薬剤耐性赤痢菌の生理学的研究

特に硝酸塩還元能と解糖能について

片山 胖・西谷 定一・水谷 孝昭

藤田 恒・安井 晃男

京都府立医科大学微生物学教室 (指導 鈴木成美教授)

中 沢 昭 三

京都薬科大学微生物学教室

[受付: 9 月 26 日・1960 年]

赤痢菌に対する抗生物質及び化学療法の進歩に伴って臨床に重要な問題となったのは、赤痢菌において特に耐性菌が多く、しかも早く出現し易いことであつた。この問題の克服の爲には、耐性菌の存在しない新しい薬剤の発見と、薬剤の合理的な使用法の研究が重要であるが、さらに、赤痢菌が何故耐性菌に変異しやすいかについて、興味ある幾多の業績が殊に日本の研究者によつて行われている。

それと共に重要なことは、薬剤耐性菌の耐性の機序がどういふものなのか、殊に多剤耐性菌の仕組みはどうなっているのか、多種類の薬剤に耐性となるためには、夫々の薬剤に対する細胞膜の透過性の変化、薬剤に対する拮抗物質の産生、どの薬剤によつても障害されない代謝経路の存在等、考えうる諸種の耐性機序の型が、どのようにくみ合わされているのか、一種類の薬剤ならばともかく、多種類の薬剤に対する、しかも高濃度の薬剤に対する耐性が、どうして可能なのかという疑問である。

我々は耐性菌の問題が、細菌が薬剤耐性への突然変異によつて薬剤耐性の gene を獲得し、その gene によつて耐性が維持伝達され、細菌細胞の Organization を支配して“耐性菌の耐性の性質”を発揮せしめているという説明だけで充分なものとは考え得ない。耐性の問題は、もっと具体的に、細菌細胞の生活過程の中で細菌の生理学的な諸性質が、抗菌物質に対抗して働いている姿を明確にしていくべきだと考えている¹⁾。我々はこれらの問題について、赤痢菌、大腸菌、葡萄球菌等を用いて研究中であるが、共同研究者の中沢が患者より分離した SM, TC, CP 高度耐性の赤痢菌の生物学的、免疫学的、形態学的研究の研究で、硝酸塩還元能が特に強いのを見

出した²⁾。

我々はこの菌を得て、腸内細菌において知られる好気的過程と、嫌気的過程への硝酸塩の関与の仕方³⁾から、赤痢菌の薬剤耐性と硝酸塩還元能或いは、嫌気的過程との間に、一般的な性質が存在し得るのか否か、また、耐性と、硝酸塩呼吸との相関々係がありうるのか、などの疑問をもつた。これらの問題を解明するために、1959年度の患者よりの新鮮分離株を用いて、赤痢菌の葡萄糖酸化能を、これに及ぼす硝酸塩の影響を検討した。ブドウ糖酸化能と硝酸還元能の測定には別に報告した Spot-test の方法を用いた^{4,5)}。

I. 実験材料及び方法

(1) 使用菌種:

患者より分離した赤痢菌を患者名をとり、夫々、荒井株、野村株、黒須株と名づけたものを用いた。何れも菌型は *Sh. flexneri* 2a であり、荒井株、野村株はいずれも SM 100 γ 以上の耐性菌で、黒須株は、テトラサイクリン (TC) 100 γ 以上の耐性菌である。対照として、教室保存の、大原菌、駒込 B III 菌、中村菌、及び EW 10株、並びに大腸菌 K-12 株を用いた。試験管内耐性菌

KATAYAMA Yutaka, NISHITANI Teiichi, MIZUTANI Takaaki, FUJITA Hisashi and YASUI Teruo. Kyoto Prefectural University of Medicine. Department of Microbiology (Director: Prof. S. Suzuki). NAKAZAWA Shozo: Kyoto Pharmaceutical College Department of Microbiology: Studies on the Physiology of Drug-Resistant Dysentery Bacteria. Especially on their Activities of Nitrate-Reduction and Carbohydrate Oxidation. — Jap. J. of Bact., 16(4), 300-304, 1960.

