

人型結核菌 SM 依存株における INAH 耐性菌出現率について

(第 2 報)

三浦幸二・林光男

国立療養所大府荘 (指導 荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 51 年 11 月 12 日

Streptomycin-(以下 SM と略) 依存菌については、多数^{1)~13)}の報告がある。Demerec¹²⁾ は、Escherichia coli において、SM 耐性の中約 60% が、その発育につれて、SM に依存性をもつものであつたといつている。すなわち、それらは、SM を含有する培地においてのみ充分発育できたが、SM を含有しない培地においては、僅かに数回分裂するのみであつたといひ、SM 耐性菌には、依存菌が相当量含まれていることを示している。著者¹⁴⁾ は、SM 依存菌とは、SM 含有培地にのみ発育し、SM を含有しない培地では発育しないいわゆる安定した SM 依存菌と、SM がその発育を増強するいわゆる SM 増強菌を不安定な SM 依存菌と考え、Mycobacterium avium より分離せる SM 耐性株 (20000 γ 以上耐性) 中には、極めて多くの不安定な SM 依存菌が含まれ、かつその不安定な依存菌より INAH 耐性に極めてなり易いことを報告した。この事実を、人型結核菌において再検討する目的にて、本研究を行つた。

I 臨床的観察

観察材料:

観察の対象は、国立療養所大府荘に 1953 年から 1956 年 8 月までの間に入院中の常時排菌者で、SM 100 γ 培地に対照と同程度に耐性菌が生育する者の喀痰を使用した。

耐性検査は 3% 小川(辰次)培地により、4% NaOH で処理して直接法で施行した。

使用薬剤は、SM は Dihydrostreptomycin sulfate で協和製薬会社製のものを使用し、滅菌後の力価を $\frac{1}{2}$ として、所定濃度の倍量を加えられた。判定は 6 週培養の成績によつた。

実験方法:

喀痰に同量の 4% NaOH を加え均等化して、1 白金耳ずつ薬剤を含有しない対照培地、および SM 1 γ/ml 、10 γ/ml 、100 γ/ml を、それぞれ含有する培地に接種、また試料を、生理的食塩水にて、10 進法により稀釈、同様の培地に等量ずつ接種した。

判定基準:

集落の発育状態の記載法は、

十……101 以上の集落があり弧立しているもの。

十……大部分が弧立しているが融合しているものもある。

十……全部の集落が融合している。

とした。また試料を稀釈した系列については、集落数をそれぞれ計算した。

実験結果ならびに考察

表 1 に示すごとく、試料濃度 10 $^{\circ}$ においては、いずれの場合も対照の生育に比し SM 100 γ 培地の菌の生育は同程度であつたが、試料を 10 進法にて稀釈した場合には、対照の生育菌数に比し、SM 100 γ 培地の生育菌数が大であつたものは、12 例中 8 例であつた。見掛け上、

表 1

患者氏名	接種量	SM 0	SM 1	SM 10	SM 100
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-2}$	76	131	86	76
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-8}$	105	165	63	129
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-2}$	87	138	101	162
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-1}$	109	252	238	226
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-2}$	94	59	157	156
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-2}$	50	汚染	55	93
■	10 $^{\circ}$	+	+	十	十
	10 $^{-1}$	200	183	169	262
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-1}$	217	527	255	238
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-8}$	213	192	171	20
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-8}$	56	98	72	29
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-8}$	83	94	38	58
■	10 $^{\circ}$	十	十	十	十
	10 $^{-8}$	39	51	22	28

対照と薬剤含有培地に同程度に生育したと思われる場

合、これを完全耐性という定義に対して、東村ら¹⁵⁾は、集落数を計算した結果でいべきであると報告しているが、本実験においては、 10^0 では見掛け上完全耐性であったものを、稀釈した試料により集落を計算すると、対照よりもSM 100 γ 培地の生育菌数が増大するものは、12例中8例であった。これは、培地中のSMが、菌の生育に有利に作用したものである。われわれ⁴⁾は、Mycobacterium avium において、同様の現象を認めて報告したが、これは、SM耐性株中に不安定なSM依存菌が多数含有されていることを示している。すなわち、喀痰中のSM耐性菌には相当量のSM依存菌が含まれていることが推定される。

