

抗酸性菌の分類に関する研究

第3編 抗酸性菌の抗結核剤に対する耐性獲得について

札幌医科大学衛生学教室 (主任 金光正次教授)

荒 木 雅

(受付 昭和29年11月1日)

緒 言

さき¹⁾²⁾に、私は、自然界抗酸性菌の諸種抗結核剤に対する感受性、温度に対する抵抗性、テルル酸加里感受性、ならびにその他の細菌学的諸性状を観察し、これ等の関係について得た成績を報告した。本編では更に抗酸性菌の SM 及び INAH に対する耐性獲得の状態を調べ、前述の諸性状すなわち SM, INAH の原株に対する感受性、耐熱性、テルル酸加里感受性及び諸種培地上における発育状態との関係について報告する。

実験方法

- 1) SM 及び INAH 感受性、テルル酸加里感受性、耐熱性の測定は、いずれも前編の方法に準じて行つた。
- 2) SM 及び INAH に対する耐性獲得は、10 倍希釈法によつて調製した馬血清加 Kirchner 培地 (以下 Kirchner 培地と略す) を用いた。すなわち各薬剤が 1 ml 当り 10 r, 100 r, 1000 r, 1 万 r, 10 万 r の濃度に含まれる系列の培地を調製し、各試験管に per cc 約 1 mg の菌を含む Kirchner 平等浮游液の 1 滴量を加え、37°C において 10 日間培養し、発育を認めた最大濃度管からさらに 1 段階濃い試験管に菌を移植後、同様な方法により培養を行い、爾後、本操作を繰返して耐性を上昇せしめた。

実験成績

1) SM 及び INAH に対する耐性上昇度と諸種培地上における発育状態との関係

(a) SM 及び INAH に対する耐性上昇度と岡・片倉培地上における発育状態との関係

供試菌の SM 及び INAH に対する耐性上昇度は図 1 (A) に示す如くである。まず SM の場合についてみると、最高は 1 万倍の耐性を獲得し、これに属するものは 16 株 (22.9%) で、1000 倍が 21 株 (30%)、100 倍が 13 株 (18.6%)、10 倍が 17 株 (24.3%)、全く耐性の上らないものが 3 株 (4.2%) である。

これに対し INAH は SM に比較して一般に耐性上昇度が低く、1000 倍に達したものは、僅か 1 株 (1.4%) で、他はいずれも 1000 倍以下の耐性上昇を示したに過

ぎない。すなわち 100 倍が 20 株 (28.6%)、10 倍が 21 株 (30%) で、耐性の上昇を認めなかつたものは 28 株 (40%) である。なお PAS については、原株感受性が低く、かつ殆んどそれらの感受性に差が認められなかつたので実験から除外した。

次に各薬剤に対する耐性上昇度と諸種培地上における発育状態との関係であるが、SM 耐性上昇度と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調との間には密接な関係のあることがわかつた。すなわち図 1 (A) に示すように岡・片倉培地上において紅色系のコロニーを生ずる菌株は、21 株であるが、この中 SM に対して 9 株が 1 万倍、11 株が 1000 倍、1 株が 100 倍の耐性上昇を示し、大半の菌株が 1000 倍以上の耐性を獲得している。これに対し、白色系では 22 株中 1000 倍以上に達したものは 2 株、100 倍が 9 株、10 倍が同じく 9 株で、残りの 2 株は全く耐性が上らず、紅色系に比較すると耐性上昇度が著しく低い傾向が見られる。次に橙色系では、12 株中 5 株が 100 倍の耐性を獲得し、他は少数ずつの菌株が各段階に認められ、全般的に見ると、やや高い耐性上昇を示している。さらに黄色系では 15 株中 6 株が 10 倍で、他の菌株は、橙色系と同じく殆んど各段階に認められ、黄・橙の両色系では紅色系と白色系の間中に位していると考えられる。斯様に紅色系と白色系がそれぞれ対称的な性状を呈し、且つ橙・黄色系が両者の中間に位する傾向は、既に報告した如く、原株の SM に対する感受性及びテルル塩に対する感受性と色調との関係の場合にも認められ、極めて興味ある現象と思われる。次に INAH に対する耐性上昇度と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調とを比較すると、同じく図 1 (A) に示す如く、紅色系では 21 株中約半数の菌株が本剤に対し全く耐性上昇を示さないのに対し、白色系では 22 株中 11 株が 100 倍に達している。すなわちこの場合には SM において見られた関係と逆の傾向が弱い乍らも認められる。しかし自然界抗酸性菌の INAH に対する耐性上昇度が一般に低いのでこの関係は明らかでない。かくの如く、自然界抗酸性菌の岡・片倉培地上におけるコロニーの色調と SM 耐性上昇度との間に密接な関係のあることを知つたので、岡・片倉培地上におけるコロニーの色調を、SM 耐性上昇度との間に認められた傾向に従い、紅色系、黄

