

[日本化学療法学会第 10 回総会 特別講演]

細菌の薬剤耐性獲得の機序

秋葉朝一郎

東京大学教授

細菌の耐性獲得の機序は第 1 表に示すように、(A)薬剤の影響によつておきるものと、(B)薬剤と無関係におきる機序、とに分けることができる。

日本化学療法学会第 1 回総会 (昭 28) において「薬剤耐性の獲得と阻止の機序」と題して特別講演<sup>1)</sup>をおこなつたが、その際には前記 A 群の薬剤と細菌との間の直接的な交渉によつておきる耐性獲得の機序ならびに、この機序に基づく阻止の機序について主として述べた。

第 1 表 耐性獲得の機序

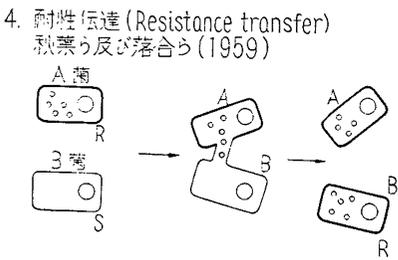
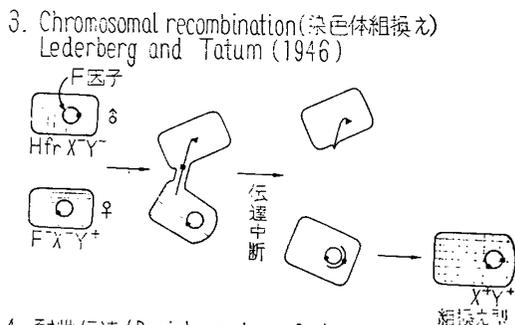
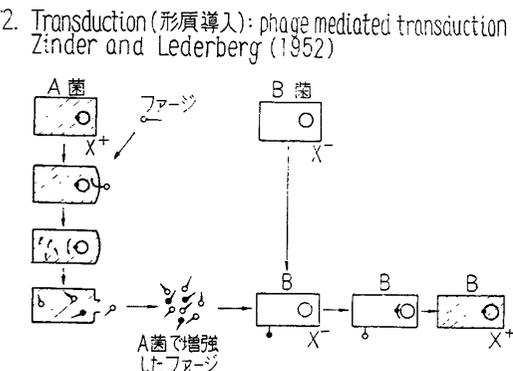
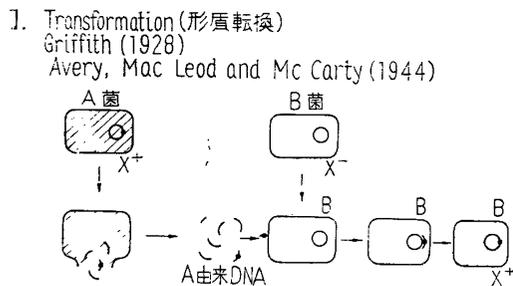
- A) 薬剤の作用によるもの
  - 1) 突然変異と選択
  - 2) 適 応
  - 3) 誘導変異と選択
- B) 薬剤の作用によらないもの
  - 1) 形質転換 (Transformation)
  - 2) 形質導入 (Transduction)
  - 3) 接合 (Conjugation) による遺伝因子の組換
    - i. 染色体遺伝子 (chromosome gene)
    - ii. 細胞質遺伝因子 (cytoplasmic genetic element : plasmid ; episome)

従つて今回は前記 B 群による機序について、近年私が共同研究者とともに試みた実験所見を中心として述べたいと考える。

この種類の機序は近年微生物の遺伝学の進歩に伴つて明らかになつてきた分野であるので、いちおうの解説を試みたくえて本論に入りたい。(図 1 参照)。

1) Transformation (形質転換) というのは、donor である A 菌 (X という遺伝形質、たとえば薬剤耐性という形質をもつ、X<sup>+</sup>) から抽出したデオキシリボ核酸 (DNA) を加えた培地に recipient である B 菌 (X という形質をもたない、X<sup>-</sup>) を培養すると、A 菌のもつ遺伝形質の一部 (X 即ち耐性) が recipient 細胞に組み込まれて、X という性質をもつ B 菌が発生するという現象である。耐性獲得にもこの機序が関与しうるのであつて、ペニシリン (PC) 耐性肺炎球菌から抽出した DNA が PC 感性株を耐性化することを HOTCHKISS<sup>2)</sup> (1951) が最初に報告したが、最近にいたつて連鎖球菌においても transformation によつてストレプトマイシン (SM)

