腸内細菌の薬剤耐性に関する研究

第8報：自然界から分離されるスルホンアミド1剤耐性菌と 多剤耐性菌のS剤耐性形質の比較

原 田 賢 治・亀 田 三 男・鈴 木 ミ ツ エ
橋 本 一・江 川 龍 起・三 橋 進

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋 進教授)

[受付: 10 月 17 日・1960 年]

わが国において、菌の確実に検出された赤痢患者は年間8~10万を数え、一向に減少の傾向を示さない。昭和24~26年頃が赤痢による死亡率は最も高かったが、治療の進歩と共に死亡率は減少の一途をたどつておる。しかるに患者数の減少をみないことは Carrier state の問題として今後に残された一つの課題である。

赤痢菌のスルホンアミド(S)剤耐性出現状況、菌型別のS剤耐性獲得の相違等については前報に述べた¹⁻³⁾。

赤痢菌薬剤耐性の第一の問題はS剤耐性であった。ついで Streptomycin (SM), Chloramphenicol (CM), Tetracyclin 系薬剤 (TC) 等の抗生剤に対する耐性化が注目されておつた。

偶々北本等⁴⁾によつてSM, CM, TC, Sの4剤に高度耐性の赤痢菌の検出が報告され、吾々の一人原田^{5,6)}によつて *E. coli*, *Citrobacter* も又4剤 (SM, CM, TC, S), 3剤 (SM, CM, S), 耐性の形で分離された。落合等⁷⁾ 秋葉等⁸⁾ は上述の多剤耐性形質が混合培養によつて *E. coli* と *Shigella* 相互間に伝達される事を明らかにした。吾々は耐性因子 (R因子) が腸内細菌科の総ての属に伝達可能であり、又その機構は菌と菌との接触による "Conjugation" によるもので、F因子 Polarity と無関係⁹⁻¹²⁾ である事を明らかにし、赤痢菌の耐性は遺伝学的にも大きい問題を提供する段階に至つた。耐性の伝達が Conjugation による事は渡辺等¹³⁾ の Blendor による実験からもますます確実視されるに至つた。

本報においては自然界から分離されるS1剤耐性菌と、3剤耐性 r_3 (CM, SM, S), 又は4剤耐性 r_4 (CM, TC, SM, S) として分離される多剤耐性菌のS剤耐性の耐性形質の比較を試みた。

材料および方法

使用菌株：混合培養による薬剤耐性の Donor には、自然S1剤耐性菌としては *Shigella flexneri* 2 a 1216 (2 a-1216 S^r), 2 b 40 (2 b-40 S^r), 2 b 1103 (2 b-1103 S^r), 3 b 2 (3 b-2 S^r), var. x 1220 (var. x-1220 S^r), 及び var. y 13 (var. y-13 S^r) 等の6株を用いた。 r_1 (TC), r_3 (CM, SM, S) 又は r_4 (CM, TC, SM, S) 菌には上述の菌株に *E. coli* K-12 Strain Prot. F⁺ r_1 (TC), *E. coli* C-41 r_3 又は *E. coli* O-26 G r_4 から混合培養によつて実験的に R (TC), R(CM, SM, S) 又は R (CM, TC, SM, S) の標識を伝達されたものを使用した。

Recipient としては、4剤 (CM, TC, SM, S) 感受性菌に *E. coli* O-26 G (O-26), *E. coli* K-12 Strain Prot. F⁺ (K-12 F⁺), *S. typhi* H 901 W を、SM 1 剤耐性菌としては *E. coli* K-12 Strain W-1177 aux. F⁻(W-1177 SM^r), W-1367 aux. Hfr (W-1367 SM^r) を、TC 1 剤耐性菌には実験的に、混合培養で *Sh. Sonnei* 488 r_1 (TC) から R (TC) の伝達された *E. coli* O-26 G r_1 (TC) を使用した。

耐性の伝達法：前報記載の混合培養の方法に従つた。耐性化した Recipient の選択にはスルフアイソキサゾール (100 µg/ml) 又は CM (25 µg/ml) を加えた前報¹³⁾ 記載の ALGa 又は AGGa 培地を、使用し、Recipient が

HARADA Kenji, KAMEDA Mitsuo, SUZUKI Mitsue, HASHIMOTO Hajime, EGAWA Ryuki and MITSUHASHI Susumu: ON THE DRUG-RESISTANCE OF ENTERIC BACTERIA 8) Comparative study of sulfanilamide-resistance between single sulfanilamide-resistant and multiple-resistant strains. Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University.— Jap. J. of Bact, 16(5), 371-374, 1961.