として、夫々EW10株を用いて耐性菌を分離した。これを便宜上 No. 1 株 (SM 10 万), No. 2 株 (Pc 25 u), No. 3 株 (TC 50 γ, CP 50 γ), No. 4 株 (CP 200 γ/ml) と表わすことにする。中沢の分離した, SM, TC, CP, 高度耐性の株は No. 110 株と名づける。

(2) 培養

18時間ブイヨン培養菌を, Nutrient agar 及び硝酸カリを0.1%に含む Nutrient agar に塗抹し, 20時間程度培養した菌を用いる。嫌気性培養には, 黄燐法及び candle jar 法を用いた。

(3) ブドウ糖酸化能及び硝酸還元能試験

別に述べた spot-test^(4,5) の方法を用い, 試薬の濃度としては, ブドウ糖試験には, ブドウ糖 0.1%, TTC は 0.1%及び0.05%の濃度を用いた。硝酸塩試験には, Gries-Ilosvay 試薬の $\frac{1}{10}$ 及び $\frac{1}{20}$ (G-I₁₀, G-I₂₀ と記載) を用いた。反応は室温で行ったが, 25°C以下の時は, 孵卵器で行った。

II. 実験成績

(1) in vivo 耐性菌のブドウ糖酸化能

in vivo 耐性菌を硝酸塩無添加培地及び添加培地で好氣的に培養して, 20時間後, TTC-filter spot 法でブドウ糖分解能を測定したものを第1表に, 同じく candle jar 法で嫌氣的に培養した菌の成績を第2表に示す。好氣的

第1表 好氣的培養の耐性赤痢菌の解糖能

Nitrate (0.1%)		-	+
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株		80	85
荒井 株		90	120
黒須 株		60	85
野村 株		55	87
No. 110 株		70	70
E. coli K-12 株		43	110

註: TTC の還元発色までの時間(秒)を示す。
解糖能の強いもの程, 値は小さくなる。
TTC 0.1%, glucose 0.1%, 室温での
Filter spot-test による。

培養菌においても, 嫌氣的培養菌においても, 硝酸塩添加によって多少の Glycolysis の阻止が見られるが, TTC の濃度を0.05%にすると, 第3表に示す通り, 殊に嫌気性培養菌において, 解糖能の低下が, 荒井株, 野村株, 及び No. 110株において見られる。10分間の観察で反応の漸く出現するものを(+), その極めて弱いものを(±), 出ないものを(-)とした。

第2表 嫌気性培養の耐性赤痢菌の解糖能

Nitrate (0.1%)		-	+
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株		130	150
荒井 株		70	100
黒須 株		80	100
野村 株		120	130
No. 110 株		70	100
E. coli K-12 株		60	210

註: 培養は candle jar 法で行う。Spot-test は, 好氣的条件で, 第1表と同一条件で行なう。

第3表 硝酸塩添加培地培養の耐性赤痢菌の解糖能 (TTC 低濃度による試験)

被検菌株	培養	好氣的		嫌氣的	
		-	+	-	+
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株		120		600(+)	
荒井 株		120		600(±)	
黒須 株		120		240	
野村 株		120		600(±)	
No. 110 株		180		600(±)	
E. coli K-12 株		90		480	

註: 本実験においては, TTC 0.05%, glucose 0.1%を用いた。600(+)は, 600秒後に反応が軽い陽性を示すもの。(±)は, どうかすかな呈色を表わすものを示す。

(2) 正常赤痢菌及び大腸菌の解糖能

教室保存の赤痢菌及び大腸菌の正常株について, 同様

第4表 正常赤痢菌及び大腸菌の解糖能

被検菌	培養	好気性		嫌気性	
		-	+	-	+
赤痢菌	中村 菌	65	130	80	300
"	駒込 B III 菌	95	140	170	210
"	大原 菌	100	600(±)	45	250
大腸菌	K-12 株	70	80	70	130
"	B 株	50	60	40	160
"	K 12 S 株	60	70	60	60

註: TTC 0.1%, glucose 0.1%を用いた。
嫌気性培養は黄燐法による。

にして解糖能を測定した結果を, 第4表に示す。嫌気性培養は黄燐法によった。

赤痢菌も大腸菌も, 硝酸塩添加培地においては多少とも解糖能の低下していることが観察される。

(3) 耐性菌の硝酸塩還元能

硝酸塩還元能を、生体内耐性菌について検討した結果を第5表に示す。試薬の濃度は G-I/10 及び G-I/20 であるが、掲げた成績は別々に行った実験であり、両者が大体平行することが見られるが、試薬の濃度を低くする方が差を見出すには便利である。

この結果が示すように、正常赤痢菌に較べて、in vivo 耐性菌は、硝酸還元能が相当に強く、殊に嫌気性培養を

第5表 耐性赤痢菌の硝酸塩還元能

被検菌	実験		I		II	
	試薬濃度	培養	G-I/20		G-I/10	
			好気性	嫌気性	好気性	嫌気性
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株			60	360(±)	20	360(±)
荒井株			30	45	18	30
黒須株			30	45	10	15
野村株			50	70	15	15
No. 110 株			30	40	25	20
E. coli K-12 株			20	15	10	10

