

合剤使用の理論的考察

マクロライド耐性ブドウ球菌の応用

三橋 進・森 弘道・渡辺 健

群馬大学医学部微生物学教室

(昭和 44 年 7 月 21 日受付)

抗生物質、化学療法剤の発見と進歩は、細菌感染症の治療に大きい偉力を発揮し、感染症に対する我々のイメージを著しく変化させた。いつぼう、衛生環境の改善、予防法の普及に伴って、感染症を惹きおこす細菌の種類に変化が生じた。このような変化“細菌の種類 Shift”はこの方面の研究者にとって見のがすことのできないでき事であるが、さらに我々にとって大きい問題は、これらの細菌の多剤耐性化の状況である。

耐性化はあくまでも細菌遺伝の問題で、生物の示す最も根本的な課題であるが、薬剤の開発、使用の面からすれば、極めて面倒な問題を含んでいる。本報においてはブドウ球菌のマクロライド抗生物質に対する耐性の遺伝学的な問題を記述し、これに対しての対策の1つを理論的に述べたい。

実験方法

分離株の由来

分離株はすべてブドウ球菌による感染免疫の研究會(文部省総合研究班:班長、石原恵三教授、1961、1962年)¹⁾及び耐性ブドウ球菌研究會(班長、市川篤二博士、1961年から継続中)によつて分離されたもの、及び当教室独自に蒐集した菌株を加え、総数8,000株に及ぶ菌株、米国及びデンマークにおいて分離したものからランダムに選んだものを用いた。

耐性の測定

1晩ブイヨン培養した菌液の1白金耳を、2倍階段希釈した種々の濃度の薬剤を含む平板に塗抹し、1夜培養後、薬剤を含まない平板(cooked meat medium)上の発育と比較し、菌の発育が許される平板の最大薬剤濃度をもつて耐性値とした(MAC)。

薬剤

マクロライド(Mac)抗生物質として、Erythromycin(EM)、Oleandomycin(OM)、Leucomycin(LM)、Spiramycin(SP)、Josamycin(JM)、Lincomycin(LCM)を用いた。

それぞれの薬剤は塩野義製薬、東洋醸造、協和醸酵、山内製薬、日本アブジョンから分与された working standard である。また国立予防衛生研究所、梅沢博士

から分与された working standard をも併用した。

実験結果

Mac 耐性の分類

吾々は先に Mac 耐性菌を Mac A, B, C 群に分類した²⁾、Aグループは使用した Mac 抗生剤のすべてに交叉耐性で、その大部分は LCM にも耐性を示した。ごく稀に LCM 感受性菌もある。グループ B 及び C はその耐性が誘導されるもので C グループでは EM がその誘導剤、B グループでは EM 及び OM がその誘導剤となるものである。

A 群菌は平板上に接種する菌量の多少に関係なく、また接種後の時間が1日でも2日でも関係なく明瞭に発育し、その MAC あるいは MIC 測定には判定者による誤差がほとんどおこらない。このグループの菌の大部分は Mac 抗生物質に属さない LCM に交叉耐性を示す点興味深い。1966 年の調査では本邦で分離されたブ菌も米国のそれでも、Mac 耐性菌のうち A 群が約 5%、誘導型の耐性は約 95% ほどであった³⁾。従つて A 群菌に対しては Mac 抗生剤及び LCM は治療不適応の菌である。この種の菌の増加は Mac 抗生剤によつて警戒を要する菌である。

Mac 誘導耐性菌の性状

Mac 誘導耐性菌には EM だけが inducer となり得るもの、EM, OM の 2 剤が inducer となり得るものとが自然界から分離される。著者の 1 人(S・M)はかつて、ブドウ球菌の Mac 耐性は A グループに移行する型と 2 誘導剤の種類を増加するであろう型と 2 つの方向で変異してゆくことを予想した。しかし現実には A 群は増えつ

