

赤痢菌の耐性値測定法について

三橋 進・永井 裕・田中徳満・橋本 一
群大医学部微生物学教室

(昭和 43 年 12 月 27 日受付)

化学療法の普及に伴つて我国における赤痢の致命率は著しく減じたが、いつぼう薬剤耐性赤痢菌の増加もこれに伴っている¹⁾。1966 年の調査では下記 4 剤 TC, CP, SM, SA の中、4 剤に対する耐性菌が全分離株の 71% を占めるに至つている²⁾。これらの多剤耐性赤痢菌に対してはなお奏効する種々の新薬が使用されているが、これらの薬剤に対する耐性菌も最近出現しはじめている³⁾。従来、耐性菌、感受性菌の区別は臨床的立場より考えられ 100 mcg/ml 感受性、または 50 mcg/ml 耐性が耐性菌の限界値であつた³⁾。しかし治療中に耐性菌が排出する例が、従来の耐性菌の範囲に入らぬ中等度耐性菌のためであつたり、耐性度が感受性菌より僅かに上昇しているにすぎない菌より、R 因子が他の菌に伝達すると、耐性度がさらに上昇して発現したり⁴⁾、従来の耐性菌の解釈では不都合な種々の例が次第に明らかになつて来た。従つて赤痢菌の薬剤耐性に関してはかかる中等度耐性も含めて論ずることが必要である。

本報において赤痢菌の薬剤耐性値測定法を実用に即しながらも遺伝学的立場より考察し、耐性、感受性の限界を定めたので報告する。

実験材料並びに方法

使用菌株

使用した赤痢菌は耐性赤痢研究会(会長:江崎唯人)により分離されたものである。接種菌量の差、および各薬剤への耐性化をみる場合、代表株として 3 種の感受性赤痢菌、すなわち *Sh. flex. 3 a*(JS 833), *Sh. flex. 2 a*(JS 700), *Sh. sonnei* (JS 1337), 及び 3 種の TC, CP, SM, SA 耐性株, *Sh. flex. 3 a*(JS 2529), *Sh. flex. 2 a*(JS 2997), *Sh. sonnei*(JS 949), 計 6 株を用いた。耐性分布の測定には種々の耐性型を含む 100 株を任意に選んだ。

使用薬剤及びその略号

Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CP), Streptomycin(SM), Sulfonamide(SA), Kanamycin(KM), Paromomycin(PRM), Fradiomycin(FRM), Gentamicin (GNT), Aminobenzyl-penicillin(AB-PC), Nalidixic acid (NA), Colistin methansulfonate (CL-M), Furaztrazine(FT), Furazolidon(FZ)。

平板作製用の薬剤原液は各薬剤とも 5 mg/ml になるよう秤量し蒸留水にて溶解して原液を作つた。とくに CP は 100 mg を秤量し 1 ml のプロピレングリコー

第 1 表 接種菌量の差による薬剤耐性度の変化 (1)

菌株 接種菌量の 稀釈	<i>Sh. flexneri 3 a</i>								<i>Sh. flexneri 2 a</i>								<i>Sh. sonnei</i>							
	1				2				1				2				1				2			
	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
CP	11	10	10	10	3	3	2	2	12	11	10	10	3	2	2	2	12	11	10	10	4	4	4	4
TC	7	6	6	6	3	2	2	2	11	10	9	8	2	1	1	1	11	10	9	9	3	3	3	3
SM	13	11	11	11	4	4	4	4	13	10	10	10	5	5	5	5	12	10	10	10	5	5	5	5
PRM	5	4	4	4	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
DM	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CL	2	0	0	0	2	1	1	1	3	1	1	1	2	0	0	0	3	0	0	0	2	1	1	1
PC	-1	2	2	2	3	2	2	2	4	4	4	4	3	3	3	3	4	3	3	3	4	4	4	4
FT	2	-2	-2	-2	-3	-3	-3	-3	1	-2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	1	-2	-2	-2	-1	-1	-1	-1
FZ	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	2	2	2	3	0	0	0	3	1	1	1
NA	4	3	3	3	4	3	3	3	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
GNT	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2
KM	4	3	3	3	5	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

菌 株: 1. CP, TC, SM, SA 耐性菌 2. 感受性菌

薬剤濃度は 0.1 × 2ⁿ をもつて現した。表には n を表記した。例えば n=0 のときは 0.1 mcg/ml

第2表 接種菌量の差による薬剤耐性度の変化 (2)

