

ミコバクテリウムの特異な抵抗性とそれが薬剤耐性獲得に さいして演ずる役割について

4. SM, INH に対する抵抗性と耐性の出現

山 田 修

京都大学結核研究所細菌血清学部 (指導 植田三郎教授)

受付 昭和34年3月14日

結 言

著者は前 1, 2, 3 編¹⁾において、ミコバクテリウム (以下「ミ」と略) の酸・アルカリ、消毒剤および熱に対する抵抗性を詳細に検討した結果、いずれの場合においても、「ミ」菌液は分裂菌のそれとは異なつて、抵抗性を異にするところの概略 2~3 種以上の菌体から成立し、中でも特別に強い抵抗性を示す菌体が含まれていることを明らかにした。しかもこのような抵抗性は上記各種の影響に対して、それぞれの場合に多少の差異はあつたが常にほぼ共通して表現せられた。このような、影響の性質の如何を問わず表現せられる普遍的な抵抗性は、おそらくは「ミ」の発育のそれぞれの段階における菌体の構造ないしは機能に起因するものであらうと考えせしめた。

本編においては、前 3 編の成績を顧慮しながら上記各種の影響とは作用機序を異にすると考えられている抗結核剤、たとえば硫酸デヒドロストレプトマイシン (以下 SM と略) およびイソニコチン酸ヒドラジッド (以下 INH と略) の影響に対して、はたしていかなる抵抗性を示すかを検討した。従来この種の薬剤に対する抵抗性 (逆にいえば感受性) は、通例各種濃度の薬剤を含有する培養基に菌を移植して発育可能な限界濃度をもつてそれを知る指標とした。しかしながら上記のような方法で発育した集落は、その出発点となつた菌体細胞が発育の開始以前およびそれ以後に、すでに一定日数培養基中の薬剤に当然接触し、その影響下にあつたことは自明であるから、このようにして発育した集落の中には適応あるいはその他なんらかの機転によつてはじめて発育した集落が存在する可能性が考えられる。したがつてこの場合、発育した集落を構成する菌体と、その出発点となつたもとの菌体とはすでに薬剤との関係からみたその性質が異なつてるとみなさるべきであらう。このように考えると、薬剤含有培養基に培養した結果発育してきた集落について、ただちにもとの菌体の抵抗性ないしは耐性を云々することは誤りを犯すおそれがあると思わ

れる。

したがつて著者は、菌液に薬剤を種々の日数接触させたのち、その影響をできるだけ除去するために洗滌あるいは高度に稀釈してから薬剤を含まない卵培養基に培養し、発育集落の有無および発育した集落について再び抵抗性 (感受性) 試験を繰返した結果を観察することにより、もとの菌液に含まれた菌体の抵抗性を判定した。

材 料

〔供試菌〕 人型結核菌 H37Rv 株およびフランクフルト株。牛型結核菌牛 1 号株および RM 株。鳥型結核菌鳥京株。

〔菌液〕 供試「ミ」をグリセリンブイヨンに 37°C 11~14 日間培養し、その菌膜を濾紙で脱水後、一定量を瑪瑙乳鉢で丁寧に磨砕し、キルヒナー菌液または蒸溜水菌液を作り、できるかぎり単個菌からなる菌液を得るために室温に 30 分間放置して菌塊を洗滌させ、その上清を用いた。

〔実験その 1〕 鳥型結核菌の SM の影響に 対する抵抗性

鳥京株の 2 mg/ml 蒸溜水菌液を作り上記のごとく菌塊を除き、SM 1, 10, 100 および 1,000 γ /ml を含むキルヒナー液 20 ml に 0.5 ml 宛加えた。容器は 100 ml 容量三角コルメンを用い、あらかじめ磨砕用硝子玉を入れておき、よく振盪混和し、管口は密栓した。37°C 2, 4, 7 および 14 日後にコルメンを強く振盪後、1ml を取出し、できるだけ SM の作用を除去するために蒸溜水で 10,000 倍に稀釈し、0.1 ml 宛各 3 本の卵培養基に培養し、8 週後に集落数を数え、それぞれ培養基 3 本についての平均値を求めた。このようにしてそれぞれ接触日数を異にした場合の生菌数についてその消長曲線を得た。また上記実験によつて得た集落のうち 100 γ および 1,000 γ の SM 中で 2 および 7 日間接触後の生残菌 (集落) および 1,000 γ 中で 14 日後に増殖した菌 (集落) を任意に釣菌してグリセリンブイヨンで増

