

生体内に於ける細菌の抗生物質耐性の推移に関する研究 第3篇

耐性復帰について

星 崎 東 明

京都大学医学部内科第二講座 (主任教授 菊池武彦)

(昭和 31 年 7 月 19 日受付)

I. 緒 論

耐性菌を抗生物質を含ませた培地に何代も植えつくと、或る株は長く耐性を変えないし、或る株は順次耐性が低下するのが見られる。一般に高度耐性菌は比較的安定しているが、軽度耐性菌は感受性菌に復帰しやすいことが知られている。これについて秋葉^{1),2)}は低耐性株は感受性菌体と種々の程度の耐性菌体とが混在しているために、これを普通培地に継代すると、感受性菌の増殖速度が耐性菌のそれよりも大である為に、次第に耐性菌の比率が減少して感受性株に復帰すると述べている。又耐性復帰の機序として VOUREKA³⁾ は PC 耐性菌が感受性菌と同一培地に混合培養されると、その耐性度が低下することを発見し、この現象を Sensitization とよび、感受性菌がこの効果をもつ物質を産出するものと仮定し、これを Sensitizer と命名した。その後 GEORGE & PANDALAI⁴⁾ は黄色葡萄球菌の核蛋白、RNA、DNA の各分層を抽出し、RNA 分層が Penicillin 耐性菌の耐性を復帰させたことと報告した。しかし秋葉²⁾等は GEORGE & PANDALAI の報告を追試し、Sensitizing-principle は RNA 分層でなしに DNA 分層にありとする訂正説を提出している。この外耐性復帰の機序として、耐性獲得機序についての DEMEREC の説である Spontaneous mutation に対してその逆の Spontaneous back mutation、即ち耐性菌の増殖中に於て感受性菌の変異株が逆変更によつて出現するという説がある。このように耐性復帰に関しては未だその真の機序は不明である。ところで生体内に於ける菌の耐性の持続又は復帰に就いては、結核症の場合を除いては未だよく調査されていない。そこで我々は生体内に於ける耐性復帰につき、動物を用いて実験を行つたので以下その成績を報告する。

II. 試験管内実験

1. 実験材料並びに方法

使用菌株としては黄色葡萄球菌島株に試験管内で耐性を獲得された人工耐性葡萄球菌 5 株及び化膿性疾患患者より分離した自然耐性葡萄球菌 5 株を用い、夫々抗生物質を含まないブイヨン培地に毎日継代してゆくことにより 15 代に亘り継代し耐性の推移を観察した。人工耐性菌としては PC に対し 0.08 u/ml, SM に対し 1.2

mcg/ml, CM に対し 2.5 mcg/ml, AM に対し 0.3 mcg/ml, EM に対し 0.16 mcg/ml の感受性株より、PC に対し 25 u/ml の PC 耐性菌, SM に対し 1,000 mcg/ml の SM 耐性菌, CM に対し 6.3 mcg/ml の CM 耐性菌, AM に対し 1.2 mcg/ml の AM 耐性菌及び EM に対し 25 mcg/ml の EM 耐性菌を作つた。その耐性獲得方法はブイヨン培地を用い、抗生物質の倍數稀釈系列に順次継代することにより耐性を獲得せしめたもので、SM 耐性菌は 5 代、その他の耐性菌は 15 代継代したものである。自然耐性菌としては PC に対し 50 u/ml の PC 耐性菌, SM に対し 1,000 mcg/ml の SM 耐性菌, CM に対し 25 mcg/ml の CM 耐性菌, AM に対し 50 mcg/ml の AM 耐性菌及び EM に対し 10 mcg/ml の EM 耐性菌を用いた。

2. 実験成績

人口耐性菌の試験管内耐性復帰の成績は第1表の如く、15代継代で PC 耐性菌は 0.08 u/ml, SM 耐性菌は

第1表 試験管内耐性獲得菌の試験管内耐性復帰

抗生物質	原株感受性	耐性菌	継代数		
			5 代	10 代	15 代
PC	0.08	2.5	1.2(1/2×)	0.1(1/25×)	0.08(1/31×)
SM	1.2	1,000	500(1/2×)	63.(1/16×)	8.(1/125×)
CM	2.5	6.3	6.3 (1×)	6.3 (1×)	3.1 (1/2×)
AM	0.3	1.2	0.6(1/2×)	0.3 (1/4×)	0.3 (1/4×)
EM	0.16	2.5	12.5(1/2×)	12.5(1/2×)	6.3 (1/4×)

