アクリフラビン耐性炭そ菌に関する研究

第1報 アクリフラビン加培地上における炭そ菌 Mukteswar 株の集落と毒力について

屋 部 憲 清

家畜衛生試験場北海道支場（支場長 村瀬信雄）

〔受付：11 月 15 日・1960 年〕

緒 言

炭素菌の変異についての研究は古くは Pasteur¹⁾ の弱毒変異株Ⅱ苗に始まり、Preis²⁾ は集落型と芽胞形成能力の関係について研究し、Eisenberg³⁾ は実験室保存菌株より無芽胞菌を見出した。また Wagner⁴⁾、Lutz⁵⁾、Gratia⁶⁾ らは集落形態から菌形と毒力との関係を論じているが、Nungester⁷⁾ は変異株の作出に単個菌培養法を用いてこの種の研究の基礎を築いた。彼は炭素菌の集落型を6種に区分けしているが、そのうちのS型の菌形は短くなり、または Vibrio 形あるいは球形を呈し、SM型は無芽胞で毒力がないと報告している。

Mazzuchi⁸⁾ の有莢膜弱毒変異株 Carbozoo, Sterne⁹⁾ の無莢膜弱毒変異株についての研究は代表的なものであり、炭素菌の莢膜と毒力の変異との関係の解明に寄与している。

Chu¹⁰⁾ はこれらの説を基礎にして炭酸ガスの存在下で炭素菌集落の R→S 変異の解明を行なっている。

杉村ら¹¹⁾ はアクリジン系色素添加培地の累代通過により豚丹毒菌の無毒性変異株の作出に成功し、この変異株による生菌ワクチンは本邦およびヨーロッパ各国において広く応用されてきた。また大地、川島¹²⁾ らは同じくアクリフラビン添加培地累代培養により気腫そ菌の変異の実験を行ない、さらに旭¹³⁾ らはこの方法をリステリア菌について試みそれぞれ優秀な生菌免疫元となりうる弱毒変異株の作成に成功している。

この研究は炭そ菌のアクリフラビン添加培地累代通過によって起る毒力の変化を主とした Correlated variation を追及することを目的として、アクリフラビンと本菌の毒力変化と菌体の形態学的ならびに生物学的変化との関係について実験をえた成績について報告する。

但し本報においては炭素菌 St. Mukteswar のアクリ

フラビン培地累代通過中における集落の形態変化と毒力の低下について記載し、一般性状の変化と形態学的変化については次報に記載する。

実験材料および方法

1. 使用菌株：炭素菌弱毒変異株 st Mukteswar
2. アクリフラビン添加メヂウム：アクリジン系色素であるアクリフラビンを無水アルコールで数回洗滌後充分に乾燥した精製アクリフラビンを作り、これを滅菌蒸留水で一定濃度に溶解して原液とする。寒天に原液を定量加えて高濃度のアクリフラビン加培地を作り、これを基礎培地としてその一定量を新たな普通寒天に加えて必要濃度の培地を作成した。
3. 培養方法：先ず使用原株の一定量を各種濃度のアクリフラビン添加寒天平板上に培養し、48時間後の発育によって耐性度を計り、その最も高い濃度の培地に発現した集落をこれと同じ濃度の培地に10代まで累代培養する。10代目に再び各種濃度の培地に移植し前回と同様な方法で耐性度の上昇を計り、その最も高い濃度の培地に発現した集落をこれと同じ濃度の培地に更に10代まで累代培養を行う。これを10代毎に繰返して耐性度の上昇を高めた。
4. 実験動物：ヤギ20 kg 前後、ウサギ 2.3 kg, モルモット 400 g 前後、マウスDD系15～20 g、(体内消長試験では10～15 g) でいずれも15日以上健康観察の後雌雄の区別なく使用した。
5. 注射材料および菌数計算：注射材料としては目的

YABE Norikiyo: Studies on the acriflavin-fast anthrax bacilli. Report 1. Colonial and virulent observations of st. Mukteswar on the acriflavin agar. The National Institute of Animal Health Hokkaido Brauck — Jap. J. of Bact, 16(5), 424-429, 1961.

