Staphylococcus に関する研究

第3報 Phenol-Hg₂Cl₂ に対する態度及び coagulase 作用について

真 野 大 二 ・ 川 上 勝

国立田辺病院 (院長 玉井 寿)

[受付: 7月17日・1961年]

緒 言

殺菌剤に関してはかなり古くから研究され作用機作は物理化学的であり、化学療法剤の作用は主として酵素阻害作用であることは周知のとおりである。Altman, Abbott 等は phenol, Hg₂Cl₂ について自然耐性菌の存在を記載し、次いで、Regenstein¹⁾, Berger & Wyss²⁾, 田中³⁾ 等は人工的につくつた Staphylococcus aureus の phenol 耐性菌における生物学的性状の変化を報告している。化学療法剤 (特に抗生物質) による Bacteria の薬剤耐性獲得の Mechanism, 栄養要求性の変化について Gladston⁴⁾, 秋葉, 桑原等の報告がある⁵⁾。著者等も Staphylococcus の Pc-SM 耐性株 (人工的耐性上昇) に関して耐性獲得の難易, 生物学的性状, Coagulase action 等について検討したが Strain によつてはかなり差異のあることを認めた⁶⁾。本報においてこれらの中より興味あると思われる Strain を選び phenol-Hg₂Cl₂ に対する感受性, 耐性獲得状態, Coagulase action について実験を行った。

実験方法

a) 使用した菌株: Staph. aureus FDA 209P 小児患者より分離し, Staph. 19, 31, 34, 36, 47株の計6種, Pc-SM 耐性株の計8種。

b) 薬剤: Phenol (一級), Hg₂Cl₂ の2種類。

c) 薬剤との接触: 薬剤は中性 Bouillon にて階段希釈し, これにそれぞれ Strain を最初は湿菌 2 mg を接種し 37°C 48hr 後に高濃度に発育した試験管の中より次の系列に 0.5ml 宛を移植し菌増殖による培地混濁を対照と比較し, 肉眼的にみて発育したものを順次高濃度に移し薬剤抵抗性の変化を観察した。

d) 血漿: 3.8% 滅菌クエン酸 Na 1 ml に人血 3 ml

の割で多数人より採血し, 1,500rpm 10min 遠沈し, 混合血漿を無菌的に使用した。

e) Coagulase 試験: 各 Strain は無食塩中性 2% pepton 水で 168hr 37°C に培養後 5,000rpm 10min 遠沈, その上清を使用した, 血漿は滅菌無食塩 2% Pepton 水で 5 倍より倍数希釈し, 0.5ml を小試験管に分注, 前記被験菌液 0.5ml 宛を追加し, 全量を 1 ml とし最終 pH 8.2 に止め 37°C 12hr 後に凝固の有無により判定した。

実験成績

1) Phenol に対する態度: 原株, SM 耐性, Pc 耐性株の初代感受性は 800~1,000 倍であつたが接触継代することにより Strain によつては 300 倍の濃度に増殖するようになった。すなわち原株の (図 I. に示すごとく) FDA 209P では 10 代でわずかに差がみられたのみである。これに対して 36.47 株は 8 代で急に上昇し 300 倍に発育することをみとめた。原株に比較して SM 耐性株の場合, 34 株が 300 倍に上昇し他の Strain においてはほぼ同様の傾向がみられた。さらに Pc 耐性株の 36 株は比較的変動がなく 700 倍の線に止まり上昇しなかつた。

(図 II. III)。

2) Hg₂Cl₂ に対する態度: 原株 SM 耐性, Pc 耐性株の初代感受性は Strain によつてさまざまである。すなわち原株の 15, 37, 47 株は 50 万倍であり, FDA 209P 31 株は 100 万倍であり, 36 株は 1,000 万倍であつた, (図 IV)。耐性上昇については 209P, 31 株は著明な変化

MANO Daiji and KAWAKAMI Masaru: Studies on the Staphylococcus. III. Acquisition in Phenol-Hg₂Cl₂ resistance of Staphylococcus and coagulase action. National Tanabe Hospital.— Jap. J. of Bact., 16(12)1080-1083, 1961.

