

耐性乳酸菌製剤に対する抗 MRSA 薬の薬剤感受性 —耐性乳酸菌製剤に含まれる

Enterococcus faecalis は linezolid に耐性を示す—

吉田 宣政¹⁾・河原 菜摘²⁾・田中 博和³⁾・福原 佐知¹⁾・檜山 智子¹⁾

¹⁾九州中央病院薬剤科*

²⁾同 検査技術科

³⁾福岡徳洲会病院薬剤部

受付日：2018年10月15日 受理日：2019年1月8日

抗菌薬の副作用として引き起こされる下痢は、抗菌薬関連下痢症（AAD）といわれ、AADの治療には耐性乳酸菌製剤が用いられる。現在、4種類（6株）の耐性乳酸菌製剤が使用可能であるが、抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）薬が、これらの菌株に対し耐性を示すかは不明である。

そこでわれわれは、耐性乳酸菌製剤に含まれる6株（*Enterococcus faecalis* 129 BIO 3B-R, *E. faecalis* BIO-4R, *E. faecalis* PCR, *Lactobacillus acidophilus* 4AR, *Bifidobacterium infantis* SMR, *Bifidobacterium longum* LBR）に対し、MRSAの治療に用いる9種類の抗菌薬、vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), arbekacin, linezolid (LZD), daptomycin (DAP), sulfamethoxazole-trimethoprim, rifampicin (RFP), clindamycin (CLDM), minocycline (MINO) の *in vitro* での薬剤感受性検査を行った。

VCM, TEIC, DAP, MINO ではいずれの菌株に対しても MIC ≤ 1 μg/mL であり、明らかな耐性を示さなかった。一方 LZD では、*E. faecalis* 129 BIO 3B-R, *E. faecalis* BIO-4R の2株が耐性を示し、RFP では *Enterococcus* 属菌3株が、CLDM では *L. acidophilus* 4AR と *B. longum* LBR の2株が耐性を示した。

AADを発症した際は対象抗菌薬を中止することが最優先であるが、継続せざるを得ない場合は、対象抗菌薬に耐性を示す菌株を含む耐性乳酸菌製剤を正しく選択することで、より腸内フローラの改善効果が期待できる。

Key words: probiotics, linezolid-resistance, enterococci, anti-MRSA agent, antibiotic-associated diarrhea

はじめに

抗菌薬の副作用として頻度が高い下痢は、抗菌薬関連下痢症（antibiotic-associated diarrhea, AAD）といわれ、抗菌薬投与患者の5~10%に認められる¹⁾。小泉らは、注射剤抗菌薬投与後のAAD発症頻度を系統別に調査し、カルバペネム系薬、フルオロキノロン系薬、第4世代セファロsporin系薬などの広域な抗菌スペクトルをもつ薬剤や、抗メチシリン耐

性黄色ブドウ球菌（MRSA）薬がAADを引き起こしやすいことを報告している²⁾。

McFarland は25件のランダム化比較試験の結果をメタ解析し、さまざまな種類のプロバイオティクスが、AADの治療法として有望であると報告している³⁾。医薬品におけるプロバイオティクスは整腸剤に当たり、AADの治療には、整腸剤の中でも抗菌薬に耐性を有する耐性乳酸菌製剤が用いられる。AAD発症時は原因抗菌薬の中止を第一に考えない

