腸内細菌の薬剤耐性に関する研究

第14報：薬剤耐性因子のアクリフラビン処理による 人工的除去について

亀田 三男・原田 賢治・鈴木ミツエ・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：9月1日・1961年]

菌と菌との recombination に際して、染色体移動の方向性 (polarity) を決定するのに F 因子の存在が相定せられた。

F 因子の存在様式に細胞質性と染色体上にくみ入れられたものとの二つがある。

広田、飯島等^{1,2)} によつてアクリジン系色素処理で F 因子が容易に脱落することが発見せられ、この方面に一段の進歩がみられた。しかし F 因子が細胞質に存在する場合容易にアクリフラビン処理によつて脱落するが、染色体上にくみ入れられた場合の F 因子 (Hfr) はアクリフラビン処理に抵抗性のあることが明らかにされている。

伝達性ある薬剤耐性因子 (R⁺) と略) の細菌遺伝学的意義は極めて大きい。R 因子の細胞内存在様式、従来の遺伝因子との関係を知ることは R 因子解明の一つの手がかりである。

本邦においては R 因子がアクリフラビン処理によつて容易に除去し得る結果について報告する。

実験材料ならびに方法

使用菌株：耐性標識としては、chloramphenicol (CM), tetracycline 系薬剤 (TC), streptomycin (SM), および sulfanilamide (SA) の 4 剤を用いた。

Shigella としては 4 剤に感受性の *Sh. flexneri* 3a S-86 が混合培養によつて 4 剤、3 剤、1 剤に耐性化した *Sh. flexneri* 3a S-86 r₄ (CM, TC, SM, SA), *Sh. flexneri* 3a S-86 r₃ (CM, SM, SA), *Sh. flexneri* 3a S-86 r₁ (TC) の 3 株。

患者からの分離株で SA 耐性に、4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達されて耐性化した *Sh. flexneri* 2b SH-16 r₄・SA^r, *Sh. flexneri* 2a 1216 r₄・SA^r の 2 株。

患者から分離され 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達できる 4 剤耐性菌 *Sh. flexneri* 2a 1144 および *Sh. flexneri* 3a 86 の 2 株。

患者から分離され耐性因子を伝達できない 4 剤耐性菌として *Sh. flexneri* 2b 547-59 の 1 株 (大腸菌 50 株を recipient として伝達不能)。

以上合計 7 株を用いた。

大腸菌としては耐性の伝達をうけてそれぞれ 4 剤、3 剤、1 剤耐性化した *E. coli* 0-26G r₄ (CM, TC, SM, SA), *E. coli* 0-26G r₃ (CM, SM, SA), *E. coli* 0-26G r₁ (TC) の 3 株および結核患者より分離され、SM 1 剤耐性因子の伝達能のある *E. coli* C-446 r₁ (SM) の合計 4 株を使用した。

いずれの菌も単個コロニーから増菌したものをを用いた。

acriflavine に対する抵抗性の測定法：acriflavine を種々の濃度に含む heart infusion broth (BHI-broth と略) を調製し、これに BHI-broth 培養菌を 1 白金耳量宛接種し、37°C 24 時間後発育の有無を観察した。

acriflavine 処理による R 因子の除去法：BHI-broth に acriflavine を 5-20 μg/ml 加え (acriflavine の添加量は各菌株の発育可能な最高濃度)、これに BHI-broth 37°C 16-18 時間培養菌を約 10⁶/ml 接種し、37°C 24 時間後、BTB 乳糖加寒天培地の平板に散在するコロニーを得て、目的の各薬剤を含む (CM: 25 μg, TC: 25 μg, SM: 25 μg, SA: 50 μg) heart infusion 寒天培地 (HI-寒天培地と略) あるいは SA の耐性値測定用の半合成培地^{4,5)} にレプリカ培養法⁶⁾ で 37°C 20 時間培養後、薬剤を含む培地に発育せず、薬剤を含まない HI-寒天培地に発育するコロニーを Kligler の確認培地に移植し、その培地の性状およびスライド凝集反応で当該菌株であることを確かめ、さらにそれぞれの系について 1 部のものを原株と比

