

耐性, 表現型耐性, 偽耐性

東村道雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 33 年 8 月 27 日

薬剤耐性問題を取扱うさいに研究者がしばしば感じる疑点は、耐性の定義すなわち耐性菌と感性菌とをどうして区別するかということであろう。しかし、この問題を論じるに先立つて次のことを前提としておかねば無用の混乱を招くおそれがある。

a) 耐性検査の対象となるのは通常個々の菌ではなくて菌集団である。したがって検査の結果は菌集団の大きさ、すなわち接種菌量の大きさによつて変動するから¹⁾、耐性問題を論じるには接種菌量を一定としておかねばならない。そのためには対照培地で単離集落を生じて集落数算定可能な接種菌数を使用するのが実際的である²⁾。具体的にいえば、各試験管あたり (中試験管に培地 8 cc 分注の条件) 10~150 くらいの集落、できれば 10~100 くらいの集落が対照培地に認められる条件で、どの濃度まで発育可能かを定める必要がある。

b) 次に耐性検査の結果は培地によつて変動するから培地を一定にする必要がある [注. 喀痰中結核菌の耐性検査に一般に使用される 3% 小川培地は thiosemicarbazone (TB₁), kanamycin の検定には不適當であるので、小川 (政) 4) によつて提唱され、われわれによつて渦巻白金耳接種法 (接種量を 0.02 ml とする)⁵⁾ と組合わせるように改良された 1% 小川培地使用の方法の方がすぐれている。方法は喀痰に等量の 5% KOH を加えて均等化し、渦巻白金耳で 0.02 ml 宛を接種する (詳細は文献⁶⁾ 参照)。われわれの療養所では昭和 30 年 11 月以来この方法を常用に供している。SM, PAS, INAH に関する検査結果は 3% 小川培地を用いるのと同じである。]

c) 耐性検査の結果は菌株により変動する。ただしこの変動はあまり大きくはないように思われる。

d) 判定日数を一定にすること。

接種菌量、培地、菌株、判定日数を一定にしてもなお避けがたい実験誤差が生じる。しかしこの誤差は上記実験条件をとるとのえれば経験的にはきわめて僅少であつて、人型結核菌青山 B 株、1% 小川培地、渦巻白金耳接種法を用いて、分離集落を与える接種量を用いて検定すれば (以下 actual count 法という)、以下に述べる結果がほとんど恒常的に得られる。

SM では 1 γ から集落数および集落直径が減少しはじめ、以下濃度とともに連続的に減じ、SM 5 γ では

ほとんど可視集落を認めなくなる⁶⁾。

PAS では 0.05 γ から集落数および集落直径を減少しはじめ、以下濃度を増すとともに連続的に減少の度を増し、PAS 0.8 γ では可視集落を認めなくなる⁷⁾。

INAH では 0.005 から集落数のみを減じ、以下 0.01 γ ではさらに数を減じ (直径は不変)、0.02 γ または 0.03 γ で急に可視集落を認めなくなる。INAH では SM および PAS と違つて急に発育阻止が起ることが特徴である⁸⁾。(注. 卵培地の凝固蛋白は薬剤分解を阻止するのに役立つので⁹⁾ ¹⁰⁾、滅菌条件を一定にして固めに仕上げるのが、恒常的結果を得るのに必要である。)

その他、われわれの研究室の成績によれば、viomycin¹¹⁾、TB₁¹²⁾、sulfa 剤¹³⁾、kanamycin¹⁴⁾ も程度の差はあれ SM および PAS と同じ型を示す。

上述の結果は数回ないし 10 数回の検査を繰返してほぼ恒常的に得られる。とくに INAH の場合はきわめて明確な結果が得られる。すなわち、条件さえととのえれば、細菌学的検査の結果に十分信頼をおいてもよいと考えられる。(注. 上述の SM および PAS の記述のごとく、一見完全阻止にみえても、それは肉眼的に可視集落が認められないことを意味するだけで、実際に発育が停止しているのではないことに注意を要する。)