図 1



耐性が伝達されるということが、BRACO(1957), SLADE<sup>3)</sup>(1962)らによつて報告された。

2) Transduction (形質導入) というのは、donor となる A 菌(X<sup>+</sup>) を宿主として増殖したファージが宿主の遺伝子の一部 (たとえば X) をとり込んでいて、これが recipient にあたる B 菌(X<sup>-</sup>) に感染するとき donor の遺伝子が運び込まれて recipient の B 菌が X という形質を獲得するという現象である。Transduction によつて耐性化がおきることは、ZINDER & LEDERBERG<sup>4)</sup>(1952)によつて発見されたが、吾国においては井関ら<sup>5)</sup>(1954)によつて報告され、その後内外に多数の報告がある。

3 i) Chromosomal recombination (染色体組換え) というのは LEDERBERG & TATUM (1946) によつて E. coli K-12 の mutants について発見された現象である。Male cell (性決定因子 F をもつもので、F 因子が細胞質内に在る場合と染色体上に在る場合とがあり、後者では接合のおきる頻度が高いので Hfr と記す) と female cell(F<sup>-</sup>) とを混合培養すると、両細胞の間に接合がおこり、F<sup>+</sup>-cell の染色体の 1 部分が F<sup>-</sup>-cell のなかに入つて、female cell の染色体において遺伝子の組換(recombination) がおきる結果として、male cell の遺伝形質 (X) が female cell に移る現象である。かような Chromosomal recombination による耐性化の報告は最初に LEDERBERG<sup>6)</sup>(1950) が出したが、吾国では秋葉、横田<sup>7)</sup>(1952)によつても報告され、その後多くの報告がある。

3 ii) 耐性の伝達 3 i) のような染色体遺伝子の移入によらないもので、薬剤耐性を支配する因子が細胞質遺伝因子 (Cytoplasmic genetic element : plasmid ; episome) として存在すること、およびこの耐性因子が接合によつて耐性菌 (A 菌 R) から感性菌 (B 菌 S) に移入して、B 菌が耐性化するという現象が、秋葉ら<sup>8)</sup>と落合ら<sup>9)</sup>(1959) によつて独立に発見された。この現象は現在までのところ腸内細菌においてのみ認められているにすぎない。

以上 4 種の耐性化の機序のうちで、生体内で実際にしかも相当の頻度でおこりうるのは、ファージによる導入と接合による耐性因子の伝達という機序であろうと現在のところ考えておる。

I. ブドウ球菌の transduction による耐性化

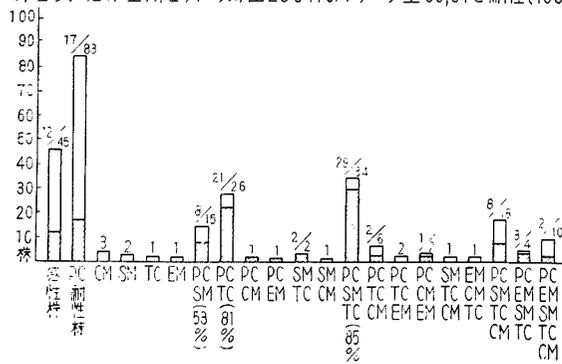
この問題は近年ようやく注目されるにいたつた。CAVALLO & TERRANOVA (1955) は PC-SM 耐性のブ菌から得たファージによつて感性菌が SM 耐性を導入されたと報告した。RITZ & BALDWIN<sup>10)</sup>(1958) は、ブ菌のペニシリナーゼ (PC-ase) 産生能が Virulent phage を用いての transduction によつて感性菌に導入されることを、MORSE<sup>11)</sup>(1959) は phage 53 の U.V. 照射によつて得た mutant phage によつて SM と Novobiocin 耐性の導入をブ菌でおこなつたことを報告した。ついで PATTEL & BALDWIN (1961) は phage 80 を用いて、これを耐性ブ菌株で増殖させた後抗生剤感性ブ菌に感染させ PC-ase 産生能、Chlortetracycline 耐性、Novobiocin 耐性が導入されること、phage 25, 52 A, 79, 53 等も導入能力をもつが phage 42 B や 81 は不能であつたという報告を出している。

