浅川賞受賞論文

細菌における伝達性、非伝達性プラスミドと
その疫学的、生化学的および遺伝学的背景

三橋 進, 橋本 一, 原田 賢治*

群馬大学医学部 微生物学教室

前橋市昭和町 〒371

*群馬県衛生研究所

前橋市岩神町 3-21-19 〒371

〔受付：9月17日, 1975年〕

1. R 因子発見の背景
2. 耐性菌の疫学
3. 耐性プラスミドの遺伝
4. 耐性プラスミドの生化学
5. 将来への展望

1. R 因子発見の背景

スルホンアミド剤 (SA), 抗生剤の発見前は細菌感染症は人類にとって死亡原因の筆頭を占めるものであった。夏の高温多湿と下水道の不備からわが国では赤痢菌感染が長い年月の課題で、これが法定伝染病であった関係からこの方面のデータが多く集積された。

SA 製剤の発見後まもなく、その誘導体であるスルファグアニジン、スルファチアゾールがグラム陽性菌と同様にグラム陰性菌にも有効であることが明らかになって、赤痢の治療に多量に使われ、当時これらの薬剤は赤痢にもきわめて有効であった。ところが大量に使用後4～5年を経て、赤痢菌が急速に SA 耐性化したことが判明した。当時各地で行われた調査の集計を図1に示した。分離菌の80～90%が SA 耐性化していることがうかがわれる。

幸いなことに当時わが国ではようやくしてストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC) 系薬剤, クロラムフェニコール (CM) の生産が開始され、SA とともにさかんに細菌感染症の治療に使われ、そのすぐれた効果に臨床家は讃嘆の声をおしなかつた。事実、1955年ころまでのわが国の赤痢菌は SA にはその多く

が耐性であつたが、新たに登場した抗生剤に対してそのほとんどは感受性であつて、まれにえられる耐性菌はその都度学会に報告されるほど少ないものであつた。当時これらの抗生剤耐性菌はきわめて少ないことがうかがわれるが、しかし年とともに耐性菌は増加していった。抗

図 1. 耐性赤痢菌の出現頻度

図 2. わが国における抗生剤生産と耐性赤痢菌の増加

生剤の生産量の増加とともに抗生剤耐性菌の増加した模様を図 2 に示した。抗生剤耐性菌のうち CM 単剤耐性菌がきわめて少ないことが特徴で、(TC・CM・SM) の 3 剤耐性菌が急激に増加していることが目立つ。しかもこの 3 剤耐性菌は必ず SA 耐性をともなっている。

赤痢菌のなかで抗生剤、SA を含め多剤耐性菌がわが国で最初に分離されたのは 1952 年のことで、この菌は (TC・SM・SA) の 3 剤に耐性であつた。これに次いで 1955 年東京において (TC・CM・SM・SA) の 4 剤耐性赤痢菌が分離され、われわれを驚かした。多剤耐性赤痢菌の分離がなぜわれわれの関心を強くひくかは、一つには臨床治療しにくいことにもよるが、理論的には系統の異なる薬剤の 2 剤、3 剤に耐性化する割合は少ないとされていたからである。

1952、1955 年の多剤耐性菌分離の報告にひきつづいて 1956 年に東京における多剤耐性菌による赤痢の発生が報告された。しかし当時年間 10 万例をこえる赤痢患者のなかでわずかに 3 例にすぎなかつたが、これらの発表は、臨床的にも遺伝学的にも強くわれわれの関心をひいた。

当時わが国において報告された赤痢菌の多剤耐性の分離の模様を表 1 に示した。わが国における赤痢を含めての伝染性疾患の診断とその細菌学的調査のレベルの高いことを考えると、多剤耐性菌の少なかつたことは確実である。

われわれが群馬地区において経験した例は 1957 年 12 月であつた。われわれの経験で興味あることは、同一人より 2 種の菌が同じ型の多剤耐性をもつて排菌される事実であつた。1952 年最初の京都の報告以来全国各地で散発的に多剤耐性赤痢患者の報告例が出されたが、これらの患者の発生が、同一の菌の伝播によつておこつたものでないことは、発生地域がばらばらであること、菌型が異なっていることから明瞭である。

1959 年 11 月、落合らは関西の化学療法学会支部総会で、秋葉らは同じく 11 月細菌学会関東支部総会において、多剤耐性が赤痢菌と大腸菌の間に混合培養で伝達される事実を発表した。東京で開かれた学会には多くの学者が参加し、その機構について活発な討議が行われたが、その機構はまったく不明であつた。

表1 多剤耐性グラム陰性桿菌の分離

分離時期	分離場所	菌 株	症 例	耐 性 型
1952年 8月	京 都	<i>S. flexneri</i> 1 b	1	TC. SM. SA
1955 7	東 京	<i>S. flexneri</i> 4 a	1	TC. CM. SM. SA
1656 8	東 京	<i>S. flexneri</i> 2 b	51(集団)	TC. CM. SM. (SA)
1957 7	東 京	<i>S. flexneri</i> 1 b	3	TC. CM. SM. (SA)
		<i>S. flexneri</i> 2 b	2	TC. CM. SM. (SA)
1957	東 京	<i>S. flexneri</i> 1 b	1	"
		<i>S. flexneri</i> 2 a	3	"
		<i>S. flexneri</i> 2 b	2	"
		<i>S. flexneri</i> 3 a	2	"
		<i>S. flexneri</i> v. Y	1	"
1957 9	名古屋	<i>S. flexneri</i> 3 a	66(集団)	TC. CM. SM. SA
1957 10	東 京	<i>S. flexneri</i> 2 a	24(集団)	TC. CM. SM. (SA)
1957 12	群 馬	<i>S. flexneri</i> 3 a	87(集団)	TC. CM. SM. SA
		<i>S. flexneri</i> 3 a } a*	2	TC. CM. SM. SA
		<i>E. coli</i> }		
1959 11	群 馬	<i>S. flexneri</i> 2 a } a	1	CM. SM. SA
		<i>E. coli</i> }		
1959 11	群 馬	<i>E. freundii</i> } a	1	TC. CM. SM. SA
		<i>E. coli</i> }		

