抗生物質の細菌細胞に及ぼす影響の形態学的研究

第1報 ペニシリンによるブドウ球菌の形態変化と耐性との関係

上 條 清 明

東京大学医学部細菌学教室 (指導 秋葉教授)

[受付: 8 月 4 日 1953 年]

緒 言

ペニシリン, ストレプトマイシンを始め種々の抗生物質の作用下に於ける細菌の形態変化に関しては, 東 (1948), 中村他 (1949), 片山 (1949)¹⁾, 井村 (1949), 吉池 (1949), 山田 (1949)²⁾, 松井 (1950), 松井他 (1950), 井上 (1950), 渡辺他 (1950), 円岡 (1950), 小野 (1950), 安藤 (1950), 田沢 (1950), 矢坂他 (1950), 中塚 (1950)³⁾, 榊原 (1950), 八家 (1900), 森川 (1951)⁴⁾, 寺田 (1951), 美田 (1951)⁵⁾, 城谷 (1951)⁶⁾, 鈴木 (1951), 安曾他 (1951)⁷⁾, 兒玉 (1951), 山岡 (1951), 伊藤 (1951), 中塚他 (1951), 松井 (1951), 西沢 (1951)⁸⁾, 塚原 (1952), 占部 (1952), 佐藤 (1952), 勝沼 (1952), Gardner (1940)⁹⁾, Smith & Hay (1942), Robinson (1943), Weiss (1943), Steinman & Nicole (1945), Fisher (1946), Klimeck et al. (1948), Duffrenoy & Pratt (1947~1949)¹⁰⁾, Tulasne & Vendrely (1948)¹¹⁾, Smiles et al. (1948), Levaditi & Vaisman (1945) 等多くの業績があるが, 之等を大別すると, 発育阻止濃度以下に於ける異常形の出現に関するもの, 発育阻止濃度又は更に高濃度に於ける形態変化に関するもの, 耐性上昇過程に於て観察された異常形に関するもの及び, 耐性菌に就いての形態学的研究となり, 耐性上昇過程に観察された異常形に就いての報告が最も多く, ブドウ球菌に於ては, 膨大, 排列異常 (菌体間の間隙が広がる) 及び多形態性等が知られている。耐性菌に就いては, 異常形を認めるもの, 多形態性を唱へるもの及び正常形に戻るとするものがあるが, 一般には耐性初期に異常形が出現し, 耐性上昇と共に正常形に戻るが, Gram 染色性は陰性化するとされているようである。ペニシリンの作用自体に重点をおいた研究では, 微量ペニシリン含有培地に感性菌を発育せしめた場合の異常形に関し, Gard-

ner⁹⁾, Tulasne & Vendrely¹¹⁾, 安曾⁷⁾等の報告があり, 高濃度ペニシリンの作用に就いては, 片山¹⁾, 美田⁵⁾, Fleming¹¹⁾, Fisher¹¹⁾, Eriksen et al.¹¹⁾ 等により類化, 変性, 溶菌等が報告されている。Pratt & Duffrenoy⁹⁾ の報告は低濃度から高濃度に至る連続的観察を [[assay

第 1 図

- A. 正常形。
- B. 濃染形 (稍大形で Methyleneblue に濃染する集団は正常より小数の菌から成る。
- C. 双球菌様体 (B より更に大きく, 色素に濃染する。集団は 10 数個~2 個の菌から成り中央の帯状部は淡染し 2 カ宛同方向に並ぶ)。
- D. 分節形 (C に似ているが 1 カの菌が 3~4 カに分れている)。
- E. 幼若形 (B より稍小さく必ず対をなしている)。
- F. G. H. 退行形。

KAMIJO, Kiyooki: Morphological studies on the effect of antibiotics on the Bacterial Cell. (I) Morphological changes of staphylococci by Penicillin and the relation between the abnormal forms and Penicillin Resistance. Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tokyo., —Jap. J. of Bact., 8(7)747-751, 1953.