東大附属病院の臨床検査室において昭和 36 年に感染症から分離したブドウ球菌 311 株中 108 株 (34.72%) は phage 80 又は 81 に感受性のものであつた。なおこの 80 又は 81 型ブ菌の抗生剤耐性ととの関係をしらべてみると、第 2 表に示すように (PC・TC) 耐性株と (PC・SM・TC) 耐性株とにおいては、ファージ 80, 81 に感性である菌株の率が極めて高く、前者においては 80.7%、後者においては 85.3% を占めておる。この事実から phage 80, 81 とブ菌の多剤耐性化との間に関係がありそうに思われる。

多剤耐性ブドウ球菌の出現の機序について考えてみるに、薬剤とブドウ球菌との間の interaction の結果によるという機序によつては解釈しにくいし、また transformation や接合による機序ははまだ実験的に証明されていない。

いつぼう、ブ菌では溶原株 (lysogenic strain) がかなり多い事実、ならびに鼻腔内或は体表面の化膿巣においてはファージ型の異なるブ菌の混合感染がある事実を考えあわせると、ファージ型を異にするブ菌の混合感染巣において、しかも耐性域を異にする菌の間において transduction によつて耐性形質の授受がおこなわれることによつて多剤耐性化するという機序の可能性を推測することができよう。しかもこの場合上述の事実から phage 80, 81 が関係があると思われる。

表 2 感染症分離ブドウ球菌 259 株のファージ型 80, 81 と耐性 (1961)



第3表 Phage 81-15 による TC 耐性の導入と Recipients の感受性との関係

Recipient Strain No.	Phage type	薬剤感受性						TC-耐性 transductant の頻度/ 10 <sup>7</sup> phage 粒子
		PC	SM	CM	EM	SA	TC	
91	81	s	s	s	s	s	s	1,000
66	III	s	s	s	s	s	s	200
128	81	s	s	s	s	s	s	60
79	III/81	r	s	s	s	s	s	450
39	III	r	s	s	s	s	s	200
80	III	r	s	s	s	s	s	30
48	80	r	r	s	s	r	s	1,500
57	I	r	r	s	s	s	s	200
58	—	r	r	s	s	r	s	10
276	III	r	s	r	s	r	s	200
251	I/80	r	r	r	s	r	s	80
13	II	r	s	r	s	s	s	5
239	80/81	r	s	s	r	r	s	220×10 <sup>8</sup>
47	81	r	r	s	r	r	s	1,000
155	81	r	s	r	r	r	s	90
Donor E-15	80/81	r	r	s	r	r	r	

第4表 Phage 80-15, 81-15 による TC-耐性導入と Recipient の phage type

Recipient の phage type	P 81-15 による 導 入		P 80-15 による 導 入	
	+	-	+	-
I (80, 81)	26	0	21	3
II	17	19	14	20
III (80, 81)	21	0	19	1
IV	1	0	1	0
I, II (80, 81)	1	0	1	0
I, III (80, 81)	5	0	3	1
80	2	0	2	1
81	5	0	6	0
80/81	5	0	5	0
Non-typable	40	23	39	23
計	123 (74.5%)	42 (25.5%)	111 (69.4%)	49 (30.6%)