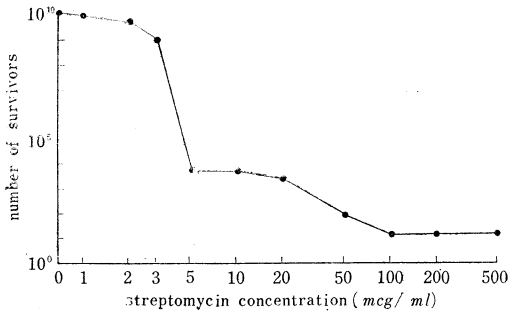
以上の条件を前提として、以下耐性菌と感性菌との区別を混乱させる現象について観察を加える。

I 耐性 (Real Resistance) の定義

耐性菌を論じるには、まず感性菌を論じる必要がある。人型結核菌青山 B 株と SM を例にとれば、薬剤にふれたことのない感性株 (親株) の SM 感受性にも種々の度合があり、感受性の分布曲線は図 1 の通りとなる。ここに使用した感性株は single clone から出発しているので、株中に含まれる耐性度の高い菌も感性菌から変異して生じたことは疑いない。この曲線を観察するのに、左方部 (低濃度部) には緩徐な連続的変動がみられ、ついで曲線は 5 γ のところで急に断層を作つて不連続的となり、再び右方部 (高濃度部) に緩徐な連続的変動を画く。この曲線をみれば、断層点を挟んで左方部を感性菌、右方部を耐性菌と考えるのが自然であろう。

さらに各濃度の survivors (可視集落を形成する菌) をとつて、その population 構成をしらべてみると、5

図1 人型結核菌青山 B 株の SM にたいする Survival Curve
(1% 小川産地, 渦巻白金耳接種法, 4 週後判定)



γ 以上の濃度の survivors の子孫はやはり大部分が SM 5γ ないし 10γ 培地で発育可能 (以下可視集落を形成することを発育という) であり, 一方 3γ 以下の survivors の子孫はそのほとんど大部分が SM 5γ のみならず SM 3γ にも発育不能のものであつた。すなわち 5γ 以上に発育する性質は遺伝するものである。これらの survivors は遺伝子型が変化した菌すなわち resistant mutants と考えられる。一方, 3γ に発育した菌は感性株中では比較的高い変異を示すものであるが, 図1のごとく連続的変異の範囲に含まれ, かつその性質は子孫に遺伝しないので, 感性菌が彷徨変異を示して SM 3γ に発育したものと考えられる。

なお, SM 3γ 培地に発育した菌が, 菌そのものの性質の差によつて survive したのではなく, 数 \times の菌の集合であつたために, 単個菌よりも大きい集落を作つて survive したのではないかという疑問が起るかもしれない。しかし SM 培地上の generation time が仮りに 24 時間かかるとしても (薬劑なし培地では Youmans & Youmans¹⁵⁾ 法で約 8 時間), 3 日経てば 3 世代を経過して 8 \times になるから, その遅れは 3 日分のものである。したがつて仮りに 8 \times の菌から出発した集落が発育停止期に達すれば, 3 日後には単個菌から出発した集落も同じ発育に達してよいはずである。しかるに実際に観察される発育の不揃い (集落直径の不揃い) は培養日数を延長しても消失しない。したがつてやはり菌そのものの感受性の差に由来するものと考えねばならない。また以上の考察とは別にわれわれの実験条件では, 各集落は大抵のものが単個菌に由来するものと考えてよいものである⁵⁾。

以上のごとく耐性度が比較的高く不連続的に出現する菌はその性質を遺伝する mutants であり, 比較的高い耐性度が低くて連続的に出現する菌はその性質が非遺伝的で彷徨変異によるものと考えられる。遺伝子型的には前者は感性菌と違つた遺伝子型をもち, 後者は感性菌と同じ遺伝子型をもつと考えられる。したがつて, ここに耐性菌の定義を耐性遺伝子型をもつ mutants と定義すれば