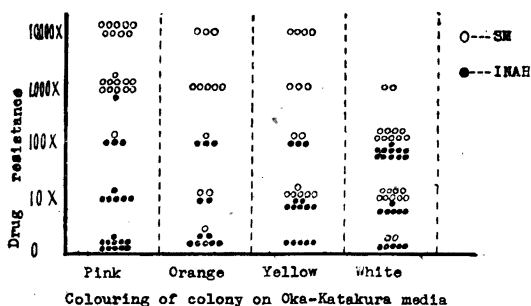
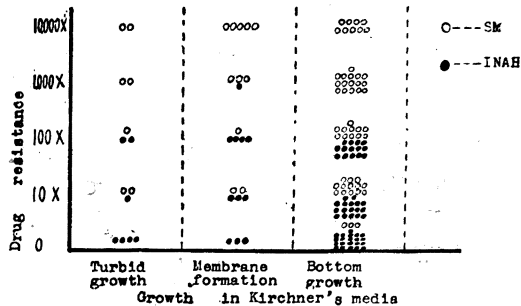


Fig. 1. (A) Relations between drug resistance of acid-fast bacteria against antituberculosis agents and their colourings of colonies growing on Oka-Katakura media.



(B) Relations between drug resistance of acid-fast bacteria and their growth characteristics in Kirchner's media.

及び橙色系、白色系の3群に大別しこれと SM 及び INAH に対する耐性獲得の難易の状況を観察すると第2図の如くである。すなわち白色系では、SM に対し 1000 倍の耐性を獲得した2株は INAH に対しそれぞれ 10 倍、100 倍の耐性を獲得し、他の菌株においても SM に対する耐性上昇度が低下するに従い、INAH に対しても耐性度の下降する傾向が認められ、白色系においては、SM に対して耐性を獲得し易い菌株は INAH に対しても又耐性を獲

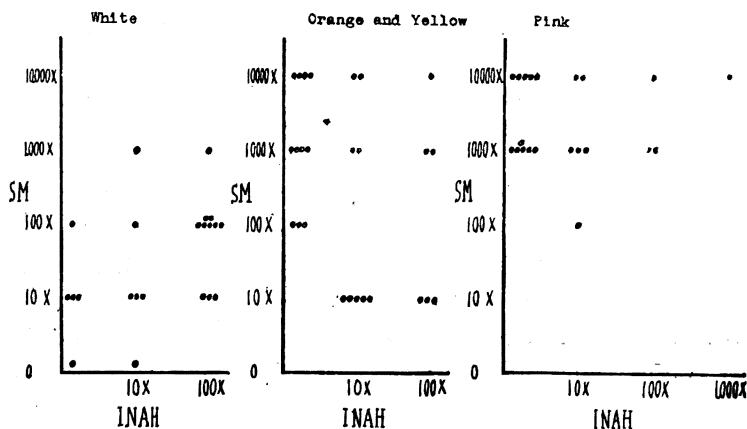


Fig. 2. Relations between colourings of colonies of acid-fast bacteria and their drug resistance against INAH and SM.

