人型結核菌 H 37 Rv 株の Streptomycin 及び Isoniazid に対する耐性獲得の機作について

第 3 報 Streptomycin の微量含有培地継代による耐性上昇の分析的考察 (その 1)

田 中 完 巳

東京大学医学部細菌学教室 (指導 秋葉教授)

[受付: 1 月 28 日・1958 年]

横田¹⁾ は薬剤に細菌の薬剤耐性変異を誘発する直接作用があるか否かを検討する方法の 1 つとして、薬剤の選択作用が働かない程の低濃度の薬剤含有培地中において菌を増殖させた場合の耐性変異菌発生の有無を検する方法をあげている。又薬剤量が subinhibitory dose であっても、添加された薬剤が選択作用を現すのは最初の 2 ～ 3 日で、その培地で継代する場合には最初の 1 代のみであり、以後の耐性上昇は薬剤の有する耐性上昇に関する interaction によると考えている²⁾。此に対して牛場³⁾、渡辺⁴⁾ は Yudkin⁵⁾ の “clonal variation with selection” の説を更に検討して、“relative selection due to relative inhibition” の考えを提出し、微量接触法による耐性上昇は普通の方法によつては測定し得ない程弱い selection が働いているために、耐性上昇が起るのであつて、薬剤の interaction の結果起る耐性上昇ではないであろうといっている。著者は第 2 報⁶⁾ において、SM 0.05 γ /cc を含有する Tween 培地で長期間人型結核菌 H 37 Rv 株を継代して耐性上昇を認め、更に二重耐性菌を原株に混合して作成した mixed population に対する SM 0.05 γ /cc の影響、および感性菌と耐性菌の発育に対する SM 0.05 γ /cc の影響を検討してその機作を検討し、SM 0.05 γ /cc の濃度には selecting effect が存在することを確めた。しかし、それが微量接触の際の耐性上昇の唯一の機作とは断定出来ず、Adaptation も否定出来なかつたが、又 Adaptation を積極的に証明することも出来なかつた。この事から微量接触による耐性上昇の機作を更に詳しく検討する必要があると感じて次の実験を行つた。

微量接触による耐性上昇の機作の検討は、いずれも詳しい実験は報告されていない。本報においては先ず、第

2 報の SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地継代により耐性を獲得した株が、一定耐性度を獲得した後は耐性変動が認められなかつた点について検討した。

実験材料及び実験方法

液体培地は第 1 報⁷⁾ 記載の Tween 培地、生菌単位測定および耐性度測定には 1% 小川培地を使用し、その他の実験材料および実験方法は前報と同様である。被検菌は SM 0.05 γ /cc 含有の Tween 培地に 2 週間毎に 42 代継代した株で、この株は第 2 報にのべた通り、18 代以降 54 代まで耐性変動を認めず、又 SM を含む培地で 27 代継代後、SM を含まない培地で 27 代継代して耐性の変動を認めなかつた安定した SM 耐性株である。

実験 1

本菌株の 37°C 2 週間 Tween 培地中培養菌 0.1 cc を、SM 0, 0.1, 0.5, 1, 10 γ /cc 夫々含有する Tween 培地に同時に接種して、37°C に培養しつつ毎日光電池比濁計で濁度を測定すると、第 1 表、第 1 図の如く 0.1 γ /cc 含有培地では対照の SM を含まない場合と差なく、良好は発育を示したが、0.5 および 1 γ /cc では若干の差があり、10 γ /cc では殆んど濁度の増加を認めず、次に SM

TANAKA Sadami: On the Mechanism of Acquisition of Streptomycin and Isoniazid-resistance of Mycobacterium tuberculosis var. hominis Strain H 37 Rv. III. Analytical Studies on the Acquisition of Drug-resistance by Serial Subcultures in Media Containing Small and Fixed Amount of Streptomycin. (1), Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact. 13(6), 467-470, 1958.

第1表 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地中
42代継代し耐性上昇を認めた株に
ついての SM の影響

培養日数	SM conc. γ /cc				
	0	0.1	0.5	1	10
0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
2	0.13	0.13	0.10	0.10	0.07
3	0.19	0.20	0.18	0.16	0.08
5	0.36	0.36	0.31	0.29	0.08
6	0.43	0.43	0.38	0.36	0.08
7	0.52	0.53	0.49	0.46	0.07
8	0.56	0.57	0.52	0.49	0.07
9	0.61	0.62	0.56	0.54	0.06
10	0.65	0.65	0.60	0.56	0.05

数値は Optical Density

第1図 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地中 42代
継代の耐性株に対する SM の影響