菌後、菌液を作り、上述と同様な方法で再び SM 加キルヒナー液中における生残菌の消長曲線を調べ、最初のそれと比較した。

その結果は図 1 のごとく、100 γ および 1,000 γ に

図 1 各種濃度の SM 加キルヒナー液中の発育曲線 (鳥京株) [その 1]

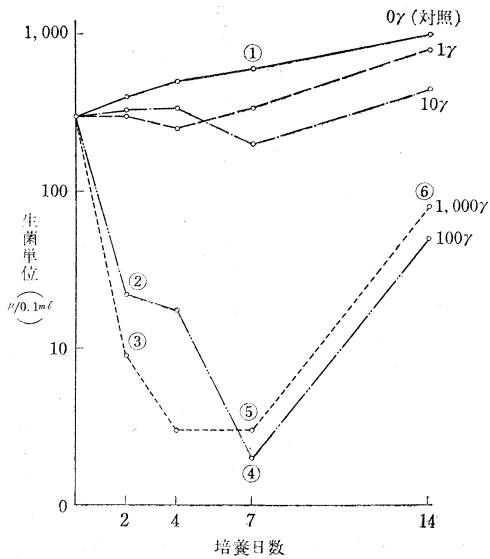
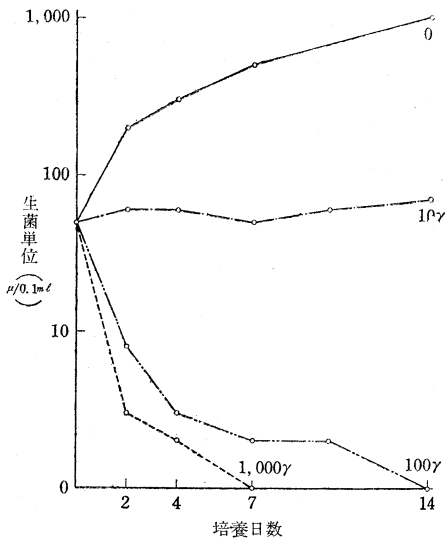


図 2 各種濃度の SM 加キルヒナー液中の発育曲線 [その 2] (図 1 ①印の菌：対照の菌)



おいては 2 日後に大部分の菌体は死滅し、7 日後に生残菌数は最低を示したが、14 日後には顕著に増殖した。そして同図の①, ②, ③および④印の集落を用いて再び発育曲線を調べた結果は、図 2~5 のごとく多少の差異はあるが図 1 (親株) と同じ傾向の曲線を示した。しかしながら図 1 の⑤印の集落、すなわち 1,000 γ/ml S

図 3 各種濃度の SM 加キルヒナー液中の発育曲線 [その 3]

(図 1 ②印の菌：100γ 2 日後生残菌)

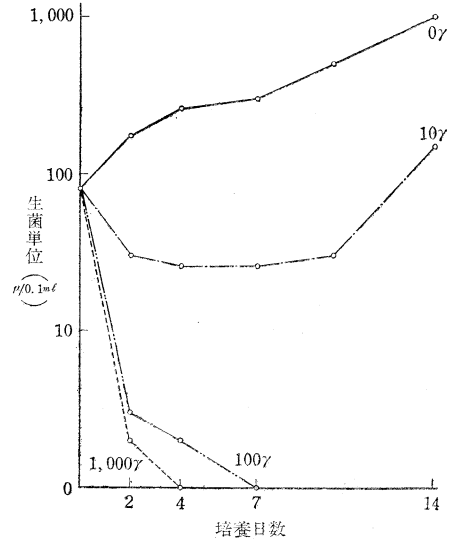
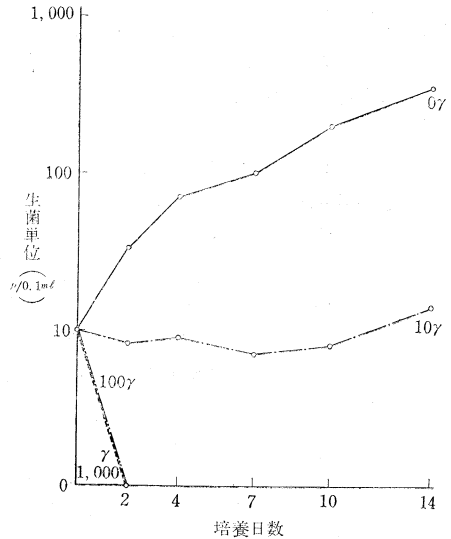


