

## Mycobacterium 607 株におけるストレプトマイシン低濃度耐性出現の機序

氏 家 淳 雄

慶応義塾大学医学部細菌学教室

受付 昭和 33 年 12 月 25 日

## 緒 言

薬剤耐性菌が出現する機序は Luria ら<sup>1)</sup>による fluctuation test, Newcome<sup>2)</sup>による phagespray 法, それに Lederberg ら<sup>3)</sup>の replica plating 法および transduction, transformation 等の方法により mutation and selection の機序の存在することが証明されているが, これらの実験は主に高濃度に出現する耐性菌について行われている。しかしながら薬剤の低濃度に出現するいわゆる耐性菌の起源についてはなお多くの疑問があるゆえ, この点に関し Mycobacterium 607 株とストレプトマイシンとについて行つた実験成績を報告する。

## 実 験 材 料

菌株: 当教室保存の M. 607 株で数年前予研から分与されたもの。通常 0.1% Tween 80 含有キルヒナー液体培地で 37°C 2 日間培養した菌液を使用した。

薬剤: 硫酸ジヒドロストレプトマイシン (明治) を用いた。

培地: キルヒナー培地, ただし血清を含まず 0.1% の割合に Tween 80 (関東化学) を含み, 寒天培地のときは 1.5% に粉末寒天を加え, とくとして 20 万倍にマラカイト緑を入れて使用した。

## 実 験 方 法

## 1. M. 607 株の耐性分布

キルヒナー液体培地 2 日培養菌液を 10 倍階段希釈し, それぞれの希釈菌液 0.1 ml をキルヒナーの液体培地, 寒天平板培地, 寒天斜面培地および比較として 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 含有小川培地に接種した。平板培地は使用直前 37°C で 60~90 分乾燥し, 斜面培地は作製後 3 日間横にして 37°C の孵卵器で乾燥して凝固水の消失せるのちに使用した。

1% 小川培地のストレプトマイシン量は相当濃度の 2 倍を含有させて作製した。

## 2. 不完全発育阻止濃度に発育した集落の検討

a) ストレプトマイシン (以下 SM) 含有平板に発育した集落を同じ濃度を含む平板に累代して発育するか否かをみた。集落が大きくなると Tween 80 が 0.1% 含有していても菌が平等に塗抹できないゆえ, 前日また

は当日にはじめて認められた径 0.5 mm 以下の小集落を選び, これを白金耳に取り新しい同濃度薬剤を含む平板の 1 区画によくなすりつけ, 次に隣接部の無菌地帯にそのまま軽く 1 回塗抹した。便宜上前者を大量菌接種, 後者を少量菌接種とみなして区別した。この方法は一度に多数の例を同じ条件で検するために行つた簡便法である。

b) 同様に発育した 0.5 mm 前後の集落より菌液を作り, これを 10 倍階段希釈を行つて各希釈液について, その 0.1 ml または所定の 1 白金耳をキルヒナー寒天平板に接種して耐性分布をみた。

## 3. レプリカ平板法による検討

薬剤を含まぬ寒天平板に 10 倍階段希釈せる各希釈菌液を接種して親平板とし, 24~36 時間 37°C で培養後薬剤含有の同培地にレプリカを通常の方法で行い<sup>4)~5)</sup>, 親平板はその後集落がみうるまで培養して氷室に保存しておく。レプリカ平板に発育せる集落に相当する集落を親平板より分離して, これをキルヒナー液体培地に接種して培養した菌液について, またはそのまま菌液を作つて前述のごとくして耐性を検討した。相当する集落を取りえないときは, 相当する菌苔を約径 2~3 mm の範囲内で菌液を作りそのまま耐性をみるか, またはさらにレプリカ平板法をくり返して相当する集落を分離して耐性を検討した。

## 4. 耐性株と感受性原株との混合培養

感受性原株の 2 日培養菌液の 10<sup>-1</sup> 希釈菌液 0.2 ml と耐性株の 2 日培養菌液の 10<sup>-4</sup> 希釈菌液 0.2 ml とをそれぞれの SM 濃度を含むキルヒナー液体培地に全量が 5 ml になるように調整して混合培養した。対照として感受性原株のみ, および耐性株のみ培養し, それぞれ比色計にて濁濁度を求めて比較した。(日立製 EPO-B 型, フィルターは No. 45, 波長 450 m $\mu$  を使用) このとき使用した耐性株は SM 0.25  $\gamma$ /ml 含有平板にて感受性原株より one step に分離したもので, キルヒナー寒天平板培地による耐性分布は SM 0.25  $\gamma$ /ml に対し完全耐性を示したものである。使用せる培養の中試験管はあらかじめ色素液を一定量入れて色素液の高さおよび比色度の大体同じ値を示したものを選んだ。値は 2 本の平均値である。