このような想定から、まづ phage 80 と 81 とを用いて多剤耐性菌株を宿主として増殖させた後、これを感受性株に作用させて tetracycline (TC) 耐性が導入されるか否かを調べた。この研究は東邦大学の桑原教授<sup>13)</sup>の研究室と私の研究室との共同研究として現在実施中のものであるが、ここにその一部を紹介したい。

まづ、phage 80, 81 を用いてこれに感受性である *Staphylococcus aureus* E-15 (PC<sup>r</sup>, SM<sup>r</sup>, EM<sup>r</sup>, SA<sup>r</sup>, CM<sup>s</sup>,

TC<sup>r</sup> という 5 剤耐性株) を増殖菌としてファージ液をつくつた (P 81-15; P 80-15 という記号を与えた)。かようなファージ液 1 cc と、各種のファージ型で各種の抗生剤感受性をもつ分離株のブイオン培養 1 cc とを混じて 30 分間作用させた後その 0.1 cc を TC 10 mcg/cc 含有寒天平板にまいて培養し 24~48 時間後の発生集落数を調べた。TC-耐性化した集落数 (transductants) を作用させたファージ 10<sup>7</sup> 粒子あたりにまとめたものを第 3 表に示した。これを要約すると、感受性株、1 剤耐性株、2 剤以上の耐性株のいずれの耐性域の菌株にも TC 耐性が導入された。この transductants の TC 耐性は原株 E-15 の TC 耐性 (>100 mcg/cc) と同等のものが大部分 (96%) で 50 mcg/cc のものはわずか (4%) であった。

つぎに、P 80-15, P 81-15 による TC 耐性の導入と recipient のファージ型別との関係を調べた結果をまとめて第 4 表に示した。これによつて、II 群の菌株と型別不能群 (nontypable) とにおいては TC 耐性を導入されない菌株が相当数みられたが、他のファージ型の菌株は P 80, 81 に感受性であるか否かを問わず、かなり高率 (70~75%) に導入された。II 群及び型別不能群において導入陰性株が多いことは耐性株のファージ型分布と一致する点において興味ある所見であろう。

なお、上記の TC 耐性を導入された菌株について、TC 耐性と同時に他の耐性も導入されたか否かを調べたところ、現在までに知り得た範囲では PC 耐性、SM 耐性、EM 耐性などは導入されていなかった。ただし TC 耐性導入株 123 株のうち 1 株だけが TC 耐性ととも EM 耐性が導入されていた。換言すると、5 剤耐性株で増殖させたファージを用いたのであるが、2 剤以上の耐性を同時に導入することはふつうにはおこらないということである。次に述べる腸内細菌、たとえば 4 剤耐性大腸菌又は赤痢菌を宿主として増殖したファージが導入する場合は 4 剤耐性をいつしよに導入し得る場合が多い (90% 以上)。この事実は、ブドウ球菌の多剤耐性の遺伝因子と腸内細菌の多剤耐性因子との間に構造上の相異があることを示唆するものといえよう。

## II. 赤痢菌の耐性伝達による耐性化

現在わが国で流行している赤痢菌株のうち、抗生物質耐性株の頻度は 10~15% 位であるが、このうち 1 剤耐性株 (TC 又は SM) 或は 2 剤耐性株は比較的少なく 3 剤耐性株が大部分を占めていることは周知の通りである。

ここに昭和 36 年度に栃木県において分離された赤痢菌株 415 株 (集団発生において同一菌型の場合は代表として 1 株のみをとつた) について、そのス剤 (SA), ス

トレプトマイシン(SM), テトラサイクリン系薬剤(TC), クロラムフェーコール(CM)の4剤に対する耐性の頻度を調査した結果を紹介すると次のようである。415株中上記の4剤のいずれにも感性であつたものは124株(30%), SA-1 剤耐性株が231株(55.7%), (SA・SM・CM・TC)-4 剤耐性株が41株(9.9%), 残りの18株(4.3%)がSM-耐性(1), TC-耐性(3), (SA・SM)-耐性(6), (SA・TC)-耐性(2), (SA・SM・CM)-耐性(5), (SA・SM・TC)-耐性(1)よりなるものであつた。なお抗生物質耐性株59株についてみると(SM・CM・TC)耐性株が41株(67%)を占めている。

