細菌の石炭酸耐性についての研究 (1)

石炭酸耐性株の生物学的性状

日本医科大学衛生学教室 (主任: 八田貞義教授指導)

西 田 義 春

Yoshiharu Nishida

(この論文の内容の一部は第 8 回日本公衆衛生学会で公表された)

ま え が き

スルホンアミドを始めとして近年急速に現れた細菌に対する化学療法剤は、いずれもその出現の初期にはすばらしい治療効果を収めながら時日の経過とともに多くは治効の低下を示している。この原因の大きな部分を占めるのは病原菌がその薬物に対して抵抗性を得るためとみられ、すでに今日までスルホンアミド、ペニシリン及びストレプトマイシンについては基礎的にも臨床的にも多数の耐性についての報告が行われている。

臨床的に得られた耐性株はさておき、実験的に薬物に接触させてできた耐性株はその原株に比べて形態、生物学的性状、栄養要求度及び菌力にそれぞれある程度の変化を生ずる。これは薬物との長期接触によって、菌の酵素反応系が変形し、菌の攻撃点をなくし、それによつて自体の生命を保持しようとする防衛機構の表現ともみることができる。

ひるがえつてこれらの化学療法剤とは逆に、菌に対する直接的な殺滅作用(殺菌作用)を主体とする殺菌剤では耐性の様相はどのようなものであろうか。もともと殺菌剤の働きは菌体構成要素と直接結合してこれを変質させるといふ、いわば物理化学的な反応機構が主体をなし、酵素反応を阻害する働きは従属的なものであるだけに耐性の生成はきわめて困難であることが予想される。しかしこれまでたとえば Altman & Rauth (1915)¹⁾, Abbott (1912), Rengestein (1913)らの研究者が実験しているように石炭酸、昇汞、硝酸銀その他の殺菌剤に対しても菌はある程度の耐性を得ているようである。

それならば殺菌剤に対する耐性と化学療法剤に対する耐性との間には何等かの差があるであろうか。この問題に対してはおそらく誰も現在では正確な答えを与

えることができないはずである。それは化学療法剤耐性については耐性変異のくわしい記載があるにもかかわらず、殺菌剤のそれについてはきわめて研究が少ないからである。それで著者は殺菌剤の標準になる石炭酸に対する耐性獲得の状況、各種性状の変化の様相を追究してみた。以下に報告するのは、その中生物学的性状の変異についての成績である。

I 実験の方法

a. 使用した菌株 実験に使用した菌株は黄色ブドウ球菌 寺島株、食中 1 株、P-8 株の 3 株、大腸菌(阿木株、松田株)の 2 株 計 5 株である。この中食中 I 株、P-8 株は国立衛生試験所鈴木昭技官より、他の 3 株は同所桑原技官より分興を受けたものである。各菌株は肉汁寒天斜面に $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 ± 2 時間培養後、 $5 \sim 7^\circ\text{C}$ に保存、1 週 1 回ずつ継代した。使用に当つては乳糖—B.T.B.寒天平板に $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $18 \sim 20$ 時間培養し、定型的な集落を拾つて再び肉汁寒天斜面に 37°C , $18 \sim 20$ 時間培養し、これから移植菌液をつくつた。

b. 使用した薬剤

1. 石炭酸 化学用 1 級石炭酸を再留したものを使用した。

2. スルファチアゾール(ST), ペニシリンG(P), 硫酸ストレプトマイシン(SM), クロラムフェニコール(CM), テラマイシン(TM),

前 2 者は武田製の粉末を、後 3 者はいずれも標準粉末を使用した。

c. 実験の方法

1. 耐性株作製の方法 普通ブイヨンに石炭酸を 100 倍、200 倍、300 倍……1,000 倍、1,200 倍に加え、小試験管に 3 cc ずつ分注、 100°C , 30 分、3 回間歇滅菌する。この 1 系列に a. の寒天斜面菌苔生理食塩液浮游液 (10 cc につき 1 白金耳) を 1 白金耳ずつ移植、 37°C , 48 時間培養し、混濁を認めた試験管の中