## 実 験 成 績

1. M. 607 株の耐性分布

表 1, 図 1 より SM 0.1~1  $\gamma/ml$  までの間が不完全発育阻止濃度である。しかして使用せるキルヒナー寒天培地は小川培地と比べ発育悪く不完全で生菌数において  $\frac{1}{10}$  以上少ない。

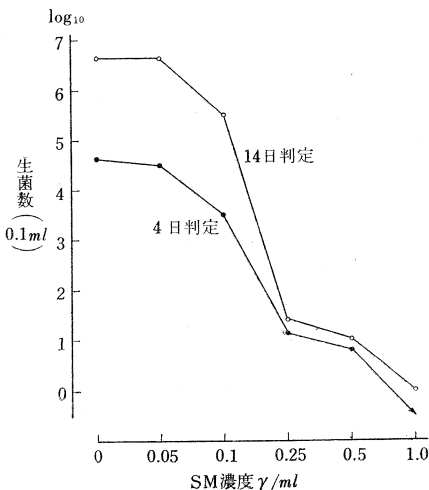
図 1 より 0.25~1  $\gamma/ml$  濃度に発育せる 集落数は培養日数が長くなつても著変ないが, 0~0.1  $\gamma/ml$  濃度においては培養日数の増加につれて集落数の増加がみられる。

表 1 M. 607 株の SM 耐性分布 (8日判定)

培地	菌量 (0.1 ml)	SM 濃度 $\gamma/ml$						
		0	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0
キルヒナー斜面培地	原液	+	+	+	+	+	30	•
	-1	+	+	+	+	8	2	•
	-2	+	+	+	+	1	•	•
	-3	+	+	+	+	•	•	•
	-4	+	+	+	+	•	•	•
	-5	3	1	3	2	•	•	•
	-6	•	•	•	•	•	•	•
	-7	•	•	•	•	•	•	•
小川培地	原液	+	+	+	+	+	+	+
	-1	+	+	+	+	+	+	8
	-2	+	+	+	+	+	+	2
	-3	+	+	+	+	+	+	•
	-4	+	+	+	+	+	+	22
	-5	27	30	30	35	26	2	•
	-6	5	•	1	2	1	1	•
	-7	•	•	•	•	•	•	•

キルヒナー液体培地 2 日菌液を原液とす。菌量の数字は 10 の指数で以下これに準ず

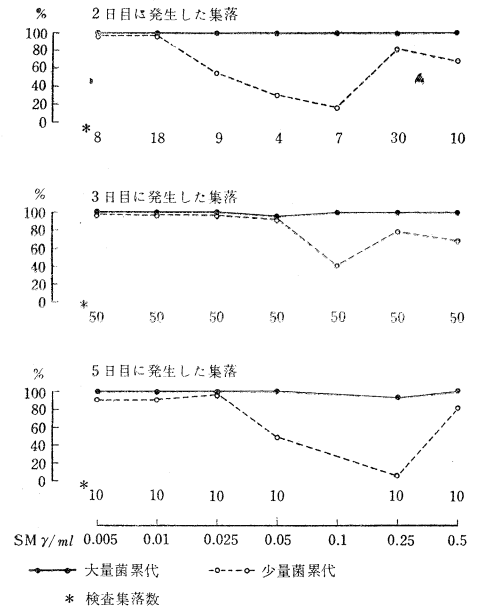
図 1 M. 607 株のキルヒナー寒天平板における SM 耐性分布



2. 不完全発育阻止濃度に発育した集落の検討

a) 図 2 は前述の簡便法によるもので集落を発生した培養日数で区別して比較したものである。実験方法の項で述べた, いわゆる大量菌接種の場合はほとんど 100% に累代できるが少量菌の場合は必ずしも累代できず, 2 日目および 3 日目発生集落は 0.1  $\gamma/ml$ , 5 日目発生集落は 0.25  $\gamma/ml$  がもつとも累代しえないものが多かつた。しかし薬剤濃度が高度になると再び少量菌接種でも累代しうるものが多くなっている。

図 2 SM 低濃度発育集落を同濃度平板に累代せるときの移植率 (3日判定)



b) 不完全発育阻止濃度に発育した集落の耐性分布検討の結果は表 2 より 0.1  $\gamma/ml$  で分離した集落では 5 日目, 14 日目分離集落ともに対照と大差なく 0.1  $\gamma/ml$  に対し不完全耐性分布を示す。

