

結核菌のストレプトマイシン耐性に関する研究

第 1 編

変異菌に就いて

岡山大学医学部微生物学教室 (主任・村上 栄教授)

専攻生 野崎 達夫

【昭和31年12月1日受稿】

内 容 目 次

第1章 緒言	第1節 低度耐性菌株よりの変異菌出現
第2章 実験方法	第2節 高度耐性菌株よりの変異菌出現
第3章 実験成績	第4章 考按並びに結語

第1章 緒言

細菌の薬剤耐性の現象は遠く1887年Kossiakoff⁵⁶⁾に依り記載されているが近年「ストレプトマイシン」(以下「ストマイ」と略す)その他各種の抗生物質が治療医学に汎用されるにつれて此の問題は臨床上極めて重要なものとなつた。

「ストマイ」に就ては1944年 Waksman⁸¹⁾に依り発見されて以来、結核症の治療に劃期的な進歩を遂げたことは周知の事実であるが「ストマイ」治療上最も注意を要するものの一つとして耐性獲得の問題がある。

「ストマイ」と結核菌との間に於ける現象に就いては1946年 Youmans⁹⁰⁾, Feldmann⁵⁴⁾, Williston⁸²⁾, Hinshaw が先ず報告し同年 Youmans⁹⁰⁾, Williston⁸²⁾はこの耐性株に就て動物実験を行つて「ストマイ」が奏功しなかつたことを報告した。

その後多数の報告が耐性獲得に就いて発表され「ストマイ」の効力に少なからざる影響を与えることが明らかになつた。

「ストマイ」及びその他の抗生物質の耐性獲得並びに復帰の機序に就ては1946年 Luria⁸²⁾, Delbrück に依り Sulphonamide 耐性獲得の機序に就いての研究が発表されて以来活潑に討

議されつゝあるが、現在の所、相対する2つの説が提唱され未だ何れが主なる役割を果しているものか、一致した結論は得られていない。

即ち自然的突然変異説と適応説である。

第1の説は細菌の耐性獲得は菌集団の増殖過程に起る自然的突然変異と薬剤の選択作用に由来すると考える仮説であり薬剤は耐性上昇に関して“Selection”を行うのみで菌体への直接作用は有しないとするものである。

之は「ストマイ」に関しては1948年 Demerec⁵⁰⁾, 1950年に Newcombe and Nyholm⁷²⁾が夫々動揺試験と呼ばれる実験を行つて検討を加え細菌の薬剤耐性上昇はその増殖過程に起る spontaneous random mutant が薬剤の selection に依つて耐性菌のみ生き残ることに起因すると報告した。今日ではこの説を支持する学者は仲々多い。第2は適応説であつて細菌の薬剤耐性獲得の機序として薬剤が耐性上昇に関する直接作用を有すると考える仮説である。

勿論薬剤耐性という現象が遺伝性を有する Genetic variation であることが明らかとなり且つ場合に依つては1951年 Lederberg⁵⁹⁾, 1949年 Newcombe, 1950年 Cavalli & Macca-cao⁶³⁾等によりその遺伝型式迄解明されている現在この説を以てしては耐性獲得の機序に

就いて考えるのは困難であるが1921年Jollos⁵⁵⁾が paramecium に就いて記載した Dauermodifikation の考えを参考にせんとするものであり、又或は Antibiotics に mutagenecity があつて之が細菌の薬剤耐性獲得の直接的な interaction であると考えられるものである。

私は1951年以来結核菌の「ストマイ」耐性獲得の機序として spontaneous mutation with selection のみでは説明し難い事実の多数あることを認め、特に「ストマイ」が遺伝子変異効果を有し之が結核菌の「ストマイ」耐性獲得の大きな役割を果していることを報告した。

然して私は前述の如く多くの人々の支持する考え方に従い spontaneous mutation with selection の説に立脚し突然変異と薬剤の選択が細菌の耐性獲得の主役であるとの考え方のもとに「ストマイ」耐性結核菌に関する研究を行つた。