表 1 薬剤耐性別伝達実験成績

Donor Marker Recipient	2a-1216				2b-40				2b-1103				3b-2				var. x-1220				var. y-13			
	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄	S ^r	r ₁ (TC)	r ₃	r ₄
O-26 G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K-12 F ⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W-1177 SM ^r	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O-26 G r ₁ (TC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

註: S^r=スルファマイソキサゾールに >400 µg/ml 耐性
 r₁=CM, SM (>100 µg/ml), S (>400 µg/ml) に耐性
 r₃=CM, TC, SM (>100 µg/ml), S (>400 µg/ml) に耐性
 r₄=耐性化した Recipient 集落数 (1-10 菌)
 + = 耐性化した Recipient の集落極めて多数 (Confluent colonies)
 — = 耐性化しなかった

auxotroph 即ち *E. coli* K-12 W-1177の場合 AGGa 培地に Threonine, Leucine, Biotin, B₁ を *E. coli* K-12 W-1367 の場合上記の外に更に Methionine を加えて用いた。選択培地に塗抹する菌体は0.85%滅菌生理食塩水で3回洗滌したものをを用いた。伝達実験はすべて同一条件で同時に行つて伝達能を比較した。

アクリフラビン処理による耐性因子の除去法: 赤痢菌の 2 a-1216 r₄ 及び 2 b-40 r₄ の 2 株を Brain Heart Infusion Broth (BHI-Broth) に 37°C 18 hrs 培養し, これを約 10⁶ 菌/ml 宛アクリフラビン加 (5~50 µg/ml) BHI-broth に接種して, 37°C, 24 hrs 培養した後 BTB 乳糖寒天培地に塗抹して 37°C で 18 hrs 培養し, 発生した集落を Heart infusion agar 又は S 加 (スルファイソキサゾール 100 µg/ml 含有) A T C A 培地 (Med. A 1000 ml, Casamino acid 2 g, Tryptophan 50 mg, Vitamin B₁ 10 mg, Nicotinic acid 2 mg, Glucose 5 g, Agar 15 g, pH 7.2) に複写して感性化した集落を検査した。

実験成績

自然 S 1 剤耐性の伝達性: 赤痢菌の 2 a-1216 S^r, 2 b-40 S^r, 2 b-1103 S^r, 3 b-2 S^r, var. x-1220 S^r, var. y-13 S^r 等を Donor として S 剤耐性の伝達を試みた処 Recipient の感受性菌, T C 1 剤, S M 1 剤耐性菌の何れにも S 剤耐性の伝達は認められなかった (表 1 参照)。

次に実験的に R (TC) を伝達された上述の S^r 菌 6 株を Donor として再び耐性の伝達を試みた処, R (TC) は Recipient の感受性菌及び S M 1 剤耐性菌の総てに伝達できるが, S 剤耐性の伝達は認められなかった。更に r₁ (TC) S^r 菌との混合培養で T C 1 剤耐性になったこの Recipient を Donor として 4 剤感受性の *S. typhi* H 901 W へ耐性の伝達を試みた。その結果 R (TC) は良く伝達されるが S 剤耐性は伝達不能で, 前述の赤痢菌 → 大腸菌への伝達実験で S^r 因子は Genotype としても伝達されていない事を知つた。