註：0.1%硝酸カリ含有寒天平板に20時間培養し、Gries-Ilosvay 試薬を用いる Filter-spot-test による呈色までの時間(秒)を示す。360(±)は、360秒後の判定で、極めて弱い呈色を表わすことを示す。実験 I 及び II は夫々、別々に行ない、試薬も G-I/20 及び G-I/10 の濃度を用いる。反応は室温。

行ったものについては正常菌に較べて遙かに強いことが見られる。中沢の分離した No. 110株は、2年以上、継代を続けたものであるが、なお、この性質を或程度持ち続けていることが判る。

(4) in vitro 耐性菌の検討

in vitro 耐性菌のブドウ糖酸化能及び硝酸塩還元能についての成績を、第6表及び第7表に示す。この中で特に目立つことは、No. 3株が解糖能が低く、殊に嫌気性培養において、著明に低下するが、硝酸塩の還元は最も強いことである。

III. 考 按

以上我々は in vivo 及び in vitro でえた赤痢菌、Sh. flexneri 2 a のブドウ糖酸化能と硝酸塩還元能について我々の考案した Spot-test の手技を用いて検討した。検索に供した菌の例数が少なく、これから一般的結論を導き出すことはできないが、in vivo 耐性菌においては、一般的に硝酸塩還元能の強いこと、また、S M耐性菌で

第6表 試験管内耐性赤痢菌の解糖能

被検菌株	培 養		好気性		嫌気性	
	Nitrate		-	+	-	+
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株			80	85	130	150
No. 1 株			60	90	180	300
No. 2 株			80	120	120	180
No. 3 株			110	130	600(±)	600(±)
No. 4 株			90	90	60	120

註：TTC 0.1%，glucose 0.1%を用いる嫌気性培養は candle jar 法。

第7表 試験管内耐性赤痢菌の硝酸塩還元能

被検菌	培 養	好気性	嫌気性
Sh. flexneri 2 a, EW 10 株		20	360(±)
No. 1 株		12	180
No. 2 株		16	180
No. 3 株		8	30
No. 4 株		17	120

註：試薬は G-I/10 を用いる。

は、硝酸塩添加培地での嫌気性培養菌が、ブドウ糖酸化能が低いことなどが見られる。勿論、検索した例数が少ないので、これを以て耐性赤痢菌の一般的性質とすることは明らかに誤りであるが、硝酸塩還元能と耐性の間に少なからざる関係が考えられる。

硝酸塩の腸内細菌に及ぼす作用については日本では、江上氏の業績^{6,7)}があるが、Nitrate respiration の問題以外に、適応酵素産生に及ぼす影響について、D. Billen⁹⁾が、Hydrogenase, formic dehydrogenase, formic hydrogenlyase 産生を Nitrate が阻止することを示し、M. J. Pinski¹⁰⁾ ちも、大腸菌の formic hydrogenlyase の産生及びその働きを Nitrate 及び Nitrite が阻止することを述べている。また、H. S. Tubiash¹¹⁾ は Nitrate 及び Nitrite が Salmonella 及び Proteus の glucose の好氣的分解を抑えることを示している。Escherichia-Aerobacter に対しても同様の成績が示されている¹²⁾。これらの示すように、Nitrate 及び Nitrite は腸内細菌の代謝過程を嫌氣的過程にする働きがあるもので、Oxygen-Respiration を、Nitrate-Respiration に変えることに基くものと思われるが、Verhoeven⁸⁾ は、Nitrate reduction を行なう細菌を3種類に分類して (1) nitrate assimilation をするもの、これは N-源に用いるもの。

(2) true dissimilatory nitrate reduction. これは Nitrate

を essential hydrogen acceptor とするもの。

(3) incidental dissimilatory nitrate reduction. これは nitrate を non-essential hydrogen acceptor とするもの、に分けて考察を加えている。E. coli はこの第3の型に入るものであるとしている。また、江上等⁹⁾は、硝酸塩の還元過程について

なる scheme

を考え、更に佐藤⁷⁾は

なる経路をも考えている。

また、P. H. Kopper⁸⁾は E. coli について、培養の phase によつて硝酸塩の還元能が異なること、即ち、18時間培養菌は2～3時間培養菌に比較して硝酸塩還元能が遙かに低いことが示され、硝酸塩還元が、大腸菌の生成過程に働いているのではないかと考えている。

