腸炎菌の抗生物質耐性に関する研究 (1)

硫酸ジヒドロストレプトマイシン耐性に 伴う性状の変化について

舩 松 克 彦

東邦大学医学部微生物学教室 (主任 桑原教授)

[受付: 7月3日 1956年]

I. まえがき

微生物を実験的に *in vitro* または *in vivo* で各種の抗菌剤に接触させると、その薬剤の特性に応じて程度の差はあれ微生物の当該薬剤に対する抵抗性の上昇が認められることは、すでに比素剤について古くから知られていることであるが、それが臨床的に大きな課題となつたのはスルホンアミドや抗生物質が一般に使われるようになってからのことである。

最近10年間細菌の抗生物質耐性化についての研究はきわめて多数あるが、その多くは変異出現の機作が撰択作用かまたは誘導であるかという基礎的理論に関するもので、直接に臨床的な抵抗性上昇の経過を説明するにはいくらかの距離があるように思われる。

それで私は *in vitro* での細菌と薬剤の接触形式を種々の様式に変えてその結果起る耐性上昇経過の変動及び当然生ずべき変異菌の性状をストレプトマイシン及び腸炎菌を用いて検討、考察してみたので、次にその実験のあらましを報告する。

II. 実験の方法

a) 使用した菌株: 東京大学医学部細菌学教室から分与をうけた腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) B—24 株で、使用前マウス (体重12—17 g) を通過し、ブイヨン24時間培養 0.2cc を腹腔内に投与した際24時間で確実に死亡するように菌力を高めた後実験を行った。

b) 薬剤との接触形式: 菌と薬剤との接触は培地条件と薬剤濃度を次のように変えて実験してみた。

1. 培地: 培地の栄養条件を種々変える意味で、次の4種の培地を用いた。

i) 血清寒天培地: 普通寒天培地 (栄研) にウマ血清を無菌的に20%に加えたもの。

ii) 普通寒天培地 (栄研)

iii) Gladstone 固形培地

iv) Gladstone 固形培地のリン酸濃度を3%に変えたもの。

2. 薬剤濃度: 使用菌株の硫酸ジヒドロストレプトマイシン (以下SMと略す) に対する抵抗性は 6.25 γ /cc であったから、次の2種の方法で継代実験を行った。

i) 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.19 γ /cc にSMを含む平板系列をつくり、これにB—24株ブイヨン24時間培養を1白金耳ずつうえ、48時間培養後菌の増殖した平板のうちSMの最大量を含むものから次の系列にうえ、これをくりかえして抵抗性の上昇をしらべる形式。これを増量継代とよぶ。

ii) 48時間間隔で常に 6.25 γ /cc 及び 1 γ /cc にSMを含有する平板に継代し、10代毎に上記と同じ方法で抵抗性を測定する形式。これを恒量継代とよぶ。

以上4種の培地と3型の薬剤接触方式を組合せた12系の系列についてそれぞれ耐性上昇経過を観察した。

c) 耐性株の性状の観察: 各耐性株は大略10代毎に次の各種の性状につき原株と比較観察を行った。

i) 乳糖, ブドウ糖, ツルシット, キシロースの分解能。

ii) 養素要求性, 特に Stephenson-Whetham 培地における増殖の有無及びアミノ酸の利用能力の変化。

iii) 形態の変化: 染色標本による光学的検査及び電子顕微鏡による検査を併用した。

HENOMATSU Katsuhiko: Studies on the Antibiotic-resistance of *Salmonella enteritidis* (1). On the Change of Biological Reactions of Acquired Streptomycin-resistant strain. Dept. of Bact., School of Medicine, Tôhō University: —Jap. J. of Bact., 11 (10), 917-918, 1956.

iv) 他の一般的性状

v) マウスに対する菌力：菌力の測定には測定すべき平板の集落を1度ブイオンに24時間培養したものを更に一定量ずつ3匹1群のマウス（体重12—17g）に腹腔内注入し死亡例は各臓器を培養して他の原因を排除した。

