

Mycobacteria の Streptomycin に対する耐性菌の 出現の機構に関する研究

吉 川 正 吾

大阪大学微生物病研究所竹尾結核研究部 (指導 堀三津夫教授)

受 付 昭 和 33 年 12 月 1 日

I 緒 言

細菌の薬剤に対する耐性菌 (以下薬剤耐性菌と略) がどのような機構をもって出現してくるかについては現在多くの疑問が存在してまだ十分に解明されていないが、つぎに述べるような仮説が提唱されている。

1) 突然変異 (Spontaneous mutation) と薬剤の選択作用によるという説

細菌が突然に原因不明の、また無方向的な予測することのできない変化を起し、しかもこの変化が遺伝性をもっている場合を突然変異という。薬剤に対する耐性 (以下薬剤耐性と略) の場合では、細菌が薬剤と一度も接触することなくして生じたいろいろの突然変異菌の中から環境に存在する薬剤によつて薬剤耐性菌が選択されるから、また Selection theory とよばれている。この説は最初 Demerec^{1)~3)} によつて提唱せられ、その後 Klein, et al.^{4) 5)}, Luria, et al.^{6)~8)}, Newcombe et al.^{9) 10)}, Lederberg, et al.^{11) 12)}, Cavalli & Maccacaro¹³⁾, その他多数の人々によつて支持され、またわが国では牛場およびその協同研究者^{14)~17)} がこれを強調している。

2) 誘導変異 (Induced mutation) によるという説

人為的な突然変異であつて、環境に加えられた外因によつて細菌の突然変異率が実験誤差の範囲をこえて著しく増大される場合を誘導変異という。これをさらに分類すると無方向性と定方向性が考えられるが、薬剤耐性の場合の定方向誘導変異、たとえば Streptomycin (以下 SM と略) が細菌に作用して、SM に対する耐性 (以下 SM 耐性と略) に関与する遺伝子に特異的に変化を誘起して SM 耐性という性質を獲得させることは、堀教授¹⁸⁾ が述べているように一般には否定されている。しかしたとえ定方向誘導変異が起つたとしても、Mycobacteria ではこれと無方向性の誘導変異および選択作用により起る現象とを現実と区別して把握することはきわめて困難であるから、ここでは一括して単に誘導変異とよぶ。この説は Linz, et al.^{19)~21)}, Gibson & Gibson²²⁾, Eagle, et al.^{23)~26)} らによつて提唱されており、わが国では柳沢およびその協同研究者^{27)~29)}, 秋葉およびその一門の人々^{30)~32)}, 君野および都築³³⁾, ら

によつて支持されている。

3) 遺伝子系の変化を伴わない単なる表現型適応

(Phenotypic adaptation) であるとする説

細菌が環境の変化に順応して適当な代謝系を活性化する、あるいは変化する現象を適応というが、この場合遺伝子系の変化を伴わないから適応によつて発現されている性質は一般に遺伝性に乏しい。薬剤耐性の場合には薬剤によつて阻害される代謝系の機能を代償して、しかもその薬剤の作用をうけない代謝系が活性化してその薬剤に対して耐性という性質を示すものであるが、細菌の代謝系の適応的变化はほとんどの場合不明であつて、単に細菌のその薬剤に対する感受性から耐性への変化を目標として把握されているので、堀教授¹⁸⁾ にしたがつて表現型適応とよぶことにする。Hinshelwood, et al.^{34)~37)}, Sevag, et al.^{38) 39)} らによつて唱えられている仮説はこれに属すると思われる。表現型適応によつて細菌が薬剤耐性を獲得する場合は非増殖条件でも細菌が薬剤と相互作用を営むことによつて薬剤耐性という性質を獲得するはずであり、獲得した薬剤耐性という性質の遺伝性は一般に否定されているが、細胞質遺伝という現象も明らかにされているので、この性質が遺伝するからといって、ただちにこれを表現型適応でないとして解釈することもできず、耐性の獲得が適応か誘導変異かの区別はなかなか困難である。

以上述べたように大別すると3つの仮説が唱えられているが、第1の仮説の提唱者は少数の人々を除き薬剤耐性菌の出現機構を突然変異と薬剤の選択作用のみで解決しきれるとしているが、第2および第3の仮説の提唱者のほとんど大部分は第1の仮説のみでは解釈しきれないとしている。

私は Mycobacteria の SM 耐性菌の出現機構について研究したが、Mycobacteria では接合現象が認められていないので、第2および第3の仮説を明確に区別することができず、この両者を一括して SM が Inducer として作用する可能性の有無として検討し、以下に述べるような実験を行い種々の知見をえたのでここに報告する。

II 実験方法と実験成績

Mycobacteria の SM 耐性菌の出現に SM が Inducer として作用するか否かの可能性は突然変異が起らないような条件, すなわち非増殖条件, あるいは薬剤の選択作用をさけるような条件, すなわち増殖抑制濃度以下の薬剤を作用させる条件によつて検討することができ, また SM を作用させた場合の耐性菌の出現頻度が突然変異率から期待されるそれよりも実験誤差の範囲をこえてはるかに大きいか否かによつても推定することができる。

A) 非増殖条件で SM を作用させた場合

1) 4°C で SM を人型菌に作用させた場合

実験 1

〔実験方法〕

使用菌株: 下記の Dubos 変法培地に 2 週間培養した人型結核菌 H₃₇Rv 株。

使用培地: 菌と SM を接触させるために用いた培地は Dubos 基礎培地 (Albumin を含まず) に Tween 80 を 0.025 % の割に加えたもの (以下 Dubos 変法培地と略), 生菌数および SM 耐性菌数の測定には KH₂PO₄ を 1 % の割に含むように調製した小川培地

(以下小川培地と略)。

使用した SM : Chas. Pfizer & Co., Inc. の製品で Dihydrostreptomycin sulphate (以下 DHSM と略)。なお上記の両培地に添加した SM は表 1 に記載した所用量である (小川培地でも加熱による SM の力価の低下は考慮していない)。