* a は同一人より2種類の菌が分離されたことを示す。

(SA): 測定されていないが SA 耐性であることが推定された。

ある遺伝学的性状が一方の菌から他方の菌に伝達される機構には、次の三つのあることが知られている。(1) 導入 (transduction), (2) 形質転換 (transformation), (3) 接合 (conjugation)。すでにわれわれは、多剤耐性赤痢菌の培養液、紫外線照射後の無菌液を用いて、感性菌に耐性の伝達を試みたがすべて失敗におわつていた。この実験はファージによる導入の可能性を否定したものである。またグラム陰性菌においては DNA による形質転換はおこりにくいとされているが、多剤耐性菌から DNA をとりだし、transformation の実験も行つたが否定的であつた。そこで最後の可能性である接合の実験にとりかかつた。筆者の一人 (三橋) は、かつて留学した New York の B. Davis が、F 因子の伝達を証明した巧妙な実験を想起した。すなわち菌を通過させないが、ファージなどを含む濾過性因子を通すチャンペランの濾過管 (図3) をあいだにおいて、内側に多剤耐性赤痢菌を、外側に感性大腸菌を入れ、37°C に培養し真空ポンプで外側と内側の内圧を変化させ、内液と外液を24

時間の培養時間中10数回交換した。この場合まったく耐性の伝達はおこらなかった。しかしこれを混合培養すれば容易に耐性の伝達がみられた。したがって耐性の伝達は、ファージによる導入でもなく、形質転換でもなく、菌と菌の接触を必要とする接合によるであろうことを結論し、1960年1月の伝染病研究所の学術集団会において発表した。耐性が接合による伝達であることは、混合培養のときにブレンダーで攪拌すると伝達がみられないという事実からもいつそう確実視されるにいたつた。

当時すでに F 因子、F' 因子が知られ、この方面の研究が一段と進んでいたときだけに、多剤耐性菌の研究も非常に早さで進んでいった。F⁺ の菌は雄性を獲得し、F⁺ の菌から F⁻ の菌に接合によつて染色体の移入が行われる。また接合によつて F 因子それ自身も F⁻ の菌に伝達される。したがって多剤耐性が伝達される場合も、F 因子が関与しての染色体上にある耐性遺伝子が、染色体の移入にともなわれて移る可能性が考えられた。そこでわれわれは多剤耐性を混合培養で *E. coli* F⁻ の

図 3. 接合による伝達の証明

菌に移して、この菌のもつ多剤耐性が、*E. coli* F⁺の菌にも、雄性をもつ菌として染色体の伝達頻度の高い *E. coli* Hfr の菌にも伝達されるかどうかを検討した。その結果多剤耐性は、F⁻ から F⁺ にも Hfr にも伝達されることが明らかにされた。換言すれば、多剤耐性は F 因子を介して雄側の菌の染色体上に位置する耐性遺伝子が雌側の菌に接合によって伝達されたものでない。すなわち多剤耐性の伝達はまったく F の方向性 (polarity) と無関係に行われることから、多剤耐性は F 因子とはまったく別の遺伝因子によるものであることを予想させた。

一方、われわれはたくさんの多剤耐性菌、大腸菌を患者から蒐集し保存していた。たまたまあるときこの多剤耐性が脱落していることに気づいた。しかもその脱落は一挙に 4 剤が失われてまったく感受性化するものであった。そこで F 因子の例にならって多剤耐性赤痢菌をアクリジン系色素で処理することによって、一挙に多剤耐性を失わせることに成功した。

以上のような実験結果から、このように菌から菌に接合によって移る多剤耐性遺伝子は細菌のなかに寄生的に存在しうる細胞質性遺伝因子 (プラスミド) であることが確実視されるにいたつたので、筆者の一人 (三橋) は、このプラスミドに対し、F 因子の例にならって R (resistance) の略称を与えた。

表 2 R 因子発見の歴史

事 項	発 表
耐性が混合培養で伝達される	1959年11月
この伝達はファージその他の 過性因子では伝わらない	1960年 1 月
この耐性の伝達は F 因子の polarity と無関係に移る	1960年 1 月
この耐性は保存中に消失し一 挙に感受性化する	1960年 3 月
この耐性因子は F' 因子に近 いものではないかと予想された	1960年 4 月
この耐性はアクリジン系色素 で一挙に脱落する	1960年 6 月
耐性伝達はプレnder処理で 中断される	1960年
この遺伝物質に対し R 因子の 略称を与えた	1960年
R 因子は腸内細菌科のすべて に伝達する	1960年
<i>Vivrio comma</i>	1961年
<i>Pasteurella pestis</i>	1963年

R 因子は赤痢菌、大腸菌のあいだばかりでなく、*Escherichia freundii* にも伝達しうることが原田らによつて発見され、その宿主域の研究から腸内細菌科のほとんどすべてに伝達し、さらにビブリオにもベスト菌にまでも伝達しうることが示され、非常に宿主域の広いものであることから遺伝学上のみならず医学上注目すべき遺伝因子である。R 因子発見の初期の歴史のごく大略を表 2 に示した。