に応じ原株同定試験では芽胞液, 耐性菌毒力試験では湿菌を使用し, 菌数計算は材料を寒天平板に定量培養し発育集落数により菌数を計算した。体内消長は臓器の一定量を培養し発育集落を計算した。

実験成績

1. St. Mukteswar の性状および毒力

研究にもちいた炭そ菌は St. Mukteswar (弱毒株), St. Carbozoo (弱毒株), St. 52 (強毒株) の3種であるが, 実験の主眼を St. Mukteswar においた。

一般生物学的性状

同定試験の結果大きさ平均 $3 \sim 9 \mu$, 幅 $1 \sim 1.2 \mu$, 中立芽胞を有し, 非動運で鞭毛なく, グラム陽性の桿菌である。ゲラチン培地上にブラシ状に発育, 軽度の液化, 普通寒天上でいわゆる獅子毛状集落に発育し, プイヨン中で軽度のこん濁, 牛乳凝固, インドール陰性硫化水素陰性, カタラーゼ陽性その他糖分解および各種反応, 芽胞の熱抵抗性など炭素菌としての特徴を備えている。

各種動物に対する毒力試験

ヤギ: 皮下注射を行った4頭のヤギは芽胞数 286×10^6 個以上で斃死した。

ウサギ: 供試羽数24。皮下(10羽), 皮内(5羽), 腹腔内(4羽)注射では 8.1×10^7 個でも斃死せしめない。静脈内注射では 3×10^6 個以上で斃死する。

臨床症状および浮腫形成は皮下注射例では食欲不振があるのみで, 接種部位は 2×10^7 個以上のものに浮腫形成が認められるが2週間後には消失し, 極めて大量接種例は20日以上でも痕跡を認めた。

モルモット: 169頭のモルモットを使用した。皮下(40頭), 腹腔内(9頭)では 1×10^7 個以上で斃死せしめた。皮内(10頭)では 1×10^6 個でも生存し, 静脈(10頭)では成績は区々で 1×10^6 個で生存するもの, また 1×10^5 個以下で斃死したものもある。浮腫は 2.6×10^4 個以上に認められたがいずれも2週間以内に消失した。

マウス: 139頭を実験に供した。皮下(89頭)接種群のうち体重 $9 \sim 11$ g (36頭)のものでは斃死率高く, また成績も区々であった。体重 $15 \sim 25$ g (53頭)のものでは $2.7 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^4$ 個以上で斃死せしめた。また皮内(18頭)では 1×10^7 個以上, 腹腔内(16頭)では成績は区々であるが 1×10^3 個以下でも斃死せしめた。臨床的に3~4日目に全身症状, 食欲減退, 元気消失, 被毛逆立などがみられ5日目から急性敗血症死するものもあるが, 5~6日目頃から元気回復して来る。浮腫は7日目以降に認められた。

St. Mukteswar のコロニー

R 型 原 株

SR 型 AC 株

S 型 AC 株

(培養 48 時間所見)

表 1 原株のアクリフラビンに対する耐性度

菌 株	集落型	AC 寒 天 (Acriflavin 含 有 量) %									
		0.0001	0.0002	0.0003	0.0004	0.0005	0.0006	0.0007	0.0008	0.0009	0.001
Mukteswar	R	300	289	200	286	—	—	—	—	—	—
	S R	—	—	—	—	300	250	200	—	20	—
	S	—	—	—	—	—	—	100	1	45	13
対 照 Carbozoo	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S R	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—
	S	∞	∞	10	10	—	—	—	2	—	1
	S M	—	—	—	∞	∞	∞	1	—	—	—
対 照 St. 52	R	∞	∞	∞	—	—	—	—	—	—	—
	S R	—	—	—	∞	300	20	2	—	200	—
	S	—	—	—	—	—	—	20	6	100	300

註：表中の数字は発現した平板上の集落数を示す。

表 2 St. Mukteswar の低濃度 AC 培地上における連続培養所見

耐性度	型	0.001% AC 培地 継代 代数																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0.001 %	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S R	20	20	20	30	3	12	12	10	10	—	—	—	—	—	—	30	80	80	50	50	80	80	90	50	50	30	20	5	—	—
	S	45	12	8	15	50	50	50	70	70	100	100	100	100	100	35	24	20	20	50	50	30	10	2	50	50	70	80	100	100	100