菌株 接種 菌量	Sh. flex 3 a						Sh. flex 2 a						Sonnei					
	1			2			1			2			1			2		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
CM	11	11	3	12	12	3	3	3	12	12	12	12	12	12	4	4	4	7(3.0×10 ⁻⁸)
TC	7	8	3	11	11	2	2	2	11	11	11	11	11	11	3	3	3	7(1.0×10 ⁻⁸)
SM	13	13	4	13	14	4	4	4	15(1.0×10 ⁻⁷)	15(1.0×10 ⁻⁷)	7(2.5×10 ⁻⁷)	7(2.5×10 ⁻⁷)	14(1.5×10 ⁻⁸)	14(1.5×10 ⁻⁸)	5	6	6	7(3.0×10 ⁻⁸)
PRM	5	5	3	6	6	3	3	3	7(8.0×10 ⁻⁸)	7(1.8×10 ⁻⁸)	5	5	5	5	5	5	5	7(1.0×10 ⁻⁸)
FRM	4	4	3	3	3	4	4	4	6(2.5×10 ⁻⁸)	6(2.5×10 ⁻⁸)	4	4	4	4	4	4	4	6(1.0×10 ⁻⁸)
KM	4	6	5	7	3	5	7	7	7(2.6×10 ⁻⁸)	7(1.0×10 ⁻⁶)	3	6	3	5	3	6	7	7(2.0×10 ⁻⁶)
GM	2	3	2	2	2	3	5	5	5(2.2×10 ⁻⁷)	5(1.0×10 ⁻⁷)	1	3	2	4	2	3	3	7(2.0×10 ⁻⁶)
CL	2	4	2	5	3	4	2	4	3	4	2	4	3	4	2	5	5	7(2.0×10 ⁻⁶)
PC	2	3	3	3	3	5	3	4	3	4	3	4	4	5	4	4	4	7(2.0×10 ⁻⁶)
FT	-1	0	-3	1	2	2	1	2	1	2	-1	0	1	2	-1	0	0	7(2.0×10 ⁻⁶)
FZ	2	3	0	1	4	5	4	5	3	4	3	4	3	4	3	4	4	7(2.0×10 ⁻⁶)
NA	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	7(2.0×10 ⁻⁶)

接種菌量 A...10⁶個の菌接種 (通常接種量) B...10⁸個の菌接種 (大量菌接種) C...10⁹の接種の場合に出現する突然変異株の耐性度
 () 内は突然変異株の発現頻度を現わす
 菌株及び耐性度は第1表と同じ

ルを加えて加温溶解した後、蒸留水を加えて全量 20 ml にし 5 mg/ml の原液を作った。NA は 50 mg を秤量して、0.1 N の NaOH を 1 ml 加えて溶解した後、蒸留水を加えて全量 10 ml とし、5 mg/ml の原液を作った。FT, FZ はそれぞれ 50 mg を秤量し 1 ml のジエチルホルムアミドを加えて加温溶解した後、加温蒸留水を加えて全量 10 ml にし 5 mg/ml の原液を作った。平板作製には上記の原液を 8 倍づつ希釈し、その 0.2, 0.4, 0.8 ml を 20 ml の寒天中に混釈することにより 2 段階希釈の薬剤平板を作った。

使用培地

薬剤平板用培地としてハート・インフュージョン・カンテン (HIA 栄研)、菌接種用前培養培地はペプトン水を、また 10⁸ 個以上の菌を得るための培地はブレイン・ハート・インフュージョン・ブイヨン (BHI, Difco) を用いた。SA だけは合成培地を用いた (Medium A 1 L + casamino-acid 2 g, tryptophan 10 mg, nicotinic acid 2 mg, glucose 2 g, agar 12 g)。

耐性測定及び判定

耐性度測定は 2 段階ずつの薬剤平板希釈法により行なつた。前培養にはペプトン水を用い、18~20 時間培養した (菌数 5×10⁸/ml)。接種菌量をかえる場合は培養液を無菌ペプトン水にて 100 倍 (菌数 5×10⁶/ml), 10⁴ 倍 (菌数 5×10⁴/ml), 10⁶ 倍 (菌数 5×10²/ml) して各段階の菌数液を作り 1 白金耳ずつ接種した。1 白金耳は約 0.003 ml のものを使用したので接種菌数はそれぞれ約 10⁶, 10⁴, 10², 10⁰ になる。10⁶ が通常の接種菌量である。10⁶ 以上の接種菌量の場合を考察するために、被検菌を BHI 中で 1 夜培養し、その 10 ml を遠心沈澱して 1 枚の薬剤平板上に 10⁹ 個づつ接種し、これを大量菌接種とした。判定は 18~20 時間培養後、薬剤を加えない平板と同様の発育が見られる平板の中、最も高い薬剤濃度をその菌の最大発育許容濃度とし、それを以つて耐性度とした。

実験成績

接種菌量による耐性度の変動

Sh. flex. 3 a, Sh. flex. 2 a, Sh. sonnei の代表株 6 株を用い、接種菌量を 100 倍づつ加えて耐性値の変動をみた。その結果を第 1 表、