図 I. Phenol に対する態度
Staph. parent strain

図 II. Phenol に対する態度
Staph. SM-1,000 γ /ml Mutant strain

図 III. Phenol に対する態度
Strain PC-1,000u/ml Mutant strain

図 の 説 明

○—○	19	Strain
●—●	31	"
○····○	34	"
△—△	36	"
●····●	47	"
×—×	209p	"

がなく, 19, 34, 36, 47株では 50 倍の耐性を獲得した。原株に比較して SM 耐性株の感受性はほぼ同様であり耐性上昇の場合も特別変化はみられなかった。しかし 36株では感受性が 50 倍の低下がみられた (図 V)。Pc 耐性株においても原株と比較して 19, 36 株の感受性, 耐性上昇はほぼ同様の傾向を示した。さらに 31 株についてみると感受性が 5 倍に上昇し 6 代で 50 倍の耐性上昇を示し

た (VI)。

3) Coagulase action: 表 I. に示すごとく Strain によつて Coagulase 産生能に差異がみられた。まず原株において 47 株の action がみられなかったが, 209p, 19, 31, 34, 36 株にはかなり強い Coagulase action を示した。次に phenol resistance strain でみれば 34, 36 株が陰性化した。また Hg₂Cl₂ resistance Strain においても同様に 34, 36 株が陰性化し, 31 株も完全に陰性化した。19 株は僅かに action が弱くなる傾向を示し, FDA 209P 株は Phenol-Hg₂Cl₂ のいずれに resistance した場合も Coagulase action に変化を示さなかった。

4) 糖分解能および NaCl に対する態度: Phenol, Hg₂Cl₂ resistance strain の Glucose, d-mannitol 分解性および 10% NaCl 加中性 Bouillon に対しての発育状態等については特に著明な変化はみられなかった。

図 IV. Hg_2Cl_2 に対する態度
Staph. parent strain

図 V. Hg_2Cl_2 に対する態度
SM-1,000 γ /ml mutant strain

図 VI. Hg_2Cl_2 に対する態度
PC-1,000u/ml mutant strain

考 接

Berger & Wyss²⁾ は Phenol 耐性 Staph. の Glucose および d-mannitol 分解能の消失を報告しており田中³⁾ は Hexachlorophene について耐性化した Staphylococcus 2 株には変化がないがチフスにおいて、2 種の糖分解の陰性化、4 種の糖分解陽性化という変化を示したことについて報告がある。かかる点著者等は本報において Staphylococcus の Phenol- Hg_2Cl_2 に対する感受性、耐性獲得状態を試みると同時に耐性化した Strain の Coa-

表 1. Coagulase action

Strain		稀釈倍数					
		37°C 12hr					
		5	10	20	40	80	Cont.
Parent	209 P	卅	卅	卅	+	+	—
	19	卅	卅	卅	卅	+	—
	31	卅	卅	卅	卅	+	—
	34	卅	卅	+	+	—	—
	36	卅	卅	卅	卅	+	—
	47	—	—	—	—	—	—
Phenol resistance	209 P	卅	卅	卅	+	+	—
	19	卅	卅	卅	卅	+	—
	31	卅	卅	卅	+	+	—
	34	—	—	—	—	—	—
	36	—	—	—	—	—	—
	47	—	—	—	—	—	—
Hg_2Cl_2 resistance	209 P	卅	卅	卅	+	+	—
	19	卅	卅	卅	+	—	—
	31	—	—	—	—	—	—
	34	—	—	—	—	—	—
	36	—	—	—	—	—	—
	47	—	—	—	—	—	—

註：卅 反応強度 凝固。卅 反応中等度凝固
+ 凝固を僅に認める。— 凝固しない。

gulase action を併せて検討するのも興味あるのではないかと考えた。まず Parent Strain 6, SM-resistance Strain 5-Pc-resistance Strain 3 の計 14 株は Phenol に