註：表中の数字は発現した平板上の集落数を示す。

以上実験の結果この菌は炭そ菌としての特長を備えており、また毒力はマウスの皮下注射で 3×10^4 個芽胞数でこれを斃死せしめることなどから、弱毒株とは云つても可成りの程度に毒力があることがわかった。

2. アクリフラビン加培地上における集落の諸相と耐性度の上昇試験

原株のアクリフラビン耐性度：普通寒天培地に精製アクリフラビンを加えた平板培地に St. Mukteswar の原株を 1 白金耳移植し 48 時間培養した。これらの培地では R 型は 0.001~0.0004%，S R 型は 0.0005~0.0009%，さらに S 型は 0.0007~0.001 % でそれぞれの集落が発現した。（写真参照）即ちこの最高耐性濃度は 0.001 % であり、集落型からみると R 型は低濃度培地に多く発現し、ついて S R 型、S 型は比較的高い濃度にも発育して R→S 型へ移行する傾向がみられた。（表 1）

アクリフラビン添加メヂウムの累代通過と耐性度の上昇：原株の初代で発現した最も高い濃度の 0.001% AC 培地（アクリフラビン添加培地の略以下同じ）に発育した集落（S 型）を同じ濃度の AC 培地に 100 代まで通過したところ、R 型集落は全く発現を認めず、S R 型は 10

代より消えて S 型の発育のみとなつたが、16 代より再び S R 型が発現して 28 代まで続き 29 代から以後は消失し S 型集落のみ発現した。（表 2）

ついてこの試験の連続培養 10 代目の S 型集落菌をさらに高濃度の各段階濃度の AC 培地上に移植した結果最高発現培地は 0.004 % に S 型発現をみ、その耐性濃度は 0.001% から 0.004% に上昇していることが認められた。この試験の結果からも R→S 型集落へ移行する傾向が窺われたので、同一濃度培地に累代培養 10 代毎に耐性濃度上昇試験を行いさらに高濃度への耐性化を試みた。

AC 培地累代通過 10 代毎における耐性増進の度合：AC 培地上での弱毒変異株 Mukteswar の原株の集落は R 型であるが、この培地上では R 型は累代培養中いずれの場合にも完全に消失し、S R 型、S 型の出現がみられるが代を重ねるに従つて次第に R→S 型移行の形を呈し 30 代以後は殆んど S 型のみとなつた。また耐性度の上昇度合も原株が 0.001 % であつたものが AC 50 代では 0.015 %、100 代では 0.15% まで上昇した。（表 3）

なお対照株 St. Carbozoo および St. 52 でも同様の所見をみた。

表 3 St. Mukteswar の AC 培地継代中の耐性増進の度合

原 株	AC 培地継代代数									
	10 代	20 代	30 代	40 代	50 代	60 代	70 代	80 代	90 代	100 代
0.001 %	0.004 %	0.006	0.009	0.019	0.015	0.02	0.05	0.1	0.12	0.15

註：表中の％は発育した培地のアクリフラビン含量を示す。

表 4 St. Mukteswar の 培地継代株のマウスにおける毒力の動き

接 種 菌 数	継代数 区 分	原 株	10 代			50 代			100 代		
		生 死	計	死	生	計	死	生	計	死	生
5000000—10000000	+	+	3	3	0	5	5	0	10	4	6
2500000—5000000	+	+	3	3	0	5	3	2	20	0	20
2000000—2500000	+	+	3	3	0	10	2	8	10	0	10
1500000—2000000	+	+	3	3	0	15	0	15	20	0	20
1000000—1500000	+	+	3	3	0	10	0	10	20	0	20
750000—1000000	+	+	5	3	2	10	0	10	5	0	5
500000—750000	+	+	5	2	3	10	0	10	5	0	5
250000—500000	+	+	5	4	1	10	5	0	5	0	5
125000—250000	+	+	5	3	2	15	2	13	5	0	5
25000—125000	+	+	15	1	14	15	0	15	5	0	5
12500—25000	—	—	10	0	10	10	0	10	5	0	5
2500—12500	—	—	10	0	10	5	0	5	5	0	5
AC 耐 性 度		0.001%	0.004 %			0.015 %			0.15 %		

