 /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) にマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて 10^6 CFU/ml の菌液を接種し、日本化学療法学会標準法⁴⁾ 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 22~30 g, (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 21~26 g, (iii)

腹腔内感染・治療実験には ddY 系、雄、体重 18~20 g および (iv) 気道感染実験には ddY 系、雄、体重 16~18 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³⁾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 ($10^3 \sim 10^8$ 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 LD₅₀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 ED₅₀ 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 μ 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 LD₅₀ 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 μ 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 μ g/ml 以上の MIC を有する高

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

1. 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
BPH	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

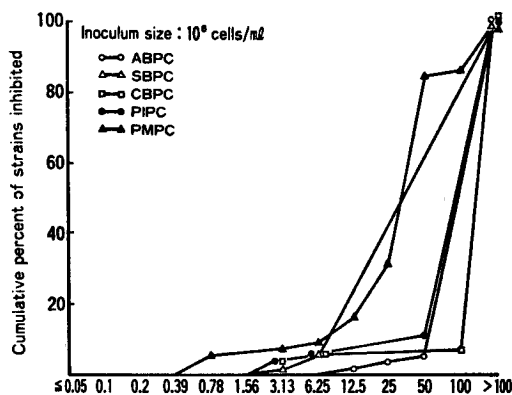
BPH : Benign prostatic hypertrophy

BT : Bladder tumor

PC : Prostatic cancer

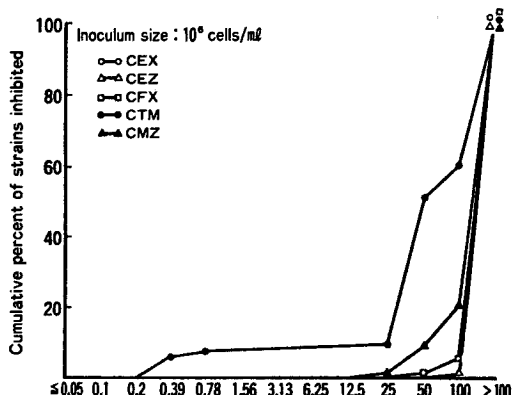
BS : Bladder stone

度耐性株が多いが，CMX は 100 μ g/ml 以上の耐性株を認めず，かつ 6.25 μ g/ml に MIC のピークを有していた．LMOX も同様に 6.25 μ g/ml, CTX および CZX では 12.5 μ g/ml, CPZ は 25 μ g/ml に MIC のピークを有し，これらいわゆる第3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2世代とされるセフェム系薬剤である CTM の MIC は 50 μ g/ml にピークを有し，CMZ ではほとんどが 50 μ g/ml 以上で，またいわゆる第

Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)

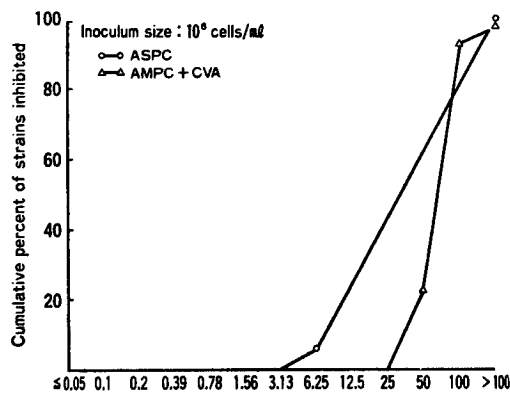
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Total
Drug		≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
ABPC										1	1	1		50	53
SBPC								1	2					50	53
CBPC								2	1				1	49	53
PIPC								2	1			3		47	53
PMPC						3		1	1	4	8	28	1	7	53

Fig. 1—1

Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)