得し易いと云える。これに対し着色系では、両薬剤間における耐性獲得の難易に特別な関係は認められない。

(b) SM 及び INAH に対する耐性上昇度と Kirchner 培地における発育状態との関係

次に各薬剤に対する耐性上昇度と Kirchner 培地における発育状態との関係であるが、この場合は、図1(B)に示す如く何等特別な関係は認められない。さらに本培地における発育状態に従い、これを管底発育、菌膜形成、平等濁濁の3群に分類し、各群について、SM, INAH 両薬剤間における耐性獲得の難易の状況を調べたが、この場合においても特別な関係はなかつた。

2) SM 及び INAH に対する原株の感受性と耐性上昇度との関係

第3図は、原株の SM 及び INAH に対する感受性と両薬剤に対する耐性上昇度との間に如何なる関係があるかを示したものである。まず SM の場合について見ると、10 τ/ml で発育が阻止される菌株の本剤に対する耐性上昇度は 1000 倍及び 1 万倍に達するものが 39 株中 30 株を占め、以下原株の本剤に対する感受性が弱くなるに従つて耐性上昇度も漸次下降し、1000 τ/ml で発

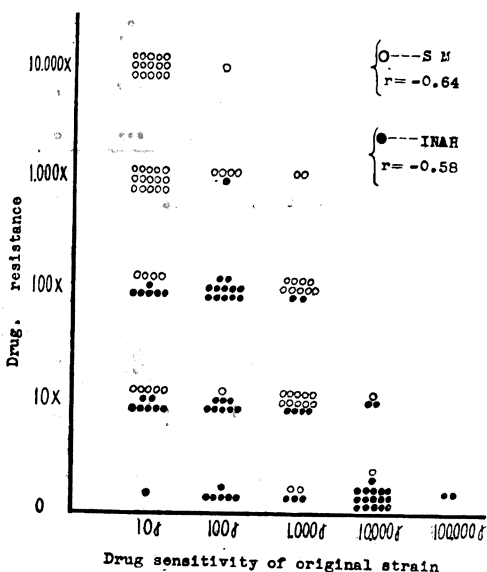


Fig. 3. Relations between drug resistance of acid-fast bacteria and their drug sensitivities of original strains.

育が阻止される2株、及び 1万 τ/ml で発育が阻止され

る 2 株は全く耐性上昇を示していない。INAH の場合においても SM と同様の傾向が見られるが、特に原株が本剤の 1 万 r/ml の濃度で発育を阻止されている 18 株中 16 株及び 10 万 r/ml で発育が阻止された 2 株は、いずれも全く耐性の上つていないことが目立っている。すなわち SM, INAH いずれの場合においても原株の感受性が強い菌株程、耐性を獲得し易い傾向があり、両者の間に有意の順相関が認められる。

3) 各種薬剤に対する耐性上昇度と耐熱性及びテルル酸加里感受性との関係

前述の如く、自然界抗酸菌においては、各薬剤に対する原株の感受性と耐性上昇度、ならびに INAH 感受性と耐熱性との間には、それぞれ密接な関係のあることが明らかとなり、さらに耐熱性とテルル酸加里感受性との間においても特定の関係が認められたので、各種薬剤に対する耐性上昇度と耐熱性、及び耐性上昇度とテルル酸加里感受性との間においても直接に何等かの関係があるものと想像して観察した。その成績は 4 図に示すように SM に対する耐性上昇度と耐熱性との間には、特別の関係はないが、INAH に対する耐性上昇度と耐熱性との間に一定の関係が認められる。すなわち余り著明ではないが、INAH に対し耐性を獲得し易い菌株は、耐熱性が高い傾向が見られる。又耐性上昇度とテルル酸加里感受性との間においては、いずれの薬剤の場合においても全く関係がない。

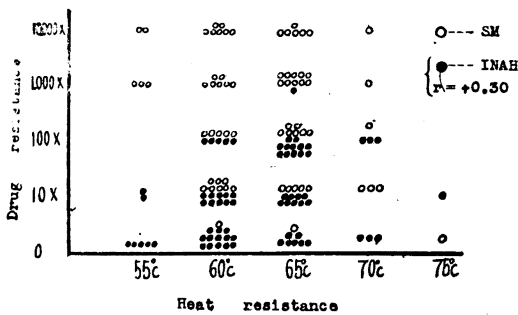
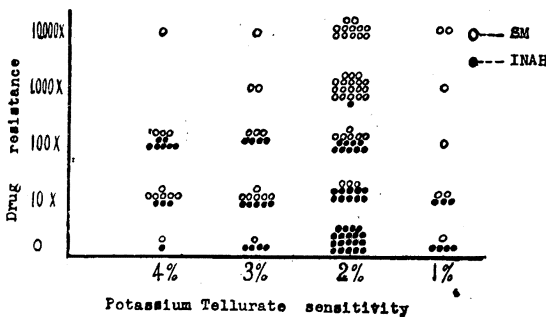


Fig. 4. (A) Relations between drug resistance of acid-fast bacteria and their heat resistance.



