

第10回東日本支部総会

シンポジウム：各種細菌の薬剤耐性パターンの比較と疫学的・遺伝学的諸問題

座長：三 橋 進（群大微生物）

1. 赤 痢 菌

阿 部 実・斎 藤 誠

六大都市立伝染病院薬剤耐性赤痢研究班
都 立 荏 原 病 院

赤痢菌の薬剤耐性の今日における1つの焦点は、サルファ剤(SA)と常用抗生剤(SM, CP, TC)に対する耐性で、今後の化学療法の在り方に重大な転機を求めている点にある。今回は治療問題を除外し、患者分離株の薬剤耐性の現況及びその疫学的問題に重点をおいて紹介してみたい。

SA剤の薬剤耐性は昭和24~5年頃までに、患者分離株の80~90%が耐性となつたが、昨年37年に六大都市立伝染病院で分離した株のうち4299株について検討したところ、その3780株(86%)が耐性(100mg/dl \leq)で顕著な地域差を認めていない。菌型別にみても *Sh. sonnei* が83.77%で、他の菌型よりいくぶん低位である以外、その差をみていない。

SM, CP, TC等の所謂常用抗生剤に対する耐性が治療上に影響を及ぼしたのは昭和32年頃で、当時の耐性率は3~5%を示し、その後逐年上昇の過程を辿り、昭和37年の六大都市平均は32.13%(6853株中2140株)であつた。都市別にみると横浜22%、東京、名古屋、京都は26~28%、大阪、神戸40~45%の耐性を現わしている。

菌型別を昭和37年について窺うと、1b(566株中190株33.57%)、3a(1119株中623株46.11%)及び *Sonnei* (1691株中631株37.32%)が他の菌型より耐性株の分布が高い。この耐性を年次別に窺うと(荏原病院)、3a *Sonnei* の耐性は昭和35('60)を、1bは昭和37年を転機とし耐性株の検出頻度が高くなり、この3菌型が今日の耐性率の上昇因子となつていることが指摘される。

耐性赤痢菌の耐性パターンを昭和37年の都市立伝染病院の調査と、昭和32~37年の荏原病院の成績で纏めてみると、SM, CP, TCの3剤耐性が77~78%を占め、ついでTC単独9~10%、SM, CP2剤及びSM単独耐性が夫々4~5%の頻度でみられるが、SM, TC(2.5%)並びにCP, TC2剤(0.8%)耐性は低頻度でみられるに過ぎなかつた。

SA剤耐性との関連を窺うと(荏原病院)、抗生剤耐性を示すものは一般にSA耐性であるが、*Sh. sonnei* の中でSM, CP, TC2株、TC7株、CP, TC1株はSA感性を現わした。このSA感性、抗生剤耐性株は一集団発生より分離されたものである。

集団発生と抗生剤耐性を都市立伝染病院の昭和37年の調査で窺つてみると、55件のうちすべてが等しく耐性(18件)、または感性(23件)が41件、残りの15件のうち感性株が主で耐性が混在していたものは11件、耐性株が主で感性の混在をみたものは3件で、集団発生における耐性株の関与が予想以上に高率であつた。特に混在率の高い菌型は2a(20件、感13、耐3、感主耐混3、耐主感混1)、*Sonnei* (19件、感6、耐6、感主耐混6、耐主感混1)であつた。

以上の成績を通覧してみると、我国の薬剤耐性赤痢菌の6大都市における分布は、地域差をみるけれども患者分離株の22~45%(平均32%)を示し、そのパターンはSA, SM, CP, TCの4剤耐性が約78%を占めている。これらの耐性株は *Sh. flex.* 1b, *Sh. flex.* 3a, *Sh. sonnei* に高率にみられる。

また集団発生において耐性株の関与が極めて高く、菌型を等しくする集団内において耐性株と感性株の混在、耐性株の耐性パターンにばらつきをみる等、その様相が多岐にわたり、遺伝学的にも今後の課題を残していると考えられる。

3. 肺 炎 球 菌

市 橋 保 雄

慶応義塾大学医学部小児科教室

抗生剤の発達により、感染症は以前に較べて小児科学で、その占める比重はへつて来たといわれ、特に小児の急性肺炎は著しく少なくなつて来て、最近ではその病原菌としての肺炎球菌の意義は減じて来ているが、肺炎球菌による髄膜炎等も尚散見されることより見て、本菌は今でも場合により十分病原性を発揮するものであることが想像される。

