

# 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及び復元の機序に就いて

### 第 1 編 鳥型結核菌に関する実験\*

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32年11月19日）

## 緒 言

近年各種化学療法剤及び抗生物質に対する細菌の薬剤耐性化は治療上重大な問題としてその発現防止に幾多の手段が講じられており、更にその根本的解決のため耐性発現機序が各方面より追究されている。而して今日の所細菌の薬剤耐性化の機序に就いては、突然変異説 (Demerec<sup>1)</sup>, Newcombe<sup>2)</sup>, Lederberg<sup>3)</sup>, Eagle<sup>4)</sup>) と誘導変異説 (Sevag<sup>5)</sup>, 秋葉<sup>7)</sup>) が提唱されているが、未だ一致した見解に到達していない状態である。然るに一方 1944年 McCarty, Avery 等が肺炎双球菌 III 型の DNA が II 型 R 変型菌を III 型に変え得る事実を報じて以来、遺伝生化学分野への DNA の導入は新しい問題として、Boivin<sup>6)</sup>, Weil<sup>10)</sup>, Alexander<sup>11)</sup>, Hotchkiss<sup>12)</sup> 等

によつて攻究され、結核菌の薬剤耐性化の問題も亦、同様な観点から検討されるようになった。即ち日比野<sup>13)</sup>等は磷酸殊に核酸代謝の面より研究の歩を進め、着々成果を挙げている。日比野等のいう核酸代謝が耐性菌発現機序に重要な因子であることは汎く認められている所であるが、私は更に細菌細胞の物理化学的性質が薬剤に対する耐性獲得或いは感性復帰に何らかの役割を演じてはいないかと考え、細菌細胞膜の透過性に変化を与えると推定される二、三の条件下に於て、菌の薬剤耐性化或いはその復元が惹起されるや否やを検討した。以下はその成績である。

### 第 I 実験 菌の Streptomycin (以下 SM と略) 耐性化に関する実験

培地成分としての glycerol を増量することにより抗酸性が強まる事実は既に 1927年 Long<sup>14)</sup>等は彼等が分離した No. 1305株を使用して実験しており、更に Bloch<sup>15)</sup>は結核菌菌膜の非透

過性と抗酸性の強さとの間に平行関係が成立すると報告している。そこで私は高濃度 glycerol 含有培地に発育した菌の耐性\*\*の変動を検討した。

\* 本論文の要旨は昭和32年10月27日第11回日本細菌学会北陸地方支部集会で発表した。

\*\* 以下耐性又は感性とあるは SM 耐性又は SM 感性を意味する。なお SM は Dihydrostreptomycin (明治製菓) を使用した。

## 実 験 材 料

(1) 使用菌株：使用原菌株は教室保存の鳥型結核菌竹尾株で

i) 4日毎に Sauton 培地 (6% glycerol 含有培地) に継代し, 1γ/ml 以上 SM を含有する 1%小川培地に発育しないことを確認した菌株 (6% GL. 株と仮称)

ii) その 6% GL. 株を glycerol 量を 20%含有せしめた Sauton 培地 (20% glycerol 含有培地) に継代し, 容易に発育するまで馴らしめた菌株 (20% GL. A 株と仮称)

iii) 更に 20% GL. A 株を再び 6% glycerol 含有培地に 1代継代した菌株 (20% GL. B 株と仮称) の 3種の菌株を使用した。

(2) Warburg 検圧法：M/15 Sørensen 氏磷酸緩衝液 (pH 7.0) を用い, 基質として 0.1M glycerol を使用した。

(3) 耐性測定用培地：最高 SM 濃度 20γ/ml とし以下遞減的に稀釈した 1%小川培地を使用した。

その他の実験材料は実験方法の項に於て随時記載する。

## 実験方法並びに実験成績

1) 3種の菌株の抗煮沸性試験：占部<sup>13)</sup>の方法に拠つた。第1表はその成績を示したもので, 20% GL. A株では 6% GL. 株に比し, 明らかに抗煮沸性の増強が認められたが, 20% GL. B株では 6% GL. 株と著差を示さなかつた。