(B) Relations between drug resistance of acid-fast bacteria and their sensitivities to Potassium Tellurate.

総括ならびに考案

以上私は、自然界抗酸菌の SM 及び INAH に対する耐性獲得の状態を調べ、これと諸培地上における発育形状、耐熱性、テルル酸加里感受性との関係について論じた。従来、抗酸菌の SM 及び INAH に対する耐性獲得に関しては幾多の報告³⁾⁻¹³⁾があり、耐性獲得の難易、機序、耐性菌の毒性、ならびに耐性菌と原株間における異同等につき研究されているが、これ等は主として病原結核菌を対象として行われ、多数の自然界抗酸菌について耐性獲得の状態を他性状と対比した研究は極めて少ないようである。まず供試菌の SM 及び INAH に対する耐性上昇度であるが、太田¹⁴⁾は、非病原性抗酸菌の SM に対する耐性上昇度について、最高が 160 倍、最低が 2 倍であると云っているが、私の成績では、SM の場合、最高が 1 万倍の耐性を獲得し、10 倍、100 倍、1000 倍に達したものは最も多く、70 株中 51 株を占め、全く耐性の上らなかつたものは僅か 3 株に過ぎなかつた。これに対し INAH では遙かに耐性上昇度が低く、1000 倍に達した 1 株を除くと、いずれも 10 倍、100 倍で、特に全菌株の約 1/3 を占める 28 株においては、本剤に対し数回の継代培養にも拘らず全く耐性の上昇が見られなかつた。さらに本問題に関し、築山¹⁵⁾は、人、牛、鳥型結核菌、及び自然界抗酸菌について SM 1000 r/ml 以上の耐性獲得は、菌型により、且つ同一菌型においても菌株によりかなりの差異があると報告している。上述の如く、本実験結果から、自然界抗酸菌においては、菌株によるばかりでなく、用いる薬剤の種類によつても耐性上昇度に相違のあることがわかつた。又耐性獲得の機序については、周知の如く Demerec¹⁶⁾等による自然的突然変異説と Hinshelwood¹⁷⁾等による適応説を以つて説明されているが、その後、秋葉²⁰⁾は、Demerec 説を批判し、SM の場合は、本剤に細菌の誘導変異を起す作用のあることを指摘している。次に SM と INAH の耐性出現の比較については、研究者により必ずしも成績が一致していない。例えば、Middlebrook¹⁸⁾は RIRV 株及び Vallée 株について、同量の SM, INAH を用いた場合では、INAH の耐性菌が SM のそれに比して高率に生ずると云い、Szybalski¹⁹⁾も又 Ranae 株について同様の成績を報告している。他方、柳沢²⁰⁾は、昭和 27 年度における厚生省結核療法協議会の総合成績として、単独治療をした患者からの耐性結核菌の出現は、INAH より SM の方が高率に生ずると述べている。以上の成績を、私の成績と直接比較することは出来ないが、自然界抗酸菌の場合では、試験管内で耐性を同一条件の下に上昇せしめると SM の耐性上昇度が INAH に比較して明らかに高い傾向が見られた。次に耐性上昇度と諸培地上における発育状態との関係であるが、SM に対す