小 括

われわれは、大府在入院中の患者喀痰につき、SM依存菌の存在を検討したが、12例中8例において、対照よりもSM 100 γ 培地の生育菌数の増大を認めた。これは、患者喀痰のSM耐性菌中に、相当量のSM依存菌の存在を示し、SM耐性に対し、再検討を要するものと認めたい。

II 試験管内実験

実験材料

使用菌株：SM依存株は予研橋本氏が分離せるSM依存菌18-b株であった。予研より国立療養所刀根山病院が分与を受けたものを、さらに譲り受けたものである。その後、当所にて、SM 200 γ/ml 含有する1%小川培地に3代継代せるものを使用した。

SM 100 γ 耐性株：当大府在研究室東村が、人型結核菌青山B株より分離せるもので、分離後9代継代培養せるものである。および人型結核菌青山B株を使用した。

使用薬剤：SMはDihydrostreptomycin sulfateで協和製薬会社製、Isonicotinic acid hydrazide(以下INAHと略)は第一製薬製、PASはSodium-paraaminosalicylateで田辺製薬会社製のものを用いた。

各薬剤は、滅菌に先だち所定濃度に培地に加えられたが、SMのみは滅菌後の力価を λ として、所定濃度の倍量加えられた。

実験方法ならびに実験成績

(1) 保存せるSM依存株、SM 100 γ 耐性株、青山B株を、それぞれ別々に、ナス型コルペンにて、ガラス玉とともに10分間振盪生理的食塩水に懸濁して、菌液を調製し、SM依存株はSM 200 γ/ml およびINAH 10 γ/ml を同時に含有する培地、他の菌株はINAH 10 γ/ml を含有する培地に接種し、またその菌液を10進法により生理的食塩水にて稀釈して、SM依存株はSM 200 γ/ml を含有する培地、他の菌株は薬剤を含有しない培地に接種して、各菌株につき接種生菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率を算定した。またSM 100 γ 耐性株については、同様にして調製した菌液を、INAH 10 γ/ml およびSM

100 γ/ml を同時に含有する培地に接種し、接種SM 100 γ 耐性菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率を算定した。

その成績は、表2に示すごとく、接種生菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率は、SM依存株では 10^0 当り3.14であり、青山B株では 10^1 当り4.66、SM 100 γ 耐性株ではINAH 10 γ/ml 単独使用時には 10^8 当り4.26であり、SM 100 γ/ml とINAH 10 γ/ml 併用時には 10^8 当り1.65であった。

表 2 SM依存株、SM耐性株および感性株よりの INAH 10 γ 耐性菌出現率

	試験管当り 接種生菌数	試験管当り INAH 10 γ 耐性菌数	生菌数当り INAH 10 γ 耐性菌出現率
SMD	19.6×10 ⁶	62.1	3.16×10 ⁻⁶
S. S.	53.6×10 ⁶	25.0	4.66×10 ⁻⁷
SMR	91.9×10 ⁷	59.2	4.26×10 ⁻⁸
	試験管当り 接種SM 100 γ 耐性菌数	試験管当り INAH 10 γ -SM 100 γ 感性菌数	SM 100 γ 耐性菌数当りの INAH 10 γ 耐性菌出現率
SMR	76.1×10 ⁷	12.6	1.65×10 ⁻⁸

ただし SMD: SM-依存株 SMR: SM 100 γ 耐性株 S.S.: 青山B感性株

すなわち、INAH 10 γ 耐性菌の出現率は、SM依存株が最も高く、感性株、SM耐性株の順であった。なおSM依存株とSM耐性株よりのINAH 10 γ 耐性菌出現率との間に、有意の差を認めた。また、SM耐性株の場合に、接種生菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率と接種SM 100 γ 耐性菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現とは、ほぼ同率であった。

