

# 人型結核菌における SM 耐性, INAH 耐性および PAS 耐性の定量的分析

東村道雄・野田 用・三浦幸二

国立療養所大府荘 (院長：勝沼六郎博士)

(受付 昭和 30 年 11 月 28 日)

Luria and Delbrück<sup>1)</sup> (1943) は virus-resistant bacteria が virus の作用とは無関係に sensitive cells の mutations によつて生じることを証明し、その mutation rate を測定して耐性菌の起原に関する今日の定説の基礎を作つた。次いで Demerec and Fano<sup>2)</sup> (1945) は Luria and Delbrück の所見を拡張し、E. coli における種々の bacteriophage-resistance types にたいする mutations が互に independent であることを証明し、これらの mutations が gene mutations によるものであると考えた。細菌の薬剤耐性菌の起原は Oakberg and Luria<sup>3)</sup> (1947) および Demerec<sup>4)</sup> (1948) により明かにされた。すわなち前者は Staphylococcus aureus の sulfathiazole-resistance が mutation and selection の機作により出現するものであることを示し、後者は Staphylococcus aureus の penicillin 耐性および streptomycin (SM) 耐性が、薬剤により誘導されたものでなく、gene mutations により発生することを示し、薬剤耐性株(以下たんに耐性菌)が resistant mutants の selection により認められることを証明した。次いで、Newcombe and Hawirko<sup>5)</sup> (1949), Demerec<sup>6)</sup> (1951), Newcombe and McGregor<sup>7)</sup> (1951) などにより、E. coli における SM 耐性への mutation rate が測定され、耐性菌の起原が spontaneous mutation によるものであることが証明された。

結核菌ないし mycobacteria の耐性菌の起原も同様であることは当然であつて、pyle<sup>8)</sup> (1947) は SM を使用したことのない患者の喀痰から SM 耐性結核菌を分離し Vennesland, Ebert and Bloch<sup>9)</sup> (1947) は人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv に自然に存する SM 耐性菌を証明した。Yegian and Vanderlinde<sup>10,11)</sup> (1948, 1950) は H<sub>37</sub>Rv の SM 耐性の定量的分析を行つた。一方 Demerec<sup>4)</sup> (1948) は Staphylococcus aureus における penicillin 耐性と SM 耐性の survival curves と stepwise build-up of resistance から、両者の耐性の形式を比較した。すなわち penicillin 耐性はその first-step penicillin resistant strains が均一な耐性度を有し、その高度耐性株は

several steps を通じてはじめて分離できるのにたいして、SM 耐性では first step の株は耐性度が不均一であり、SM 高度耐性株を one step でも得ることができると述べた。Yegian and Vanderlinde<sup>10)</sup> (1948) の研究は結核菌の SM 耐性も同様の形式であることを示している。Hsie and Bryson<sup>12)</sup> (1950) は Mycobacterium ranae について SM 及び neomycin 耐性出現を観察し、その survival curves から SM 耐性が上述同様であることを示して、これを “facultative multiple step resistance” とし、neomycin 耐性は Demerec が Staphyl. aureus の penicillin 耐性について観察した形式すなわち “obligatory multiple-step resistance” に一致することを報告した。結核菌の INAH 耐性については柳沢など<sup>13)</sup> (1953) その他が感性株中に INAH 高耐性菌を証明している成績からその耐性形式が facultative multiple-step resistance に属することが想像される。PAS 耐性については小酒井<sup>14),15)</sup> (1952, 1953) が臨床的観察から “Demerec の penicillin 型に相当する” と述べている。しかし人型結核菌の SM 耐性, INAH 耐性および PAS 耐性に関する survival curves が作られていないので詳細な検討を必要とするように思われる。われわれは結核菌薬剤耐性の臨床的観察を行う間に、PAS 耐性が相当屢度に認められること(判定の基準については別報するが、PAS 500~1,000g 単独投与で18例中7例、SM-PAS 併用(SM 35~50g, PAS 1200~1800g)で75例中35例すなわち約46%に臨床的 PAS 耐性(10<sup>7</sup>耐性)を認めたおよび PAS 耐性菌の遺伝学的研究により得られた結果から考えて、特に PAS 耐性形式について検討することを目的とし、併せて結核菌の SM 耐性および INAH 耐性形式について知見を加えることを目的として、この研究を行つた。

## 実験材料および実験方法

使用菌株は Mycobacterium tuberculosis var. hominis 青山 B 株を用いた。培地はすべて 1% 小川(辰次)培地(基礎液(1% KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 1% sodium glutamate)

