

結核菌におけるストレプトマイシン耐性上昇の 分析的研究

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

金井 興美・志賀 康夫・伊藤 文子

(昭和 26 年 3 月 27 日受付)

I 緒 言

ストレプトマイシン (以下「ス」と略す) が結核治療薬として劃期的なものであることは、今日既に確立された事実であるが、その臨床的治療効果は病変の位置、性質によつて異り、副作用の点とともに、大きな欠点であることは屢々指摘される所である。しかし「ス」の使用に際して最も重大障害は、結核菌がこの薬物に対して容易に耐性を獲得する事実であつて、この現象の機序を明らかにすることは臨床に必要であるのみならず、また生物学的にも興味ある研究課題である。この問題に関しては既に試験管内及び動物実験による多くの知見が知られているが、近年 Yegian 及び Vanderlinde⁽¹⁾ は「ス」その他の化学療法剤に対する結核菌の耐性の問題を綜的に述べ、耐性上昇の機序について詳細に論じている。さて「ス」耐性結核菌株の出現を今日まだ適応 (Adaptation) 現象とし、「ス」を含む環境に対する菌の後天的な順応であるとする者もあるが、我々は細菌遺傳学的立場から特発的な突然変異 (Mutation) によつて生じ、これが「ス」によつて人為的に淘汰されるのであると説明したい多くの実験を知っている。^(2,3,4,5) 特に Luria 及び Delbruek⁽⁷⁾ によつて始めて案出された簡単な手技を用いて、Demerec^(2,6) は黄色ブドウ状菌のペニシリンまたは「ス」に対する耐性変異株が、これらの薬物を含ませ環境中の数個の感性菌より由来し得ることを明らかに示した。我々は結核菌による「ス」耐性上昇の現象を同じ立場から説明せんとして、前に「ス」に接触したことのない BCG の継代保存菌株より耐性菌を二種類の方法で分離して、その分布の状態を分析し、さらに分離された変異耐性菌を人為的に感性菌中に混合して「ス」耐性度に及ぼす影響を研究した。一方耐性 BCG の染色性、毒性についても考究したので、以下その方法成績について報告する。

II 実験材料

使用菌株：実験に供せられた結核菌は国立予防衛生研究所結核部に保存された BCG 株に由来するもので、もちろん以前に「ス」に接触したことのない株である。

ソートン培地上 37°C で 2—3 週培養を用うるを常とした。菌液調製には水晶球入りの硬質コルペンを用いて手振法によつた。

ストレプトマイシン：Squibb のストレプトマイシン塩酸塩を力価検定後用いた。蒸留水で段階的に稀釈した系列を作り、それぞれ下記の培地に混じて培地中で所期の濃度となる如くした。培地、① Kirohner (Minas-Ser) 培地⁽⁸⁾ 基礎培地を 120°C 20 分滅菌後馬血清を 10% に無菌的に混じ、中試験管に 4.5cc ずつ分注し、「ス」稀釈液を 0.5cc ずつ加え、培地中で 10 分の 1 となり所期の濃度とする如くした。② Kirohner (Sy-Ser) 寒天平板培地。上述の Minas-Ser 基礎培地にグリセリンの入つた Sy-Ser 基礎培地に 3% に寒天を加えて 120°C 20 分間滅菌後、50°C に保つて馬血清と「ス」稀釈液を加え、最後に直徑 7 cm のカレルの瓶に 25cc ずつ分注して平板となした。「ス」を加えない場合は使用菌浮游液の生菌数測定に用いた。

III 実験成績

(1) 「ス」を 0, 0.1, 1, 10, 15, 20, 25, 30 及び 100 γ /cc の 9 種の濃度を含む Kirohner 寒天培地 (上記) を各濃度につき 4 本ずつ用意し、これらにソートン培地上 2 週培養の BCG の 2.5 mg を一様に接種した。