R (CM, SM, S) 又は R (CM, TC, SM, S) を獲得した菌株の S 剤耐性の伝達能: 前述した S 剤耐性を移し得ない S 1 剤耐性菌 6 株に実験的に混合培養で R (CM, SM, S) 又は R (CM, TC, SM, S) を伝達し 3 剤又は 4 剤耐性化してその伝達能を調べてみると Recipient の感受性菌及び T C 又は S M 1 剤耐性菌の総てに R (CM, SM, S) 又は R (CM, TC, SM, S) が容易に伝達された。従つて S 剤耐性には自然界から分離され, 混合培養で伝達不可能の S^r 菌と, R (CM, SM, S) 又は R (CM, TC, SM, S) 因子と一緒に伝達され S 剤耐性を発現するものと

表 2 アクリフラビン処理による自然 S 1 剤耐性と多剤耐性 (r₁) の比較

供 試 菌	接種菌数 (per ml)	アクリフラビン加 BHI-broth 24 h 培養後の菌数 (per ml)	感 性 化 頻 度	耐 性 値 (μg/ml)			
				CM	TC	SM	S
2 a-1216 r ₁ (CM, TC, SM, S)	1.1×10 ⁶	4.8×10 ⁸	25.7%	100 (0.39)	200 (0.78)	400 (6.25)	>400 (>400)
2 b-40 r ₁ (CM, TC, SM, S)	8.5×10 ⁵	4.6×10 ⁶	21.1%	200 (0.78)	200 (3.13)	400 (0.78)	>400 (>400)

註: () 内の数字は感性化した菌株の耐性値を示す。

があることが明らかになった (表1)。

耐性因子の人工除去による自然 S 1 剤耐性菌 2 株に、混合培養で実験的に R (CM, TC, SM, S) を伝達し 4 剤耐性化した 2 a-1216 r₁ S^r, 2 b-40 r₁ S^r の 2 菌株をアクリフラビン加 BHI-Broth で培養し耐性因子の人工的除去を試みた。その結果は第 2 表に示す如く 2 a-1216 r₁ S^r は 25.7%, 2 b-40 r₁ S^r は 21.1% の頻度で、しかも何れの集落も CM, TC, SM に感受性で S のみに耐性の原株の形質に復原した事が認められた。

次にアクリフラビン処理で原株の形質に復原した S 1 剤耐性菌を再び Donor として S 耐性の形質の伝達を試みたが、Recipient の 4 剤感受性菌及び TC 又は SM 1 剤耐性菌の何れの菌株にも S 剤耐性は伝達できない事を知った。

考 察

1945 年—1955 年にかけて赤痢の治療に S 剤が賞用された。しかるに赤痢菌の S 剤耐性獲得は極めて速やかで、ある菌型においては分離される菌の 80—100% が S 剤に高度耐性の状況である¹⁻³⁾。

抗生剤の出現に及んで治療は急速に S 剤から抗生剤へと切換えられ、疫学的には赤痢菌の抗生剤耐性化に注意がむけられた。

わが国の病院検査室、保健所、各研究所等においては、極めて広汎に赤痢菌の薬剤耐性が調査せられ、これが耐性研究の大きい基礎になり得た事には異論がない。しかしながら抗生剤と S 剤とを分離して考察する習慣が強く、往々にして何れか一方の検査を行って他方の検査をおろそかにする憾みがあった。

これ迄の遺伝学の教える処によると Sodium azide, Phage 耐性, SM 耐性等は菌の染色体上に位置づけられた Gene による事が明らかにされて^{15,16)}, Recombination の実験等による解析からも SM^r, T^r, azide 耐性遺伝子の染色体上の位置づけは確定されておる。

菌と菌との接触で伝達される薬剤耐性⁹⁻¹²⁾ は、伝達性

(Infectivity)⁶⁻¹²⁾, アクリフラビン処理による耐性の除去¹⁸⁻²⁰⁾, Phage による Transduction^{21,22)} 等の実験から F 因子²³⁾, Col 因子²⁴⁾, Prophage 等に極めて近い性状のものと考えられるに至った。渡辺は耐性因子と伝達因子とを別個に考え、Resistance transfer factor (RTF) の考え方を提唱しておる²⁵⁾。吾々は伝達性のある耐性因子を R 因子と称する事を提唱した²⁾。R 因子と RTF 因子との関係は今後の実験に待たねばならない。

