

2 サルファ剤耐性赤痢菌に対する化學療法について

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
北海道立衛生研究所 技師 飯田 広夫
同 中村 豊

1. 昭和 26 年度並びに 27 年度に於て、北海道各地より分離された赤痢菌の Sulfa 耐性試験

Sulfa 剤耐性赤痢菌の化學療法に関する研究を行うに當つて、先ずかかる Sulfa 剤耐性赤痢菌が實際の流行からどの程度分離されるかを確めようと考え、昭和 26 年度及び 27 年度に於て北海道各地から分離された赤痢菌株を集め、その菌型を決定するとともに一部は菌の Sulfa 耐性試験を行つた。

方法：培地としては次の如き組成を有する合成培地（落合氏による）を用いた。

Na ₂ HPO ₄	2.5 gr	Glutamic acid	0.5 gr.
KH ₂ PO ₄	0.25 "	Asparagin	0.5 "
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.1 "	Tryptophan	0.01 "
NaCl	5.0 "	Nicotinic acid	0.02 "
Glucose	1.0 "		

以上を 1000 c.c. の蒸溜水に溶解せしめ NaOH 以てその pH を 7.4 とする。

Sulfa 耐性試験に用いた Sulfa 剤は Sulfathiazol で、これを上記の合成培地に夫々 100 mg %, 10 mg %, 1 mg % の割合に溶解せしめた。

以上の培地を夫々 5 c.c. 宛試験管に分注し、100°C. 30 分間 3 回滅菌してから使用に供した。

先ず普通寒天斜面に分離された赤痢菌を更に新しい普通寒天斜面にうえて 37°C. 20 時間培養し、これを薬剤を含まない上記の合成培地にうえる。37°C. 20 時間培養後、再びその一白金耳を取つて薬剤を含まない合成培地にうえる。37°C. 20 時間後これに増殖したもののみを各濃度の Sulfathiazol 加培地に一白金耳宛移植してフラン器に收め、5 日間觀察して菌の増殖の有無を見た。

成績：第 1 表にこの結果をまとめて示した。この表によつて見ると、北海道に於て分離された赤痢菌の中にはかなりの Sulfa 耐性菌が存在する。そして最も Sulfa 耐性株の現われ易いのは Sh. Flex. 2a であり、Sh. Flex. 3a これに次ぐ。この傾向は他の地方に於て報告されているのと略一致している。また昭和 26 年度に於けるよりも昭和 27 年度に於ては Sulfa 耐性株の出現率が高くなつて來ている。

2. 薬物の併用療法による耐性菌出現の阻止に関する實驗的研究

前述の如く最近の赤痢の流行からは多数の Sulfa 耐性株が分離される。然らばこの様な薬物耐性菌の出現を防ぐには如何にすべきであろうか。その一つの方法として薬物の併用ということに着目し、これが耐性菌の出現阻止に有効なるか否かを試験管内に於て調べて見た。

方法：培地としては PH 7.4 の普通ブイヨンを用い、薬物としては Streptomycin 及び Sulfa-

第1表 分離株の Sulfa 耐性試験

菌型	昭和26年					昭和27年				
	>100 mg%	100~10mg	10~1mg	<1mg	計	>100 mg%	100~10mg	10~1mg	<1mg	計
Sulfathiazol										
Sh. Flex. 1a	-	-	-	-	-	3	2	-	-	5
" " 1b	-	9	1	4	14	1	18	-	-	19
" " 2a	25	6	5	2	38	102	20	2	3	127
" " 2b	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
" " 3a	2	17	12	28	59	14	17	1	13	45
" " 4a	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
" " X	-	-	-	-	-	1	4	-	1	6
" " Y	-	-	-	-	-	3	1	-	1	5
Sh. sonnei	-	-	-	-	-	7	-	1	1	9
計	27	32	18	35	112	131	63	4	19	217

thiazol を選んだ。即ち種々の量に Sulfathiazol を加えた培地と、これを全く含まない培地とに Streptomycin を漸次增量して添加し、Streptomycin に対する菌の耐性獲得の過程を調べて見た。これは Streptomycin が現在知られている抗生物質の中では最も菌の耐性獲得が速かであり、この実験の目的に好都合であると考えたからである。

菌としては Escherichia coli communis 及び Shigella Flexineri, Type 1b を用いた。

成績：先ずブイヨン培地に於ける E. coli 及び Sh. Flex. 1b の Sulfathiazol 並びに Streptomycin に対する感受性を調べて見た。即ちこの両菌の 37°C. 24 時間ブイヨン培養を一白金耳宛とり、種種の濃度に Sulfathiazol 及び Streptomycin を添加したブイヨンにうえて再び 37°C. に培養し、48 時間後の菌の増殖の有無を見た。その結果は第2表及び第3表に示してある。

第2表 Sulfa 耐性試験

菌	Sulfathiazol	100mg%	75mg	50mg	25mg	10mg	5mg
E. coli	+	+	+	+	+	+	+
Sh. Flex. 1b	+	+	+	+	+	+	+