これまで述べてきたように、R 因子は赤痢の流行という特殊な環境の日本において、長いあいだ積み重ねられてきた疫学に基礎をおいて発見された遺伝因子で、耐性を与えるという点で純医学上の課題であるのみならず、耐性標識をもつてでプラスミドの研究に有利な資料で、分子遺伝学上からも見のがすことのできない課題である。

R 因子の研究と平行して、多剤耐性ブドウ球菌の研究で、1963年、われわれはマクロライド (Mac) 耐性、ペニシリン (PC) 耐性などが脱落することに気づき、ブドウ球菌の耐性を支配する遺伝子もまたプラスミドにあることを推定した。しかし、R 因子と異なることは混合培養による伝達性のないことで、その後の研究などから、一応 R 因子と区別し、gram 陰性菌における非伝達性プラスミドとともに r 因子となづけることにした。

2. 耐性菌の疫学

赤痢菌の多剤耐性化の推移については、すでに序説でふれてきたが、これはR因子の発見とその研究のための大きな道標となった。その後耐性菌の疫学調査は新薬の開発と相まって全国的な規模で実施される機運となり、耐性赤痢菌研究会(会長、江崎唯人)、グラム陰性桿菌(GNB)研究会(会長、石山俊次)、ブドウ球菌耐性研究会(会長、市川篤二)が次々に結成され活動を開始した。当教室ではこれらの研究会の薬剤耐性検査部門の仕事をひき受けその役割を果たしてきた。この種の検査は正確にして大量の処理が要求されるので多目的型別装置などを利用して能率的、合理的方法を確立して、各種薬剤に対する多数の臨床由来菌の耐性値を測定するとともにこれの保存に努めてきた。現在諸外国から送付される菌株も含めて約50,000株の耐性菌が保存されており、また、文部省の耐性菌保存センターに指定されている。

GNBの薬剤耐性とR因子の分布: 1965年~1973年の間に日本で収集された赤痢菌株は12,453株であり、また、かつて広く使われた4剤(TC, CM, SM, SA)でみた耐性菌出現頻度は91.6%と高かった。耐性型別では4剤耐性(69.5%)が大部分を占めており、ついで単剤耐性(15.4%), 3剤耐性(4.3%), 2剤耐性(2.6%)の

図 4. 赤痢菌における耐性型

順に検出されている(図4)。耐性菌(11,433株)からR因子の検出を試みたところ、7,298株(63.8%)がR因子による耐性発現であることがわかった。特に4剤及び3剤耐性菌のほとんどはその耐性標識がR因子上にあり、2剤及び単剤耐性菌からも35.1%または9.6%の割合でR因子が検出されている。次に*E. coli*(319株)、*Klebsiella*(292株)などの耐性型別出現頻度は4剤耐性型がもつとも多く赤痢菌と同様な傾向を示した。ところが*Salmonella*の耐性型別出現頻度は単剤耐性菌がもつとも高く(43.0%), 4剤耐性菌がもつとも低いので(4.4%)赤痢菌のそれと対照的であつた。*Proteus*(171株)は1剤から4剤耐性までその耐性菌の出現がほぼ同頻度であつた。また緑膿菌はほとんどの薬剤に自然耐性であるが病巣由来菌の耐性値分布には2つの山が認められる。そのうち高度耐性を示す菌群(271株)を耐性型別してみると4剤耐性型がもつとも多かつた。GNBからのR因子検出状況を図5に示した。その検出頻度は*E. freundii*>*Shigella*>*Klebsiella*>*Proteus*>*E. coli*>*P. aeruginosa*>*Salmonella*の順であつた。従来緑膿菌からのR因子分離はきわめてまれなものとされていたが、当教室の実験結果では*E. coli*のR因子検出頻度に近い。次に前述の4剤以外の薬剤に対する耐性菌及びR因子出現状況はどうであろうか。まずカナマイシン(KM)とアンピシリン(APC)に対する耐性菌及びR因子の分離頻度を調査した。赤痢菌のKM耐性(0.4%), APC耐性(3%)の検出頻度はいまだ少ないが、その耐性はほとんどR因子の存在によることが明らかである。今後この種の耐性菌の増加が予想される。その他のGNBのKM耐性(2.6%~11.1%), APC耐性(1.0%~36.8%)は*Proteus*に多く*Salmonella*に少なかった。また、*P. aeruginosa*の高度耐性菌はKM及びカーベニシリン(CPC)ともに16.1%の高頻度で検出された。この種の耐性GNBからのR因子検出頻度はいずれも高く、多剤耐性標識をもつR因子に付加して、より複雑な多剤耐性化の傾向が認められる。GM耐性菌はいまだ少ないがNA耐性を示すGNBが増加している。しかしその耐性の伝達には成功していない。新しい耐性標識が付加された6剤(TC, CM, SM, SA, KM, APC)耐性菌が検出されているが、この多剤耐性菌の保有するR因子は必ずしも単一ではない。この株より実験的にも、接合伝達、導入、除去などの方法によつて種々の耐性標識をもつR因子が分離される。これは各種のR因子が同一細胞内に共存(hetero R)して、より複雑な耐性を発現していることを示している。また、

