

薬剤耐性の獲得と阻止の機序

秋葉朝一郎*

緒 論

医学的に薬剤耐性の問題を論ずる際には、これを2項目に分けて考える必要がある。

第一はある社会に流行する菌種について、化学療法の普及に伴つての耐性株の率の推移を論ずる場合であり、第二は治療中の個々の患者において感性菌株から耐性菌株への推移を論ずる場合である。

今回は前者の社会集団の問題については触れることなく、後者の“生体内における病原菌の耐性獲得とその阻止の機序”について、余等協同研究者の実験所見を中心として論究して、同学各位の批判と教示を仰ぎ度いと考える。

なお本問題については、昭和27年4月の第25回日本細菌学会における特別講演¹⁾として、また同年11月の伝染病研究所創立60周年記念学術講演会²⁾において講演したところであり、今回の講演内容が一部既述のものと同重複するところがあるが、これは一貫して論旨を進めるためであることを諒承されたい。

I. 耐性獲得の機序

耐性獲得の機序については、次の相対立する2学説が提出されている。

- a) 突然変異と薬剤の選択とによるとする説
- b) 適応によるか又は誘導変異によるとする説

耐性成立の機序として“薬剤の菌体への直接的な作用”を前説は否定し、後説は肯定する点において両説は明確に対立する考え方である。これについて説明すると、次のようである。

a) 突然変異と選択説 (spontaneous mutation and selection theory)

ある菌集団 (bacterial population) について、個々の菌体のある薬剤に対する抵抗性を調べると、大多数の感性菌体 (sensitive cells) のなかに特に抵抗の強い菌体のごく少数含まれているが、これは菌の分裂増殖の過程において突然変異によつて自然に発生してくる

resistant mutants である。このような菌集団 (原株) が薬剤を含む環境下 (培地または生体内) におかれ、しかも薬剤濃度が完全阻止濃度より少し下 (subinhibitory dose) である場合には、大多数の感性菌体の増殖は抑制され、少数の抵抗性菌体 (resistant mutants) のみが増殖してくる。したがつて、ここに生じた菌集団 (第1次株) は原株よりも一段と全菌体の抵抗が強くなつており、しかもそのなかには少数の特に抵抗の強い resistant mutants が含まれている。

次にこの第1次株を第1回よりもさらに薬剤濃度の高い環境で増殖させると、resistant mutants のみが選択的に増殖が許される結果、第1次株よりも抵抗の強い菌集団 (第2次株) となる。このように培地中の薬剤濃度を漸次高めつつ移植培養を反覆すると、抵抗の極めて強い菌株 (耐性株) がつくりあげられる。

以上のように、突然変異と薬剤の選択という2因子によつて耐性の獲得がおこなわれると主張するものである。この学説は DEMEREC³⁾ (1945) がブドウ球菌の Penicillin 耐性獲得の研究によつて提唱したものであるが、Penicillin のみならず他の化学療法剤についても DEMEREC 説を支持する報告が多い。たとえば、Penicillin については LURIA^{4,5)} (1946), KLEIN⁶⁾ (1947) が、Sulfonamid 剤については OAKBURG & LURIA⁷⁾ (1947) らが、Streptomycin については KLEIN & KIMMELMAN⁸⁾ (1946), ALEXANDER & LEIDY (1947), DEMEREC (1947), SCOTT (1949), NEWCOMBE & HAWIRKO⁹⁾ (1949) らの報告を例としてあげるにとどめる。

b) 適応 (adaptation) 説または誘導変異 (induced mutation) 説

適応説と誘導変異説とはともに“薬剤の菌体への直接的な作用”の結果として菌体の耐性の獲得が起きるものと主張する。この見解をもつ研究者は現在なお比較的小数であるが、HINSHELWOOD¹⁰⁾ (1949), LINZ¹¹⁾ (1950), BARER¹²⁾ (1951), 秋葉¹⁾ (1952), SEVAG & ROSANOFF¹³⁾ (1952), らの報告がある。

ただ両者の異なる点は、適応説では薬剤の刺戟を除去すれば耐性株は感性株へもどるといふ遺伝性のない変異、即ち variation と考えるのに対して、誘導変異説では耐性は遺伝的な変異、即ち generic variation であると考えるところにある。

* 東京大学医学部教授 (細菌学)
TOMOICHIRO AKIBA (Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tokyo):
On the Mechanism of the Acquisition of Drug-resistance and its Inhibition.

●) 著者の見解

「生体内における細菌の薬剤耐性獲得」の機序について、現在著者の抱えておる基本的な考え方は次のようなものである。

- 1) 薬剤耐性は Gene の変異による遺伝的変異である。
- 2) Gene の変異は薬剤の直接的な作用によつて引き起こされる。即ち、誘導変異である。
- 3) 薬剤の選択作用その他いくつかの機序がある程度の役割をはたすが、これは補助的なものである。

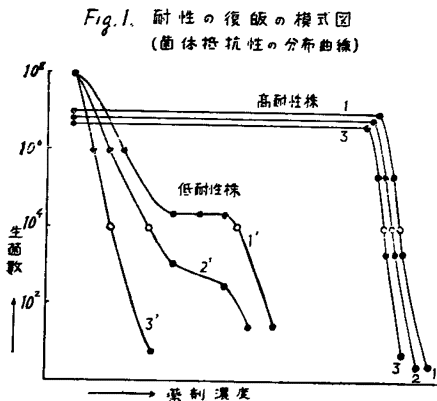
以下、このような見解を基礎づける実験知見を示して批判を得たいと思う。

(1) 薬剤耐性は遺伝子変異であることについて

適応説の根拠となる事実は、耐性株は薬剤が存在しない環境において増殖をつづけると、感性株へ復帰するという現象である。しかしながら、この耐性の復帰現象は、Gene の変異に因る遺伝子変異説の立場に立つても十分に説明できる。

薬剤不含の培地に耐性株の継代培養をおこなつていく場合、高耐性株はほとんど復帰しないから遺伝的変異であること明瞭であるが、低耐性株であると薬剤抵抗性がだんだん弱まつてきて、感性株へ帰るから適応であるかのごとく考えられる。

耐性復帰の現象を、菌集団を構成する菌体の薬剤に対する抵抗性の分布曲線の推移によつて追跡して見ると、第1図に示すように模型化することができる。



高耐性株の菌集団は全部の菌体の抵抗性が強くしかも均一相であつて(曲線1)、これを10~30回ぐらゐ継代しても、この曲線が変化しない(曲線3)。このような遺伝的に安定した耐性株は、完全耐性株 (completely resistant strain) と呼ばるべきである。これに対して、低耐性株の菌体の耐性分布曲線は、曲線1'のように感性菌体と種々の程度の耐性菌体とが混在して不均一相