第 1 表 Mac 耐性の分類

分類	耐性の性状	誘導剤	耐性型
A 群	安定な耐性		EM. OM. LM. SP. JM. LCM EM. OM. LM. SP. JM
B 群	誘導耐性	EM. OM	EM. OM. LM. SP. JM. LCM (誘導後)
C 群	誘導耐性	EM	EM. OM. LM. SP. JM. LCM (誘導後)

つあるが、inducer が EM あるいは (EM, OM) 以外に増えたブ菌はこれまでに分離されていない。吾々が研究室で変異誘起物質を使つて、EM, OM の他に LM が誘導剤となり得る菌をつくることに成功した (大島, 他: 未発表)。Mac 誘導耐性菌は inducer に接触すると極めて短時間 (0.5~2 時間) に耐性を獲得し、その耐性は inducer のないところで培養されるとじきに消失する。Inducer によつて耐性を獲得する場合、inducer として EM, OM, LM のいずれか 1 剤を使つても獲得された耐性は全マクロライドと LCM 耐性である点注目すべきである。誘導耐性菌に蛋白質阻害剤を添加すると誘導はおこらない。例えば、EM が誘導剤である MS 537 は EM に触れると Mac 抗生剤全部と LCM に耐性化されるが、EM とクロロマイセチン (CP) を合剤として与えると誘導はおこらない^{3,6)}。

MS 537 は EM 平板にまくと最初は僅かに、後には完全に増殖し、EM 耐性菌としての様相を示す。しかし inducer になり得ない OM, SP, LM, JM 平板では発育しない。従がつて見掛け上は MS 537 は EM 耐性菌である。

MS 537 を EM で誘導後に各薬剤を含む平板にまくと、EM 平板では full growth を示すが、他の平板ではうすい増殖を示すが、接種量が少なくと発育しない。このことは誘導剤である EM がないところで分裂させると誘導によつて獲得した耐性を全部失なうことによつて説明つく。すなわち、MS 537 を EM で誘導後 EM を含む次の色々の薬剤平板 (EM, OM), (EM, LM) (EM, SP), (EM, JM), (EM, LCM) にまくと菌は full growth を示す。すなわち、誘導によつて耐性を獲得した菌は分

第 2 表 Mac 誘導耐性菌の耐性の模様

菌 株	グループ	耐 性 型	
		誘導前	誘導後 ^{d)}
MS 537-1 ^{a)}	B	EM, OM	EM, OM, LM, SP, JM, LCM
S 1008		"	"
S 1026		"	"
MS 537	C	EM	EM, OM, LM, SP, JM, LCM
MS 353 C 36 ^{b)}		"	"
S 665		"	"
MS 537-59 ^{c)}		EM, OM LM	EM, OM, LM, SP, JM, LCM

- a) MS 537 から得られた変異株 (6)
- b) Mac 感性菌 MS 353 に MS 537 から誘導耐性を導入したもの
- c) MS 537 から得られた変異株 (大島, 他: 未発表)
- d) 誘導後の耐性の測定には各薬剤を含む平板のすべてに EM (0.5 μg/ml) を添加して行なつた

裂に際して、そこに inducer である EM が存在するために耐性を持ちつづけ、すべての Mac 耐性、LCM 耐性菌としてこれらの平板に発育し続けることになる訳である。以上の結果を表 2 に示した。

誘導耐性から安定な耐性への変異

MS 537, MS 537-1, MS 353-C 36 の 3 株は共に誘導耐性株で、MS 537, MS 533-C 36 は EM のみが inducer であるが、MS 537-1 は EM 及び OM が共に inducer となり得る。MS 537, MS 353-C 36 を SP, LM, JM, LCM のそれぞれの 12.5 μg/ml を含む平板に接種した。この 2 株は EM のみが inducer であるため、もちろんこれらの平板に増殖はできない。ところがかなりの頻度でこれらの平板に増殖できる変異菌が出現した。その頻度はほぼ 10⁻⁸ に相当する (表 3)。MS 537-1 は橋本らによつて、M 537 から得られた変異株で、EM の他に OM も inducer となり得る菌である。この菌を inducer となり得ない LM, SP, JM, LCM 平板にまいて得られる耐性菌の変異率も同じく、ほぼ 10⁻⁸ を示した。

