

試験管内で Streptomycin 耐性を獲得した大腸菌の 他種抗菌物質に対する感受性に関する研究

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

山 上 斌
荒 木 暢 子
山 本 雅 一
田 中 義 郎

[昭和 38 年 11 月 12 日受稿]

I 緒 言

北本等¹⁾は昭和30年に赤痢患者より1株の Streptomycin (以後 SM と略記する.), Chloramphenicol (CM), Tetracycline (TC), Sulfa 剤 (SA), の四剤に耐性, 即ち多剤耐性赤痢菌を分離した。以来, 多剤耐性腸内細菌の保有者が激増し公衆衛生学, 伝染病学上の大きな問題となり, 龐大な数にのぼる有意義な業績が報告されつつある。最初が多剤耐性腸内細菌は, かつてその各々の薬剤に何等かの形で接触した後に生き残った菌と見做されていたが, 後に薬剤耐性の出現には必ずしもその薬剤との接触を必要としないことが明らかにされた。多剤耐性腸内細菌について現在迄に明らかにされた点を要約すると²⁾³⁾⁴⁾¹⁴⁾

1) 多剤耐性と云う表現型は遺伝すること, この遺伝因子は多剤耐性因子 (R因子¹³⁾) と名付けられ, Episome 性のものであるとも云われ, SA, SM, CM, TC, の順序で耐性因子が連らなつて並んでおり, この遺伝因子群が一同となつて, 又はいくつかの組に分離して子孫に, 又は細菌の接合 (conjugation) 又は形質導入 (transduction) によつて同種又は異種の感受性菌に伝達される。例えば耐性大腸菌より感性大腸菌に, 耐性大腸菌より感性赤痢菌に。

2) 現在迄のところ多剤耐性因子の形質転換 (transformation) による伝達は否定されている。等である。

我々は学生実習において教室保存の人工的に試験管内で耐性を獲得させた streptomycin 耐性菌を用いて種々の抗菌物質の disk で耐性検査を行なわせ原株と薬剤感受性の比較を行なわせた時に, streptomycin 耐性と同時に sulfa 剤耐性をもつも

の, penicillin 感受性をもつもの等色々な態度を示す菌があるのに気が付いた。

木村等¹¹⁾は396名の健康者の糞便の大腸菌を検査し SA 平板で61株の SA 耐性, 11株の SA・SM 耐性, 13株の SA・TC 耐性, 7株の SA・SM・CM・TC 耐性, 3株の SA・SM・TC 耐性, 1株の SA・CM 耐性大腸菌を, 又 SM 平板で5株の SM耐性, 6株の SA・SM 耐性, 4株の SA・SM・TC 耐性大腸菌を分離したと報告している。吉川等⁹⁾は SA・SM 耐性大腸菌を donor とし感性赤痢菌を recipient として伝達を行なつたところ SA・SM 菌と SM 耐性菌に分離したと報告している。原田等⁹⁾は CM・TC・SM・SA 四剤耐性菌から耐性の自然消失によつて SM・SA 株と TC 耐性株が得られたと報告している。本多等¹⁰⁾は群馬県下で449名の健康者の大腸菌を検査し30.2%が何等かの型の耐性大腸菌を保有しており, そのうち SM・SA 耐性菌が最高率に検出されたと報告している。前述の文献は人体よりの分離菌でのものである。一方試験管内で人工的に1つの薬剤との接触によつて得られた菌は単独耐性菌で他種の薬剤に対して同時に耐性を獲得することは困難であるとの報告が多い⁴⁾¹²⁾。そこで我々は教室保存の大腸菌18株を試験管内で高度の streptomycin 耐性とし, disk 法で原株とこの耐性株の SM・SA・PC・TC・CM・KM (Kanamycin) の耐性を比べた結果, streptomycin 耐性菌は同時に sulfa 剤にも耐性をもつ確率が大きいと云うデータを得たので報告したい。