III. 実験の成績

a) 耐性上昇の経過

1) 増量継代 血清寒天培地継代と普通寒天培地継代とは全く同じ変化を示し、Gladstone 培地、リン酸 Gladstone 培地はそれぞれ別の態度を示した。

i) 血清寒天培地及び普通寒天培地における継代：毎代著しい抵抗性上昇を示し、10代で10,000 γ /ccの抵抗性に達した。途中の上昇速度も両者にほとんど差を認めなかった。

ii) Gladstone 培地における継代：耐性上昇は比較的小さく10,000 γ /ccに達するのに37代を要した。

iii) 高濃度リン酸含有 Gladstone 培地における継代：耐性上昇はきわめて小さく70代で2,500 γ /ccに達し以後少くとも20代この線に停止した。

2) 恒量継代 この場合も血液寒天培地と普通寒天培地とは全く同様、Gladstone 培地もリン酸濃度の如何にかかわらず同じ経過を示した。

i) 血液寒天培地と普通寒天培地では耐性上昇速度は増量継代の場合に比べてかなり小さく70代の検査で10,000 γ /ccに達した。

ii) Gladstone 培地ではリン酸濃度の如何にかかわらず耐性上昇はきわめて小さく80代でようやく2,500 γ /ccに達した。

また接触濃度は6.25 γ /ccでも1 γ /ccでも速度に差が認められなかった点が注目された。

以上の経過は第1図に示してある。

第1図 各種継代様式による耐性上昇経過

b) 形態の変化

形態の変化は高濃度リン酸加 Gladstone 培地継代を除く増量継代系列、血液寒天培地及び普通寒天培地における恒量継代系列に認められた。変化の様相はいずれの場合も略々同一であった。

すなわち血液寒天及び普通寒天継代株は80代頃から原株に比し菌の横径がやや大となり40代ではほとんど運動が認められず鞭毛はきわめて少数となり、50代で完全に鞭毛消失が認められた。しかしこの株を2—3代SMを含まない培地に継代すると再び鞭毛の発生が認められた。

恒量継代系列では時期がおくれて同様の現象が現われたが、その程度はいくらかよく常に鞭毛の残存が認められた。

電子顕微鏡像によると耐性菌は一般に菌体構造が粗く顆粒状構造が認められた（写真1—5）。

c) 生物学的性状

i) 普通培地における増殖 10,000 γ /cc耐性になった系列は10,000 γ /cc SMに接触20—30代に及ぶ頃からSMを含まない培地特にブイオンにおける増殖がある程度低下した。すなわち普通寒天平板では原株に比し増殖速度は約2日程後れるが最終の集落の大きさは略同じであるが、ブイオンの場合にはかなり明らかな差が認められる。この原因を追究するために原株と耐性株をそれぞれ純好氣的（300cc三角フラスコにブイオン50ccを入れ振盪培養する）及び嫌氣的（ブイオン培地を1度煮沸し急冷後菌をうえパラフィンを重ねる）に培養し増殖量を比べたところ、第1表のように嫌氣的増殖度が耐性株において減弱していることが知られた。

第1表 耐性株の好気及び嫌気増殖

培地	継代方法	継代数	好気培養	嫌気培養
血液寒天	増継	73	7.4×10^8 /cc	3.0×10^6 /cc
	恒継	62	9.6×10^8	6.3×10^6
普通寒天	増継	81	9.1×10^8	1.4×10^6
	恒継	82	5.6×10^8	2.1×10^7
Gladstone培地	増継	92	3.7×10^8	1.3×10^7
	恒継	92	7.0×10^8	9.9×10^7
原株			1.2×10^9	1.0×10^8

ii) 他の生物学的性状 糖分解能（乳糖、ブドウ糖、ツルシット、キシロース）、インドール産生能、 H_2S 産生能は各系列とも原株と質的には全く差がなく、Simmons培地及び Stephenson-Whetham 培地にも増殖できた。また Simmons ブドー糖培地の NH_4^+ を18種のアミノ酸（Glycine, α -Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Cystine, Tyrosine, Arginine, Histidine, Methionine, Proline, Lysine, Threonine, Serine, Aspartic acid,