我々の実験で、還元能の強さが赤痢菌の薬剤耐性菌において正常菌よりも強く、殊に嫌氣的に培養した場合には、生成する Nitrite が正常菌では極めて少ないが、in vivo 耐性菌では非常に多いことが判る。このことは、耐性赤痢菌においては、硝酸塩呼吸が、大腸菌に比べると同様程度の役割を果たしていることを示唆するものではないだろうか。これに対して、試験管内耐性菌においては、TC及びPc耐性のNo. 3株のみに同様の現象が見られるのみである。これが、in vitro と in vivo との耐性菌の差を示すものなのか、或いは、単剤耐性と多剤耐性の差に基くものか直に知ることはできないが、今後多数の耐性菌の分離と共に、一応検討するに値する問題であろうと考える。

次に嫌氣性培養菌の解糖能の測定は、好氣的条件で測定を行っているので、嫌氣性培養菌自体のブドウ糖酸化能を測っているというよりは、好氣的酸化への転換能力乃至は、適応酵素産生能の大小を示すものと見る方が妥当であろうが、今後慎重に検討したい。

IV. 結 論

(1) 我々はかつて患者より分離した、多剤耐性赤痢菌において、硝酸塩還元能の特に強い1株を得たが、赤

痢菌の薬剤耐性の機構と硝酸塩還元能との間に合目的な関連が存在するものなのかどうかを検討しようと試みた。

(2) 1959年度に患者より分離した赤痢菌の Sh. flexneri 2a の3株及び保存正常菌の試験管内耐性菌4株について、我々の考案した Spot test の手技を用いて、ブドウ糖酸化能及び、硝酸塩還元能の強さを測定した。

(3) in vivo 耐性菌については、硝酸塩添加によつて解糖能の落ちることが見られるが、嫌氣性培養菌の成績は、好氣的酸化過程への適応能の大小を示すものと考えられる。

(4) in vitro 耐性菌については、硝酸塩還元能が何れも上昇しており、嫌氣性培養菌において、特に正常菌との差が大きい。in vitro 耐性菌については、ただ1株のみにこの現象が見られる。この性質が、薬剤耐性との間に、どれだけの意味をもつかは、なお、多数の菌株を分離して検討をしたい。

最後に、恩師鈴木成美教授の御指導に感謝の意を表します。

(本論文の要旨は、昭和34年度日本化学療法学会西日本支部会シンポジウムにおいて、鈴木教授によつて報告された。)

文 献

- 1) 鈴木成美: 化学, 15-8, 15-23, 1960.
細菌の薬剤耐性と遺伝。
- 2) 中沢昭三, 他: 化学療法学会西日本支部会講演.(1957).
- 3) Egami, F. and Edahiko Murakami: J. Biochem., 37, 73-79, 1950.
The role nitrate in biological oxidation.
- 4) 片山胖, 他: 日本細菌学雑誌.
細菌の硝酸塩還元能の簡易試験法。
- 5) 片山胖, 他: 細菌の炭水化物分解能の簡易測定法。
- 6) Taniguchi, S., Sato, R. and Egami, F.: The enzymatic mechanisms of nitrate and nitrite metabolism in Bacteria. in "A Symp. on Inorganic Nitrogen Metabolism", John Hopkins Press, Baltimore, 1956, pp. 87-108.
- 7) Sato, R.: Ibid., pp. 163-175.
The cytochrome system and microbial reduction of nitrate.
- 8) Verhoeven, W.: Ibid., pp. 61-86.
Some remarks on nitrate metabolism in microorganisms.
- 9) Billen, D.: J. Bact., 62, 793-797, 1951.
The inhibition by nitrate of enzyme formation during growth of Escherichia coli.

- 10) Pinski, M. J. and Stokes, J. L. : J. Bact., 64, 151-161, 1952.
Requirements for formic hydrogenlyase adaptation in non proliferating suspensions of E. coli.
- 11) Tubiash, S. H. : Amer. J. Publ. Health, 42, 1060~1061, 1952. An anaerogenic effect of nitrate and nitrites on representative strains of Salmonella.
- 12) Tubiash, H. S. : Ibid., 41. 833-838, 1951.
The anaerogenic effect of nitrates and nitrites on gramnegative enteric bacteria.
- 13) Kopper, P. H. : Nature, 167, 951-952, 1951.
Relationship of growth phase to the reducing activity of bacterial cells.