実数は耐性度 u, mcg/ml, () は耐性復帰倍數

第2表 患者より分離した自然耐性菌の試験管内耐性復帰

抗生物質	耐性菌	継代数		
		5 代	10 代	15 代
PC	50	50.(1×)	50.(1×)	50.(1×)
SM	1,000	1,000(1×)	1,000(1×)	1,000(1×)
CM	25	25.(1×)	25.(1×)	25.(1×)
AM	50	50.(1×)	50.(1×)	50.(1×)
EM	10	10.(1×)	10.(1×)	10.(1×)

実数は耐性度 u, mcg/ml, () は耐性復帰倍數

8mcg/ml, CM 耐性菌は 3.1mcg/ml, AM 耐性菌は 0.3 mcg/ml, EM 耐性菌は 6.3mcg/ml であり, EM 耐性菌に於て耐性復帰がやや緩慢であつたが, その他の耐性菌はほぼ原株感受性に近くまで耐性が復帰した。これに対し自然耐性菌の耐性復帰は第 2 表の如く, 15 代継代で全く認められなかつた。

III. 生体内実験

1. 実験材料並びに方法

用いた菌株は試験管内実験で用いたものと同様である。動物はラットを用い, 菌を mucin 生理的食塩水に浮遊させて作製した菌浮遊液を, ラットの腹壁に接種させて皮下膿瘍を形成させ, 接種後 4 日目に菌を分離し, これをくりかえすことにより 4 代に亘り継代し菌の耐性復帰を観察した。

2. 実験成績

人工耐性菌の耐性復帰の成績は第 3 表の如く, 4 代継代で PC 耐性菌は 0.6u/ml, SM 耐性菌は 63mcg/ml, CM 耐性菌は 1.6mcg/ml, AM 耐性菌は 0.1mcg/ml 及び EM 耐性菌は 0.16mcg/ml となり, 試験管内成績(第 1 表)と比較して大差ない程度の復帰をみた。

これに対し自然耐性菌の耐性復帰は第 4 表の如く, 4 代継代で PC 耐性菌は 12.5u/ml, SM 耐性菌は 6.3 mcg/ml, CM 耐性菌は 1.6mcg/ml, AM 耐性菌は 1.6 mcg/ml 及び EM 耐性菌は 5mcg/ml であり, 試験管内に於ては全然耐性復帰が認められなかつたのに対し, 生体内ではかなり耐性が復帰し, これを人工耐性菌の生

体内耐性復帰成績と比較して一般に大差を認めなかつた。

IV. 総括並びに考察

試験管内で耐性を獲得された人工耐性菌の試験管内復帰に関しては, 松本⁵⁾は PC 耐性葡萄球菌について研究を行い, 高耐性菌 (1,000 u/ml) のものは全く耐性が復帰しないが, 低耐性菌 (6 u/ml) で耐性獲得度の遅かつた菌株は耐性復帰が速かつたと報告し, 山川⁶⁾は腸チフス菌及び腸炎菌で実験を行い, CM 耐性菌で 700~1,000mcg/ml の高度耐性株は 30 代継代しても復帰は軽度であるが, 中等度ないし低耐性株は耐性の復帰がかなり著明であり, AM 耐性菌は 100mcg/ml のものが 1/30 に, 200mcg/ml のものでは 1/21.5 の復帰がみられ, 高度なほど耐性復帰が遅れ SM 耐性菌は 1,000 mcg/ml のものが 1/2 になり耐性復帰が緩慢であつたと報告し, 中塚⁷⁾は葡萄球菌を用いた実験で, 4~10 倍耐性獲得せしめた CM 耐性菌が 1 代で原株感受性に復帰したと報告し, 高橋⁸⁾は赤痢菌を用いた実験で, PC 耐性菌は或程度復帰するが SM 耐性菌は復帰し難く, CM 耐性菌は 30 代継代で 1/2~1/10 に復帰したと報告し, 宮川⁹⁾は *E. coli* を用いた実験で, CM 耐性菌には著明な耐性復帰が認められたと報告している。

