

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 8 報

結核菌の薬剤耐性化および復元の機序について

第 2 篇

Myco.607 および Myco.phlei を用いての実験

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任：柿下正道教授)

西 田 昭 治

(受付：昭和33年6月1日)

緒 言

私はさきに (金大結研年報, 15 (下), 243, 1957.) トリ型結核菌竹尾株を用い, その SM 感性菌を glycerol 増量培地に発育させる事によつて, SM に対する感受性を低下させ, かつその SM 耐性菌を感性菌浸出液中で加温直後冷却させる事によつて耐性を低下させうることを観察し,

これらの事実がそれぞれ菌膜透過性の減弱および昂進と密接な関係を有する事を実証した。

今回は更に Myco.607 および Myco. phlei について同様な条件下で SM 耐性の変動がみられるか否かを検討したので, ここにその成績の概要を述べる次第である。

実 験 材 料

I) 使用培地：

1) 継代用培地

- i) Sauton 液体培地 (6% glycerol 含有)
- ii) 15% および 20% glycerol 含有培地：
Sauton 培地の glycerol 量のみをそれぞれ 15% および 20% とした培地

2) 耐性測定用培地：最高濃度 1,000r/ml と して以下遞減的に稀釈した SM を含有せしめた Sauton 寒天培地 (寒天含有 3%)

II) 使用菌株：

1) 使用原菌株は予防医学研究所より分与せら

れたる後当教室に保存せる Myco.607 および Myco. phlei でともに 4 日ごとに Sauton 液体培地に継代し 1r/ml 以上 SM を含有する Sauton 寒天培地に発育しない事を確認した。

2) 両原株を漸増的に SM を含有した Sauton 培地に継代する事によつて得られた両菌株の SM 1,000r 耐性菌株 (607-R 株および ph-R 株と仮称)

その他の実験材料は実験方法の項において随時記載する。

実験方法ならびに実験成績

I. 培地の glycerol 増量と SM 耐性との関係

15% glycerol 含有培地では両菌株ともはじめは発育を抑制されたが、継代(3代以上)を続ける事によつて、ほとんど対照(6% glycerol 含有培地発育菌)と同程度に発育するようになった。一方20% glycerol 含有培地上では直接6% glycerol 含有培地より移植された菌はほとんど発育不能であつて、15% glycerol 含有培地に継代後移植された菌はかろうじて発育可能となつた。しかし両菌株では発育状態に差があつて、Myco.607では継代を続ける事によつても20% glycerol 含有培地に対する馴化傾向は認められなかつたが、Myco.phlei では継代を重ねるに従い、ほとんど対照と等しくなるまで発育可能となつた。そこで6%、15%および20% glycerol 含有培地に継代され発育の安定した Myco.607 および Myco. phlei のほぼ均等な 10^{-4} mg/ml 濃度の生理的食塩水(以下生食水と略)菌浮遊液を作り、その0.1ml あてを耐性測定用培地に滴加、37°C、4日間培養後発生した集落を数え、耐性の変動を検討した。その成績は第1表に示した。すなわち、15% glycerol 含有培地に継代する事によつて、Myco. 607 ではわずかに耐性の上昇を認めたが、Myco. phlei では対照群との間に差異を認めなかつた。20% glycerol 含有培地に発育した Myco. 607では対照群(6% glycerol 含有培地発育菌)に比し耐性の上昇を認めた。その耐性分布の状態は第2表のごとく、対照群の Myco. 607では SM 0.5r耐性菌が全体の86.3%を占めて最も多いのに比し、20% glycerol 含有培地に発育した Myco. 607では SM 0.5r耐性菌が31.9%に過ぎず、SM 1r 耐性菌が52.3%と最も多く、明らかに耐性分布の変動がうかがわれた。一方20% glycerol 含有培地に発育した Myco. phlei でも若干の耐性上昇傾向が認められたがその耐性分布は対照群とほとんど同型であつた。

II. 加温冷却操作による耐性菌感性化に関する実験

Myco. 607および Myco. phlei の4日間培養菌400mg(湿菌量)をそれぞれ20mlの0.01 M クエン酸ソーダ溶液に入れ、100°C、10分間加熱後1週間約2°Cの氷室に保存、遠心して得られた上清液を浸出液として使用した。Myco.607 および Myco.phlei の浸出液4.5mlにそれぞれ607-R株およびph-R株の生食水浮遊液(菌液濃度 10^{-1} mg/ml)を0.5ml あてに加え、それを50°C、30分間加温次いで-13°C、20分間冷却後、その0.1ml あてを耐性測定用培地に滴加し、37°C、4日間培養後発生した集落数を数えた。その成績は第3表に示した。すなわち607-R株では加温冷却処置によりSM 1,000r 耐性菌が9.1%に激減しており(第4表)明らかな耐性の低下を認めた。しかし一方加温冷却処置 ph-R では SM 1,000r 耐性菌は73.9%を占めやや減少しているごとく思われるも、607-R株との間に顕著な差が見られた。

III. 菌浸出液による耐性菌感性化作用の交差実験

使用菌株として Myco. 607, Myco. phlei の2株以外に前篇に使用したトリ型結核菌竹尾株およびそれぞれの SM 1,000r 耐性菌株をあわせて使用した。これらの感性菌浸出液を前述の方法に従つて調製し、Myco. phlei 浸出液に607-R株およびトリ型結核菌 SM 耐性株菌液を、Myco. 607 浸出液に ph-R 株およびトリ型結核菌 SM 耐性株菌液を、トリ型結核菌浸出液には607-R株およびph-R株菌液を、それぞれ 10^{-2} mg/mlの割合に混じて、加温冷却操作をほどこし、耐性の変動を検討した成績は第5表に示すごとくである。すなわち Myco. phlei 浸出液の場合には607-R株およびトリ型結核菌 SM 耐性株のいずれにも全然耐性の変動が認められず、Myco. 607 浸出液の場合にはトリ型結核菌 SM 耐性株に、またトリ型結核菌浸出液の場合には607-R株とともに若干の SM 耐性の低下を認めたが、両浸出液中で ph-R 株の耐性は全然変動を示さなかつた。