(2) 実験(1)と同様に、保存せるSM依存株、SM 100 γ 耐性株、青山B株を、それぞれ別々に、ナス型コルペンにて菌液を調製し、SM依存株はSM 200 γ/ml およびPAS 100 γ/ml を同時に含有する培地、他の菌株はPAS 100 γ/ml を含有する培地に接種し、またその菌液を10進法により生理的食塩水にて稀釈して、SM依存株はSM 200 γ/ml を含有する培地、他の菌株は薬剤を含有しない培地に接種して、各菌株につき接種生菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率を算定した。

またSM 100 γ 耐性株については、同様にして調製した菌液を、PAS 100 γ/ml およびSM 100 γ/ml を同時に含有する培地に接種し、またその菌液を生理的食塩水にて10進法により稀釈し、SM 100 γ/ml を含有する培地に接種して、接種SM 100 γ 耐性菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率を算定した。

その成績は、表3に示すごとく、接種生菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率は、SM依存株では 10^7 当り6.88、青山B株では 10^8 当り1.66、SM 100 γ 耐性株では 10^8 当り2.90であり、特にSM 100 γ 耐性株の場合、接種SM 100 γ 耐性菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率は 10^8 当り3.79であった。

表3 SM依存株, SM耐性株および感性株よりのPAS 100 γ 耐性菌出現率

	試験管当り 接種生菌数	試験管当り S 100 γ 耐性菌数	生菌数当り PAS 100 γ 耐性菌出現率
SMD	19.6 \times 10 ⁶	13.5	6.88 \times 10 ⁻⁷
S. S.	55.6 \times 10 ⁶	0.894	1.66 \times 10 ⁻⁸
SMR	91.9 \times 10 ⁷	27.7	2.90 \times 10 ⁻⁸
	試験管当り 接種SM 100 γ 耐性菌数	試験管当り PAS 100 γ -SM 100 γ 耐性菌数	SM 100 γ 耐性菌数当りの PAS 100 γ 耐性菌出現率
SMR	76.1 \times 10 ⁷	28.9	3.79 \times 10 ⁻⁸

すなわち, PAS 100 γ 耐性菌出現率は, SM依存株の場合には, 青山B株およびSM 100 γ 耐性株に比して, やや高率に出現するのを認めたが, 有意の差を認めることはできなかつた。またSM耐性株の場合に, 接種生菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率と, 接種SM 100 γ 耐性菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率とは, ほぼ同率であつた。

考察

接種生菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率はSM依存株が最も高く, 感性株, SM耐性株の順であつた。なおSM依存株とSM耐性株のINAH 10 γ 耐性菌出現率との間に, 有意の差を認めた。すなわち, 著者¹⁴⁾が *Mycobacterium avium* を用い, すでに報告せるごとく, 人型結核菌においても, SM依存株よりINAH耐性菌を出現し易いことを明瞭に現わしている。

またSM耐性株の場合に, 接種生菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率と, 接種SM 100 γ 耐性菌数当りのINAH 10 γ 耐性菌出現率とは, ほぼ同率であつたことは, 前報¹⁴⁾の成績と一致しない。すなわち, われわれは, SM依存菌とは, SM含有培地にのみ生育し, SMを含有しない培地では生育しない安定ないわゆるSM依存菌と, SMによりその発育が増強される不安定なSM依存菌いわゆるSM増強株よりなると考え¹⁴⁾, SM耐性菌中には相当量のSM依存菌が含有される¹⁴⁾ という報告に一致しないが, この菌株の場合は, 表2に明らかなごとく, SM 100 γ /ml含有培地に9代継代培養を行つたものではあるが, 接種生菌数91.9に対し, SM 100 γ 以上耐性菌数は76.1であつた。すなわち, この菌株の場合には, SM依存菌含有の割合は, 非常に低かつたことが想像される。