表 1. アクリフラビン処理による感受性菌の出現とその頻度

菌 株	アクリフラ ビン添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	接種菌数	24時間後の 生 菌 数	感受性 コロニ ー数	検査 コロニ ー数	感応性 化の頻 度(%)	備 考
<i>Sh. flex.</i> 3a S-86 r_4	10 0	8.6×10^5 9.1×10^5	1.2×10^5 1.1×10^9	241 0	517 1198	46.6 0	CM, TC, SM, SA に感受性
" r_3	10 0	8.5×10^5 8.8×10^5	4.2×10^7 1.0×10^9	0 0	375 1177	0 0	
" r_1 (TC)	10 0	9.2×10^5 9.0×10^5	7.5×10^8 1.1×10^9	201 0	583 1116	34.5 0	TC 耐性が消失
<i>Sh. flex.</i> 2b SH-16 r_4 ・SA ^r	10 0	1.0×10^6 9.6×10^5	4.6×10^6 1.6×10^9	34 0	161 102	21.1 0	CM, TC, SM に感受性, SA 耐性
<i>Sh. flex.</i> 2a 1216 r_4 ・SA ^r	5 0	9.6×10^5 9.7×10^5	4.8×10^8 1.2×10^9	56 0	218 407	25.7 0	CM, TC, SM に感受性, SA 耐性
<i>Sh. flex.</i> 2a 1144 4剤耐性	10 0	9.6×10^5 9.9×10^5	5.2×10^8 1.8×10^9	1092 0	1121 1117	97.4 0	CM, TC, SM に感受性, SA 耐性
<i>Sh. flex.</i> 2b 542-59 4剤耐性	5 0	8.9×10^5 9.0×10^5	1.2×10^9 1.4×10^9	591 0	881 1213	67.1 0	CM, TC, SM に感受性, SA 耐性
<i>Sh. flex.</i> 3a 86 4剤耐性	10 0	9.3×10^5 9.0×10^5	1.2×10^8 1.0×10^9	402 0	1003 1068	40.1 0	CM, TC, SM, SA に感受性
<i>E. coli</i> O-26G r_4	20 0	8.5×10^5 9.0×10^5	5.4×10^8 2.1×10^9	5 0	579 1589	0.9 0	CM, TC, SM, SA に感受性
" r_3	20 0	9.6×10^5 1.0×10^6	5.2×10^7 2.2×10^9	15 0	547 881	2.7 0	CM, SM, SA 耐性が消失
" r_1 (TC)	20 0	1.2×10^6 9.6×10^5	3.8×10^5 2.3×10^9	0 0	579 364	0 0	
<i>E. coli</i> C-446 r_1 (SM)	20 0	1.1×10^6 1.2×10^6	2.0×10^9 2.0×10^9	70 9	333 802	21.0 1.1	SM 耐性が消失 同上

r_4 : CM, TC, SM, SA 耐性 r_3 : CM, SM, SA 耐性 SA^r: 伝達性のない SA 耐性

較しつつ耐性値を測定した。

耐性値測定法: 福見等⁷⁾の記載した方法にしたがった。

実験結果

赤痢菌の場合: 薬剤耐性因子を伝達されてそれぞれ 4 剤, 3 剤, 1 剤耐性の *Sh. flexneri* 3a S-86 r_4 , r_3 , r_1 菌を acriflavine で 24 時間処理した後得られたコロニーの中で, 感性菌と耐性菌の比を調べると r_4 (CM, TC, SM, SA), r_1 (TC) 菌の場合それぞれ 46.6% 34.5% の割合に感性化された。*Sh. flexneri* 3a S-86 r_3 (CM, SM, SA) の場合 acriflavine 処理後に調査した 375 個のコロニーの中 1 個も感性化されたものが得られなかった (表 1)。

患者から分離された SA 耐性分離株で 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達されて多剤耐性化した *Sh. flexneri* 2b SH-16 r_4 ・SA^r および *Sh. flexneri* 2a 1216 r_4 ・SA^r の場合 acriflavine 処理でそれぞれ 21.1%, 25.7% の割合に感性化され, いずれの場合も CM, TC, SM に感受性で SA 耐性のみが残った (表 1)。

赤痢患者から分離され 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子の伝達可能な 4 剤耐性 *Sh. flexneri* 2a 1144 および *Sh. flexneri* 3a 86 を acriflavine で処理した場合, それ

