

Mycobacterium の薬剤耐性獲得の機序

M607 株洗滌菌の振盪時および静置時におけるストレプトマイシンの作用について

草 間 久 子

慶応義塾大学医学部細菌学教室 (主任 牛場大蔵教授)

受 付 昭 和 32 年 8 月 23 日

緒 言

細菌薬剤耐性獲得の機序に関してはすでに多くの研究者によって報告され、薬剤耐性の遺伝子的変化を認めるものの中に2つの学説がある。すなわち1つは突然変異選択説であり、他は変異誘導説である。前者はDemerec¹⁾, Klein および Kimmelman²⁾, Luria³⁾, Alexander および Leidy⁴⁾^{5), 6)}, Yegian および Vanderline⁷⁾, Alexander および Redman⁸⁾, Newcombe および Harwirk⁹⁾, Scott¹⁰⁾, English および McCoy¹¹⁾, 牛場および渡辺¹²⁾, 渡辺¹³⁾, によって専ら菌の突然変異と耐性菌の選択的増殖によって説明され、後者では Linz¹⁴⁾, 秋葉および横田¹⁵⁾¹⁶⁾, 金井ら¹⁷⁾, 君野および都築¹⁸⁾, 横田¹⁹⁾ らによって薬剤そのものの変異誘導作用の存在が強調されている。以上のほかに非遺伝子的の考えとして薬剤耐性上昇の機序は酵素的適応と同じであるとする Hinshelwood²⁰⁾, Sevag および Rosanoff²¹⁾ ら, によって唱えられる適応説があり、またかつて堀²²⁾ はストレプトマイシン耐性と菌の代謝との関係から一種の適応説を提唱した。

一般に薬剤は細菌の増殖しつつある population に対して選択作用をもちうるものである。薬剤そのものの誘導作用を証明するためには選択作用の全く働かない状態において、すなわち "Resting Cell" を用いて、薬剤と菌体との直接的な相互作用 (interaction) によって薬剤耐性が獲得されるかどうかをしらべるのが望ましい。かようにして Klein および Kimmelman は赤痢菌の resting cell と SM とを接触させても耐性の上昇がみられなかつたと報告し、また牛場、渡辺らは腸炎菌 (No. 11株) と SM を接触させても耐性上昇はみられなかつたこと、また同時に "phenolag" の現象を考慮に入れて実験しても同様に耐性上昇がみられなかつたことを報じている。これに反し秋葉、横田らは、黄色ブドウ球菌 (209P株) と大腸菌 (B-19株) とを使用し、おのおのの resting cell と SM とを数日間接触させると、SM耐性上昇が著明に認められたと報じている。また前記堀は洗滌菌に力源としてブドウ糖およびある種のアミ

ノ酸を加えて SM の存在の下に短時間振盪することによって、耐性上昇を認めたという。今回私は上記諸実験を Mycobacterium についてさらに検討するため Mycobacterium 607株を使用して短時間振盪しながら SM に接触させて SM 耐性の変化をみる実験、さらに温度の条件をかえて resting cell と SM を5日間接触させてその SM 耐性に及ぼす影響をみる実験等を行つたのでここに報告する。

実験材料と実験方法

- 1) 使用菌株は国立予防衛生研究所より分与された後当教室で小川培地に継代保存せる Mycobacterium 607株 (以下 M607株と略) である。
- 2) M 607 株の耐性分布に使用したストレプトマイシンは明治製薬の Crystalline Dihydro-streptomycin Sulfate (以下 SM と略), SM の溶解および稀釈には滅菌蒸溜水を使用した。
- 3) 使用培地は下記の2種類である。[1] Kirchner 寒天培地 (血清を添加せず), すなわち Kirchner 液体培地の原液に寒天 (精製粉末寒天) を 2% に混合して 10% 苛性ソーダにて pH 6.8 に補正後高圧滅菌して使用した。[2] グリセリン寒天培地, すなわちグリセリン (試薬特級品) 1%, 肉エキス (レンダー) 1%, ペプトン (極東ペプトン) 1%, 食塩 (日本局方) 0.2%, 寒天 (精製粉末寒天) 1%, に混合して 10% 苛性ソーダにて補正高圧滅菌して使用した。
- 4) 菌浮游液および菌稀釈には Sørensen の磷酸緩衝液 (pH 6.8) を使用した。