*福岡市南区塩原 3-23-1

といけないが、症状が軽症の場合や抗菌薬を継続せざるを得ない場合は、抗菌薬に耐性乳酸菌製剤が併用される。

現在、国内では4種類の耐性乳酸菌製剤が上市されているが、比較的新しい抗菌薬であるフルオロキノロン系薬、カルバペネム系薬や、抗 MRSA 薬との併用は保険適用となっておらず、これらの抗菌薬における感受性検査は、インタビューフォームに記載されていない。しかし、耐性乳酸菌製剤に含まれる菌株は主なフルオロキノロン系薬には耐性を示さず、カルバペネム系薬には耐性を示すことが報告されている⁴⁻⁶⁾。一方、MRSA の治療に用いる薬剤としてはこれまでに、vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), minocycline (MINO) には耐性を示さないことがわかっている。各耐性乳酸菌製剤のインタビューフォームによると、エンテロノン[®]-R に含まれる菌株には arbekacin (ABK) が耐性を示し、ラックビー[®]-R に含まれる菌株には sulfamethoxazole が耐性を示すことがわかっているが、その他の組み合わせや、linezolid (LZD), daptomycin (DAP), sulfamethoxazole-trimethoprim (ST), rifampicin (RFP), clindamycin (CLDM) については報告がない。そこでわれわれは、耐性乳酸菌製剤に含まれる菌株に対する、これらの抗菌薬における耐性の有無を明らかにするため、*in vitro* での薬剤感受性検査を行った。

1. 材料と方法

1. 耐性乳酸菌製剤

現在上市されている耐性乳酸菌製剤として、ビオフィェルミン R[®]錠 製造番号 7K615 (ビオフィェルミン製薬株式会社)、エンテロノン[®]-R 散 製造番号 6H836A (EA ファーマ株式会社)、レベニン[®]散 製造番号 7166 (わかもと製薬株式会社)、ラックビー[®]-R 散 製造番号 CE6A (興和株式会社) の4製剤を用いた。各耐性乳酸菌製剤に含まれる菌株を Table 1 に示す。

2. 抗菌薬

薬剤感受性検査に用いた抗菌薬は、VCM, TEIC, ABK, LZD, DAP, ST, RFP, CLDM, MINO の9薬剤とした。

3. 菌株の採取

耐性乳酸菌製剤に含まれる6株をシェドラー 0.02% 寒天培地 (ビタミン K3 添加) (半流動) (ビ

Table 1. Bacterial strains contained in antibiotic-resistant probiotics

Brand name	Probiotic strains
Biofermin-R [®]	<i>Enterococcus faecalis</i> 129 BIO 3B-R
Enteronon [®] -R	<i>E. faecalis</i> BIO-4R
Lebenin [®]	<i>E. faecalis</i> PCR
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4AR
	<i>Bifidobacterium infantis</i> SMR
LACB [®] -R	<i>Bifidobacterium longum</i> LBR

オメリュー・ジャパン)へそれぞれ溶解し、35°C-24時間培養を行った。その上清をトリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD), “KBM” アネロウサギ血液寒天培地 (コージンバイオ) へ接種し、ヒツジ血液寒天培地は 5% 炭酸ガス条件下、アネロウサギ血液寒天培地はアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気条件下とし、すべて 35°C-48 時間培養を行って菌株を分離した。

4. 菌種同定

ビオフィェルミン R[®], エンテロノン[®]-R, レベニン[®]に含まれる *Enterococcus faecalis* は、VITEK 2[™] GP 同定カード (ピオメリュー・ジャパン) にて同定を行った。*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* に関しては RapID ANAII (Remel) にて同定を行った。

5. 薬剤感受性試験

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M100-S20, M45-A, および M11-A7 の微量液体希釈法に準拠し、ドライプレート ‘栄研’ (栄研化学) にて MIC を測定した。*Enterococcus* 属菌は基礎培地に MIC 測定用ミューラーヒントンプイオン ‘栄研’ (栄研化学) (陽イオン調整) を用いて 35°C-24 時間好気培養, *Lactobacillus* 属菌は MIC 測定用ストレプト・ヘモサプリメント ‘栄研’ (栄研化学) を添加した陽イオン調整ミューラーヒントンプイオンを用いて 35°C-24 時間好気培養, *Bifidobacterium* 属菌は MIC 測定用ブルセラブロス ‘栄研’ (栄研化学) を用いて 35°C-48 時間嫌気培養を行った。