註：使用マウス DD 系 15～20 g

このようにして出来た S 型菌はこれを普通メヂウムに還元培養しても容易には復帰しなかつた。

St. Mukteswar のアクリフラビン培地継代中におけるマウスに対する毒力の動き：炭そ菌を動物接種する際、接種菌数と感染致死が平行しないので実験成績が不明確に終る場合がしばしばある。このような欠点を除くにはホモロガスな芽胞乳剤を使用することが好ましいが、今回の材料は芽胞形成能の喪失、菌体の糸状化、強度の縮毛化（後篇性状試験で詳述）等のため、芽胞液の使用は不可能で、専ら湿菌を使用した。接種量の測定には平板培養法により菌数計算を行った。

AC 耐性と毒力変化：皮下注射による毒力試験で原株では $2.7 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^4$ （芽胞）であるが、AC 耐性 10 代株（耐性度 0.004 %）の LD は $12.5 \times 10^4 \sim 25 \times 10^4$ （湿菌）に低下し、さらに AC 耐性 50 代株（耐性度 0.015 %）では $2 \times 10^5 \sim 25 \times 10^5$ （湿菌）に低下し、AC 耐性 100 代株（耐性度 0.15 %）では $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ （湿菌）で耐性度の上昇にしたがつて明らかに毒力の低下が認め

られた。（表 4）

マウス体内における菌の消長

ACM 100 代株（St. Mukteswar のアクリフラビン耐性株の略）の 11.2×10^5 および 22.4×10^5 個の皮下注射を行い、毎日殺して臓器の定量培養を行った結果、対照の原株は接種後 2 日目より全臓器に大量の菌が証明され 4 日目に全部炭そ死した。これに対し 100 代株は接種後 2 日目に一時各臓器に少量の菌が検出されたがその後は全く体内から菌を検出出来なかつた。また同じ株の倍量接種においては前の少量接種群よりはるかに多く検出されるが、いずれも発病致死はなかつた。

考 察

炭そ菌の自然的発育環境において、または人為的にその環境をかえることによって派生する集落の変異ならびに毒力の変化についての研究は Pasteur (1881)¹⁾ の II 苗以来枚挙にいとまがない。Preis (1908)²⁾ は Peptone を除いた Broth 中に高温で長期培養して、Round form

表 5 St. Mukteswar の A. C. 100 代のマウスにおける体内消費

日 数	体 重	原 株 (1,100,000 S.C)							日 数	体 重	AC-100 代 (1,120,000 S.C)											
		皮下	淋巴	肺	肝	脾	腎	心血			皮下	淋巴	肺	肝	脾	腎	心血					
1	10 g	5							1	12 g	40											
2	12	∞	∞	50	40	∞	∞	15	2	10	20	6	5	3	1							
3	11	15	20	12	5	∞	22	11	3	11												
4	10	40	∞	∞	∞	∞	∞	30	4	11												
5	13	(炭 そ 死)							5	13												
6	11																					
7	15																					
8	12																					
9	10																					
10	13																					
									同 上 (1,120,000 S.C)													
註……表中の数字は菌数を示す。									1	11 g	∞											
									2	12	∞	20	11	3	1							
									3	13	21											
									4	15	14	16	32	11	17	15						
									5	12	20	40	50	3	5	2						
									6	14	14	∞	4	5		1						
									7	11	17	∞										
									8	10	1											
									9	13												
									10	11												

と Homogenousform (Mucoid form) が出現し、モルモットに対して前者は毒力低く、後者は高かったと報じ、Markoff (1912)¹⁴⁾ は集落変異は菌株、培養温度、培地の新旧、培地の組成などに関係があると報じている。Nungester (1929)⁷⁾ は Serial single Colony isolation によって分離した集落を 7 種に分類し、そのうちの S, Rm, Sm, Rp の各集落は寒天培地継代 1 年有余にして毒力を失ったが、R は毒力を有していたことを報告し、また炭酸ガスの存在下で有荚膜弱毒変異株を作出している。さらに Sterne (1937)⁹⁾ は炭酸ガスの存在下で血清加寒天培地上に炭そ菌は S M 集落に発育し、その集落より派生する R 集落の無荚膜弱毒変異株の作出に成功している。Chu (1952)¹⁰⁾ は Sterne の研究をさらに発展させて自然界に存在する炭素菌を炭酸ガスの存在下に培養し、その実験をもとにして自然界にも無荚膜炭そ菌の存在することを明らかにし、また炭酸ガス存在下の S 集落は本来の炭そ菌集落の原型であるとすれば、その S 集落から派生する R 集落が変異菌で、これが現在自然界に存在する R 集落であつて、炭そ菌の集落変異は他の細菌と同様に S