第3表 Streptomycin 耐性試験

菌	Streptomycin	10r/cc	5r	1r	0.5r	0.1r	0.05r
E. coli	-	+	+	+	+	+	+
Sh. Flex. 1b	-	+	+	+	+	+	+

そこでこの E. coli 及び Sh. Flex. 1b. を次のような組合せの薬物加ブイヨンに植え継ぎ、菌の Streptomycin 耐性がどのように上昇していくかを調べてみた。

- 1° Sulfathiazol 100mg% + Streptomycin
- 2° Sulfathiazol 50mg% + Streptomycin
- 3° Sulfathiazol 25mg% + Streptomycin
- 4° Streptomycin のみ

添加する Streptomycin の量は、0.5r/cc より始めて 1r, 2.5r, 5r, 7.5r, 10r, 25r, 50r, 75r,

100r … と漸次継代培養を重ねると共に増量して行き、菌の増殖の見られない場合には同じ量で培養を繰返した。培養は 37°C. 48 時間とし、これから一白金耳を取つて次の代にうえた。

[A] E. coli の場合

この菌の場合には、普通ブイヨン及び Sulfathiazol を 25 mg % に添加したブイヨンでは Streptomycin 5r/cc まで菌は増殖し得るが Sulfathiazol を 100mg% 及び 50mg% に加えた場合には 1r/cc まで菌の増殖が見られ、5r/cc では増殖し得なかつた。Streptomycin の濃度を次第に増して行くと、これのみを加えた場合には菌は速かに Streptomycin 耐性を獲得し、10 代の継代培養で 500r/cc にも増殖し得るようになつたが、Sulfathiazol を 100mg% に加えた場合は僅かに 5r/cc, 50mg% 及び 25mg% に加えた場合には 10r/cc に増殖し得るにすぎなかつた。即ち Streptomycin を単独で菌に作用させた場合よりも、これと Sulfathiazol を併用して作用させた場合の方が Streptomycin 耐性株は遙かに出来難いことが知られたのである。そして併用する薬物の濃度の高い程、耐性株の出現はより著明に阻止される。これは第4表に示されている。

第 4 表 E. coli の Streptomycin 耐性獲得の過程

Sulfathiazol	継代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100mg%	1r/cc	1	1	1	2.5	2.5	2.5	5	5	5	5
50mg%	1	2.5	5	5	5	5	5	7.5	10	10	10
25mg%	5	5	7.5	7.5	7.5	7.5	10	10	10	10	10
0mg%	5	10	20	30	50	75	100	250	500	500	500

[B] Sh. Flex. 1b の場合

この場合にも E. coli の場合と略々同様の結果が得られた。即ち Streptomycin を単独で菌に作用させた場合には菌の Streptomycin 耐性は著明に上昇し、10 代目には 100r/cc にも増殖し得るようになつた。これに反して Sulfathiazol を 100mg%, 50mg% 及び 25mg% に添加した場合には 0.5r/cc の Streptomycin を加えると 1 代では菌の増殖が認められるが、これを再び同じ 0.5r/cc の Streptomycin 添加培地にうえても菌の増殖は認められなくなつてしまう。即ち 0.5r/cc の Streptomycin 耐性より以上の耐性を示す菌が現れないものである。

要するに E. coli の場合にもまた Sh. Flex. 1b の場合にも、単独では菌の増殖を阻止し得ない位の濃度に加えられた Sulfathiazol は、同時に加えられた Streptomycin に対して菌が耐性を獲得することを著明に抑制することが明らかにされたわけである。これは試験管内に於ける実験であつて、生体内に於ては更に種々の因子が菌の耐性獲得と関連を持つてくるものと考えられ、この結果を直ちに生体内の場合に適応することは出来ないにしても、二種以上の薬物を併用することにより臨床的にもある程度までは個々の薬物に対する耐性菌の出現を阻止し得るのではないかという推測がなされ得るものと考える。

3. 耐性菌の生物学的並びに血清學的性状に関する實驗

上述の実験に於て得られた E. coli 及び Sh. Flex. 1b の Streptomycin 耐性株は、もとの感受性株と生物学的並びに血清學的に何等かの異なる性状を示すであろうか。例えば山田¹⁾等は黄色アド

一球菌の Penicillin 耐性株について、また浜田²⁾は Pencillin に耐性を得た *Pneumococcus*について、これがもとの菌とは異つた血清学的性状を有するようになることを明らかにし、また飯田^{3) 4)}は Sulfanilamide に耐性を得た *E. coli* がもとの菌と比べて著しい糖分解能、インドール産生能の低下を示すことを報告している。