図 5. R 因子の分離頻度

hetero R₊による耐性発現以外に R 因子と非伝達性のプラスミド及び染色体性耐性遺伝子などの共存によつても、同様に多剤耐性の発現が認められている。

グラム陽性球菌の薬剤耐性と耐性プラスミド：1966年～1971年にわたつて収集された病巣由来の *Staph. aureus* 4,923 株の薬剤耐性を広く使用されている 4 剤 (TC, SM, SA, PC) を対象に調べた。その結果、分離菌の99%が耐性菌であり、耐性型別してみると、2 剤耐性 > 3 剤耐性 > 4 剤耐性 > 単剤耐性の順に分離された (図 6)。特に単剤耐性がすべて SA 耐性菌であるばかりか、他の多剤耐性菌も必ず SA 耐性をもっており、おそらく SA 耐性標識が基礎となり順次他の耐性標識が付加していったものと考えられる。1961年～1969年の間の分離菌4,900株について、TC, SM, SA または PC にそれぞれ耐性を示す菌株の出現頻度は TC 及び SM

への耐性では変化なく、PC 耐性菌の増加 (50～77%) が認められている。したがつて分離菌の中でもっとも多い耐性型は (PC・SA) の 2 剤耐性型で上述の統計とよく一致する。また PC 耐性菌は高度耐性 (A 群) と中等度耐性 (B 群) の 2 種があり、A 群 (50 u/ml 以上耐性) は80%以上が高度 SA 耐性 (800 µg/ml ≤) を示しており、また合成ペニシリンを基質とした場合でもその耐性値が異なり、遺伝学的に種別することが妥当である。次に CM, Mac. (EM, OM, LM, SP, LCM), NB, KM, GM, CER 及びその他合成ペニシリンに対する耐性菌の出現状況について述べたい。CM 耐性菌は1961年 (7%) から1970年 (18%) までそれほど急速な増加は認められない。またアミノ配糖体抗生物質に対する耐性菌の中、KM, GM 耐性菌はいまだ SM に比較してきわめて少なく、合成ペニシリン (DMP, MCI など), CER

図 6. グラム陽性菌の耐性型

などに関する耐性菌も現在のところ非常にまれである。マクロライド系の薬剤について、EM (31%), OM (23%), LM と LCM (いずれも21%), SP (19%) の順で耐性菌が検出される。このうちマクロライド抗生剤に constitutive な耐性を示す菌 (A 群) と inducible な耐性を示す菌 (B および C 群) とが存在するが、1968 年以降は B, C 群が減少し A 群が増加している。これらの薬剤耐性は前述の 4 薬剤 (TC, SM, SA, PC) の 3 剤乃至 4 剤耐性菌に付加しやすい。このことは 3 剤及び 4 剤耐性菌が新薬に耐性化されやすい傾向にあり、新薬が登場すれば一層多剤耐性化の傾向を示唆している。

近年 *Str. pyogenes* (溶レン菌) に多剤耐性菌が出現し問題になっている。1970～1973 年に群馬県、神奈川県、東京都の 3 地区で収集されたヒト由来 980 株を調べてみると薬剤耐性菌が 85% 検出された。耐性型で区分すると、3 剤 (Mac, TC, CM) 耐性型 (52%) がもつとも多くついで 2 剤耐性型 (19%), 単剤耐性型 (14%) の順で検出頻度が高い (図 7)。PC 及び SM に対する耐性菌の出現が認められないことは前述したブドウ球菌の耐性型と異なる。また分離地域によつて耐性パターンが異なる結果がえられているが溶レン菌由来地区の薬剤使用状況と関係があるかも知れない。

家畜由来菌の R 因子保有状況：近年家畜や魚類の飼育に抗生剤を含む飼料が使用されているがこの影響を受けて耐性菌が増加している。そこでブタ (151匹) 及びニ

図 7. 耐性菌出現の地域差

図 8. 家畜よりの耐性菌と R 因子

ワトリ (108羽) について大腸菌の耐性型、R 因子型を調べてみたところ、すべてのブタが耐性菌を排菌し、うち 3 剤 (TC, SM, SA) 耐性型 (47%) がもつとも多く、約半数のブタから R 因子による耐性菌が検出された (図 8)。ニワトリは調査対象の約 40% から耐性菌が検出され、その耐性型別では 3 剤 (TC, SM, SA) 耐性型が 33% でもつとも多かつた。また約 29% のニワトリから R 因子による耐性菌が検出された (図 8)。

かくしてヒト由来のみでなく家畜由来菌にも R 因子による耐性菌が多く検出され今後の抜本的な対策が望まれる。

3. 耐性プラスミドの遺伝

耐性プラスミド上の諸形質：耐性プラスミドが宿主に与える諸形質には、薬剤耐性の他に、伝達性、自律的複製、他のプラスミドやファージとの干渉性、組換え能などがある。臨床分離の耐性プラスミドは大きく伝達性 (R)、非伝達 (r) の因子に大別され、それらは遺伝体のサイズにおいても 2 群にわけられ、前者は 30 μ 前後、後者は 1.5～3 μ のものが多い (図 9)。伝達性に関する遺伝子は 20 近くも知られており、R 因子全体の 1/3 以上の領域を占めている。

図 9. プラスミドの大きさ

耐性遺伝子の種類は、TC、CM、SM、SA、APC、KM、GM 耐性について知られているが、同じ薬剤耐性でも、不活化の場合と透過性の低下による場合とあり、さらに同じ不活化でも、生化学の項で述べられるように、異なる酵素によるものが知られているから、耐性の表現型と遺伝子型とは異なる。さらに金属イオンに対する耐性遺伝子が数種知られている。薬剤耐性に関しては、対応する酵素がよく解析されているが、伝達性その他の諸形質に関しては、酵素のレベルにまでの解析には至っていない。