ところで、このような4剤又は3剤耐性赤痢菌がどのような機序によつて発生するかということが問題となる。In vitro の実験で諸種の薬剤加培地に継代培養することによつて多剤耐性株をつくることは可能ではあるが、このような機序は人体腸管内において多剤耐性赤痢菌が発現する機序としては在り得ないと考える。たとえば、入院当初には4剤に対して感性な赤痢菌を排菌していた患者に、CM又はTCの1剤のみを投与した後に突如4剤耐性赤痢菌が排菌されるにいたつた例が決してすくなくないのであるが、この場合の多剤耐性獲得の現象は薬剤の直接的な作用によるということでは説

第5表 赤痢菌と大腸菌(健康者分離株)の耐性型と伝達性耐性因子(R-因子)との関係

耐性株	赤痢菌属	大腸菌属	伝達性耐性因子
SA	卍	卍	○ vr
SM	+	+	○ m
CM			⊗
TC	+	+	○ f
SA・SM	+	+	○ m
SA・TC	±	+	
SA・CM	±*	±	○ vr
SM・CM			
SM・TC		±	○ vr
CM・TC			○ rv
SA・SM・CM	+	+	○ m
SA・SM・TC	+	+	○ r
SA・CM・TC	±**		
SM・CM・TC		±***	○ vr
SA・SM・CM・TC	卍	+	○ f

卍……>50%, 卍……30~50%, 卍……10~30%,

±……1~10%, ±……<1%~稀

\*…1株(埼玉衛研), \*\*…1株(名古屋東市民病院),

\*\*\*…1株(東大中検)

f…frequent, m…moderate, r…rare, vr…very rare

⊗……実験的につくつたもの

明できない。

つぎに、吾々の腸管内に常在している腸内菌のうち上記の薬剤に耐性である菌種にどんなものがあるかを調べてみると、*Escherichia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* などがあるが、その大多数をしめるものは大腸菌(*Escherichia*)である。つぎに、健康人から分離された大腸菌について、その上記薬剤に対する耐性パターンを調べてみたものを、赤痢菌のそれと併記して第5表に示した。

SA-1 剤耐性大腸菌株が最も多く(30~50%), ついでSM又はTC-1 剤耐性株、(SA・SM)又は(SA・TC)2 剤耐性株もかなりの率(10~40%)に分離される。ことに興味ある点は、(SA・SM・CM・TC)4 剤耐性大腸菌は健康者より2~3%に検出されるのであるが、抗生剤の経口投与を受けている患者においては20~40%ぐらまで検出率が高くなることである。このような事実は、現在健康人の間に多剤耐性大腸菌保有者がかなり高率に在ることを示している。

そこで、もしこのような多剤耐性大腸菌保有者が感性赤痢菌の感染をうけた場合には、腸管内で両者が共存することになるが、そのとき耐性大腸菌から耐性という性質が感性赤痢菌になんらかの機序によつて移行して、感性赤痢菌がいつきよに多剤耐性となることがあるかも知れない。このような仮定が、吾々の研究の出発点であつた。

まづ In vitro で、人から分離した多剤耐性大腸菌と感性赤痢菌との混合培養をおこなつてから(2~18時間)、大腸菌の発育を抑制するSS培地に薬剤を加えた平板に塗布培養すると、多剤耐性化した赤痢菌が容易に発生することを知つた。このようにして多剤耐性を獲得した赤痢菌の生物学的性状や抗原性をしらべてみると、感性原株との間に少しも差が認められなかつた。換言すると、耐性という遺伝形質が伝達される以外に、他の形質がlinkして移行することがないということになる。従つて染色体性遺伝子の組換えによるものではないと考えられた。それで、transformation 又は transduction に因るものか否かを検討したが、これを立証できなかった。