またPAS 100 γ 耐性菌出現率は, SM依存株の場合には, 青山B株およびSM 100 γ 耐性株に比して, やや高率に出現するのを認めたが, 有意の差を認めることはできなかつた。すなわち, SM依存株では, SM耐性株に比しやや高率にPAS耐性菌を生ずる傾向を認めた。

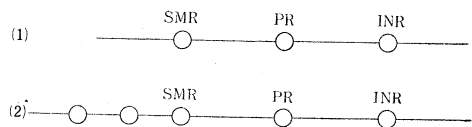
なおSM耐性株の場合に, 接種生菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率と, 接種SM 100 γ 耐性菌数当りのPAS 100 γ 耐性菌出現率とは, ほぼ同率であつたこと

は, 上述のSM耐性株よりのINAH単独使用時, INAH-SM併用時のINAH 10 γ 耐性菌出現率の場合と同じく, 使用せるSM耐性株における, SM依存菌含有率が非常に低いことが想像される。

要するに, SM依存菌は不安定なものと, 安定したものがあつて, 不安定なSM依存菌はSM耐性に極めて逆変異を起し易く¹⁴⁾, またSM耐性菌に比して極めてINAH耐性を生じ易く, PAS耐性はやや高率に出現するという事実より, 第1に, SM依存性に関与するgenesはSM耐性に関与するgenesと密接な関係を有している。第2に, 不安定なSM依存菌の場合には, SM耐性に関与するgenesが変異を起し, かつそれに隣接するSM依存に関与するgenesの数個(1個かも知れない)が, 変異を起しているものと思われる。極めて不安定であることは, そのSM依存に関与するgenesの変異が, 逆変異を起し易いことであり, したがつて, 1個のgenesの変異とも考えられる。第3に, 安定なSM依存菌の場合には, SM耐性に関与するgenesが変異を起し, かつそれに隣接するSM依存に関与するgenesが少なくとも数個以上変異を起し, その結果逆変異を起しにくくなつたものと思われる。第4に, SM依存株の場合, INAH-, またはPAS-耐性菌を生じ易いのは, genes mapにおいて, SM耐性に関与するgenesおよびSM依存に関与するgenesに変異を起しており, なお広範に, その変異がその隣接するgenesに影響を及ぼしたのかも知れない。あるいは, 単にSM依存菌に対するPAS, またはINAHの感受性の相違によるものであるかも知れないと思う。

SM, PAS, INAH各耐性に関与するgenes mapについては, 東村, 三浦²³⁾は, PAS耐性株よりSM耐性菌およびINAH耐性菌を生ずる難易より, PAS耐性に関与するgenesと, INAH耐性に関与するgenesが, 少なくとも2~3個共通のgenesを持つていたことを想像し, genes mapの仮想図として, SM, PAS, INAH各耐性に関与するgenesの順に配列することを予想した(表4参照)。その後, 三浦, 林²⁴⁾は, 2重耐性菌出現率より検討し, 同様の結論に達した。

Gene Map 仮想図



SMD (Unstable)
 ◐ MD (Stable)
 SMR : SM耐性に関与する Genes
 PR : PAS耐性に関与する Genes
 INR : INAH耐性に関与する Genes
 SMD (Unstable) : SM依存に関与する Genes (不安定株)
 SMD (Stable) : SM依存に関与する Genes (安定株)

以上の考察を総合すると, genes map はSM依存性

に関与する genes, SM耐性, PAS耐性, INAH耐性に関与する genes の順序に配列するものと想像される。

小 括

接種生菌数当りの INAH 10 γ 耐性菌出現率は SM依存株が最も高く, 青山B株, SM耐性株の順で, なお SM依存株と SM耐性株の INAH 10 γ 耐性菌出現率との間に, 有意の差を認めた。また PAS 100 γ 耐性菌出現率は, SM依存株の場合には, 青山B株および SM 100 γ 耐性株に比して, やや高率に出現するのを認めたが, 有意の差を認めることはできなかった。

genes map の仮想図としては, SM依存性に関与する genes, SM耐性, PAS耐性, INAH耐性に関与する genes の順序に配列するものと想像された。