ぞれ 97.4%, 40.1% の割合に感性化された。耐性を失って感性化した菌は *Sh. flexneri* 2a 1144 ではすべて CM, TC, SM に感受性で SA 1 剤にのみ耐性であった。*Sh. flexneri* 3a 86 では感性化したコロニーのすべてが CM, TC, SM, SA の 4 剤に感受性であった (表 1)。

赤痢患者から分離され耐性因子を伝達できない 4 剤耐性の *Sh. flexneri* 2b 542-59 を acriflavine で処理した場合 67.1% の割合に感性化された。耐性を失って感性化した菌はすべて CM, TC, SM, に感受性で SA 1 剤に耐性であった (表 1)。

大腸菌の場合: R 因子を伝達されて 4 剤 (CM, TC, SM, SA), 3 剤 (CM, SM, SA), 1 剤 (TC) 耐性菌となつた *E. coli* O-26G r_4 , r_3 , r_1 菌を acriflavine 処理すると, r_4 , r_3 菌の場合それぞれ 0.9%, 2.7% の割合に耐性の消失がみられた。TC 1 剤耐性菌の場合 579 株中感性菌は 1 株も得られなかった。また r_4 , r_3 菌で耐性を失って感性化したものはそれぞれすべての耐性標識を失って全部の薬剤に感性化した (表 1)。

また自然分離株で SM 耐性伝達能のある *E. coli* C-446 r_1 (SM) を acriflavine で処理すると 21% の割合に SM 耐性を失った感性菌が出現した (表 1)。

実験に使用した種々の菌株と acriflavine 処理後感性化された菌株の CM, TC, SM, SA の 4 剤に対する薬剤

表 2. アクリフラビン処理によって得られた感受性菌株とその原株の耐性値

菌 株	原 株 の 耐 性 値 (μg/ml)				感 性 化 後 の 耐 性 値			
	CM	TC	SM	SA	CM	TC	SM	SA
<i>Sh. flex.</i> 3a S-86 r ₄	200 (1.56)	200 (1.56)	>400 (3.13)	>400 (6.25)	1.56	1.56	3.13	6.25
" r ₃	200 (1.56)	0.78 (1.56)	>400 (3.13)	>400 (6.25)	1.56	1.56	3.13	6.25
" r ₁ (TC)	1.56 (1.56)	200 (1.56)	3.13 (3.13)	6.25 (6.25)	1.56	1.56	3.13	6.25
<i>Sh. flex.</i> 2b SH-16 r ₄ ・SA ^r	100 (0.78)	200 (0.78)	400 (3.13)	>400 (>400)	0.78	0.78	3.13	>400
<i>Sh. flex.</i> 2a 1216 r ₄ ・SA ^r	400 (0.39)	200 (0.78)	400 (6.25)	>400 (>400)	0.39	0.78	3.13	>400
<i>Sh. flex.</i> 2a 1144 4剤耐性	>100	>100	>100	>400	0.39	0.78	3.13	>400
<i>Sh. flex.</i> 2b 542-59 4剤耐性	>100	50	>100	>400	0.39	0.78	3.13	>400
<i>Sh. flex.</i> 3a 86 4剤耐性	200	100	100	>400	1.56	1.56	3.13	6.25
<i>E. coli</i> O-26G r ₄	400 (6.25)	200 (3.13)	200 (3.13)	>400 (6.25)	6.25	3.13	3.13	6.25
" r ₃	400 (6.25)	3.13 (3.13)	100 (3.13)	>400 (6.25)	6.25	3.13	3.13	6.25
" r ₁ (TC)	3.13 (6.25)	200 (3.13)	1.56 (3.13)	6.25 (6.25)	6.25	3.13	3.13	6.25
<i>E. coli</i> C-446 r ₁ (SM)	3.13	6.25	400	1.56	3.13	6.25	3.13	1.56

() 内の数字は *Sh. flexneri* 3a, *E. coli* O-26G, *Sh. flexneri* 2b SH-16 SA^r, *Sh. flexneri* 2a 1216 SA^r の耐性を伝達される前の耐性値を示す。

r₄: CM, TC, SM, SA 耐性 r₃: CM, SM, SA 耐性

耐性値は表2に示した。

R因子の伝達を受けて耐性化された菌は *Shigella*, *Escherichia* とともに acriflavine 処理で感性化するとR因子伝達前の原株の耐性値にもどる。