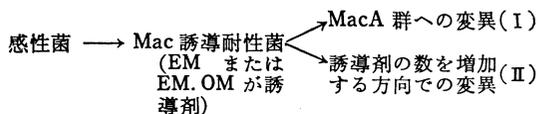
得られたこれらの耐性変異菌の耐性値を測定してみると、例外なく全マクロライド (EM, OM, SP, LM, JM) と LCM に耐性であつて、その耐性値は高く (800 μg/ml 以上)、しかもその耐性値は安定であつた。測定の代表例を表 4 に示した。すなわち、いずれの薬剤平板から得

第 3 表 Mac 誘導耐性菌から安定な耐性菌への変異

菌 株	接種した薬剤平板 (12.5 μg/ml)	耐性菌の出現率	得られた耐性菌 ^{a)}
MS 537	LM	3×10 ⁻⁸	A10, A11
	SP	3×10 ⁻⁸	A12, A13
	JM	8×10 ⁻⁸	A14, A15
	LCM	7×10 ⁻⁸	A16, A17
MS 353-C 36	LM	8×10 ⁻⁸	A18, A19
	SP	4×10 ⁻⁸	A20, A21
	JM	3×10 ⁻⁸	A22, A23
	LCM	1×10 ⁻⁸	A24, A25
MS 537-1	LM	2×10 ⁻⁸	A26, A27
	SP	3×10 ⁻⁸	A28, A29
	JM	1×10 ⁻⁸	A30, A31
	LCM	4×10 ⁻⁸	A32, A33

a) 得られた変異株の中からそれぞれ代表株として 2 株づつを選んだ

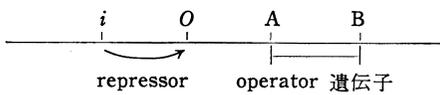
第 1 図 Mac 耐性菌増加の予想



第4表 Mac 誘導耐性菌から得られた変異菌の耐性

もとの菌株	誘導剤	耐性変異株の耐性型	
MS 537	EM	A10	EM. OM. LM. SP. JM. LCM
		A12	"
MS 353-C 36	EM	A22	EM. OM. LM. SP. JM. LCM
		A24	"
MS 537-1	EM, OM	A26	EM. OM. LM. SP. JM. LCM
		A28	"
		A30	"
		A32	"

第2図 Mac 耐性の遺伝構造



i : Mac 耐性の誘導に関係する遺伝因子
 A : Mac 抗生剤耐性を支配する遺伝子 } operator
 B : LCM 耐性を支配する遺伝子 } 遺伝子
 O : repressor の作用をうける遺伝子

られた耐性変異株も、すべて Mac 抗生剤のすべてと LCM に耐性であることを示している。

Mac 誘導耐性株からA群菌への変異の阻止

Mac 誘導耐性株からA群菌への変異は、すべてのMac 抗生剤を無効にし、さらには LCM も無効になるという極めて注目すべき変異である。Mac 耐性菌の大部分を占める Mac 耐性誘導株が、Mac 耐性A群菌に変異することは、研究室内で確認された事実であるが、疫学的にも近年 Mac 耐性菌の中にA群菌が増えつつあることは事実である。そこで誘導耐性株からA群への変異を阻止する実験を行なった。先に使用した MS 537 及び MS 537-1 を用い、誘導剤となり得ない、LM, SP, JM 及び LCM の単独 12.5 µg/ml を含む平板と上記の各薬剤に CP(5.0 µg/ml) あるいは KM(5.0 µg/ml) の合剤を含む平板に濃厚に菌を塗抹し、A群菌への変異の模様を調べた(表5)。