plate を用いて行つたもので、異常形出現から溶菌に至る連続した変化が述べられている。之等の報告を通覧すると、低濃度では、膨大が唯一且著明な変化であり、稍高濃度では、膨大と共に溶菌又は破壊が見られ、耐性上昇途上では、この両者が混在し、高度耐性菌では異常形態はむしろ少いと云う事になる。一方細菌の異常形態は抗生物質のみならず、ビタミン K (結核菌: 弓削 1949¹²⁾), アミノ酸 (チフス菌: 切目 1950¹³⁾) 等でも抗生物質と同様に生ずる事が知られている。余はブドウ球菌において、形態変化と耐性獲得乃至ペニシリン感受性との間に一定の関連性を認め、興味ある結論に達したので、ここに報告する。

実験並びに成績

Staphylococcus aureus 209-p 株を被検菌とし、ブイヨン及び普通寒天培地を用い、形態観察は Methylene blue 単染色及び Giemsa 染色によつた。ペニシリンは G-Na 塩 (日本化薬試供品) である。全実験を通じ、ペニシリンによつて生ずる異常形は一定の経路をもつて發育するので、便宜上第 1 図に各種異常形並びにその相互の関連を示し、以後の記載は図中の呼称をもつてする。〔第 1 図〕

実験 1. 異常形株に双球菌様体の出現條件

1000~0.001 u/cc のペニシリン・ブイヨンに 209-p 株を接種し、37°C 20 時間後に観察した。發育は 0.01 u/cc 以下に見られ、發育した菌は 3 μ 内外の双球菌様体及び退行形であり、1000~0.1 u/cc では發育は認められず、1000~100 u/cc では菌体の破壊又は溶菌を認め、10 u/cc では濃染形と退行形が相半ばし、1~0.1 u/cc ではすべて濃染形であつた。次に各試験管からブイヨンに後培養すると 20 時間後には、10 u/cc のものからは 3 μ 前後の双球菌様体のみが、1 u/cc のものからは 1 μ 前後の双球菌様体と退行形、0.1 u/cc のものからは、小数の双球菌様体と正常形、0.01~0.001 u/cc のものからは正常形のみが發育して来る。即ち 10 u/cc 前後のペニシリンで処置した後培養に、特に著明な双球菌様体の出現する事を認めた。次にこの後培養を寒天斜面に行うと、好氣的、嫌氣的のいずれの條件でも双球菌様体の出現は見られず、殆どすべてが正常形として發育してくる。又前処置をペニシリンブイヨンの代りに、ペニシリン食塩水で行うと双球菌様体は多少認められるが、大きさの不揃いが著しく、且濃染形が常に混在する。次に典型的な異常集團の出現は、移植の時混入する微量のペニシリンによるものと考え、後培養を Penicillinase 加ブイヨンに行つた。結果は予期の通りであつたが、必ずしも正

常形のみは發育は見られず、1~1.5 μ の範囲で大小不同があり、双球菌様体も小數ながら混在する。この所見は、209-p 株を前処置せずに Penicillinase ブイヨンに接種した時と同じであり、異常形の出現には、混入するペニシリンが主因となつてゐるが、Penicillinase の存在も亦その因子となり得る事を示している。更に Gardner の報告に準じて、微量のペニシリンを含む寒天斜面及びブイヨンに 209-p 株を發育せしめると斜面では 0.032 u/cc で 1.5~2.0 μ の双球菌様体を、又ブイヨンでは、0.00625~0.0125 u/cc で 3 μ 前後、0.025~0.1 u/cc で 3~1 μ の双球菌様体を認めるが、大小不同と退行形混在の点でペニシリン処置→ブイヨン後培養の所見と異つてゐる。以上により双球菌様体は微量のペニシリンの存在により著明に出現するが、ペニシリン処置→ブイヨン後培養法により典型的な双球菌様体集團を得る事を明らかにした。