例えば菌増殖の過程に於てその内極く少数の割合で自然に「ストマイ」に耐性を有する菌が出現する。それらは極く少数ではあるが「ストマイ」の使用に依り、感受性菌は発育を阻止されるのに対し、そのみは増殖するので耐性菌の割合が増加する。要するに臨牀的に菌が耐性を獲得するという事は耐性菌の出現増加に外ならない。

かくの如く自然に出現する「ストマイ」耐性菌の割合は菌の種類に依り、又同一種類の菌でも菌株に依つて相違するが、結核菌に於ては Yegian⁸⁷⁾⁸⁸⁾等の実験成績に依ると大約 10^9 乃至 10^9 に1個の割合と考える。従つて喀痰内に大量の菌を排出している患者例えば1日に 10^9 乃至 10^{10} 程度に菌を排出している患者では当然1日に何個かの耐性菌が出ているわけである。

第2章 実験方法

(1) 使用菌株

本学微生物学教室並びに結核予防会岡山県支部診療所に於ける結核患者喀痰よりの分離菌株を使用した。

(2) 菌液

岡、片倉培地及び3% KH_2PO_4 培地3乃至5週間培養発育良好なものを用いた。即ち予め滅菌した乳鉢になるべく多くの菌を取り少量の滅菌蒸留水を入れながら均等化し、20cc入の滅菌遠心沈澱管に入れ500廻転5分間遠心沈澱する。そうすることにより顆粒はすべて沈渣となる。上清を再び遠心沈澱管に取り4000廻転30分間遠心沈澱する。上清を捨て沈渣を滅菌濾紙で水分を除き、化学天秤で秤量した。

かくして得た30mgの菌を2ccの滅菌蒸留水に浮遊させ、1-N H_2SO_4 水0.5ccを10分間作用させ、1-N NaOH 水0.5ccで中和した。そして1cc 10mgの菌液を 10^{-1} とし10倍稀釈で 10^{-7} (10^{-8})として使用した。(表1参照)

表 1

菌液の作り方

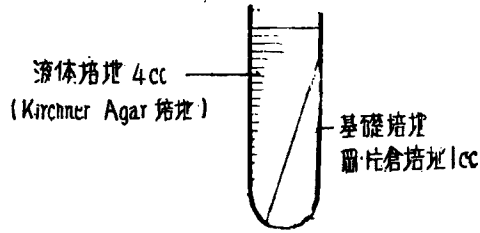
岡・片倉、3% KH_2PO_4 、Streptomycin 加3% KH_2PO_4 培地に3~5週間培養発育良好なるもの

↓
滅菌乳鉢になるべく多くの菌を取る
↓
少量の滅菌蒸留水を入れ乍ら均等化
↓
500r. p. m. 5分遠沈
↓
上清を再び 4000r. p. m. 30分遠沈
↓
沈渣の水分を除き秤量
↓
30mgの菌を2ccの滅菌蒸留水に浮遊
↓
1規定 H_2SO_4 水0.5cc 10分間作用させ1規定 NaOH 水0.5ccで中和
↓
菌液
(1cc 10mg を 10^{-1} 10倍稀釈して 10^{-7} とてし用)

(3) 使用培地

私の使用せる培地は小川氏重層培地の一変法にして小川氏重層培地の基礎培地は1% KH_2PO_4 培地の高層であるのに対し、私の培地は之を斜面とした。この理由は液体培地に接する面積が広い為による。(表2参照)

表2 使用培地 (重層培地)

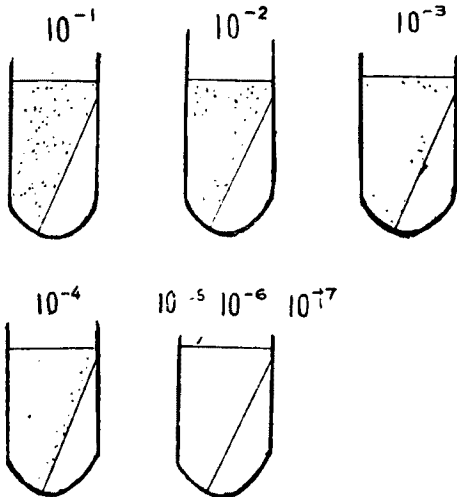


- KH₂PO₄ 4.0g
 - Na₂HPO₄ 3.0g
 - クエン酸 Na 2.5g
 - MgSO₄ 0.6g
 - Asparagin 5.0g
 - Glycerin 20.0cc
 - 寒天 5.0g
 - dist Water 1000.0cc
- 濾過後 pH7.0 とし
3回滅菌