であつて、これを普通培地に継代すると曲線2'~3'のような変化を示し、耐性菌体の比率が速やかに減少して感性菌体の均一相に復帰する。

曲線1'のような耐性分布曲線を示す菌株は、不完全耐性株 (partially resistant strain) と見なすべきである。

ところで、低耐性株はおおむね不完全耐性株であるが、これの耐性復帰はいかなる機序によるかについては前報²⁾に詳論したところであるので、結論だけを述べると、(1)感性菌体の増殖速度が耐性菌体のそれよりも大であることが主たる機序であるが、(2)耐性を支配する Gene の自然的逆変異 (spontaneous back mutation) (3)感性菌体成分の感敏化作用 (resensitization) などの機序も介入するであろう。

このように、耐性復帰の現象は、遺伝子変異説を以て容易に説明できる。

さらに、ある化学療法剤に対する菌の耐性が、その化学療法剤と全く無関係な物質、たとえば大腸菌に nitrogen mustard を働かせることによつて Streptomycin や Chloramphenicol に対する耐性菌体が出現するという余等の実験³⁾事実や、赤痢菌浮游液に通気 (aeration) をおこなうことによつて Sulfathiazole 耐性となるという事実 (橋本, 塚口⁴⁾) 及び核の主成分たる菌体 DNA を作用させることによつて耐性化または感敏化される事実 (後述) 等は、耐性変異が適応に因るという考えでは説明できない。

以上のような諸事実に徴して、耐性変異は遺伝子変異に因ると結論すべきであると信ずる。

(2) 耐性変異は薬剤に因る誘導変異であることについて

突然変異と選択説の根拠となる実験事実は、*in vitro* の実験において継代するごとに薬剤の濃度を段階的に高めた培地に植えついでいくという方法 (増量的継代法) による耐性上昇の現象である。即ち、この場合には薬剤の選択作用がきわめて強く働いているわけであつて、この方法による耐性の上昇は突然変異と選択説によつてよく説明できる。

しかしながら、感染生体に化学療法を実施する場合の細菌対薬剤の関係は、増量的継代法における場合とは異なつている。生体に化学療法剤を投与する場合には、投与量は終始大差がないから、菌に作用する薬剤濃度の範囲はほぼ一定であり、しかも薬剤の選択作用が働くのは初期だけであつて、選択作用が反復されることはない。

従がつて、生体内における病原菌の耐性獲得の機序を検討する模型実験としては、増量的継代法は不適當と云わねばならない。むしろ薬剤濃度を一定にした培地に継

代する方法(恒量的継代法)が適当である。というのは、この方法においては、薬剤の選択作用が働くのは継代第1代のみであつて、第2代以後には反復されないからである。

この点を立証するために次の実験を示す。

1) *In vivo* における耐性の獲得の実験

館野・高山¹⁵⁾(1951)はマウス体内における赤痢菌の Sulfathiazole に対する耐性獲得の過程を報告したが、教室の伊藤⁶⁾(1953)はこの実験方法にならつて赤痢菌 (*Shigella flexneri* 3a, No. 239) の Sulfathiazole (ST), Streptomycin (SM), Chloromycetin (CM), Terramycin (TM) に対する耐性の獲得の経過を調べた。マウスの1側の睾丸実質内に赤痢菌と 1/4 m. l. d. のブドウ球菌毒素(細谷教授から分与されたもの)とを混じて注射する。このマウスに化学療法剤を1日1回づつ3日間皮下注射し、それから2日後に睾丸を摘出して赤痢菌を分離培養し、これを次のマウスに接種してまた薬剤投与をおこなう。このように化学療法をおこないつづ継代していき、各代の分離菌株について薬剤の抵抗性を調べた。その成績を一括して第1表に示した。

第1表 *Shigella flexneri* 3a (No. 239) の
生体内における耐性の獲得

薬 剤	継代数	1日の 投与量 (mg)	投与 日数	抵 抗 性	
				発 育	阻 止
Sulfathiazole	0	—	—	mg% 0.2	mg% 0.5
	1	0.2	3	2	5
	2	0.2	3	50	100
	3	0.2	3	200	>200
	5	0.2	3	200	>200
Streptomycin	0	—	—	γ/cc 2	γ/cc 5
	1	1	3	5	10
	5	1	3	20	50
	8	1	3	50	100
	10	1	3	50	100
Chloromycetin	0	—	—	2	5
	1	1	3	2	5
	5	1	3	5	10
	8	1	3	5	10
	10	1	3	5	10
Terramycin	0	—	—	2	5
	1	1	3	2	5
	5	1	3	5	10
	8	1	3	10	20
	10	1	3	10	20

Sulfathiazole 耐性: ST の1日の注射量は 0.2mg pro 13~15g マウス \approx 14mg pro kg \approx 0.7g pro 50kg であつて、人体使用量の数分の一にすぎない。したがつて、睾丸実質内の ST 濃度は 2~3mg% 以下と見做されるが、このような低濃度に曝露されているにもかかわらず

ず継代 3~5 代(薬剤接触 15~25 日)の間に赤痢菌の ST 耐性は 0.2mg% から 200mg% 以上となつた(耐性上昇 1,000 倍以上)。

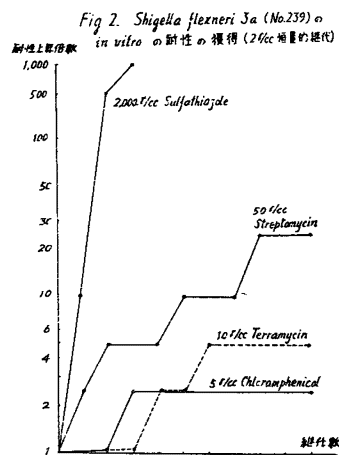
Antibiotics 耐性: Streptomycin, Chloromycetin, Terramycin などの1日の注射量は 1mg pro 13~15g \approx 70mg pro kg \approx 3.5g pro 50kg であつて、人体用量にはほぼ近い量を用いた。

赤痢菌の Antibiotics に対する耐性の獲得は Sulfathiazole に較べれば軽度であつた。SM に対しては、8代の継代(薬剤接触 40 日)によつて耐性 2γ/cc の原株が 50γ/cc 耐性株となつた(耐性上昇 25 倍)。TM に対しては、10代継代後といえども耐性上昇は 4~5 倍、CM に対しては 10代後に僅かに 2.5 倍にすぎなかつた。