2) 3種の菌株の Warburg 検圧法による酸素消費量の測定：吉田<sup>17)</sup>の方法に準拠した。菌量は各々乾燥重量 3mg として, 4時間観察し, その間の酸素消費量を測定した。その成績は第1図に示した。即ち 6% GL. 株に比し 20% GL. B株では振盪開始後1時間は酸素消費の減少, その後は急激な増加が認められた。一

方 20% GL. B株では最初から 6% GL. 株, 20% GL. A株に比し酸素消費量の増大が認められた。

3) 3種の菌株の耐性分布：手振法で20分間振盪し, 略々均等な 1mg/ml の生理的食塩水 (生食水) 菌浮游液を作り, これを  $10^{-4}$ mg/ml に稀釈して 0.1ml 宛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算えた。第2表はその成績で, 20% GL. A株に於て明らかに耐性の上昇を認めたが, 20% GL. B株では再び対照 (6% GL. 株) と殆んど同程度の感性に復していた。

## 小 括

SM 耐性の上昇を示した glycerol 増量培地に容易に発育した菌株 (20% GL. A株) では理論的には glycerol に対応する酵素活性が通常の Sauton 培地の菌株 (6% GL. 株) に比し増加し, 従つて酸素消費の増大が予想された。しかし実際には振盪開始直後の酸素消費量の減少と爾後の急激な増大が認められた。この初期減少は glycerol 増量培地で継代した菌株に於

ける菌膜透過性減弱による lag phase の延長によるものであり, 後期増加は予想した酵素活性の増加によるものと推定することも許されるのではないかと考える。このような推定は更に通常の Sauton 培地 (6% glycerol 含有) に再び移植された菌株 (20% GL. B株) では初期より酸素消費量の増大が認められた事実によつて支持され得ると考える次第である。

## 第II実験 耐性菌の感性化に関する実験

1952年 H. A. Krebs<sup>18)</sup> が酵母菌を加温し, 次いで急激に冷却することによつて, 著しく菌膜透過性が高まることを報告しているが, 私は

同様な操作が SM 耐性鳥型結核菌竹尾株の耐性に如何ように影響するかを検討した。

## 実験材料

### (1) 使用菌株

i) 耐性菌：鳥型結核菌竹尾株の SM 1,000 $\gamma$  耐性菌株を使用した。

ii) 感性菌：第1実験に使用した菌株と同じ。

### (2) 使用培地

i) 継代用：Sauton 液体培地を使用した。

ii) 耐性測定用：最高 SM 濃度 1,000 $\gamma$ /ml とし以下遞減的に稀釈した Sauton 寒天培地を使用した。

(3) P<sup>32</sup> 溶液：Na<sub>2</sub>HP<sup>32</sup>O<sub>4</sub> の 100 $\mu$ c/ml 蒸留水溶液で、日本放射性同位元素協会より分与されたものである。その他の実験材料は実験方法の項に於て随時記載する。

## 実験方法並びに実験成績

### 1) P<sup>32</sup> 菌体内吸収に加温冷却操作の及ぼす影響の検討

耐性菌を生食水で十分に洗滌し、濾紙で可及的に水分を除去して 100mg を秤量し、大試験管に移し、硝子玉を入れ少量の生食水を加え、手振法で20分間振盪、更に生食水を加えて全量 19ml とした。次いで恒温槽で 40°C、30分間加温後直ちに -13°C に冷却し20分間放置後、P<sup>32</sup> 溶液 1ml を加え 37°C 孵卵器中に16時間放置後、菌体の洗滌液（遠心上清）のカウントが back ground と等しくなる迄洗滌された菌体 10mg を秤量し、メノウの乳鉢で菌塊を磨り 10 ml の生食水を加えて、1mg/ml の菌液を作り、それより 10<sup>-1</sup>mg/ml 及び 10<sup>-2</sup>mg/ml の菌液を作つた。その 1ml を試料皿に取り乾燥し、夫々の P<sup>32</sup> の量をガイガー・ミュウラ計数管によつて測定した。なお対照として加温-冷却を施さなかつた菌に就いても同様な検索を行つた。その成績は第3表に示した如く明らかに加温-冷却処置された菌は未処置菌に比し菌体中に多くの P<sup>32</sup> を取り入れていた。