図 4 各種濃度の SM 加キルヒナー液中の発育曲線 [その 4]

(図 1 ③印の菌：1,000γ 2 日後生残菌)



M 接触後 7 日目の菌 (集落) の発育曲線は図 6 のように 100 γ/ml SM 耐性を示した。また図 1 の⑥印の菌 (SM 接触後 14 日) では図 7 のごとく SM の影響を全く受けずに発育した。

〔実験その 2〕 人型・牛型結核菌の SM の影響 に対する抵抗性

SM 100 γ/ml 加キルヒナー液でそれぞれ H37Rv 株 フランクフルト株および牛 1 号株の 10 mg/ml 菌液を

図5 各種濃度のSM加キルヒナー液中の発育曲線
〔その5〕
(図1④印の菌: 100 γ 7日後生残菌)

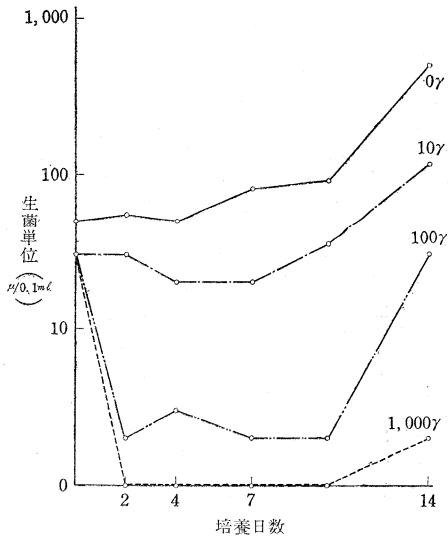


図7 各種濃度のSM加キルヒナー液中の発育曲線
〔その7〕
(図1⑥印の菌: 100 γ 14日後の菌)

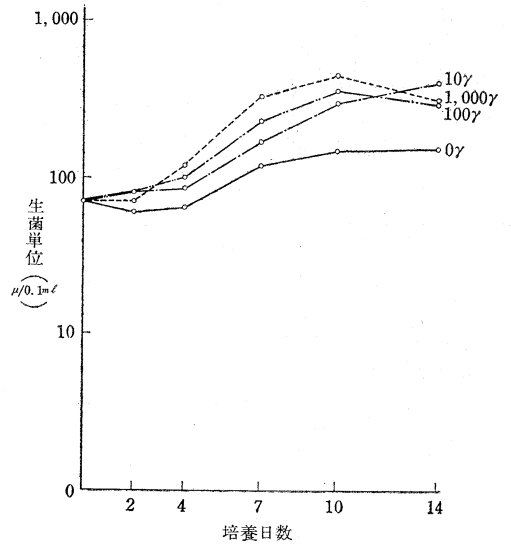


図6 各種濃度のSM加キルヒナー液中の発育曲線
〔その6〕
(図1⑤印の菌: 1,000 γ 7日後生残菌)