10⁹~10¹⁰ 個の菌を平板に塗抹した範囲内では CP ないしは KM を加えた合剤を含む平板からは耐性菌は出

現しなかつた。

討 議

Mac 抗生剤、LCM は共にすぐれた抗生剤として特にグラム陽性菌感染症の治療に使われている。ブ菌は近年著しく SA, SM, TC, PC などに耐性化し、いつそ Mac, LCM の重要性は高く、合成ペニシリン、セファロスポリン系薬剤などと共に使用量が増えつつあるのが現状である。

Mac 耐性の中には誘導型と安定な constitutive の型のあることが明らかにされ、Mac耐性の中後度が多いことが判明してから、吾々は Mac 耐性菌は図1に示すとおり、誘導剤の数を増やす方向での変異(II)と Mac A 群菌への変異(I)と2つあることを予想した。

しかし、最近までの調査では(II)の方向の変異は極めて少なく、橋本らによればIIの方向の変異は研究室内では得られているがその変異率のほぼ 10⁻¹⁰ のオーダーにあることが明らかにされた⁶⁾。この条件では治療をうけつつある1個体からそう頻繁にA群菌が出現しないことを示している。吾々は研究室内で MS 537(EM が誘導剤)→MS 537-1(EM, DM が誘導剤)→MS 537-59(EM, OM, LM が誘導剤)の変異株を得ている(大島, 他:未発表)。

しかし変異誘起剤、紫外線などを用いて研究室内で得られるもので病巣からは(EM, OM)以外の Mac 抗生剤が inducer になり得る菌は得られていない。

いつぼう、Mac A への変異(I)は研究室内でも容易に得られ、おそらく病巣内でも治療中 SP, LM, JM, LCM などで治療中比較的容易に得られるであろうことは疫学的調査で Mac A 群菌の増加からも推測される。

Mac 抗生剤耐性の遺伝学的構造は充分には明らかでないが、誘導耐性菌には inducer が加えられるか、42 °C 程度に加熱すると誘導されて耐性が発現する^{7,8)}。また誘導はCPのような蛋白合成阻害剤で阻止される^{3,5)}。以上のことから耐性誘導株では i 遺伝子から出される repressor によって operator 遺伝子 (Mac, LCM 耐性) が作用していない。Repressor がこわされるか inducer の添加で作用しなくなると operator 遺伝子が作用を

第5表 Mac 誘導耐性菌からA群菌への変異の阻止

菌 株	A 群菌への変異率 (使用した薬剤平板)											
	LM	SP	JM	LCM	(LM. CP) ^{a)}	(SP. CP)	(JM. CP)	(LCM. CP)	(LM. KM)	(SP. KM)	(JM. KM)	(LCM. KM)
MS 537	4×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁸	7×10 ⁻⁸	6×10 ⁻⁸	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
MS 537-1	1×10 ⁻⁸	5×10 ⁻⁸	4×10 ⁻⁸	3×10 ⁻⁸	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰

LM, SP, JM, LCM はそれぞれ 12.5 µg/ml を平板に加えた, CP 及び KM はそれぞれ 5.0 µg/ml を加えた

a) ブイヨン1晩培養菌を遠心で集め約 2×10¹⁰ 個の菌を寒天平板に混釈培養した

じめ Mac 耐性, LCM 耐性が発現すると考えられる。Mac, LCM 耐性遺伝子が異なるものとするのは、野外株に Mac 耐性で LCM 感受性菌が得られるからで、充分な遺伝学的解析は終っていない。

変異は従がつて i^- の方向か O^o の方向か, inducer の数を増やす方向に起ることが理論的に考えられる。しかしその変異率の比較から誘導耐性から, i^- あるいは O^o の方向への変異がおこり易いことを示している。

一般に A 薬剤に対する耐性菌出現の変異率を 10^{-a} , B のそれを 10^{-b} とする。それぞれの変異が独立とすれば 1 個の細胞が A と B 薬剤に耐性となる率は $10^{-(a+b)}$ となる。従がつて誘導耐性株から Mac A 群への変異をおさえるためには変異に無関係な他の薬剤を添加すればよい。その際、他の薬剤が添加されたために相乗効果が期待されれば、いつそう望ましい。もちろん、合剤にしたために生体への毒性が高まることは警戒しなくてはならない。