薬剤の直接的作用による耐性上昇の実験として、実験[1] M 607 株の Kirchner 寒天斜面培地の3日培養菌をガラス玉入コルベンに掻き取り、冷却しながら手振法で均等菌浮游液を作り、その濃度は日立製光電光度計にて (フィルター No. 66, 波長 660 μ m を使用), O.D. (Optical Density) 0.382 となるように規定した。この均等菌浮游液を pH 6.8 の磷酸緩衝液で 3,000 回転 30 分間遠沈をくりかえし 3 回洗滌して培養成分を洗い落とし、再び磷酸緩衝液にて原量にもどし、菌体内の栄養素を消費

しつくさせる意味で菌浮游液を24時間37°Cに保存後、菌浮游液4.5mlにSM水溶液0.5mlを加えて、SM5γ/ml含有菌液、SM1γ/ml含有菌液を作り、SMの代りに滅菌蒸留水0.5mlを加えたものを対照とした。なおSM5γ/ml, 1γ/ml, 含有菌液に10%ブドウ糖0.1mlを加えたものについて同時に実験した。すなわちこれらの各菌浮游液材料を遠沈管(菌液が良く攪拌されるように先端の比較的円味のある遠沈管を選んだ)に分注して、37°Cの恒温槽中に浸し、5時間振盪攪拌した後取り出して、再び磷酸緩衝液にて3,000回転30分間遠沈、十分に洗滌してSM濃度0γ, 0.3γ/ml, 1.0γ/ml, 3γ/ml, 10γ/ml, 30γ/ml, 100γ/mlのKirchner寒天平板培地にそれぞれ菌液0.1mlずつ接種し、一定規格のConradi棒で平等に塗抹し、37°Cに培養してSMの耐性分布を調べた。判定は4日~7日後に出現した集落を肉眼的に数えて、培地2枚の平均数をみた。

実験〔II〕 M607株の休止菌とSMを直接接触させた実験で、いわゆる休止菌の作り方はM607株を小川培地に3日培養した菌を使用し、前実験同様に冷却しながら菌液を作り、3,000回転30分間3回遠沈洗滌して、5ml中にそれぞれSM0.5γ/ml, 5γ/mlを含む菌液を作り、SMを含め対照と同時に37°C, 4°C, に5日間保存、5日後に取り出し、再び磷酸緩衝液にて3,000回転30分間遠沈、十分に洗滌して、SM0γ, 0.05γ/ml, 0.5γ/ml, 2.5γ/ml, 5γ/ml, 50γ/ml, 100γ/ml, を含むグリセリン寒天平板培地に0.1mlずつ接種して、前実験同様にSM耐性分布を調べた。

実験成績

実験にあたり最初M607株の原株の大量菌について、SM耐性分布をKirchner寒天平板培地およびグリセリン寒天平板培地にて数回繰り返して試みたところほぼ同じような成績でその耐性分布の1例は表1の如くである。すなわち大量菌中に耐性の高い変異菌の存在を容易に認めることができた。

表1 M607原株(大量菌)のSM耐性分布

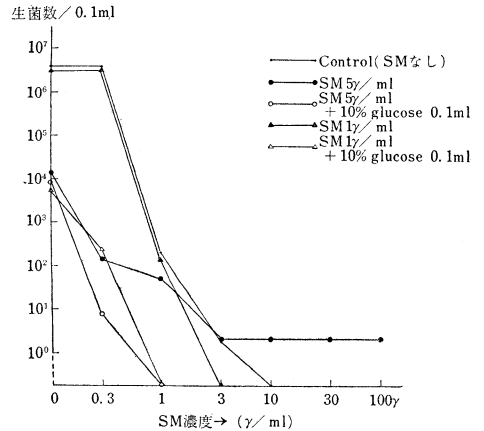
SM濃度	0γ	0.3γ	1γ	3γ	10γ	30γ	100γ
生菌数	3.6×10 ⁹	3.6×10 ⁹	4.5×10 ⁸	8.5×10 ²	10	3	2※

※ 数字は0.1ml中の生菌集落数を現わす

実験〔I〕 直接接触させたSMが持ち込まれぬように十分洗滌し、上記の振盪による方法にしたがって数回繰り返して試みた。37°C24時間保存前の生菌数は1.7×10⁸個で保存後の生菌数は4.1×10⁷個で、生菌数の差は僅かではあるが減少している。また振盪前のSM耐性分布を調べたところ少なくともその0.1ml中には高度耐性菌の出現はみられなかった。

