

# ミコバクテリウムの特殊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

## 5. ミコバクテリウム菌液中の自然抵抗性の強い菌体の SM, INH に 対する抵抗性およびそのような菌体における耐性の出現

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

結核菌の薬剤耐性獲得機作の説明に関しては周知のごとく一般分裂菌のそれと同様に対立する2説がある。すなわち突然変異・薬剤選択 (spontaneous mutation and selection) によるとする説<sup>1)~3)</sup>, および適応ないし誘導変異 (adaptation or induced mutation) によるとする説<sup>4)~6)</sup> がそれであるが, これらいずれの説によつても今日なお解答は得られず, むしろ混乱の感があり, 研究者の中には両説を折衷して上記両機作によつて耐性が獲得されるのではないかと説く者<sup>7)~9)</sup> もある現状である。ことに一般分裂菌たとえば大腸菌<sup>10)</sup>, あるいは腸炎菌<sup>11)</sup> を使つて得た実験成績と, ミコバクテリウム (以下「 $\text{M}$ 」と略) を用いて得たそれとを同列に論じたり批判することが一層この問題の解決を混乱させているのではないかと考えられる。既述<sup>12)</sup>のごとく「 $\text{M}$ 」はその発育様式については抵抗性が一般分裂菌とは顕著に相違するのであるから, その耐性獲得についても当然別個の立場からする考察が試みられるべきであろう。

著者は前 1, 2, 3 および 4 編において「 $\text{M}$ 」の酸・アルカリ, 消毒剤, 熱, および抗結核剤に対する自然抵抗性について検討した結果, それぞれの場合多少の差異はあつたが, いずれの場合においても「 $\text{M}$ 」の菌液が分裂菌のそれとは異なつた特殊な抵抗性を示し, とくに「 $\text{M}$ 」菌液中には常に自然抵抗性の強い少数の菌体が含まれていることを明らかにするとともに, このような菌体は「 $\text{M}$ 」の発育のある段階における特殊な構造の菌体であろうと考察した。しかも上記抗結核剤, たとえばジヒドロストربت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) の影響に耐えて感性のまま生残した菌体は, それらの薬剤を含む培養基中でやがて再発育し, 同時に耐性を示した事実を鑑み, 「 $\text{M}$ 」における耐性発現の問題はその特殊な発育様式についてはそのある段階の特殊な構造の菌体の存在を無視して考えるわけにはゆかない。換言すれば抗結核剤に

抵抗して生残する感性菌体もまた酸・アルカリ, 消毒剤, 熱等に抵抗して生残する菌体と同様に, とくに自然抵抗性の強い菌体であろうと考え, 本編においてはこの点を直接立証すべく, 一般的影響たとえば熱あるいは酸・アルカリに耐えて生残した菌体がはたして抗結核剤の影響に対してどのような態度を示すかを検討し, 他方また SM の影響に耐えて生残した感性菌体は INH に対してどのような態度を示すか等の点について直接吟味した。

### 材 料

〔供試菌〕 人型結核菌 H37Rv 株, 牛型結核菌牛 1 号株および鳥型結核菌鳥京株。

〔菌液〕 上記「 $\text{M}$ 」をグリセリンパイオンに 37°C 11~14 日間培養した菌膜を濾紙で脱水後瑪瑙乳鉢で丁寧に磨碎して下記のごとくに調製した。

#### 〔実験その 1〕 熱, 酸, あるいはアルカリの影響に耐えて生残した菌体の SM に対する抵抗性

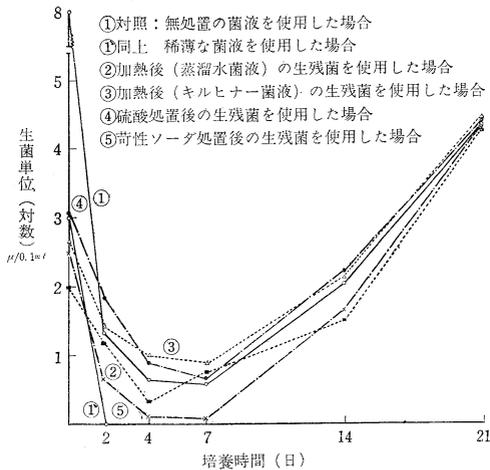
〔方法その 1〕 鳥京株の 100 mg/ml の蒸溜水およびキルヒナー浮游液を作り, 10 ml 宛試験管に分注し, 菌塊を除くために室温 (18°C) に 30 分間放置したのち, 各菌液についてその上清部を 5 ml とつて別の試験管に移し, 55°C 30 分加熱後遠沈し, 沈渣を SM 10,000  $\gamma$ /ml 加キルヒナー液 20 ml に混和し, 37°C における抵抗ないしは発育曲線をしらべた。すなわち 100 ml 容量の三角コルベンを用いあらかじめ磨碎用硝子玉を入れておき, 2, 4, 7, 14 および 21 日後に強く振盪してからその 2 ml を取出し, 遠沈洗滌 (蒸溜水) を 3 回繰返し, 最後に 2 ml の蒸溜水菌液となし, 0.1 ml を 3 本宛 SM を含まない卵培養基に培養し 6 週後にそれぞれ培養基 3 本についての発育集落数の平均値を求めた。