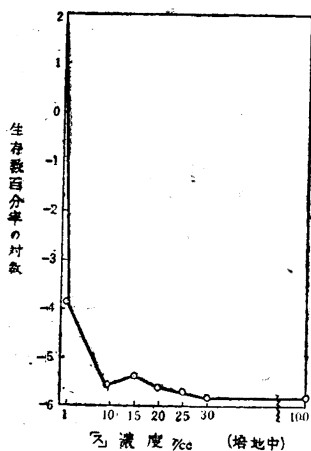
定量培養により接種生菌数は $28 \times 10^{(7)}$ と計算された。接種後 37°C で 7 週培養後発生集落数を計算した。また生じた集落を一つ一つ別々に拾い上げて菌液を調製し、「ス」含有 Minas-Ser 培地でそれらの「ス」耐性度を再検査した。それらの成績を第 1 表、第 2 表として示し、また第 1 表は第 1 図に「ス」耐性菌の分布曲線として表現した。すなわち第 1 表の如く 0, 0.1 γ /cc においては培地全表面を苔状に融合発育して個々の集落を見出し得ない程であるが、1 γ /cc の培地表面には 300—400 の孤立した小集落の発生が見られる。さらに 10 γ /cc においては急に発生集落数は減じて数個平均となり、それ以上「ス」濃度が増加しても集落数には変化がない。また 10 γ /cc 以上で分離された集落の「ス」耐性度を再検すると、第 2 表の如く、多くは 1000 γ /cc か、100 γ /cc に耐性で

第1表 ストレプトマイシン含有 Kirchner 寒天培地上に於ける集落発生状況(BCG接種後7週)

「ス」濃度 %/cc	フラスコ番号	発生集落数	平均	「ス」濃度	フラスコ番号	発生集落数	平均
0	1	○	冊	20	1	6	6.75
	2	冊			2	12	
	3	冊			3	3	
	4	冊			4	6	
0.1%/cc	1	冊	冊	25	1	2	5.25
	2	冊			2	10	
	3	冊			3	4	
	4	冊			4	5	
1.0	1	300~400	300~400	30	1	3	3.5
	2	○			2	5	
	3	300~400			3	1	
	4	300~400			4	5	
10	1	5	7.25	100	1	6	4.25
	2	6			2	1	
	3	15			3	5	
	4	11			4	5	
15	1	11	10.5				
	2	11					
	3	4					
	4	16					

○……雑菌 各フラスコへの接種生菌数は 28×10⁷

第1図 ストレプトマイシン耐性菌の分布曲線 (BCG)



あり、それ以下の場合は少ない。「ス」耐性菌が BCG 株から一度で分離され、その特異な分布状態と耐性度の高さは、Demerec(2) がブドウ状球菌で、Vennesland 等(3) が H37R V で行つた実験と同一傾向の成績である。

(2) 「ス」を 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 4.0, 6.4, 10, 50, 100, 1000 %/cc を含む Kirchner (Minas-Ser) 液体培地に BCG を 0.1mg それ

ぞれ接種して 37°C で 3 週間培養した。発育の見られた「ス」最高濃度の培養を「ス」を含ませ小川培地に移

第2表 各濃度にストレプトマイシンを含む Kirchner 寒天培地上に分離された集落の「ス」耐性度による分類成績

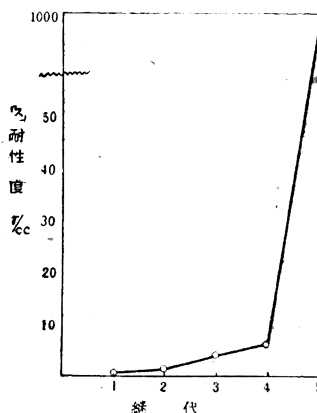
集落の分離された培地の「ス」濃度 %/cc	被検集落数	「ス」耐性度による被検集落数の分類			
		1000%/cc	100	25	0
100	3	3	0	0	0
30	4	1	3	0	0
25	8	6	0	2	0
20	4	2	0	2	0
15	10	7	3	0	0
10	4	2	2	0	0
総計	33	21	8	4	0

第3表 ストレプトマイシン含有 Kirchner 液体培地への継代接種による BCG の「ス」耐性上昇過程

継代移植	ストレプトマイシン濃度 (r/cc)												
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	4.0	6.4	10	50	100	1000
1	冊	冊	冊	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
3	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
4	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
5	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

備考 -発育なし, +微弱な発育, 冊良好, 冊非常に旺盛

第2図 第3表より表現した耐性上昇曲線



し増菌し、これを用いて 2 度目の実験を同一方法で行つた。かくして薬物との接触を繰返してゆき、第 5 代で 1000 %/cc に耐性となつたが、それ迄の上昇の過程を第 3 表として示し、第 2 図に図示した。すなわち始め 0.5 %/cc より 6.4 %/cc に 4 代かゝつて耐性は徐々に上昇し、第 5 代に急に 1000 %/cc 耐性に上昇した。もう一つの特