→R 集落変異が基礎となると論じている。

このように炭そ菌の変異の問題は色々な面から研究され発展しつつあり、他方において弱毒変異株の作出は予防医学上生菌ワクチンの観点からも重要な意義をもつものである。しかるにこれらの研究を薬剤耐性の面から追及した報告は余りなされていない。この意味においてアクリジン系色素加培地上において現われる諸変化は興味深い事実と考えている。

アクリフラビンに対し炭そ菌の原株は低濃度に耐過生存するが、10 代毎に濃度を高めて累代通過することにより次第に耐過発育度を増していく。

原株または低濃度での耐過発育株をある一定濃度を越えた濃度の培地に移植すると発育してこない。つまり高濃度での耐過株でもその発育限界濃度においてのみ継代可能である。これらの所見は一段階変異を示すストレプトマイシン抵抗性変異菌やファージ抵抗性変異菌とことなり、ペニシリン抵抗性変異菌の出現様式に近似している。

なお高濃度での耐過発育してくる菌株が薬剤を含まな

い環境で感受性になり 易いことは興味ある 所見であるが、この様な耐性度の減弱が、遺伝的変異以前の問題か、逆変異に基くかは今後の研究に俟たなければならない。

アクリフラビン通過の当初においては原株と同様 R, RS, SR などの中間型集落と S 集落が出現するが、比較的低濃度においては R 集落、高濃度においては S 集落の出現が顕著で、集落変化からみて R→S 移行の様相を呈する。

Mukteswar 株はもともと弱毒変異株とされているが、著者の実験の範囲内では原株は可成り毒力を有している。この菌株をアクリフラビン通過することによつてえられた耐性株では、耐性濃度の上昇に応じてマウスに対する毒力の減退がみられた。

原株の最初のアクリフラビン耐過発育濃度つまり低濃度の培地に累代通過した耐性株の場合初代の耐性発育菌株は原株よりも毒力の低下が認められるが、その後同一濃度に何代通過継代しても毒力は变りなく、耐性濃度を高めた場合にのみ毒力が減退していくことは集落の耐性濃度を高めることにより R→S 型集落に変つていく様相と関連性があるように思われる。

結 論

1. Mukteswar 株をアクリフラビン培地上で累代通過することにより 同色素に対する 耐性度の 上昇がみられ

た。

2. 耐性度の上昇は Rough→Smooth 集落変異につながり、これらの変異の過程には中間型として RS, SR 型が認められた。

3. 耐性度の上昇に伴いマウスに対する毒力の減退がみられた。

稿を終るに当り家畜衛生試験場長石井進博士、支場長村瀬信雄博士に敬意を表し、御指導並に御校閲をいただいた製造部長杉村克治博士、調査第一部長藤田淳吉博士に対し衷心より感謝します。

文 献

第2報の末尾に一括する。日本細菌学雑誌, 16 巻, 6 号掲載予定。

この研究は下記の学会において報告した。

- 1) マウスをもつてする炭そ弱毒菌 MUKTESWAR 株の免疫試験 (第 27 回日本細菌学会, 昭和 29 年 4 月)
- 2) 炭そ菌の人工変異に関する, 1, 2 の実験. (第 9 回日本細菌学会関東支部総会, 昭和 29 年 11 月)
- 3) 炭そ菌の人工変異に関する 1, 2 の実験. 第 2 報 (第 14 回日本細菌学会第 9 分科会, 昭和 30 年 4 月)
- 4) 炭そ菌の人工変異に関する 1, 2 の実験. 第 3 報. (第 29 回日本細菌学会, 昭和 31 年 4 月).