第2表に示した。

第1表： 10^4 から 10^6 までの接種菌量ではいずれの菌種、いずれの薬剤でも耐性度に変化はほとんど認められない。わずかに CP, TC で、ことにその耐性菌において耐性度が1段階の差がみられたのみである。しかし、ペプトン水中1夜培養原液とその100倍稀釈液からの接種、すなわち 10^6 と 10^4 との接種菌量間では耐性度に4倍以上の開きが生じたのがみられ、中でも著明なのは FT, FZ で16倍の差がみられる。その他 SM では感受性菌では接種菌量の影響をうけないが耐性菌では原液からと100倍稀釈液からとでは4~8倍の開きが見られた。

以上のことより耐性検査に当つてはペプトン水中1夜培養液を100倍以上に稀釈し用いることは耐性値のばらつきが原液を用いた時よりも少ないと考えられる。

10^6 以上の接種菌量での耐性値の変動を第2表に示す。CLM, KM では 10^6 接種との間に8倍の差が、CP, TC 以外の全薬剤に2~4倍の差が見られた。また、SM, PRM, FRM, GNT, KM では少数菌の発育がより高い濃度の薬剤平板上にみられた。これは菌のその薬剤に対する突然変異株であると考えられ、ストレプトマイシン系の薬剤にのみこのような現象が顕著であつた。

各薬剤に対する耐性菌の耐性限界

ある薬剤濃度以上に生育したものを耐性菌とするとき、その限界値は、たとえ感受性菌を混入せしめることはあつても、耐性菌を見逃すものであつてはならない。何故ならば、ある菌が、ある薬剤に感受性であるという

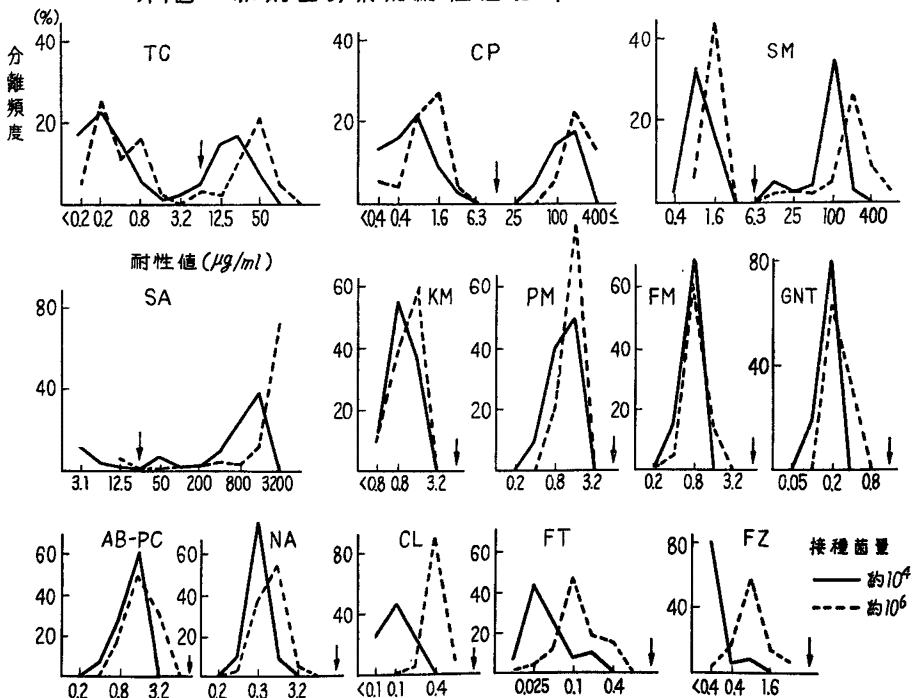
ことは、そのまま治療に使用することへの是非につながるもので、無効な投薬を行なう危険をさけるためである。従つて我々は、従来一律に100 mcg/ml または50 mcg/ml 以上を耐性菌としていたのを排し、先ず与えられた薬剤に対する耐性値分布曲線を100株の菌株を用いて書き、接種菌量が多い場合の耐性値の動きを参照して、感受性菌の耐性値が如何に動いてもある濃度段階には到達しがたい点、すなわち感受性菌の感受性値の上限を求め、そのひとつ上の濃度を耐性菌の下限値とした。多くの場合、通常の接種菌量による感受性菌の分布が零を示した耐性値の1つ上の段階の耐性度をとることになつたが、以下、各々の薬剤について詳述する(第1図)。