2) 恒量的継代法 (*in vitro*) による耐性の獲得

次に、*in vivo* における耐性獲得の模型実験として *in vitro* における恒量的継代培養を試みた。

伊藤⁶⁾は、上記の赤痢菌 (No. 239) を各薬剤の阻止量の半量を常に加えた平板培地に接種し、3日培養後、普通培地に移植して2日培養し(第1代)、さらに薬剤加培地に移植し、3日培養後に普通培地2日培養(第2代)というような継代培養をつづけた。そして各代毎に菌の耐性を調べた。薬剤濃度は、ST は 0.2mg%(2γ/cc) に半合成培地に、SM, CM, TM は 2γ/cc に普通寒天培地に加えた。



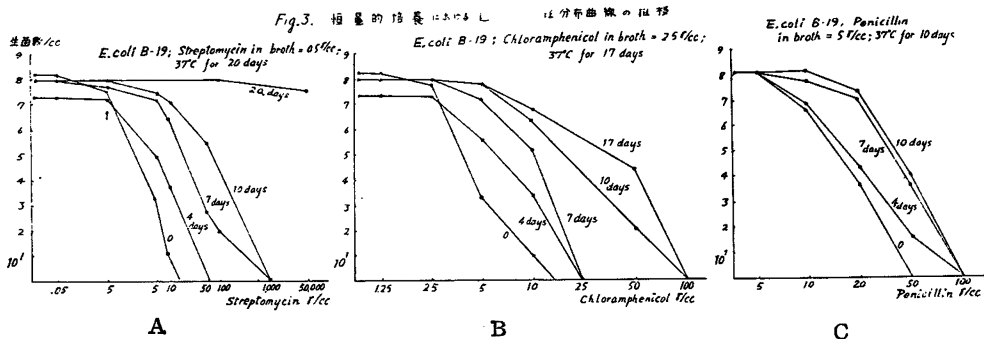
その結果は第2図に示したが、恒量的継代法による耐性獲得の経過は、その速度及び強度において各薬剤によつて異なる相を示し *in vivo* の場合ときわめてよく似ている。

もしこれを増量的継代法によつておこなうならば、薬剤の選択作用が反復する結果、Streptomycin に対してはかなり速やかに、かつ甚だ高度に耐性となるのみならず、Chloromycetin や Terramycin に対しても数 10 倍以上の耐性を得てくることは多くの研究報告の示す通りであつて、生体内実験の成績とはかなりかけはなれた所見を示すのである。

以上のような知見から、生体内における耐性獲得の機序の分析には恒量的継代法を用うべきであると考えられる。

なお、薬剤が安定であつて培地中において不活性化されないか、或いはされても軽度である場合には、継代することなしに、第1代の培地に2~3週間培養することによつても恒量的継代法と同様の所見を得ることができる。次にこの方法によつて耐性獲得過程の分析をおこなつた実験例をあげる。

3) 恒量的培養における菌体の耐性分布曲線の推移
恒量濃度に薬剤を加えた培地に長い期間培養しておると、菌株の耐性がだんだん上昇することは前述のようであるが、この現象を“菌体個々の耐性の分布”の面から観察すると、次のような様相を示す。教室の横田⁽⁷⁾が、*



第3図(A)に示すように、原株はSM 0.5 γ /cc に対し約50%の菌体が耐性であり、10 γ /cc に耐性である菌体が1/10⁷ ぐらいの割合に存在する(曲線0)。この原株からSM 0.5 γ /cc 含有ブイヨンに移植し、培養4日後の菌液についてその耐性分布曲線(曲線4)を見ると、全体の菌体の耐性は0.5 γ /cc となり、同時に10 γ /cc 耐性の菌も増加している。この曲線の推移は原株中の感性菌が抑制され比較的耐性な菌が増殖したという、薬剤の選択作用の結果であると解釈してもよい。

ところが、7~10~20日と培養日数が長くなるにつれて、薬剤の選択作用はもはや働かない条件にあるにかかわらず、菌の耐性がだんだんに高まり、曲線は右方へ推移していく。ことに20日間培養後においてはほとんど全部の菌体が1,000~5,000 γ /cc 耐性となつている。

このような耐性曲線の推移はChloromycetin (B)、Penicillin (C) その他の化学療法剤においても共通の現象であつて、ただその程度の差が認められるにすぎない。

このように薬剤の選択という作用が働かない環境下にあるにかかわらず、菌体の耐性分布曲線が右方に推移する現象は、spontaneous mutation and selection theory のみを以てしては説明できない。ただし、resistant mutants の増殖速度が、阻止量以下の濃度(sub-inhibitory dose)を含む培地中にあつては、感性菌体の増殖速度よりも大であるとするならば、上記の現象を

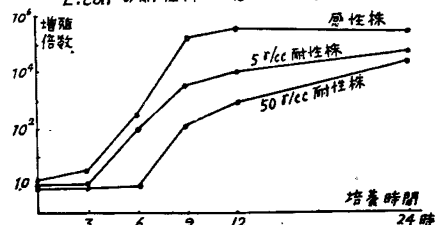
**E. coli communis* B-19 を用いて Streptomycin (SM), Chloromycetin (CM), Penicillin (Pc) の3種についておこなつた所見(第3図)をあげる。普通ブイヨンに20時間培養したものについて、これから種々の濃度に薬剤を加えた寒天培地に混和培養をおこなつて、48時間培養後、各平板に発生する集落数をかぞえて、菌体耐性分布曲線(曲線0)をとる。次に、原株を構成する菌体のほとんど全部または約50%以上が耐性である濃度に薬剤を加えたブイヨンに原株から1~2白金耳量を移植して、37°C に2~3週間放置する。この期間にときどき培養液の一部をとつて菌体の分布曲線をとる。

説明することの可能性があるらう。

この仮定の吟味の1例として、横田が Streptomycin についておこなつた実験をあげる。

SM 0.5 γ /cc, 5 γ /cc, 50 γ /cc 耐性の3株(同一原株から得たもの)の菌浮遊液(菌濃度をできるだけ等しいようにする)をつくり、これからSMを0.5 γ /cc に含むブイヨンに接種(菌数20~100/ccの割合に)して37°C に培養し、各菌株の増殖速度を平板培養による菌数計算法によつて測定して第4図に示すような結果を得た。即ち、阻止量以下の濃度に薬剤を加えた培地中においても、薬剤不含培地におけると同様、耐性の高い菌ほど増殖速度が遅いことを知つた。この所見から、耐性の高い菌体が耐性の低い菌体(感性菌体)を凌駕して増殖するという仮定は否定できる。