自然 S 耐性は吾々の今回の実験で得られた 2 つの事実、即ち伝達性のない事、及びアクリフラビン処理による除去の不可能な事等から考慮して S^r の形式で発現される S 剤耐性と R 因子の形式で発現される S 剤耐性とは遺伝学的に異つた遺伝単位によるものと考えられる。

落合等²⁶⁾は北本等の分離した多剤耐性菌の示す S 耐性は、もともとの菌が偶然 S 耐性であつた為であろうと推論した。多剤耐性菌の示す S 耐性には以上の実験から [S^r, R (CM, TC, SM, S)], [S^r, R (CM, SM, S)] と S^r のない R (CM, TC, SM, S), R (CM, SM, S) によつて発現される S 耐性の種類があるものと考ええる。S^r と R 因子によつて支配される S 耐性の遺伝学的解析は今後に残された課題である。

結 論

1. 自然界から分離された S 1 剤耐性菌の示す S 耐性は混合培養によつて伝達されない。即ち感染性がない。

2. 自然 S 1 剤耐性菌は R (CM, TC, SM, S) 又は R (CM, SM, S) が伝達されると夫々 4 剤又は 3 剤耐性が発現する。この菌は又混合培養で他の菌に R (CM, TC, SM, S) R (CM, SM, S) 因子を伝達できる。

3. 自然 S 1 剤耐性菌が R (CM, TC, SM, S) 又は R (CM, SM, S) 因子を伝達されて、4 剤又は 3 剤耐性となつた菌はアクリフラビン処理によつて R 因子を失つて (CM, TC, SM) 又は (CM, SM) に感受性で、S 1 剤耐性菌に復帰する。この S 1 剤耐性は伝達がない。

4. 自然 S 1 剤耐性と伝達性のある多剤耐性によつて
発現される S 耐性とは異つた遺伝単位によつて支配され
るものと考えられる。

文 献

- 1) 三橋進：日本臨床，印刷中。
- 2) 三橋進：科学(岩波)，印刷中。
- 3) 三橋進：医人，印刷中。
- 4) 北本治，他：日本伝染病学会雑誌，**30**, 403, 1956.
- 5) 松山達夫，原田賢治，他：日本医事新報，**1795**, 22, 1958.
- 6) 原田賢治，三橋進：日本伝染病学会雑誌，投稿中。
- 7) 落合国太郎，他：日本医事新報，**1861**, 34, 1959.
- 8) 秋葉朝一郎，他：日本医事新報，**1866**, 46, 1960.
- 9) 原田賢治，三橋進，他：伝研予研學術集談会，1960年1月。
- 10) 原田賢治，三橋進，他：日本細菌学雑誌，稿投中。
- 11) 三橋進：医学と生物学，**55**, 49, 1960.
- 12) Mitsuhashi, S., Harada, K and Hashimoto, H. :

Jap. J. Exp. Med., **30**, 1790, 1960.

- 13) 原田賢治，三橋進，他：日本細菌学雑誌。(第3報及第5報，第6報，第7報)，印刷中。
- 14) 渡辺力，深沢俊夫：医学と生物学，**56**, 98, 1960.
- 15) Hayes, W. : J. Gen. Microbiol., **16**, 97, 1957.
- 16) Watanabe, T and Watanabe, M. : J. Gen. Microbiol., **21**, 30, 1959.
- 17) Harada, K., Mitsuhashi, S., et al : Jap. J. Exp. Med., **30**, 289, 1960.
- 18) 亀田三男，三橋進，他：伝研予研學術集談会，1960年5月。
- 19) Mitsuhashi, S., et al : Nature, in press
- 20) 渡辺力，深沢俊夫：医学と生物学，**56**, 71, 1960.
- 21) 中谷林太郎，他：伝研予研學術集談会，1960年2月。
- 22) 渡辺力，深沢俊夫：医学生物学，**56**, 64, 1960.
- 23) Hayes, W. : Nature, **169**, 118, 1952.
- 24) Frédéricq, P. : Rev. belge Path., Suppl. 4, 1948.
- 25) 渡辺力，他：医学と生物学，**56**, 201, 1960.
- 26) 落合国太郎：日本医事新報，**1727**, 12, 1957.