0.25  $\gamma/ml$  での分離集落も 4 日目, 8 日目, 9 日目ともに不完全耐性を示している。0.5  $\gamma/ml$  での分離集落は 5 日目分離したものに, その濃度に対してはほぼ完全耐性を示すもののみみられたが, 4 日目, 8 日目, 9 日目に分離したものはともに不完全耐性を示している。

M. 607 株は Tween 含有キルヒナー液体培地の 2 日培養菌液でも小さい菌塊をなし 2~3 コが約 30%, 4~10 コが 40% もあり単個菌と思われるものは 20% 以下である。それで No. 131 東洋濾紙で濾過した菌液を接種して得た集落について耐性分布をみる実験を行った。濾過すると単個菌と思われるものが 50~70% くらいになり残りが 2~3 コで, 4 コ以上の塊りはほとんどみられない。濾過から接種まで氷で菌液および稀釈液を冷して, 菌が互いに凝集するのを防いで実験した。

表2 SM 低濃度発育集落の耐性分布 (8日判定)

分離条件		菌量 (1白金耳)	SM 濃度 $\gamma/ml$			
薬剤	日数		0	0.1	0.25	0.5
0	4	0	+	+	.	.
		-1	+	+	.	.
		-2	2	.	.	.
	9	0	+	+	.	.
		-1	+	.	.	.
		-2	+	.	.	.
0.1	5	0	20	3	.	.
		-1	2	.	.	.
		-2	.	.	.	.
	14	0	+	+	.	.
		-1	+	+	.	.
		-2	+	3	.	.
0.25	4	0	+	+	+	+
		-1	+	+	+	+
		-2	+	3	.	.
	8	0	+	+	+	.
		-1	+	+	.	.
		-2	+	+	.	.
	9	0	+	+	+	+
		-1	+	+	+	+
		-2	+	+	1	.
0.5	4	0	+	+	+	+
		-1	1	.	.	.
		-2	.	.	.	.
	5	0	+	+	+	+
		-1	+	+	+	+
		-2	1	.	.	.
	8	0	+	+	+	+
		-1	+	+	+	.
		-2	+	+	.	.
	9	0	+	+	+	+
		-1	+	+	+	.
		-2	+	32	.	.
	9	0	+	+	+	+
		-1	+	+	13	11
		-2	+	+	2	.

かくすると表3に示すように、0.1  $\gamma/ml$  濃度で分離した集落でも早期に出現するものは完全耐性を示し、遅く出現したものでは不完全耐性を示す成績である。0.25  $\gamma/ml$  分離集落にては5日目出現せる集落の2株は完全耐性を示し、1株は不完全耐性を示しているが12日

目出現集落はともに不完全耐性を示している。

早期出現集落に完全耐性菌が多く、遅く出現する集落に不完全耐性を示すものが多いという傾向がこの表よりみることができる。

3. レプリカ平板法による検討

表4は分離した集落を同じキルヒナー液体培地で2日間培養し、その菌液の1滴を同寒天平板に滴下して耐性をみたもので、ただ1回のレプリカ法で採取した集落にははつきりと耐性が対照より高いといえるものはみられない。しかし1回のレプリカ平板法で集落として分離しえない場合、さらに相当する菌苔で菌液を作り再びレプリカを行うと、明らかに耐性を示す集落を得ることができる。しかしかくのごとく濃縮して得た集落でも、なんら対照と変らない耐性を示すものが多くみられる。

表5は親平板の集落が多くて相当する集落を分離しえないので、相当する部分の菌苔で菌液を作りそのまま直接に耐性分布をみた結果である。この場合は多くの clone をあわしての耐性検査である。

1  $\gamma/ml$  に発育した集落に相当する菌苔には natural mutants が混在していると思われる。また0.5  $\gamma/ml$  の4日目、9日目発育集落に相当する菌苔にも、かかる mutants が混在していると思われる。しかしこの場合も対照と大差ない耐性を示し、mutants 由来の clone の混在をみとめえないものが多くみられる。早期に分離しうる菌苔にかかる mutants の混在を示すのが多いか否かは不明である。

4. 耐性株と感受性原株との混合培養

耐性菌が発育することによつて阻制的な薬剤濃度内でも感受性菌が発育して不完全耐性を示すようになることも考えられるゆえに行つたものである。

図3の48時間培養後判定では0.16  $\gamma/ml$  および0.25  $\gamma/ml$  濃度培養は耐性菌のみの培養および感受性菌のみの培養でほとんど濁濁を示さないのに混合培養では濁濁を示している。