Streptomycin 耐性株についてもこれと同様のことが見られるであろうか、これを調べるために次のような実験を行つた。

方法：用いた菌は *E. coli communis* の正常株と *Streptomycin* 耐性株 (500r/cc に増殖し得るもの) 及び *Sh. Flex. 1b* の正常株と *Streptomycin* 耐性株 (100r/cc に増殖し得るもの) である。これ等の菌の形態、染色性、集落の性状等を検し、更にこれを各種の炭水化物を含む 1%ペプトン水にうえてその炭水化物分解による酸生成及びガス発生を見た。またこれ等の菌によるインドール産生能の有無をも見た。更に *Sh. Flex. 1b* についてはこの *Streptomycin* 耐性株と正常株の間に、免疫血清による凝集性の差が見られるかどうかをも調べて見た。

成績

(A) 生物學的性状

1) 菌の形態並びに染色性……*E. coli* に於てもまた *Sh. Flex. 1b* に於ても、菌の形態は *Streptomycin* 耐性株が正常株に比べてやゝ細長く、中に連鎖を作るものも見られた。この連鎖形成の傾向は特に耐性獲得の初期に於て著明である。共に Gram 陰性で、染色性には耐性株と正常株の間に差が見られなかつた。

2) 集落の性状……*E. coli* に於てもまた *Sh. Flex. 1b* に於ても、集落の大きさは *Streptomycin* 耐性株が正常株に比べて一般に小さく、幾分 R型への変異を示すものが多かつた。

3) 炭水化物分解能……第5表にその結果を示してある。これは 37°C. 48 時間後の結果であるが、24 時間後の観察では耐性株による炭水化物分解はやゝ正常株のそれに比して遅れる傾向が見られた。然しその差異はあまり顕著なものとは思われなかつた。

第 5 表 耐性株と正常株の炭水化物分解

炭水化物		グルコ	マロト	キシロ	ガラクト	レブロ	ラクト	サツカロ	アラビノ	ラムノ	マンニ	ソルビ	ゾルチ	ザリ	デキスト	グリセ
菌	株	一	一	一	一	一	一	一	一	一	一	一	一	シ	トリン	リ
<i>E. coli</i>	耐性株	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	・	⊕	⊕	⊕	・	・	・	・	・
	正常株	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	・	⊕	⊕	⊕	⊕	・	・	・	・
<i>Sh. Flex. 1b</i>	耐性株	○	・	・	○	○	・	・	○	・	○	・	・	・	・	・
	正常株	○	・	・	○	○	・	・	○	・	○	・	・	・	・	・

註：・変化なし ○酸生成のみ ⊕酸及びガス产生

4) インドール産生能……*E. coli* に於ても *Sh. Flex. 1b* に於ても耐性株と正常株の間にインドール産生能の有無に関して差異は見出せなかつた。即ち *E. coli* では 37°C. 24 時間で耐性株、正常株共にインドール産生陽性であり、*Sh. Flex. 1b* では両株ともに陰性であつた。

(B) 血清學的性状

Sh. Flex. 1b の正常株並びに Streptomycin 耐性株について、その免疫血清による凝集性に差異が見られるかどうかを調べて見た。凝集素血清は Sh. Flex. 1b (正常株) を以て家兎を免疫して得た。第6表にこの成績を示してある。

第6表 耐性株と正常株の凝集反応

菌株	血清稀釈	100×	200	400	800	1600	3200	6400	12800	対 (NaCl)
正 常 株	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
耐 性 株	++	++	++	++	++	+	-	-	-	•

即ち耐性株と正常株の間に凝集性の差異を見出すことは出来なかつた。

結 論

1 昭和26年度並びに27年度に於て北海道各地より分離された赤痢菌の Sulfathiazol に対する感受性を調べた。その結果 100mg% 以上の耐性菌は昭和26年度に24%, 27年度に60%と上昇の傾向が認められた。

2 菌型との関係では、Sh. Flex. 2a が最も耐性になり易く、Sh. Flex. 3a がこれに次ぐ様である。

3 Escherichia coli communis 及び Shigella Flexneri 1b を用いて薬物の併用が耐性菌出現に及ぼす影響を調べた。その結果、菌の増殖を阻止しない程度の量の Sulfathiazol の添加が菌の Streptomycin 耐性獲得を著明に抑制することを試験管内に於て明らかにし得た。

4 E. coli 及び Sh. Flex. 1b について、その Streptomycin 耐性株と正常株との間に何等かの生物学的性状の差異が認められるか否かを調べた。その結果、何れも耐性株に於て菌の形態が細長く連鎖を形成する傾向が見られたが、炭水化物の分解、インドール産生能には著明な差異を見出しえなかつた。

5 Sh. Flex. 1b の Streptomycin 耐性株と正常株との間には、免疫血清による凝集性の差異は見出しえなかつた。

なほ本研究は厚生科学研究所によるものであり、昭和28年4月、日本伝染病学会に発表した。

文 献

1. 山田守英・米沢富也・永井竜夫：北海道医学雑誌、25. 8, 1950, 419
2. 浜田元与：北海道医学雑誌、26, 1951, 150
3. 飯田広夫：北海道医学雑誌、27. 1, 1951, 1 及び27. 2, 1952, 1
4. 飯田広夫：北海道立衛生研究所所報、第2集、1951, 61