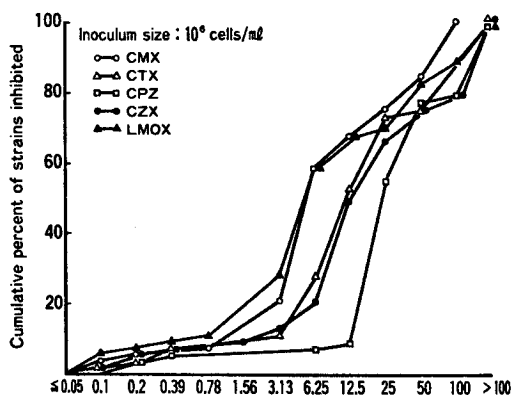
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Total
Drug		≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
CEX														53	53
CEZ													1	52	53
CFX												1	2	50	53
CTM					3	1					1	22	5	21	53
CMZ												1	4	42	53

Fig. 1—3

Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)

		MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Total
Drug		≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
ASPC								3						50	53
AMPC+CVA												12	37	4	53

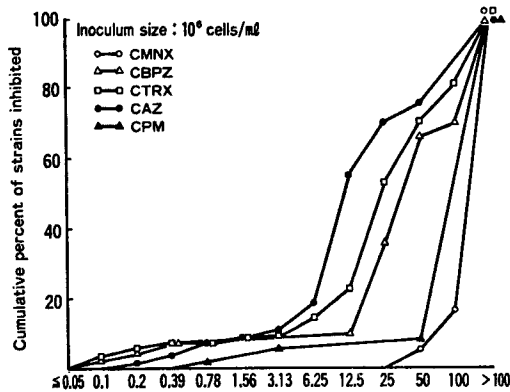
Fig. 1—2

Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)

		MIC ($\mu\text{g/ml}$)													Total
Drug		≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
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

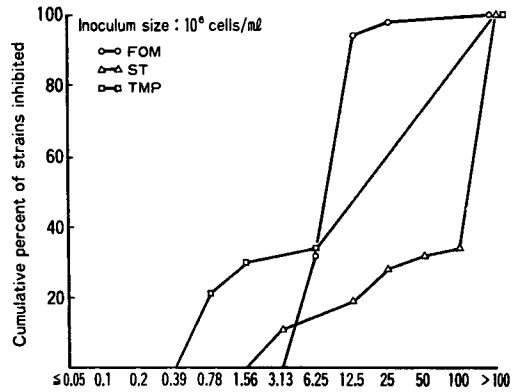
Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)



M I C (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	
CPM					1		2				1		49	53	

Fig. 1—5

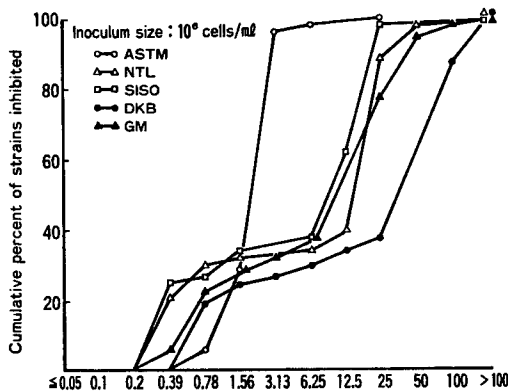
Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)



		M I C ($\mu\text{g/ml}$)															
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

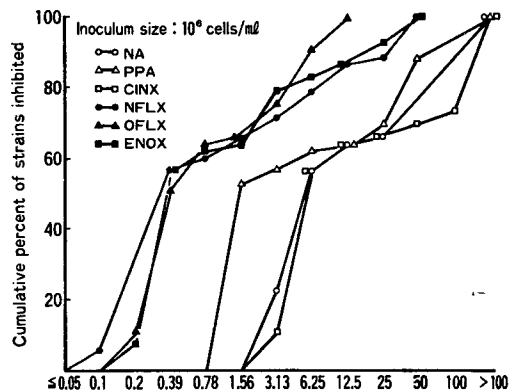
Sensitivity distribution of clinical isolates
Citrobacter freundii (53 strains)



		M I C (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			
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)