Fig. 4. Streptomycin 0.5 γ /cc 加ブイヨンにおける *E. coli* の耐性株及び感性株の増殖速度の比較



従がつて、恒量的培養の際に認められる耐性の上昇は、spontaneous mutation and selection theory

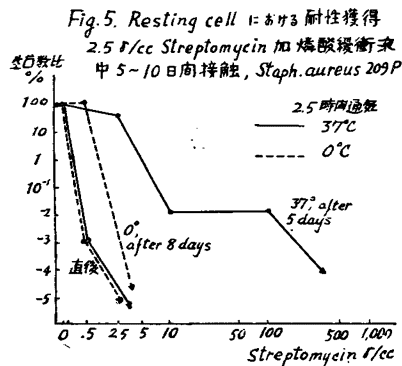
を以ては説明がつかないことになり、当然の帰結として適応が誘導変異の機序を考えねばならない。

耐性獲得が単なる適応現象でないことは前記のとおりであるから、化学療法剤に因る誘導変異と考えざるを得ないことになる。

4) 化学療法剤の誘導変異作用 (mutagenic effect) sponaneous mutation による耐性菌出現の機序を除外して、薬剤の誘導変異作用を証明する短絡的な方法は、細菌が増殖し得ない条件下において薬剤を作用させた場合においても耐性菌が出現することを証明することである。

余等¹⁸⁾はこの事実の有無を *Staphylococcus aureus* 209 P 対 Streptomycin, Penicillin, Terramycin について次のような方法によつて吟味した。

209 P 株の単集落培養をくりかえした後単集落からブイオンに接種して 24 時間培養したものから、遠沈によつて集めた菌体を pH 7.0 の phosphate buffer で 3 回洗滌したのち、菌浮游液に 2 時間通気処理をおこなつて菌体内の energy source をできるだけ除去してから、pH 7.0 の buffer に浮游する。この菌液 2 本を用意し、各々に SM を 2.5 γ /cc に加えたのち、1 本は 0° に、1 本は 37° に置き、混和直後と 5~8 日保存後に菌の SM 耐性分布曲線をとつた。



第 5 図に見られるように、resting state において 2.5 γ /cc の SM に 37° で 5 日間接触することによつて大部分の菌の耐性が 2.5 γ /cc にまで上昇するとともに、100 γ /cc にも耐える菌が相当数に現われてくる。0° に保存した場合には、37° 保存に比して耐性の獲得の程度は弱い、しかし明らかに耐性の上昇を認め得た。即ち、この所見から Streptomycin には誘導変異作用があると云うべきである。SM の mutagenic effect が温度によつて強弱の差を示す理由は、菌体の核物質の SM に対する感受性が温度に支配されるためであろう。

なお、Penicillin と Terramycin については、resting cell の耐性の上昇を誘発する mutagenic

effect を証明することはできなかつた。しかし、このように菌体の activity を極度に制限した状態において作用させた場合には mutagenic effect が証明されないものであつても、その薬剤に mutagenic effect がないとは云えない。というのは、菌が増殖している場合のような菌体の代謝が活動的な時期には、薬剤に対する感受性が強いからである。従がつて、resting state の菌体に対しては mutagenic effect を示し得ない薬剤も proliferating state の菌体に対しては mutagenic effect を示すことが可能であろうと考えられるからである。

事実、恒量培養法によつて耐性上昇の過程を追跡すると、前章及び後章に述べるように、Penicillin, Chloromycetin, Terramycin, Sulfathiazole, INAH 等の化学療法剤においても、程度の差こそあれ、Streptomycin におけると同様の所見を示す。

この現象は、薬剤との接触によつて耐性菌出現の変異率 (mutation rate) が著るしく大となることを示すものであつて、とりもなおさずこれらの化学療法剤が誘導変異作用を有することを示すものであると思われる。

(3) 菌体成分による耐性の獲得と復帰

ある化学療法剤に対して感性であるか、または耐性である菌株の菌体成分が、反対の感受性をもつ菌株を感性化し、或いは耐性化するという現象は、現在の研究段階では将来の臨床的応用への可能性を示唆する程度の知見を得たにすぎないが、現在の知見を以てしても耐性成立の機序を考える上において、かなり興味深いものがある。

Wyss¹⁹⁾(1950) は Sulfonamid 剤耐性大腸菌の核蛋白分割が感性株を耐性化すると報告し、HOTCHKISS²⁰⁾(1951) は Penicillin 耐性肺炎双球菌の Desoxyribonucleate (DNA) が感性株を耐性化するという精細な研究報告を出した。ROLAND & STUART²¹⁾(1951) は、Streptomycin 耐性 *S. wickita* 及び *E. coli* の培養濾液、Autolysate、核酸分割を以て SM 感性 *S. typhi* を耐性化することを得たと報告した。ZINDER & LEIDERBERG²²⁾(1952) は *S. typhimurium* を用いて Streptomycin 耐性株の培養濾液 (FA) が感性株を耐性化することと、FA 中の活性物質は諸種の酵素 (pancreatin, trypsin, ribonuclease, desoxyribonuclease) によつて破壊されないと報告している。わが国においては、中村等²³⁾(1952)、秋葉等²⁾(1952) が、SM 耐性 *E. coli* の培養濾液が感性株を耐性化する事実を報告している。

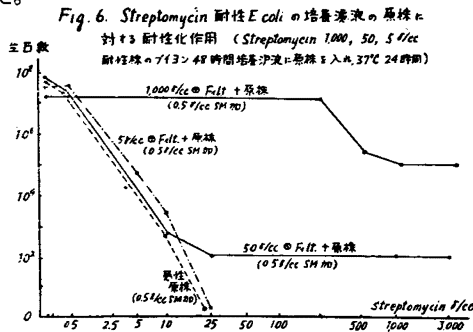
次に感性化の現象については、VOUREKA²⁴⁾(1948) は Penicillin 耐性菌と感性菌を混合培養するか、または感

性菌の菌体成分を加えた培地に耐性菌を培養すると感性株となる事実を発見したが、これを追試した GEORGE & PANDALAI²⁵⁾ (1949)は感性菌から抽出した sensitizing principle は ribonucleic acid (RNA) 分割にあると報告した。余等²⁶⁾ (1952) は GEORGE & PANDALAI の報告を追試し、sensitizing principle は RNA 分割でなしに DNA 分割にありとする訂正説を提出した。