培養法: SM を種々の濃度に加えた Dubos 変法培地 9 ml に, 適当量の菌液 (上記の原培養の 1 ml あて) をそれぞれ接種して, 菌の増殖をさけるために氷室 (4°C) 中で保存し, 1 週間後より 8 週間後まで毎週それぞれの培養の 1 ml をとりだして原液とし, これを 10⁵ 倍に稀釈してその 0.25 ml あてを, 種々の濃度に SM を添加した小川培地に各群 5 本あて接種, 4 週間培養して発生した集落数を算定した。

〔実験成績〕

上記の SM 添加 Dubos 変法培地に菌を接種して 4°C に保存し, 2, 4, 6 および 8 週間後に SM 耐性菌の分布を検した成績を表 1 に示した (1, 3, 5 および 7 週間後のそれは省略)。

表にみられるように, このような条件でも SM 耐性

表 1 SM 耐性菌の分布

(a) 2 週間後

耐性検定濃度 接触濃度	0	1	4	16	64	256	512	1,024
0 (対 照 群)	152 (100.0)	42 (27.6)	0	0	0	0	0	0
1	102 (100.0)	38 (37.3)	0	0	0	0	0	0
4	82 (100.0)	20 (24.5)	0	0	0	0	0	0
16	42 (100.0)	11 (26.3)	0	0	0	0	0	0
64	33 (100.0)	7 (21.2)	0	0	0	0	0	0
256	25 (100.0)	5 (20.0)	0	0	0	0	0	0

注: 1) SMの濃度はすべて γ/ml

2) 上の数字は小川培地 5 本の集落数の総和, 下の () 内は感性菌に対する %

3) 上記の事項は (b) 以下の表についても同じ

菌はあらわれるが, 期間の経過とともにこの Dubos 変法培地中の結核菌の生菌数は顕著に減少していくので SM の選択作用が菌の生死にまでおよんでいる可能性が考慮されねばならないし, またこのような条件では Dubos 変法培地中の菌の増殖を完全に否定しきることまでできない。

2) 非増殖条件で鳥型菌に SM を作用させて 38°C に静置した場合

実験 2a (予備実験一使用菌株の SM 感受性)

以下の実験にさきだち予備実験として使用菌株の SM 感受性を 20 回にわたつて検索した。

〔実験方法〕

使用菌株: グリセリン・フイオンに 72 時間表面培養をした鳥型菌竹尾株 (以下の実験にはすべてこの菌株を用いた)。

培養法: SM 非添加 (対照) および SM を種々の

(b) 4 週間 後

耐性検定濃度 接触濃度	0	1	4	16	64	256	512	1,024
(対 照 群)	92 (100.0)	18 (19.0)	0	0	0	0	0	0
1	82 (100.0)	18 (22.0)	10 (12.2)	9 (11.0)	2 (2.4)	0	0	0
4	38 (100.0)	8 (21.0)	4 (10.5)	4 (10.5)	1 (2.6)	0	0	0
16	20 (100.0)	4 (20.0)	2 (10.0)	3 (15.0)	0	0	0	0
64	18 (100.0)	8 (44.4)	4 (22.2)	2 (11.1)	4 (22.2)	3 (16.7)	0	0
256	18 (100.0)	12 (66.7)	6 (33.3)	2 (11.1)	3 (16.7)	3 (16.7)	2 (11.1)	0

(c) 6 週間 後

耐性検定濃度 接触濃度	0	1	4	16	64	256	512	1,024
(対 照 群)	78 (100.0)	20 (25.4)	0	0	0	0	0	0
1	40 (100.0)	8 (20.0)	2 (5.0)	2 (5.0)	2 (5.0)	0	0	0
4	22 (100.0)	4 (18.2)	6 (27.3)	4 (18.2)	2 (9.1)	0	0	0
16	18 (100.0)	6 (33.3)	2 (11.1)	4 (22.2)	2 (11.1)	0	0	0
64	9 (100.0)	5 (55.6)	2 (22.2)	2 (22.2)	3 (33.3)	1 (11.1)	0	0
256	6 (100.0)	4 (66.7)	2 (33.3)	2 (33.3)	1 (16.7)	2 (33.3)	2 (33.3)	1 (16.7)

(d) 8 週間 後

耐性検定濃度 接触濃度	0	1	4	16	64	256	512	1,024
(対 照 群)	36 (100.0)	8 (22.2)	0	0	0	0	0	0
1	28 (100.0)	4 (14.3)	2 (7.1)	0	0	0	0	0
4	18 (100.0)	6 (33.3)	4 (22.2)	0	2 (11.1)	0	0	0
16	8 (100.0)	4 (50.0)	2 (25.0)	4 (50.0)	2 (25.0)	0	0	0
64	5 (100.0)	3 (60.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	0	1 (20.0)	0	0
256	4 (100.0)	3 (75.0)	0	1 (25.0)	0	1 (25.0)	0	0