第3章 実験成績

第1節 高度耐性菌株よりの変異菌出現

(1) 私は本実験に於ては「ストマイ」未使用若しくは「ストマイ」少量 (30g. 以下) 使用の結核患者喀痰よりの分離菌株 (24例) を用いた。培地の「ストマイ」含有量は 1r, 5r,



判定基準

- ∞ 10⁻¹
- ⊘ 10⁻²
- ⊘ 10⁻³
- ⊘ 10⁻⁴
- ⊘ 10⁻⁵ 10⁻⁶ 10⁻⁷

($\frac{\square}{13}$) は集落の数

10r, 100r, 1000r/cc の重層培地を使用した。その耐性度は表3 (A) 及び (B) に示す。

表3 基礎実験 (A)

		C	1γ	5γ	10γ	100γ	1000γ
1 田辺	10 ⁻¹	⊘	⊘	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	+	-	-	-	-	-
2 樋口	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	+	+
	10 ⁻⁷	+5	+3	+1	-	-	-
3 堀家	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	+	+
	10 ⁻⁷	+7	+3	+1	-	-	-
4 秋山	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
	10 ⁻⁷						
5 種谷	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	+
	10 ⁻⁷	+104	+38	+5	+6	-	-
6 小野	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	-	-
	10 ⁻⁷	+52	+13	-	-	-	-
7 西崎	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	+	+
	10 ⁻⁷	+51	+25	+3	-	-	-
8 藤原	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	+	+
	10 ⁻⁷	+10	+6	+1	-	-	-
9 小林	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	-	-
	10 ⁻⁷	+3	-	-	-	-	-
10 浅田	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	+
	10 ⁻⁷	+5	+13	+3	+8	-	+1
11 石井	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	-	-
	10 ⁻⁷	+86	+1	-	-	-	-
12 土師	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	+	+
	10 ⁻⁷	+26	-	-	-	-	-

表3 基礎実験 (B)

		C	1γ	5γ	10γ	100γ	1000γ
13 平田	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	+	+
	10 ⁻⁷	+21	+5	-	-	-	-
14 平野	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	⊘	+	+
	10 ⁻⁷	+29	+8	-	-	-	-
15 草野	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	-	-
	10 ⁻⁷	+13	+4	-	-	-	-
16 河口	10 ⁻¹	⊘	⊘	⊘	+	+	+
	10 ⁻⁷	+3	-	-	-	-	-

17 佐々木	10 ⁻¹	卍	卍	+	+	-	-
	10 ⁻⁷	+11	+7	+1	-	-	-
18 田村	10 ⁻¹	卍	卍	卍	卄	+	+
	10 ⁻⁷	+8	+5	-	-	-	-
19 鶴見	10 ⁻¹	卍	卍	卍	卄	+	+
	10 ⁻⁷	+8	+5	-	-	-	-
20 表	10 ⁻¹	卍	卄	+	-	-	-
	10 ⁻⁷						
21 塩田	10 ⁻¹	卍	卍	卄	卄	+	+
	10 ⁻⁷	+28	+6	-	-	-	-
22 清水	10 ⁻¹	卍	卍	卄	+	+	+
	10 ⁻⁷	+12	-	-	-	-	-
23 古賀	10 ⁻¹	卍	卄	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	+3	-	-	-	-	-
24 筒井	10 ⁻¹	卍	+	卍	卄	+	+
	10 ⁻⁷	+12	卍 9	+2	-	-	-

私は本実験に於ては耐性の低い菌株を使用したので、その完全耐性の割合は表4に示す如くである。即ち 17 若しくは、それ以下の

表 4

17以下	17	57	107	1007	10007
9	10	2	2	1	0

ものが19例あり24例中の75%であつた。この様に低度耐性のもの例えば 17 耐性の菌株で 1007, 10007/cc で少数の菌集落が発生するか否かに就て実験した。