(遺伝子型的に定義すれば), 両種に耐性菌と感性菌とを区別できる。この区別を実際に行うには, 任意の菌の子孫の population 構成をしらべて, 耐性の性質が遺伝するか否かをしらべればよい。

以上 SM を例として述べたことは INAH や PAS についても全く同様であることが見出された⁷⁾⁸⁾。

以上の定義は臨床的な耐性の定義にも全く好都合である。何となれば, われわれが臨床的に問題とする耐性菌なるものは, たんに一過性のものであれば臨床的に意味がないのであつて, 耐性なる性質が子孫に遺伝されて, 耐性菌集団が持続するがゆゑに臨床的に重大意義を有するからである。すなわち耐性菌の定義を resistant mutants と定義することは理論的のみならず臨床的にも合理的な定義である。(まとめ)耐性菌と感性菌との区別は遺伝子型によつてなされることが合理的であると考えられる。耐性菌とは感性菌 (感性遺伝子型をもつ) と異なる遺伝子型をもつ resistant mutants と定義するのが理論的にも臨床的にも合理的である。すなわち耐性菌とは耐性遺伝子型をもち, 耐性なる性質が遺伝される菌と定義する。耐性菌の耐性度は感性菌と比較して不連続的に高いので感性菌と区別され, さらに両者の子孫の P_{population} 構成をしらべれば, 耐性菌の子孫は耐性度の高い集団からなるので容易に感性菌と区別できる。

II 表現型耐性 (Phenotypic Resistance)

以上のごとく耐性菌を resistant mutants と定義したが, 感性遺伝子型をもつ感性菌が一見耐性菌とまぎらわしい現象を示すことがある。それがここに述べる表現型耐性と次に述べる偽耐性である。SM に関する表現型耐性の現象については別報¹⁶⁾したので, ここには PAS に関する表現型耐性について述べる。

人型結核菌青山 B 株の PAS にたいする survival ratios は表1の通りであつて, survivors は PAS 濃度とともに連続的に減少し, 0.8γ では発育を示さなくなる。PAS にふれたことのない感性株の個々の菌は single cells として接種された場合には 0.8γ 以上の濃度に可視集落を示すことは耐性菌でない限り何回実験を行つても全く経験されない。PAS 0.5γ では survivors の数はかなり減少しているが, なお連続的変動の範囲に含まれていて, 少数が survive する。一方, PAS 1γ 培地における survivors はわずかに 2.81×10^{-5} の割合に見出されるにすぎない。しかも PAS 1γ 培地の集落約 100 \times をとつて, その population 構成をしらべると, 子孫のほとんど全部が PAS 1γ に発育するのみならず, 相当数が PAS 10γ にすら小集落を形成する (表3)。すなわち PAS 1γ 培地の survivors の性質は子孫に遺伝されるので, 耐性遺伝子型をもつ耐性菌と考えられる。

表1 人型結核菌青山B株のPASにたいするSurvival Ratios

(1%小川培地, 渦巻白金耳接種, 6週後判定)

PAS濃度	Survivor 数**				Survival Ratio
	10 ⁻⁵ *	10 ⁻⁴ *	10 ⁻³ *	10 ⁻² *	
0 γ/ml	44.2 ± 8.22	c	m	m	1.00
0.05	35.0 ± 5.52	c	m	m	0.80
0.1	21.5 ± 7.45	c	m	m	0.49
0.5	7.80 ± 2.71	101	m	m	0.23
0.7	0.0	14.6	m	m	0.05
0.8	0.0	0.0	0.2	4.0	2.16 × 10 ⁻⁵
1.0	0.0	0.0	0.1	2.5	2.81 × 10 ⁻⁵

