ブドウ球菌の Streptomycin 耐性に関する研究

森村 正東・手島栄三郎・阪本 亨吉

国立高崎病院

橋本 一・堀川 謹三・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋 進教授)

緒 言

近年抗生物質の開発にはめざましいものがあるが、一方耐性菌の出現、増加は疫学的に憂慮にたえぬ問題となっている。中でもブドウ球菌は結核菌、赤痢菌と並んで、耐性菌、殊に多剤耐性菌の分離頻度が高い。ブドウ球菌の薬剤耐性は、現在サルファ剤 (SA) Penicillin (PC) Tetracycline (TC), Streptomycin (SM) の4剤について主にみられ、他の薬剤に対する分離頻度は低い¹⁾ 即ち未だ有効な薬剤は多く残されている。併しそれらの薬剤にも早晚耐性菌が出現してくるのが予想される。これら耐性菌への対策としては、次々に新薬を開発するものもさることながら、合成ペニシリンの進歩のように耐性菌の耐性機構を知った上で対策を考えるのが合理的である。

耐性機構を考える場合、吾々はSA, SM, PC等について単にMICをきめてある数値以上を耐性菌とするやり方でなく、薬剤耐性を遺伝子の形質発現とみて、その遺伝学的背景の質的变化を問題とした。即ちSA, SM, PCについては高度耐性菌と中等度耐性菌とは遺伝子支配が異なると考えた。

耐性菌の年次推移をみてみると、特にSM耐性が減少しつつあるのが明らかである。従って今回はこのSM耐性について、遺伝学的背景をも加えて整理、考察した結果について報告する。

実験材料並方法

使用菌株：疫学的統計は、耐性ブドウ球菌研究班 (班長 市川篤二博士) によって、1961年から64年まで分離された約1,500株の菌株について行った。これらはすべて人病巣由来、コアグラゼ陽性のブドウ球菌である。保存法は、クックトリミート培地に接種し、常温で保存している。

使用薬剤並耐性度測定：Dihydrostreptomycin (SM), Tetracycline (TC), Penicillin-G (PC) 等は、予研 梅沢博士の許より検定ずみのものの分与をうけた。サルファ剤としては市販のスルフイソミジンナトリウムを用いた。

耐性度は最大発育許容濃度で表わした。耐性検定は平板希釈法で行った。薬剤の濃度は培数希釈で行った。

ファージ型測定：Blair & Williamsの方法²⁾によった。

実験結果

ブドウ球菌のSM耐性度曲線の年次変化をみると (第1図), 年毎に100mcg/cc以上の耐性菌の減少がみられ、又SM感受性菌の山もより耐性度の低い方へ移行しているのがみられる。耐性ブ菌研究班では12.5mcg/cc以上が耐性菌ときめられたが、100mcg/cc以上に明らかな山がみられPCやSAにみられた高度耐性菌のグループの存在が予想された。そこでTC耐性との連関をみると (第2図), TC感受性菌では種々

図1 ブドウ球菌のSM耐性値

図2 TC耐性とSM耐性度

のSM耐性度をとるが、TC耐性菌では、SM100mcg/cc以上の耐性度をもつものが大部分である。従って、吾々は100mcg/cc以上をもって、SM高度耐性菌として、それに満たぬ中等度耐性菌と区別することにした。

高度と中等度に分けたSM耐性菌の分離頻度を年次別にみると、第3図の如く年々減少しているのがみられる。他の薬剤耐性には、かかる減少の傾向はみられず、SMに特有な現象であると考えられる。

SM耐性菌の耐性型とファージ型を第4図に示す。1,500株の中453株がSM耐性で、耐性型ではSM, TC, SAPCの4剤耐性型が最も多く半数以上を占め、次いでSM, SA, SM, SA, PC, SM, TC, SAの順となっている。ファージ型では、80/81型や型別不能株が多く、合わせて略々半数に及ぶが、Ⅱ, Ⅲ群もそれぞれ10%程分離されている。