河盛等 (1953) の報告もまた DNA 分割が有効であるとしている。

菌体成分による耐性化又は感性化に関する余らの現在の知見の概要は、つぎのようである。

SM 感性 *E. coli* B-33 から 1,000 γ /cc, 50 γ /cc, 5 γ /cc 耐性株をつくり、この3種の耐性株の SM 0.5 γ /cc 加ブイオン 48 時間培養の濾液をつくつて、これに感性原株を接種して 24 時間培養して、増殖した菌体の耐性分布曲線を調べ、同時に原株を SM 0.5 γ /cc 加ブイオンに培養した場合のそれと比較すると第6図のような結果を得た。



5 γ /cc 耐性株の濾液には耐性化作用が認められず、50 γ /cc 耐性株の濾液においては低耐性菌の増加は認められなかつたが、3,000 γ /cc に増殖する高耐性菌が少数出現することは注目に値しよう。1,000 γ /cc 耐性菌の濾液の耐性化作用は極めて強く、一挙にして全菌体が 200 γ /cc 耐性となり、そのうちには 3,000 γ /cc 耐性菌が相当数含まれている。

次に、SM 感性原株の培養濾液をつくつて、これに低耐性株 (SM 50 γ /cc +) と高耐性株 (1,000 γ /cc +) とを接種培養して耐性分布曲線をとつて見たところ、全然

感性化されないという結果を得た。

以上の知見は、SM 加培地に菌を継代していく際に、初期の間は耐性の上昇が緩慢であるが、上昇し始めると急激に上昇する事実や、SM 耐性の復帰が他の薬剤耐性の復帰に較べて比較的困難であることの一部の機序となるように考えられる。

なお、耐性物質が HOTCHKISS の所見のように DNA 分割であるのか、LEDERBERG の所見のように RNA, DNA 以外のものであるかについて、余等はいまだ明らかにしていない。

次に、感性化物質についての余等の研究知見に移る。

菌体成分を抽出すべき感性株として *Pneumococcus* type I を用いた。それは本菌株が Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin, Terramycin 等に感性であることと、菌体成分の抽出処理が比較的よくやれるからである。

本菌株と、人為的に Pc 耐性とした *Staphylococcus aureus* (R-82, R-97) とを肉汁ブイオンを用いて混合培養 (24 時間) すると、耐性株はかなりよく感性化される。しかし本菌の培養濾液にはかかる作用が認められなかつたが、菌体に胆汁を加えて溶解した濾液は有効であつた。そこで、AVERY & MC CARTY (1946) の方法に準じて菌体成分を抽出して、nucleoprotein, ribonucleic acid (RNA), desoxyribonucleic acid (DNA) 各分割をとつて、これを加えたブイオンに耐性菌を接種培養して見ると、DNA 分割にのみ感性化作用を認めた (第2表)。

余等の抽出した DNA 分割は、其 100 γ /cc 溶液の呈色反応は DISCHE の Diphenylamin (+), HCl-cystein (+),

第2表 感性菌の感作効果 (Sensitizing effect)

耐性菌	耐性菌の処置	Penicillin G γ /cc in Broth									感作効果		
		0	10	25	50	100	200	500	1,000	1,500		2,000	
Staph. R 97	- (対照)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
//	Pn I 生菌	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	⊕
//	同培養濾液	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
//	同胆汁溶解液	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	⊕
//	同 Nucleoprotein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
//	同 RNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
//	同 DNA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	⊕

Feulgen (+), Bial (±), Molisch (±), Biuret (-) Millon (-), Sakaguchi (-) であつて、DNA が主体であると考えるが、ある量の RNA や多糖体が混在している。また、本分割の活性は RNA 酵素によつては破壊されないが、DNA-酵素によつて破壊されるか否かは本酵素の活性あるものが入手できないので確認していな

い。余等²⁵⁾の得た DNA 分割の Pc-耐性 *Staph. aureus* R-97 に対する感性化活性は 15 γ /cc であつて、比較的弱いものであつた。

本物質を加えた培地に、耐性菌を接種すると、3時間後には感性化が完了する。また感性化作用は 0° で菌体に接触した場合は無効で 25°~37° で有効であり、菌体が感性化されるためには菌の代謝が活発におこなわれていることを必要とすることが推定できる。

次に、肺炎菌の DNA 分割が、分類学的にかなり離れた位置にある大腸菌の薬剤耐性株を感性化するか否かを調べて見た。第3表に示すように、Penicillin-, Aureomycin-, Terramycin 耐性は感性化されるが、Chloromycetin と Streptomycin 耐性は感性化され難いという所見を得た。

第3表 Pn I-DNA-Eraction の耐性 *E. coli* 感性化作用

Aureo- mycin	γ /cc	300	200	100	50	10
	処理菌 対 照	-	-	-	-	-
Chloro- mycetin	γ /cc	3,000	2,000	1,000	500	100
	処理菌 対 照	-	+	+	+	+
Penici- llin	γ /cc	3,000	2,000	1,000	500	100
	処理菌 対 照	-	-	-	±	+
Strep- tomycin	γ /cc	30,000	20,000	10,000	5,000	1,000
	処理菌 対 照	-	-	±	+	+
Terra- mycin	γ /cc	80	60	40	20	10
	処理菌 対 照	-	-	-	-	+

以上のように同種また異種の菌体成分を作用させることによつて、耐性化され或いは感性化されるという現象の背後に潜む機序についてはここに論ずることを省略するが、このような操作によつて耐性株となり、或いは感性株となつたものが継代によつて変化しないことは、遺伝子変異であることを示すものであつて、薬剤耐性が誘導変異であることを裏づける事実と考える。

II. 耐性阻止の機序

2種以上の化学療法剤を併用する方法による耐性阻止の機序と、化学療法剤に非抗菌性物質を併用する阻止法とについて、余等²⁶⁾の実験知見を述べる。

(1) 化学療法剤の併用による耐性阻止

実験的に、或いは臨床的に有効であると認められている

唯一の耐性防止法は、2種以上の化学療法剤を併用する方法である。

そして併用による耐性獲得防止の機序としてしばしば引用される説明は、spontaneous mutation and selection theory に立脚して次のように論ぜられている。

作用機序を異にする2種の化学療法剤が存在する環境においては、一方の薬剤に対する resistant mutants は他方の薬剤に対しては感性であるのが原則であつて、両薬剤に耐性である二重耐性菌の出現率(変異率)は、極めて小であるから、これが両薬剤の二重の淘汰の網をくぐつて増殖する可能性、即ち二重耐性菌株となる可能性は少ない。