〔方法その 2〕 方法その 1 と同様にして作つた鳥京株の蒸溜水菌液を 2.5 ml 宛試験管にとり, それに 4 規定硫酸 (約 10.8%) あるいは 4 規定苛性ソーダ (約 16%) 2.5 ml をそれぞれ混和して室温に 30 分間放置後,

遠洗洗滌(蒸溜水)を3回繰返した沈渣を、SM 10,000  $\gamma/ml$  加キルヒナー液 20 ml に混和し、上記同様に 37°C における抵抗ないしは発育曲線をしらべた。

上述の方法によつて得た結果を図1に示した。同図の①は対照であつて2日後にはその菌数はきわめて急激に減少し4~7日後に最低値を示し、のち再発育を開始した。また対照①は下記各種の影響を受けた菌液と近似の濃度であつたが、このような濃度の菌は2日後にはすでに生菌をとどめず、以後の経過においても再発育は認めなかつた。しかるに対照①と同じ濃度の菌液をあらかじめ熱、酸、あるいはアルカリにて処置したのちには、

図1 熱および酸・アルカリに耐えて生残した菌体の SM 10,000  $\gamma/ml$  加キルヒナー液中における発育曲線(鳥京株)



その生残菌数は概略対照①に近いものであつたが、これら各種の前処置に耐えた菌液は、SM含有メヂウムに移された場合には対照①のごとく2日後に死滅しつくすことなく、ほぼ4~7日後に少数の生残菌を保持し、この生残した菌体は7日以後にやや急速に増殖を再開した。このことは熱、酸、あるいはアルカリに抵抗を示す菌体と、SMに感性のまま抵抗性を示す菌体とは、ともに菌液中の概略同じ一定少数の菌体であることを考えしめた。

#### 〔実験その2〕酸またはSMの影響に耐えて生残した菌体のINHに対する抵抗性

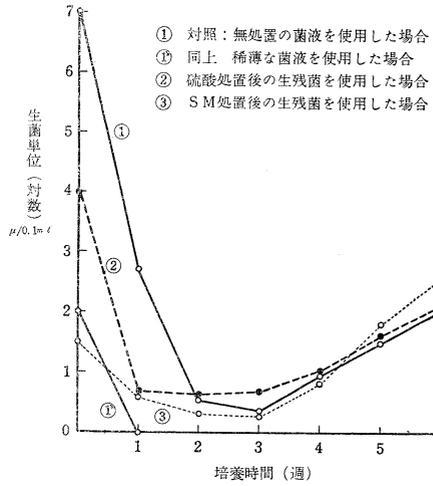
〔方法その1〕 上述と同じ方法で作つた H37Rv 株および牛1号株の菌液 2.5 ml を、2 規定硫酸(約 5.4%) 2.5 ml に混和し、室温に 60 分放置後、遠洗洗滌した沈渣を INH 100  $\gamma/ml$  加キルヒナー液 20 ml に混和し、上記同様にして INH に対する抵抗ないしは発育曲線をしらべた。

〔方法その2〕 上記 H37Rv 株および牛1号株の菌液 2.5 ml を、SM 2,000  $\gamma/ml$  キルヒナー液 2.5 ml に

混和し、37°C 2 日間接触後遠洗洗滌し、沈渣を INH 100  $\gamma/ml$  加キルヒナー液 20 ml に混和し、上記同様に抵抗ないしは発育曲線をしらべた。

その成績は図2のごとく、対照すなわち無処置の菌は、対照①濃厚菌液の場合は1~2週の間経過中にその菌数の減少がきわめて顕著であつて、2~3週の間経過中に最低値を示し、その後徐々に増殖を再開した。また①