表2 使用菌株のSM耐性度分布

濃度	0	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0	32.0	64.0
No.										
1	102 (100.0)	19 (18.65)	10 (9.80)	8 (7.84)	4 (3.92)	0	0	0	0	0
2	130 (100.0)	21 (16.15)	14 (10.76)	11 (8.47)	6 (4.61)	1 (0.77)	0	0	0	0
3	185 (100.0)	35 (18.92)	23 (13.51)	10 (5.41)	10 (5.41)	3 (1.68)	0	0	0	0
4	82 (100.0)	17 (20.73)	12 (14.63)	6 (7.32)	2 (2.44)	0	0	0	0	0
5	107 (100.0)	15 (14.02)	10 (9.35)	6 (7.48)	3 (2.80)	0	0	0	0	0
6	145 (100.0)	19 (12.41)	15 (10.35)	12 (8.28)	8 (5.52)	3 (2.08)	0	0	0	0
7	98 (100.0)	17 (17.35)	10 (10.20)	6 (6.12)	0	0	0	0	0	0
8	61 (100.0)	6 (13.11)	4 (6.55)	4 (6.55)	0	0	0	0	0	0
9	96 (100.0)	15 (15.63)	11 (11.46)	6 (6.25)	3 (3.13)	0	0	0	0	0
10	135 (100.0)	15 (11.11)	10 (7.41)	8 (5.93)	0	0	0	0	0	0
11	80 (100.0)	12 (15.00)	7 (8.75)	5 (6.25)	2 (2.50)	0	0	0	0	0
12	141 (100.0)	13 (9.22)	16 (11.35)	7 (4.96)	7 (4.96)	2 (1.42)	0	0	0	0
13	153 (100.0)	25 (16.34)	13 (8.50)	10 (6.54)	0	0	0	0	0	0
14	76 (100.0)	16 (21.05)	10 (13.16)	5 (6.58)	0	0	0	0	0	0
15	128 (100.0)	20 (15.63)	15 (11.72)	11 (8.59)	3 (2.34)	0	0	0	0	0
16	101 (100.0)	25 (24.75)	14 (13.86)	7 (6.93)	0	0	0	0	0	0
17	93 (100.0)	12 (12.90)	10 (10.75)	8 (8.60)	0	1 (1.07)	0	0	0	0
18	130 (100.0)	21 (16.15)	16 (12.31)	8 (6.15)	0	0	0	0	0	0
19	122 (100.0)	28 (22.95)	20 (16.39)	7 (5.74)	4 (3.28)	0	0	0	0	0
20	175 (100.0)	22 (12.57)	15 (8.57)	11 (6.28)	5 (2.83)	2 (1.14)	0	0	0	0
A	10 ⁵ .0	16.23	10.97	6.81	2.19	0.41	0	0	0	0

注：1) SMの濃度は γ/ml
 2) 上の数字は集落数、下の()内は%
 3) 最下欄のAは20回の%の平均値

濃度に添加した2%寒天加グリセリン・ブイヨン平板培地。

あらかじめ50~60°Cに加熱溶解させた上記培地15mlにコルペン手振法で型のごとく調製した上記鳥型菌の菌液(1mg/mlを10⁵倍希釈, 0.25ml)をPetriシャーレ内でよく混和して冷却したのち、さらにその上層に上記培地を5mlあて注加して作成した。これを38°Cに1週間培養し(以下この培養法を平板培養と略)、発生した集落数を算定した。

使用したSM:前記のDHSMと同じ(以下実験2Cまで同じ)。

[実験成績]

使用菌株のSM耐性度分布は表2にみられるように、SM1 γ/ml に対して約6.8%に耐性菌が認められるが、SM8 γ/ml 以上に対する耐性菌は証明しえない。

実験2b(非増殖条件で植菌と同時にSMを作用させた場合)

[実験方法]

生理的食塩水(0.85%)以下生塩水と略、M/100磷酸緩衝液(以下緩衝液と略)および対照としてDubos変法培地(いずれもpH7.0)に上記菌株から調製した菌液(3回遠心洗浄)を10mg/mlにそれぞれ接種し、1群にはただちにSMを100 γ/ml の割合に加え、他群にはSMを添加せず、孵卵室(38°C)に静置し、それぞれを原液として1週間後より4週間後まで毎週原液の一部をとり、SMを作用させた場合は10³倍に、SMを作用させない場合は10⁵倍に希釈して、その0.5mlあてを上記の方法で平板培養を行い生じた集落数を算定した。なお平板培養には各群とも3枚あての培地を用いた。

[実験成績]

表 3 生塩水中で菌に SM を作用させた場合の耐性度分布 (静置実験)

保存期間	SMの濃度 区分	SMの濃度				
		0	1	10	100	1,000
1週	菌液	360.3 (100.0)	23.7 (6.6)	0	0	0
	菌液+SM	277.3 (100.0)	20.0 (7.2)	0	0	0
2週	菌液	170.7 (100.0)	10.7 (6.3)	0	0	0
	菌液+SM	107.3 (100.0)	7.3 (6.8)	0	0	0
3週	菌液	80.3 (100.0)	4.3 (5.4)	0	0	0
	菌液+SM	57.0 (100.0)	3.3 (5.8)	0	0	0
4週	菌液	31.7 (100.0)	1.7 (5.4)	0	0	0
	菌液+SM	23.3 (100.0)	0.7 (3.0)	0	0	0

注: 1) SM の濃度は γ/ml
 2) 上の数字は 5 枚の平板培地に認めた集落数の平均値, 下の () 内は %
 3) 以上の事項は表 6 まで同じ

表 4 緩衝液中で菌に SM を作用させた場合の耐性度分布 (静置実験)

保存期間	SMの濃度 区分	SMの濃度				
		0	1	10	100	1,000
1週	菌液	433.3 (100.0)	25.7 (5.9)	0	0	0
	菌液+SM	371.0 (100.0)	42.3 (11.4)	20.7 (5.6)	8.3 (2.2)	0
2週	菌液	247.7 (100.0)	16.3 (6.6)	0	0	0
	菌液+SM	183.3 (100.0)	36.7 (20.0)	15.0 (8.2)	6.7 (3.7)	2.0 (1.1)
3週	菌液	120.5 (100.0)	7.3 (6.1)	0	0	0
	菌液+SM	97.7 (100.0)	20.7 (21.2)	10.5 (10.5)	5.7 (5.8)	4.0 (4.9)
4週	菌液	73.3 (100.0)	4.3 (5.9)	0	0	0
	菌液+SM	37.7 (100.0)	5.7 (15.1)	2.7 (7.2)	2.3 (6.1)	0

生塩水中で菌に SM を作用させた場合は, 表 3 にみられるように原株の SM 耐性度分布 (表 2) と差異を認めず, また緩衝液の場合は表 4 にみられるように SM

