

人型結核菌の Sulfisoxazole 耐性獲得形式

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

交付 昭和 34 年 11 月 24 日

Demerec¹⁾ は *E. coli* および *M. pyogenes* var. *aureus* の penicillin 耐性および streptomycin (SM) 耐性獲得形式を研究し、この両抗菌物質に対する耐性獲得形式 (pattern of resistance development) が著しく異なることを観察した。すなわち、penicillin 高耐性菌は first-step selection では得られず、selection の step を重ねてはじめて高耐性菌が得られた。また、first-step selection で得られた first-step strains の耐性度はほぼ同一であった。一方、SM 高耐性菌は first-step selection ですでに原株中に認められ、さらに first-step strains の耐性度は種々であった。このような耐性獲得形式の差はその後 penicillin 型および SM 型とよばれている。

その後、Hsie and Bryson²⁾ および Bryson and Szybalski³⁾ は微生物の抗菌物質に対する耐性獲得形式を次の 3 つに分類することを提唱している。この分類は上記の penicillin 型および SM 型に an obligatory single-step pattern を加えたものである。

- (1) Multi-step pattern (penicillin 型)
- (2) Facultative single-step pattern (SM 型)
- (3) Obligatory single-step pattern

現在まで種々の菌株および種々の抗菌物質について耐性獲得形式の研究が行なわれているが、サルファ剤に関する研究はほとんどなく、とくに人型結核菌または *Mycobacterium* を材料としたものはまだ報告されていない。本報は人型結核菌のサルファ剤耐性獲得形式の研究を目的として行なつた。

また最近抗結核剤としてサルファ剤が臨床に適用されるにつれて、サルファ剤耐性の問題が注目される。これに関する問題の 1 つとして、サルファ剤中もつとも実用される頻度の高い sulfisoxazole と、最近注目されている持続性サルファ剤との交叉耐性の有無を人型結核菌を材料として検討してみる必要があると思われる。本報の第 2 の目的は、この交叉耐性の検討にある。

実験材料および方法

使用菌株は、人型結核菌 H₃₇Rv 株、培地は 1% 小川培地 (中試験管に 8 ml ずつ分注) を用いた。

sulfisoxazole (3, 4-dimethyl-5-sulfanilamido-isoxazole), sulfisomezole (5-methyl-3-sulfanilamido-

isoxazole), sulfadimethoxine (6-sulfanilamido-2, 4-dimethoxy-pyrimidine), sulfamethoxypyridazine (3-sulfanilamido-6-methoxy-pyridazine), sulfaphenazol (3-sulfanilamido-2-phenylpyrazole) はそれぞれ、塩野義、塩野義、山之内、日本レダリー、大日本の製品を使用し、いずれも苛性ソーダ液を滴加して 1 mg/ml 水溶液を作り、これを所期の濃度を得るように、培地に滅菌前に添加した。菌液の調製および接種は既報の渦巻白金耳法⁴⁾によつた。

(1) 耐性獲得形式の研究方法

H₃₇Rv 株の原株をガラス玉とともに 10 分間振盪したのち、生理的食塩水に浮遊して菌液を作り、さらにこれから 10 倍稀釈液を作つた。そのおのおのの稀釈液を種々の sulfisoxazole 濃度を含む培地系列に渦巻白金耳で 0.02 ml ずつ接種し、37°C 6 週培養後に集落数を算定した。この first-step selection で得た集落中の 1 コをとつて一たん薬剤なし培地で増菌し、これから菌液を作つてその population 構成を調べた。これすなわち first-step strain の population 構成となる。population 構成は種々の sulfisoxazole 濃度における survival ratios すなわち survival curve で示した。以下同様に次々と second-, third-, および forth-step selection を行なつた。

(2) 交叉耐性の研究方法

サルファ剤のごとく発育遅延的に作用する薬剤では接種生菌数の多少による耐性度測定値の変動かはなほだし^{5) 6)}。それで耐性度を可及的正確に測定して比較するために、対照培地 (薬剤なし培地) に 20~120 集落を与えるごとき small inocula 接種の条件で、37°C 4 週培養後に集落形成可能の最高濃度 (または最小発育阻止濃度) で耐性度を表わした。

実験成績および考察

(1) sulfisoxazole 耐性獲得形式

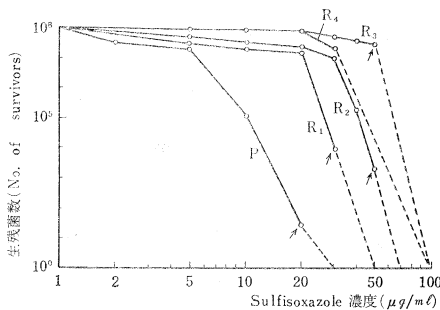
実験成績は図 1 に示した。sulfisoxazole 高耐性菌は first-step selection では得ることができず、selection step を重ねることにより、順次高耐性菌が得られた。図に示した survival curves から、耐性獲得形式は、"multi-step pattern (with wide first step)"^{7) 3)} と考えられる。

second-step strain (R₂) および third-step strain (R₃) のうちで, sulfisoxazole 30 μg/ml 以上に発育した集落はいずれも比較的小さいものであり, この小集落からとつた R₃ および R₄ 株の耐性度 (population 構成) はその母株である R₂ および R₃ 株より著明な差は認められなかつた。とくに R₄ 株 (forth-step strain) の耐性度が R₃ 株よりも上昇していないことは, forth-step selection が無効であつたことを示すものであつて, 耐性度上昇が上限に達したことを考えさせた。