### 2) 生食水中での加温-冷却操作による耐性菌の耐性の変動の検討\*

10<sup>-2</sup>mg/ml の生食水耐性菌浮游液（菌液調製は以後前法に同じ）を作製し、種々の温度（50°C、45°C、及び 40°C）に 30分間加温、次いで -13°C に20分間冷却後、各々その 0.1ml 宛を耐性測定用培地に滴加、37°C、4日間培養後発

生した集落数を算えた。しかし何れの場合に於ても耐性の変動は認められなかつた。

### 3) 感性菌浸出液及び耐性菌浸出液中での加温-冷却操作による耐性菌の耐性変動の検討

感性菌及び耐性菌の 400mg（湿菌重量）を夫々 20ml の 0.01M citrate 溶液に入れ、100°C 10分間加熱後1週間 2°C の氷室中に保存、遠心して得られた上澄液を浸出液として使用した。両浸出液 4.5ml に耐性菌生食水浮游液（菌液濃度 10<sup>-1</sup>mg/ml）を 0.5ml 宛分注し、これを各種の温度（40°C、45°C、及び 50°C）で 30分或いは60分間加温し、次いで -13°C に20分間冷却後、夫々の 0.1ml 宛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算えた。それらの成績は第4表に示した。即ち耐性菌浸出液中では何れの条件下に於ても耐性の変動は認められなかつた。然るに感性菌浸出液中では加温 40°C、45°C の場合には菌の耐性の変動は認められなかつたが、50°C、30分間の加温操作に於て明らかに耐性低下が認められた。しかし 50°C、60分間加温操作を施した場合の感性化は著明でなかつた。更にその際浸出液と菌液とを混和するに先立ち、予め菌液に加温-冷却操作（50°C、30分及び -13°C）を施し、次いで感性菌浸出液と混和した場合の耐性の変動をも合せて検討したが、明らかに耐性低下が認められた。

### 4) 耐性菌の加温-冷却操作の反覆による耐

\* 感性菌及び耐性菌の加温・冷却操作による菌生存率を検討したが両者の間に著差はなかつた。

### 性の変動の検討

感性菌 0.01M citrate 浸出液中で加温-冷却操作\*を施した耐性菌を Sauton 培地で4日間培養後生食水浮游液を作り、再び感性菌浸出液中で加温-冷却操作を行つたもの及び、同再加温-冷却処理菌を今一度 Sauton 培地で4日間培養した菌に更に、感性菌浸出液中で加温-冷却操作を加えたものに就いて、夫々その耐性の変動を前述の方法に従い検討した。一方1回感性菌浸出液中で加温-冷却処理された耐性菌を Sauton 培地で4日間培養したもの及び更にこれを Sauton 培地に継代したものに就いても同様な方法により耐性の変動を検討した。その成績は第5表に示した。感性菌浸出液中で反覆加温-冷却操作を繰返すことにより SM 1,000 $\gamma$  耐性菌は SM 10 $\gamma$ /ml 含有培地で漸く完全耐性を示す迄に耐性低下が認められた。一方1回加温-冷却処理後、通常の Sauton 培地に継代された菌では、一旦低下した耐性は徐々に原株の耐性度に復帰する傾向が認められた。