II 実験材料及び実験方法

1) 使用した菌

原株は E. coli (Kauffmann-Knipschildt-Vahlne の

分類による1群~24群, 但し 2, 12, 14, 15, 16, 23, 25群は欠ぐ) の計18株, streptomycin 耐性株は上記の原株を1, 10, 100, 1,000, 1万 mcg/ml の割合で streptomycin を含んだ寒天培地に植継いで, 5段階で耐性を獲得させた1万 mcg/ml 耐性菌18株. 3代~10代目の菌を実験の前日植継ぎ, 18時間培養菌を用いた.

2) 培地

普通寒天培地を用い, sulfa 剤の耐性検査には Müller-Hinton 寒天培地を使用した.

3) 薬剤耐性の測定

disk (昭和薬品化工K. K.) を用いて菌の発育阻止帯の直径の大きさを耐性の程度を測定した.

4) 耐性の判定

	最低阻止濃度	阻止帯直径
SM	100mg/ml	10mm 以下
PC	10unit/ml	12mm "
SA	400mcg/ml	10mm "
TC	50mcg/ml	12mm "
CM	50 "	15 "
KM	100 "	8 "

をもつて耐性とした. 昭和 disk 説明書による.

5) 実験方法

18時間培養菌の各々 2mg 湿菌を 2ml の滅菌したシモンズ液体培液に均等に浮遊させ菌液とする. その1滴 (0.04ml) をシャーレに流した固型培地 (Müller-Hinton 培地又は寒天培地) の上に落し一面に拡げ, その上に3枚の異種の薬剤 disk を等間隔に置き, そのシャーレを冷蔵庫に4時間入れて disk 中の薬剤をよく培地の中に拡散させた後, 37°C, 18時間培養して発育阻止帯を測定する.

III 実験成績

Kauffmann-Knipschildt-Vahlne の分類による, 大腸菌1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24群の計18株及びその1万 mcg/ml SM耐性菌の種々の抗菌物質に対する感受性を表にして示す. 実験は2回ずつ行なった. Sは感受性を, Rは耐性を表わす.

18株の streptomycin 耐性菌のうち4株 (約20%表 C, D, E,) が sulfa 剤に対して同時に耐性 (1,000 mcg/ml 以上) を示した. これは Müller-Hinton 培地で実験を行なった場合であるが, sulfa 剤に対する拮抗物質を含むと云われている普通寒天培地で調べた場合, sulfa 剤に対する耐性を併有するものは

A		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	S	S	R	S	S	S		5, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 20, 21, 22,	
耐性株	R	S	R	S	S	S		5R, 7R, 8R, 9R, 10R, 18R, 19R, 20R, 21R, 22R,	
B		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	S	S	S	S	S	S		11, 13,	
耐性株	R	S	S	S	S	S		11R, 13R,	
C		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	S	S	R	S	S	S		3, 17,	
耐性株	R	R	R	S	S	S		3R, 17R,	
D		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	S	S	S	S	S	S		6,	
耐性株	R	R	S	S	S	S		6R,	
E		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	R	R	S	S	S	S		4,	
耐性株	R	R	S	S	S	S		4R,	
F		SM	SA	PC	TC	CM	KM	菌の群の番号	
原株	S	S	R	S	S	S		1, 24,	
耐性株	R	S	S	S	S	S		1R, 24R,	

6株以上 (30%) にも及んだ. (データは省略する) これは streptomycin 耐性と sulfa 剤耐性とが密接な関係を有することを意味するものと思われる.

Streptomycin 耐性と同時に, penicillin に対して強い感受性 (最低阻止濃度 0.04 unit/ml 以下, 原株の約200倍の感受性) を示す菌が2株 (約10%表 F) 認められた. が他の16の株は penicillin に対する感受性を増していなかった.