考案ならびに総括

前篇に述べたトリ型結核菌竹尾株の glycerol 増量培地における SM 抵抗性の上昇およびその SM 耐性菌の感性菌浸出液中における加温、冷却操作による SM 耐性低下等の事実は Myco. 607 およびその SM 耐性株においても認められた

が Myco.phlei およびその SM 耐性株においては明らかに認められなかつた。すなわち Myco.phlei は20% glycerol 含有培地での発育良好な点も考慮して、トリ型結核菌ならびに Myco.607 とその菌膜構造、生活機能において

異なっている事が推定できる。また Myco. 607 およびトリ型結核菌竹尾株の浸出液はそれぞれ607-R 株およびトリ型結核菌竹尾株 SM 耐性株の耐性を低下せしめたが Myco. phlei 浸出液は SM 耐性トリ型結核菌竹尾株および 607-R

株の耐性を低下せしめなかつた。これらの事実は抗酸性菌各菌株はその類縁性に従つて、いくらかずつ異なつた SM 耐性獲得あるいはその復元の機序を有することを示唆するものと思う。

結

私はトリ型結核菌竹尾株の SM 耐性上昇および低下せしめた前篇の実験条件で果して Myco. 607 および Myco. phlei の SM 耐性が変動するか否かを検討し、次の結論を得た。

1) Myco. 607 およびその SM 耐性株はそれぞれ培地の glycerol 増量および Myco. 607 浸出液中での加温冷却操作により、SM 耐性の上昇および低下をきたしたが、Myco. phlei および

論

その SM 耐性株においてはこのような SM 耐性の変動は明らかには認める事ができなかつた。

2) Myco. 607 およびトリ型結核菌竹尾株の浸出液にはいずれも両 SM 耐性菌の感性能を認めたが Myco. phlei SM 耐性株の感性能を認めなかつた。一方 Myco. phlei 浸出液には上記3種の SM 耐性菌に対する感性能を認めなかつた。

第 1 表 Glycerol 増量培地での培養によるSM耐性の変動

GL. 濃度 \ 菌株		SM濃度 (r/ml)							
		0 (control)	0.5	1	2	5			
6%GL.	Myco. 607	卅 (385)	卅 (375)	+	(43)	-	(0)	-	(0)
	Myco. phlei	卅 (379)	卅 (375)	+	(31)	-	(0)	-	(0)
15%GL.	Myco. 607	卅 (356)	卅 (345)	+	(220)	+	(70)	-	(0)
	Myco. phlei	卅 (320)	卅 (311)	+	(72)	-	(0)	-	(0)
20%GL.	Myco. 607	卅 (357)	卅 (345)	+	(186)	+	(37)	+	(8)
	Myco. phlei	卅 (383)	卅 (358)	+	(73)	+	(25)	-	(0)

卅 : 250 以上

卅' 249 ~ 200

+ 199 ~ 100

+' 99 ~ 80

+ 79 ~ 10

+' 9 ~ 1

- 0

(以下すべてこの規準による)

()内は集落数

第 2 表 Glycerol 増量培地に発育した菌の SM 耐性分布状態

GL. 濃度 \ 菌株		SM濃度 (r/ml)				
		0 (control)	0.5	1	2	5
6%GL.	Myco. 607	10 (2.6)	332 (86.3)	43 (11.1)	0	0
	Myco. phlei	4 (1.0)	344 (91.1)	31 (8.0)	0	0
20%GL.	Myco. 607	12 (3.3)	114 (31.9)	86 (52.8)	37 (10.3)	8 (2.2)
	Myco. phlei	25 (6.5)	285 (74.4)	48 (12.5)	25 (6.5)	0

数字は集落数, ()内は百分比

第 3 表 607-R株および ph-R株のそれぞれの感性菌浸出液中での加温・冷却処置による SM 耐性の変動

処置	菌株	SM濃度 γ/ml					
		1,000	500	250	125	62.5	0 (control)
加温 冷却 処置	607-R	+	+	++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
非 処 置	607-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++

第 4 表 607-R 株および ph-R 株のそれぞれの感性菌浸出液中での加温・冷却処置後の SM 耐性分布状態

処置	菌株	SM濃度 γ/ml					
		1,000	500	250	125	62.5	0 (control)
加温 冷却 処置	607-R	32 (9.1)	41 (11.9)	77 (21.8)	130 (36.9)	65 (18.4)	7 (1.9)
	Ph-R	280 (73.9)	5 (1.3)	35 (9.1)	35 (9.1)	17 (4.4)	8 (2.1)
非 処 置	607-R	340 (100)	—	—	—	—	—
	ph-R	385 (100)	—	—	—	—	—

第 5 表 感性菌浸出液による耐性菌感性化能の交差実験

浸出液	菌株	SM濃度 γ/ml					
		1,000	500	250	125	62.5	0 (control)
Myco. phlei	607-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Avi-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Myco. 607	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Avi-R	++'	+++'	+++	+++	+++	+++
Myco. avium	ph-R	+++'	+++	+++	+++	+++	+++
	607-R	+	+++'	+++	+++	+++	+++

註 ; Avi-R はトリ型結核菌竹尾株 SM 耐性株