これら耐性型にわけた上でのSM耐性菌の分離頻度を4年間の推移として

みてみると、第5図の如く、SM、TC、PC、SA耐性株は第2図年度から急にふえており、SM、SA耐性株は逆に減少している。SM、TC、SA耐性株は年々増加しているが未だ全体の中で占める割合が小さく、大勢に影響を及ぼしてはいない。

SM耐性型とファージ型との関係を第6図に示す。最も分離頻度の高いSM、TC、PC、SA 4剤耐性菌では、I群、80/81群、混合群、型別不能群が殆んどを占め、II、III群は極めて少い、それに反してSM、SA耐性菌はII群菌が全体の5分の1を占めており、80/81型は少い。それに、PC耐性の加わった、SM、SA、PC耐性菌では80/81型が多くなっているため80/81型はPC耐性が関係していると考えられる。

次にSM耐性菌の安定性を調べた。各年度で分離されたSM耐性菌の耐性度を再び検査し、更にそれを3度純粋培養して後、耐性検査を行った。3回純粋培養をくりかえすと、保存後、一部の細胞に耐性の脱落がおこったときでも、大部分の細胞が耐性であれば、耐性菌だけが純粋培養されうるし、反対に、ごく一部の細胞だけ

図5 SM耐性菌の耐性型(年間の推移)(1961~1964)

図6 SM耐性と Phage 型との関係

図7 SM中等度耐性菌の再検査

が耐性を示しつづけているにすぎない場合には、再検時耐性と判定されても純培養後は感受性菌が選択されることになる。1961年度分離の8株の中等度耐性菌は、4年間の保存後6.3又は3.1 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示すようになり、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上のものは一株も保存され得なかった。1962年分離のものは再検時全株が1.6～3.1 $\mu\text{g/ml}$ と耐性度を感じ、純培養後は一株だけが12.5 $\mu\text{g/ml}$ にとどまるにすぎない。大部分の株は0.8～0.2 $\mu\text{g/ml}$ にまで、耐性度を減じ、全くの感受性菌に戻っているのがみられた。1963年分離の株では純培養後15株中1株だけが耐性菌であり、1964

年分離のものは15株中6株が耐性菌であった。即ち1年間の保存では約1/3が耐性を持ちつづけていたことになる。

次に始めSM高度耐性菌として分離された株について保存後の耐性度の脱落をみた。方法は中等度耐性菌と同様である。耐性の脱落はやはり顕著で1961年～1963年では $1/4$ から $1/8$ が高度耐性を失い、0.4～0.8 $\mu\text{g/ml}$ の感受性菌に変化していた。1964年分離のものは約半数が高度耐性を脱落していた。ここにおいても、保存期間の少い方が脱落の頻度が少いように考えられた。

図8 SM高度耐性菌の再検査

次に耐性脱落と反対に感受性菌のSM耐性化を調べた。(第1表)。22株のSA1剤耐性菌のSM耐性は、20株が0.8で2株が0.2 μ g/mlであった。そのブイヨン一夜培養菌を遠心沈澱し、12.5 μ g/mlのSM濃度のハートインフュージョン寒天培地上に約 10^9 の菌量を接種すると、 10^{-9} ～ 10^{-8} の頻度で耐性化したコロニーが得られた多いものは3コロニーづつ選び、純粋培養をして後SM耐性を調べると、22株の中、中等度耐性菌を生じたものが6株、400 μ /ml以上の高度

耐性菌を生じたものが11株であった。MS507は3個のコロニーの中、1株は中等度耐性菌、他は高度耐性菌と、2様の変異を示した。結局16株がSM耐性化したか、耐性化の頻度は低いから、SM耐性菌の生じなかったものも、辛うじて生じた株と、同じ頻度での、ばらつきに入るものかも知れない。いずれにしてもブドウ球菌はSMの選択作用によって容易に耐性化し、又耐性菌もその脱落がおり易いものとする。