* 接種菌液の稀釈度

** (試験管 10 本の平均値) ± (標準偏差)

c: 集落融合し多数

m: 膜状発育

表2 PAS 0.5 γ 培地に発育した集落の population 構成

(人型結核菌青山B株, 1%小川培地, 渦巻白金耳接種, 6週後判定)

PAS濃度	Survivor 数**	
	10 ⁻⁶ *	10 ⁻⁵ *
0 γ/ml	65.7 ± 13.9	c
1	0.2 ±	17.4 ± 13.3 ±
10	0.0	0.0

* 接種菌液の稀釈度

** (試験管 10 本の平均値) ± (標準偏差)

± 小集落 ("表現型耐性"による)

c: 集落多数で一部融合

一方, PAS 0.5 γ 培地に発育した集落約 100 コをとつて菌液を作り, その population 構成をしらべると表2のごとく PAS 1 γ 培地に少数の小集落を形成した。前述のごとく PAS にふれたことのない感性菌は single cells として接種されて PAS 1 γ 培地に survive することはなく, PAS 1 γ 培地の survivors は耐性菌と考えられるので, 一見このような小集落は耐性菌に由来するのではないかと考えられた, 少なくとも, single cell として接種されて PAS 1 γ 培地にもかく可視集落を形成したこれらの菌は表現型的には耐性を示すといわねばならない。もしこれらの小集落が耐性菌に由来するものであれば, その性質は子孫に遺伝しているはずであるから集落は耐性菌から構成されていなければならない。そこで, これらの小集落を集めて population 構成をしらべてみると, 今回は PAS 1 γ 培地に survive しないばかりか, PAS 0.1 γ 培地にすら survive しない hypersensitive な反応を示した。すなわち, 対照培地に平均 21.0 (10 本の平均) の集落を示したにもかかわらず, PAS 0.1 γ, 0.5 γ, 1 γ のいずれにも発育しなかつた。この結果は小集落が真の耐性菌に由来するものでなく, 実は感性菌に由来するもの

であることを示している。しかし, これらの感性菌は感性遺伝子型をもつにもかかわらず相当期間 (小集落形成の期間) 表現型的に耐性菌に似た反応を示したものといえる。すなわち, この現象は遺伝子型的には感性菌である菌が表現型的には耐性菌のそれに似た反応を示したのであるから, いわば表現型耐性 (phenotypic resistance) と名づけて, 真の耐性とは区別すべきものと考えられる。

III 偽耐性 (Pseudoresistance)

感性菌が感性菌としての表現型を示していると考えられるのに 0.8 γ 以上の PAS 培地や 5 γ 以上の SM 培地に全面的発育を示すことがある。これは大量の接種菌量 (massive inocula) を用いたときにみられる現象で, 偽耐性 (pseudoresistance) とよぶことにする。

大量接種の場合に少量接種の場合より, より高濃度まで発育がみられる現象は以前からよく知られていることであるが, その原因は明らかにされていない。その可能性としては次の 2 つが考えられる。第 1 は接種菌量を増すと, その中に含まれる耐性菌が多くなるため, より高濃度まで耐性菌が発育するのではないかということである。第 2 は, PAS, SM のように発育遅延型の作用形式を示す薬剤では, 濃度が増して発育がみられなくなつても, それは発育遅延のために可視域に達しないためであり, 微量の発育は起つていると考えられる。したがって大量の接種菌量が用いられれば, これら微量発育が集積して可視発育となるのではないかということである。第 2 の可能性は SM, PAS のほかに, sulfa 剤¹³⁾, viomycin¹¹⁾, TB₁¹²⁾, kanamycin¹⁴⁾などのごとく発育遅延型の作用形式をとる薬剤ではすべて起りうることと思われる。