		M i C (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 GEZ では全株が 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 以上と高度耐性であった。3.13 $\mu\text{g/ml}$ に MIC のピークを有する ASTM は 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ に MIC のピークを示し比較的良好であったが、DKB では 100 $\mu\text{g/ml}$ と不良であった。FOM は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に MIC のピークがあり、1株のみが 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ および後者で 1.56 $\mu\text{g/ml}$ と比較的良好な成績であったが、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株も認められた。NA は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 ED₅₀ 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 ED₅₀ 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日目では 1,200/ml と急激な低下を示し、4日目には 560 $\pm$ 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 $\times$ 10⁴ CFU/mouse, ID₅₀ 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、LD₅₀ が 10² CFU/mouse, ID₅₀ は 1桁台で、LD₅₀ で P. aeruginosa より 10¹

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

<i>C. freundii</i> No.	Infection		Treatment					MIC ($\mu\text{g/ml}$) **
	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	Drug	Route	Hour after challenge	ED ₅₀ (mg/kg/dose)		
						Kidney	Urinary bladder	
21	1.6 $\times$ 10 ⁷ (300 ID ₅₀)	Intra- vesical	ENX	po	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.18(1.7-6.0)*	3.62(2.2-5.9)	0.39
			OFLX	po	"	2.87(0.9-8.9)	3.56(2.1-6.0)	0.39
			PPA	po	"	35.0 (6.1-200)	53.6(16.1-179)	1.56
			MINO	po	"	> 400	> 400	50
			PMPC	po	"	> 200	> 200	50
			CMX	sc	"	79.3	70.8	6.25
			CBPC	sc	"	> 400	> 400	>400
			GM	sc	"	> 50	> 50	25
53	1.0 $\times$ 10 ⁸ (100 ID ₅₀)	Intra- vesical	ENX	po	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.43(1.6-4.4)	4.42(1.4-14.0)	0.78
			NFLX	po	"	12.3(2.9-66.6)	10.9(2.7-44.1)	0.39
			PPA	po	"	61.0(30.7-121)	53.2(20.3-139)	3.13
			PMPC	po	"	28.9(6.6-126)	28.9(6.6-126)	0.78
			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 parentheses indicated 95% confidence limits.

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

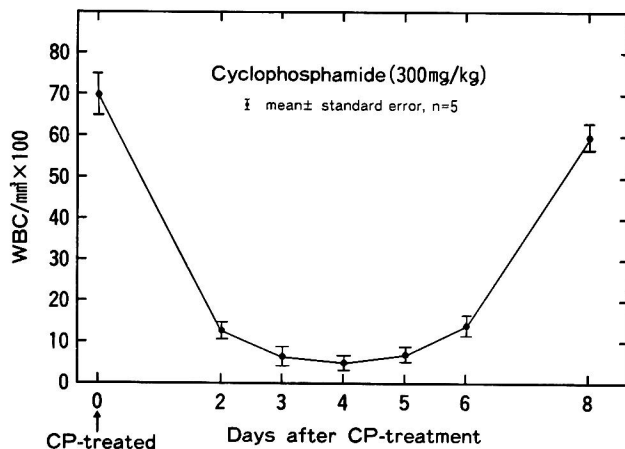


Fig. 2. The effect of cyclophosphamide (CP) on WBCs of female JCL-ICR mice

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
<i>C.freundii</i>	12	3.4×10^4	1.0×10^1	1.0×10^1
"	21	6.3×10^4	2.1×10^1	2.1×10^1
"	32	1.1×10^5	1.0×10^2	1.0×10^2
"	53	7.0×10^2	1.45	1.45
<i>E. coli</i>	P 5101	$>1.6 \times 10^7$	6.3×10^1	8.8×10^1
<i>P. morganii</i>	Kono	5.5×10^5	5.3×10^3	5.3×10^3
<i>K. pneumoniae</i>	No.13	8.0×10^3	5.6×10^1	5.6×10^1
<i>S. marcescens</i>	S-9	1.9×10^3	3.7×10^2	3.7×10^2
<i>P. aeruginosa</i>	No.12	1.5×10^1	1.5	1.5