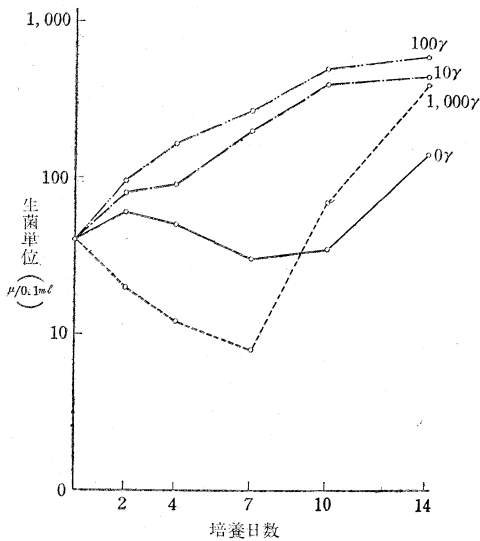
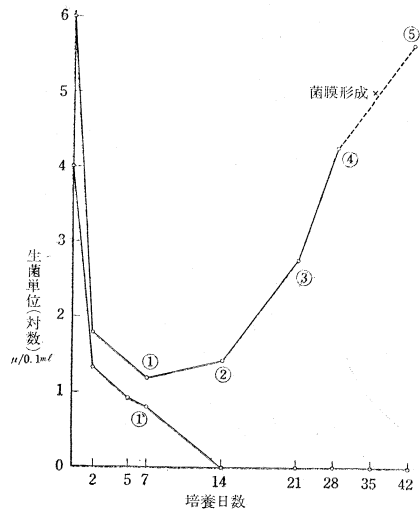


図8 SM 100 γ /ml 加キルヒナー液中の発育曲線
〔その1〕
(H37Rv株)



作り、上述のごとく菌塊を除き、その 20 ml をそれぞれ硝子玉入りコルベンに入れて 37°C に置き、2 日、5 日および 1, 2, 3, 4, 6 週後に強く振盪後 1 ml を取出し、4 ml の蒸留水を加えて遠沈し、沈渣に 5 ml の蒸留水を加えて遠沈洗滌をさらに 2 回繰返し、最後に 1 ml の蒸留水菌液となし、0.1 ml を 3 本宛卵培養基に 6 週間培養後、集落数の平均値を求めて 100 γ 中での発育曲線を得た。

その結果は図8のごとく、上記鳥京株の場合にはほぼ類

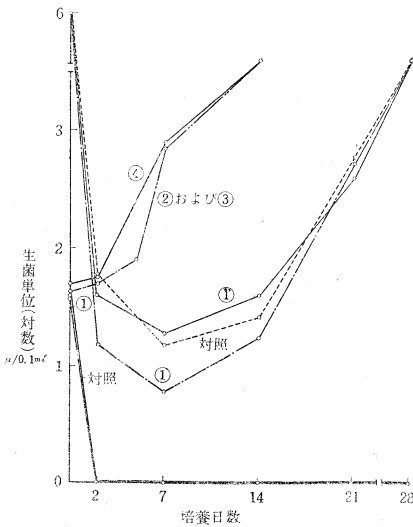
似して 2 ないし 7 日後に生残菌数は最低になり、以後増殖しはじめた。ただし供試菌量が少ない場合には①印のごとく増殖はみられなかった。フランクフルト株および牛 1 号株についてもまたこれと類似の曲線を得た。また試みに鳥型菌島京株の 100 mg/ml 菌液を用いて上記同様にして SM 10,000 γ の場合についても実験したがこの場合にもまた上記と同じ傾向の曲線を得た。

〔実験その3〕 H37Rv 株菌液の SM 加キルヒナー液中において各時期に生残ないし発育した菌(集落)の SM 抵抗性の再検討

実験その2において得られた H37Rv 株の集落, すなわち 100 γ のうちで 1 週間接触後生残した菌 (集落) および 2, 3, 4 週後の菌 (集落) をそれぞれ 5 コ宛任意に釣菌し, それぞれグリセリンピジョンで増菌後, 最初と同じ方法で再び SM 100 γ/ml 加キルヒナー液中における発育曲線を調べた。

すなわち図8の①, ①, ②, ③および④で得られた集落についての発育曲線は図9に示すごとく, ①および①すなわち SM 100 γ/ml 7 日間接触後生残した菌 (集

図9 SM 100 γ/ml 加キルヒナー液中における発育曲線 [その2] (図8○印の菌)