表1 SA1剤耐性菌のSM耐性化

MS番号	菌株 SM耐性値 μg/ml	選択されたコロニー数	得られたSM耐性値 μg/ml	
			中等度	高度
29	0.78	1		1600
106	0.78	8		1600
130	0.19	7		400
198	0.78	0		
204	0.78	1		1600
205	0.78	11	50	
216	0.78	13		400
224	0.78	9		400
226	0.78	0		
227	0.78	10		400
231	0.78	1	50	
241	0.78	0		
242	0.78	18	50	
295	0.78	2		400
298	0.78	2	50	
320	0.78	6	50	
327	0.78	0		
352	0.19	0		
353	0.78	0		
359	7.78	2		1600
362	0.78	8		1600
507	0.78	7	50	400

選択薬剤濃度 12.5μg/ml

接種菌量約10⁹

3株宛検査

考 察

SM耐性ブドウ球菌の分離頻度が年々減少の傾向を迎えるという疫学的事実が、遺伝学的に如何に説明されるかを検討した。

始めにSM耐性と一概に言われても、それには中等度耐性と高度耐性という2つの表現型があるということを明らかにした。SM高度耐性菌は、TC、PC、SA耐性との連関や、フェージ型がI群や型別不能株が大部分なことなどが特徴的である。SM耐性菌は、中等度耐性菌でも高度耐性菌でも、いずれも感受菌から、*in uitro*

で変異して生ずるから、これらは細菌の染色体上の遺伝子によって支配されていることが考えられる。菌によって変異の頻度が中等度耐性菌に変わる場合と高度耐性菌に変わる場合とで異っており、従って任意に各株から一株ずつ耐性化菌を選んだ場合、高度耐性菌の方が得られ易いのは、高度耐性が中等度耐性よりも遺伝学的により安定であるからと考えられる。

長い保存は耐性から感受性への逆変異を、おこし易いが、この場合も高度耐性の方が中等度耐性よりも安定である。併しいずれにしても耐性化の頻度よりも感受性化の頻度が高頻度であるから、SMによる選択作用が続かなければ大部分の株は竟には感受性菌に戻ってう。SM耐性菌の出現と減少とは、このような両方向への変異の頻度の差で説明される。

感受性菌より *in uitro* で人工的に耐性菌がえられる場合、それは染色体上の遺伝子の支配によるものと考えられる。人工的に耐性菌がつけられ得ず、又自然界より分離された耐性菌が一挙に耐性を失った時でも、再び耐性化することが出来ない場合は、染色体外の即ち細胞質性の遺伝子であると考えられる。PC耐性やmacrolide系薬剤への高度耐性は、その例と考えられた。(Novick ら²⁾, 三橋進他³⁾)

SM高度耐性がTC耐性と連関している事は導入実験でも確かめられた。(三橋他³⁾)。

TC耐性も亦染色体上の遺伝子により支配されていると考えられる。TC耐性の導入はSA耐性も伴うことが知られている(春日他⁴⁾)。併しPC耐性の導入を伴うことは未だ報告がないこれらの導入実験によっても、TC、SM、SA耐性は染色体上の遺伝子支配により、PCだけがMacrolide耐性と共に染色体外遺伝子の支配によるものと考えられている。

SM耐性の導入はMorse⁵⁾, Korman⁶⁾ らによりなされている。Morseは導入における形質発現に数時間を要することから、SMでは感受性遺伝子が耐性遺伝子よりも優性であると考え、

この点でも大腸菌における染色体上のSM耐性遺伝子とブドウ球菌のSM耐性とは類似していることが考えられた。KormanはSM耐性菌よりタイピングフェージ53で導入を行いSM高度耐性菌、又大多数は20 μ g/ml耐性でありながら高頻度に100 μ g/ml耐性菌を生ずる不安定な株を得ている。彼はプロフェージ様の遺伝子を想定し、その附着する座位の違いにより耐性度が異なると考えた。併し吾々の実験から考えるとSM耐性座位は中等度と高度との2種があると考えるのが妥当である。同一株でもその2様の耐性のいずれかに変異するのが可能であって耐性度をプロフェージと結びつけて考える必要もない。中等度耐性と高度耐性相互間の変異の頻度は算定しなかったがそれぞれが感性化する頻度は中等度耐性菌の方が高く、中等度耐性は不安定であると考えられた。