II. 結果

各菌株に対する抗菌薬の MIC を Table 2 に示す。

VCM では、*Enterococcus* 属菌の3株と *L. acidophilus* 4AR は感受性があり耐性を示さなかった。*Bifidobacterium* 属菌には CLSI の判定基準はない

Table 2. MIC values of anti-MRSA antibiotics for different bacterial strains

Probiotic strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)								
	VCM	TEIC	ABK	LZD	DAP	ST	RFP	CLDM	MINO
<i>Enterococcus faecalis</i> 129 BIO 3B-R	≤ 0.5	1	256	8	0.5	20	4	64	≤ 0.5
<i>E. faecalis</i> BIO-4R	≤ 0.5	1	64	16	0.5	20	>16	32	≤ 0.5
<i>E. faecalis</i> PCR	1	1	32	4	≤ 0.25	20	16	32	≤ 0.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4AR	1	1	16	2	1	20	2	16	≤ 0.5
<i>Bifidobacterium infantis</i> SMR	≤ 0.5	≤ 0.5	8	≤ 0.5	≤ 0.25	40	≤ 0.25	≤ 0.5	≤ 0.5
<i>Bifidobacterium longum</i> LBR	≤ 0.5	≤ 0.5	>256	1	≤ 0.25	20	≤ 0.25	128	≤ 0.5

VCM: vancomycin, TEIC: teicoplanin, ABK: arbekacin, LZD: linezolid, DAP: daptomycin, ST: sulfamethoxazole-trimethoprim, RFP: rifampicin, CLDM: clindamycin, MINO: minocycline

が、2株とも MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ を示した。

TEIC でも VCM と同様の結果となった。*Enterococcus* 属菌には感受性があり耐性を示さず、*Lactobacillus* 属菌と *Bifidobacterium* 属菌には判定基準はないが、MIC は VCM と同じ値を示した。

ABK では、*Enterococcus* 属菌、*Lactobacillus* 属菌、*Bifidobacterium* 属菌のすべてに判定基準はない。最も MIC が高い *B. longum* LBR で MIC > 256 $\mu\text{g/mL}$ を示し、最も MIC が低い *B. infantis* SMR で MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$ を示した。

LZD では、*E. faecalis* 129 BIO 3B-R、*E. faecalis* BIO-4R の MIC はそれぞれ、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ を示した。CLSI の判定基準では MIC $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ で耐性となるため、この2株が耐性と判定された。*Lactobacillus* 属菌と *Bifidobacterium* 属菌には判定基準はないが、最も MIC が高い *L. acidophilus* 4AR では MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$ であった。

DAP では、*Enterococcus* 属菌は susceptible のみ判定基準が設定されており、MIC $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ が感受性となる。これにより *Enterococcus* 属菌の3株は感受性と判定され耐性を示さなかった。*Lactobacillus* 属菌と *Bifidobacterium* 属菌には判定基準はないが、最も MIC が高い *L. acidophilus* 4AR では MIC = 1 $\mu\text{g/mL}$ であった。

ST では、*Enterococcus* 属菌、*Lactobacillus* 属菌、*Bifidobacterium* 属菌のすべてに判定基準はない。全6株の MIC は 20~40 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。

RFP では、*Enterococcus* 属菌の3株とも耐性を示した。*Lactobacillus* 属菌と *Bifidobacterium* 属菌には判定基準はないが、最も MIC が高い *L. acidophilus* 4AR では MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$ であった。

CLDM では、*Enterococcus* 属菌には判定基準は

ないが、3株の MIC は 32~64 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。*L. acidophilus* 4AR では MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$ となり耐性を示した。*Bifidobacterium* 属菌では菌株によって MIC が大きく異なり、*B. longum* LBR では耐性を示したが、*B. infantis* SMR では感受性があり耐性を示さなかった。

MINO では、*Enterococcus* 属菌の3株は感受性があり耐性を示さなかった。*Lactobacillus* 属菌と *Bifidobacterium* 属菌には判定基準はないが、いずれの菌株も MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ であった。