落) は, 対照の親株と類似した曲線を示した。しかしながら②, ③および④すなわち 2, 3 および 4 週間 SM に接触した菌の発育曲線は, 図9の②, ③および④印のごとく対照とは顕著に相違して SM の影響を受けずに発育し, いわゆる耐性を示した。それぞれ5コを集落について行なつたこの実験はいずれも類似の曲線が得られ, 図9はその平均値を示した。(注: 図9において①および対照はおのおの2つの曲線が示されてあるが, 接種菌量の多い場合と少ない場合とをそれぞれ示したものである。)

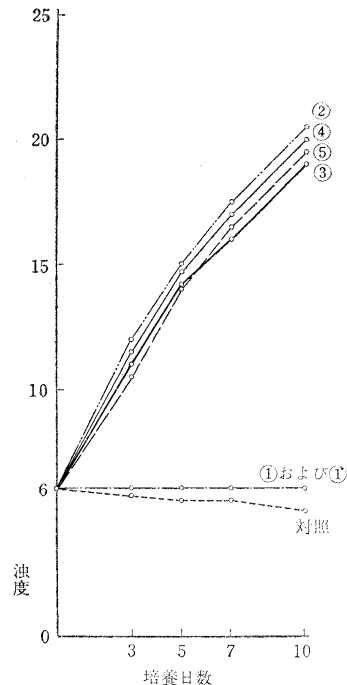
なお図8の SM 100 γ/ml 加キルヒナー液において第5週ごろになると菌膜が出来はじめたが, 試みに第6週の菌膜の一部を採つて SM 1,000 および 10,000 γ/ml 加キルヒナー液の液面に移植すると, いずれの濃度においても旺盛な発育を示した。

〔実験その4〕 実験その3と同じことを光電比濁計を用いて検査した場合

H37Rv 株が SM 100 γ/ml 加キルヒナー液中で, 1, 2, 3, 4 および 6 週後に生残ないし発育した菌

(集落) を任意にそれぞれ 2 コ宛釣菌してただちに菌液となし, 0.05% の割に Tween 80 を加えた SM 100 γ/ml 加キルヒナー液に培養し, 濁度の上昇すなわち増殖の有無ないし増殖の経過を光電比濁計によつて検した。すなわち図8における①, ①, ②, ③, ④および⑤の菌 (集落) の発育 (濁度) 曲線は図10のごとく, SM に 1 週間接触後生残した菌 (①および①) は対照の親株と同様に濁度の上昇がなく, したがつて発育は阻

図10 SM 100 γ/ml 加キルヒナー液中の発育曲線 [その3] (光電比濁計) (図8○印の菌)



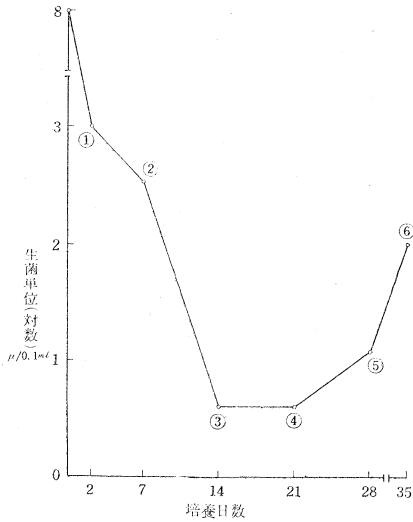
止され, 2 週間以上接触した菌(②, ③, ④および⑤印)は濁度の上昇を示し, したがつて SM の影響を受けずに発育した。

〔実験その5〕 人型および牛型結核菌の INH の影響に対する抵抗性

人型 H37Rv 株および牛型 RM 株を用い上記の方法に従つて INH 100 γ/ml 加キルヒナー液で 100 mg/ml の菌浮遊液を作り, 20 ml を硝子玉入りコルペンに入れ, 37°C 2, 7, 14, 21, 28 および 35 日後にコルペンを強く振盪後, ピペットで 1 ml を採り, これに 4 ml の蒸溜水を加えてさらに遠沈洗滌を 2 回繰返し, 最後に 1 ml の蒸溜水浮遊液となし, その 0.1 ml を 3 宛宛卵培養基に培養し, 6 週後に集落数 (平均) を計算した。