CP, TC 耐性

CP では接種菌量の多少に拘らず感受性菌の上限は3.1 mcg/ml で6.2 mcg/ml では0となる。また第2表にみるとおり、大量菌接種でも耐性値の上昇はない。従つて21.5 mcg/ml 以上を耐性菌と定めた。耐性菌の分布曲線は接種菌量が1/100の場合には低い耐性値のほうに僅かにずれるが25 mcg/ml 以下に下ることはないので12.5 mcg/ml の限界値は充分に安全である。

TC では耐性値が他の常用抗生剤にくらべ、はるかに低いので他薬剤と同列に論ずるわけにはいかない。耐性値分布曲線では耐性菌と感受性菌との山が辛うじて2つに分かれているのがみられる。またTCでは大量菌接種でも耐性値の上昇が明らかでない。TCの1.6 mcg/ml とCP 3.2 mcg/ml と対比し考察すると、その1段上の耐性値をとる感受性菌は現われないと考えられるので、

1) 図 赤痢菌の薬剤耐性値分布



さらにその1段上の6.2 mcg/mlを耐性菌の下限と定めることが出来る。TCには6.2 mcg/mlの耐性度でありながらR因子として伝達し、また、より高い耐性に変異する株が知られているから⁴⁾、耐性菌の下限をこれより高く定めることは出来ない。

SM, SA 耐性

SMについては大量菌接種で耐性突然変異株がえられることは古くより知られており、その変異株にも高度耐性株と中等度耐性株が報告されている。我々の実験でも、第2表にみられるとおり、 10^{-8} ~ 10^{-7} の頻度で感受性菌より、12.5 μ g/ml耐性の中等度耐性菌がえられている。変異株の出現を除外すると接種菌量が大きい場合、耐性値の上昇は6 μ g/mlにおよぶものが*Sh. sonnei*にみられているので、6 μ g/mlの限界値は、あるいは時に感受性菌を含む可能性は否定できないが、12.5 μ g/mlにすると上述したとおり、時に耐性菌を除外する危険性があるので、6 μ g/mlを選ぶことにした。

SA 耐性

SAは接種菌量の影響を最もよく受ける薬剤である。ペプトン水中1夜培養液から稀釈せずに接種すると、ほとんどが3,200 mcg/ml以上の耐性度を示すが 10^4 の接種菌量では1,600 mcg/mlの所に耐性菌分布の山があり、また50 mcg/mlの所にも中等度の山がある。3.2 mcg/mlの所に感受性菌の山があると思われる。6.25 mcg/mlの耐性菌はほとんどないので12.5 mcg/mlを感受性菌の上限と考え、25 mcg/ml以上を耐性菌と定めた。

KM, PRM, FRM 耐性

KM, PRM, FRM 3薬剤はaminocyclitol系薬剤で、交叉耐性を示す例が報告されている⁶⁾。しかし、赤痢菌のこれら薬剤への耐性菌はほとんどない。従つて100株の耐性値分布は感受性菌だけの単一峯を画く。いづれも通常接種量以下では3.1 mcg/ml以上を示すものはない。しかし、接種量をかえた場合、3薬剤は僅かに異なつた耐性値の変化を示し、最も安定なものはFRM耐性値であつた。すなわちFRM耐性値は接種菌量の変化によつてほとんど影響をうけず、3.1 mcg/ml以上の耐性値をとることはない。ただ時に 10^{-8} の低頻度で6.25 mcg/mlの中等度耐性菌を生ずる。従つてFRMの場合には6.25 mcg/ml以上を耐性菌として誤りはないであろう。

KM, PRMはこれと異なり、感受性菌の耐性値は通常接種量では3.1 mcg/mlをこえることはないが、100倍稀釈液よりの接種とくらべてやや耐性値が上昇し、さらに大量菌を接種すると、KMでは3.1~12.5 mcg/ml、PRMでは3.1~6.25 mcg/mlというように、4~8倍も高濃度の薬剤平板に容易に生育し、さらに耐性変異株と

してPRM, KM両者とも12.5 mcg/mlの耐性値のものがKMでは 10^{-6} ~ 10^{-8} 、PRMでは 10^{-9} ~ 10^{-8} の頻度で得られている。接種菌量が多くなればなるほど、耐性値が上昇するということは、耐性値の階段の上昇が極めて高い頻度でおこりうることを示している。通常接種量は約 10^6 であるが、このうち 10^2 ほどは2~3段階上の濃度まで生育するのがみられている。この場合、対照平板との差は明らかであるが、さらに接種菌量が増加した場合は、対照との区別がつけにくい。すなわち、KMやPRMでは 10^{-4} ほどの高頻度で耐性菌が生じており、大量菌接種は正確な耐性値を示すとは言い難く、従つて通常接種量以下の場合、6.25 mcg/ml以上の平板に対照と同じく発育した場合を耐性菌とするのが妥当と考えた。