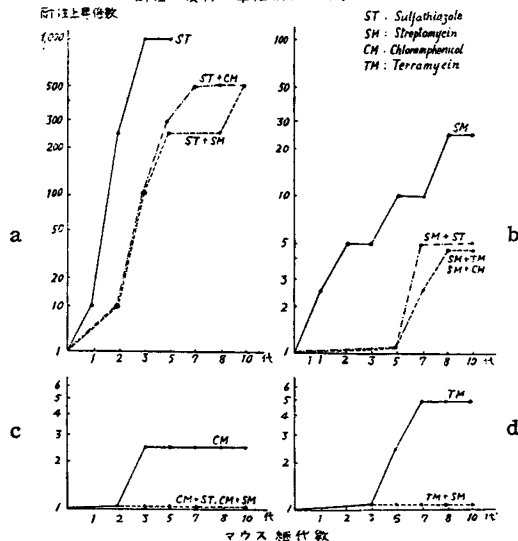
化学療法剤に対する resistant mutant の変異率は実験的に 10^{-8} ~ 10^{-10} の程度と考えられるから、薬剤Aに対する resistant mutants の変異率が 10^{-8} 、薬剤Bに対する変異率が 10^{-9} とすると、二重耐性菌の変異率は 10^{-17} となり、実際には negligible である。このような考え方に従えば、併用法によつて耐性獲得は完全に防止し得ることになる。

はたして、この理論どおりにいくであろうか。この点を吟味した実験例として、伊藤¹⁶⁾が、マウスを用いての赤痢菌継代接種法によつて薬剤の単独投与と併用投与との耐性獲得の程度を比較した結果を示したい(第7図)。

単独投与の1日量は、Sulfathiazole は 0.2mg、他の antibiotics は 1.0mg であり、併用法の場合の1日量は Sulfathiazole 0.2mg と各 antibiotics 0.5mg、2種 antibiotics 併用の際には各々 0.5mg づつ注射した。

単独で耐性を極めて得易い Sulfathiazole に対して

Fig 7. *Shigella flexneri* Ja (No 239) のマウス体内への耐性の獲得 単独投与と併用との比較



は、Streptomycin や Chloromycetin を併用しても ST 耐性防止の効果はあまりよくない (7a)。

耐性を比較的得易い Streptomycin に対しては、Sulfathiazole, Terramycin, Chloromycetin を併用することによつて防止効果はやや良好である (7b)。

元来、耐性を得難い Terramycin や Chloromycetin に対して他剤を併用することによつて強い耐性防止の効果を示した。(7c, d)

Spontaneous mutation and selection 説に立つて併用による耐性阻止の機序が説明され得るためには、次の2前提条件が満足されねばならないであろう。

(a) 併用する薬剤の間に交叉耐性(cross resistance)がないこと

(b) 併用する薬剤が拮抗的 (antagonistic) でないこと

これらの事項について吟味したのち、併用による耐性の獲得を *in vitro* で実験した内藤²⁹⁾の所見を記す。

(a) 交叉耐性について：内藤²⁹⁾(1952)は *E. coli communis* (No. 54) を用いて、人為的に原株に対する耐性の上昇が、Penicillin 1,000×, Streptomycin 20,000×, Chloromycetin 100×, Aureomycin 5×, Terramycin 3× の耐性株をつくつて、5種の antibiotics 間の交叉耐性を調べた。その結果は第4表に示すようであつて、AM と TM との間には完全な交叉耐性が認められ、CM, AM, TM との間には不完全な交叉耐性が認められた。この所見は SZYBALSKI & BRYSON³⁰⁾(1952)、池見、中渡瀬³¹⁾(1952)、御藤納³²⁾(1952)、小酒井・広明³³⁾(1953) その他の AM, TM, CM 間には交叉耐性を認めるとする報告とほぼ一致している。

(b) 拮抗作用について：次に内藤²⁹⁾(1952)は、これら5種の Antibiotics が、2種づつ併用した場合、*E. coli* に対して協力的に働くか、或いは拮抗的に働くかを吟味したが、第5表に示すように、相互に相乗的 (synergistic) ないしは相加的 (additive) に働き、拮抗的に働く場合がなかつた。

第4表 Antibiotics 間の交叉耐性

	Pc	SM	AM	CM	TM
Penicillin - 耐性株	卅	-	-*	-	-
Streptomycin - 耐性株	-*	卅	-*	-	-*
Chloromycetin- 耐性株	±	-	卅	±	±
Aureomycin - 耐性株	±	-	卄	卄	卄
Terramycin - 耐性株	-	-	-	卄	卄

註 1. *E. coli communis* (No. 54)

2. * は原株よりも感性が強くなっている。

この結果は、*Streptococcus* または *Pneumococcus* を

被検菌とするときは Pc または SM と AM, TM, CM との間に拮抗が認められるが、*E. coli* や *S. typhosa* などを被検菌とする場合には、これらの Antibiotics は拮抗的には働かないという KLEIN & SCHORR³⁴⁾(1953) の報告に一致する。

第5表 5種抗生物質の2種併用による併用効果

	Penicillin	Streptomycin	chloramphenicol	Aureomycin	Terramycin
Penicillin	-	S	S	S	S
Streptomycin	S	-	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	-	Ad	Ad
Aureomycin	S	S	Ad	-	Ad
Terramycin	Ad	S	Ad	Ad	-

S : Synergistic, Ad : Additive

以上の知見の示すように、Aureomycin と Terramycin との組合わせを除くほか、他の抗生物質間には著しい交叉耐性が認められない事実から、これらの作用機序は異なることが判り、また拮抗的に働かないから、交叉耐性を示さない4種の抗生物質を2種以上併用した場合には、*E. coli* No. 54 の耐性獲得は、spontaneous mutation and selection theory に従えば、完全に防止されるはずである。

(C) 併用による耐性阻止について：内藤²⁹⁾(1953)は、この点を増量的継代法によつて吟味した。各抗生物質を等量づつ加えた1系列のブイヨン培地に菌を培養し、その増殖最高濃度の培養から次の増量的系列に移植するという普通の増量的継代法を30代つづけ、その菌株の各抗生物質単独に対する耐性を調べた。第6表に示したように、併用によつて耐性獲得の強さ (SM, Pc, CM) はかなり阻止されるが、しかし3~4種を併用しても耐性獲得を完全に防止することは不可能であつた。