総 括

SM依存菌とは SM含有培地にのみ発育し, SMを含有しない培地では発育しないいわゆる安定した SM依存菌と, SMがその発育を増強するいわゆる SM増強菌を不安定な SM依存菌と考えているが, *Mycobacterium avium* より分離せる SM耐性株 (20,000 γ 以上耐性) 中には極めて多くの不安定な SM依存菌が含まれ, かつその不安定な依存菌より INAH耐性に極めてなり易いことを報告した。この事実を, 人型結核菌において再検討した。その結果は次の如くである。

当大府荘に入院中の患者排出喀痰につき, SM依存菌の存在を検討した結果, 患者喀痰の SM耐性菌中に, 相当量の SM依存菌の存在を想像せしめうる結果を得た。また試験管内実験において, 接種生菌数当りの INAH 10 γ 耐性菌出現率は, SM依存菌18-b株が最も高く, 青山B株, SM耐性株の順で, なお SM依存株と SM耐性株の INAH 10 γ 耐性菌出現率との間においては, 有意の差を認めた。また PAS 100 γ 耐性菌出現率は, SM依存株の場合には, 青山B株および SM 100 γ 耐性株に比して, やや高率に出現するのを認めたが, 格別有意の差を認めることはできなかった。

genes map の仮想図としては, SM依存性に関与する genes, SM耐性, PAS耐性, INAH耐性に関与する genes の順序に配列するものと思われた。

御指導ならびに御校閲を賜った国立療養所大府荘長勝沼六郎博士, および名古屋大学医学部内科第一講座日比

野進教授に感謝します。(本論文の要旨は, 第11回厚生省医学会総会において総会発表として報告した。)

参 考 文 献

- 1) Miller, C.P. and Bohnhoff, M. : J. Bact., 54 (4) : 467~481, 1947.
- 2) Yegian, D., Budd, V. and Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 58 : 257~259, 1949.
- 3) Lennert, T.F. & Hobby, G.L. : Am. Rev. Tuberc., 59(2) : 219~220, 1949.
- 4) Owen, C.R., Adcock, J., Stow, R.W. : Am. Rev. Tuberc., 61 : 705~718, 1950.
- 5) Yegian, D. and Budd, V. : J. Bact., 55(4) : 459~461, 1948.
- 6) Yegian, D. and Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 57(2) : 169~178, 1949.
- 7) Yegian, D. and Budd, V. : J. Bact., 61 : 161~165, 1951.
- 8) 矢坂・山村 : 日本臨床結核, 9 : 92~95, 1950.
- 9) Emerson, S. : J. Bact., 54(2) : 195~207, 1947.
- 10) Bryson, V., Deiches, H., Szybalski, W. : Am. Rev., Tuberc., 68 : 631~633, 1953.
- 11) 君野徹三 : J. antibiotics, ser. B.
- 12) Demerec, M. : J. Bact., 36(6) : 585~597, 1951.
- 13) 橋本達一郎 : 結核, 30(1) : 4~8, 1955.
- 14) 三浦幸二 : (結核掲載予定)
- 15) 東村・三浦 : J. antibiotics, ser. B, 9(1) : 23~25, 1956.
- 16) 橋本達一郎 : 結核, 30(5) : 237~241, 1955.
- 17) Kirchheimer, W.F. and Youmans, G.P. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 486~496, 1952.
- 18) Paine, T.F. JR., and Finland, M. : J. Bact., 56 : 207~218, 1948.
- 19) 加藤・三木・松永 : 医学と生物学, 37(5) : 161~164, 1955.
- 20) 橋本達一郎 : 結核, 30(5) : 237~241, 1955.
- 21) 橋本達一郎 : 結核, 30(8) : 461~466, 1955.
- 22) 橋本達一郎 : 結核, 30(12) : 707~711, 1955.
- 23) 東村・三浦 : 医学と生物学, 39(1) : 31~35, 1956.
- 24) 三浦・林 : (結核掲載予定)