演者はかつて終戦直後のPcがやつと製品に出回り始めた頃、肺炎球菌を用いた実験を行なつていたが、その時代に用いた肺炎球菌を本学微生物学教室で凍結乾燥しておいた血清型を異にする20株と、その亜型3株及び

最近患者より採取された新鮮株7株、計30株についてその感受性を調べ、比較検討し、併せて耐性上昇についても実験を試みた。

実験方法：実験材料の詳細は省略するとして、培地、方法等一定のものを用いた。

I. 各種抗生剤に対する肺炎球菌の感受性についての実験

1. ペニシリン系薬剤、使用薬剤は、Pc-G, Pc-V, PE-PC, PP-PC, DMP-Pc, MCI-Pc, MPI-Pc. AB-Pc の8種で、その各濃度における感受性を表わす菌株数を示し、又、その累積曲線をひいて見た。その結果曲線の傾斜の急なもの、例えばPc-Gは感受性の幅が狭く、多くの菌株のものに対し、一定の濃度で感受性を示すこととなり、臨床に使用し易い。これを一応他の2, 3の報告と比較して見るとPc-Gの感受性の範囲はFL-IPKINの成績よりもWELCH, 上田氏らの0.016~0.42 u/cc という成績と大体一致し、我々の場合は、範囲も狭く0.015~0.03 μ gのみであった。

又PE-Pc, PP-Pc, DMP-Pcでは我々の場合もKIRBYらの成績と大体一致していた。又合成Pcと、今迄の天然ないしは生合成Pcとの間の感受性には可成りの相違があり、MPI-Pc, DMP-Pc, MCI-Pcの様なペニシラーゼ抵抗性Pcは発育阻止濃度が可成り高いので、Pc-G, Pc-V, AB-Pc等を使用するのが望ましい。

2. グンソット系薬剤、使用薬剤はストマイ、ジヒドロストレプトマイシン、カナマイシン、フラジオマイシンで、感受性の幅広くWELCH, 上田氏らの成績にくらべ、我々の場合は12.5~100 mcg/mlの様に発育阻止濃度は稍々高くなっていた。

又フラジオマイシンは毒性の為、一般には外用に用いられているが、他の本系薬剤も、発育阻止濃度が可成り高いから、肺炎球菌感染症には有用なものとは思われない。

3. クロラムフェニコール、テトラサイクリン系薬剤、クロラムフェニコールとテトラサイクリン系薬剤は本来別個の抗生剤である為か、テトラサイクリン系の3種とクロラムフェニコールは一すちがついていた。

これらは一般臨床に多く使用されているが、案外感受性の幅が広くWELCHの報告も同様で、特にCMは上田氏らの成績より稍々発育阻止濃度が高く、腎機能の悪い未熟児等に高濃を使用する時は致命的な結果を招来することもあるから、殊に量的配慮に慎重を期さなければならぬであろう。

4. マクロライド系薬剤はEM, OLM, LMについて調べて見たが、EMは曲線の傾斜も急で幅も狭く、WELCH, 上田氏等の成績とよく一致している。

5. ノボビオン、フラジオマイシン類についてはノボビオンは既存の抗生剤と交叉耐性なく耐性ブドウ球菌にも強い抗菌力を示すといわれているが、曲線の傾斜もゆるやかで、幅も広がった。

又バシトラシン類は、バシトラシンとグラミシジンJ共に幅も広くWELCHの成績とも大体同傾向で外用薬として用いられているものである。

II. 疫学的観察。前にものべた様な15年前凍結乾燥して、とつておいたもので、今回培養に成功したものと最近患者から採取したものを比較して見て、何れも殆んど同じ範囲の感受性を示したことは、現在の所、15年以上の間隔をおいた観察で、耐性菌がさうふえているとは思われない。しかし次の耐性上昇試験の結果より見て楽観は許されないと思う。

III. 耐性上昇実験では2つの型が認められ、その1つはPc, TCの様に菌が段階的に耐性を高めてゆき、ことにPcの場合は30数代観察して見た。他方ストマイは今回では2, 3代で1,000~10,000 mcg/ml耐性となり、変異的に耐性が獲得されたものと思われ、又EMは8代目から急に耐性が上昇して来た。尚SM, EM耐性のものとカナマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、Pc-G等各薬剤について交叉耐性の有無を調べているが、今の所は何れも交叉耐性は認められなかった。