上記の伊藤の *in vivo* の実験及び内藤の *in vitro* の実験の示すように、併用によつて耐性獲得を完全に防止することは不可能である。この事実は、2重ないし4重耐性菌が spontaneous mutation によつて発生し、それが選択されて増殖するという機序によつては説明し難く、薬剤の誘導変異という機序を設定することによつて無理なく了解できると考える。

耐性獲得の原因が薬剤による誘導変異であるとすれば、併用によつても耐性を完全に防止することは不可能であろうが、或る程度阻止することはできるはずである。

そして、この際の機序は、単相耐性菌は相互に異種の薬剤によつて抑制されることと、複相耐性菌の発生を誘導することは混在する薬剤の種類が多くなるほど困難になるためと思われる。1種の薬剤に対する耐性菌について見ても、その耐性度が高まるほど増殖速度が低下する

第6表 各組合せ耐性獲得菌(30代目)の各抗生物質単独に示す抵抗力

抗生物質	初代感性	各抗生物質単独に対する抵抗力 γ/cc					
		SM	Pc	CM	AM	TM	
単独	SM	5	<10000				
	Pc	30		7000			
	CM	10			2000		
	AM	20				200	
	TM	10					70
2種併用	SM+Pc		>10000	500			
	SM+CM		700		100		
	SM+AM		>10000			70	
	SM+TM		>10000				100
	Pc+CM			500	500		
	Pc+AM			300		100	
	Pc+TM			300			70
	CM+AM				200	100	
CM+TM				200		100	
3種併用	SM+Pc+CM		300	200	200		
	SM+Pc+AM		<10000	200		100	
	SM+Pc+TM		50	100			50
	SM+CM+AM		200		300	100	
	SM+CM+TM		70		100		100
	SM+AM+TM		200			200	200
	Pc+CM+AM			200	200	100	
Pc+CM+TM			100	300		200	
4種併用	SM+Pc+CM+AM		70	200	100	100	
	SM+Pc+CM+TM		100	100	70		70

が、このことは耐性菌の代謝が異常化、非能率化していることを示すものである。従がつて復相耐性となるほど異常化の程度が強くなるのは当然と考えられるから、このような復相耐性菌の発生は困難となるであろう。

なお、2重耐性菌出現の機序として、接合によつて単相耐性菌から2重耐性菌となる機序が存在することを余等³⁵⁾は先に報告したが、その発生頻度から見てこの機序が復相耐性菌発生の主な役割をはたすものとは思われないので、ここには省略することとした。

(2) 非抗菌性化学物質を以てする耐性の阻止

耐性の成立が薬剤による誘導変異の結果であるとするれば、それは薬剤が直接的にか、或いは間接的にか遺伝子の形成に關与する代謝に干渉する結果であろうと考える。

そうであるとすれば、薬剤の制菌作用の機序には干渉しないで、遺伝子の代謝への干渉の部分にだけ阻害的にか

働く化学物質があれば、この物質を化学療法剤と併用する場合には、薬剤自身には拮抗的に働かないで、菌の耐性変異のみを阻止することが可能であると想像される。

余等はこのような仮定に立つて、金属イオンその他の化学物質について耐性阻止の効果を有するものを検索しているわけであつて、現在までに得た所見を本学会において報告した。

有効な物質として cadmium sulfate, stibnal, nitroprusid natrium などを見出したのであるが、詳細は原著³⁶⁾にゆづり、実験例として cadmium sulfate について得た成績だけを示したい。

菌種と化学療法剤との組合せは次のようなものであつた。

Streptomycin : *E. coli communis* B-19

Chloromycetin : " "

Sulfathiazole : " "

Penicillin : *Staphylococcus aureus* 209 P

Isonicotinic acid hydrazide : *Mycobacterium avium* A 71

阻止濃度以下に薬剤を加えた培地と、薬剤とともに cadmium sulfate を 10~100 γ/cc に加えた培地に、同一条件の菌を接種し、37° に 2~3 週間放置したのち、菌の薬剤に対する耐性を平板法または稀釈法によつて試験した。

第7表に示すように、Streptomycin, Chloromycetin, Sulfathiazole に対する *E. coli* の耐性の獲得と、Isonicotinic acid hydrazide に対する *Mycobacterium avium* の耐性の獲得とは、cadmium sulfate の存在によつてかなり顕著に阻止されたが、Penicillin に対する *Staphylococcus* の耐性獲得は軽度阻止されたにすぎなかつた。

ところで、Cd-sulfate の示す非特異的な耐性獲得阻止効果は、(a) 抗菌作用の結果ではないか、或いは (b) 薬剤と菌体との結合を阻害する (sulfonamid 剤に対する *p*-aminobenzoic acid のように) 結果ではないかを吟味して、そうでないことを確めた。それでは、どのような機序によるものであるかについては、余等はいまだなんらの実証を得ていない。manganous ion (DEMEREÇ & HANSEN 1951), ferrous ion (CATLIN 1953), hydrogen peroxide and organic peroxide (WYSS, *et al.* 1948, DICKY, *et al.* 1949, DEMEREÇ, *et al.* 1951) などが細菌や *Neurospora* に対して mutagenic effect をもつと報告されておる。これから考えて、cadmium sulfate, stibnal, nitroprusid natrium など mutagenic effect をもつていて、この作用が化学療法剤の mutagenic effect に干渉するの

第7表 Cadmium sulfate の耐性阻止効果

(1) Streptomycin—*E. coli communis* B 19 (20 日培養)

	SM (γ /cc) in media				
	0	5	50	100	1,000
普通ブイヨン	1.2×10^8	3.3×10^8	0	0	0
//+SM 0.5 γ /cc	1.6×10^8			1.2×10^8	1.3×10^8
//+SM 0.5 γ /cc+Cd 10 γ /cc	1.1×10^8	3.4×10^6	1×10^2	0	0
//+SM 0.5 γ /cc+Cd 100 γ /cc	1.7×10^8	3.4×10^3	0	0	0

(2) Chloromycetin—*E. coli communis* B 19 (17 日培養)

	CM (γ /cc) in media				
	0	5	10	50	100
普通ブイヨン	1.3×10^8	1.3×10^8	10	0	0
//+CM 2.5 γ /cc	1.8×10^8	1.7×10^7	6.4×10^6	2.4×10^4	0
//+CM 2.5 γ /cc+Cd 10 γ /cc	1.3×10^8	9.2×10^4	0	0	0