混合した耐性菌は生菌数  $1.1 \times 10^8$  コで48時間培養ではほとんど濁濁を示さない菌量である。

このことは耐性菌単独培養の成績からいえることである。すなわちこの場合感受性菌とともに発育せることを思わせる。

72時間後判定にても混合培養は他に比して高い値を示している。

考 案

低濃度の SM に発育した M. 607 の集落からただちに菌液を作り耐性分布をみると感受性の population を含む不完全耐性を示すものが多く、ときにはなんら感受性原株と変らないものもある。レプリカ平板法で相当

表 3 SM 低濃度発育集落の耐性分布 (8日判定)

No. 131 東洋濾紙にて濾過した菌液を接種した場合

分離条件		菌量 (0.1ml)	SM 濃度 $\gamma/ml$		
薬剤	日数		0	0.1	0.25
0	5	0	+	+	.
		-1	+	7	.
		-2	.	.	.
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	+	.	.
-2		.	.	.	
-3		.	.	.	
0.1	5	0	+	+	.
		-1	+	+	.
		-2	10	6	.
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	+	.	.
-2		19	.	.	
-3		.	.	.	
0.25	5	0	+	+	+
		-1	+	+	+
		-2	.	.	.
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	+	+	.
-2		7	.	.	
-3		.	.	.	

分離条件		菌量 (1白金耳)	SM 濃度 $\gamma/ml$		
薬剤	日数		0	0.1	0.25
0	5	0	+	+	.
		-1	19	.	.
		-2	.	.	.
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	+	.	.
-2		7	.	.	
-3		.	.	.	
0.1	5	0	+	+	.
		-1	+	+	.
		-2	.	.	.
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	1	.	.
-2		.	.	.	
-3		.	.	.	
0.25	5	0	+	+	+
		-1	+	+	+
		-2	1	1	8
		-3	.	.	.
	12	0	+	+	.
		-1	+	.	.
-2		4	.	.	
-3		.	.	.	

する集落または菌苔を親平板より分離して耐性を検討してもなら感受性原株と変らないものが多くみられる。

これらの成績よりかかる不完全耐性集落は natural mutant のみから由来したとは考えられない。すなわち低濃度 SM において、菌群の示す見かけ上の耐性現象にはいわゆる生理的分布 (physiological distribution) が考えられねばならない。それが生じる理由としては種々考えられようが、そのうちの主なものは以下のように解釈できよう。

その1つは M. 607 は Tween 80 を含有した液体培地で培養しても単個菌からなる菌液を作りにくく、4~10 コの菌塊を成しているものが 40% も占めていることである。

薬剤が感受性 population に対し殺菌的でなく静菌的に作用している濃度においてははじめに耐性菌または適応せる菌が増殖して、その代謝が増すにつれ今まで静止していた感受性菌が発育してきて不完全耐性を示す集落を形成することが考えられる。

この場合耐性菌がはじめに発育することにより薬剤を中和する物質が産生されるとか、pH が変つて薬剤の作用が弱くなるとか、薬剤によつて中断された必須代謝産物が産生されるとか、37°C に培養することにより薬剤が不活化されるとか、いろいろ考えられることである。以上のうちで pH がもつとも考慮されやすいが、キルヒナー液体培地でこの M. 607 株を培養し、2日目、4日目、6日目にその遠心上清の pH をガラス電極で測定しても少しの変動も示さなかつた。しかし寒天平板培地では方法として困難であるゆえに検討はしていない。その他、菌が発育してその密度が大となれば薬剤量が一定であるため、1 コ当りの菌に対する薬剤の作用力が違うようになることも考えられる。

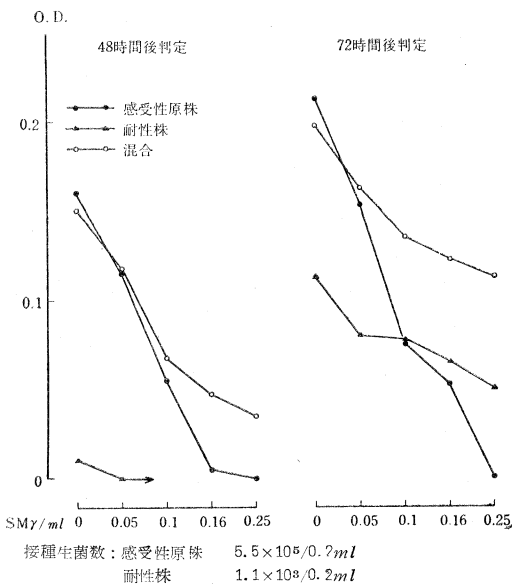
なるべく単個菌のみによる実験に近づけようとして行つた試みの成績が表 2, 3 に示されている。いま両表を比較すると濾過菌液を接種して発育した集落は単個菌に由来するものが多いためか、完全耐性を示すものが多く認められ、とくに早期出現の集落にかかる傾向がみられ