AB-PC, GNT, NA 耐性

AB-PC耐性菌は我が国に於いて1966年分離報告されたが⁶⁾、未だ全分離株の2%に満たない。これらの耐性菌の耐性度は中等度と高度耐性の別があるが、前者でも25 mcg/ml耐性以上である。いつばう感受性菌の耐性度分布は接種菌量の如何にかかわらず1.6 mcg/mlのところを頂をもつ分布の山を画くが、その上限は接種菌量により異なり、 10^6 の菌量で6.25 mcg/ml、 10^4 で3.2 mcg/mlの点が、分布が0となる点であり、大量菌接種によつても6.25 mcg/mlに菌が生育することがない。従つて12.5 mcg/mlを耐性菌の耐性度の下限と定めた。

NA耐性もまた我が国に於いては1966年度より分離の報告があるが、これも2%に満たない。この耐性菌の耐性度は25 mcg/ml以上である。感受性菌の耐性度分布は鋭い頂をもつ分布曲線を画き6.25 mcg/mlがその上限である。大量菌接種でも6.25 mcg/ml以上の濃度平板に菌生育はみられなかつた。従つて12.5 mcg/mlを耐性菌の耐性度の下限と定めた。

GNTに対しては未だ耐性菌の報告はない。感受性菌の分布は単一の鋭い山を画き、0.8 mcg/mlに及ぶものはなかつた。従つて1.6 mcg/mlを耐性菌の耐性度の下限と定めた。しかし接種菌量の増加につれ耐性値上昇の傾向はみられた。

CLM, FT, FZ 耐性

CLMに対しても未だ耐性菌の報告はない。感受性菌の耐性度分布は単一の山を画くが、接種菌量が 10^6 と 10^4 とでその頂も耐性度上限も4倍差がある。しかし 10^4 以下の接種菌量で耐性値の変動はみられない。従つてCLMは常に 10^4 以下の接種菌量で測定すべきであり、そのほうが発育終末点も明瞭である。 10^4 での接種菌量の感受性菌耐性度の上限は0.4 mcg/mlであるが稀釈しない場合の 10^6 の接種菌量の時との差が大きく、またさ

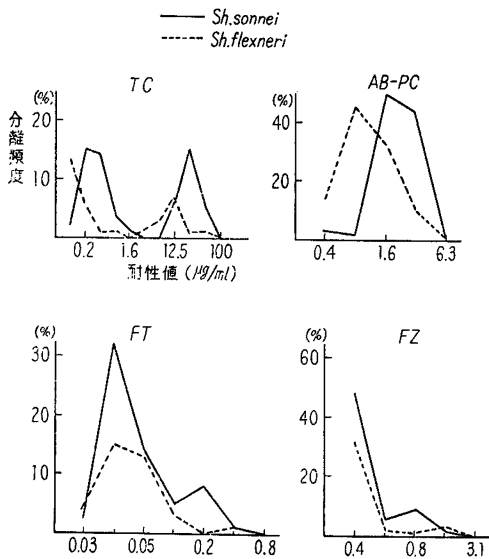
らに大量菌接種の場合 0.8 mcg/ml まで生育するので安全のため 2段階上の 1.6 mcg/ml を耐性菌の下限と定めた。

FT, FZ もまた接種菌量により耐性度に影響を受ける。10⁶ 接種の場合、感受性菌はほとんど1つの山をもつ耐性度分布曲線を描き、10⁴ の接種ではその頂は10⁶ の場合の 1/4 以下の耐性度のところにある。CLM と同じく 10⁴ 以下の接種菌量で耐性値の変化はない。従つてこの場合も 10⁴ の接種菌量で耐性検査を行なうべきである。感受性菌分布の山の右端、すなわち耐性度の高い部分に FT, FZ とともに小さな肩が認められ、これは明らかに感受性群と区別されうる。これらは耐性度の僅かに高い菌群と考えられるが、他の感受性群との限界が明瞭でないのと、これらの菌の耐性度の上限もそれほど高方に及ばず、FT, FZ とともにそれぞれ 0.4 mcg/ml, 1.6 mcg/ml が限界であることから、これらの菌群も含め感受性菌群とした。10⁶ の接種菌量では 10⁴ より 2~4 倍高い耐性値が現われることから CLM の場合と同じく安全を見越して 2段階上の 1.6 mcg/ml, 6.25 mcg/ml をもつて、それぞれ FT, FZ の耐性菌の耐性値の下限と定めた。

血清型との連関

赤痢菌の場合、*Sh. sonnei* と *Sh. flexneri* とでは同じ感受性菌群でも耐性値分布曲線が、ある薬剤に対しては僅かに異なる。TC, AB-PC, FT, FZ がその主なもので、第2図に示す。これらの場合、赤痢菌全体としての分布曲線では広い分布がみられても、各血清型にわけると、より鋭い分布がみられ、従つて耐性菌の耐性限界も僅かに異なつてよいが、煩雑になることをさけるために、同