以上を総合してみても、肺炎球菌約30株につき、各種抗生剤に対する感受性を調べた所、現在採取されたものと、15年以上も前のものとの間に違いは認められず、その感受性の範囲も、諸家のものと大体一致し、臨床耐性肺炎球菌は今の所、殆んど問題にならないと思われる。しかし最後の実験の様に、実験的に*in vitro*には耐性を帯びさせることはできるのであるから、今後の経過を注意深く観察する必要はあろう。

4. 緑色連鎖球菌、溶血連鎖球菌

三方一沢・富岡 一

慶大三方内科

亜急性細菌性心内膜炎の原因菌として、近年ぶどう球菌が増加の傾向にあるとはいえ、今日なお緑連菌が重要な位置をしむることは、第10回化学療法学会総会で、その詳細を報告した。したがって緑連菌の薬剤感受性は終始われわれの関心をひくところで、今回はかかる見地から亜急性細菌性心内膜炎の血中より分離した緑連菌の各種薬剤に対する感受性を、年次的に検討し、これに同じ連鎖球菌属にある溶連菌の立場から考察を加えようと試みた。

なお最小発育阻止濃度は全て馬血液添加寒天平板稀釈

法によつて行ない、以後 MIC と略記した。他方被検溶菌菌は主として咽頭よりの分離株である。

まず Pc-G から緑連菌での MIC を年次的に検討してみたところ、昭和 35 年以降の分離株 (6 株) の MIC 分布状況は 0.07~1.4 u/ml で、昭和 27 年以前の 38 株、28~34 年の 22 株の成績とほぼ一致していた。また各種 Pc について、その感受性を 21 株で比較検討した結果、Pc-G、PE-Pc、PP-Pc、AB-Pc 間には殆ど差異がなかつた。しかし MCI-Pc では 50 mcg/ml の 5 株をふくめて 13 株が 12.5 mcg/ml 以上であつた。また EM には 0.07~1.2 mcg/ml、OM には 0.1~5 mcg/ml、TC には 0.5~5 mcg/ml、CM には 2.5~10 mcg/ml の MIC を有する株がその大部分を占め、昭和 27 年以前、28~35 年分離株との間に年次的変動はみとめられなかつた。SM には昭和 27 年以前から 10~ \geq 100 mcg/ml の株が存在しているが、かかる菌株が近年増加した印象はうけなかつた。

溶連菌については昭和 32 年以降検討をすすめてきているが、Pc-G には例年 0.01~0.02 u/ml の株が大部分をしめ、年次的変動はみられなかつた。なお PE-Pc、PP-Pc、AB-Pc での MIC は Pc-G の 1~2 倍で、ほぼ一致する値を示した。しかし MCI-Pc ではこれらの 2~4 倍高く、緑連菌での傾向とその軌を一にする成績をえた。

CM には昭和 36 年以降 6.25 mcg/ml の株がみとめられてきているが、大勢はなお 1.56~3.12 mcg/ml であり、EM には 0.02~0.1 mcg/ml、OM には 0.2~1.56 mcg/ml で、これらの薬剤にあつては年次的変動はみられなかつた。

しかし TC にあつては昭和 32~34 年当時の 0.2~0.78 mcg/ml の感受性分布状況に比し、ここ数年来 0.39~3.12 mcg/ml で、やや MIC 上昇の印象をうけていたところ、本年度分離の A 群溶連菌 32 株中 9 株、2 組の同一患者からの再分離株 2 株をのぞけば 7 株 (23%) が 50 mcg/ml 以上の耐性株であつた。なおこれら 9 株はいづれも他剤との間に交叉耐性を有してはなかつた。

そこでかかる耐性株の出現が、局部的現象に起因するか否かを、患者居住地、分離時期の 2 面から検討してみたところ、7 例中 3 例の居住地は比較的接近していたがその他では散在性であつた。一方、分離時期をみると、4、5、8 月の各被検月毎に分布していた。従つてかかる菌株が必ずしも局部的なものではなく、最近急激に出現、増加してきたことを示唆するよう思われた。

最後に TC 耐性株の出現、増加により、その価値を深めたといえる第一線の感受性試験法ディスク法について若干の検討を加えてみた。その結果、接種菌液が希釈

されるにつれディスク阻止円が著しく増大した。特にこの傾向は、高濃度菌液接種のさいその出現が著しく阻害される溶血阻止円で顕著であつた。このことは菌発育、溶血両阻止円が平行関係にないことを示す一面、本法の判定上の指標が菌発育阻止円にあるとはいへ、一見その成績を見誤ることをなしとしない場合のあることを知つた。これに加えて溶連菌の感受性問題でもつとも重要な TC ディスク阻止円は、基礎培地により著しい影響をうけ、普通寒天を基礎培地とした血液添加培地でも、その阻止円は Heart infusion 寒天を用いた場合にくらべて増大した。