長は第1代では 0.1, 0.2% の発育に比して 0.4, 0.8% で発育極めて悪く, 第2代目では 1.6% で発育し得ても 0.8% に比しては不振であり, 0.1, 0.2% に比すれば 0.8% も発育程度は悪い。ところが代を繰返すうちにこの傾向は次第に失われ, 成長し得た範囲においては, その発育程度は「ス」濃度によつて差がみられなくなる。また実験(1)において我々が知つた耐性菌の分布, すなわち 10% 以上で急に分布が減少し, 1% との間には大きな差異のあること, また 1% と 0.1% との間にもさらに大なる分布差があることは, 実験(2)の継代的に「ス」に接触させて 6.4% 途迄に耐性上昇し, それより急に 1000% に上昇した事実との間に何か共通的な因果関係で相関しているとも考えられ, さらに分析する必要が感ぜられる。

(3) 実験(1)(2)の成績より, 我々は「ス」耐性菌が「ス」の存在する環境に順応して生ずるのではなくて, 特発的に自然に生じたり, それが淘汰生残するのであると考えるが, 一度分離した耐性菌が「ス」の存在しない環境中でもその耐性度を失わないことを示してさらに淘汰説の妥当性を裏づけた。100% の「ス」含有寒天培地上に分離した株を, さらに Kirchner 液体培地で 1000% の「ス」に耐性なることを認めた後, 「ス」を含まぬ小川培地に移植し, つぎにやはり「ス」を含まぬグリセリン馬鈴薯上に 2 週毎に継代培養した 10 代目に再びその耐性度を検査したところ, やはり 1000% に確実に耐性であつた。また「ス」耐性株の出現率は同じ BCG でもその都度の培養材料で異り, 一般に非常に稀であるが, 大量の菌を検索すれば多くの場合発見することができた。第4表にその成績を示す。

第4表 「ス」含有 Kirchner 寒天培地への接種量と集落発生数

材 料	接種量 mg/コ ルベン	「ス」濃度		%cc	
		0	0.1	6.4	100
1	0.5	■	■	0	0
2	0.5	■	■	5	0
3	3	■	■	0	0
4	3	■	■	0	0
5	5	■	■	6	11
6	5	■	■	15	8
7	5	■	■	10	2
8	5	■	■	2	0

(4) 以上の実験より実験室で通常取扱われている結核菌培養は, 「ス」感性菌中に極めて少数の「ス」耐性菌の混在しているものであると思われるのであるが, 我々は分

離した 1000% 「ス」耐性を BCG を人為的に「ス」感性菌中に一定少数加えて, その混合接種の「ス」含有 Kirchner 液体培地中の発育態度を追求して興味ある事実を認めた。「ス」を 0.1, 1, 10, 1000% に含む 4 本, 及び全く含まない 2 本計 6 本の Kirchner (Minas-Ser) 液体培地 5cc 分注の中試験管を 1 系列として 5 列用意した。第 1 列には「ス」感性菌 0.2mg, 第 2 列には 1000% 「ス」耐性菌を 0.1mg, 第 3 列には同耐性菌 0.0001% を接種し, 第 4, 5 列には耐性菌 0.0001mg 接種後更に感性菌を生菌又は加熱殺菌後 0.1mg 追加接種した。それぞれ定量培養によつて実際の接種生菌数を測定しておいた。かくして 37°C で 5 週迄培養観察した。第 5 表の一部としてその成績を記載したが, これによつて, 極めて少量の耐性菌が, 感性菌によつて「ス」含有の環境中で著しく発育が速進され, しかも興味あることは, それが加熱死菌でも差支えないことである。実験をさらに繰返して同一傾向を得たことは第 5 表に追加記載した如くである。すなわち耐性菌 2 個では 10% 1000% で発育できないが, 加熱「ス」感性死菌の大量混在によつて 10 週後には 1000% 中でも著明なる発育を示している。この現象が単なる加熱死菌の発育速進作用によるか, または「ス」耐性菌に対するかゝる条件での特異的な作用であるかを明らかにするために, 「ス」を含まぬ Kirchner (Minas-Ser) 液体培地に BCG を種々の菌量で接種し, これに BCG 加熱死菌または蒸留水, グリセリン水による加熱死菌抽出液を加えて, 発育が速進されるか否かを検査したが, 結果は否定的で何等発育に変わりはなかつた。故に我々は上述の現象は「ス」含有の環境における「ス」耐性菌に対する加熱死菌の特異的な作用であると考えたい。