100ml; 卵液, 200ml; 2% malachite green, 6ml; glycerine, 6ml.) を用い, 試験管に 10ml 宛分注し, 90°C 1 時間滅菌した。streptomycin (SM) は dihydrostreptomycin sulfate (協和), INAH は isonicotinic acid hydrazide (武田), PAS は sodium para-aminosalicylate (田辺) を使用し, 蒸留水で適当な濃度に希釈して培地に滅菌前に添加した。SM の力価は滅菌により,  $1/2$  に減弱するものとして計算した。INAH および PAS は添加量をそのまま表示した。

survivors 数の測定には, 被検株の小川培地 6 週培養の集落をとって, ガラス玉とともに 10 分間振盪した後, 生理的食塩水 (生食水) に浮遊させ,  $10^{-1} \sim 10^{-7}$  に希釈し, 各濃度の薬剤を含む系列に同一大型渦巻白金耳 (0.025ml) で接種した。薬剤の濃度により菌液濃度を調節した。試験管数は各薬剤の各濃度について 10~50 本の組よりなる。接種後 37°C に培養し, SM および INAH については 4 週後に, PAS については 6 週後に survivors の数を算定した。そして survivors の出現率を各濃度毎に表示して, survival curves を作った。

survivors の数の判定を SM および INAH では 4 週後に行つたのに, PAS では 6 週後に行つた理由は別報するように, PAS 耐性菌でも PAS により著明な発育遅延作用を受けるためである。PAS 耐性菌は PAS を含有しない培地上ではほぼ感性菌同様の発育速度を示すが, PAS を含有する培地では, colony 数の actual count を行い得る条件で 2 週間以上の発育遅延がおこる。この報告のように酸またはアルカリ処理を行わなかつた場合で, PAS 耐性菌を PAS 含有小川培地に接種する場合, single cell からの発育が個々に分離して起る条件では 6 週以後にはじめて集落の発育を認める。この発育の遅延が, 培養中に培地の PAS が分解して途中から発育しはじめた菌によるものでないことは, 培地中の PAS が 8 週後にも約  $1/4$  分解しているにすぎないことを結核菌接種による生物学的検定法で証明してたしかめられた。ただし PAS 耐性菌の大量接種では 4 週後でも

Table 1

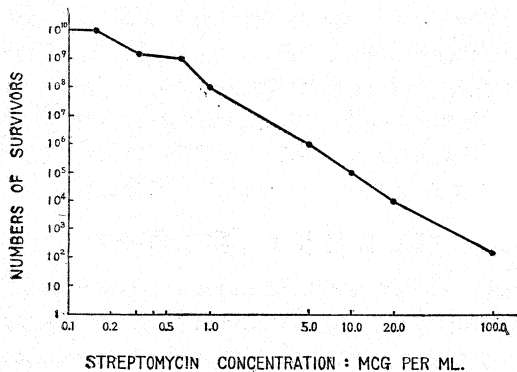


Table 2

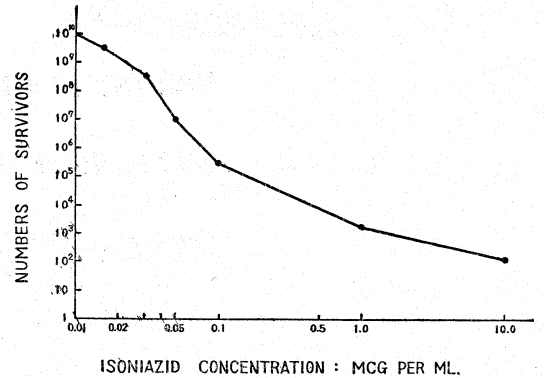
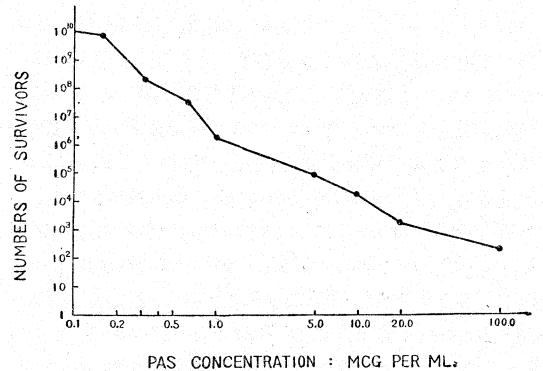


Table 3



集落融合発育を認め得る。

## 実験成績

SM, INAH および PAS について作製した survival curves は図に示す通りである。図では生菌数を縦軸に, 薬剤濃度の対数を横軸にとつてある。

(1) これらの図から明かな通り, INAH は SM および PAS より微量で発育阻止を示す。INAH の最大発育無影響濃度は 0.01γ/ml であるのにかたいし, SM および PAS のそれは 0.16γ/ml である。したがつて INAH の 10γ/ml は大凡 SM または PAS の 100γ/ml 以上に相当すると考えられる。