5) 各種酵素作用による感性菌浸出液の感性化能の変動の検討

感性菌 0.01M citrate 浸出液を無菌的にセロファン膜により流水中で一昼夜透析後、4.0ml 宛中試験管に分注し、各種酵素液\*\* (trypsin, lipase, amylase, ribonuclease, desoxyribonuclease) 0.5ml を加え、37°C, 2時間放置後 100°C 5分間加熱し、次いで耐性菌生食水浮游液(菌液濃度 10<sup>-1</sup>mg/ml) を更に 0.5ml 加えて、加温-冷却操作を行い、前法に従つて耐性の変動を観察した。その成績は第6表に示した如く、trypsin, lipase, amylase, ribonuclease は共に無影響であつた。desoxyribonuclease に於て感性化作用の減弱が認められた。

6) 感性菌死菌の耐性菌の耐性に及ぼす影響  
10<sup>-2</sup>mg/ml, 10<sup>-3</sup>mg/ml 及び 10<sup>-4</sup>mg/ml の感性菌生食水浮游液を 4.5 ml 宛、中試験管に分注し、100°C, 10分間加熱殺菌した後、各試験管に耐性菌生食水浮游液(菌液濃度 10<sup>-1</sup>mg/ml) を 0.5ml 宛滴加し、加温-冷却操作を行つた。その 0.1ml 宛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を算えて耐性の変動を観察したが、何れの場合に於ても耐性菌の耐性度は影響されなかつた。

## 小 括

感性菌培養濾液或いは感性菌菌体成分による耐性菌の感性化に就いては Vourka<sup>20)</sup>, Winner<sup>20)</sup>, 秋葉<sup>21)</sup>等の報告があるが、それらは共に連鎖球菌、葡萄球菌或いは肺炎双球菌等に関する実験であり、抗酸性菌に就いての報告は未だ見られない。これは恐らく抗酸性菌が独特の強固な細胞膜を有するために感性化能を有する物質が充分に作用し得ないことに原因するのではな

いかと考えられる。次いで私は菌膜透過性を高めると思われる条件—加温後冷却—を耐性菌に与えて感性菌浸出液と接触させた所、明らかに耐性の低下が認められた。而してこの場合単に耐性菌に菌膜透過性を高めると推定される条件を与えるだけでは耐性の変化は惹起されなかつた。然るに斯くして低下した耐性が Sauton 培地に継代することにより再び徐々に上昇する傾

\* 加温-冷却操作の条件は以後すべて 50°C 30分間加温後 -13°C, 20分冷却とする。

\*\* なお使用した酵素液の濃度、作用時の pH 及び製造会社名

	濃度	pH	会社名
Trypsin	30mg/ml	8.0	石津製薬 (p.p)
Lipase (Steapsin)	20mg/ml	7.0	和光純薬 ch
Amylase	20mg/ml	7.0	石津製薬 (p.p)
Ribonuclease	5mg/ml	7.0	和光純薬 ch
Desoxyribonuclease	5mg/ml	7.0	和光純薬 ch

向を示したことは、果してこれらの現象が変異によるものか、或いは適応によるものか、何れ

とも判定出来ずなお今後の問題を残しているものとする。

## 総 括

細菌の薬剤耐性獲得に細菌細胞膜の透過性が重要な因子となることに就いて、夙に Ehrlich<sup>23)</sup> 一門の *Trypanosoma* に関する実験、或いは Fischl<sup>23)</sup> 等の *Spirochaeta recurrentis* に関する報告等があり、抗酸性菌に関しては庄司<sup>24)</sup> は鳥型結核菌体内に存在する glutamin 酸脱炭酸酵素に対する INH の阻害作用を示標として INH 耐性獲得には薬剤の菌体内への非透過が重要因子であると報告しているが、SM 耐性獲得或いはその復元と菌膜透過性との関係に関する報告は未だ見ない。よつて私は SM 感性菌を gly-

cerol 増量培地に培養した所、抗酸性は増強し、Warburg 検圧法による酸素消費量から菌膜透過性が減弱したと見られる成績を得ると同時に明らかに SM 耐性の上昇が認められた。SM 耐性菌では感性菌浸出液に接触しただけでは耐性は低下しないが、同時に菌膜透過性を高めると考えられる条件(加温-冷却操作)が与えられれば明らかに耐性低下が招来された。これらの事実は菌膜透過性と菌の SM 耐性化或いはその復元との間に若干の関連性が存在することを示すものと推論するものである。