10 γ/ml 以上の耐性菌がすでに 1 週間後に出現し, 2 週間後になると生菌数は減少するが高濃度耐性菌の占める割合は大きくなる。3 週間以後では生菌数が顕著に減少するために成績の解釈は困難である。なお Dubos 変法培地ではもちろん菌の増殖が行われるので高濃度耐性菌は, 表 5 のように 1 週間後からほとんど 100 % 近く出現する。

表 5 Dubos 変法培地中で菌に SM を作用させた場合の耐性度分布 (静置実験)

保存期間	SMの濃度 区分	SMの濃度				
		0	1	10	100	1,000
1週	菌液	1,123.0 (100.0)	78.7 (7.0)	0	0	0
	菌液+SM	977.7 (100.0)	973.7 (99.6)	943.3 (96.5)	996.3 (101.9)	920.0 (94.1)
2週	菌液	1,909.3 (100.0)	132.3 (6.9)	0	0	0
	菌液+SM	1,563.3 (100.0)	1,570.3 (100.4)	1,495.7 (95.7)	1,501.3 (96.0)	1,503.7 (96.2)
3週	菌液	2,010.3 (100.0)	130.7 (6.2)	0	0	0
	菌液+SM	1,288.7 (100.0)	1,236.7 (96.0)	1,359.3 (105.5)	1,290.3 (100.1)	1,193.7 (92.6)
4週	菌液	1,343.7 (100.0)	91.3 (6.8)	0	0	0
	菌液+SM	998.7 (100.0)	948.7 (95.0)	1,010.3 (101.2)	980.7 (98.2)	950.3 (95.2)

実験 2c (非増殖条件で植菌 5 日後に SM を作用させた場合)

実験 2b において生塩水あるいは緩衝液に菌を接種した場合 SM を添加していても菌の初期の増殖が起る可能性が考えられるので⁴⁰⁾, 菌を接種してから 5 日後に SM を 100 γ/ml あてに添加して上記と同様の実験を行った。

その成績は表 6 に示すように SM 10 γ/ml 以上の耐性菌の出現は生塩水では認められず, 緩衝液では認められる。

3) 非増殖条件で鳥型菌に SM を作用させて 38°C で 5 時間振盪した場合

実験 3a (前処置を加えない菌に SM を作用させた場合)

〔実験方法〕

使用菌株: Sauton 培地に 48~72 時間表面培養をした前記の鳥型菌竹尾株 (感性株)。

使用した SM: 武田薬工の製品で DHSM (以下実験 4b まで同じ)。

培養法: 生塩水 (0.85 %, pH 7.0), M/50 磷酸緩

表6 植菌5日後にSMを添加した場合の菌のSM耐性度分布(静置実験)

保存期間	SMの濃度 区分	SMの濃度				
		0	1	10	100	1,000
1週	N	123.3 (100.0)	8.0 (6.6)	0	0	0
	B	173.7 (100.0)	17.7 (10.2)	7.7 (4.4)	5.0 (2.9)	0
	D	925.7 (100.0)	923.7 (99.7)	932.7 (101.0)	910.7 (98.5)	898.7 (97.3)
2週	N	56.7 (100.0)	3.7 (6.5)	0	0	0
	B	103.7 (100.0)	15.7 (15.1)	9.7 (9.4)	7.3 (7.0)	4.7 (4.5)
	D	1,477.7 (100.0)	1,501.3 (101.6)	1,480.3 (100.2)	1,468.7 (99.4)	1,403.7 (95.0)
3週	N	31.7 (100.0)	2.0 (6.3)	0	0	0
	B	50.3 (100.0)	9.7 (19.3)	7.7 (15.3)	6.7 (13.3)	3.3 (6.6)
	D	1,201.3 (100.0)	1,215.7 (101.2)	1,185.7 (98.7)	1,167.7 (97.2)	1,098.7 (91.5)
4週	N	11.3 (100.0)	0.7 (6.2)	0	0	0
	B	13.7 (100.0)	1.7 (12.4)	1.7 (12.4)	0.7 (5.1)	0
	D	947.7 (100.0)	938.7 (99.1)	961.3 (101.4)	940.3 (99.2)	909.3 (95.9)

注: N = 生理的食塩水 (0.85%, pH 7.0)
 B = 磷酸緩衝液 (M/100, pH 7.0)
 D = Dubos 変法培地

衝液 (pH 7.0) (以下緩衝液と略) および後者にブドウ糖または焦性ブドウ酸ソーダを、それぞれ 10^{-5} M/ml あて添加した各液 (以下の実験に使用した各液の濃度はすべてこれと同じ) に SM を $100 \gamma/ml$ に添加、あるいは対照として添加せず、鳥型菌 (実験 2a と同一の菌株) の特殊な前処置を施さない菌液を 10 mg/ml に接種して Warburg の恒温槽 (38°C) で 5 時間振盪した。振盪後それぞれの菌液を原液として下記のように希釈して菌液をつくり、その 0.5 ml あてを前記の実験 2a と同じようにして、各群 3 枚あての平板培養を行った。なお原液の希釈度は SM を作用させた場合は 10^3 倍、SM を作用させない場合は 10^5 倍であり、以下実験 3c まで同様である。

〔実験成績〕

表 7 のように、緩衝液にブドウ糖を加えた場合のみ SM 1, 10, 100 および $1,000 \gamma/ml$ に対する耐性菌が出現した。ただし生菌数は SM を作用させた場合

表 7 前処置を加えない菌に SM を作用させた場合の耐性菌の分布 (振盪実験)

区分	SMの濃度	SMの濃度				
		0	1	10	100	1,000
N		1,056	0	0	0	0
B		1,816	0	0	0	0
B + G		2,038	0	0	0	0
B + P		1,888	0	0	0	0
N + SM		660	0	0	0	0
B + SM		1,460	0	0	0	0
B + G + SM (%)		1,608 (100.0)	185 (11.5)	99 (6.2)	56 (3.5)	23 (1.4)
B + P + SM		1,468	0	0	0	0