Wolinsky⁸³⁾⁸⁴⁾ に依れば感性菌中 10007/cc で 0.1% 以上の変異菌があると云い、私の実験に於ても菌 0.1mg, 1mg の接種では明らかに 0.1% 以上、それ以上の突然変異菌の出現を知つた。

菌液 1mg 中約 10 億の菌が存在すると仮定して 10 倍稀釈に依り 10⁻⁷ として使用した。10⁻⁷ 即ち菌数約 1000 個で行つた実験では菌数が少ない為か、比較的集落の発生も遅く、大体 3 乃至 4 週間を要し厚生省療研細菌科会の標準耐性測定法の成績に近い成績であつた。但し菌数を少なくすると判定が遅くなるので「ストマイ」の力価低下に依る in vitro 耐性

になるとも解釈される。

然しながら私の実験に於て、菌数 10⁻¹ で耐性 17/cc の場合、菌数 10⁻⁷ で 57/cc に発育しない菌株もあることより考え、この解釈は全面的には肯定し得ないのではあるまいか。

Yegian⁸⁵⁾⁸⁸⁾ に依れば菌数 10⁻⁸, 10⁻⁹, に 1 個の割合で自然的突然変異菌が出現すると云うが、私の菌数 10⁻⁷ では之を認めることが出来なかつた。

第 2 節 高度耐性菌株よりの 変異菌出現

私は本実験に於ては「ストマイ」多量 (50g 以上) 使用の結核患者喀痰より 2 例の高度耐性菌株を分離することが出来た。

第 1 例

山田株は「ストマイ」加 3% KH₂PO₄ 培地の 17, 107, 1007, 10007/cc に於て、対照と全く等しい発育を認めた。菌液の稀釈は 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ とし「ストマイ」の稀釈は 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 5, 10, 100, 10007/cc とした。尚判定期間は 2 週, 3 週, 5 週とした。

その成績は表 5 及び 6 の通りである。

表 5 及び 6 に依る如く、山田株は Streptomycin Enhanced の傾向があるかの如く、菌数 10⁻¹ では 6 日目、早くも集落の発生を認めた。

菌数と集落との関係は、菌数の多いもの程、集落発生が早く、少ないもの程遅い様である。菌数が少ない場合は 2 週では判定し難い。それは集落が小さい為であるが、外になんらかの原因があるのではないかと考えられる。

3 週判定では菌数 10⁻¹ より 10⁻⁴迄は多少共集落は大きくなつた様だが大した変化がないので表から除外し菌数 10⁻⁵ より 10⁻⁷迄表示した。3 週判定に依ると、2 週では集落の計算し難つたものが計算出来る様になり、集落数も増加し、且大きくなつた。之は小川その他に依る如く 370C 3 週間には「ストマイ」の力価が 1/3 に減少する為ではないかと考えられる。表 5 及び 6 による如く山田株は高度

表 5 山田株 2 週判定

SM γ /cc 菌液	C	0.1 γ	0.2 γ	0.3 γ	0.4 γ	0.5 γ	0.6 γ	0.7 γ	0.8 γ	0.9 γ	1 γ	5 γ	10 γ	100 γ	1000 γ
10-1	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10-2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10-3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10-4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	85	72	26	65	71	35	51	22	31	19	54	75	47	42	78
10-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40	18	21	6	13	22	13	9	2	19	3	13		8	5
10-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	1	3	1	5	1	1	1	5	2	11	2	13	5	3

表 6 山田株 3 週判定

SM γ /cc 菌液	C	0.1 γ	0.2 γ	0.3 γ	0.4 γ	0.5 γ	0.6 γ	0.7 γ	0.8 γ	0.9 γ	1 γ	5 γ	10 γ	100 γ	1000 γ
10-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	96	100	100	100	100	58	62	41	51	82	59	62	38	15	36
10-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	62	19	25	41	39	38	21	45	22	19	8	9		22	8
10-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	12	13	15	5	23	19	8	10	21	32	8	16	33	42

耐性を有し 1000 r /cc 完全耐性菌であると考
えられる。

第 2 例

田中株は「ストマイ」加 3% KH_2PO_4 培地

10 r /cc に於て対照と全く等しい発育を認めた。
前記山田株と同様に接種し、2 週、3 週、及
び 5 週で判定した。表 7 は 2 週判定であり、
菌数 10⁻⁷ に於ては対照及び 0.8 r /cc 集落の