患者から分離された SA 1 剤耐性の *Sh. flexneri* 2b SH-16 SA^r, *Sh. flexneri* 2a 1216 SA^r が 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子をうけて 4 剤耐性化した菌は acriflavine 処理をうけるとR因子伝達前の SA 1 剤耐性菌にもどることが明らかになった。また 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達することのできる 4 剤耐性の *Sh. flexneri* 2a 1144 および伝達できない 4 剤耐性の *Sh. flexneri* 2b 542-59 の場合 acriflavine 処理で耐性が失われ SA 耐性のみが残ることが注目される (表2)。この二つの菌株の 4 剤耐性ははもとも SA 1 剤耐性に R (CM, TC, SM, SA) 因子が伝達された SA^r・r₄ (CM, TC, SM, SA) 菌であることが考えられる。

既に自然分離株で伝達能のない SA 耐性 (SA^r) は acriflavine 処理で除去することが不可能であることは既に報告した^{8,9)}。伝達性のある SA 耐性, すなわち r₄ (CM, TC, SM, SA), r₃ (CM, SM, SA) 菌は acriflavine 処理で容易に他の耐性標識とともに SA 耐性も acriflavine 処理で容易に除去できることから SA^r と伝達性ある SA 耐性とは遺伝学的に異なるものと思われる。acriflavine 無処理の場合, しらべた範囲のコロニー中には耐性因子が自然消失して感性化した菌はほとんど検出することができなかった。ただし *E. coli* C-446 r₁(SM) の場合にのみ約 1% の割に SM 耐性を失って感性化した菌を得ることができた。

なお acriflavine 処理によって耐性を失って感性化した菌と原株について acriflavine 耐性値を比較したが両者の間に差異を認めなかった。すなわち acriflavine 処理は acriflavine 耐性菌を選択する結果ではないことが

わかる。

考 察

混合培養によつて伝達性のある薬剤耐性菌が発見せられ、その疫学的、遺伝学的意義は大きい。この伝達の機構は deoxyribonucleic acid による transformation, 相互に耐性伝達可能な菌から得られる temperate phage による transduction が否定せられ、さらに無菌フィルターを装置した特殊培養管によつて耐性伝達の不可能な事実から phage を含めた未知の濾過因子が否定せられ、菌と菌との接触によるすなわち conjugation によることが確定せられた^{10,11)}。なお混合培養による耐性伝達に種々の proteinase, ribonuclease, deoxyribonuclease は全く影響を示さなかつた^{12,13)}。

ブレンダー処理で耐性伝達が中断されることから conjugation によることがますます確実視されるに至つた¹⁴⁾。

さらに R 因子は PI *kc*^{15,16)}, P-22¹⁷⁾, *E*₁₅¹⁸⁾, *E*₃₄¹⁸⁾ phage によつて transduction されることが明らかにされ、R 因子の遺伝学的解明に新しい武器を加えた。しかるに R 因子と、これ迄に知られた他の gene との間の関係は明らかにされておらず、R 因子の細胞内存在様式も明らかでない。混合培養によつて R 因子が伝達可能なこと^{10,11,19,20)}、R 因子の polarity と無関係なこと^{10,21,22)}から因子とは異つた因子、恐らくは細胞質に存在する新しい遺伝単位であることが予想されていた。

広田、飯島等によつて明らかにされた F 因子の acriflavine 処理による人工的除去の実験にならつて筆者等も伝達性のある耐性菌を acriflavine 処理を施して耐性の喪失することを確認した。しかるに抗生剤耐性菌出現以前に疫学的に注目されていた SA 1 剤耐性は acriflavine 処理で脱落せず^{8,9)}、また SA 1 剤耐性菌に 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達して 4 剤耐性化した菌に acriflavine 処理を施すと SA 1 剤耐性のみが残ることから acriflavine 処理に抵抗のある SA 1 剤耐性は chromosomal に位置づけられ、acriflavine 処理によつて容易に消失する R 因子は菌の細胞質に存在する遺伝因子と考えられる。