結局、上記の耐性の伝達は、接合によるものではあるが、非染色体性の遺伝因子の組換えであつて、多剤耐性を支配する遺伝因子は細胞質内に所在する Cytoplasmic genetic element であると考えられるにいたつた。そしてかような伝達性の耐性因子を設定しこれを耐性因子(resistance factor)又はR因子とよんでいる(以上は原著 8a, 8b, 8c 参照)。

このR因子にはどのような種類があるかを、人から分離された赤痢菌と大腸菌について調べているのである

第6表 マウス腸管内における耐性の伝達  
多剤耐性 *E. coli* M-1(R)→*Sh. flex.* 3a MZ(S)

日	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	耐性化	
経口投与	CM 1mg	M-1 (R) 0		M-Z (S) △									
マウス糞中の排菌	No. 1	+	↓	○	↓	○△	○△ ▲	○△ ▲	† { M-1 M-Z(S) M-Z(R)	1.5×10 <sup>7</sup> 6.6×10 <sup>3</sup> 7×10		+	
	No. 2	+	↓	○	↓	○△ ▲		† { M-1 M-Z(S) M-Z(R)	2.8×10 <sup>9</sup> 5.8×10 <sup>6</sup> 1.3×10 <sup>4</sup>			+	
	No. 3	+	↓	○	↓	○△	○△	○△	○	○	○	○	+
	No. 4	+	↓	○	↓	○△	○△ ▲	○	○	○	-	-	-
	No. 5	+	↓	○	↓	○△	○	○	○	○	○	○	-
	No. 6	+	↓	○	↓	○△ ▲		† { M-1 M-Z(S) M-Z(R)	8.7×10 <sup>8</sup> 2.5×10 <sup>7</sup> 1.8×10 <sup>2</sup>				+

数字は腸内容 1g 中の生菌数 †……マウスを殺して検査したもの

○……耐性 *E. coli* M-1, △……感性 *Sh. flex.* 3a MZ, ▲……耐性 *Sh. flex.* 3a MZ

が、自然界にあるパターンとしては第5表の右欄に示したように吾々は○印を附した 11 種を確認した。これらの耐性因子は、大腸菌、赤痢菌、サルモネラなどの菌種間で相互に容易に移行し得るものである。

それでは、耐性大腸菌と感性赤痢間の耐性の伝達が、はたして腸管内において現実におこるか否かをマウスを用いて実験した。マウスの腸管内にまづ多剤耐性大腸菌をすみつかせてから、感性赤痢菌又はサルモネラを経口的に与えて、両者を腸管内において共存させるようにするのであるが、適当な条件下に共存させることがなかなか困難なために失敗例が多かつた。しかし腸管内においても耐性大腸菌から感性赤痢菌或は腸炎菌への耐性の伝達は可能であるという知見を得た<sup>14)</sup>。なお、昭和 37 年 4 月名古屋において開かれた日本細菌学会の際名大細菌学教室の粕谷氏によつて、マウス腸管内において経口的に与えた大腸菌と赤痢間において耐性の伝達がおこることが報告された。

次に、人における臨床的並に実験的観察が、万治病院の加藤氏<sup>15)</sup>らによつておこなわれたが、その結果、人においても耐性大腸菌から伝達によつて耐性赤痢菌が発生する可能性を示す所見が報告されている。

しかしながら、腸管内においての耐性の伝達は、*in vitro* のように容易にはおこり難いものである。これにはいくつかの要因があるが、たとえば、菌株の適合性 (Competence of donor-and recipient strains), donor と recipient との菌数の比などのほか、腸内容中には耐性伝達阻止物質 (胆汁酸塩や脂肪酸などの) が含まれていることを吾々は発見したが<sup>16,17,18)</sup>、このほかにも物理的条件の関与も考えられる。