図1に示す如くSM1γ/mlの存在で振盪した場合は感

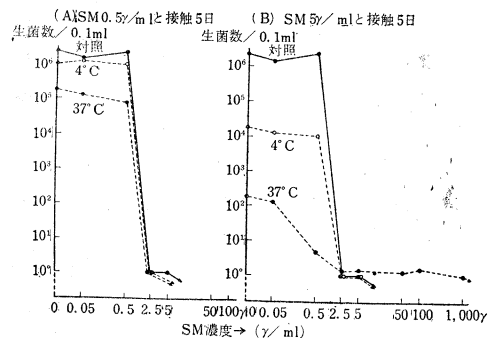
図1 M607株のSM接触5時間振盪後のSM耐性分布



受性菌の僅かの減少をみたが、SM耐性上昇は認められない。またこれにブドウ糖を添加した場合は感受性菌は対照に比較して100倍以上の減少をきたしたが、同様耐性菌の出現も認められなかった。また他方比較的高濃度のSM(5γ/ml)においては感受性菌の著明なる減少をきたし、同時に僅かではあるが3γ以上100γのSM耐性菌の出現がみられたが、ブドウ糖を添加したものには前者同様感受性菌の減少をともなつたのみで、SM耐性の上昇はみられなかった。繰り返し実験を試みたが、ブドウ糖を添加しないものに時としてSM耐性上昇をきたす傾向が認められた。

実験〔II〕 ではM607株を上記の如くしてまず incubation前の生菌数4.3×10⁷個でまたSM耐性分布を調べたところ少なくとも接種菌量0.1mlの中には高度耐性菌の出現は認められておらない。incubation後の成績は図2に見られるように、低濃度のSM(0.5γ/ml)に5日間

図2 SM接触後の"Resting Cells"(M607株)耐性分布



接触させると、37°C, 4°C, の環境でも感受性菌の減少は僅かであり、しかも4°Cの環境の方が減少の度は弱い、いずれも耐性上昇はみられない。比較的高濃度のSM(5γ/ml)に5日間接触させると、対照に比較して著明なる感受性菌の減少をきたし、この時にも37°Cの

方が感受性菌の減少が強く、同時に僅かではあるが耐性菌の出現を認めた。ただし4°Cの環境においてはまったく耐性菌の出現は認められなかった。

総括ならびに考案

実験〔I〕を総括すると、菌体内の栄養素を除いた後に磷酸緩衝液中で菌をSMに直接接触させると、SM低濃度の場合は感受性菌の減少は僅かであり、SMの比較的高濃度の場合は感受性菌の著明な減少があり、それにとりもなつて僅かではあるが耐性菌の出現が認められる。この際にブドウ糖を添加すると両者共に感受性菌の減少が強くみられる。したがつて本実験ではブドウ糖が力源として作用し、耐性菌の出現を誘導して多数の耐性菌の出現をもたらすというような成績は得られなかった。緒言にもふれたように、秋葉らは黄色ブドウ球菌 209 P株の "Resting Cell" を使用して 2.5γ/ml SM 磷酸緩衝液に 5日～8日間接触させて、SM耐性分布を Demerec らの平板法によつて測定し、resting state において 2.5γ/ml の SM に 37°C 5日間接触せしめるとほとんど全体の生菌の耐性が 2.5γ/ml となると同時に 100γ/ml に耐える菌が相当数に現われ、また 0°C に 8日間接触させた場合にも前者に比較して弱いが 2.5γ/ml 以上に耐える菌が相当数に増加していると述べており、この実験で獲得された耐性菌を SM のない環境に継代培養して反復して SM の耐性を調べたところ、耐性は容易に低下しなかつたので、この SM 耐性は遺伝性であり、SM 耐性上昇の機序は主として induced mutation によると主張している。ところが本実験〔II〕を総括すると、SM 濃度 0.5γ/ml, 5γ/ml, に 37°C, 4°C, に各 5日間接触させると、SM 低濃度 (0.5γ/ml) では感受性菌の減少は僅かであり、それに耐性上昇もなく、SM 高濃度に接触させると、感受性菌の著明なる減少をきたすと同時に、僅かではあるが耐性菌の出現をみる。37°C の環境の方が感受性菌の減少が著明なる傾向を示している。ただし 4°C の場合には感受性菌の著明なる減少があるにもかかわらず耐性上昇は認められなかった。一方 M607 株の大きな population 中にはいわゆる自然変異耐性菌が存在することが表 1 により明らかに推察され、また元来多数の菌中には自然変異耐性菌の存在しうことはすでに Demerec (1948年), Lederberg (1952年) によつて証明されている。そこで 37°C の場合には両実験とも M607 株は完全なる "resting" の状態にはなく、恐らく菌の分裂の過程において SM が感受性菌に殺菌的に作用して、殺菌された死菌の菌体成分を栄養素として、元来生菌中に存在しておつた自然変異耐性菌が選択的に増殖してきたものと考えられる。なお 4°C の場合には低温のため増殖条件が悪いので自然変異耐性菌が出現できなかつたものとみなされる。かくして "resting cell" における耐性上昇の

