

BACTERIOLOGICAL STUDY OF INCULABLE CHRONIC OTITIS MEDIA

Toshiichi Awataguchi and Tomonori Takasaka

Department of Otolaryngology, Tohoku University Medical School

Isao Kowata

Department of Otolaryngology, Tohoku Koseinenkin Hospital

In many cases of the inculable chronic otitis media, *Pseudomonas aeruginosa* is isolated in otorrhea and is resistant to antibiotic therapy.

Fifteen cases in 62 cases of the inculable chronic otitis media in our hospital from 1985 to 1986 have been isolated *pseudomonas aeruginosa*, in which two high antibiotics resistant strains were isolated. These two strains were examined in the mechanism of resistance to antibiotics.

The results were as follows:

1) These two strains have not been

found the increase of resistance to antibiotics in sub-MIC culture because of these having high β -lactamase and enzyme activity naturally.

2) The resistance to antibiotics increased in the high concentrated antibiotics culture and then high resistant strains were selected.

Therefore, in the inculable chronic otitis media, the possibility of high antibiotics resistant *pseudomonas aeruginosa* infection has to be considered.

難治性慢性中耳炎の細菌学的検討

東北大学耳鼻咽喉科

粟田口 敏一・高坂 知節

東北厚生年金病院耳鼻咽喉科

古和田 勲

はじめに

抗生剤の進歩は目覚ましいものがあり、それぞれに特徴ある作用を持ったものが開発されている。しかし、感染症の原因菌としては従

来のものに加え、かつては問題とならなかった弱毒菌が病原菌として注目されて来ている。中耳炎においては多剤耐性黄色ブドウ菌の増加や緑膿菌を始めとするグラム陰性桿菌が問題と

なっている。緑膿菌に対しては通常用いられる抗生剤は効果がなく耐性であり、感受性のある抗生剤でもMICが高いため十分な局所濃度が得られない。更に菌体外産生物質のプロテアーゼは組織を障害するため重篤になりやすいことなどより治療は困難となっている。

今回、われわれは、抗生剤投与をうけながらも耳漏停止には到らず難治性となった慢性中耳炎患者の耳漏より多剤耐性菌を分離し、耐性獲得機構について検討した。

対 象

東北厚生年金病院耳鼻咽喉科及び東北大学付属病院耳鼻咽喉科外来を受診した慢性中耳炎患者の中で少なくとも1ヵ月以上、他施設において抗生剤投与をうけたが耳漏の停止しないものを対象とした。対象症例は80耳であったが菌を検出したものは62耳であった。

<i>Staphylococcus aureus</i>	23 (37.0%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (8.0%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Corynebacterium sp.</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 (24.1%)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	1
<i>Pseudomonas acnes</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Escherichia feacalis</i>	2 (3.2%)
<i>Escherichia aerogenes</i>	1
<i>Neiseria sp.</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2 (3.2%)
<i>Alcaligenes sp.</i>	2 (3.2%)
<i>Citrobacter diversus</i>	1
<i>Candidia sp.</i>	3 (4.8%)
total	62

Table 1. Strains Isolated from the Otorrhea of the Patients with Incurable Chronic Otitis Media

方法及び結果

62耳の耳漏の細菌学的検査の結果、*Stap-*

hylococcus aureus 23例 (37%), *Pseudomonas aeruginosa* 15例(24.5%), *Staphylococcus epidermidis* (8.0%)であった。*Pseudomonas aeruginosa* を検出したものにつき感受性検査を行った。MICは化学療法学会標準法に準じ寒天平板希釈法にて行った。また、誘導薬剤濃度を求める場合は液体希釈法を用いた。*Pseud. aeruginosa* を検出したもののうち多剤耐性であったものは2例であった。これら2株の検出菌を用い緑膿菌の耐性獲得機構につき検討した。(Table 1)

症例1では肉眼的に明らかに異なる2種類のコロニーが形成された。両者の血清型はE型でβ-lactamase産生株であったが、Gentamicin には異なる感受性を示し、一方は強耐性株であった。これら2種の検出菌について以下の実験を行った。(Table 2)

使用薬剤は下記を用いた。

- Cephaloridine (C E R, 鳥居薬品)
- Cefoperazone (C P Z, 富山化学)
- Piperacillin (P I P C, 富山化学)
- Cefoxitin (C F X, 万有製薬)
- Gentamicin (G M, エセックス日本)

(症例1)

	①Pseud. aerg.		②Pseud. aerg.	
	10 ^e	10 ^e	10 ^e	10 ^e
PIPC	>400	200	>400	200
CPZ	400	100	200	100
CFS	100	100	100	100
GM	400	400	25	25

TOB	400	400	200	200
AMK	200	100	200	100
FOM	—	12.5	—	12.5
CPM	>400	100	>400	100
CAZ	3.13	3.13	1.56	1.56
OFLX	1.56	1.56	0.78	0.78
BRL-28500	200	200	200	200
β-lactamase (+) β-lactamase (+)				
sero type E E				