以上の如く一般に高耐性菌は復帰し難く, 低耐性菌は復帰し易い様である。我々の用いた人工耐性菌も SM 耐性菌を除いては低耐性菌でありその為に比較的速に耐性が復帰したものと考える。SM 耐性菌については耐性

が復帰しにくいという報告が多いが, 我々の成績ではかなりの耐性復帰が認められた。

生体内に於ける人工耐性菌の復帰に関しては, 山川¹⁰⁾が腸チフス菌で実験を行い, マウスに接種することにより 5 代に亘り継代し, 50mcg/ml の CM 耐性菌が 1/5 にその耐性を低下し, SM 耐性菌は耐性復帰が軽度で, いずれも試験管内の成績と一致していると報告しているが, 我々の成績でも人工耐性菌の生体内復帰は試験管内のそれと大差なかつた。

自然耐性菌の試験管内復帰は, 我々の成績に於ては 15 代継代で全く耐性復帰が認められなかつた。我々の用いた自然耐性菌はいずれも人工耐性菌よりも耐性度が高く, その為に復帰しにくいということも考えられるが, それ

第 3 表 試験管内耐性獲得菌の生体内耐性復帰

抗生物質	原株感受性	耐性菌	継 代 数			
			1 代	2 代	3 代	4 代
PC	0.08	2.5	2.5 (1×)	2.5 (1×)	1.2 (1/2×)	0.6 (1/4×)
SM	1.2	1,000	750(1/1.3×)	750(1/1.3×)	63 (1/16×)	63 (1/16×)
CM	2.5	6.3	6.3 (1×)	6.3 (1×)	3.1 (1/2×)	1.6 (1/4×)
AM	0.3	1.2	1.2 (1×)	0.6(1/2×)	0.16(1/8×)	0.16(1/8×)
EM	0.16	5.2	25 (1×)	12.5(1/2×)	3.1 (1/8×)	1.6(1/16×)

実数は耐性度 u, mcg/ml, () 度は耐性復帰倍数

第 4 表 患者より分離した自然耐性菌の生体内復帰

抗生物質	耐性菌	継 代 数			
		1 代	2 代	3 代	4 代
PC	50	37.5(1/1.6×)	25 (1/2×)	12.5(1/4×)	12.5 (1/4×)
SM	1,000	1,000(1×)	31 (1/32×)	10(1/100×)	6.3(1/158×)
CM	25	6.3 (1/4×)	1.6(1/8×)	1.6 (1/8×)	1.6(1/8×)
AM	50	1.6(1/13×)	1.6(1/31×)	1.6 (1/31×)	1.6(1/31×)
EM	10	1.0 (1×)	10 (1×)	5 (1/2×)	5 (1/2×)