機序は薬剤の選択作用のみによつても説明されうるのであえて薬剤そのものの誘導作用を考慮に入れなくともよいと考えられる。

結 論

- 1) Mycobacterium 607 株を磷酸緩衝液中で SM 低濃度に接触させてブドウ糖の存在の下に 37°C 短時間振盪した場合、あるいは同緩衝液中で SM と接触させて静置した場合、いずれにおいても著明な耐性上昇は認められなかった。
- 2) 1, 2 の実験において僅かに耐性上昇を認めた場合があるが、それらはいずれも感受性菌の著明な減少をきたし、かつ 37°C に保たれた時においてのみであった。したがつて耐性が上昇した場合には、死菌菌体成分を栄養素として元来存在した自然変異耐性菌の増加する可能性が推察された。
- 3) 上記の実験は Mycobacterium 607 株においてもその SM 耐性上昇には薬剤の誘導作用を考慮に入れるべき積極的の証明を得られないことを示し、したがつてその機構は突然変異および薬剤選択作用によつて説明されると考えられる。

この実験の一部は昭和 30 年 4 月第 30 回日本結核病学会総会において発表した。また本実験は文部省科学研究費結核班の補助を受けた。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導、御校閲を賜つた牛場教授に心から深謝いたします。なお御援助に預つた小沢教博士ならびに伊藤満学士に深謝いたします。

文 献

- 1) Demerec, M.: J. Bact., 56:63, 1948.
- 2) Klein, M., and Kimmelman, L.J.: J. Bact., 52:471, 1946.
- 3) Luria, S.E.: Bact. Rev., 11:1, 1947.
- 4) Alexander, H.E., and Leidy, G.: J. Exp. Med., 85:329, 1947.
- 5) Alexander, H.E., and Leidy, G.: J. Exp. Med., 85:607, 1947.
- 6) Alexander, H.E., and Leidy, G.: Pediatrics., 4:214, 1949.
- 7) Yegian, D., and Vanderline, R.J.: J. Bact., 56:177, 1948.
- 8) Alexander, H.E., and Redman, W.: Pediatrics., 4:461, 1949.
- 9) Newcombe, H.B., and Hawirko, R.: J. Bact., 57:565, 1949.
- 10) Scott, G.: Brit. J. Exp. Path., 30:501, 1949.
- 11) English, A., and McCoy, E.: J. Bact., 61:51,

- 1951.
- 12) 牛場大蔵・渡辺力：日本細菌学雑誌，9：349-353，昭29.
 - 13) 渡辺力：日本細菌学雑誌，10：231-237，昭30.
 - 14) Linz, R.: Ann. Inst. Past., 78：105, 1950.
 - 15) 秋葉朝一郎・横田健：医学と生物学，24：218-222，昭27.
 - 16) 秋葉朝一郎：Chemotherapy, 1：1, 1953.
 - 17) Kanai, K., Nakamoto, T., and Yanagisawa, K.: Japanes. J. Med. Sci. and Biol., 6：365, 1953.
 - 18) 君野徹三・都築敏男：J. Antibiotics, Ser. B, 7：62, 89, 1954.
 - 19) 横田健：日本細菌学雑誌，10：261-267，昭30.
 - 20) Hinshelwood, C.: Nature, 166：1089, 1949.
 - 21) Sevag, M.G., and Rosanoff, E. I.: J. Bact., 63：243, 1952.
 - 22) 堀三津夫・吉川正吾・伊藤和夫・横井正照：結核，30：12-13，昭30.
 - 23) 堀三津夫：文部省科学研究費結核研究班，化学療法，研究科会，プリント，昭29.
 - 24) 秋葉朝一郎：細菌学の領域，204-221.
 - 25) 後藤敏夫・清水邦彦・渡口精吉・坂本光弘：結核，30，11：34-39，昭30.