Table 2. Sensitivity to Antibiotics

1) β -lactamase の誘導及び酵素活性の測定

上記薬剤をInducer としてBroth dilutionによりMICを決定した(Table 3)。その結果GMを除き各薬剤に対し高耐性を示した。

Table 3. MICs to Antibiotics in *Pseud. aeruginosa*

Drug Strain	CFX	CPZ	PIPC	GM
	<i>P.aerug.</i>	3200	3200	6400

* Broth dilution method

GMに対するMICが低い値を示したのは、一旦、凍結保存した後再培養した時に何らかの理由で耐性が脱落したためであった。次に、MIC以下の濃度(Sub-MIC)を用い β -lactamase の誘導を行うと共に酵素活性を測定した。つまり、*Pseud. aeruginosa*の一夜培養液を新鮮なMüller Hinton Brothで10倍希釈し、前記薬剤を 1/4 MIC, 1/40 MIC, 1/400MICの濃度になるように加え、35°Cで2時間振盪培養を行った。その後集菌して0.067Mリン酸緩衝液(PH7.0)で2回洗浄の後、超音波破壊をし、その上清を粗酵素液としてSpectrophotometric methodで測定した。その結果、用いた株はSub-MIC下の培養ではさほど酵素誘導はうけなかった。つまり、この株は元来構成的に β -lactamaseを高度に産生していることがわかった。また、薬剤に対する感受性にも誘導前後では変化が認められなかった。(Table 4)

2) 耐性細胞の選択

CPZ 800 $\mu\text{g/ml}$ (32MIC濃度), GM100 $\mu\text{g/ml}$ (8 MIC濃度)含有培地に濃厚菌液を塗布し、耐性細胞の選択を行った。さらに同含有培地で2~3代継代した後MICを決定した。その結果 10^6 CFU/ml接種ではCPZ 200 $\mu\text{g/ml}$, 10^8 CFU/mlにおいてはCPZ

>400 $\mu\text{g/ml}$, GM100 $\mu\text{g/ml}$ と強度耐性株が得られた。(Table 5)

Table 4. Induction of β -lactamase and Enzyme activity

Inducer	Conc.	MIC determination ($\mu\text{g/ml}$)			β -Lactamase activity (U/mg)	
		CPZ	PIPC	GM		
CFX	1/4MIC	50	400	25	6216	1.47
	1/40MIC	50	400	25	4853	1.14
	1/400MIC	50	200	25	4849	1.14
CPZ	1/4MIC	50	200	25	4791	1.13
	1/40MIC	50	200	25	3870	0.91
	1/400MIC	50	200	25	4926	1.16
PIPC	1/4MIC	50	200	25	4958	1.17
	1/40MIC	50	200	25	5607	1.32
	1/400MIC	50	400	25	5140	1.21
GM	1/4MIC	50	200	25	1521	0.36
	1/40MIC	50	400	25	4161	0.98
	1/400MIC	50	400	25	4337	1.02
Control		50	200	25	4243	1.00

Table 5. Selection of Antibiotics resistant strain

	Pseud. aerg. CPZ 800		Pseud. aerg. GM 100	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	10^6	10^8	10^6	10^8
CPZ	> 400	200	400	50
GM	50	25	100	25

CPZ : 800 μg (32MIC)
GM : 100 μg (8MIC)

考 按

慢性中耳炎が遷延化し難治性となった患者の耳漏培養の結果 *Pseudomonas aeruginosa* が検出されたが、肉眼的に明らかに異なるコロニーが形成されており血清型は同じE型でありながらGMに対するMICでは400と25と明らかに異っていた。このように同定が同一菌でも明らかに薬剤感受性の異なる複数菌が病巣を形成していることが示唆された。この高度耐性株を用い耐性の誘導をMIC以上の高濃度抗生剤含有培地で行った結果、耐性の増強がみられ、この増強は菌数の増加に比例していた。この現象は一般に耐性化増強のメカニズムの一つとして述べられていることで、難治化の因子として菌量の問題は極めて重要である。更にSub-MIC下で β -lactamaseの誘導

及び酵素活性の測定を行ったが、使用した菌株はもともと構成的に β -lactamaseを高度に産生する株で誘導はさきほどけないものと思われた。従つて薬剤感受性も誘導前後では著明な変化は認められなかった。抗生剤に抵抗する難治性緑膿菌感染症においては高い β -lactamase活性や酵素活性を持った菌株が選択的に生き残っていることが推測され、十分な感受性検査を行った上で抗生剤を選択し局所に十分な濃度が得られる投与方法、投与量を予じめ考える必要があろう。

参 考 文 献

- 1) 横田 健：薬剤耐性，最新医学，36：1690～1696，1981.
- 2) 杉田麟也：慢性中耳炎の細菌学的研究，日耳鼻，80：907～917，1977.
- 3) 五島瑳智子，武藤弓子：抗生物質不活化酵素，病態生理，5：676～683，1986.
- 4) 五島瑳智子，辻 明良：緑膿菌の分離同定および生物学的性状について，最新医学，36：1674～1681，1981.