以上要するに、緑、溶連菌とも Pc、EM、OM、CM、SM には今日までのところ感受性低下はみられていない。しかし TC には本年度分離の溶連菌の 23% が 50 mcg/ml 以上の MIC を示す耐性株であつた。従つて溶連菌はもとより、いままでのところ耐性株が出現していない緑連菌にあつても、TC をはじめとする各種薬剤に対する感受性の把握には、いま一層の努力をおしむべきでない時期が到来したと考えられた。

これに併せて、感性ディスク法の成績に多くの因子が影響を及ぼすことから、その実施に際しては、慎重な配慮がつよくのぞまれることを知つた。

5. 溶血連鎖球菌

吉岡 守正

北里研究所

若干の A 群以外の株も含む 200 株の溶レン菌の Mitomycin C、Actinomycin C、Penicillin G に対する感受性は比較的一定して夫々 0.01 μ gm/ml、0.05 μ gm/ml、0.01 ml の濃度まで発育しうるものが大多数であつた。Streptomycin では 88% が 5 μ gr/ml 又はそれ以下の感受性を示すが、25 μ gm/ml でも発育しうるものが数株見出された。

A 群溶レン菌 3 株を上記 4 剤に対して耐性を上昇せしめようとしたが、Actinomycin では上らなかつた。Penicillin と Mitomycin C では 500 倍に増大したものがあり、耐性株では α 溶血に変化したものがある。これら抗生剤処理菌は何れもマウス菌力を著しく減弱し、群特異抗原を欠くものがみられた。

Actinomycin C 0.5 μ gm/ml 含有液体培地で発育した菌は DNA 及び RNA 合成には大きな影響を受けないが、蛋白合成が或程度阻害されるのがみられた。

以上の諸点より、溶レン菌のこれら 4 剤に対する感受性は他の細菌類と大差のないこと、人為的には耐性菌が比較的容易に出現すること、又特に臨床的には、 β 溶血を示さないため耐性溶レン菌を確認し難い可能性が示さ

れた。

6. ブドー球菌

三橋 進・橋本 一

群大医学部微生物学教室

ブドー球菌の薬剤耐性と遺伝学的諸問題について報告する。使用した薬剤は Tetracycline (TC), Streptomycin (SM), Sulfonamide (SA), Penicillin (PC), Chloramphenicol (CM), Kanamycin (KM), Erythromycin (EM), Leucomycin (LM), Oleandomycin (OM), Novobiocin (NB), Staphicillin (DMP) の 11 種であり、実験に用いた菌株は、群大石原外科及び耐性ブドー球菌研究班(市川篤二教授班長)の班員より送付を受けた約 1,000 株の病巣菌である。

まず分離株 800 株に対する各種薬剤の最大発育許容濃度をみると、SA では殆んどが耐性株であるが、中等度耐性と高度耐性との明らかな 2 つの山を示し、PC は階段的に耐性菌が現れ、SM も中等度耐性菌と高度耐性菌にわかれ、TC は感受性群と耐性群とが明らかな 2 峰性の分布を示し、EM, LM, OM の Macrolide 耐性は、殆どが感受性株であるが、耐性株は 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示し、CM, KM, PMP では耐性株の出現はそれほど高度耐性としては現われない。

耐性ブドー球菌研究班で定められた耐性株の限界値は最大発育許容濃度で SA : 12.5 $\mu\text{g/ml}$, Pc : 1.6 $\mu\text{g/ml}$, SM : 12.5 $\gamma\text{g/ml}$, TC : 12.5 $\mu\text{g/ml}$, EM, LM 1.6 $\mu\text{g/ml}$, OM : 3.1 $\mu\text{g/ml}$, CM, KM, DMP : 12.5 $\mu\text{g/ml}$, NB : 1.56 $\mu\text{g/ml}$ である。耐性株の分離頻度は、SA : 95 % で 800 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株は 42 %, Pc : 47 %, SM : 34 %, TC : 36 % で、この 4 剤に対する耐性株が最も多く、CM の 7 % がこれにつき、その他の薬剤に耐性株は少ない。即ち臨床的には効力が多い。

薬剤への耐性型をみると SA 1 剤耐性が 33 %, PC, SA が 14 % で TC, SM, SA, PC 13 % がこれに次ぎ多い。他の 2 剤, 3 剤性よりも TC, SM, SA, PC 4 剤耐性菌が多いのは、各薬剤に対する耐性が各々独立的に現われるのではなく、遺伝学的に何らかの連関があることを推察させる。