(5) ス耐性を BCG Ziehl-Neelsen 氏法及び gram 染色法で検査したところ, 好酸性で gram 陽性である点は普通の BCG と変りはなかつた。形態学的にも特異な点はみられなかつた。

(6) 「ス」耐性 BCG の毒力に関しては, BCG がいわゆる「Virus fixe」とされているため問題となるので, ソートン培地上 2 週発育「ス」耐性 BCG を用いて 60 mg/cc の菌液を調製し, これを 0.5cc ずつ 8 匹の健康海狸に接種し, 3 ヶ月後解剖したが全く病変を発見し得なかつた。その間動物は正常に体重を増加した。

IV 考 察

黄色ブドウ球菌を用いて行つた Demerec(2,6) の実験は, ペニシリンまたは「ス」に対する細菌の耐性上昇に遺伝学的仮説を以て鮮かに説明を加えることを可能にしたが, Hsie 及び Bryson(5) は Demerec と同一手技を用いて「ス」耐性上昇の現象を *M. ranae* において実験した。彼等の実験による耐性菌の分布曲線は, 我々が BCG で得たそれ(第 1 図)と殆ど同一傾向を示して

第5表 「ス」耐性菌と「ス」感性菌との混合接種の「ス」含有 Kirchner 液体培地中での発育態度 (BCG)

実験	接種菌数			3週						5週						10週					
	耐性菌	感性菌	加感熱性死菌	ストレプトマイシン濃度 (γ/cc)																	
				0	0.1	1.0	10.0	1000.0	対照	0	0.1	1.0	10.0	1000.0	対照	0	0.1	1.0	10.0	1000.0	対照
1.	0	32×10 ⁵	0	冊	冊	3	-	-	-	冊	冊	+	-	-	-						
	9×10 ⁵	0	0	冊	冊	冊	冊	冊	-	冊	冊	冊	冊	冊	-						
	9×10 ³	0	0	8	C	-	-	1	-	+	C	-	-	7	-						
	9×10 ²	16×10 ⁵	0	冊	冊	+	8	-	-	冊	冊	冊	冊	+	-						
	9×10 ²	0	16×10 ⁵	冊	冊	+	+	2	-	冊	冊	冊	冊	冊	-						
2.	2×10 ⁵	0	0	冊	冊	冊	冊	+	-	冊	冊	冊	冊	冊	-	冊	冊	冊	冊	冊	-
	2×10	0	0	+	+	+	-	-	-	冊	冊	+	+	-	-	冊	冊	冊	冊	+	-
	2×10	0	44×10 ⁵	冊	冊	+	+	-	-	冊	冊	冊	冊	+	-	冊	冊	冊	冊	冊	-
	2×10	0	220×10 ⁵	冊	冊	冊	冊	-	-	冊	冊	冊	冊	+	-	冊	冊	冊	冊	冊	-
	2	0	0	1	3	2	-	-	-	冊	冊	10	-	-	-	冊	冊	冊	-	-	-
	2	0	44×10 ⁵	9	6	2	3	-	-	冊	冊	+	+	-	-	冊	冊	冊	冊	-	-
	2	0	220×10 ⁵	5	5	1	5	-	-	冊	冊	+	冊	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	-

備考 冊 極めて旺盛な発育 冊 相当良好 数字は集落状の発育せるものの数
 冊 旺盛な発育 + 僅少

いるのが注目される。またこの耐性菌分布の状態が、実験②の如く継代的に「ス」で淘汰した場合の「ス」耐性上昇曲線に、一つの形態を与えることは容易に想像されるところであり、この二つの分離方法が共通的な因果関係でその結果を支配されていると考えられ、さらに細い分析を今後行う必要があると思われる。例えば 1γ/cc の寒天に分離される株の一つ一つの「ス」耐性を検査する必要もあり、又 1γ/cc と 10γ/cc との間の「ス」濃度含有寒天にどの程度に耐性菌が分離されるかを見ることはさらにこの研究の内容を豊にすると思われる。我が研究室における臼井(第24回細菌学会発表)が「ス」を使用したことのない結核患者より分離した結核菌の「ス」感受性を、139例検索して、3.2γ/cc~6.4γ/ccで発育阻止株7例、16γ/cc~3.2γ/cc 14例、0.4γ/cc~1.6γ/cc 109例、0.1γ/cc~0.4γ/cc 9例となっている成績を発表しているが、10γ/cc 以上耐性株がまだ1例もない。6.4γ/cc迄耐性の株は稀にあつても 10γ/cc 以上がないという点は、我々の耐性菌分布曲線によつて説明されると思う。この実験においては成績判定を Kirchner 液体培地で 0.1mg 接種後 3週迄の発育によつており、その被検株の大部分を占める細胞の「ス」感受性をみているのであつて、我々が実験(1)で行つたように非常に大きな菌量中から非常に稀な高濃度耐性株を発見せんとする場合と趣を異にするのである。また一方第1表第2表より明らかであるが、10γ/cc 以上で分離されればその多くの株は