図2 硫酸およびSMに耐えて生残した菌体の INH 100  $\gamma/ml$  加キルヒナー液中における発育曲線(H37Rv株)



稀薄な菌液の場合は1週後に死滅しつくし、以後の経過中にも再発育は認められなかつた。しかるに硫酸処置後の菌液②およびSM処置後の菌液④は、ともに対照①に比較すればやや稀薄な菌液であつたにもかかわらず対照①のごとき経過をとらず、むしろ対照①に近似した経過を辿つた。すなわち硫酸あるいはSMによる前処置に耐えて生残した菌体中には、それに引続くところのINHの影響にもまたよく抵抗する菌体が多いことを知つた。

因みに、前第4編において述べた方法に準じて、図2の①、②および③の菌について、1, 2, 3, 4, 5 および 6 週後の菌(集落)を各2コ宛菌して、それぞれSM 100  $\gamma$ , 1,000  $\gamma/ml$  および INH 100  $\gamma/ml$  加 0.05% Tween 80 加キルヒナー液中での発育曲線を光電比濁計によつてしらべて各薬剤に対する耐性の有無を検したところ、第4編においても観察したごとく、SMメヂウムにおいては1, 2, 3, 4, 5 および 6 週後のいずれの菌も発育せず依然として感性であつたが、INHメヂウムにおいては1週後の菌は感性であつたが2週以後の菌は耐性を示した。

#### 総括ならびに考案

〔ミ〕菌液に酸・アルカリ、消毒剤、熱等の一般的影

響、あるいは SM, INH 等の特異的な影響を加えると、両者いずれの場合においても、菌液中の大多数の菌体は死滅し、一定少数の菌体のみが強く抵抗して生残することはすでに第1, 2, 3および4編<sup>12)</sup>において報告したところであるが、上記のごとき一般的影響に耐えて生残した菌体が SM あるいは INH のごとき特異的影響に対してどのような抵抗性を示すか、また SM の影響に耐えて生残した菌体は INH に対してどのような態度を示すかについて検討した。まず熱、硫酸、あるいは苛性ソーダで前処置したのちの菌体を 37°C で SM 加キルヒナー液に接触させると、前処置後になお生残していた菌体は、対照（無処置）の菌の場合とは顕著に異なり、SM の影響を受けにくいということが分かった。このことは熱、酸・アルカリ等の一般的影響に抵抗して生残する菌体の中には、SM のごとき特異的影響に対してもまた強く抵抗して生残する菌体が多いことを示す。

同様に、硫酸前処置あるいは SM 前処置のいずれの場合においても、前処置後の菌液を INH に接触させると、この場合にもまた前処置後になお生残していた菌体は、INH の影響を受けにくく強く抵抗して感性のまま生残するものが多く、前第4編においてみたと同様に一定期間後に再発育を開始し、同時に耐性を示した。この事実は、INH 耐性菌となるべき菌体、すなわち INH に強く抵抗して感性のまま生残する菌体は、あらかじめ SM あるいは硫酸の前処置に耐えた菌体であることを示す。すなわち上記のごとき SM あるいは硫酸の前処置に耐えて生残した菌体の中には、INH を含む培養基に移された場合、耐性菌となるべき菌体が多いことを示すものである。したがって従来一般細菌についてではあるが、SM には mutagenic action があり<sup>13)</sup>、ことにそれが一般の chemical mutagen と同様に無方向な変異率を上昇せしめる作用があるという報告<sup>14) 15)</sup>があるが、このような作用のために SM 接触後の生残菌が INH によく抵抗するのではなく、そのような解釈を下す前に SM あるいは硫酸の前処置に耐えて生残した菌体中には、上記のごとき INH を含むメヂウムにおかれた場合、耐性菌となるべき自然抵抗性の強い感性菌体が多いという事実にもまず留意せられるべきであろう。著者は前第1～4編において、「ミ」菌液中には酸・アルカリ、熱、抗結核剤等の影響に対して常に特別に強い抵抗性を示す菌体が少数含まれていることを明らかにするとともに、このような菌体は、「ミ」の発育のある段階における特殊な一定構造をもつところの菌体であろうと考察したが、蓋し熱、酸・アルカリ等に強く抵抗して感性のまま生残した直後の感性菌体は、INH に対してもまた強く抵抗して感性のまま生残する菌体であることは明らかである。すなわち「ミ」の菌