対する感受性が1,000~800倍のきわめて小範囲に限られているが、しかし Hg_2Cl_2 に対しては Strain によってかなり広範囲の幅がみられる。Phenol に対する耐性上昇過程については Parent Strain SM-PC resistance Strain とともに比較的同様の Curve で上昇するが Strain によっては差異があり、 Hg_2Cl_2 に対する耐性上昇においても同様の傾向がみられた。このことについては全く不明であるが、秋葉⁷⁾の報告のごとく各個の薬剤に対する Gene が Spontaneous mutation を起し易いか否かにより支配され Gene の数によって支配されているために起こる現象ではないかと想像している。Coagulase action は病原性判定の重要な指標となっており、感染および免疫について大きな意義を有する数多くの報告がある⁸⁾。今村⁹⁾等は血清学的立場から各種動物血漿の個体差による相違、殺菌剤による不活化、pH 域との関係、また NaCl, Glucose 等により抑制されるという細部にわたる報告があり、林¹⁰⁾は Strain によって Coagulase 作用にはなほだしい差異があるとの報告がある。著者等はこの事柄を考慮し、Parent Strain および Phenol- Hg_2Cl_2 resistance Strain の培養液について比較検討した場合(表 I)、に示したごとく Coagulase action が陰性化するという知見をえた。以上これらのことについて考察すれば薬剤のために菌の一部が阻害された変異株の増殖が起り代謝系に関係した作用属が欠けているのではないかと推論している。なお Parent Strain の培養液は酸性で不活化され、85°C の加熱により Coagulase action の低下が認められた。

結 論

Staphylococcus の Parent Strain, SM-PC resistance Strain について Phenol および Hg_2Cl_2 に対する Phase, Coagulase action について検討し次のごとき若干の知見をえた。

1) Parent Strain, SM-PC resistance Strain の Phenol に対する初代感受性は 800~1,000 倍の濃度であり、 Hg_2Cl_2 に対しては 50~1,000 万倍の広範囲であつた。

2) Phenol に対する耐性上昇については Strain によって 300 倍に上昇し、 Hg_2Cl_2 においては Strain により 1 万倍の濃度に上昇した。

3) Coagulase action については Phenol-resistance Strain 2 株が Negative になり、 Hg_2Cl_2 resistance Strain 3 株が Negative となつた。なお Parent Strain の培養液は酸性にすれば完全に不活化され、また加熱によって低下の傾向がみられた。

4) Glucose, d-mannitol 分解性、10% NaCl 抵抗性の Phase に関しては著明な変化がみられなかつた。

稿を終るにあたり終始御指導と御鞭撻並びに御校閲を賜つた。玉井 寿院長、麻殖生貞三郎副院長に深甚の謝意を表すると共に種々便宜を与えられた南寿平治氏に感謝致します。尙貴重な菌株の分与を受けました、岡山県衛生研究所 吉岡達治博士に衷心より深謝致します。

(本論文の要旨は昭和36年5月和歌山医学会総会(第24回)に於いて発表した)。

文 献

- 1) Regenstein, H.: Zbl. Bact. parasit, Abt. 1, Orig. 63: 281, 1913.
- 2) Berger, H., & Wyss, O.: J. Bact., 65: 103, 1953.
- 3) 田中淳二: 日本細菌学雑誌, 12, 4, 327, 1957.
- 4) Gladstone, G. P.: Brit. J. Exp. Path. 18, 322, 1937.
- 5) 秋葉・桑原: 最新医学, 9 (3), 7-271, 1954.
- 6) 真野・川上: 日本細菌学雑誌 (投稿中).
- 7) 秋葉朝一郎: 医学のあゆみ, 13, 5, 250, 1952.
- 8) Boake, W. C.: J. Immunol., 76, 89, 1956.
- 9) 今村 晋・他: 日本細菌学雑誌, 13, 11, 1017, 1958.
- 10) 林 道雄: 日本細菌学雑誌, 15, 12, 1250, 1960