そのうち, H37Rv 株についての成績をみると, 図11

図 11 I NH 100 γ/ml 加キルヒナー液における H37Rv 株の発育曲線〔その1〕



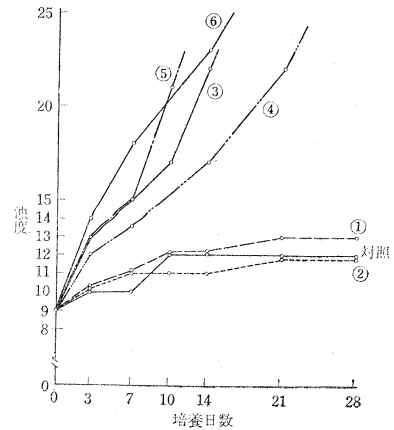
のごとく、I NH に接触後 2 週にして生残菌数は最低値を示し、3 週をすぎると生菌数は増加しはじめ、以後急速に増殖した。この場合第 6 週になると菲薄な菌膜が液面に生じることがあるが、試みにその一部を採つて I NH 100, 200, 500 および 1,000 γ/ml 加キルヒナー液の液面に移植すると、前述 SM の場合とは異なり、200 γ までは菲薄な菌膜が形成されるが 500 γ および 1,000 γ の濃度では発育しなかつた。

〔実験その 6〕I NH 加キルヒナー液中において各時期に生残ないしは増殖した菌の I NH 抵抗性の再検討

実験その 5 で得た集落、すなわち H37Rv 株の I NH 100 γ/ml 加キルヒナー液中で 2, 7, 14, 21, 28 および 35 日間接触したのちの菌 (集落) を、それぞれ任意に 3 コ宛釣菌し (14 日および 21 日作用後の菌については全集落数各 4 コ)、ただちに菌液となし、0.05% に Tween 80 を加えた I NH 100 γ/ml 加キルヒナー液に培養し、光電比濁計によりそれぞれ濁度の平均値を求めて発育曲線を調べ、耐性の有無を検した。

その結果、100 γ/ml の I NH に 2 日および 7 日間接触後生残した菌から発育した集落 (図 11 の①および②印) および 14, 21, 28, 35 日間接触後の菌から発育した集落 (図 11 の③, ④, ⑤および⑥印) は図 12のごとく 2 週間以内の菌、すなわち I NH に抵抗して単に生残つただけの菌 (集落) は対照の親株と同様に濁度の上昇は認められず、したがって発育を阻止された。しかるに 2 週間以上 I NH と接触した菌 (集落) はすべて濁度の上昇 (したがって増殖) を認め耐性を示した。

図 12 光電比濁計による I NH 100 γ/ml 加キルヒナー液における H37Rv 株の発育曲線〔その 2〕
(図 11 〇印の菌)



総括ならびに考案

上述の実験においてとくに注意をひく点が 2 つある。その 1 つは「ミ」菌液中には感性のまま SM あるいは I NH に抵抗して生残するところの一部少数の菌体が含まれているということであり、他の 1 つはこのような菌体が上記薬剤を含む培養基中においてやがて再発育をはじめたときには耐性を示すということである。

まず第 1 の点、すなわち薬剤下メヂウムにおいて感性のまま生残する菌体について考察するに第 1, 2, 3 編 1) において酸・アルカリ、消毒剤、熱等の影響に対して「ミ」の菌液中にはとくに強い抵抗性を示す一定少数の菌体が常に含まれていることを明らかにし、このような菌体は発育のある段階にある一定の構造ないしは機能を有する菌体²⁾ではないかと考察したが、このことを参照しながら SM および I NH の殺菌的作用に耐えて生残する少数の感性菌体をみれば、これらの菌体についてもまた同じような推定ができるのではないかと思う。すなわち SM あるいは I NH を含む環境中で感性のまま生残した菌体は、上記同様に発育のある段階にある一定の構造ないしは機能を有する菌体と考えて大過ないであろう。このような菌体が SM あるいは I NH を含む培養基中で感性のまま生残するという事実こそ耐性獲得の出発点として重要視せらるべきではなからうか。