カ2図 血清型別にみた耐性値の分布



第3表 耐性度への培地の影響

薬剤	菌株	阻止径 (mm)		
		A	B	C
TC	1	20	12	16
	2	18	14	18
CP	1	21	22	20
	2	16	18	18
SM	1	16	16	16
	2	16	18	16
AB-PC	1	16	15	14
	2	10	10	13
FT	1	26	25	26
	2	21	24	20
KM	1	16	16	16
	2	17	17	17
NA	1	12	15	14
	2	16	15	17
CL	1	16	13	15
	2	14	13	14

菌株 1. JS 833 *Sh. flex* 3 a.
2. JS 1337 *Sh. sonnei*.

A, B, C; 我が国で市販されている3種の Heart Infusion Agar.

第4表 培地による TC 耐性度の差

菌株	耐性度					
	10 ⁶ 個接種			10 ⁴ 個接種		
	A	B	C	A	B	C
1	9	10	10	9	10	10
2	9	10	10	9	10	9
3	10	10	10	10	10	9
4	3	6	4	2	6	3
5	2	6	3	1	4	2
6	2	6	3	1	4	2
7	3	7	4	2	5	3
8	2	5	2	1	5	2
9	1	4	2	1>	4	1

培地 A, B, C 前表に同じ
耐性度 10 : 100 µg/ml
1 : 0.2 µg/ml
その他は第1表に同じ

一規準で判定することにした。

培地の差

現在薬剤耐性検査に用いるハート インフュージョン培地には市販の乾燥培地が汎用されているが、薬剤によっては、会社、あるいは同一会社でも製造ロットが異なると耐性度に差がでてくるのがみられている。第3表に昭和ディスクを用いて、2種の菌で培地の影響を阻止円

第5表 薬剤耐性株分離頻度

薬 剤	選択濃度 (μg/ml)	耐性株数 (%)
CP	12.5	1134(71.6)
TC	6.25	1161(73.3)
SM	6.25	1196(75.6)
SA	25	1450(91.6)
PRM	6.25	1(0.06)
FRM	6.25	1(0.06)
KM	6.25	1(0.06)
GNT	1.6	0
AB-PC	12.5	14(0.9)
NA	12.5	22(1.4)
CLM	1.6	0
FT	1.6	0
FZ	6.25	0

計 1583

でみたところ、TCのみがA, B 2社の間で著明な差を示し、さらに第4表のように、定量的な測定を行なうと、感受性菌の耐性値が、時に16倍も開くことがあることがわかった。とすると接種菌量を1/100にしても時に6.25 μg/mlの耐性値がえられるので、こういう培地を用いるときは、耐性限界は12.5 μg/mlを用いることにしなければならない。

耐性菌分離頻度

以上の結果を総合して、我々の定めた耐性限界を用い、1967年度分離の赤痢菌1,583株についての薬剤耐性赤痢菌の分離頻度を第5表に示した。接種菌量はすべて、ペプトン水中1夜培養液を100倍に希釈したものを1白金耳用いた。

考 察

腸内細菌における定量的な耐性度測定法は、昭和27年福見博士を中心としてつくられた文部省腸内細菌研究班法⁷⁾が始めてで、その方法は以来15年以上もの長きにわたって臨床家によつて踏襲されている。これは赤痢菌がサルファ剤にほとんど耐性化した事実を鑑み、来るべき抗生剤耐性菌の出現を正確に捕捉するのが目的であった。当時としては未だ耐性菌の出現がなかつたために、試験管内で耐性菌を感受性菌より人工的につくるより方法がなく、その場合、SM耐性は1段階で高度耐性が得られたが、CP, TC耐性はいわゆるPC式で徐々にしか耐性上昇がみられなかつたので、耐性菌の出現もこういう姿でくると予想された。

しかし、その後自然界より分離された耐性剤は、予期に反して高度耐性として現われ、必ずしも2倍づつの段階希釈を必要としないことがわかつて来たので、間隔を飛ばして薬剤平板をつくる方法も呈案された⁸⁾。さらに

薬剤耐性機構のわかつて来た自然界よりのCP, SM, KM, AB-PC耐性は、いずれも不活化酵素のためであり、試験管内で耐性上昇して得たCP, SM, AB-PC耐性とは耐性機構が異なることもわかつて来た⁹⁾。しかもこういう不活化酵素を低活性ながらもつ菌は、容易に耐性化して酵素活性がますことも知られている⁹⁾。