注: 1) 振盪前の菌液 (10 mg/ml を 10^5 倍希釈, 0.5 ml) の生菌数は 2,346 であった
 2) 数字は 3 枚の平板に認めた集落数の平均値 (以下表 10 まで同じ)
 3) 略符号
 N = 生塩水 (0.85%, pH 7.0)
 B = 磷酸緩衝液 (M/50, pH 7.0)
 G = ブドウ糖 (10^{-5} M/ml)
 P = 焦性ブドウ酸ソーダ (10^{-5} M/ml)

には、作用させない場合に比べて約 1/100 に減少していることは注意されねばならない。

実験 3b (蒸留水中に age した菌に SM を作用させた場合)

〔実験方法〕

Sauton 培地に 72 時間培養した鳥型菌の菌膜を滅菌蒸留水 (pH 6.2~6.4) (以下蒸留水と略) に浮べたまま 38°C に 24 時間静置して Starved and aged cell としたのち、蒸留水をもって菌液をつくり 3 回遠心洗浄し、それを 4°C に 12 時間静置し Resting cell として実験に供した。この場合の振盪には生塩水、緩衝液および後者に ATP または焦性ブドウ酸ソーダを加えた液を用いた。なお ATP は実験にさいしそのつど Ba 塩を Na 塩にかえ、Chamberland 型濾過器 L₃ で濾過滅菌した。

〔実験成績〕

このような条件では表 8 にかかげたように耐性菌の出現は認められない。

実験 3c (緩衝液中に age した菌に SM を作用させた場合)

緩衝液を用いて実験 3b と同様にして上記の鳥型菌を Starved and aged cell とし、さらに十分に洗浄して菌液を調製した。振盪には緩衝液およびこれに ATP またはグルタミン酸を単独にあるいは併用して添加した液を用いた。

緩衝液に ATP, グルタミン酸およびこの両者を添

表 8 蒸留水中に age した菌に SM を作用させた場合の耐性獲得の状況 (振盪実験)

区分	SMの濃度	0	1	10	100	1,000
N		856	0	0	0	0
B		1,120	0	0	0	0
B + A		1,710	0	0	0	0
B + P		1,290	0	0	0	0
N + SM		610	0	0	0	0
B + SM		976	0	0	0	0
B + A + SM		1,350	0	0	0	0
B + P + SM		1,188	0	0	0	0

注: 1) 振盪前の菌液 (10 mg/ml を 10⁵ 希釈, 0.5 ml) の生菌数は 1,980 であつた
 2) 略符号中 N, B は前表と同じ
 A = ATP (10⁻⁵ M/ml)
 P = 焦性ブドウ酸ソーダ (10⁻⁵ M/ml)

表 9 緩衝液中に age した菌に SM を作用させた場合の耐性菌の分布 (振盪実験)

区分	SMの濃度	0	1	10	100	1,000
B		1,160	0	0	0	0
B + A		1,400	0	0	0	0
B + GI		1,560	0	0	0	0
B + GI + A		1,920	0	0	0	0
B + SM		880	0	0	0	0
B + A + SM (%)		960 (100.0)	88 (9.2)	54 (5.6)	29 (3.0)	12 (1.3)
B + GI + SM (%)		1,060 (100.0)	111 (10.5)	52 (4.9)	37 (3.5)	9 (0.8)
B + GI + A + SM (%)		1,460 (100.0)	219 (14.8)	152 (10.5)	98 (6.6)	41 (2.8)

注: 1) 振盪前の菌液 (10 mg/ml を 10⁵ 希釈, 0.5 ml) の生菌数は 2,010 であつた
 2) GI = グルタミン酸 (10⁻⁵ M/ml), その他の略符号はすべて前記と同じ

加した場合にはいずれも表 9 に示す通り耐性菌が出現する。

つぎにこのような条件で出現した SM 耐性菌の耐性という性質が遺伝するか否かを以下のようにして検討した。

SM 100 γ/ml 平板培地に発生した集落をとり、緩衝液で菌液をつくり 2 回遠心洗浄し、この菌液の 0.5 ml (菌量は不明) を鶏卵卵黄加液体培地^{41) 42)} に接種、1 週間間隔で 3 代継代したのち、この培養の SM 耐性

表 10 緩衝液中に age した菌に SM を加え 38°C で 5 時間振盪後、えられた耐性菌の耐性の遺伝性 (SM 非添加培地に 3 代継代後の耐性度分布)

区分	SMの濃度	0	1	10	100
B + A + SM (%)		2,340 (100.0)	2,280 (97.4)	2,420 (103.4)	2,150 (91.9)
B + GI + SM (%)		2,230 (100.0)	2,250 (100.8)	2,190 (98.2)	2,210 (99.1)
B + GI + A + SM (%)		2,480 (100.0)	2,350 (94.8)	2,510 (101.2)	2,450 (98.8)

注: 略符号はすべて前記と同じ

度分布を前記の平板培養で検査した。その結果は表 10 に示すように SM 耐性はよく保持されている。

B) 増殖条件で SM を作用させた場合

この条件下での実験は一般に増殖抑制濃度以下の薬剤を菌に作用させて行われているが、この種の方法では後述のように結論をえることが困難であるので、私は単個菌培養法により以下の実験を行った。

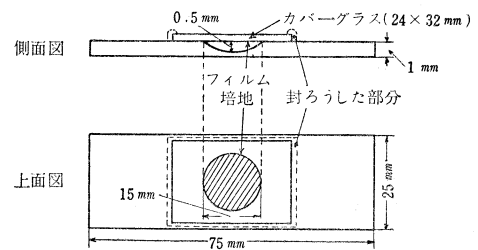
実験 4a (単個菌培養法に 2% Kirchner 寒天フィルム培地を用いた場合)

[実験方法]