0.1, 0.5, 1 γ /cc 含有培地に2週間培養した第1代の菌を更に同量のSMを含有する第2代に継代すると、(図、表略す) 1 γ /cc 含有培地では濁度の増加が認められず、0.1および0.5 γ /cc では良好な発育を認めた。然るに本菌株の耐性度は第2報および本報の第3表および第3図の継代0代の耐性度にみる如く SM含有小川培地による生菌単位測定では殆んど10 γ /cc の完全耐性と認められ、比濁計による耐性度 0.5~1 γ /cc とは差が甚だしく、此の事は本実験における液体培地による耐性測定と固型培地による耐性測定の環境条件の大きな違いに因るものと思われる。

実験2

実験1による本菌株は SM 0.5 γ /cc 含有 Tween 培地で継代することが可能であることを認めたので、1代

第2図 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地 42代継
代 SM 耐性菌を更に SM 0.5 γ /cc 含有 Tween
培地で継代した場合の Optical density

第3図 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地 42代継
代した SM 耐性菌を更に SM 0.5 γ /cc 含有
Tween 培地で継代した場合の耐性分布の変動

目に 0.5 γ /cc 含有培地2週間培養の菌を次に SM 0.5 γ /cc 含有 Tween 培地と SM を含まない対照培地に同時に 0.1ccずつ接種して第2代とし、かくして10代まで継代を続けながら、その間毎代比濁計による濁度を測定して発育曲線を検討すると共に、耐性度の変動をも同時に測定した。第2表、第2図に示す如く、各代のSMを含まない培地に発育した菌の発育と、SM 0.5 γ /cc 含有培地に発育した菌の発育を比較すると、1代目には約0.05 (Optical density) の差が3代目には約1.4となり最も著るしく、5代目には約0.03となり、8代目には10代目と同様0.01程度の差しかなくなっている。これを簡単に図示する為に、各代の対照(接種菌量が異なる為に或

第2表 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地で42代継代した SM 耐性菌を更に SM 0.5 γ /cc 含有 Tween 培地で継代した場合の optical density

継代数 添加 SM	1		3		5		8		10	
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
1	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.03	/	/
2	0.13	0.10	0.06	0.06	0.08	0.06	0.08	0.08	0.09	0.10
3	0.19	0.18	0.10	0.07	0.15	0.09	0.16	0.16	0.21	0.20
4	/	/	/	/	0.24	0.16	/	/	/	/
5	0.36	0.31	0.29	0.15	/	/	0.38	0.37	0.38	0.37
6	0.43	0.38	0.38	0.21	0.43	0.36	0.46	0.44	0.48	0.46
7	0.52	0.49	0.46	0.28	/	/	0.52	0.51	0.54	0.52
8	0.56	0.52	0.53	0.36	0.57	0.54	/	/	0.59	0.56
9	0.61	0.56	0.58	0.44	0.61	0.57	0.63	0.62	0.66	0.64
10day	0.65	0.60	0.64	0.52	0.68	0.65	0.67	0.64	0.67	0.65

第3表 SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地42代継代した SM 耐性菌を更に SM 0.5 γ /cc 含有 Tween 培地で継代した場合の耐性分布の変動

継代数	SM conc. γ /cc				
	0	1	10	100	1000
0	49×10^6	102×10^6	58×10^6	12×10^2	9
2	84×10^6	101×10^6	86×10^6	$10^2 \times 10^2$	ca 10^2
3	67×10^6	68×10^6	52×10^6	195×10^2	ca 10^3
5	98×10^6	82×10^6	98×10^6	103×10^4	ca $10^3 \times 10^2$
6	86×10^6	/	95×10^6	65×10^6	$+ \times 10^2$
7	142×10^6	145×10^6	133×10^6	76×10^6	293×10^4

は培養期間中の種々の条件が異なる為には相当の差があるが便宜上一様に取扱った)の最高値と最低値を取り、仮に control zone を斜線の如く示すと、1代目および5代目には対照の最低値より更に低く、3代目には著しい差が認められ、8代および10代目には control zone の中に含まれてしまう。一方、耐性変動は第3表、第3図の如く、2代目にはすでに相当の耐性上昇が認められ、3代、5代、7代と順次耐性上昇が進み、6代目と7代目の耐性度は殆んど差が認められず、耐性度はこの程度で安定した如くであった。

考 察

著者は第2報に、SM 0.05 γ /cc 含有培地継代の際に液体培地では耐性上昇が割合に容易であるが、固型培地では耐性上昇が著明でなく、この原因は薬剤と菌との接

触条件の差が最も大きいものと推察した。しかし実験1の結果の如く、生菌単位測定法で10 γ /cc 完全耐性と認められた株が、Tween 培地では10 γ /cc 含有培地に発育せず、比濁計で測定すると1 γ /cc でも発育抑制が認められ、これを次代に継代した場合には、発育しなかつた。この事は培地の差による菌と薬剤との接触条件の違いのみで考えるにはその差が大きすぎると思われるが、判然とした理由は不明であつた。この様な事が、臨床的耐性検査の際に、固型培地による耐性度と、液体培地による耐性度との間にも起るとすれば大きな問題であつて、耐性測定法の詳しい再検討が必要と思われる。