## 結 論

私は鳥型結核菌竹尾株を使用して菌膜透過性と SM 耐性化或いはその復元との関係を知らんとして実験を行い、次の結果を得た。

1) Sauton 培地の glycerol 含有量を20%まで増量した培地に発育した菌では、明らかに耐性

の上昇が認められた。

2) 感性菌浸出液中で加温-冷却操作(50°C, 30分後 -13°C, 20分)を施された耐性菌では明らかに耐性低下が認められた。

## 文 献

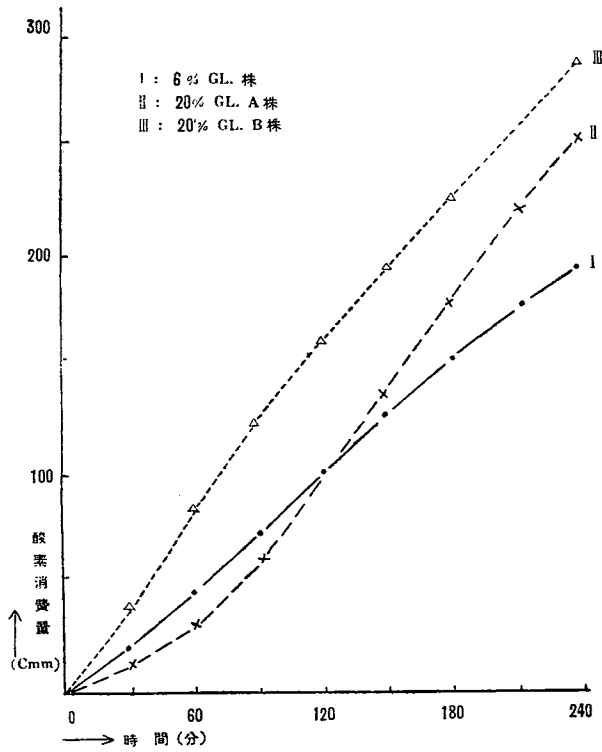
- 1) Demerec, M. : *Genetics*, **36**, 585, 1951.
- 2) Newcombe, H. : *J. Bact.*, **57**, 505, 1949.
- 3) Lederberg, J. : *J. Bact.*, **63**, 339, 1952.
- 4) Eagle, H. : *J. Bact.*, **63**, 623, 1952.
- 5) Sevag, M. : *J. Bact.*, **63**, 245, 1951.
- 6) Hinshelwood : *J. Chem. Soc.*, 745, 1952.
- 7) 秋葉朝一郎 : *医学と生物学*, **24**, 218, 1952.
- 8) Avery, O. : *J. Exp. Med.*, **79**, 137, 1944.
- 9) Boivin, A. : cf. *結核*, **29**, 19, 1954. 10) Weil, A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **64**, 349, 1947. 11) Alexander, H. : *J. Exp. Med.*, **97**, 17, 1953. 12) Hotchikiss, R. : cf. *Chemotherapy*, **1**, 1, 1953. 13) 日比野進 : 第28回日本結核病学会総会特別講演, 1954.
- 14) Long, E. : *Am. Rev. Tuberc.*, **16**, 523, 1927. 15) Bloch, H. : *Am. Rev. Tuberc.*, **61**, 270, 1950. 16) 占部薫 : *実地医家と臨床*, **18**, 526, 1937. 17) 吉田清 : *金大結研年報*, **10** (下), 112, 1952. 18) Krebs, H. : *Bioch. J.*, **51**, 614, 1952. 19) Voureka, A. : *Lancet*, **1**, 63, 1948.
- 20) Winner, H. : *Lancet*, **1**, 674, 1948.
- 21) 秋葉朝一郎 : *医学と生物学*, **24**, 55, 1952.
- 22) Ehrlich, P. : *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **42**, 17, 1909. 23) Fischl, V. : *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, **116**, 138, 1934.
- 24) 庄司宏 : 第32回日本結核病学会総会発表, 1957.