表 7 田中株 2 週判定

SM γ /cc 菌液	C	0.1 γ	0.2 γ	0.3 γ	0.4 γ	0.5 γ	0.6 γ	0.7 γ	0.8 γ	0.9 γ	1 γ	5 γ	10 γ	100 γ	1000 γ
10-1	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	+	+
10-2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
10-3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
10-4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
10-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	64	52	104	42	54	72	33	24	78	61	7	42	16	5	1
10-6	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	30	16	4		3	1	5	5	8	13	10	6	2		
10-7	+								+						
	3								2						

発生を認めたのみであつた。表 8 は 3 週判定、
表 9 は 5 週判定である。

田中株は 10 r /cc の完全耐性菌であり、
10 r /cc 迄は対照と全く等しい発育を認めた。
100 r 、1000 r /cc に於ては対照の 1/10 乃至
1/20 である、2 週判定では菌数 10⁻⁵ の 100 r /cc

に於ては対照の 1/10 であり、1000 r /cc に於
ては 1/50 である。菌数 10⁻⁶、10⁻⁷ の 100 r 、
1000 r /cc に於ける発育は認められなかつた。

3 週判定では菌数 10⁻¹ 乃至 10⁻⁴ では大体
変化なく 10⁻⁷ の場合も可成りよく発育した
ので集落を計算することが出来た。10⁻⁶ の

表 8 田中株 3 週判定

SM γ /cc 菌液	C	0.1 γ	0.2 γ	0.3 γ	0.4 γ	0.5 γ	0.6 γ	0.7 γ	0.8 γ	0.9 γ	1 γ	5 γ	01 γ	100 γ	1000 γ
10 ⁻⁶	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	30	18	12		5	15	17	13	9	8	17	19	16		1
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	5	4	8	1	8	6	1	1	4	2	4		1	1	

表 9 田中株 5 週判定

SM γ /cc 菌液	C	0.1 γ	0.2 γ	0.3 γ	0.4 γ	0.5 γ	0.6 γ	0.7 γ	0.8 γ	0.9 γ	1 γ	5 γ	10 γ	100 γ	1000 γ
10 ⁻¹	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10 ⁻²	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻⁴	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	70	65	108	120	116	180	78	118	113	144	86	82	26	11	13
10 ⁻⁶	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	44	21		11	32	26	19	10	8	23	32	24	19	4	4
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	7	12	5	13	9	4	3	6	4	9	7	3	1	2

100 γ /cc に於ては集落の発生を認めず、1000 γ /cc に於ては集落は(+), 10⁻⁷ の 100 γ /cc に於て(+), 1000 γ /cc に於ては集落の発生を認めなかつた。

5 週判定では菌数 10⁻¹ 乃至 10⁻⁵迄の対照と、100 γ 、1000 γ /cc に於ける集落の差は1/2乃至 1/5 であり、3 週で発生しなかつた菌数 10⁻⁶ の 100 γ /cc、10⁻⁷ の 5 γ /cc 及び 1000 γ /cc に於てもすべて集落の発生を認めた。この事実は「ストマイ」力価の低下に起因するか、或は in vitro に於ける耐性の出現に基づくものとも考えられる。

第 4 章 考按並びに結語

私の本実験は少数例に過ぎないが、4 週 5

週の判定では「ストマイ」力価の低下によるか、或は in vitro に於ける耐性出現によるかどうかの判別が困難であるので 2 週若しくは 3 週に於て判定する方が適切ではないかと考える。

Yegian⁸⁶⁾⁸⁷⁾⁸⁸⁾ その他によれば菌数 10⁸ 乃至 10⁹ に 1 個の割合で自然的突然に依る変異菌の出現を報告しているが、私の分離せる菌株に於ても 10⁻⁶、10⁻⁷ に於て菌数 10³ 乃至 10⁴ に 1 個の割合で変異菌の出現を認めた。

擱筆に臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜りたる村上教授並びに本研究に際し絶大なる便宜を与えられた検査員田中義郎氏に深謝する。

(本論の要旨は昭和28年岡山医学会にて発表した。)