Glutamic acid, Phenylalanine, Tryptophan) 単独で置換した時の増殖を比べてみたが、高度耐性化系列において一樣にある程度増殖速度がおくれた他は差異を認めることができなかった。

d) 菌力

菌力の測定は血液寒天及び普通寒天系列では85代で、Gladstone 培地及びリン酸加 Gladstone 培地系列は90代で検査した。成績は第2表に示す通りである。表に認められる通り血液寒天及び普通寒天恒量継代系列を除いては一樣に菌力の低下が認められたが、Gladstone 培地、リン酸加 Gladstone 培地系列は対照としてとつたSMを含まない系列も菌力低下を示しているの、SM耐性化のためとは断定できない。

第2表 耐性株のマウスに対する菌力

投与量 (cc)		0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0
血 液 寒 天	増継				$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$
	恒継	$\frac{1}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$
普 通 寒 天	増継				$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$
	恒継	$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$
Gladstone 培地	増継				$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{0}{3}$
	恒継				$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$
リン酸加G培地	増継				$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$
	恒継				$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$
原 株	血寒	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$
	普寒	$\frac{0}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$
	G培地	$\frac{0}{3}$ *	$\frac{0}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{2}{3}$

* 分母は実験したマウス数、分子は死亡した数。

IV. 考 察

細菌の *in vitro* における SM 耐性実験についてはきわめて多数の研究が内外に見られるが、その大部分はこの実験で増量継代とよんだ形式のものである²⁻⁹⁾。元来細菌が生体内で薬剤と接触する場合薬剤の体液乃至臓器内濃度はあまり高いものではなく、菌の耐え得る最大限の濃度を常に菌に接触させる実験形式はかなり現実とかけはなれたものとみて差支えない(秋葉⁷⁾, 1953)。これに反して菌の耐え得る薬剤濃度以下の一定の濃度に菌と薬剤を接触させるいわゆる恒量継代形式は一段と生体内接触に近い形式とみなすべきである。

更に私は菌と薬剤の接触する生活環境の耐性化に及ぼす作用をみるため、体液の栄養成分に比較的近い血液含有培地、普通寒天培地及び単純培地を用いて耐性化速度

を比較してみた。実験成績から明かなように、単純培地は自然培地に比し耐性化が著しく後れ、また恒量継代は増量継代に比し耐性化速度が少である。しかし普通寒天培地と血清添加培地との間には何の差異を認めることもできなかった。単純培地において自然培地より耐性化速度が少であることはすでに Rosanoff and Sevag (1953)⁹⁾ が大腸菌を用いて実験しているが、彼らの実験における、高濃度リン酸添加によつて耐性化速度が上昇する事実は私の実験では全く否定された。これまでの多くの実験に認められているように菌の耐性変異にはほとんど常に (*in vitro* では) 代謝経路あるいは養分要求性の変化を伴うものであるから、単純培地においては耐性化と一定範囲の栄養要求性の二重の撰択を行なうことにより、これが耐性上昇の後れる原因になると推定される。

耐性化に伴う性状の変化は一般に 10,000 γ /cc 以上の高度の耐性を得た系列に現われた。形態の膨大化はこれまでもしばしば経験されている事実であるが、この実験から得られている事実であるが、この実験から得られた特徴ある事実は鞭毛の消失と、SM との接触を断つことによるその速かな復旧である。もともと耐性化による形態変化は、薬剤との接触を断つた場合比較的復旧しやすい変化の1つであるが^{2,9)}、特に鞭毛の完全消失した系列でも2~3代普通培地に継代すると直ちにほとんど原株と同様の鞭毛が回復する点から見ると耐性化というよりはSMの長期共存が鞭毛消失の重要な原因であると考えなければならない。しかもSMの量の如何にかかわらず(普通培地恒量継代でも)自然培地系列では同程度のSMの接触期間にもかかわらずこの変化が起つていないことからみると、耐性化そのものもこの変化と無関係ではあり得ないことがわかる。