で石炭酸の濃度の最も高いものから次の同じ系列に 1 白金耳ずつ継代する。これを数十代に亘って行つた結果、いずれの株にもわずかながら耐性の出現を認めた。耐性株は常に石炭酸を含む培地に継代して耐性の保持に努めた。又対照の原株は石炭酸を含まないブイオンに同じ速度で継代を行つた。以下感性株を S-、耐性株を R- で示し終りに継代数を数字で示すことにする。

2. 生物学的性状 生物学的性状の検査には、検査しようとする代の石炭酸ブイオンからドリガルスキー平板に移植し、これから釣菌した集落を用いた。

II 実験の成績

a. 石炭酸の培養による抗菌作用

ブイオンを用いて測つた各菌株の石炭酸に対する感受性は第 1 表に示す通りである。すなわち黄色ブドウ球菌の 3 株の中、寺島株は培養 1 週間に亘り、500 倍の石炭酸で完全に発育を阻止され、600 倍でわずかな発育を、700~800 倍では中等度の阻害を受ける。これに対し P-8、食中 I の両株は 400 倍では完全に発育を阻止されるが 500 倍ではわずかながら増殖を示す。大腸菌の 2 株はいずれも感受性は 400 倍であり、500 倍では辛うじて目に見える混濁を示した。

第 1 表 ブイオンで測つた石炭酸の増殖阻止作用

石炭酸希釈 倍数	菌種 培養日	ブドウ球菌												大腸菌		
		寺島			P 8			食中 I			阿木					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	500	—	—	—	—	+	+	+	+	+	±	±	±	—		
	600	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	800	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	1,200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		

(松田株は阿木株と同じ)

b. 耐性獲得の経過

各菌株の耐性獲得の経過は第 2 図に示してある。寺島株は 14 代まで感受性は変りがなかつたが 8 代頃か

第 2 表 石炭酸耐性のできる経過

ら 600 倍石炭酸ブイオンでの発育はめだつて良好になり、15 代で 400 倍、34 代で 300 倍となり、80 代まで変りがなく、食中 I、阿木、松田 3 株は同一の経過をとり初代 400 倍から、8 代 300 倍となり、食中 I 株だけが 63 代で 200 倍になつたが、他は 300 倍に止つてゐる。P-8 株は 56 代まで感受性の変りがなく、57 代で 300 倍となつて 80 代まで変りがなく。

c. 感性株と耐性株の細胞感受性の分布

各菌株の感性株と耐性株の細胞感受性の分布を平板混濁培養によつて測定した結果が第 3 表に示されている(食中 I、松田は阿木と大体同じであつたので省略した)。これをみるとまず原料の細胞の感受性分布の程度は各菌株を通じてほとんど同じで、1,000 倍感受性の細胞は全細胞数の 65~80%，700 倍では急速に割合が増して 99.9% 以上が感受性となる。しかし寺島株では 600 倍抵抗性の細胞は 100 万箇中 65~30、500 倍抵抗性の細胞はわずか 0.05 であるのに対し、P-8、阿木両株では 500 倍抵抗性の細胞は 100 万箇中数十箇あり、その感受性の分布は大体抗菌価の成績と平行している。

これに対し耐性株では各段階の石炭酸に抵抗する細胞数は著明に増加している。たとえば寺島-R-53 では原株では認められなかつた 400 倍抵抗細胞が 8% に認められ、300 倍に抵抗するものも $3/10^8$ 程度出現している。又 P-8-R-30 は感受性値だけから見ると原株と同じであるが、500 倍に耐える細胞数は原株の 100 倍以上になつており、少ないながら耐性化の傾向を示している。

d. 石炭酸の感性株及び耐性株に対する殺菌力

次に大腸菌阿木株の感性株と耐性株を用い石炭酸の両者に対する殺菌力を比較してみた。すなわち石炭酸係数を求める日公法に準じ各濃度の石炭酸溶液に感性株及び耐性株のブイオン培養 1 白金耳量を入れ、一定時間後にブイオンに後培養して増殖の有無を検査し

第3表 各菌株細胞の石炭酸耐性度の分布

菌株 石炭酸 % 酸	寺 島		P 8		阿 木	
	原 株	耐 性 株	原 株	耐 性 株	原 株	耐 性 株
0	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000
0.10	281~236,000	1,000,000	216~162,000	1,000,000	312~218,000	1,000,000
0.14	160~100	790,000	1,300~4,000	890,000	5,000~8,000	680,000
0.167	65~30	580,000	100~200	630,000	710~1,000	590,000
0.20	0.05	520,000	18~20	3,000~5,000	63~80	430,000
0.25	0	81,000	0	0	0	105,000
0.33	0	0.03	0	0	0	0.05