赤痢患者から分離された 4 剤耐性 R (CM, TC, SM, SA) 因子をもつ *Sh. flexneri* 2a 1144, *Sh. flexneri* 2b 542-59 菌は acriflavine 処理で SA 耐性のみ残ることから SA^r 耐性菌に R (CM, TC, SM, SA) 因子が感染して SA^r · *r*₄ (CM, TC, SM, SA) 菌となつていたものと考えられる。

結 論

1. 伝達性のある薬剤耐性因子 R は acriflavine 処理で容易に消失して感性化される。
2. R 因子を消失して感性化される率は *E. coli* に比し *Shigella* の方が高い。
3. acriflavine 処理によつて除去できない。sulfanilamide 耐性 (SA^r) がある。
4. SA^r 菌に R (CM, TC, SM, SA) 因子を伝達して 4 剤耐性化された菌も acriflavine 処理で R 因子のみが消失する。
5. 自然界から分離され、4 剤耐性 (CM, TC, SM, SA) 因子をもつ 4 剤耐性菌の中には *r*₄ 菌と SA^r · *r*₄ 菌の二つがあることが考えられる。acriflavine 処理で前者は 4 剤感受性に後者は SA のみ耐性菌となる。

本報は 1960 年 6 月伝研學術集談会において発表した。その席で渡辺力博士より同様の事実の得られておることについて追加発表があつた。

文 献

- 1) Y. Hirota: Nature, 178, 92, 1956.
- 2) Y. Hirota, T. Iijima: Nature, 180, 655, 1957
- 3) 三橋 進: 科学, 30, 12, 1960.
- 4) 三橋 進・原田賢治・橋本 一: 医学と生物学, 55, 3, 1960.
- 5) 三橋 進・橋本 一・原田賢治・鈴木ミツエ・亀田三男・松山達夫: 日本細菌学雑誌, 15, 9, 1960
- 6) Lederberg, J. and Lederberg, E. M.: J. Bact. 63, 399, 1952.
- 7) 福見秀雄・他: 日本医事新報, 1513, 14, 1953.
- 8) 原田賢治・三橋 進・他: 微生物遺伝研究会 (東京) 1960 年 6 月.
- 9) 原田賢治・三橋 進・他: 日本細菌学雑誌, 投稿中.
- 10) 原田賢治・三橋 進・他: 伝研, 予研學術集談会 1960 年 1 月.
- 11) 原田賢治・亀田三男・鈴木ミツエ・三橋 進: 日本細菌学雑誌, 16, 1, 1961.
- 12) 原田賢治・三橋 進・他: 日本細菌学会関東支部例会 (横浜), 1960 年 4 月.
- 13) 原田賢治・三橋 進・他: 日本細菌学雑誌, 投稿中.
- 14) 渡辺 力・深沢俊夫: 医学と生物学, 56, 98, 1960.
- 15) 中谷林太郎・中村明子: 伝研, 予研學術集談会, 1960 年 2 月.
- 16) 中谷林太郎: 医学と生物学最近の展望, 第 1 集, 1960 年.
- 17) 渡辺 力・深沢俊夫: 医学と生物学, 56, 64,

1960.
18) 原田賢治・三橋 進・他：日本細菌学会関東支部
総会, 1960年11月.
19) 落合国太郎・山中敏樹・木村勝直・沢田 収：日
本医事新報, 1816, 34, 1959.
20) 秋葉朝一郎・小山恒太郎・一色義人・木村貞夫・

- 福島敏雄：日本医事新報, 46, 1866, 1960.
21) 三橋 進：医学と生物学, 55, 2, 1960.
22) S. Mitsuhashi, K. Harada, M. Kameda, M.
Suzuki and R. Egawa: J. J. Exp. Med., 30,
4, 1960.

Drug-Resistance of Enteric Bacteria

14) Artificial elimination of transmissible drug-resistance (R) factor by treatment with acriflavine

M. KAMEDA, K. HARADA, M. SUZUKI and S. MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan

Transmissible drug-resistance (R) factor was artificially lost by treatment with acriflavine. The loss frequency of R factor from *Shigella* was more higher than that from *E. coli*. There are two kinds of bacteria which is resistant to four drugs (CM, TC, SM and SA); R⁺ (CM. TC. SM. SA) SA^r and R⁺ (CM. TC. SM. SA). Following elimination of R factor by treatment with acriflavine, the former becomes SA^r cell and the later becomes R⁻ (sensitive) cell.