100γ/cc 又は 1000γ/cc に対しても耐性であり、稀にそれ以下となつている。故に 10γ/cc でも 20γ/cc でも 100γ/cc でも、そこで分離されてくる耐性株の数に大差ないのは当然の帰結であろう。Yegian 及び Vanderlinde (1) は 100γ/cc 以上では耐性株の分離率は一定してくると云つてゐるが、我々の 10γ/cc と開きがあるわけである。また実験(4)において経験した如く、加熱死菌でも大量混在すれば微量の耐性菌が 1000γ/cc 「ス」の Kirchner (Minas-Ser) 液体培地中で結局増殖してくる事實は、「ス」による治療法について考えさせられるところである。もし患者の体内に少数でも「ス」耐性結核菌が感性菌中に混在していれば、「ス」によつて治療を受けて感染菌が発育阻止されても、耐性菌の増殖を促す点では変りがないとも考えられる。試験管内での実験は生体内と条件が大いに異なるであろうが、「ス」と Pas との併用療法が叫ばれるのも、「ス」耐性の問題から当然ではないかと考えられる。さらに Demerec (2) の指摘した如く、また我々の実験の示すように、「ス」耐性はペニシリン耐性と異つて、高濃度の「ス」に対する耐性変異株が突然変異によつて特発的に生じ得るのであるから、「ス」による治療、始めから量的に充分に行つても、体内の結核菌分布が次第に耐性株に淘汰置換され得ると予想される為、この問題は臨牀的に益々重要である。この耐性菌の混在意義に関しては既に Mitchisen (9) や Wolinsky 等 (10) の報告で詳らかに論じている。「ス」耐性を生物化学的立場か

ら説明する実験は少く、Smith, Oginsky 等⁽¹¹⁾ は E. coli を用いて実験し、細菌の呼吸過程における oxalacetate と Pyruvate 濃縮の阻止という点に結びつけて考えているが、結核菌については今後の研究に待つべきであろう。

V 総 括

- (1) 以前に「ス」に接触したことのない BCG 株より 2 種の方法で耐性菌を分離した。
- (2) その成績は、「ス」耐性の現象を Demerec 等の細菌遺伝学的立場からすれば説明が付き易いことを示した。
- (3) 「ス」耐性の特長、及びその耐性菌分布の意義から考えて、「ス」は他の抗生物質又は化学療法剤との併用が望まれる。
- (4) 「ス」耐性 BCG は、毒性に関しては従来の BCG ワクチンと変りはない。

文 献

- 1) Yegian, D. and Vanderlinde, R.T.: *Am Rev. Tuberc.*, 61, 483, 1950
- 2) Demerec, M.: *T. Bact*, 56, 63, 1948
- 3) Vennesland, K., Elbert, R. and Bloch, R.: *Science*, 106, 476, 1947
- 4) Oakberg, E. F. and Luria, S. E.: *Genetics*, 32, 249, 1947
- 5) Zou-Yah Hsie and Vernon Bryson: *Am Rev. Tuberc.*, 62, 286, 1950
- 6) Demerec, M.: *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 31, 16, 1945
- 7) Luria, S.E.: *Bact. Rev.*, 11, 1, 1947
- 8) Kirchner, O.: *Zentralblatt für Bakt.* 124, 403, 1932
- 9) Mitchison, D. A.: *Thorax*, 5, 162, 1950
- 10) Wolinsky, E., Reginster, A. and Steenken, W.: *Am Rev. Tuberc.*, LVIII, 335, 1948
- 11) Smith, P.H., Oginsky, E. L. and Umbreit, W. W.: *T. Bact*, 58, 761, 1949