液中には上記各種の一般的影響ならびに抗結核剤の特異的影響に対して、いずれの影響にも強い抵抗性を示す少数の菌体が含まれていることは明白である。このような特別な抵抗性を示す菌体は上述のごとく植田ら<sup>16) 17)</sup>が指摘した「ミ」のある発育段階において自然に形成される場所の特別な菌体であろうと考えるのがもつとも自然であろう。

SM あるいは INH の影響に耐えて単に生残しただけの菌体は、前編においても著者が明らかにし、最近笹野<sup>7)</sup>および金井<sup>8)</sup>によつても類似の所見が得られているごとく、SM あるいは INH に対して感性菌であつて、Demerec<sup>1)</sup>あるいは牛場・渡辺<sup>11)</sup>らが一般細菌について述べたところの突然変異説による耐性菌とは一致しない。また Lederberg & Lederberg<sup>18)</sup>はレプリカ法を考案して突然変異菌の存在を確証したかにみえたが、Lam & Sevag<sup>19)</sup>は SM に接触したことの無いレプリカ集落 (Microc. Pyogenes) と SM を含む培養基上のそれらの copies (sister colonies) とは生物学的性状が相違することを観察しているのは興味深い。蓋し、著者の得た上述の実験成績の範囲から考察するかぎり、「ミ」においては上述のごとき自然抵抗性の強い菌体がレプリカ法によつて SM 含有培養基に移植されて一定期間後に再発育をすると同時に耐性を獲得する可能性が考えられるということを顧慮すれば、レプリカ法の薬剤を含まない plate の copies (sister colonies) といえども、耐性菌であることを知るためには、薬剤を含む培養基に一定期間培養したのちに判定しなければならぬのであるから、その間にすでに薬剤の影響を受けていることを看過してはならないであろう。また仮りに他の観察方法によつて、一般細菌の菌体中にも上述「ミ」におけるごとき自然抵抗性の強い菌体に類似した多少とも抵抗性の強い菌体が存在すると仮定しても発育速度が速いために、「ミ」におけるごとき耐性出現の時間的關係を観察することが困難であろうし、またそれがゆゑに感性のまま抵抗して生残した菌体と、それから薬剤の影響下に発育して耐性菌となつたものとを1コの集落として同一に取扱い観察する結果は、あたかも耐性菌が当初から存在していたかのごとき誤つた判断をする危険があるかもしれない。Yegian & Vanderlinde<sup>3)</sup>は「ミ」の SM 耐性分布を量的に分析し、耐性変異菌なるものが当初から自然に存在し、それは薬剤の存在とは無関係に変異の過程によつて生ずるものであること、および多くの菌数が多ければその数も多く、同一の培養基から取つてもその数には変化があること、また観察時間を延長することによつてその数が増加することをみえたが、氏らのいう耐性変異菌は著者の場合、一般的な自然抵抗性の強い菌体の意味においてのみ、まさに薬剤の存在とは無関係に、原集団中に変異の過程においてではなく自然の発

育の過程において存在するところの菌体であつて、上記氏らのみたその他の条項についてもまたこの意味においてのみそのまま理解しうる。

上述した実験ならびに前第4編の成績からみると、SM あるいはINH を含む培養基において、上記のごとき自然抵抗性の強い菌体が、なんらかの機作によつておよそ第2週の経過中にそれぞれの薬剤に対する特異的な耐性を獲得するものであつて、耐性を獲得するにいたる出発点となる菌体、すなわち将来再発育して耐性菌となる菌体は、酸・アルカリ、熱等の一般的影響に対してもまたSM, INHのごとき特異的影響に対しても普遍的に強い抵抗性を示すところの菌体であろう。したがつて「ミ」の薬剤耐性獲得の機作の解明は、上記のごとき自然抵抗性の強い菌体が抗結核剤を含むメヂウムにおいて、およそ第1週末から第2週の間にかなる過程を経るものであろうかという問題に要約されるのではなからうか。そして「ミ」の発育過程中にこのような自然抵抗性の強い特別な菌体が自然に形成されるということが、この種の菌が上記のごとき薬剤に対して耐性を獲得しやすい根拠ではないかと考えられる。以上のように「ミ」の耐性獲得の過程とその拠りどころを「ミ」の特殊な発育様式、ひいてはその自然抵抗性に関連せしめて考察したのであるが、現今もつとも論議の多い耐性菌の population の問題について一言ふれる要があると思う。すでに前第4編において述べたごとく、いわゆる one step で抗結核剤、ことにSM 加キルヒナー液に形成された菌膜がさらにはるかに高濃度のメヂウムにも発育しうることを観察したが、その場合すべての菌体が一律に安定性のある高度耐性を有するとはかぎらないことは文献<sup>20)</sup>の示すところである。しかしながら各種程度に耐性を獲得した菌といえども、その発育様式は原株のそれと大差なきものと考えらるべきであるから、その発育過程においては感性菌の場合と同様に自然抵抗性の強い特殊な構造の菌体が存在するはずである。この場合、その一般的抵抗性が原株の場合のそれとどのように変わつていくかを知る資料は少なく、またそれが耐性とどのような結びつきにおいて表現されるかを知ることは今日われわれのもちあわせている方法手技では困難であるが、step wise にさらに高濃度の薬剤含有培養基に継代される場合にもまた上述同様の過程を繰返し、自然抵抗性の強い菌体が出発点となつて次第に高度かつ安定性ある耐性が獲得されてゆくであろうことが考えられる。しかしながらその立証のためには新しい方法の考案が必要であらう。