薬剤耐性の伝達：異なる宿主間での遺伝子伝達には、菌同士の接触を必要とする接合、ファージを介して運ばれる導入、分離精製した DNA だけで伝達できる形質転換の3種があり、薬剤耐性の伝達には難易の差こそあれ、いずれの方法も可能である。非伝達性の r 因子の解析には、導入と形質転換が常用される。

薬剤耐性が菌の接合により伝達した場合でも3種の場合がある。もつとも多い第1の場合は耐性遺伝子が R 因子上にある場合であるが、この場合伝達が1種の R 因子によるのか、2種以上の R 因子によるのかはさらに解析が必要である。第2、第3の場合は mobilization によるもので、伝達因子の存在は必須であるが、その上

に調べるべき耐性遺伝子がない場合である。耐性遺伝子が r 因子として存在しているとき、共存する伝達因子により容易に他の菌に移行しうる。第3の場合は、耐性遺伝子が宿主染色体上にある場合で、伝達因子により低頻度ながら接合伝達する。混合培養によつて耐性伝達が低頻度ながらみられる場合は、第2、第3の場合の可能性を吟味することが必要である。

逆に染色体上、または r 因子上の耐性遺伝子を用い、自然界における耐性をもたない伝達因子の分離が可能である。すなわち tra^- の耐性菌と被検菌を混ぜ、さらに第3の受容菌を混合してこれへの耐性伝達をみると、被検菌での伝達因子 (T 因子) の有無がわかる。表3のごとく、種々の腸内細菌を調べると、ほぼ半数は伝達因子をもっていることがわかった。

表3 グラム陰性菌におけるT因子の分布

調べた菌種	菌株数	T^+ 菌株数
<i>E. coli</i>	56	25
<i>Shigella</i>	25	10
<i>Salmonella</i>	3	1
<i>Arizona</i>	1	0
<i>E. freundii</i>	1	0
<i>Klebsiella</i>	5	2
<i>Proteus</i>	12	4
<i>Serratia</i>	1	0
計	104	42(40.4%)

以上のことから、多剤耐性菌を論ずる場合、各耐性の伝達の有無にかかわらず、それらが1つの R 因子上にあるのか、 r 因子や染色体上にあるのか、2つ以上の R 因子または r 因子上にあるのか、1部が染色体上にあるのか、それらの区別が必要である。2種以上の薬剤耐性が、同一遺伝体上にあるかどうかの検定には、同時脱落性、同時伝達性をもとより、導入や形質転換によつても同時に伝達される証明が必要である。ブドウ球菌の多剤耐性では、単一の耐性遺伝子をもつ独立した r 因子を多様にもつている場合が多いことが明らかにされた。

耐性プラスミドの分類：多剤耐性の表現型と遺伝子型とが異なることから、耐性遺伝子の存在様式を明らかにすることが必要となつたが、臨床分離菌の多剤化が進むにつれて、共存可能な耐性プラスミドの組み合わせが問題となつた。 R 因子をもつ recipient に他の R 因子の重複感染を行うと、同じ親株から由来した2種の変異株

表4 R因子の分類
incompatibility group

R plasmids in <i>E. coli</i>	R plasmids in <i>P. aeruginosa</i>
source	place
F I <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i>	I Japan, Canada
F II <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i>	II Japan
H <i>Salmonella</i>	III Germany
I <i>Salmonella</i>	IV Germany
J <i>Proteus</i>	V England
L <i>Serratia</i>	VI Australia
M <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>	VII Canada
N <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i>	
O <i>E. coli</i>	
P <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Bordetella</i>	
C <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>	
S <i>Serratia</i>	
T <i>Proteus</i>	
W <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i>	
Datta et al.	This laboratory

の間では、重複感染頻度の低下がみられるし (entry exclusion), また一時同一宿主内に共存してもやがていづれか一方の R 因子が排除される (incompatibility)。この後者の性質 (非共存性) を利用して R 因子を 14 種以上に分類することが出来る (表 4)。異なるグループに属する R 因子は共存して安定な多剤耐性菌をつくるが、同一グループに属する R 因子間では重複感染せしめても 2 つの R 因子の解離がおこる。従つて *P. rettgeri* における例のごとく、接合伝達後数種の R 因子がえられた場合は、それらが伝達時に一つの R 因子がわかれたのか、始めから異なる二個またはそれ以上の R 因子が共存していたのか、それぞれの R 因子間の非共存性を調べればその区別が明らかとなる。

緑膿菌における R 因子のように、他の種に伝達不能の傾向が強い場合には、その種内に限つての R 因子の分類が可能であり、今までに 7 種が知られている (表 4)。

R 因子の遺伝学的構造: 1 つの R 因子上に種々の耐性遺伝子がある場合、伝達性その他の遺伝子をも含めて、それらの配列順序をきめる方法には、R 因子の重複感染を行い、各マーカー間の組換え頻度をみる方法、宿主染色体上にその R 因子全体をくみ入れて、導入による欠損部分の比較による方法、および物理的方法とある。

図10. R 因子の Physical Mapping

R100 のマップで、外輪は 34 μ の長さを塩基対の数で表わしている (単位キロ)。すなわち全長 87,700 の塩基対がある。太線は伝達に関する部分で、耐性遺伝子は 2 重線のところにある。伝達性遺伝子 *tra* には A-F の他 15 近くの遺伝子がクラスターをなしている。(CM $\cdot$ SM $\cdot$ SA) 耐性遺伝子 *cml. str. sul* もクラスターをなし、その両側に 800 塩基対の繰返し *cd* がある。TC 耐性遺伝子 *tet* の両側には逆向きの同一部分 *ab-a'b'* がある。内輪は DNA の密度を表わし、太線の部分は 58% GC で密度高く、線をひいた場所はことに密度が低い、全体で 52% GC 含量である。