(数字は細胞 100 万個に対する耐性細胞の個数分布を示す)

第4表 耐性株に対する石炭酸の殺菌作用
使用菌株 阿木株 (実験方法は日公法に準ず)

菌株 石炭酸 希釈 倍数	作用時 間 (分)	原 株 耐 性 (石炭酸非接触)				耐性株(石炭酸接触)			
		5	10	15	20	5	10	15	20
70	—	—	—	—	—	—	—	—	—
80	+	—	—	—	—	+	+	—	—
90	+	—	—	—	—	+	+	+	—
100	+	+	—	—	—	+	+	+	—

た。実験の結果は第4表に示した通りである。すなわち感性株及び石炭酸なしの寒天培地を経過した耐性株には石炭酸は同じ殺菌力を示すのに、石炭酸ブイオンから直接石炭酸溶液に菌を加えた場合はいくらか殺菌力の低下が見られた。この際前に培養する石炭酸ブイオンの石炭酸濃度は400倍でも1,000倍でも成績に変わらない点が注目された。

e. 各菌株の他の薬剤に対する感受性について

5株の原株その耐性株の上記5種の薬剤に対する感

第5表 耐性株の抗生物質感受性

菌	株	ST	P	SM	CM	TM
寺島	原株	15.0	0.05	2.0	10.0	10.0
	耐性株	20.0	0.1	5.0	10.0	10.0
P 8	原株	10.0	0.1	5.0	10.0	10.0
	耐性株	15.0	0.2	10.0	10.0	10.0
食中Ⅰ	原株	10.0	0.1	5.0	10.0	10.0
	耐性株	10.0	0.5	10.0	10.0	10.0
阿木	原株	5.0	—	2.0	2.0	5.0
	耐性株	10.0	—	2.0	2.0	5.0
松田	原株	5.0	—	2.0	2.0	5.0
	耐性株	10.0	—	2.0	2.0	5.0

数字は培養 48 時間の感受性を r/cc で示す

受性は第5表に示してある。スルファチアゾール試験には半合成培地 (KH₂PO₄ 4.5 g, NaCl 5.0 g, MgSO₄ 7 H₂O 0.1 g, ブドウ糖 1.0 g, カゼインアミノ酸 5.0 g, サイアミン 1 mg, ニコチン酸 1 mg, 再蒸留水 1 l; pH 7.0), その他の薬物はブイオンを、又テラマイシンでは濾過滅菌を、他は培地に加えてから加熱滅菌を行つた。表からわかるように5菌株とも ST, P, SM に対してはわずかながら抵抗性の上昇を示し, CM, TM には感受性の変化を示さなかつた。

f. 耐性株の示す生物学的性状

各菌株の 70~80 代耐性株について各種生物学的性状を検査した。その結果は大体次の通りである。

1) 形状: 各菌株とも共通して形の膨大と、染色性の低下を示している。しかし化学療法剤耐性菌にみられるような菌体内の濃染部の発現は見られず、グラム染色性の変化も起らなかつた。

2) 集落: 黄色ブドウ球菌3株はほとんど寒天平板上の集落の外観には変りがなく色素産生も原株と同じであつた。これに対して大腸菌株では集落は正半球状であるが原株に比しいちじるしく灰白色不透明となり、表面が湿润光沢性になつた。硬さには変りがない。

3) ブイオンにおける発育: 大腸菌耐性株はブイオン中できわめて粘稠な沈澱をつくる。黄色ブドウ球菌の中では食中 I-R 株はブイオン中で沈澱をつくらず平等な発育をするようになった。石炭酸を含まないブイオン中では耐性株の発育量、発育速度は感性株と全く同じである。400 倍石炭酸を含むブイオンでは発育速度、最大発育量ともに感性株に劣っている。