(3) Penicillin—*Staph. aureus* 209 P (17 日培養)

	Pc (γ /cc) in media				
	0	0.05	0.1	0.5	1.0
普通ブイヨン	1.8×10^8	3.2×10^8	2.1×10^8	0	0
//+Pc 0.1 γ /cc	2.0×10^8	2.0×10^8	1.0×10^8	3.2×10^8	3.2×10^2
//+Pc 0.1 γ /cc Cd+10 γ /cc	1.2×10^4		74	40	1

(4) Sulfathiazole—*E. coli communis* B 19 (20 日培養)

	ST (mg%) in media				
	0	1	10	100	200
合成培地	2×10^8	1×10^5	0	0	0
//+ST 0.01 mg%	5×10^8	2×10^7	3×10^2	2×10^2	2×10^2
//+ST 0.01 mg+Cd 10 γ /cc	2×10^8	1×10^5	1	0	0

(5) Isonicotinic acid hydrazide—*M. avium* A 71 (13 日培養)

	INAH (γ /cc) in medium				
	0	1	5	10	100
Tween-KIRCHNER 培地	卅	卅	—	—	—
+INAH 1 γ /cc	卅	卅	卅	卅	+
+INAH 1 γ /cc+Cd 10 γ /cc	卅	卅	—	—	—

も知れないし或いはそれ自身は mutagenic effect をもたないで単に化学療法剤の mutagenic effect に干渉するのかも知れない。その機作はとにかくとして、抗菌作用を示さない化学物質を化学療法剤に加えることによつて、薬剤自身の抗菌力には干渉することなしに、細菌の耐性の獲得を阻止することは興味深い現象と考える。そしてまた、この事実は、化学療法剤が mutagenic effect をもつことを示唆するものと思う。

余等はこのような耐性阻止現象を報告した文献をいまだ見出し得ないのであるが、文献の調査が不充分であるためかも知れないから、御承知の方の御教示を得られれば幸である。

結 論

“感染生体に化学療法をおこなう場合に現われる病原菌の耐性獲得”の機序について、動物実験、恒量培養法による耐性推移の分析、resting cell に対する mutagenic effect の吟味、菌体成分による耐性化と感性化の実験、化学療法剤併用による耐性阻止の機序の分析、非抗菌性化学物質による耐性阻止など諸種の実験から得た知見を総合して著者は次のような見解をもっている。

耐性獲得の機序は、化学療法剤による誘導変異 (induced mutation) が主たるものであつて、薬剤の選択作用、突然変異 (spontaneous mutation) による耐性菌の出現、耐性菌の菌体成分による耐

性化、接合による耐性獲得などの機序は、環境の条件によつて関与することがあるとしても、補助的なものである。

附記。本稿は、昭和 28 年 7 月に開かれた第 1 回日本化学療法学会総会における特別講演として報告したものであつて、この機会を与えられた佐々会長に深く感謝する。なお、実験を担当した共同研究者 石井、横田、内藤、伊藤、田村の諸君の尽力に謝意を表す。

文 献

- 1) 秋葉：医学のあゆみ 13 (5), 1, (1952)
- 2) 伝研 60 周年記念会講演集 細菌学の新領域
医学書院 (1953)
- 3) DEMEREC, M. : (a) Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. 31, 15, (1945)
(b) J. Bact. 56, 63, (1948)
- 4) LURIA, S. E. : J. Bact. 53, 463, (1947)
- 5) LURIA, S. E. : Bact. Rev. 11, 1, (1947)
- 6) KLEIN, M. : J. Bact. 53, 463, (1947)
- 7) OAKBURG, E. F. & LURIA, S. E. : Genetics
32, 249, (1947)
- 8) KLEIN, M. & KIMMELMAN, L. J. : J. Bact.
52, 471, (1946)
- 9) NEWCOMBE, H. B. & HAWIRKO, R. : J.
Bact. 57, 505, (1949)
- 10) HINSHELWOOD, C. N. : Symposia of the
Society for Exptl. Biology. Academic Press,
New York, (1949)
- 11) LINZ, R. : Ann. Inst. Past. 78, 105, (1950)
- 12) BARER, G. : J. Gen. Microbiol. 5, 1, (1951)
- 13) SEVAG, M. & ROSANOFF, E. L. : J. Bact.
63, 243, (1951)
- 14) 橋本, 塚口 : 第 26 回日本細菌学会総会 (1953)
- 15) TATENO, I. & TAKAYAMA, H. : Jap. J.
Exptl. Med. 21, 285, (1951)
- 16) 伊藤 : 総合医学 (寄稿中)
- 17) 横田 : Chemotherapy (寄稿予定)
- 18) 秋葉・横田 : 医学と生物学 24, 219, (1952)
- 19) WYSS, O. : Ann. N. Y. Acad. Sci. 53,
183, (1950)
- 20) HOTCHKISS, R. D. : Cold Spring Harbor
Symposium Quant. Biol. 16, 457, (1951)
- 21) ROLAND, F. & STUART, C. A. : Antibiot.
Chemotherap. 1, 523, (1951)
- 22) ZINDER, N. D. & LEDERBERG, J. : J. Bact.
64, (6), 679, (1952)
- 23) 中村, その他 : 日本細菌学会関東支部総会 (1952)
- 24) VOUREKA, A. : Lancet 1, 63, (1948)
- 25) GEORGE, M. & PANDALAI, K. M. : Lancet
1, 955, (1949)
- 26) 秋葉・石井・田村 : 医学と生物学 24, 55, (1952)
- 27) 河盛, 高橋, 岡田 : 第 1 回日本化学療法学会総会
(1952)
- 28) 秋葉・石井・田村 : 医学と生物学, 寄稿中 (1953)
- 29) 内藤 : (a) J. Antibiotics 5 (7), 404, (1952)
(b) // 5 (8), 463, (1952)
(c) // 6 (2), 86, (1953)
- 30) SZYBALSKI, W. & BRYSON, V. J. Bact.
64 (4), 489, (1952)
- 31) 池見・中渡瀬 : J. Antibiotics 5 (2), 112 (1952)
- 32) 御籬納 : 日本伝染病学会雑誌 27 (1/2), 1, (1953)
- 33) 小酒井・広明 : 第 26 回日本細菌学会総会 (1953)
- 34) KLEIN, M. & SCHORR, S. E. : J. Bact. 65
(4), 454, (1953)
- 35) 秋葉・横田 : 医学と生物学 25 (3), 123 (1952)
- 36) 秋葉・横田 : 医学と生物学 (寄稿中)