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



Fig. 3. The mouse 4 days after cyclophosphamide treatment

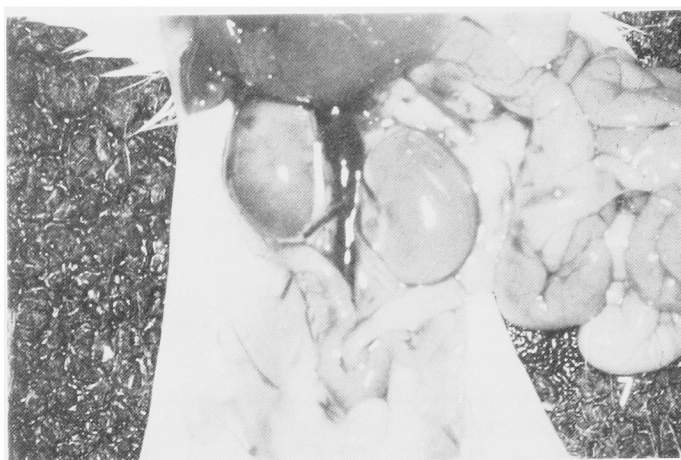


Fig. 4. The cyclophosphamide-treated mouse 3 days after inoculation with *C. freundii* No. 53

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

<i>C. freundii</i> No.	Infection			Treatment					MIC*** ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	CP* (mg/kg)	Drug	Route	Hour after challenge	ED ₅₀ ** (mg/kg/dose) Kidney	Urinary bladder	
21	1×10^3 (476 ID ₅₀)	Intravesical	300	ENX	po	3, 8, 24, 30, 48, 54	2.8(1.6-4.9)	3.1(1.9-5.2)	0.39
				OFLX	po	"	1.7(1.1-2.7)	1.7(1.1-2.7)	0.39
				NFLX	po	"	7.7(3.4-17.6)	7.7(3.4-17.6)	0.39
				PPA	po	"	27.3(12.6-59.2)	29.2(2.9-66.7)	1.56
				CMX	sc	"	70.7(22.3-224)	114.0(67.9-191)	6.25
				GM	sc	"	>50	>50	25
53	1×10^2 (69 ID ₅₀)	Intravesical	300	ENX	po	3, 8, 24, 30, 48, 54	3.51	3.51	0.78
				NFLX	po	"	11.0(5.5-21.8)	11.0(5.5-21.8)	0.39
				PPA	po	"	31.5	35.4(23.9-52.5)	3.13
				PMPC	po	"	45.7(19.1-109)	51.7(20.7-129)	0.78
				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.

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

CFU/mouse オーダー高いものの ID₅₀ では同等であった。本菌は他の対照菌と較べても LD₅₀, ID₅₀ 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 LD₅₀ が 10⁴ CFU/mouse, ID₅₀ が 10¹ CFU/mouse であり, No.32 では LD₅₀ および ID₅₀ ともに前2株に比べ 10¹ 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 4.0×10² 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)。

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

Organisms		LD ₅₀ (CFU/mouse)
<i>C. freundii</i>	1	>2.75×10 ⁷
"	7	>2.5 ×10 ⁷
"	11	<4.8 ×10 ⁷
"	12	7.9 ×10 ⁷
"	16	>3.5 ×10 ⁷
"	21	1.2 ×10 ⁷
"	22	>4.0 ×10 ⁷
"	30	>3.3 ×10 ⁷
"	32	1.26×10 ⁷
"	43	3.5 ×10 ⁷
"	45	>3.5 ×10 ⁷
"	53	1.74×10 ⁸
<i>P. aeruginosa</i>	No.12	<5.5 ×10 ⁶
<i>S. marcescens</i>	S-9	9.35×10 ⁶
<i>P. morganii</i>	Kono	3.0 ×10 ⁸
<i>K. pneumoniae</i>	No.13	4.1 ×10 ⁷
<i>E. coli</i>	P-5101	>4.1 ×10 ⁸