使用菌株: グリセリン・ブイヨンに 72 時間表面培養をした前記の鳥型菌竹尾株 (感性株)。

培養法: 10% 家兎血清加 Kirchner 培地に SM を 1 ml 当り 0 (対照), 1, 2, 3, 4, 5, 10 γ あて添加し、さらに 2% の割合に寒天を加え、カバー・ガラスに型のごとくしてフィルム培地を作成し、図 1 のように膜面を下にしてホール・ガラスに固定し、次のように培

図 1 培養法



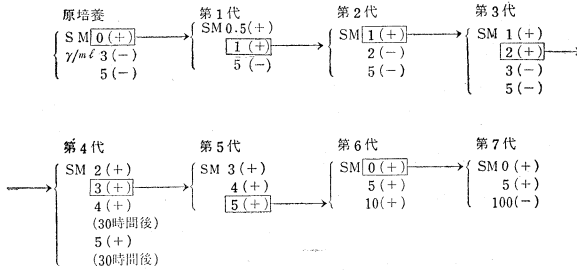
養した。上記の鳥型菌 (実験 2 a と同一の菌株) の 1 mg/ml の菌液を 5,000 r.p.m. 10 分間遠心し、その上清の 1 滴を SM 非添加フィルム培地 (対照培地) に接種して 18 時間培養後位相差顕微鏡で分裂増殖を確認した菌 (3~4 Generation の菌) を原培養菌として用いた。菌の移植にさいしては de Fonbrune の Micromanipulator で原培養菌の同一の Clone から 1~3 ヶあての菌を釣菌し、これらの菌を対照培地および SM 添加

培地に移植して18~20時間培養, この操作を繰返してSMを順次高濃度に増量添加したフィルム培地に継代培養を行った。なお菌の増殖の有無はすべて位相差顕微鏡を用いて, 特記しない限り18~20時間培養後に判定した。

〔実験成績〕

表11に示すように原培養菌をSM 1 γ/ml 培地からSM濃度を漸増的に増加した培地に順次継代培養を

表11 単個菌継代培養法によるSM耐性菌の出現状況



- 注: 1) 増殖の有無は特記しないかぎり18~20時間培養後に判定した
 2) □ の培養から次代へ移植した
 3) (+) は増殖す, (-) は増殖せず

図2 培養法

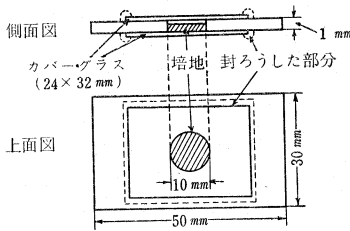
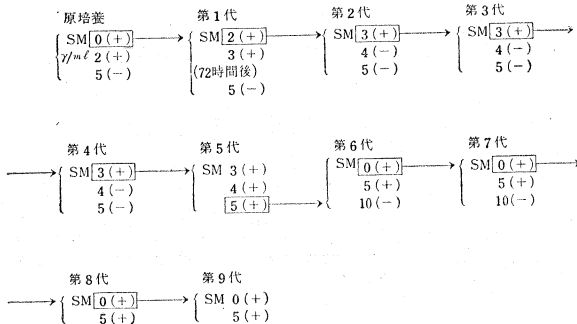


表12 単個菌継代培養法によるSM耐性菌の出現状況



- 注: 1) 培地には5~10 μ の菌よりなる菌集団を移植した
 2) 増殖の有無は特記しない限り48時間培養後に判定した
 3) □ の培養から次代へ移植した
 4) (+) 増殖す, (-) 増殖せず

行うことによつて, 継代第6代でSM 10 γ/ml 培地に増殖しうる菌が出現した。また継代第5代のSM 5 γ/ml 培地に増殖した菌を, 対照培地を1代通過させたが, この菌はなおSM 5 γ/ml の耐性を示した。

実験4b (単個菌培養法に2%グリセリン・ピヨン寒天培地を用いた場合)

〔実験方法〕

使用菌株は実験4aに同じ。培養は図2に示したように, 中央を打抜いたオブジェクト・ガラスに2%寒天加グリセリン・ピヨンで厚さ約0.5mmの培地を作成して実験4aと同様に行った。ただし本培地では前記のKirchner寒天フィルム培地に比して菌の増殖が不良であるので, 増殖の有無は培養48時間後に判定し, また継代培養には5~10 μ の菌よりなる菌集団を移植した。

〔実験成績〕

表12に示すように原培養菌はSM 2 γ/ml 培地に増殖しうるが, SM 5 γ/ml 培地には増殖しえない。対照培地に發育した1つのCloneから5~10 μ くらいの菌よりなる菌集団をとり, SM 2 γ/ml 培地から漸次SM濃度を増量した培地に順次継代培養を行ったのに, 継代の早期にはSM 5 γ/ml 培地に増殖しえなかつたCloneから継代5代目にはSM 5 γ/ml 培地に増殖しうる菌が出現した。なおSM 5 γ/ml 培地に一度増殖しえたCloneはその後3代にわたつて対照培地に継代しても, SM 5 γ/ml に対して耐性という性質を保持していた。

III 総括と考案

MycobacteriaのSM耐性菌の出現の機構についても緒言に述べた第1から第3までの仮説が考えられているが, 私は第2および第3の仮説を一括してSMがInducerとして作用する可能性の有無を検討すべく, 主として鳥型菌竹尾株を用いて非増殖条件あるいは増殖条件でSMを作用させた場合の耐性菌の出現を検索した。