このように薬剤耐性の形質発現は、それに関係する遺伝子の種類により決定され、耐性機構が単一の場合是一定の耐性度をとる傾向がある。その場合、菌種が同一ならば耐性値分布曲線はほとんど常に鋭い分布曲線を描く。SM, SA耐性のように中等度耐性が高度耐性と区別されるものは容易に高度耐性に変異し易いことも知られている。しかし、この場合、その変異は漸移的でない。

耐性度の変異頻度が 10^{-6} 以下の場合、通常の耐性検査では菌接種量がほぼ 10^6 であるから、限界点を不明瞭にすることはない。しかしaminocyclitol系薬剤のKM, PRM, FRM, GNT等では、2~4倍高い耐性値への変異の頻度がそれより高く、 10^{-4} ほどなので、通常の接種菌量では、対照平板と同様の発育をみた限界値より2段階濃度くらい上までの平板上に100個以下のコロニーとして発育が続くのがみられる。この場合、接種菌量を1/100、すなわちほぼ 10^4 個とすると、その中に変異株はほとんどみられず、明瞭な境界点がえられる。しかし通常接種量でも、たとえ100個以上の変異株の生育がみられたとしても、これを除外し、対照平板上と同様の発育をみた平板だけを陽性とするれば、通常接種量でも境界点の判定は、1/100量の場合と大差はない。

もし数個でもコロニーの生育がみられた最大値を耐性度にとると、変異の頻度に従がつて種々の耐性度が得られ、ばらつきが大きい。液体培地内で薬剤の段階希釈を行ない、菌の生育をみる耐性検査の場合は、1個でも耐性菌があれば培地内全体に増殖可能であるから終末点のばらつきが大きい。

またSA, CL, FT, FZなどは100倍に稀釈せねば耐性値のばらつきが大きい。

TCやCPのように、感受性菌の耐性度に変異し難いものは、接種菌量の如何に拘わらず、明瞭な境界点がえられている。

こうして我々は、接種菌量を1/100以下にすることによつて変異菌の出現を防ぎ、また菌体外に出る不活化酵素や菌体内の拮抗物質の影響をうけないようにすることが出来た。その稀釈の法は、被検菌の1夜培養液より菌液を1白金耳とつて、0.4 ml以上のペプトン水中に稀釈すれば、100倍以上の稀釈となり、大量の菌を処理する場合、簡便である。

我々は赤痢菌における耐性限界をきめただけであつ

て、その限界値がそのまま他の菌種にあてはまるものではない。赤痢菌ですら、例えば KM の感受性菌と中等度耐性菌との間の境界をひきにくいほどであるから、ましてや腸内細菌に属する菌のすべてを含めての耐性限界を1薬剤について1つという具合に定めることは出来ない。

しかしいずれの場合においても、*in vitro* におけるある菌種のある薬剤に対する耐性限界は、先ず耐性値分布曲線を種々の接種菌量で書いてから本稿に考察したような方法で定めるのが妥当であると考えられる。

藤井らは、我々のように接種菌量を1/100にするのが不相当である理由として、ブドウ球菌のペニシリン耐性の場合など、耐性菌の耐性値が接種菌量が少いと感受性菌のそれと近くなるからと論じている¹⁰⁾。

このような誘導酵素または菌体外へも出る不活化酵素による耐性は、耐性値が接種菌量に極めて影響され易いから別個に論じられねばならないが、その場合でも、耐性菌と感受性菌の耐性値の分布の山が異なる限り、耐性限界を正しくきめることは容易である。接種菌量を如何ようにするかは、耐性値のばらつきを最も少いところとしてきめるのが適当であろう。

さらに、こういう方法できめた耐性限界は、これによつて感受性菌、耐性菌の区別をするのが目的であるが、この区別をそのまま臨床面に適用するには未だ多くの因子を考慮に入れなければならない。生体内の薬剤濃度は平板上のそれと異なり、吸収、排泄との動的関係、血清中の不活化因子との関係によつてその活性が異なり、また菌の存在する具体的な環境、例えば細胞内とか、空腔内とかによつて静菌、あるいは殺菌の効果が変化する。

感受性菌といえども、CLM のように腸管から吸収し難いものは、経口投与では体内では奏効しないであろうし、耐性菌といえども、中等度耐性のものは、薬剤の大量使用が可能ならば治療効果がありうる。従がつて、臨床面では、また病巣のそれぞれに従がつて、薬剤の効果に異なる影響があるものと考えられる。

結 論

赤痢菌の薬剤耐性値分布を任意に選んだ100株の菌株について、13の薬剤について測定した。方法はハート・インフュージョン培地(SAでは合成培地)を用い、2倍づつの階段稀釈平板上に、被検液のペプトン水中1夜培養液を1白金耳づつ接種し、これを通常接種菌量とした。