(2) SM, INAH および PAS にかたいする survival curves は図から明かな通り, 比較的相似であつて, 耐性菌の分布状態および耐性形式が本質的に差がないことを暗示している。特に INAH および PAS 耐性菌が one-step selection で得られることを強調したい。

(3) survival curves を同一紙に plot して比較すると, 3者の中で SM の survival curve の傾斜がもつとも緩かであり, 特に 0.1~1.0γ/ml の範囲でゆるやかである。これは低耐性菌の population が耐性度に関して不均一であることを示している。換言すれば感性株の population の SM 感受性 (耐性) の fluctuation の幅が広いことを示している。これにかたいして, INAH にかたい

する survival curve の傾斜が最も急であり、感性株の INAH 感受性(耐性)の fluctuation の幅が狭く、感性株の population 構成が INAH 感受性について比較的均一であることを示している。PAS の survival curve は SM と INAH の中間に属し、PAS 感受性(耐生)の fluctuation ないし PAS 感受性についての population 構成もその中間に属することを示していると考えられる。

## 考 察

(1) SM 耐性、以上の成績から人型結核菌青山B株の SM にたいする survival curve も Demerec<sup>4)</sup>(1948) が Staphyl. aureus について示したもの、および Hsie and Bryson<sup>12)</sup>(1950) が Mycobacterium ranae で示したものと同一であることが分る。したがって人型結核菌の SM 耐性形式も Hsie and Bryson のいう facultative multiple-step resistance の形式であると考えられる。そして感性株の population を構成する individual cells の SM 感受性の fluctuation の幅は INAH または PAS に比較して幅が広い。

(2) INAH 耐性、実験成績から INAH にたいする survival curve も SM にたいするそれと類似している。すなわち one-step selection により高耐性菌を得ることができる点で INAH 耐性の形式が Demerec が Staphyl. aureus の SM 耐性の形式に相似しており、facultative multiple-step resistance に属するものと思われる。しかし感性株の population の individual cells の INAH 感受性の fluctuation の幅が狭く、population 構成は INAH 感受性について最も均一であることが注目される。

なお multiple step を通じての selection により得られた高耐性株(highly-resistant strain)の population は SM 耐性株の population が SM 耐性について均一であるのにたいして、INAH 耐性株および PAS 耐性株の population は耐性度については不均一なものしか得られない。これについては別報する。

(3) PAS 耐性、PAS にたいする survival curve も SM にたいするそれと類似である。すなわち高度耐性菌が感性株の population 中から one-step selection により分離できる点で、Demerec が Staphyl. aureus について示した SM 耐性の形式と Penicillin 耐性の形式との間に類型を求めるならば、前者に類似しており Hsie and Bryson のいう facultative multiple-step resistance に属すると考えられる。

PAS 耐性度の判定について問題となるのは、菌株、培地、接種菌数、判定日数の影響であるが、ここには判定日数について若干附け加えておきたい。被検菌をガラス玉とともに振盪し、生食水に浮遊させて、1%小川培

地に接種する場合、PAS 耐性菌でも PAS の存在で発育遅延を受ける。SM や INAH の場合にも同様の傾向があることが知られているが、肉眼的判定では実際上遅延作用はないといつてよい。しかしながら、PAS の場合には、PAS 耐性株を several steps により分離し、PAS 100γ 培地に 5 代継代した株でも、その population の耐性菌の発育(増殖速度)は、PAS なしの場合(感性菌と同じ発育速度)よりも著明に遅延する。この遅延作用は培地に大量の菌を接種した場合には PAS 100γ 培地でも認め難いので、PAS 耐性菌は PAS の存在でも通常の発育速度をもつと思われ易い。しかし接種菌数が小で、各 single cell からの発育が別々の colonies を形成する条件では発育遅延を認めることができる。われわれの条件では 6 週以後に集落発生を認めた。これが培地中の PAS 分解によるものでないことは、生物学的な PAS 濃度測定(人型結核菌使用)から明かとなつたので、PAS による発育遅延は PAS 耐性菌でも免れ得ない本来の性質であると考えられる。したがって PAS にたいする survivors の算定の際には、single cell からの発育条件に等しいので判定を 6 週以後で行わなければ、たとえ耐性菌が存しても見逃すことになる。(注、しかし小川法で PAS 耐性菌を含む喀痰から菌を培養する際には、routine method では PAS 耐性菌が集束したまま培養されることは避けられないであろうから、4 週で集落を発見し得ることもあり得よう。)