第1表 抗煮沸性試験

菌株 煮沸時間	6% GL株	20% GL.A株	20% GL.B株
1'30"	卅	卅	卅
2'	卅	卅	卅
2'30"	卅	卅	卅
3'	卅	卅	卅
3'30"	±	卅	+
4'	-	卅	-
5'	-	卅	-
7'	-	+	-

染色温度 42°~45°C  
 染色時間 41分

第1図 3菌株の Warburg 検圧法による酸素消費量 (基質 0.1M glycerol)



第2表 3菌株の耐性分布

菌株 \ SM濃度 γ/ml	C	0.5	1	2	4	8	10	20
6% GL. 株	冊	冊	+	-	-	-	-	-
20% GL. A 株	冊	冊	冊	冊	+	+	+	-
20% GL. B 株	冊	冊	+	-	-	-	-	-

集落数の表現

- 冊 500個以上 (以下すべて集落数の表現は左の基準による)
- 冊 500~200
- 冊 200~100
- +
- 100~1
- 0

第3表 菌体内への P<sup>32</sup> 透過に対する  
加温冷却操作の影響(数値はカウント)

B G	3 4			
菌液濃度 菌	10 <sup>-1</sup> mg/ml		10 <sup>-2</sup> mg/ml	
	平均	平均	平均	平均
非処置菌	1,997	2,029	252	233
	2,023		227	
	2,058		231	
処置菌	3,019	3,044	341	317
	3,026		296	
	2,987		315	

BG : back ground

第4表 感性菌浸出液及び耐性菌浸出液中での加温冷却操作による耐性菌の耐性の変動

浸出液種 及び加温条件		SM濃度 γ/ml	1,000	500	250	125	50	C
感性菌浸出液	40°C	30'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	45°C	60'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	45°C	30'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	50°C	60'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	50°C	30'	+	+	冊	冊	冊	冊
耐性菌浸出液	40°C	30'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	45°C	60'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	45°C	30'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	50°C	60'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	50°C	30'	冊	冊	冊	冊	冊	冊
菌液加温冷却 (50°C, 30' 及び -13°C, 20') 後感性菌浸出液と混和			+	+	冊	冊	冊	冊

第5表 加温冷却操作の反覆による耐性菌の耐性の変動

処 置	SM濃度 γ/ml		1,000	500	100	50	10	C
	世代							
加温冷却操作	1	代	+	+	++	+++	+++	+++
	2	代	+	+	++	++	+++	+++
	3	代	-	+	+	+	+++	+++
非 処 置	2	代	+	+	+++	+++	+++	+++
	3	代	+	++	+++	+++	+++	+++
対 照			+++	+++	+++	+++	+++	+++

第6表 各種酵素作用による感性菌浸出液の感性能の変動

酵素の種類	SM濃度 γ/ml		1,000	500	250	125	50	C
	透 析	非透析						
Trypsin	+	++	+	++	+++	+++	+++	+++
Lipase	+	++	+	++	+++	+++	+++	+++
Amylase	+	++'	+	++'	+++	+++	+++	+++
RNase*	+	++	+	++	+++	+++	+++	+++
DNase**	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
非処置 浸出液	透 析		+	++'	+++	+++	+++	+++
	非透析		+	+	++	+++	+++	+++

\* RNase : ribonuclease

\*\* DNase : desoxyribonuclease