代表的 R 因子 R100 についての結果を図 10 に示す。伝達性遺伝子はクラスターをなし、全体の約 1/3 を占め、TC 耐性遺伝子 (*tet*) はそれに近接している。(CM $\cdot$ SM $\cdot$ SA) 耐性遺伝子 (*cml. str. sul*) は 1 つのクラスターをなしている。物理的解析によると、耐性遺伝子 *cml. str. sul* の両側には 800 塩基対の繰返し部分があり、その間の分子内組換えによつて (CM $\cdot$ SM $\cdot$ SA) 耐性が失われ易いことがわかつた。

R 因子の分子構造の変化は、ことに宿主が変わった場合に顕著である。サルモネラ菌では、R100 の *cml. str. sul* 部分が高頻度に失われ易く、逆にプロテウスではその部分の繰返し増幅がおこり易い。APC 耐性を含む 5 剤耐性 R 因子 Rms 201 では、APC 耐性遺伝子 *amp* 部分が増加して R 因子全体が 31 μ から 36 μ と大きくなったものや、*amp* を含む 3 μ の小さい遺伝体が増加したものなど、各種の構造変異株がえられている。

物理化学的方法で、R 因子 DNA を菌体からとり出し、超速心や電子顕微鏡による解析が進んでおり、各種遺伝体の大きさが容易に測られるようになった。図 11 に

図11. Rms201 の電子顕微鏡像

Rms 201は 31μ であり、時に 3μ のミニプラスミドを生ずる。

は Rms201 の例を示す。ブドウ球菌では TC, CM 耐性遺伝子がそれぞれ 1.5μ の小さい r プラスミドの上にあり、グラム陰性菌から検出される非伝達性の r (SM-SA) など 3μ のものが多い。一般には、非伝達性のものは略 10μ 以下である。教室で測定された種々のプラスミドの大きさは図9に示した。

他の遺伝体との関係：耐性プラスミド上の耐性遺伝子は宿主染色体上に組みこまれる。たとえばサルモネラにおけるファージによる導入で TC 耐性遺伝子を *lac* 近傍に組みこみえるし、CM 遺伝子を宿主染色体上の任意の場所に組み込ませる方法も確立された。これら染色体上の耐性遺伝子は再び伝達因子により、細胞質性の R 因子上にとりこませることができる。

伝達因子に F 因子を用いると、耐性遺伝子をもつ F-CM, F-TC をつくることができる。R 因子はまたファージとも組換えをおこし、P1CM や edTC などをつくることもできた。

かくして R 因子の出現は、T 因子が、染色体性、または細胞質性の耐性遺伝子を次々にとりこんで生じたものと考えられた。

R 因子はまた他のプラスミドとの共存の場合、その機能の一つを抑制する場合も知られている。F 因子との共存での F 線毛形成の抑制、ファージ DNA の分解などがそれである。

図12. 耐性機構 (Davis の仮説)

4. 耐性プラスミドの生化学

耐性機構：さきに B. Davis は、細菌が薬剤耐性を獲得する機作として7つの場合があることを仮定した (図12)。しかし多くの薬剤耐性菌が実際に臨床から分離されてみると、その耐性機構は、*in vitro* でえられた耐性菌とは著しく異なっていた。ほとんどの場合薬剤の酵素による不活化によるものであり、透過性の低下も少なくない。表5に臨床株の薬剤耐性機構を示す。PC 系薬剤、アミノグリコシド系薬剤、CM 耐性などは不活化酵素によるものであり、TC 耐性は透過性低下のよい例である。ブドウ球菌のマクロライド耐性は、薬剤の結合するリボゾームのマクロライド結合性の低下である。

同じ薬剤の不活化でも、不活化の種類が異なる場合がある。例えば kanamycin B は $3'$ の-OH を燐酸化するもの、 $6'$ または $2'$ の-NH₂ をアセチル化するもの、また $2''$ の-OH がアデニル化するものと、不活化の部位は多様で不活化産物が異なる。また同じ種類の不活化でも、不活化の部位が異なる場合がある。たとえば Gentamicin C1a では $2'$, $6'$, 3 の位置のアミノ基がそれぞれ異なる酵素でアセチル化される。さらに同じ場所を同じように不活化する酵素でも、比活性や基質特性によつて種々の型にわけられる場合がある。たとえば同じく β -lactam 環を開裂する β -lactamase でも、MCI-PC を不活化しないものとするもので I 型、II 型と分けられている。

Table 5. Biochemical Mechanisms of Bacterial Resistance

Drug	Mechanisms
1. β -lactam antibiotics	β -lactamase Impermeability
2. Aminoglycosides	Phosphorylation Acetylation Adenylylation
3. Tetracyclines	Impermeability
4. Chloramphenicol	Acetylation Impermeability
5. Macrolides	Decrease in the formation of drug- ribosome complex
6. Sulfonamides	Impermeability Increased produc- tion of dihydrofolate reductase activity
7. Nalidixic acid	Impermeability

これら酵素の違いは、遺伝子型の違いを反映しており、臨床分離株としての菌種が異なると、酵素が異なる場合も多いが、同じ菌種からも、たとえば緑膿菌におけるアミノグリコシド耐性のごとく、種々の種類の不活化酵素が分離されている。基質の数の多いアミノグリコシド系薬剤に関しての不活化酵素の命名法を表6に要約した。