III. 考察

ジオフェルミン[®]、エンテロノン^{®-R}、レベニン[®]に含まれる *E. faecalis* は、いずれも *Enterococcus faecium* と同定された。*L. acidophilus*、*B. infantis*、*B. longum* に関しては添付文書に記載された菌種と同定された。*E. faecalis* が *E. faecium* と同定されたことについては、*E. faecalis* が抗菌薬に対する耐性化の過程で炭水化物の利用能に影響を受け、*E. faecium* に類似した性状を示すようになったためと考えられている⁷⁾。実際に耐性乳酸菌製剤に含まれる *E. faecalis* の同定検査を行ったところ、*E. faecium* と同定された報告があり⁵⁾、今回も同様の影響が考えられた。

今回の結果より、耐性乳酸菌製剤に含まれる菌株に対する、MRSA の治療に用いる薬剤の感受性が判明した。興味深い知見として、*E. faecalis* 129 BIO 3B-R、*E. faecalis* BIO-4R の2株が LZD に耐性を示すことが明らかになった。LZD は本来 Vancomycin-resistant Enterococci の治療薬として発売された抗菌薬であるが、ジオフェルミン[®]とエンテロノン^{®-R}に含まれる菌株が LZD に耐性を示したことから、この2株は Linezolid-resistant Enterococci と表現できる。LZD の発売前から国内で

広く使われている両剤に含まれる *E. faecalis* が、すでに LZD 耐性株であったことは非常に興味深い。そこで、これら 2 株の耐性遺伝子が他の菌株に水平伝播する可能性がないかを考えた。まず、ビオフェルミン R[®] と エンテロノン R[®]-R のインタビューフォームによると、*E. faecalis* 129 BIO 3B-R と *E. faecalis* BIO-4R のいずれも、耐性遺伝子はプラスミド性のものでなく染色体性のものであり、他の腸内細菌科細菌に耐性遺伝子は伝播しないことが確認されている。次に、全国規模での臨床分離株のサーベイランスで、*Enterococcus* 属菌に LZD 耐性株がどの程度存在するかを調べた。2010 年の薬剤感受性サーベイランスの報告では、*E. faecalis* が 641 株、*E. faecium* が 591 株分離され、いずれも LZD 耐性株は 0% であった⁸⁾。同じ調査が 2013 年にも行われ、この年は *E. faecalis* が 629 株、*E. faecium* が 511 株分離され、*E. faecalis* の 0.2% が LZD 耐性と報告されている⁹⁾。著者らは特にこのことについて言及していないが、耐性乳酸菌製剤由来かは不明ながら、臨床分離株の中には極わずかに LZD 耐性の *E. faecalis* が存在していることがわかる。さらに、当院で分離された臨床分離株の *Enterococcus* 属菌に、LZD 耐性株が存在するかを調査した。2015 年から 2017 年までの 3 年間で *E. faecalis* は 452 株、*E. faecium* は 152 株分離されていたが、LZD に耐性を示すものは 0% であった。当院では *Enterococcus* 属菌を含有する耐性乳酸菌製剤としてビオフェルミン R[®]錠を採用しているが、*E. faecalis* 129 BIO 3B-R による LZD 耐性遺伝子の水平伝播は確認されず、同時に *E. faecalis* 129 BIO 3B-R そのものが、感染症の起炎菌になっていることも確認されなかった。今後も臨床分離株の中の *Enterococcus* 属菌に LZD 耐性株が増えていないか注意を払う必要がある。

