細菌の薬剤耐性について

2) R因子の種々のタイプについて

柿 沼 義 包

群馬大学医学部微生物学教室

前報¹⁾において腸内細菌(赤痢菌, 大腸菌)の薬剤耐性出現の状況を疫学的に考察した. 先に報告したごとく, R因子研究の発端は群馬県の某結核療養所における多剤耐性赤痢菌による赤痢の集団発生の際の多剤耐性大腸菌の発見であった²⁾. 従って著者は広く人の大腸菌を分離し, その中から耐性大腸菌を分離し, その耐性型, R因子の遺伝学的特性を明らかにすることを目的とした.

実験方法

人から分離される大腸菌及び赤痢患者より得られた赤痢菌を材料とした. 耐性の測定は寒天希釈平板法を用い, 腸内細菌研究班法³⁾の指示に従った. 使用薬剤はストレプトマイシン (SM), クロラムフェニコール (CM), テトラサイクリン (TC), 及びスルホンアミド (SA) の4剤を用いた. SAの耐性測定には Mueller Hinton 培地を用いた. 耐性の表示には2段階希釈の薬剤を含む寒天平板培地に被検菌を塗抹培養し, 37° C, 24時間後の発育の有無によって菌の発育を許す最大薬剤濃度をもって耐性値とした. R因子の証明は赤痢菌, 大腸菌相互の耐性の伝達に従った. R因子の伝達は前報⁴⁾によった.

実験結果

R因子の耐性型: これまでに得られた薬剤耐性大腸菌, 赤痢菌のうち, R因子をもつものの大部分はTC, CM, SM, SAの4剤に耐性であった. しかし表に示すごとく耐性パターンをもつR因子も分離された. その耐性パターンと分離頻度は表1に示した.

表1 人の大腸菌赤痢菌より分離されたR因子の耐性型とその分離頻度

耐性型	TC, CM, SM, SA	CM, SM, SA	TC, SM, SA	SM, SA	TC	SM
分離頻度 (%)	72	12	6	5	3	2

調査して得られた120株のR因子について計算した

調査した480株の大腸菌, 150株の赤痢菌のうち, 120株のR因子が得られた. そのR因子を耐性型から分離すると (TC, CM, SM, SA) 4剤に耐性のものが最も多く, 3剤, 2剤, 1剤耐性のものは著しく少なかった. また共同研究者らの広汎な研究によれば, CM1剤耐性菌はこれまでに1株も得られていない. 従って野外からR (CM) 因子の得られた報告はない.

R (CM, TC) は名古屋の落合博士が分離した (CM, TC, SA) 3剤耐性赤痢菌を三橋教授が分与を受け, 調査した結果, SA耐性は非伝達性で, 染色体上に位置すると思われるSA^r (SA耐性) であるのに (CM, TC) は伝達性で, ここにはじめてR (CM, TC) として分離された⁵⁾. (SM, SA) 2剤耐性菌はかなり高率に分離されるが, 混合培養によって伝達性をもつものは著しく少ない.

R因子相互間の干渉: 既に協同研究者によってR因子をもつ菌を recipient とすると, R因子のない菌に比しR因子の伝達率が著しく低下することが報告されている.^{6,7,8)} これに対しR因子間の干渉と名づけられた⁹⁾. 得られた120株のR因子について調査した結果, 干渉のないR因子はR (SM) 2株とR (SM, SA) 1株であった. R (SM) 因子の場合を表2に示した.

表2 R因子相互間の干渉

Donor × Recipient	DonorのR因子の伝達頻度
R(CM) R ⁻	260×10^{-5}
R(TC) R ⁻	200×10^{-5}
R(SM) R ⁻	350×10^{-5}
R(CM) R ⁺ (TC)	1.0×10^{-5}
R(SM) R ⁺ (TC)	210×10^{-5}
R(TC) R ⁺ (CM)	1.2×10^{-5}
R(SM) R ⁺ (CM)	180×10^{-5}

Donor及びRecipientの菌の37° C, 18時間培養の1 mlを混合培養し, 37° C, 18時間後R因子の伝達率を調べた。

R(SM) 因子の場合, recipientにR因子がある場合とない場合とに著明の差がみられないが, R(CM) またはR(TC) 因子の場合, その伝達率はR⁻ 菌を recipient にした場合に比

し, 約100分の一またはそれ以下に低下する。

R(CM) 因子の分離: たまたま一患者の検便中に4剤耐性大腸菌を排菌するほかに, (CM, SM, SA), (CM, TC) 耐性菌を排菌するものを発見した。一患者の耐性菌がこのような多彩な形で発見される理由について検討した。患者より得られたR(TC, CM, SM, SA) 因子を *E. coli* O-26に伝達し, R因子分離の様子をみると容易にR(CM, SM, SA) の得られることを知った。即ち, R因子の耐性部分(r region)はTCとその他の耐性部分に容易に分離する。更にR(TC, CM, SM, SA) を *Sh. flexneri* に伝達し, これを *S. typhi* S-86に伝達すると容易にR(CM, TC) が得られた更にR(CM, TC) はR(CM) と R(TC) の各々に分離し, しかも共に伝達性をもつことが明らかになった。分離の系統を図1に示した。

図1 容易に耐性マーカーの分離し易いR因子について

従って、このR因子から著者はこれまでに報告のなかったCM 1 剤耐性のR(CM) 因子を得ることに成功した。

またR(TC, CM, SM, SA) 因子から分離によってR(TC, CM) とR(SM, SA) 因子が得られたが、前者は伝達性を有するに拘らず後者は混合培養による伝達性を失った。このようにR因子の分離によって (SM, SA) 耐性部分が非伝達性となることは、伝達性を支配する遺伝的部位 (t region) が (CM, TC) 部位の近くにあることを示唆するものである。また野外から多く得られる (SM, SA) 耐性菌の多くが混合培養によって伝達性をもたないこともなんらかの関係があるものと考えられる。またR因子を ϕ フェージで導入することによって得られたR因子導入株のすべては伝達性を欠除し、必ず (TC) と (CM, SM, SA) の二つに分離する⁹⁾。