実際に PAS 1 γ 培地または SM 5 γ 培地に種々の接種菌量を接種してみると, ある程度の接種量に達すると少数の耐性菌集落 (population 分析により耐性菌集団であることが証明された) が認められるが, さらに接種菌量を増すと耐性菌集落の背景に薄膜状の全面的発育が認められる。そしてさらに接種菌量を増すと今度は耐性菌集落が不明となつて菌膜状発育のみとなつてしまう。耐性菌集落が不明となつた原因は, 菌膜状発育によつて耐性菌集落の発育が干渉を受けたものと解される⁷⁾。ここに認められた薄膜状ないし膜状発育の由来は何であろうか。もし耐性菌ならば, 耐性菌はまれな存在であるから点状に出現するはずであり, 接種菌量を増して急に全面的発育を示すことはおかしい。したがって第 2 の可能性によるものと思われる。もしそうであれば, 既述のように, これら膜状の全面的発育は耐性菌ではなく感性菌から構成されているはずである。ただし接種された大菌量中には耐性菌も含まれているにちがいないか

ら、これら耐性菌からの発育も起るにちがいない。しかも薬剤培地での発育速度は耐性菌は比較的速く、感性菌は比較的遅いであろうから、一定培養期間後に認められる発育中の耐性菌含有率は、薬剤にふれたことのない感性株中の含有率よりも増加するはずである。

以上述べたごとく、感性菌の集積により耐性培地に発育が認められるとすれば、これは全く耐性とはいいがたく、いわば偽耐性とでもいうべきものであろう。この偽耐性の現象の存在、すなわち前述の膜状発育が感性菌から構成されていることは、次に述べる実験によつて証明された。

1) PAS の場合: PAS 1 γ 培地に 44.2×10^4 の菌を接種すると 6 週後に平均 12.4 コの大きい点状集落が認められ、その背景に薄膜状の全面発育が起つた。この両者の population 構成をしらべると、表 3 のように、点状集落は PAS 1 γ 耐性菌から成っており、これら集落が耐性菌の子孫であることが証明された。一方、PAS 1 γ 培地の薄膜状発育の方は、single cells として接種されたときには PAS 1 γ 培地には発育せず、感性菌から成るものであることが証明された。すなわち、これらの菌は感性菌であるにもかかわらず PAS 1 γ 培地に膜状発育を示して一見耐性菌とまがう現象を呈したのであるから、いわゆる偽耐性の現象を示したといえる。

表 3 大量接種 (44.2×10^4) で PAS 1 γ 培地に点状に発育した単離大集落(株 P1) とその背景の薄膜状発育(株 Pm) の population 構成
(青山 B 株, 1%小川培地, 渦巻白金耳接種, 6 週後判定)

株	PAS 濃度	Survivor 数 **		
		10 ⁻⁵ *	10 ⁻⁴ *	10 ⁻³ *
Pm	0 γ/ml	36.9 \pm 9.14 (100%)	c	m
	1	0.0 (<0.3%)	0.0(<0.03%)	0.0(<0.003%)
	10	0.0 (<0.3%)	0.0(<0.03%)	0.0(<0.003%)
P1	0 γ/ml	191.6 \pm 41.9(100%)	m	m
	1	144.1 \pm 19.4(75%)	m	m
	10	69.0 \pm 12.5(36%)	m	m

* 接種菌液の濃度
** (試験管 10 本の平均値) \pm (標準偏差)
c: 集落多数で一部融合
m: 膜状発育

2) SM の場合: SM 5 γ 培地に感性株の生菌数 21.4×10^4 を接種すると 4 週後に平均 0.2 コの大集落が得られた。この集落を株 I と名づける。同時に 21.4×10^5 の生菌数を接種した SM 5 γ 培地では平均 1.2 コの集落が得られ、その背景に薄膜状の全面的発育が起つた。また 21.4×10^6 の生菌数を接種した SM 5 γ 培地では膜状発育となつて点状集落は不明となつた。これを株 II と名づける。これらの株 I と II との population