4) 糖分解作用: すべての性状の中で糖分解度作用は最もばげしい変化を示した。すなわち R-60 以後すべて糖分解作用が陰性化した。

5) その他の性状：黄色ブドウ球菌の3株の耐性株は食塩耐性、血漿凝固作用、溶血作用には著変は認められなかつた。ゼラチン液化作用、インドール産生、硝酸塩還元作用は全耐性株とも変りがなかつた。

考 え 方

細菌の殺菌剤耐性についての研究はきわめて古い。Altman & Rauth (1910)³¹ は大腸菌群の中に石炭酸に対する抵抗性の菌株のあることを示した。Abbott (1912) は通常昇温の 1,000 倍液中で 5 分で死滅する化膿球菌群に 20 分接触によつても死滅しない株のあることを示した。Regenstein (1913)³² は黄色ブドウ球菌、大腸菌、腸チフス菌を、殺菌剤を加えたブイオンに連続培養し、最初よりも高い濃度の薬剤含有培地にはえるように菌を変異させることに成功した。Meader & Feirer (1926)³³ もまた各種殺菌剤に対する耐性株を人工的につくり、その耐性が薬剤特異的であることを実証している。

1) 耐性上昇の速度：耐性上昇の速度は著者の実験では全株ともにきわめておそく、80 代以上の継代によつても 2 倍以下の耐性上昇しか示していない。これまで石炭酸に対する耐性獲得の速度については詳しい記載がないが、Meader & Feirer (1926) が大腸菌 3 株、腸チフス菌 1 株、*B. lactis aerogenes* 1 株について行つた実験でも耐性上昇は 2 倍以下に止つている。はじめに触れたように石炭酸の細菌に対する作用が全く理化学的であれば菌がそれに順応する余地は全然ないはずであるが、この実験からみてきわめて部分的ながら酵素阻害的要素がありそれが耐性上昇の原因となつてゐるものと解されよう。

2) 形態の変化：形態の変化はスルホンアミド剤以外の各種抗生物質に対する人工的耐性株に広く認められている変化 (Klimek Cavallits & Bailey, 1948³⁴; 鉢原, 1951³⁵; 井上, 1952³⁶; 中塚及荒谷, 1951³⁷; 鶴谷, 1952³⁸) と本質的に異なるものではない。これらの薬剤耐性株に見られる変化は常に巨大型の生成と染色性の減退であり、菌の分裂機能の低下とそれに伴う細胞の老化現象と推定される。又その強度はあまり強いものではなく、ペニシリンの場合よりは軽微に止つている点が注目された。

3) 細胞感受性の分布について：各菌株とも原株では 0.1% 石炭酸に耐える細胞は全長の 30% 内外に過ぎず 0.2% (500 倍) に耐える細胞は $1/10^8$ のオーダーで認められるに過ぎない。しかし 0.25% 石炭酸に耐えるようになった耐性株では菌の半数以上は 0.2%

石炭酸に耐え、0.33% 石炭酸に耐える個体が $1/10^8$ のオーダーで認められた。

Berger & Wyss (1953)³⁹ は耐性株を原株と同数ずつ同じブイオンにうえて培養するとはじめは同じ速度で両者が増殖するが次第に感受性個体が優勢になり耐性細胞は全菌数の 1% 以下になることを示した。彼らの実験では耐性株だけを単独に石炭酸なしのブイオンに培養するとその速度、発育量ともに感性株と差がないのであるから耐性個体は健全な感性個体に比し何らかの異常性状をもち石炭酸の存在下では感性個体がないために増殖できても、これと共存すれば圧倒されると考えねばならない。 $1/10^8$ という数字は丁度正常細菌群の変異の発生割合に相当しているが、仮にこれらの変異個体が発生したとしても当然正常細胞と対抗することができず、従つて数を増すことはないが石炭酸の存在下ではこれらが正常細胞に代つて増殖し、更に高度の変異を誘発すると思われる。