次に第 2 の点のみるに上記のごとくして生残した菌体がやがて再発育をはじめたときにはすでに耐性を有しているという点を重要視すべきであろう。もちろん、再発育に先立つてすでに一定の過程があつて耐性が獲得されるのか、あるいは再発育することによつてはじめて耐性が獲得されるのか等に関する詳細は上記実験の範囲内では考察しがたいが、要するに再発育ということ、耐性獲得ということが密接に関係するということを見る

過してはならない。

上記の2点に留意しつつ SM あるいは INH の所見を考察するに、まず SM の場合には、「ミ」の菌液にある濃度以上の SM を接触させると、大多数の菌体は1週以内に死滅するが一部少数の菌体だけは強く抵抗して生残する。しかも図8~10(人型菌 H37Rv 株)にすでに示したごとく、SM に抵抗して単に生残しただけの菌体はまだ SM 耐性ではなく親株と同じく感性である。この点に関しては最近釧野³⁾ および金井⁴⁾ もまた類似の所見を得ている。このように SM の作用を受ける環境にあつて SM の作用を受けずに感性のまま生残するという菌体は特別な状態にある菌体と考えられよう。このような菌体が SM を含む培養基において薬剤接触後2週後には増殖が認められ同時に耐性を示した。すなわち SM の影響に抵抗して生残した感性菌体が SM 加培養基において、およそ第1週末から第2週の経過中に耐性を獲得することは明らかであり、この期間にいかなる機作によつて耐性が獲得されるのかはなほ興味深いことである。耐性獲得機作の解明の手懸りはこの1週間の経過の中に潜んでいるように思われた。鳥型菌では、たとえば100 γ の場合をみれば多少の相違はあるがおおむね1週後に生残菌数が最低となり、しかもこの時期の生残菌はまだ耐性を有せず、やがて発育増殖したものを2週後に検査すれば耐性を有していた。しかるに1,000 γ の場合には多少趣きを異にし、SM接触1週後に生残した菌はすでにある程度の耐性を示した。このことが1,000 γ という高濃度において発現する特殊な現象であるのかどうかは、4~7日の経過が上記の方法では十分に追跡されていないのでここで考察することは困難である。

INH の場合(図11, 12)にもまた上記 SM の場合にほぼ類似した成績であつて、INH 接触後最初の1週間内に生残した菌は感性であり、2週以後になつてはじめて耐性を示した。この成績を上掲の図8と対照すると多少の差異があるようであるが、SM の場合には上述のごとく、作用短時間後に大多数の菌体が死滅し、ほぼ1週で最低値を示し、2週になると増殖を同時に耐性を示した。しかるに INH では、1週後に生残した少数の菌は感性であつたが、2週後には生残菌数が最低となり、この時期の菌は耐性を示した。以後の経過は SM の場合とほぼ異なり、3週後までその状態を持続し、しかるのち顕著に増殖した。すなわち INH では生残菌ないし再発育の菌の曲線は SM の場合に比して概略1週のズレがあつたということは興味あることである。この場合1~2週の間の詳細を知ることができないが上述の SM 環境下における人型および鳥型の場合を参照すると、この期間中に生残菌数のもつとも少なくなつた時期があつたかもしれないことも考えられ

よう。このような考察にしてもし誤りないものとするならば、しかも2週後の菌(図11の◎印)がすでに耐性を示したことから判断すると、この時期の菌はすでに再発育をしはじめていたのではないとも考えられる。このことは Barclay⁵⁾ の実験すなわち INH メヂウムにおいて2週後に増殖を開始し、増殖した菌は耐性を有していたという成績と対照してみると興味がある。もちろん上記期間中に培養基中の INH 濃度が低下する⁶⁾ 点も顧慮しなければならないが、その間にいかなる機作によつて耐性が獲得されるのか興味深いところである。ちなみにこの実験で得られた SM 100 γ 耐性菌が1,000 γ および10,000 γ のメヂウムにも発育したにもかかわらず、INH 100 γ 耐性菌は上述の方法によつては200 γ に発育しえたのみで500 γ および1,000 γ には発育できなかった事実は両薬剤の作用機作の本質的な相違に関することかもしれない。