表4 レプリカ平板法で分離せる集落の SM 耐性 (無薬剤キルヒナー液体培地に2日培養後測定)

分離条件		SM 濃度 $\gamma/ml$				
方法	薬剤	0	0.1	0.25	0.5	1.0
直接分離	0.1	+	+	+	20	0
		+	+	+	6	0
	0.25	+	+	+	7	0
		+	+	+	38	0
1 回濃縮後分離	0.25	+	+	+	+	28
		+	+	+	17	0
	0.5	+	+	+	20	0
		+	+	+	0	0
	1.0	+	+	+	+	+
		+	+	+	50	0
対照	0	+	+	+	0	0

菌量は 2 日菌液の 1 滴

図3 混合培養における耐性株の影響



る。このことより不完全耐性集落が感受性菌を含む数々の clone の集りであることが推定される。

耐性菌の発育することにより感受性菌も発育してくるのでないかという証明は寒天平板には困難であるゆえ、液体培地で感受性菌と耐性菌とを混合培養した成績が図3に示してある。48時間培養ではほとんど溷濁度に影響しない少数の耐性菌でも、混合すると発育溷濁を

表5 レプリカ平板法で採取した菌苔の直接 SM 耐性分布測定

分離条件		菌量 (1白金耳)	SM 濃度 $\gamma/ml$				
薬剤	日数		0	0.1	0.25	0.5	1.0
0	3	0	+	+	+	1	•
		-1	+	+	1	•	•
		-2	+	+	•	•	•
	6	-3	+	+	•	•	•
		0	+	+	+	•	•
		-1	+	+	9	•	•
0.25	3	-2	+	60	1	•	•
		-3	7	3	•	•	•
		0	+	+	27	3	•
	6	-1	+	+	•	•	•
		-2	+	34	•	•	•
		-3	20	3	•	•	•
8	0	+	+	•	•	•	
	-1	29	10	•	•	•	
	-2	•	•	•	•	•	
0.5	3	-3	+	+	•	•	•
		0	+	+	1	•	•
		-1	+	+	•	•	•
	4	-2	+	+	•	•	•
		-3	31	65	•	•	•
		0	+	+	+	30	•
9	-1	+	+	6	•	•	
	-2	+	+	•	•	•	
	-3	4	28	•	•	•	
1.0	5	0	+	+	17	16	5
		-1	+	+	•	•	•
		-2	+	+	•	•	•
-3	26	54	•	•	•		

早く強く示してくる。これは感受性 population の発育が許されなければ得られない結果と思われる、72時間培養でもほぼ同様な結果であった。しかしもちろん、このような感受性菌と耐性菌との相互作用を考えなくとも、それ以外の機序で完全に感受性である菌体自身が "physiological distribution" を示すという可能性も否定し

えないであろう。

## 結 論

0.1 % Tween 80 含有 キルヒナー寒天平板培地における M. 607 株の SM 低濃度に発育した集落の耐性分布およびレプリカ平板法によつて分離した SM 低濃度発育集落に相当する集落または菌苔の耐性分布の検討より、低濃度 SM に発育した菌の中には natural mutants の存在することを確認すると同時に、かかる低濃度においては分離 SM 濃度に対し不完全耐性を示す集落を多く認め、ときには感受性原株と変らない耐性を示すものもみられた。

すなわちいわゆる生理的分布 ("physiological distribution") の存在が考慮されるべきこと、またこの現象が存在する薬剤濃度の範囲が、一応本菌株と SM との関係について示された。同時にこの現象が生ずる理由に

ついて 1, 2 の実験に基づく考察がなされた。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を戴いた牛場大蔵教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の要旨は第 33 回日本結核病学会において発表した。

## 文 献

- 1) Luria, S.E. & Delbrück, M. : Genetics, 28 : 491, 1943.
- 2) Newcombe, H.B. : Nature, 164 : 150, 1949.
- 3) Lederberg, J. & Lederberg, E.M. : J. Bact., 63 : 399, 1952.
- 4) 牛場大蔵 : 日本臨床, 14 : 624, 昭31.
- 5) Ushiba, D., Hsu, Y. & Fukazawa, T. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 841, 1957.