β -lactamase: 不活化酵素の中でもつともよく解析されているのは β -lactamase である。R 因子による PC 耐性は、PC-G のみならず、AB-PC, PE-PC, MCI-PC, 6APA, CB-PC それに CER を用いて基質特異性と比活性を比べると、数種の型に大別される。その内 I 型はもつとも多く、CB-PC や MCI-PC を比較的分解しない。I 型の中に比活性のはなはだ高い I 群があつて、これを Ib とし、Ia と区別している。Ib は *amp* 遺伝子の量的増加の場合もあり、また *amp* は 1 つでも効率よい transcription による場合も知られている。緑膿菌由来の R 因子ではやはり I 型が多いが、CB-PC を分解し、MCI-PC を分解し難いグループが知られている (図 13)。代表的な I 型ペニシリナーゼの分子量は約 25,000 である。

表6 アミノグリコシド不活化酵素の命名法

Acetyltransferase		
	phenotype	genotype
(1)	KM-A, -B	<i>aac</i> (6')-1
(2)	KM-A, -B, GM-C ₁ a, C ₂	<i>aac</i> (6')-2
(3)	KM-A, -B, GM-C ₁ a, -C ₂ , DKB	<i>aac</i> (6')-3
(4)	KM-A, -B, GM-C ₁ a, -C ₂ , DKB, AK	<i>aac</i> (6')-4
(5)	GM	<i>aac</i> (2')-1
(6)	GM, KM-B, -C, NM, RM, BT, LV, DKB	<i>aac</i> (2')-2
(7)	GM-C ₁ , -C ₁ a, -C ₂	<i>aac</i> (3)
Phosphotransferase		
	phenotype	genotype
(1)	KM, NM, RM, PM, LV	<i>aph</i> (3')-1
(2)	KM, NM, RM, PM, BT	<i>aph</i> (3')-2
(3)	RM	<i>aph</i> (5')
(4)	SM	<i>aph</i> (3'')
(5)	SM	<i>aph</i> (6)
Adenylyltransferase		
	phenotype	genotype
(1)	SM	<i>aad</i> (3')
(2)	SM	<i>aad</i> (2)
(3)	GM, KM, DKB	<i>aad</i> (2'')

プラスミドをもたないと考えられる菌種にも β -lactamase を生産するものがあり、その基質特異性を調べると、*Klebsiella* の場合のごとき、I 型の R 因子の起原ではないかと考えられるものがある。

透過性低下による耐性: 透過性低下による薬剤耐性は、TC の他 NA, や SA 耐性も知られているが、PC 類、アミノグリコシド系薬剤、CM に対する耐性の中にも、不活化によらないものが見出されてきた。大腸菌由来の R 因子の数%は不活化によらない CM 耐性遺伝子をもつし、緑膿菌では不活化の他に、非透過性の耐性機構も少なくない。

TC を用いて透過性減少の程度を測定するには、細胞内に吸収された TC を、TC の発色性を利用して光学的に測定するか、またはラベルした TC を用いて、とりこまれた TC のカウント数を測ればよい。たとえば TC 感受性菌が 2,407 cpm のとりこみのある場合、耐性菌は 265 cpm しかとりこみがない。

誘導耐性: プラスミドによる耐性は、不活化の有無に

図13. 不活化酵素の型 (β -lactamase)

図14. 誘導耐性の例

関係なく、誘導されるものが多い。たとえばブドウ球菌の TC 耐性では、液体培地で増殖曲線を画くと、 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の TC で増殖阻害がみられるが、 $0.2 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ の TC で前処理すると $50 \mu\text{g/ml}$ の TC 濃度下でも増殖阻害がない(図14)。ペニシリン系の薬剤耐性では、ブドウ球菌の PC 耐性、グラム陰性菌のセファロスポリン系薬剤耐性はすべて誘導耐性である。

ブドウ球菌のマクロライド耐性には誘導型と非誘導型とある。非誘導型は多く、EM, LM, OM のみならず LCM に対しても耐性である。誘導型のは誘導された後は上記薬剤に耐性であるが、誘導物質として活性が

あるのは EM だけなので、たとえば LM 培地では誘導された状態がつかず菌は増殖しない。従つて EM 1 剤耐性の様相を呈する。この菌は EM が存在すると OM, LM にも耐性になるので LM, EM 2 剤よりも LM 1 剤で治療した方が有効な結果をうる。

誘導と間違われ易いものに薬剤の選択による遺伝子の増加がある。変形菌に多剤耐性 R 因子があるとき、CM 存在下で (*cml. str. sul*) 遺伝子部分の増加があり、耐性値が上昇する。しかし CM が無いともとに戻るので一見誘導型にみえるが、これは遺伝体の部分的複製増加が不安定で、元に戻るため、誘導ではない。

5. 将来への展望

われわれはこれまで臨床分離の細菌、家畜からの細菌、養殖魚からの細菌の薬剤耐性を調査、研究してきた。その受ける印象は次の点に要約される。

1. 多剤耐性菌がきわめて多く、高率に分離される。
2. 伝達性のある薬剤耐性因子 (R)、非伝達性の耐性因子 (r) による耐性が多い。つまりプラスミドによる耐性の多いことが特徴である。
3. これらの細菌の耐性機構は、*in vitro* でえられる耐性菌のそれと著しく異なる。

細菌が外部の環境に対応し、生残る機構の一つに、プラスミドによる耐性獲得は、生物の適応と進化の驚くべき方法をわれわれに示したものと見える。細胞質遺伝学は今後メンデル遺伝学と異なつた立場で生物界における大きい課題となるであろう。R (または r) 因子の研究を契機として今後の発展が期待される。