薬剤耐性獲得の機作に関しては諸説があり、現今2説すなわち、(1)突然変異および選択説(spontaneous mutation and selection theory)^{7)~10)}、(2)適応(adaptation)または誘導変異(induced mutation)説^{11)~14)}とが相対立している。しかもなお今日いずれの説にたつても明確に説明できないばかりかむしろ混乱の感がある。この点については次編においてさらに検討を加える予定であるが、SM あるいは INH の影響を受けて一部の菌体が感性のまま抵抗して生残し、それが上記薬剤を含む培養基において再発育をすると同時に耐性を示すという上記実験成績の範囲からみれば、この種の菌、すなわち「ミ」に関するかぎり、その耐性出現は突然変異というような現象では説明しにくいことであつて、むしろ自然抵抗性のとくに強い、発育段階の一定の菌体と関連するものと考えるべきではなからうか。「ミ」菌液中に含まれる上記のごとき一般的抵抗性の強い菌体を抗結核剤に対する耐性を獲得する出発点となるものであろう。「ミ」菌液中にこのような抵抗性菌体が自然に含まれていることが、この種の菌が上記のごとき薬剤に対して容易に耐性を獲得する契機をなすのではないとも考えられる。

結 論

1) 「ミ」の抗結核剤に対する抵抗性を検討する目的をもつて、諸種濃度の SM 加キルヒナー液中における結核菌の発育曲線を調べたところ、ある濃度以上において菌液中の大多数の菌体は1週以内に死滅したが、一部少数の菌体は感性のまま生残り、やがて再発育して2週後には増殖を認め、同時に耐性を示した。

2) 上記同様にして INH (100 γ/ml 加キルヒナー液)の場合をみるに、1週後の少数の生残菌は SM の場合と同様に感性であり、2週後に最少値を示した生残

菌は耐性であつた。この状態を3週後まで持続したのち顕著に増殖した。

3) 「ミ」菌液中の一部少数の菌体が感性のままSMおよびINHの影響に耐えて生残する事実は、各種の一般的影響に対する自然抵抗性と軌を一にするものと考えられ、したがつてこの場合にもまた発育の一定段階にある菌体の表現する自然抵抗性と関連するものと考えられる。このような菌体こそ耐性出現の出発点であり、またこの種の菌が耐性を獲得しやすい契機をなすものであろう。

御指導と御校閲を賜つた恩師植田三郎教授に深謝し、上坂一郎助教授の御助言を謝す。

本論文の要旨は日本結核病学会第8回近畿地方会(昭和28年)において述べた。

主要文献

- 1) 山田修：結核，34：614, 677, 749, 昭34.
- 2) 植田三郎：結核菌の研究，1. 形態及び発育様式，南江堂，昭26；結核，32：181, 241, 昭32.
- 3) 箕野脩一：結核，31：678, 昭31.
- 4) 金井興美：日本細菌学雑誌，10：177, 昭30.
- 5) W.R. Barclay, R.H. Ebert, & D. Koch, Wasser：Am. Rev. of Tuberc., 67：490, 1953.
- 6) E. Lewin, & J.G. Hirsch：Am. Rev. of Tuberc., 71：732, 1955.
- 7) Demerec, M.：J. Bact., 56：63, 1948.
- 8) Klein, M. & Kimmelman, L.J.：J. Bact., 52：471, 1946.
- 9) Yegian, D., & Vanderlinde, R.J.：J. Bact., 56：177, 1948.
- 10) 牛場大蔵・渡辺力：日本細菌学雑誌，10：177, 昭30.
- 11) Hinshelwood, C.N.：Symposia of the Society for Exptl. Biology, Academic press, New York, 1949.
- 12) Linz, R.：Ann. Inst. Past., 78：105, 1950.
- 13) Sevag, M.G., & Rosanoff, E.I.：J. Bact., 63：243, 1952.
- 14) 秋葉朝一郎：Chemotherapy, 1：1, 1953.