(4) 耐性の形式。ここに誤解をさけるために特に附記したいことは、SM 耐性の形式とは Demerec が Staphyl. aureus の SM 耐性に認めた形式に類似の形式という意味に使用されるべきであつて、SM 耐性の形式がすべての微生物について同一であると思つてはならないことである。SM 耐性の形式は mycobacteria または staphylococci にたいしては類似であるが、他の微生物については他の形式、例えば Demerec が Staphyl. aureus の penicillin 耐性に示したような obligatory multiple-step resistance の形式かもしれないからである。したがって耐性の形式という問題をとり扱うならば Hsie and Bryson のように obligatory or facultative multiple-step resistance という言葉を使用するのがよいように思われる。そしてその定義としては簡単に、one-step selection で感性株中に高耐性菌を発見できるかどうかにして、この高耐性菌は一定培地で、感性株の population を構成する individual cells の大多数にたいして selective でない薬剤の最大濃度の n 倍に耐性の菌と規定するのが便利であるように考える。この報告ではおよそ 500~1,000 倍をとつている。

さらにこの高耐性菌の耐性度をどの点にするかについても問題がある。たとえば M. avium の INAH 500γ 耐性菌は multiple step によつても分離し難い<sup>19)</sup>。この

場合高耐性菌の定義を大多数の感性菌の耐性度の約 100 倍の 50Y をとれば facultative multiple-step resistance になるし、約 1,000 倍の 500Y をとれば、multiple step によつても耐性菌を得ることが困難である。この場合には、『ある濃度迄の範囲では……であつた』というような条件をつけねばならない。

### 総 括

(1) *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (青山 B 株) の streptomycin (SM), INAH および PAS にたいする survival curves を作り、感性株中に含まれる自然耐性菌の分布状態を検討した。その結果 3 者とも one-step selection により高耐性菌を発見できる点から、facultative multiple-step resistance の形式であると認められた。特に感性株中に PAS 100Y 耐性菌を大凡  $10^8$  に 1~数個の割合で認め得たことを強調したい。

耐性形式の比較には、survival curves を作つて one-step selection で高耐性菌を見出し得るか (facultative multiple-step resistance), 見出し得ないか (obligatory multiple-step resistance) を検討するのが便利であるが、培地、高耐性菌の定義などにより形式が変化する可能性があることに注意しなければならない。

(2) 感性株の population を構成する individual cells の各薬剤にたいする感受性の fluctuation は、SM にたいして最も変化の幅が広く不均一で、INAH にたいして最も変化の幅が狭く均一である。PAS はその中に位する。

(3) PAS 耐性菌は 1% 小川培地上で PAS なしでは感性菌同様の発育速度を示すが、PAS が存在する時には著明な発育遅延作用を受ける。この遅延作用は PAS 耐性菌が多量である時には認め難いが、各 single cell からの colonies が分離して発育するような場合には著明に認められる。したがつて PAS にたいする survivors の数を算定する時に、この点を注意しなければ PAS 耐性菌の存在を見逃すことを強調したい。(PAS 耐性菌数の判定は、1% 小川培地で前処理をしない場合、6 週以後でなければならぬ。)

御指導を受けた勝沼六郎院長ならびに日比野進教授に感謝の意を表する。

### 文 献

- 1) Luria, S. E., and Delbrück, M. *Genetics*, 28: 491—511, 1943.
- 2) Demerec, M., and Fano, U. *Genetics*, 30: 119—136, 1945.
- 3) Oakberg, E. F., and Luria, S. E. *Genetics*, 32: 249—261, 1947.
- 4) Demerec, M. *J. Bact.*, 56: 63—74, 1948.
- 5) Newcombe, H. B., and Hawirko, R. *J. Bact.*, 57: 565—572, 1949.
- 6) Demerec, M. *Genetics*, 36: 585—597, 1951.
- 7) Newcombe, H. B., and McGregor, J. J. *Bact.*, 62: 539—544, 1951.
- 8) pyle, M. M. *Proc. Staff Meet.*, mayo Clin., 22: 465—473, 1947 (cited from (10). )
- 9) Vennesland, K., Ebert, R., and Bloch, R. *Science*, 106: 476—477, 1947.
- 10) Yegian, D., and Vanderlinde, R. J. *J. Bact.*, 56: 177—186, 1948.
- 11) Yegian, D., and Vanderlinde, R. J. *Am. Rev. Tuberc.*, 61: 483—507, 1950.
- 12) Hsie, J-Y., and Bryson, V. *Am. Rev. Tuberc.*, 62: 286—299, 1950.
- 13) 柳沢, 宮本, 佐藤, 大野, 結核の化学療法, 東京, 医学書院, 1953(p. 87—138)
- 14) 小酒井, 日結, 11: 559—563, 1952.
- 15) 小酒井, 結核の化学療法, 東京, 医学書院, 1953 (p. 563—590).
- 16) Luria, S. E. *Bact. Revs.*, 2: 1—40, 1947.
- 17) Catcheside, D. G. *The Genetics of Micro-Organisms*. Pitman, London, 1949.
- 18) Braun, W. *Bacterial Genetics*, Saunders, Philadelphia, 1953.
- 19) 君野, J. *Antibiotics*, B, 7: 62—65, 1954.