耐性形質間の関連性を最もよく示すのは、SA 高度耐性株である。分離頻度の高い 7 種の耐性型について、その SA 高度耐性株分離頻度を調べると 90 % 以上にも及ぶのはすべて TC 耐性を含む耐性型であり、TC 感受性株の SA 高度耐性株は 40 % 以下の分離頻度である。即ち TC 耐性と SA 高度耐性の間には何らかの連関が想像される。かかる関連性は CM 耐性と Macrolide 耐性の

間でも見られた。即ち CM, Macrolide 耐性は、夫々 7 %, 4 % の分離頻度であるが、Macrolide 耐性株中の CM 耐性株、又その逆の場合は、夫々 20 % 及び 41 % と分離頻度が増加する。

次に諸種耐性株よりの耐性の人工的除去について述べる。紫外線照射によつて変異を誘発させると、TC, SM, SA, PC 耐性 26 株より TC 耐性の脱落したもの 1 株、CM 耐性株より CM 耐性の脱落したもの、9 株中 3 株、Macrolide 耐性菌より EM 耐性の脱落したもの 5 株中に 3 株あった。Macrolide 耐性菌では、EM, LM, OM 耐性が一挙に脱落した。このような耐性の人工的除去は更に acridine 系色素を用いても効果的で、数 % の頻度で耐性が脱落した。Macrolide 耐性の 1 株、MS 520 を用いて耐性形質の joint elimination をみると、紫外線を用いた除去でも、Acriflavine を用いた耐性除去でもいずれの場合でも EM, LM, OM は共に感感化し、更に Pc 耐性も 25 u/ml 耐性から 0.2 u/ml 以下の耐性値に脱落した。この現象については再検中である。

次に耐性型とファージタイプによる型との関係を述べる。分離頻度の高い耐性型では TC 耐性を含むものでは 80/81 を含む型又は 1 群菌が多く、他の耐性型ではその差が大きい。又未だ耐性菌の分離頻度の高くない薬剤、即ち Macrolide 系薬剤、CM, NB, DMP, KM 等に耐性の分離株は、殆んどが型別不能か 80/81 又は 1 群菌であり、II, III 群又は混合型は 5 % 以下であった。

最後に溶原ファージによる Transduction について述べる。自然界より TC, SM, SA, Pc 4 剤耐性菌の分離頻度の多い理由の 1 つとしてそれらの株の本来有している溶原ファージによる Transduction の可能性を検討した。

TC, SM, SA, Pc 耐性菌 16 株を donor とし紫外線照射により溶原ファージを誘発し、19 株の SM, SA, Pc 耐性株を recipient として TC 耐性の導入を検すると、4 株が donor となり、夫々の donor より数株が recipient として有効であった。Donor として MS 27 を選び、recipient に更に Pc, SA 2 剤耐性菌 46 株、SA 単剤耐性菌 28 株を用いて検すると、夫々 52 %, 46 % が TC 耐性を受け入れ得た。Recipient として MS 42, SM, SA, Pc (52/52A), MS 48, SA, Pc (29/52/52A/79), MS 353 SA (80/81/52/52A) の 3 株を選び更に詳しく調べると、MS 27 の donor より UV 照射 15" ~ 45" で 10⁸/ml のファージ Titer が得られ、3 株の recipient にいずれも 3 \times 10⁻⁶ の頻度で導入が行なわれた。これらの recipient はいずれも MS 27 よりのファージを吸着するが、溶菌をおこすのは MS 353 のみである。

Transduction の中には MS 27 のファージにより溶原化したものもあるし、ないものもみられ、前者からは再び UV 照射でファージを誘発、それにより導入を行なうことが出来る。MS 27 よりのファージに溶原化した菌は、ファージ型が変わり、52/52A には溶菌しなくなる。即ち immunity がある。併しファージ MS 27 の宿主域はむしろ 80 又は 81 に近い。以上の如く、耐性形質は、その菌のもつ溶原ファージと密接な関係があること

が考えられる。

以上要約すると、ブドー球菌における薬剤耐性は、耐性形質相互間に連関性があり、又人工的に除去する際にも連関して除去される場合がみられ、ファージ型と密接な関係があり、又 Typing ファージのみならず分離したままの溶原化ファージによつても形質導入されることがわかつた。ブドー球菌の薬剤耐性は疫学的のみならず遺伝学的にも興味ある多くの問題を提供している。