SMにはこの他に腸内細菌に於てはR因子による耐性があり⁹⁾又、mutatorとしての遺伝子も知られている¹⁰⁾。Kormanの例はmutatorに近いと思われるが、その間の解析は充分でない。ブドウ球菌のSM耐性はこのように遺伝学的に考察すると、まだ多種の発現様式があることが考えられる。年々SM耐性菌の分離数は減少しているが、SMは容易に再び耐性化するのでSMを用いた治療が耐性菌の選択作用にならぬよう注意すべきである。

結 論

- 1) ブドウ球菌のSM耐性は、中等度耐性菌においても、高度耐性菌でも、ここ4年間の統計において次第に分離頻度を減少しつつある。
- 2) 耐性型で言えば、TC, SM, PC, SA 4剤耐性菌が減少しTC, PC, SA 3剤耐性菌となり、SM, SA耐性菌は減少してSA耐性菌が多く分離されている。
- 3) 実験室内においても、SM中等度耐性菌は保存後殆んどその耐性を脱落する。高度耐性菌

でも1年間の保存後再検査すると約 $1/2$ から $2/3$ はSM耐性を失う。

4) 併し逆にSA 1剤耐性菌をSM平板上で選択すると、その半数の株からSM高度耐性菌がえられ、又試験株の $1/3$ は中等度耐性菌を変異で生じた。

5) 自然界においてSM耐性菌の分離頻度が増すのはSM使用による選択作用によるものであり、薬剤の使用が減ずると再び分離頻度が減じてゆくものと考えられる。

文 献

- 1) 三橋進他. 耐性ブドウ球菌研究班報告. 第13回化学療法学会総会. 昭和40年. 東京.
- 2) Blair, J. E., and R. E. O. Williams : Phage typing of staphylococci. Bull. World Health Organ. 24: 771—784, 1961.
- 3) Novick, R. P. : Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 33 : 121—136, 1963.
- 4) Mitsuhashi, S., H. Hashimoto, M. Kono and M. Morimura : Drug resistance of Staphylococci II. Joint elimination and joint transduction of the determinants of penicillinase production and resistance to macrolide antibiotics. J. Bacteriol. 89 : 988—992, 1965.
- 5) Mitsuhashi, S., H. Oshima, U. Kawaharada and H. Hashimoto : Drug resistance of *Staphylococci* I. Transduction of tetracycline resistance with phage lysates obtained from multiply resistant staphylococci. J. Bacteriol. 89 : 967—776, 1965.
- 6) 春日徳彦, 橋本一, 大島洋, 河原田ウメ子, 三橋進 : ブドウ球菌における TC, SM, PC, SA 耐性形質の連関性について. 日本細菌学雑誌, 20 : 374—375, 1965.
- 7) Morse, M. L. : Transduction by staphylococcal bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45 : 722—27, 1959.

- 8) Korman, R. Z. and Berman D.T. : Genetic transduction with staphylophage. J. Bacteriol. **84** : 228-236, 1962.
- 9) 三橋進 : 腸内細菌の薬剤耐性. 科学. **30** : 628-633.
- 10) Gundersen, W. B., K. Jyssum and S. Lie : Genetic instability with episome-mediated transfer in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **83** : 616-623, 1962

STREPTOMYCIN RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Masato Morimura, Eisaburo Teshima, Ryokichi Sakamoto

(National Takasaki Hospital)

Hajime Hashimoto, Kinzo Horikawa and Susumu Mitsuhashi

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

- 1) Isolation frequency of SM-resistant *S. aureus* in field survey has been decreasing year by year.
 - 2) SM-resistant strains which had been stocked in our laboratory for long months, often lost their SM-resistance. Meso-SM-resistance was more unstable than high SM-resistance.
 - 3) Mutation frequency from sensitivity to SM-resistance was examined for 22 strains. High-resistant colonies were more frequently isolated than meso-resistant ones.
 - 4) Genetically, high SM-resistance is rather stable and often links to TC, high PC and SA resistance.
-