おわりに

.....
AAD を発症した際は、対象抗菌薬を中止するこ

とが最優先である。やむを得ず耐性乳酸菌製剤を併用する場合は、抗菌薬との併用が保険適用となっている耐性乳酸菌製剤を用いなければならない。しかし、併用が保険適用となっていない抗菌薬による AAD を発症した場合は、われわれや諸家の報告をもとに、対象となる抗菌薬に耐性を有する耐性乳酸菌製剤を選択することで、より腸内フローラの改善効果が期待できる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) Surawicz C M: Antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis: are they less common with poorly absorbed antimicrobials? *Cemotherapy* 2005; 51: 81-9
- 2) 小泉祐一, 木村 健, 畑中重克, 門谷美里, 高橋陽一: 薬剤別にみた抗菌薬関連下痢症の発症リスク。環境感染誌 2008; 23: 175-80
- 3) McFarland L V: Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 812-22
- 4) 江頭かの子, 北原隆志, 柏木 香, 樋口則英, 中嶋幹郎, 一川暢宏, 他: 長崎大学医学部・歯学部附属病院における整腸剤適正使用への取り組み。薬誌 2006; 126: 1155-61
- 5) 五郎丸剛, 佐々木智也, 藤井利加, 一木孝治, 高橋浩二郎, 福長将仁, 他: フルオロキノロン系抗菌剤に対する耐性乳酸菌および酪酸菌製剤の感受性について。医療薬 2008; 34: 59-63
- 6) Yamaguchi T, Miura Y, Matsumoto T: Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains used in clinical practice as probiotics. *J Infect Chemother* 2013; 19: 1109-15
- 7) 嶋崎幸也, 細谷和良, 田子兼重, 瀬尾元一郎: 腸球菌製剤の微生物的性状に関する研究。病院薬学 1993; 19: 295-302
- 8) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 館田一博, 岩田守弘: 2010 年に全国 72 施設の臨床材料から分離された 12,866 株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiotics 2012; 65: 181-206
- 9) 山口恵三, 館田一博, 大野 章, 石井良和, 村上日奈子: 2013 年に全国 69 施設の臨床材料から分離された 11,762 株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiotics 2016; 69: 1-25

Susceptibility of antibiotic-resistant probiotics to anti-MRSA agents: *Enterococcus faecalis* in antibiotic-resistant probiotics is susceptible to linezolid

Nobumasa Yoshida¹⁾, Natsumi Kawahara²⁾, Hirokazu Tanaka³⁾,
Sachi Fukuhara¹⁾ and Tomoko Hiyama¹⁾

¹⁾ Department of Pharmacy, Kyushu Central Hospital, 3-23-1 Shiobaru, Minami-ku, Fukuoka, Fukuoka, Japan

²⁾ Department of Clinical Laboratory, Kyushu Central Hospital

³⁾ Department of Pharmacy, Fukuoka Tokushukai Hospital

Diarrhea that occurs as an adverse effect to antibiotic treatment is known as antibiotic-associated diarrhea (AAD) and can be treated with antibiotic-resistant probiotics. Four species (six strains) of lactic acid bacteria are currently used in antibiotic-resistant probiotics, but whether they exhibit resistance to the antibiotics used to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is unknown.

We therefore conducted *in vitro* tests of the susceptibility of six strains of lactic acid bacteria contained in antibiotic-resistant probiotics (*Enterococcus faecalis* 129 BIO 3B-R, *E. faecalis* BIO-4R, *E. faecalis* PCR, *Lactobacillus acidophilus* 4AR, *Bifidobacterium infantis* SMR, and *Bifidobacterium longum* LBR) to nine types of antibiotic used to treat MRSA: vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), arbekacin, linezolid (LZD), daptomycin (DAP), sulfamethoxazole-trimethoprim, rifampicin (RFP), clindamycin (CLDM), and minocycline (MINO).

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of VCM, TEIC, DAP, and MINO were all $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, and no obvious resistance to these antibiotics was observed. However, two strains (*E. faecalis* 129 BIO 3B-R and *E. faecalis* BIO-4R) exhibited resistance to LZD, three strains of *Enterococcus* exhibited resistance to RFP, and two strains (*L. acidophilus* 4AR and *B. longum* LBR) exhibited resistance to CLDM.

The first priority in the treatment of AAD is the withdrawal of the antibiotic causing the condition; however, if its use must be continued, the correct choice of the antibiotic-resistant probiotic that exhibits resistance to the specific antibiotic may lead to more effective improvements in gut flora.