TC, CM, SM, SA 以外では感受性菌のみの1峯性の耐

性値分布を画き、TC, CM では1峯性の耐性菌も加わり、SM, SA ではさらに中等度耐性菌群の区別もみられた。

SA, CL, FT, FZ では接種菌量を1/100にすると著しい耐性度の低下がみられ、それ以下の接種菌量でも同じであつた。KM, PRM, FRM, GNT 等の aminocyclitol 系薬剤では2~4倍高い耐性値をもつ変異株が 10^{-4} 程度の変異頻度でえられ、1/100以下の接種菌量では耐性値分布曲線は著変はないが変異株の出現を除外出来た。

感受性菌の耐性度分布が広い範囲にわたるTC, AB-PC, FT, FZの場合、赤痢菌の中でも *Sh. sonnei* が *Sh. flexneri* より耐性値が高いためであることがわかつた。

TC耐性では市販の培地で感受性菌の耐性度が8倍も違うのがみられた。

以上の結果から総合的に考察し、接種菌量は100倍稀釈液より行なうこととし、13の薬剤の耐性菌の下限値を下のように決定した。

25 $\mu\text{g/ml}$; SA, 12.5 $\mu\text{g/ml}$; CP, AB-PC, NA, 6.25 $\mu\text{g/ml}$; TC, SM, PRM, FRM, KM, FM, 1.6 $\mu\text{g/ml}$; GNT, CLM, FT.

文 献

- 1) 三橋 進：腸内細菌の薬剤耐性とその遺伝。薬事3(6)：40~45, 1961
- 2) 耐性赤痢研究会報告：第15回日本化学療法学会総会。昭42年6月，名古屋
- 3) 小酒井 望：赤痢菌感受性測定法の検討。日本医事新報 1783：15~19, 1958
- 4) 橋本 一，三橋 進，斎藤 誠，山口 剛，田中三重郎：治療中異なる耐性型菌を排出した細菌性赤痢について。日本医事新報 2141：24~26, 1965
- 5) 橋本 一：耐性赤痢菌の遺伝。第17回日本医学会総会学術講演集 2：63~68, 1967
- 6) 田中徳満，永井 裕，沢井哲夫，橋本 一，三橋 進：わが国で赤痢菌より分離された伝達性あるアミノペンチルペニシリン耐性について。日本細菌学雑誌 21：591, 1966
- 7) 福見秀雄，小酒井 望等：赤痢菌のストレプトマイシン，クロラムフェニコール感受性の測定法について。日本医事新報 1513：14~16, 1948
- 8) 横田 健：耐性化の生化学的機構。医学のあゆみ 56(5)：374~385, 1966
- 9) S.OKAMOTO & Y.SUZUKI: Occurrence of chloramphenicol-acetylating enzymes in various gram-negative bacilli. J. Bact. 94: 1616~1622, 1967
- 10) 藤井良知，他：感受性測定値の実験条件による動揺について。Chemotherapy 16(5)：743~749, 1968

DETERMINATION OF DRUG-RESISTANCE IN
SHIGELLA STRAINS

SUSUMU MITSUHASHI, YUTAKA NAGAI, TOKUMITSU TANAKA
and HAJIME HASHIMOTO

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

One hundred strains of shigelli were selected at random stock cultures in this laboratory and their resistance to 13 drugs was determined to establish a convenient method of assay of drug-resistance. Assay was performed by agar dilution method and level of resistance was expressed by maximal concentration (MAC) of drug which allowed bacterial growth. Serial two fold dilutions of drug were added to each plate.

It was found that decrease in inoculum size on assay plate resulted in a significant decrease in level of resistance to drugs, especially to SA, CL, FT and FZ, but constant value of drug-resistance was obtained when inoculum size below 10^4 microorganisms was used. Mutants developed at a high frequency of about 10^{-4} on assay plates containing aminocyclitol drugs such as KM, PRM, FRM and GNT, and level of their resistance was found to be 2 to 4 times higher than that of original sensitive strains. Therefore one loopful inoculum of overnight broth culture caused the development of many mutant colonies on assay plate and level of resistance of mutant colonies was taken as that of original sensitive strains. Decrease of inoculum size could eliminate such error caused by development of mutants. Distribution spectrum of resistance to TC, AB-PC, FT and FZ was slightly different between the strains of *Sh. sonnei* and *Sh. flexneri*. Considering from the results described above, one loop of 100 fold dilution of overnight broth culture was used for inoculum size on assay plate. In most cases, minimal concentration of drug (MIC) which inhibits bacterial growth was found to correspond to the concentration of two-fold MAC.

Most strains of shigelli were found to be resistant to TC, CP, SM and SA or to the combinations thereof, few strains being resistant to AB-PC or NA and mostly sensitive to other drugs. Distribution pattern of TC (or CP) sensitive and resistant strains was very sharp, but another group of low level of resistant strains exhibited in case of SM or SA.