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

Organisms		LD ₅₀ (CFU/mouse)
<i>C. freundii</i>	1	4.7×10 ⁴
"	7	1.4×10 ⁷
"	11	7.9×10 ⁸
"	12	1.1×10 ³
"	16	2.0×10 ⁸
"	21	4.5×10 ⁴
"	22	>4.0×10 ⁸
"	30	3.3×10 ⁸
"	32	4.0×10 ³
"	43	1.3×10 ⁸
"	45	<3.5×10 ⁸
"	53	3.3
<i>P. aeruginosa</i>	No.12	1.3×10 ²
<i>S. marcescens</i>	S-9	2.6×10 ³
<i>P. morganii</i>	Kono	1.3×10 ³
<i>K. pneumoniae</i>	No.13	4.5×10 ⁸
<i>E. coli</i>	P-5101	9.0×10 ⁸

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

<i>C. freundii</i> No.	Infection			Treatment				MIC (μg/ml) **
	Challenge dose (CFU/mouse)	Route	mucin	Drug	Route	Hour after challenge	ED ₅₀ (mg/kg/dose)	
21	2.5×10 ⁶ (55LD ₅₀)	ip	+	ENX	po	0,6	2.02 (1.49-2.75) *	0.39
				OFLX	po	"	1.63 (1.25-2.13)	0.39
				PPA	po	"	8.17 (4.54-14.7)	1.56
				MINO	po	"	> 100	50
				CMX	sc	"	23.6	6.25
				CBPC	sc	"	> 400	> 400
				GM	sc	"	12.6 (9.57-16.5)	25
				ENX	po	0,6	2.93 (2.06-4.16)	0.78
53	2.5×10 ³ (757LD ₅₀)	ip	+	OFLX	po	"	4.09 (2.49-6.74)	0.78
				PPA	po	"	10.5	3.13
				MINO	po	"	5.26	6.25
				CMX	sc	"	0.47 (0.29-0.78)	0.2
				CBPC	sc	"	17.7	6.25
				GM	sc	"	0.51	0.78
				ENX	po	0,6	2.93 (2.06-4.16)	0.78
				OFLX	po	"	4.09 (2.49-6.74)	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

Organisms		LD ₅₀ (CFU/mouse)
<i>C. freundii</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	No.12	5.0×10 ⁶
<i>S. marcescens</i>	S-9	>5.0×10 ⁷
<i>P. morgani</i>	Kono	>6.0×10 ⁷
<i>K. pneumoniae</i>	No.13	>7.5×10 ⁷
<i>E. coli</i>	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 ED₅₀ が 1.7 mg/kg とともにすぐれており, GM の ED₅₀ は 50 mg/kg 以上とともに悪かった. No. 53 では GM および CMX の ED₅₀ が 1.6~1.9 mg/kg とともにすぐれていた.

(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. morgani* 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 ED₅₀ 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 ED₅₀ 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 10⁶ CFU/mouse オーダーの LD₅₀ を示したが, 他の菌株ではすべて 10⁷ CFU/mouse 以上の LD₅₀ 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 は腸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⁹⁾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¹¹⁾、後藤¹²⁾および小酒井ら¹³⁾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³⁾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 5.3×10^3 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 1/10~1/10⁴ 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⁶⁾ および Lipsky ら⁹⁾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 とムチン非添加に比べ 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 10⁶ CFU/mouse の LD₅₀ 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、あるいは開発中のピ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 $1/10 \sim 1/10^4$ 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）．皮と泌 23：357～368, 1961
- 2) 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
- 7) 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 H_2S -negative *Citrobacter*. APPL Microbiol 28: 22～25, 1974
- 9) Lipsky BA, Hook III EW, Smith AA and Plorde JJ: *Citrobacter* infections in humans. Rev Infect Dis 2: 746～760, 1980
- 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・関口金雄・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・蝶良英郎：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)