大要、上述のような実験所見から、吾々は赤痢菌の耐性獲得 (とくに多剤耐性) の機序の重要なものとして次のような説<sup>19,20)</sup>を提出した。

伝達性耐性因子 (R-因子) をもつ大腸菌を保有している人が感性赤痢の感染をうけて発病し、化学療法をうける過程において、適当な条件下に耐性大腸菌と感性赤痢菌とが共存する場合には、接分によつて耐性が赤痢菌に伝達されて耐性を獲得する。

もちろんこのほかに、腸管内に transduction をおこすに適当なファージが存在するならば、transduction によつて耐性大腸菌から感性赤痢菌へ耐性が導入されるという機序も可能であることは、*in vitro* の実験所見からも推定しうるところであるが、*in vivo* においてこれを立証した報告はまだ発表されていない。

なお、耐性伝達の機序、耐性因子の遺伝学的解析、耐性の生化学的機構などについては省略するが、これらの点については原著又は綜説を参照されたい。

### む す び

ブドウ球菌と赤痢菌において数種の薬剤に耐性であるという、いわゆる多剤耐性菌株の増加が近年注目すべき現象となつてきたが、かような多剤耐性菌の発生の機序は、薬剤の直接的な作用に因するという説では解釈しがたい。

ブドウ球菌においては、ファージに因る耐性の導入という機序が重視されねばならないことが吾々の未完成的な実験所見からも推定される。また赤痢菌においては、耐性大腸菌からの耐性の伝達 (耐性因子の接合による移入) によつて耐性化するという機序が重要な役割をはたすものであろうという吾々の見解を述べた。

附記 本学会第1回総会においておこなつた「薬剤耐性獲得の機序」について10年後再びその後の研究知見を講演する機会を与えられた市川会長に深謝するものである。

なお本講演は共同研究者 桑原, 岩原, 木村, 小山, 加藤, 横田, 吉川, 栗田口氏らの研究成果の一部を綜説したものであつて, 協力を感謝する。

#### 文 献

- 1) 秋葉: Chemotherapy 1(1), 1~11, 1953
- 2) HOTCHKISS, R. D.: Cold Spring Harbor Symposium. Quant. Biol. 16, 457, 1951
- 3) PERRY, D. & SLADE, H. D.: J. Bacteriol. 83, 443-449, 1962
- 4) ZINDER, N. D. & LEDERBERG, J.: J. Bacteriol. 64, 679, 1952
- 5) ISEKI, S. & SAKAI, J.: Proc. Japan Academy 30, 143-147, 1954
- 6) LEDERBERG, J.: J. Bacteriol. 59, 211-215, 1950
- 7) 秋葉・横田: 医学と生物学 25 (3), 123-126, 1952
- 8) a. 秋葉・木村・その他: 日本医事新報 1866, 46-50, 1960
- b. 秋葉・岩原 日本医事新報 1886, 3-5, 1960
- c. AKIBA *et al*: Jap. J. Microbiol. 4(2), 219-227, 1960
- 9) 落合・その他: 日本医事新報 1861, 34-38, 1959
- 10) RITZ, H. L. & J. N. BALDWIN: Bacteriol. Proc. 40, 1958
- 11) MORSE, M. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45, 722-727, 1959
- 12) PATTEE, P. A. & J. N. BALDWIN: J. Bacteriol. 82, 875-881, 1961
- 13) a. 桑原・小山ら: 日本医事新報 2002号, 25~28, 1962
- b. 桑原・秋葉ら 医学と生物学 64 (5), 140~143, 1962
- 14) 秋葉・小山・木村・福島: 医学と生物学 59(6), 185~188, 1961
- 15) 鍵和田・加藤・その他: 日本医事新報 1886, 5-9, 1960
- 16) 小山・秋葉: 医学と生物学 60 (6), 159-161, 1960
- 17) 秋葉・小山 医学と生物学 61(2), 35-38, 1960
- 18) 加藤・秋葉: 医学と生物学 63(1), 16-19, 1960
- 19) 秋葉 日本細菌学雑誌 16(8), 602~619, 1961
- 20) 秋葉: 日本細菌学雑誌 17(7), 497~502, 1962