非増殖条件で薬剤を作用させた場合に薬剤耐性菌の出現を認めたのはLinz et al. (20) (21), 横田 (45), 木下ら (44) 等であるが, 多くの人は否定的な成績をえている。私の実験ではDubos変法培地を用いて氷室(4°C)中で人型菌H₃₇Rv株とSMを接触させた場合には耐性菌の出現を認めたが, 氷室保存が長期にわたると生菌数が顕著に減少する成績をえた。ついで鳥型菌竹尾株の菌液にSMを加えて38°Cに静置した実験でも, 媒液が磷酸緩衝液の場合には耐性菌を認め, またこの実験で植菌5日後にSMを添加した場合にも同様な成績がえられた。さらに鳥型菌の菌液にSMを加えて38°Cで5時間振盪した実験でも媒液が磷酸緩衝液でブドウ糖, ATPまたはグルタミン酸を単独にあるいは併用して添加した場合には時として耐性菌がえられた。しかしながらこれらの実験ではSMを作用させた場合には生菌数が顕著に減少

する。

以上の一連の実験成績はある種の条件下では SM が Inducer として働き菌に SM 耐性という性質を与える可能性を示唆しているが、その後いろいろの条件でこの種の実験をしばしば繰返したところ、これらの成績は再現性に乏しく、結論をえることはきわめて困難であることが判明した。そこでなぜこの種の実験の成績が再現性に乏しいかを探究しようとして、以下のような実験を行った。

鳥型菌竹尾株の SM 感性菌と耐性菌 (1,000 γ/ml 以上) の洗浄菌をあらかじめ 10:1 の割合に混じて、これに SM を作用させたのに表 13 に示すように感性菌

表 13 SM 感性菌および耐性菌の混合菌液に SM を 100 γ/ml に加え 38°C で 3 時間振盪した場合の SM 耐性度分布

菌液の種類 耐性 検定濃度	S	S + SM	R	R + SM	S + R (10:1)	S + R + SM
0	4,070	62	2,520	2,150	3,040	144
1	0	0	2,510	2,210	152	165
10	0	0	2,593	2,785	253	176

- 注: 1) SM の濃度は γ/ml
 2) S = 感性菌, R = 耐性菌
 3) 数字は振盪した菌液 (10 mg/ml を 10^5 稀釈, 0.5 ml) を前記の平板培養した場合の発菌集落数
 4) 媒液は磷酸緩衝液 (M/15, pH 7.0)

では生菌数が顕著に減少するが、耐性菌では生菌数の減少はほとんど認められず、その結果耐性菌がほぼ 100% として証明されることが判明した。

したがってこの種の実験では感性菌に最初から耐性菌がごくわずかに混在していても、感性菌の生菌数が SM の作用によつて顕著に減少するため、耐性菌の占める割合が非常に拡大されて把握される可能性があり、前記の一連の実験成績は、用いた菌液にたまたま耐性菌がごくわずかに混在していた場合のみ耐性菌を高率に証明しえたとも解釈されることができ、SM の選択作用が混在する感性菌と耐性菌の生死 (増殖可能か否か) にまで及ぶことが常に考慮されねばならない。なお私は血清加 Kirchner 寒天フィルム培地あるいは磷酸緩衝液にグルタミン酸その他を添加したものに鳥型菌竹尾株のごく微量菌を接種し位相差顕微鏡下にその分裂を追求し、もつともよい条件下においても植菌後すくなくとも 5 時間は分裂がみられないことを観察したが、牛場およびその協同研究者^{16) 17)} が述べているように、非増殖条件といつても SM が感性菌に殺菌的に作用して、そのさい生じた死菌の菌体成分を栄養素とし、菌液中に最初から存在していた自然変異耐性菌が選択的に増殖するという可能性も否定しえない。それゆえこの種の実験では SM が Inducer として作用する可能性についての積極的な証明

とはならない。

つぎに耐性菌の出現に薬剤が Inducer として作用する可能性は、また増殖条件で薬剤の選択作用が及ばない増殖抑制濃度以下の薬剤を作用させて耐性菌が高率に出現するか否かによつて一般に検討されているが、このような実験条件では増殖抑制濃度以下の薬剤が菌と相互作用をもちうるか否か、また微量の薬剤が耐性菌に比して感性菌に多少とも強く障害的な影響を与えて培養が長期にわたると、そのような効果が蓄積してくる可能性があるのではないかと等についてあらかじめ十分検討することが必要であり、しかもこの検討はきわめて困難といわねばならない。

そこで私は増殖抑制濃度の SM を添加した培地に鳥型菌竹尾株のごく微量を継代培養した場合の SM 耐性菌の出現頻度を、この菌株の SM 耐性菌の突然変異率から期待されるそれと比較することによつて SM が耐性菌の出現に Inducer として働く可能性を検討し、上記の実験 4a と 4b に示したような成績をえた。これらの実験は再三繰返したが、継代 5~7 代で SM 5 γ/ml あるいは 10 γ/ml 培地に増殖可能な Clone がほとんど常に出現し成績の再現性はきわめて強い。この菌株の SM 5 γ/ml 培地での突然変異率は堀教授¹⁸⁾ が発表しているように $1\sim 2 \times 10^{-5}$ であるから、前記の成績とこのことを考えあわせると低濃度の SM は Inducer として働き鳥型菌竹尾株の感性菌に SM 耐性 (低濃度の耐性) という性質を与えうると考えられる。

IV 結 語

Mycobacteria の SM 耐性菌の出現の機構について種々の実験を行い、つぎのような成績をえた。

A) 非増殖条件で SM を作用させた場合

1) Dubos 変法培地中で人型菌 H₃₇Rv 株と SM を接触させて 4°C に保存したのに、かなり高率に耐性菌を証明しえたが、期間の経過とともに生菌数が顕著に減少した。

2) 鳥型菌竹尾株の菌液に SM を添加して 38°C に静置したのに、媒液が磷酸緩衝液の場合には耐性菌を認め、さらにこの実験で植菌 5 日後に SM を添加しても同様な成績がえられた。また上記の菌液に SM を添加し 38°C で 5 時間振盪したのに媒液が磷酸緩衝液でブドウ糖, ATP またはグルタミン酸を単独にあるいは併用して添加した場合には耐性菌を高率に証明した。ただしいずれの実験でも SM を作用させた場合には生菌数が顕著に減少した。