誘導耐性株の場合でも蛋白合成阻害剤を添加すると誘導がおこらないことから、誘導の阻害も今後の重要な研究課題である。

結 論

1. Mac 耐性菌には Mac 誘導耐性株と Mac A 群菌とある。
2. Mac 誘導耐性株から Mac A 群菌の変異は研究室内で非誘導剤である LM, SP, JM, LCM 平板で容易におこすことができる。
3. 疫学的なデータからも Mac A 群菌の増加はこの変異の方向の確実さを推測させる。
4. 上記非常誘導剤に CP, KM などを添加すると、当然のことながら A 群菌への変異は阻止される。
5. Mac 耐性の非誘導剤を合剤として使用すべき理論的根拠を述べた。
6. Mac 耐性誘導株に誘導剤を与えた場合も蛋白合

成阻害剤があると誘導がおこらないことから、この方面の研究の必要性を討議した。

文 献

- 1) 石原恵三: ブドウ球菌感染症の流行学的細菌学的研究ならびにこれらの治療対策について。37年度文部省研究報告集録(医学及び薬学), 125~134, 昭 27
- 2) 市川篤二: ブドウ球菌の薬剤耐性。Chemotherapy 14: 1~8, 1966; 14: 392~396, 1966; 14: 633~640, 1966; 15: 195~197, 1967
- 3) KONO, M., HASHIMOTO, H. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of staphylococci. III. Resistance to some macrolide antibiotics and inducible system. Japan. J. Microbiol. 10: 59~66, 1966
- 4) KONO, M., KASUGA, T. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of staphylococci. IV. Resistance patterns to some macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus* isolated in the United States. Japan. J. Microbiol. 10: 109~113, 1966
- 5) WEAVER, J. R. & PATTEE, P. A.: Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 88: 574~580, 1964
- 6) HASHIMOTO, H., OSHIMA, H. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of staphylococci. IX. Inducible resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. Japan. J. Microbiol. 12: 321~327, 1968
- 7) SAITO, T., HASHIMOTO, H., OSHIMA, H. & MITSUHASHI, S.: Inducible resistance to macrolide antibiotics in staphylococci. Induction by leucomycin and its derivatives. Japan. J. Microbiol. in press.
- 8) SHIMIZU, M., SAITO, T., HASHIMOTO, H. & MITSUHASHI, S.: Spiramycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Decrease in spiramycin-accumulation and the ribosomal affinity of spiramycin in resistant staphylococci. J. Antibiotics 23: 63~67, 1970

THEORETICAL ASPECTS OF COMBINED THERAPY. I

An Application to the Strains of Staphylococci Resistance to
Some Macrolide Antibiotics

SUSUMU MITSUHASHI, KODO MORI and KEN WATANABE

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan

According to the epidemiological studies of staphylococci, it was found that there are two types of resistance to macrolide (Mac) antibiotics; constitutive and inducible-resistance. Constitutive-resistant strains show stable and high resistance to all Mac antibiotics and most of them are found to be resistant to lincomycin (LCM), called group A of Mac-resistant strains. Inducible-resistant strains acquired high resistance to both Mac and LCM after prior treatment with subinhibitory concentration of inducers such as erythromycin (EM) and oleandomycin (OM). Resistance of the induced population was lost when they were grown in the media without inducers. Inducible-resistant strains are classified into two groups; group B and C, in which both EM and OM, and only EM are active inducers, respectively.

It was found that high rate of mutation from inducible-to constitutive-resistance took place when inducible-resistant strains were inoculated in the media containing either one of Mac antibiotics except for inducers. This fact is in accordance with the epidemiological studies of yearly increase in the isolation frequency of group A strain.

According to these results, it was concluded that the combined therapy is necessary for Mac antibiotics except for inducers; josamycin (JM), leucomycin (LM), spiramycin (SP), *etc.*, to suppress the mutation from inducible-to constitutive-resistance.