実験 2. ペニシリン接觸による形態変化。

16, 4, 1, 0.5 u/cc のペニシリンブイヨンに被検菌を接種し、1~7 日、9 日、29 日後の形態を Giemsa 染色と Robinow 染色によつて観察した。Giemsa 染色では第 1 日には 16, 4 u/cc では膨大と被染性の上昇を認め、1~0.5 u/cc では正常であり、第 2 日 16, 4 u/cc に双球菌様体が出現し、第 3 日は各濃度共被染性の低下が著しく、膨大、変形は軽度である。4 日目には、16~1 u/cc では菌体間の間隙が広がつてゐるだけで著明な変化を認めず、0.5 u/cc では小數の双球菌様体の出現と大小不同が見られる。5 日目には、各濃度共形状の不整なものや幼若形が見られ、菌体の破壊と新しい増殖の開始が推察される。6 日目の 16~4 u/cc では、双球菌様体と幼若形が現れ、被染性も良くなり、1~0.5 u/cc では正常形が見られる様になる。7 日目では、各濃度共再び濃染形と双球菌様体が現れ、一旦發育を始めた個体が残存するペニシリンの爲再び異常發育を始めたものと思われる。9 日目の 16~1 u/cc では双球菌様体と幼若形が、0.5 u/cc では退行形が見られ、29 日目には 16~4 u/cc では殆ど菌が見られず、1~0.5 u/cc では正常形に復元している。Robinow 染色では、1~3 日では対照と大差なく、4 日目では分裂中の核を認め、以後 5~9 日では正常の核又は分裂中の核を認める。以上の所見を総合すると 4 日目頃に分裂の像を認めるが、常に菌体崩壊が起つており、ペニシリンが適應の限界以上に存在する爲、増殖過程の途中で退行形に移行する像と思われる。即ちこの程度の濃度では、個々の菌のペニシリン感受性に應じて増殖過程の途中迄は行くが、その後の發育は起らず

に死滅して行くものと考えられる。

実験 3. 耐性上昇と形態変化

ブイヨン希釈法により, 16 代で 256 u/cc に発育するペニシリン耐性株を得たが, その間移植後, 24, 48, 72 時間又はそれ以上の形態の推移を観察し, 常に先ず双球菌様体を生じ, 時間の経過につれて正常形に戻る事を認めた。然し最初の数代では必ずしもこの経過は見られず, 例えば, 第 1 代では $1/16$ u/cc 迄発育が見られるが, この濃度では濃染形が多く, 双球菌様体は $1/128$ u/cc で最も著明である。5 代以後は之に反し発育最高濃度で常に双球菌様体が主位を占めている, 即ち双球菌様体→双球菌様体の経過で耐性が上昇する。次に実験 1 で得た双球菌様体からの集団の耐性上昇の模様を通常の感性菌から出発する場合と比較すると, 上昇曲線及び形態の推移は全く一致するが, 継代間隔を延長し, 一旦生じた双球菌様体が正常形に戻るのを待って移植すると, 之を初代から始めても, 又或程度耐性を得た菌から始めても上昇速度は著しく低下する (第 2 図)。この上昇曲線の比較からも, 双球菌様体こそ耐性上昇に最も主要な役割を持つ

第 2 図 耐性上昇曲線の比較

ものである事が首肯される。何故なら曲線 a と b とが相似である事は, この 2 曲線の形成に與る主要因子が同一である事を示すと考えられるからである。尚双球菌様体→正常形に至る間の生菌数の消長は第 3 図の通りで, 顯微鏡下に双球菌様体のみが見られる時にも菌数は増加

しており, この時期 (1~3 日) には分裂して生ずる個体が次々と双球菌様体になる事が示されている。又形態上の退行形の増加する時は生菌数も減少している。〔第 2 図, 第 3 図〕

第 3 図 100 u/cc Penicillin 耐性 209-p 株の増殖曲線

実験 4. ペニシリン耐性菌の形態

209-p 株を原株とし耐性の程度の異なるもの 9 株, 自然耐性株 1 株の普通寒天培地及びペニシリン寒天培地に於ける形態を観察した。人工耐性株は, pf 株, 64 (8) 株, 64 (10) 株, 64 (t) 9 株, 64 (A) 11 株, 128 t (10) 株, 256 A (14) 株, 128 A (13) 株及び 256 A (15) 株の 9 株, 自然耐性株は中村株で, pf 株は 250 u/cc, 中村株は 8000 u/cc, その他は名称の最初の数字で示される濃度に発育可能である。寒天斜面 24 時間の観察では, 64 (8), 128 t (10), 256 A (14), 256 A (13) 及び 256 A (15) の各株に 1.5μ 程度の双球菌様体を認め, 48 時間では, 64 (10) 株に双球菌様体を認めたが, 各株共大部分は正常形であつた。ペニシリン寒天では, 256A (14) 株は 200u/cc で双球菌様体を混へ, 100~6.25 u/cc では正常形であり, 中村株は常に正常形, pf 株は 12.5 及び 6.25 u/cc