3) 上記のような実験条件では、SM を作用させた場合に耐性菌では生菌数の減少はほとんど認められないのに感性菌では生菌数が顕著に減少するので耐性菌の占める割合が非常に拡大されて把握されうることを明らかにした。また非増殖条件といつても環境が増殖条件に転

換しうる可能性も否定できないので、これらの成績はSMが Inducer として作用する可能性の積極的な証明とはならない。

B) 増殖条件で SM を作用させた場合

鳥型菌竹尾株のごく微量菌を、増殖抑制濃度の SM を添加した培地に継代培養したのに、ほとんど常に耐性菌の出現を認めた。このことと上記の菌株の SM 5 γ /ml 培地での突然変異率とを考えあわせると低濃度の SM が Inducer として作用し、感性菌に SM 耐性(低濃度の耐性)という性質を獲得させる可能性を強く示している。

以上により私は Mycobacteria の SM 耐性獲得の機構としては、突然変異と SM の選択作用による以外に、低濃度の SM 耐性菌の出現には SM が Inducer として作用すると考えたい。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった堀三津夫教授に心から感謝し、また多年にわたり終始変らない御援助をいただいた庄司助教授以下研究室員諸氏に深甚の謝意を表します。

本論文の要旨は第 7 および 10 回日本結核病学会近畿地方会ならびに第 30 および 32 回日本結核病学会総会において報告した。

文 献

- 1) Demerec, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 31 : 16, 1945.
- 2) Demerec, M. : J. Bact., 56 : 63, 1948.
- 3) Demerec, M. : J. Clin. Invest., 28 : 891, 1949.
- 4) Klein, M., & Kimmelman, L.J. : J. Bact., 52 : 471, 1946.
- 5) Klein, M. : J. Bact., 53 : 463, 1947.
- 6) Luria, S.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61 : 46, 1946.
- 7) Luria, S.E. : Bact. Rev., 11 : 1, 1947.
- 8) Oakberg, E.F., & Luria, S.E. : Genetics, 32 : 249, 1947.
- 9) Newcombe, H.B., & Hawirko, R. : J. Bact., 57 : 565, 1949.
- 10) Newcombe, H.B., & Nyholm, M.H. : Genetics, 35 : 603, 1950.
- 11) Lederberg, J. : J. Bact., 59 : 211, 1950.
- 12) Lederberg, J., & Lederberg, E.M. : J. Bact., 63 : 399, 1952.
- 13) Cavalli, L.L., & Maccacaro, G.A. : Nature, 166 : 991, 1950.
- 14) 牛場大蔵・渡辺力 : 日本細菌学雑誌, 9 : 349, 昭29.
- 15) 渡辺力 : 日本細菌学雑誌, 10 : 231, 昭30.
- 16) 牛場大蔵・後藤敏夫・清水邦彦・渡口精吉・坂本光弘 : 結核, 30 : 648, 昭30.
- 17) 草間久子 : 結核, 33 : 260, 昭33.
- 18) 堀三津夫 : 第33回日本結核病学会総会特別講演, 昭33.
- 19) Linz, R. : Ann. Inst. Pasteur, 78 : 105, 1950.
- 20) Linz, R., et Lane, J. : Compt. rend. soc. biol., 143 : 577, 726, 1949.
- 21) Linz, R., Martin, L., et Lecocq, E. : Compt. rend. soc. biol., 143 : 728, 1949.
- 22) Gibson, M.I., & Gibson, F. : Nature, 167 : 113, 1951.
- 23) Eagle, H. : J. Exp. Med., 99 : 207, 1954.
- 24) Eagle, H. : J. Exp. Med., 100 : 103, 1954.
- 25) Eagle, H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 59 : 243, 1955.
- 26) Eagle, H., Fleischman, R., & Levy, M. : J. Bact., 63 : 623, 1952.
- 27) Yanagisawa, K., Kanai, K., Shiga, Y., & Ito, F. : Jap. Med. J., 4 : 99, 1951.
- 28) Kanai, K., Nakamoto, T., & Yanagisawa, K. : Jap. J. Med. Sci. and Biol., 6 : 365, 1953.
- 29) 金井興美 : 日本細菌学雑誌, 10 : 177, 昭30.
- 30) 秋葉朝一郎 : 細菌学の領域, 医学書院, 204~221, 昭28.
- 31) 横田健 : 日本細菌学雑誌, 10 : 317, 昭30.
- 32) 田中完巳 : 日本細菌学雑誌, 12 : 675, 昭32.
- 33) 君野徹二・都築敏男 : J. Antibiotics, Ser. B., 7 : 62, 89, 1954.
- 34) Hinshelwood, C.N. : The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Oxford Univ. Press, 40~128, 1946.
- 35) Hinshelwood, C.N. : Symposia of the Society for Experimental Biology, No. III., Academic Press, N.Y., 243~252, 1949.
- 36) Hinshelwood, C. : Nature, 166 : 1089, 1950.
- 37) Dean, A.C.R., & Hinshelwood, C. : Adaptation in Micro-organisms (Ed. by Gale, E.F. & Davies, R.), Cambridge Univ. Press., 21~45, 1953.
- 38) Sevag, M.G. : Advances in Enzymology, 6 : 33, 1946.
- 39) Sevag, M.G., & Rosanoff, E.I. : J. Bact., 63 : 243, 1952.
- 40) 喜多善治 : 奈良医学雑誌, 5(1) : 14, 昭29.
- 41) 片山正治 : 阪大医誌, 4(1) : 27, 昭26.
- 42) 片山正治 : 阪大医誌, 4(5・6) : 23, 昭27.
- 43) 横田健 : 日本細菌学雑誌, 10 : 261, 419, 509, 昭30.
- 44) 木下嘉一・佐々木彰・木村芳雄・清野嘉久彌 : 日本細菌学雑誌, 11 : 27, 昭31.