実数は耐性度 u, mcg/ml, () は耐性復帰倍数

にしても SM 耐性菌は両者何れも 1,000mcg/ml のものであり、EM 耐性菌は自然耐性菌の方が耐性度が低いものであつたにも拘らず人工耐性菌は何れもかなり著明に復帰し、自然耐性菌は何れも全く耐性度に変化がなかつた。此等の事実から自然耐性菌は人工耐性菌よりは復帰し難い様に思えた。何故自然耐性菌が復帰しにくいのであろうか。人工耐性菌と自然耐性菌との間に細菌学的性状に差異のあることが知られている。例えば KLIMEK¹¹⁾、永井¹²⁾は人工 PC 耐性葡萄球菌は Gram 染色性を失い、嫌気性に發育する能力を失い、Lactose, Saccharose, Maltose, Mannit, Galactose から酸を作る能力を失い、6.5% NaCl の存在で硝酸塩を還元せず、發育が原株より不良になると報告している。NORTH CHRISTIE¹³⁾、BLAIR¹⁴⁾、SPINK FERRIS¹⁵⁾、GILSON PARKER¹⁶⁾等は人工 PC 耐性葡萄球菌と自然 PC 耐性葡萄球菌の差異について報告し、前者に毒力が消失し、Penicillinase 産生能がないのに、後者では毒力は原株と同様に保持して居り、すべて Penicillinase を産出すると述べている。永井¹²⁾は自然 PC 耐性葡萄球菌は Penicillinase を産出する以外、細菌学的諸性状には感受性菌と全く差異を認めなかつたと報告している。他の抗生物質耐性菌についても人工耐性菌と自然耐性菌との間に差異のあることが認められている。以上の如く人工耐性菌は原株に比し發育不良となり、その他の生物学的性状も変化してくるのに対し、自然耐性菌には性状の変化が少い。人工耐性菌が耐性復帰が速くであり、自然耐性菌が耐性復帰しにくいのも、このようなことに関係があるのではないかと考える。殊に人工耐性菌に於て原株より發育不良であることは、抗生物質を含まないブイヨンに継代培養することにより、感受性菌の發育の方が旺盛となり、そのために耐性菌が圧倒されることになり耐性復帰が見られ、これに対し自然耐性菌は感受性菌と同様な發育を示すため、感受性菌の發育に圧倒せられることなく、ために耐性復帰し難いのではないかと考える。

次に自然耐性菌には試験管内継代では耐性復帰の傾向が認められなかつたが、生体内実験ではかなり復帰するのが認められた。これは試験管内と生体内との間の種々の因子の相異によるものと思われるが、その機序については全く今後の研究にまつ所である。何れにせよ此事実

は耐性に関する試験管内実験成績を以て生体内に於ける菌耐性の推移をうかがわんとする事の如何に危険であるかを示唆するものである。

V. 結 論

余は、試験管内で耐性を獲得せしめて得た所謂人工耐性菌及び患者から分離した所謂自然耐性菌につき、試験管内並びに生体内に於ける耐性復帰の態度につき観察した。

試験管内に於ては、普通ブイヨンに 15 代継代することにより、人工耐性菌がいずれも、原株の感受性にまで或はそれ近くまで復帰するのに対し、自然耐性菌ではいずれも全く復帰する傾向を示さなかつた。

生体内に於てはラットの腹壁に菌を接種し、4 代継代することにより、人工耐性菌は試験管内に於けると同様にいずれも原株の感受性、或はそれ近くまで復帰したのに対し、自然耐性菌は、試験管内では全く復帰の傾向がなかつたのに、いずれも比較的よく耐性が復帰した。

本論文の要旨は日本化学療法学会第 4 回総会に於て発表した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師 菊池教授、並びに京都大学講師兼関西医大 久保博士に深甚な感謝の意を捧げる。

文 献

- 1) 秋葉：医学のあゆみ 13. 1 (1952)
- 2) 秋葉：Chemotherapy 1. 1 (1953)
- 3) VOUREKA, A. : Lancet 1. 63 (1948)
- 4) GEORGE, M. & PANDALAI, K. M. : Lancet 1. 955 (1949)
- 5) 松本：J. Antibiotics 5. 279 (1952)
- 6) 山川 J. Antibiotics 5. 114 (1952)
- 7) 中塚：J. Antibiotics 4. 141 (1951)
- 8) 高橋：慈大雑誌 69. 138 (1952)
- 9) 宮川：慈大雑誌 66. 18 (1952)
- 10) 山川：J. Antibiotics 5. 117 (1952)
- 11) KLIMEK, J. W. : J. Bact. 55. 139 (1948)
- 12) 永井：J. Antibiotics 6. 295 (1953)
- 13) NORTH, E. A. CHRISTIE, R. Med. J. Australia 1. 176 (1946)
- 14) BLAIR, J. E. : J. Immunol. 52, 281 (1946)
- 15) SPINK, W. W. & FERRIS, V. . Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59. 188 (1945)
- 16) GILSON, B. S. C. & PARKER, R. F. J. Bact. 55. 801 (1948)