圖次にわれわれは医学、畜産、農産 (植物病) の立場から多剤耐性菌の跋扈に対する対策を考えてみたい。

1. 新しい抗菌剤の開発：新薬開発の速度は確かに鈍ったことは事実で、最近土壌からえられる微生物の産生する抗菌剤には、既知のものが多いということに耳にする。しかし、この方面の成果は新薬の登場をみる結果になるので、この方向での研究はきわめて重要である。ただ、この方面の研究で重要なことは、対象とする細菌の選び方である。たとえば病巣由来菌で主役を演ずる菌の種類は変化しつつある。このような事実を知つてスクリーニングの対象菌を選ばねばならない。また耐性菌は必ず病巣由来菌を使わなければならない。人工的にえた耐性菌の耐性機構は、自然界からの菌のそれと異なるからである。

2. 既知の薬剤の化学的な修飾：このもつとも大きい成功は、合成ペニシリンに見られる。その一例を図15に示した。Cephalosporin もこの方面の研究が期待される。とくに Cephalosporin は、その側鎖が2個あつて、その変化が CESase に対しどのように対応しえるかの研究は今後に課されている。また、Tetracycline 誘導体の研究は Doxycycline, Minocycline を産み出した。TC 耐性のブドウ球菌に Doxycycline, Minocycline がすぐれた抗菌力を示す事実は注目される(図16)。LCM に対し 7-chloro-LCM のすぐれた点も報告されている。

図15. PC 系薬剤の改良

梅沢らによつて発見されたカナマイシン (KM) はきわめて広く臨床的に使用されたが、この耐性菌が著しく増加していることは例外でない。病巣からえられる耐性菌の KM 耐性機構は前に述べた。梅沢らは、この中 3'-OH のリン酸化機構がきわめて広く耐性菌に分布して

図16 薬剤の修飾による透過性の増加

いることから 3', 4'-dideoxy KM-B (DKB) をつくることに成功した。また川口らは KM-A の 1-NH₂ に γ -amino- α -hydroxy-butyric acid をアシル化することによつてアミカシン (AK) をつくつた。DKB, AK とともに KM 耐性菌に有効で両者はさらに緑膿菌にも有効であることが判明した。その化学構造を図17に示した。

今後既知薬剤の化学的な修飾は薬剤耐性菌の遺伝と、その生化学をバックにして一層さかんな新しい領域となるう。

3. 誘導される薬剤耐性：病巣細菌の耐性の中には、薬剤によつて耐性が誘導されるものが多いことは前に述べた。非誘導性の薬剤を使うか、誘導を阻止する薬剤との合剤も一つの研究課題である。

4. 合剤の研究：理論的にも実験的にも確認された効果をもつ合剤の開発は、一つの重要な課題である。たとえば、アミノ配糖体系薬剤と PC 系薬剤の合剤、また最近教室で *in vivo* の効果まで確認されたものにセファロスポリン系薬剤と合成ペニシリンの合剤は今後臨床上の効果が期待される。

5. プラスミドに有効な薬剤：R 因子の伝達阻害剤、R (または r) 因子を除去する薬剤、R 因子をもつ菌に選択的に有効な薬剤の研究は今後の大きい課題である。われわれが梅沢らとの共同研究で発見した一つの例を示したい。マカルボマイシン (MM) は大腸菌には無効で 25 μ g/ml で菌は普通に発育する。この菌が、F 因子、T 因子、R 因子をもつと MM に著しく感受性になつて MM の 25 μ g/ml プイオン中で菌数は数時間で1,000分の1にまで低下する(図18)。

図17. 不活化される薬剤の修飾

図18. R⁺ 菌に殺菌的な薬剤

さらに筆者らは医学的な立場から、病院内に多剤耐性菌の蔓延を防ぐ、ごく地道な方法のとられることを提唱したい。かつて赤痢菌もチフス菌も伝染病の概念でこれを終息せしめることができた。現在病原菌は低病原性であるが、感染性、定着性がきわめて大きい特長がある。従って多剤耐性化した菌、もしくは多剤耐性プラスミド

に対してはより一層注意し、かつての“伝染病”の概念をもつて立ちむかう日がくることを望みたい。

プラスミド性の耐性因子はわれわれに生物のもつ進化、適応の妙を教え、過去1,000年の医学史の中でもつとも華々しい登場といわれた化学療法剤に対しても R (または r) 因子をもつ菌はこれに耐え生残し続け、挑戦し続けている事実を教えてください。

参考文献

- 1) Mitsuhashi, S. (1969): The R factors. J. Infect. Dis. **119**, 89-100.
- 2) 三橋 進編(1970): 薬剤と耐性菌. 東京, 南江堂.
- 3) Mitsuhashi, S. (1971): Transmissible drug resistance factor R. Tokyo, Tokyo University Press.
- 4) 三橋 進編(1973): 薬剤耐性—エピゾームと耐性因子—東京, 朝倉書店.
- 5) Mitsuhashi, S., Inoue, M., Fuse, A., Kaneko, Y., and Oba, T. (1974): Drug Resistance in *Streptococcus pyogenes*, Jap. J. Microbiol., **18**, 98-99.
- 6) Mitsuhashi, S., and H. Hashimoto (ed) (1975): Microbial drug resistance, Tokyo, Tokyo University Press.
- 7) Watanabe, T. (1966): Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria, Bactriol. Rev. **27**, 87-115.
- 8) 渡辺 力(1970): エピゾーム, 東京, 岩波書店.