4) 耐性株に対する石炭酸の殺菌力：この実験では培養による石炭酸耐性株を主体としたのでこの意味の耐性株が石炭酸の直接殺菌力に対して原株といかなる差を示すかは興味ある問題である。ところが実験の結果は石炭酸なしの培地で培養された菌は殺菌力に対して原株と全く同じ態度を示したのに対し、石炭酸を含む培地から直接実験に供した場合には明かに殺菌作用に対して耐性を示した。念のため感性株を 700 倍石炭酸加ブイオンに培養し、この菌に対する石炭酸の作用をしらべてみたが、これは原株と全く差がなかつた。この結果からみれば、培養における耐性株は石炭酸からうける酵素阻害に対して抵抗性を獲得してはいても、物理化学的殺菌機構については大して変動が起つていないと考へられる。しかし石炭酸耐性株も石炭酸なしの培地と石炭酸を含む培地とでは若干生活状態に差が見られ、その差が両者の被殺菌作用の程度の差となつてくると解釈される。

5) 他の化学療法剤との交叉耐性：石炭酸耐性株が他の殺菌剤と交叉耐性を示さないことは Meader & Feirer (1926) の研究にもみられるが、化学療法剤について知見がないので数種の抗生物質について試験を行つてみた。実験の結果、スルファチアゾール、ペニシリン、ストレプトマイシンにはやゝ抵抗性を示すが、クロラムフェニコール、テラマイシンに対しては抗菌力の変化は見られなかつた。このようにわずかながら交叉耐性の生ずることの原因は明かでないが、石炭酸、ペニシリンはいずれも -SH 基によつて反応阻害を生

ずるものであり、この場合の交叉耐性の原因もこの辺にあるのかもしれない。

6) 生物学的性状の変化：すでに Regenstein (1913) は石炭酸耐性株においてマンニット、しよ糖の分解能の遷延が認められることを実証したが、著者の実験株のすべては乳糖、ブドウ糖を含む大多数の糖分解能は全く陰性化した。糖分解能は多くの化学療法剤 (Bellamy & Klimek, 1948¹⁰⁾; Klimek Cavallito & Bailey, 1948; 榊原, 1950; 井上, 1952) にも認められたところであるが、石炭酸の場合には同じ現象がはるかに著明に現われた点が異っている。すべての糖分解能が全く陰性化した場合、栄養源の利用能力にはかなり大きな差が現われ、必須アミノ酸の種類も相当変化してくることが予想される。

む す び

著者は3株の黄色ブドウ球菌、2株の大腸菌を人工的に石炭酸耐性となしその性状を原株と比較し、次の結果を得た。

1) 各菌株ともブイヨン中で80代に亘り石炭酸と接触せしめても2倍以下の耐性上昇を示したに過ぎなかった。

2) 耐性株は菌形の膨大と染色性の低下を示した。

3) 耐性株の細胞感受性の分布は抵抗性の強い側に向つて一様にずれていた。

4) 耐性株は石炭酸なしの培地に継代すると石炭酸の殺菌作用に対して原株と同じ態度を示すが、石炭酸

を含む培地から直接試験に供すると殺菌作用に対しても抵抗性を示した。

5) 耐性株は原株に比し、スルファチアゾール、ペニシリン、ストレプトマイシンに対してはやゝ抵抗性を示したが、クロラムフェニコール、テラマイシンに対しては交叉耐性を示さなかった。

6) 生物学的性状のうち、糖分解作用は全株が耐性度の進行につれてほとんど消失した。

終りに御指導を賜つた恩師八田貞義教授に敬意を表し、御援助を受けた桑原博士に感謝する。

文 献

- 1) Altman u. Rauth : Ztschr. Immunität. Exp. Therap., **7**, 629 (1910)
- 2) Regenstein, H. : Zbl. Bakt. Parasit., Abt. I., Orig., **63**, 281-298 (1913)
- 3) Meader, P.D., & Feirer, W.A. : J. Inf. Dis., **39**, 237-249 (1926)
- 4) Klimek, J.W., Cavallito, C.J., & Bailey, J. H. : J. Bact., **55**(2), 139-145 (1948)
- 5) 榊原 : 医学と生物学, **18** (6), 336-339 (1951)
- 6) 井上 : 日医大誌, **19** (11), 52 (1952)
- 7) 中根, 荒谷 : J. Antibiot., **4** (3), 141-147 (1950)
- 8) 鶴谷 : 日医大誌, **19** (10), 29 (1952)
- 9) Berger, H., & Wyss, O. : J. Bact., **65** (1), 103-110 (1953)
- 10) Bellamy, W.D., & Klimek, J. W. : J. Bact., **55** (2), 153-160 (1948)