表 4 大量接種で SM 5 γ 培地に発育した単離大集落とそれ以上の大量接種で得られた膜状発育の population 構成
(青山 B 株, 1%小川培地, 渦巻白金耳接種, 4 週後判定)

SM	Survivor 数 **	
	株 I * 1	株 II * 2
0 γ/ml	51.4 \pm 10. 2 (100%)	83.2 \pm 3. 0 (100%)
2	16.8 \pm 8.75 (54%)	33.5 \pm 8.75 (40%)
5	11.6 \pm 6.98 (37%)	2.6 \pm 1.16 (3%)
10	4.8 \pm 2.74 (15%)	0.5 (0.6%)
20	0.8 (3%)	0.3 (0.4%)
100	0.0	0.0

* 1 感性株の生菌数 21.4×10^4 を SM 5 γ 培地に接種して得た単離集落
* 2 感性株の生菌数 21.4×10^5 を SM 5 γ 培地に接種して得た膜状発育
** (試験管 10 本の平均値) \pm (標準偏差)

構成をしらべると表 4 の通りとなつた。すなわち、株 I の大部分は SM 5 γ 耐性菌から構成されているのに対し、株 II では SM 5 γ 耐性菌の含有率は株 I の約 1/3 であつた。すなわち株 II は主として感性菌から構成されているが前述の理由で耐性菌含有率を増したものと思われる。すなわち、株 II の耐性菌含有率が感性株より高いのは、SM 5 γ 培地における耐性菌と感性菌との発育速度の差によつて説明される。この場合も、SM 5 γ 培地に膜状発育したのは主として感性菌であつて、やはり偽耐性の現象と考えられる。

総 括

耐性 (real resistance) と混同されやすいが、全く異なる現象として、表現型耐性 (phenotypic resistance) と偽耐性 (pseudoresistance) の存在を指摘した。真の耐性とは耐性菌 (耐性遺伝子型をもつ菌) によつて与えられる現象であり、耐性菌と感性菌とは遺伝子型によつて区別されるべきである。任意の菌が耐性菌かどうかを検定するには、その菌を single cells として培地に接種して発育の有無を観察し、さらにその子孫の population 構成をしらべてみれば区別できる。

表現型耐性とは感性遺伝子型をもつ感性菌が耐性菌と類似の表現型を示す現象であり、偽耐性とは感性菌が大量接種された場合に、微量発育の集積により耐性培地に全面的発育を示す現象である。偽耐性の本態は発育が遅延した感性菌の微量発育 (おのおのは不可視) が集積して可視限界に達したものと考えられる。

文 献

- 1) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 70: 922, 1954.
- 2) 東村・河西: Chemotherapy, 4: 227, 232, 1956.
- 3) 東村・林: Chemotherapy, 掲載予定.

- 4) 小川(政敏): 医療, 10(増): 105, 昭31.
- 5) 東村・野田・中村: 結核, 32: 639, 昭32, 33: 43, 昭33.
- 6) 東村・野田: 医学と生物学, 45: 150, 昭32.
- 7) 東村・野田・山本・林: 医学と生物学, 46: 186, 昭33.
- 8) 東村・野田・山本: 医学と生物学, 46: 49, 昭33.
- 9) Drummond, M.C., Lewis, G.T. & Cummings, M. M.: Dis. of Chest, 19: 158, 1951.
- 10) 土屋: 第32回結核病学会総会演説.
- 11) 山本: 日本化学療法学会(昭33)演説.
- 12) 野田: 名古屋医学, 掲載予定(昭34年2月).
- 13) 東村: Chemotherapy, 3: 187, 1955, 東村・野田・山本: Chemotherapy, 6: 165, 1958.
- 14) 東村・野田・林・鳥居: J. Antibiotics, A, 掲載予定.
- 15) Youmans, G.P. & Youmans, A.S.: J. Bact., 58: 247, 1949.
- 16) 野田・東村: 医学と生物学, 48: 170, 昭33.