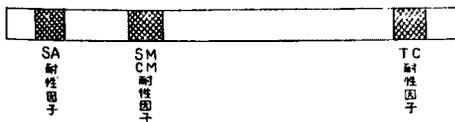
全部の streptomycin 耐性株は原株に比べて Tetracycline, Chloramphenicol に対して2~3倍感受性を増した. (Szybalski¹⁵⁾ の collateral sensitivity).

3剤以上の薬剤に対して同時に耐性をもつ株は認められなかつた。これは実験に用いた株数が少なかつたためかもしれない。

IV 検 討

多剤耐性腸内細菌に関する論文を全部ここで紹介することは不可能に近いので関連したものの一部を記すと、秋葉等²⁾、三橋等³⁾、は現在の日本人の腸管内には多剤耐性を含む各種の型の耐性大腸菌がかなりの率に存在し、かような大腸菌保有者が感性赤痢菌に感染し、発病して薬剤の投与を受ける時に、耐性大腸菌と感性赤痢菌が適当な条件下混在する時、薬剤耐性と云う遺伝的な性質が大腸菌から赤痢菌へ細菌の接合によつて伝達されることを示した。落合等⁴⁾は、多剤耐性赤痢菌の流行に際して臨床細菌学的に検査した結果多くの事実注目しているが、常識的に云えば単独耐性菌が最も多く次いで二重耐性菌の順となり多剤耐性菌は最も少ないはずなのに、事実はこれに反して自然界では多剤耐性菌が最も多く、次いで TC 耐性菌で SM・CM、CM・TC、の二重耐性菌は非常に少なく、CM 単独耐性菌はまだ検出されていない。又⁵⁾試験管内において腸内細菌の SM・CM・TC 三剤耐性菌は常に SA にも耐性である。が赤痢菌を試験管内で薬剤を含んだ培地に継代して得られるのはその作用薬剤に対する単独耐性菌で、同時に多種類の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌は得られないと云う。渡辺等⁶⁾は多剤耐性菌を donor とした接合の実験から多剤耐性因子は Episome⁷⁾ 性のものであるとし遺伝子地図を作り、SM と CM の

多剤耐性因子 Episome の模型



参 考 文 献

- 1) 北本 治, 滝上 正, 笠井直倫, 深谷一太, 川島明: 昭和30年度分離赤痢菌の薬剤感受性. 日本伝染病学会雑誌, 30, 403~404, 昭和31年.
- 2) 秋葉朝一郎: 薬剤耐性の伝達と耐性の機序. 細菌学雑誌, 16, 602~619, 昭和36年.
- 3) 三橋 進: 腸内細菌の薬剤耐性について. 医学と生物学, 55, 49~52, 昭和35年.
- 4) 落合国太郎: 混合培養による薬剤耐性の伝達. 現象発見の動機と術式の着想. 日本細菌学雑誌,

耐性因子は同じ位置に、SA はその附近に、TC の耐性因子はやや離れて位置していると云う。

三橋¹⁴⁾によれば現在迄に知られている薬剤耐性因子は R(SM), R(TC), R(TC・CM・SM・SA), R(TC・CM・SA), R(CM・SM・SA), R(TC・CM), R(SM・SA), R(CM), R(TC・SM), R(TC・CM・SM), R(CM・SA), R(SA) である。

人体よりの分離菌の場合にはその先祖の菌が何時か何等かの機会に薬剤に接触した可能性がある。

(例えば SM の治療を受けた人から SM:SA 耐性菌が検出されたとしても、その菌の先祖は SA の治療に遭遇し SA 耐性を獲得して生き延びた菌だったかも知れない。)しかし教室に長く保存された菌株ではその可能性は少くない。我々の実験の結果は試験管内で耐性を獲得した教室保存菌の streptomycin 耐性株においても少くとも SM 耐性と SA 耐性の間には密接な関係があることを示している。

PC に対して 2 株の SM 耐性菌が極度に強い感受性(原株の約200倍)を獲得した。だが残りの SM 耐性菌は PC に対して感受性を増していない。この理由について現在検討中であるがこれも collateral sensitivity かも知れない。