## 結 論

著者は、分裂菌とはその発育様式が基本的に異なる「ミ」の特殊な抵抗性を検討し、進んでその発育様式にそつて考察するとともに、このような特殊な自然抵抗性

が薬剤耐性獲得の拠りどころとしての意義に関して新しい知見を得た。

すなわち、「ミ」の菌液中には熱、酸・アルカリ等の一般的影響に対してはもとより、SM, INHのごとき特異的影響に対してもまた特別に強い抵抗性を示す少数の菌体が含まれており、このような菌体が抗結核剤、たとえばSM あるいはINH を含むメヂウムに一定期間おかれた場合、耐性菌となるべき菌体であろう。

このような自然抵抗性の強い菌体は、「ミ」に特有な発育様式にそつて考察するならば、そのある発育段階における特別な構造ないしは機能を有する菌体であろうと推断せしめる。そしてこのような菌体が存在するという事実こそこの種菌類が抗結核剤に対して耐性を獲得しやすい根拠ではないかと考える。

拙筆にあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師植田三郎教授に深謝し、上坂助教授はじめ大岩、和久田各君から本実験中にえづ御援助を得たことを付記して謝意を表する。

## 主 要 文 献

- 1) Demerec, M. : J. Bact., 56 : 63, 1948.
- 2) Klein, M. & Kimmelman, L.J. : J. Bact., 52 : 471, 1946.
- 3) Yegian, D. & Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 56 : 177, 1948.
- 4) Hinshelwood, C.N. : Symposia of the Society for Exptl. Biology., Academic Press, New York, 1949.
- 5) Linz, R. : Ann. Inst. Past., 78 : 105, 1950.
- 6) Sevag, M.G. & Rosanoff, E. I. : J. Bact., 63 : 243, 1952.
- 7) 旗野脩一 : 結核, 31 : 678, 昭31.
- 8) 金井興美 : 日本細菌学雑誌, 10 : 177, 昭30.
- 9) 堀三津夫 : 第33回日本結核病学会総会特別講演, 昭33.
- 10) 秋葉朝一郎 : Chemotherapy, 1 : 1, 1953.
- 11) 牛場大蔵・渡辺力 : 日本細菌学雑誌, 9 : 349, 昭29.
- 12) 山田修 : 結核, 34 : 614, 677, 749, 823, 昭34.
- 13) Linz, R. : Ann. Inst. Past., 76 : 250, 1949.
- 14) Newcome, H.B. & McGregor, J. : J. Bact., 62 : 537, 1951.
- 15) 横田健 : 日本細菌学雑誌, 10 : 651, 昭30.
- 16) 植田三郎 : 結核菌の研究 1. 形態及び発育様式 南江堂, 昭26 ; Rev. Tuberc., 19 : 984, 1955 ; 21 : 95, 1957.
- 17) 伊藤義昭 : 結核, 33 : 602, 昭33.

- 18) Lederberg, J. & Lederberg, E.M.; J. Bact., 63 : 399, 1952.
- 19) Gow, T. Lam & M.G. Sevag : J. Bact., 69 : 184, 1955.
- 20) R. Knox : Ciba Foundation Symposium on Drug Resistance in Micro-organisms, p. 241, 1957.