第2報でSM 0.05 γ /cc 接触ではそれ以上の耐性上昇を認めなかつた SM 耐性株が、接触するSMの濃度を0.5 γ /cc にすると継代を続けるに従つて耐性上昇を示し、1000 γ /cc 含有小川培地にも相当数の集落が発生する程の殆んど1000 γ /cc 耐性を獲得出来た。この事は0.05 γ /cc 接触では途中で耐性上昇が停止した理由が、接触するSMの濃度に関係する事を想像させるもので、その条件に適合した菌が population の全部を占め、その菌の耐性度を示した為に、耐性度も安定したものであろう。しかし、その適合した耐性菌が、adaptation によつて現れた耐性菌か、原株に含まれる spontaneous resistant mutant が現れたのかは不明である。又耐性度が安定であることが、adaptation で現れた菌でないという理由にはならず、lasting modification の考えもあるし、又 induction もある。次に第2表、第2図および第3表、第3図に示した如く、SM 0.5 γ /cc 含有培地で菌を継代した場合にはSMの発育に対する影響は第1代よりも第3代に強く現れ、更に継代を続けてSMの影響

が殆んどなくなった時期には耐性度は殆んど安定の時期に到っている。すなわち、耐性はその条件では上昇しきっている。このことの論議は後報にのべるが、微量又は subinhibitory dose の薬剤と菌が接触した際の薬剤の僅かな発育抑制効果が、1代のみでなく、耐性上昇が行われている間中存在したことは、SMの濃度が微量でも予想外に selecting effect が強いことを想像させるものであろう。又このような現象は後報にのべる如き別の条件、別の実験でも認められ、実験誤差とは考えられない。又微量の SM を含む培地で菌を継代すると、SM の影響が初期よりも後に強く表れてくる原因は、enzymatic adaptation⁹⁾ の如き現象とは逆に、SM によつて block されると考えられる enzymatic system が、SM濃度が低い為に、初めは大して影響されないが接触時間が長くなるにつれて急に Kryse を起し、SM の影響を強く受けるようになるために起ると考えれば理解出来るが、その事実は現在証明がなく、selection の機作のみでも或はこの様な現象が比濁計では認められるのかもしれないが証明がない。このように、例えば菌の発育に影響のない程度の低濃度といつても、実際には困難な問題であつて、培地の種類、或は第2報にのべた如く振盪培養か否かによつても異り、又比濁計で測定するにしても1代目のみの接触では差がないと断定出来ず、その薬剤濃度がその被検菌の発育に全然影響がないとは決定出来ないのであつて、後報に更に詳しい実験を報告する如く微量接触による耐性上昇の事実を、直接、菌と薬剤の interaction による耐性上昇と結論することには無理があると考えられ、更に詳しい検討を要するものであろう。

結 論

SM 0.05 γ /cc 含有 Tween 培地で2週間毎に42代継代して耐性上昇を示した後、耐性度の安定してしまつた SM耐性株を、更に SM 0.5 γ /cc 含有 Tween 培地で継代して各代毎の発育に対する SM の影響を測定すると共に、耐性変動を追及した結果、発育は SM 0.5 γ /cc により1代目よりも3代目に強く影響され、耐性上昇は継代とともに進み、SM の発育に対する影響のなくなると同時に耐性上昇も安定した。このことから、本菌株の耐性上昇は、接触する SM の濃度により獲得する耐性度も異なるのであつて、接触濃度が低くても高濃度耐性は容易に獲得出来、又 Distribution curve で 10 γ /cc 完全耐性菌も、SM 0.5 γ /cc で明かに発育に影響を受けることを認めた。尚、1代目よりも3代目に強く発育に影響されたその本態について考察し、微量接触による耐性上昇現象は、induction による耐性上昇現象の直接的証拠とはならないだろうことについてのべた。

文 献

- 1) 横田健：日本細菌学雑誌。10-3, 261, 1955.
- 2) 横田健：日本細菌学雑誌。10-6, 509, 1955.
- 3) 渡辺力：日本細菌学雑誌。10-3, 231, 1955.
- 4) 牛場大蔵：日本臨床。14-4, 624, 1956.
- 5) Yudkin, J.: Nature, 171, 541, 1953.
- 6) 田中完巳：日本細菌学雑誌12-8, 675, 1957.
- 7) 田中完巳：日本細菌学雑誌13-5, 386, 1958.
- 8) Dean & Hinshelwood: Symposia of the Society for Experimental Biology, Academic press, N. Y. 1949.