V 結 論

1) 試験管内で streptomycin に耐性を獲得した教室保存の大腸菌は Müller-Hinton 培地において18株中4株(約20%)が sulfa 剤に対する耐性を併わせて獲得した。

2) Tetracycline, Chloramphenicol に対して同時に耐性を示した菌は1例も認められなかつた。

3) その18株の streptomycin 耐性菌のうち2株が penicillin に対して強い感受性を示した。この理由については現在検討中である。

稿を終わるに臨み、恩師村上栄教授の御指導を感謝致します。

- 17, 503~508, 昭和37年.
- 5) 落合国太郎, 山中敏樹, 内藤晶之助: 赤痢菌の抗生物質耐性と Sulfa 剤耐性ととの関連性. 臨床内科小児科, 15, 555, 昭和35年.
- 6) 渡辺 力, 深沢俊夫: 腸内細菌のエピゾーム性耐性因子. 第5報 耐性伝達の本体. 医学と生物学, 56, 201~205, 昭和35年.
- 7) Jacob, F. Woliman, E. L.: Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C. R. Acad. Sci.,

- Paris, 247, 154.
- 8) 吉川晶之助, 秋葉朝一郎: 細菌の耐性伝達の機序と耐性の機構. 第15報 耐性伝達の分離について 医学と生物学, 62, 127~129, 昭和37年.
- 9) 原田賢治, 亀田三男, 鈴木ミツエ, 三橋 進: 腸内細菌の薬剤耐性に関する研究. 第13報 伝達性ある4剤耐性菌の耐性因子の自然喪失による感性化について 日本細菌学雑誌, 17, 112~114, 昭和37年.
- 10) 本多忠衛, 厚海亀三郎, 森村正東, 田中三重郎, 高橋正雄, 柿沼義包, 橋本 一, 原田賢治, 三橋 進: 腸内細菌の薬剤耐性に関する研究.
- 10) 薬剤耐性大腸菌の調査について. 日本細菌学雑誌, 17, 1~3, 昭和37年.
- 11) 木村貞夫, 福島敏雄, 秋葉朝一郎: 薬剤耐性大腸菌の分布に関する研究. 第2報 日本伝染病学会雑誌, 35, 614, 昭和36年.
- 12) 中沢昭三, 山本泰子, 楠原 豊, 大橋令三, 小田正夫: 赤痢菌の重耐性並に交叉耐性. 日本化学療法学会雑誌, 9, 346~349, 昭和36年.
- 13) 三橋 進: 腸内細菌の薬剤耐性とその遺伝. 科学, 30, 928~933 (1960年).
- 14) 三橋 進: 伝達性ある薬剤耐性因子 (R) について 蛋白質核酸酵素, 8, 216~228, 昭和38年.
- 15) Szybalski, W. Bryson, V.: Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. J. Bacteriol., 64, 489~499, '52.

**Studies on the Sensitivities for other Antibacterial Agents of
Escherichia coli, which Acquired Streptomycin Resistance in Vitro.**

By

Akira. YAMAGAMI,
Nobuko. ARAKI,
Masakazu. YAMAMOTO.,
Yoshiro. TANAKA.,

Department of Microbiology, OKAYAMA-University Medical School.

(Director: Prof. M. D. Sakae. MURAKAMI.)

- 1) Of 18 strains of *Escherichia coli*, which acquired Streptomycin resistance in vitro, 4 strains acquired Sulfanilamide resistance simultaneously in contamination with Streptomycin.
- 2) But no Chloramphenicol nor tetracycline resistant bacteria is observed.
- 3) 2 strains of the 18 Streptomycin resistant strains, acquired severe Penicillin sensitivity. On the reasons, authors are researching now. It may be phenomenon of "Collateral Sensitivity (SZYBALSKI)".
-