糖分解を含む一般生物学的性状がこれまでの報告と異なり質的变化を認め得なかつたのに反し、遊離酸素要求性にはかなりの変化が認められた。すなわち腸炎菌はいわゆる通性菌で遊離酸素を遮断してもある程度増殖し得る菌であるが、高度耐性系列はいずれも嫌氣的増殖がほとんど不可能になっていた。Rosanoff and Sevag (1953)⁹⁾ の実験によるとSM耐性大腸菌では耐性化に伴ないブドウ糖消費量が減退し、乳酸生産量が著明に増加するという。これはブドウ糖が焦性ブドウ酸になってから後の分解経路がもつばら無氣的に進み、好気酸化経路が阻害されたものとみられ、従つて私の得た実験結果とは全く反対の現象となる。しかし一方 Bellamy and Klimek (1948)⁹⁾ は黄色ブドウ球菌 F D A 209 P 株のペ

ニシリン高度耐性株において嫌気増殖能力が全く欠落したことを報じており、この様な代謝経路の欠落が薬剤特異かまたは菌特異かは向後検討の余地がある。

V. 結 論

私は腸炎菌 B—24 株を養素のことなる各種の培地に増量及び恒量継代し、耐性上昇度及び性状の変異を検討し次の結果を得た。

1. 養素の豊富な培地（血液寒天，普通寒天）では増量，恒量継代ともに速やかな耐性上昇が認められたが，単純培地（Gladstone 培地）では耐性化速度は著しく低下した。

2. Gladstone 培地に対する高濃度リン酸添加は耐性化速度を高めることができなかった。

3. 高度耐性化系列はいずれも菌形の膨大の他に鞭毛の消失が認められた。消失した系列は SM を含まない培地に 2—3 代継代すると速やかに鞭毛発生を認めた。

4. 高度耐性化系列においても一般生物学的性状，ア

ミノ酸利用能力には変化が認められなかった。

5. 高度耐性化系列は嫌気増殖がほとんど不可能となった。

終りに御指導を賜った東邦大学医学部微生物学教室桑原教授に深甚の敬意を表します。

文 献

- 1) 秋葉：細菌学の新領域，204-211，(1953)。
- 2) Klimek, J. W., Cavallito, C. J. and Bailey, J. H.: J. Bact., 55(2), 139-145, (1948)。
- 3) 榊原：医学と生物学，18(6)，336-339，(1951)。
- 4) 桑原，大淵，井上：衛試，71，97-102(1953)。
- 5) 石井：阪市医大誌，2(3)，214-219，(1953)。
- 6) English, A. R. and McCoy, E.: J. Bact., 62(1), 19-26, (1951)。
- 7) 秋葉：Chemotherapy, 1, 1-11. (1953)。
- 8) Rosanoff, E. I. and Sevag, M. G.: Antibiot. Chemoth 3(5), 495-504 (1953)。
- 9) Bellamy, W. D. and Klimek, J. W.: J. Bact., 55(2), 147-151, (1948)。

(1)

原株 鞭毛染色

(2)

普通寒天恒星継代株
同上

(3)

普通寒天増量継代株
同上

(4)

普通寒天増量継代株 (60 代)
電子顕微鏡像 (10,000倍)

(5)

同上 (4代普通寒天に継代し鞭毛の
再生したもの)

写真(1)～(3)は伝研野田省吾氏の
撮影による。記して感謝の意を表す
る。