る耐性上昇度と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調との間に一定の関係が認められた。すなわち紅色系においては、本剤に対する耐性上昇度が高く、白色系においては低く、黄色系ならびに橙色系では両者の中間に位する傾向がある。なお前編で記述した如く、原株のSMに対する感受性、及びテルル酸加里感受性とコロニーの色調との間においてもそれぞれ極めて類似した関係が見られたことは、興味ある所見と思う。一方Kirchner培地における発育状態と耐性上昇度との間ではSM, INAHいずれの場合にも特定の関係は認められなかつた。以上述べたように自然界抗酸菌のKirchner培地における発育状態では、SMに対する原株の感受性との間においてのみ関連があるのに対し、岡・片倉培地上におけるコロニーの色調では、原株のSM感受性のみならず、耐性上昇度との間においてもそれぞれ密接な関係のあることが明らかになつた。又岡・片倉培地上で白色系のコロニーを生ずる菌株においては、INAHに対し耐性となり易い菌株は、SMに対しても又耐性を獲得し易いが、このような現象は、着色系では認められなかつた。同様にKirchner培地における発育状態を、菌膜形成、管底発育、平等濁濁の3群に大別し、これとINAH及びSMに対する耐性獲得の難易との関係を観察したが、この場合には両者の間に特別な関連はない。次に原株の感受性と耐性上昇度との関係であるが、河盛²¹⁾は、抗結核剤の結核菌に対する抗菌価が高ければそれだけ耐性を得易いことを臨牀的事実として警告し、秋葉²²⁾は、ある薬剤に対して感受性の強い菌株を得難く、比較的抵抗の強い菌株は、耐性を得易いと述べている。勿論、生体内と試験管内において、耐性獲得の機序は同一でないと考えられるが、自然界抗酸菌にあつては、SM, INAHに対する原株の感受性が強い菌株程、それぞれの薬剤に対し耐性となり易い傾向が認められた。なおこれは、本菌群のSM, INAHに対する原株の感受性が一般に弱いことが一つの要因であると思われる。最後に耐性上昇度と原株の耐熱性との関係であるが、SMの場合においては全く関連はないが、INAHでは本剤に対し耐性を得易い菌株程、耐熱性が高い傾向を認めた。従つて本菌群においては、原株のINAH感受性、INAHに対する耐性獲得の難易、及び耐熱性の3性状の間に一定の関係があると云える。

結 論

自然界抗酸菌のSM及びINAHに対する耐性獲得の状態を観察し、これと前編で得たSM, INAH感受性、耐熱性、テルル酸加里感受性、ならびに諸種培地上における発育状態との関係について次の如き成績を得た。

1) 岡・片倉培地上におけるコロニーの色調とSMに

対する耐性上昇度との間には一定の関係が認められる。

2) Kirchner培地における発育状態と各種薬剤に対する耐性上昇度との間には関係がない。

3) 原株のSM及びINAH感受性が強い菌株程、それぞれの薬剤に対し耐性を獲得し易い傾向がある。

4) INAHに対し耐性を獲得し易い菌株程耐熱性が高い。

5) 各薬剤に対する耐性上昇度とテルル酸加里感受性との間には関係がない。

本論文の要旨は、第28回日本結核病学会総会及び第4回日本結核病学会地方会において、それぞれその一部を発表した。

稿を終るに際し、終始懇篤なる御指導を賜つた金光教授に深甚な謝意を表す。

文 献

- 1) 荒木：結核，30，81，昭30.
- 2) 荒木：結核，30，19，昭30.
- 3) G. P. Youmans et al.: Proc. staff meet. Mayo clinic, 21, 126, 1946.
- 4) W. H. Feldman et al.: Am. Rev. Tbc., 56, 346, 1947.
- 5) H. F. Shirley: Pub. Health Reports, 66, 277, 1951.
- 6) 平野：医学と生物学，20，174，昭26.
- 7) 金井他：結核，27，43，昭27.
- 8) 村田：東京医事新誌，68，30，昭26.
- 9) 柳沢：日本医事新報，1487，3568，昭27.
- 10) 小酒井他：日本医事新報，1490，3858，昭27.
- 11) 河盛：最新医学，9，297，昭27.
- 12) M. Buck & R. J. Schnitzer: Am. Rev. Tbc., 65, 759, 1952.
- 13) F. Pansy et al.: Am. Rev. Tbc., 65, 761, 1952.
- 14) 太田：結核，24，224，昭24.
- 15) 築山：結核，27，12，昭27.
- 16) M. Demerec: Proc. Nat. Sc., 31, 16, 1945.
- 17) C. N. Hinshelwood: The chemical Kinetics of the Bacterial Cell, 284, 1946.
- 18) G. Middlebrook: Ame. Rev. Tbc., 65, 765, 1952.
- 19) W. Szybalski & V. Bryson: Am. Rev. Tbc., 65, 768, 1952.
- 20) 柳沢：日本医事新報，1516，1887，昭23.
- 21) 河盛：臨牀，4，395，昭26.
- 22) 秋葉：医学のあゆみ，13，250，昭27.