以上のように, 人型結核菌の sulfisoxazole 耐性獲得形式が multi-step pattern であり, かつ耐性上限までの幅が低いことは, 他の抗結核剤 (SM, P A S, INA H, kanamycin, cycloserine, 4-acetylaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone) に対する耐性獲得形式とは著しく異なっている。人型結核菌の viomycin 耐性獲得形式は multi-step pattern with wide first step であり, かつまた耐性上限までの幅も狭いので, この点 sulfisoxazole 耐性獲得形式とよく類似している。

なお, 各 step で得た株の population 構成を調べるにあつては, 比較的多数の生菌数を接種したさいに急に薄膜状発育を示す偽耐性^{5) 6)} の現象が毎回認められた。

図 1 Mycobacterium tuberculosis var. hominis H₃₇Rv 株の sulfisoxazole に対する耐性獲得形式



矢印で示した集落をとつて薬剤なし培地に培養し, その population 構成を調べた。p は原株の population 構成 (survival curve で示す), R₁ ないし R₄ は順次 first-step ないし forth-step strains の population 構成を示す。破線部は pseudoresistance (5, 6) を意味する。

(2) sulfisoxazole と持続性サルファ剤との交叉耐性

表 1 および 2 に示すように, sulfisoxazole と持続性サルファ剤との間には完全な交叉耐性が認められた。

持続性サルファ剤中で, sulfisomezole, sulfadimethoxine, および sulfaphenazol の 3 者はおおよそ sulfisoxazole に匹敵する試験管内抗菌力を示したが, sulfamethoxypridazine のそれは他のものより劣つていた。

H₃₇Rv 株の third-step selection で得て, 原株の約 4 倍の sulfisoxazole 耐性度を示した被検 sulfisoxazole

耐性株は, 持続性サルファ剤に対しても約 4 倍の耐性度上昇を示していた。すなわち, sulfisoxazole と持続性サルファ剤の間には耐性度の対応が認められた。

表 1 人型結核菌 H₃₇Rv 株原株およびその sulfisoxazole 耐性株の種々のサルファ剤感受性の比較 (I)*

サルファ剤濃度	H ₃₇ Rv 原株				sulfisoxazole 耐性株			
	SZ	S	O	L M	SZ	S	O	L M
100 μg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	7 -
20	-	-	-	-	-	-	-	37 -
10	-	-	-	-	52	30	101	84 48
5	-	-	-	14 -	64	34	113	67 90
2	21	24	43	69 24	70	25	106	94 92
0	56	76	60	69 61	85	53	118	104 94

SZ: sulfisoxazole; S: sulfisomezole; O: sulfadimethoxine; L: sulfamethoxypridazine; M: sulfaphenazol
* 4週培養で判定, 表の数字は集落数

表 2 人型結核菌 H₃₇Rv 株原株およびその sulfisoxazole 耐性株の種々のサルファ剤感受性の比較 (II)*

サルファ剤	small inocula 接種時の最小発育阻止濃度		
	原株	sulfisoxazole 耐性株	比
sulfisoxazole	5μg/ml	20μg/ml	1:4
sulfisomezole	5	20	1:4
sulfadimethoxine	5	20	1:4
sulfamethoxypridazine	10	40	1:4
sulfaphenazol	5	20	1:4

* 表 1 参照

結 論

1) 人型結核菌 H₃₇Rv 株の sulfisoxazole 耐性獲得形式は multi-step pattern (with wide first step) であると考えられる。また sulfisoxazole 耐性上昇の幅は比較的狭い範囲に止まる。

2) 人型結核菌 H₃₇Rv 株の sulfisoxazole 耐性株を用いて実験した結果では, sulfisoxazole と sulfisomezole, sulfadimethoxine, sulfaphenazol, sulfamethoxypridazine などの持続性サルファ剤との間には完全な交叉耐性が存在する。

勝沼六郎主任ならびに日比野進教授の御校閲を謝する。また本実験実施に協力された加藤千代子, 水野松司, 外山春雄, 岡田金男の諸氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Demerec, M. : J. Bacteriol., 56 : 63, 1948.
- 2) Hsie, J., & Bryson, V. : Am. Rev. Tuberc., 62 : 286, 1950.
- 3) Bryson, V., & Szybalski, W. : Advances in Genetics, 7 : 1, 1955.
- 4) 東村道雄・野田用・中村栄一 : 結核, 32 : 639, 昭32 ; 33 : 43, 昭33.
- 5) 東村道雄 : 結核, 33 : 815, 昭33.
- 6) Tsukamura, M., Noda, Y., & Yamamoto, M. : Chemotherapy, 6 : 165, 1958.
- 7) Tsukamura, M., Noda, Y., Hayashi, M., & Yamamoto, M. : Ann. Rep. Jap. Soc. Tuberc., No. 5, 1960, in press.