以上の事実からもR因子の t region はTC とその他の耐性マーカー (CM, SM, SA) との間にあることが予想される。

また別に (TC, CM, SM, SA) 4 剤耐性大腸菌を排菌する例を発見した。この例においては4 剤耐性の他に (CM, SM, SA) (SM, SA) (TC, SA) の耐性パターンを有する大腸菌が混在している。しかも4 剤耐性は混合培養で伝達性を示すに拘らず、他の耐性マーカーのすべては非伝達性 (t^-) であった。このR(TC, CM, SM, SA) 因子を大腸菌から *S. typhi* に伝達したが高い頻度で脱落し、また分離の頻度も高かった。このことから、このR因子は宿主菌内における自己増殖性の能力が低く、またR因子の分離の頻度の高いことから replication におけるエラーの起りやすいエピソードと考えられる。

総 括

伝達性ある耐性因子Rは、わが国では昭和30年一赤痢患者に発見せられ、それまでの疫学的考察からなんらかの理由で突然出現したものと考えるを得ない。これまでの疫学的報告によ

っても、著者の経験からも (TC, CM, SM, SA) 4 剤耐性菌が圧倒的に多く、3 剤, 2 剤, 1 剤耐性菌は著るしく少ない。これまでの遺伝学の教えるところによると、A薬剤に耐性になる頻度を 10^{-a} , B薬剤のそれを 10^{-b} , C薬剤, D薬剤のそれを夫々 10^{-c} , 10^{-d} とすると、A, B, C, D の4 剤に同時に耐性になる頻度は $10^{-(a+b+c+d)}$ となる。

即ち、4 剤同時に耐性の頻度は著るしく少ないはずである。従ってR(TC, CM, SM, SA) 因子の出現はなんらか別の機構が考えられなければならない。1 剤, 2 剤, 3 剤耐性R因子が既に存在し、これが細菌内に重感染して recombination をおこし、4 剤耐性R(TC, CM, SM, SA) 因子になる可能性も存在する。しかし、疫学的の調査では、3 剤, 2 剤, 1 剤耐性R因子分離の頻度は非常に少ない。これまでの研究でR(TC, CM, SM, SA) 因子がR(CM, SM, SA), R(TC, SM, SA) または2 剤, 単剤耐性R因子より epidemic spread が高いと考えられる特別な理由は存在しない。従ってR因子は最初R(TC, CM, SM, SA) の形で出現し、その後分離をおこし、3 剤, 2 剤, 1 剤耐性の形で発見されたと思わせしめる理由がある。R因子の上にはR因子相互間の干渉 (ri) を支配する因子が存在し、 ri^+ のものの他に筆者は野外から ri^- のものを得ることに成功した。また伝達性 (t^+) のあるR因子から分離によって t^- (非伝達性) のR因子も得られた。R因子のこのような遺伝学的構造はその recombination の解析を経て、今後明らかにされる問題である。

結 論

- 1 野外から得られるR因子は (TC, CM, SM, SA) 4 剤耐性のものが圧倒的に多い。
- 2 R (TC, CM, SM, SA) 因子の他に R(TC, SM, SA), R(CM, SM, SA), R(SM, SA), R(TC), R(SM) 因子が得られた。

3 分離しやすいR(TC, CM, SM, SA) 因子からR(TC, CM) 因子及びR(CM) 因子が得られた。

4 R因子相互間に干渉のないR因子 (ri-) が得られた。

5 R(TC, CM, SM, SA) 因子から非伝達性のR(SM, SA) 及びR(TC, CM) 因子が得られた。

6 R因子上には、従って耐性を支配する r region, ri, t region のあることが考えられる。

本研究を推行するに当って群馬微生物学教室員、高崎国立病院、富岡厚生病院の諸先生に心から感謝の意をさげる。また、御指導頂いた三橋教授、橋本講師に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) 柿沼義包：北関東医学，13：12，1963。
- 2) Mitsuhashi, S., Harada, K., Hashimoto, H. and R.Egawa：Jap. J. Exp. Med., 31：53，1961。
- 3) 福見秀雄：日本医事新報，No.1473，28，1952。
- 4) Harada, K., et al.：Jap. J. Exp. Med., 31：291，1961。
- 5) Mitsuhashi, S., et al.：Gunma J. Med. Sci., 10：59，1961。
- 6) 三橋進：科学，30：628，1960。
- 7) Harada, K., et al.：Gunma J. Med. Sci., 10：201，1961。
- 8) Hashimoto, H. et al.：ibid. 10：206，1961。
- 9) Harada, K., et al.：J. Bacteriol., 86：1332，1963。

DRUG-RESISTANCE OF BACTERIA

2) Several types of transmissible drug-resistance factor R

Yoshikane Kakinuma

(Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University)

In the field study many types of drug-resistant *E. coli*, *Shigella* and *Citrobacter* were isolated by this laboratory. And seven types of transmissible drug-resistance factor were obtained; R(TC) R(SM), R(CM, TC), R(SM, SA), R(CM, SM, SA), R(TC, SM, SA) and R(CM, TC, SM, SA). The R(CM) factor was segregated from (CM, TC) resistance of *Sigella*.

These factors were eliminated spontaneously from a host strain in high frequency. From the segregation of these factors, R(CM, SM, SA), R(SM, SA) and R(TC, SA) factors were found and not transferable by conjugation.