表 1. 各種形態の出現時間 (ペニシリン感性 209 p)

濃度 時間	0.005 u/cc				0.05 u/cc				0.5 u/cc				5.0 u/cc			
	双	濃	正	退	双	濃	正	退	双	濃	正	退	双	濃	正	退
0	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—
2	+1	+	+	—	+1	+	±	—	+1.2	+	+	—	—	+	+	—
4	—	++	±	—	++1.3	+/	±	±	+	+	+	±	—	+	+	+
6	++	—	±	+	++	+/	±	±	+	+	±	+	+1	+	±	+
8	++	+	+	+	++2	—	—	+	+	+	—	+	+2	+	—	+
10	++1.5	+	—	+	++/	—	—	+	+ ² ~ _{1.5}	+	—	+/	++1.5	+	—	+
14	+++	+	—	+	++/	—	—	+	+1.2	+	—	+/	+1.2	+/	±	+
16	+++2	±	—	+	+++3	±	—	+	+1.2	+	—	++	+	+/	—	+
18	+++	±	—	+				+								
20	+++	±	—	+	+++3	—	—	+	+1.2	±	±	++	+1.2	+	—	±
24	+++	±	—	+	+++3	—	—	+	+1.2	±	—	++	+	+	—	+/
48	+++3	—	±	+	+++3	—	±	+	+2	—	—	++/	+	+/	—	+/
72	+++3	—	±	+	+++3	—	±	+	+2	+	±	++/	—	++	—	++
6日	++2	—	±	+	+2	—	±	+	+1.2	±	—	+++	—	—	—	+++
7	+1.2	—	±	++	+	±	+	±	+3	±	±	+++	—	—	—	+++
9	—	+	+	+	—	—	+	+	+2	+	±	++	—	—	—	+++

双……双球菌様体
濃……濃染形

正……正常形
退……退行形

±菌体数の多少を示す
数字は双球菌様体の直径(μ)

で双球菌様体のみの集団となっていた。要するに耐性株としての特別な形態は勿論、耐性上昇に際して出現する異常形も或濃度のペニシリンに抗して發育する事に馴れてからは出現せず、又普通寒天培地でも正常の形態を保つものと思われる。

実験 5. 双球菌様体の時間的推移。

a. ペニシリン微量含有培地に於ける所見。ペニシリン濃度は 0.005, 0.05, 0.5 及び 5.0 u/cc とし、各系列に就いて、2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20, 24, 48, 72 時間、6, 7, 9 日に至る所見を観察した。成績を表 4 に示す。0.005 u/cc では、殆どすべての菌が双球菌様体を経て發育し、その数や大きさの推移は、個々の菌のペニシリン感受性によつて変化速度に差異を来す爲と思われる。0.05 u/cc では、大部分の菌は發育を停止するが、特に強い菌だけが双球菌様体となつていと見るべき所見であり、0.005 u/cc の場合より早期に大型の菌が現われるのは、ペニシリンによる形態変化の速度が、その菌の發育し得る限界内で、濃度と正比例の関係にある事を示すものである。この関係は耐性獲得過程の形態変化にも見られる。0.5 u/cc の場合も同様であり、7~9 日に至つて双球菌様体が現れるのは辛じて死滅を免れていた個体が、ペニシリン力價の低下につれて發育を開始した像と思われる。5.0 u/cc では強い菌のみが双球菌様体に

迄は行くが、その後の分裂増殖は阻止され死滅崩壊する過程である。ペニシリンに対し本菌は形態的には双球菌様体という形で先ず反應し、代謝系の適應又は変異を待つて順次正常形に戻るものと思われるが、ペニシリン濃度と個々の菌の抵抗力に應じて、或いは双球菌様体から直ちに死滅過程に入り、又双球菌様体になる迄の時間も区々であり或いは本形態に至らずして死滅するものもあり、その結果がペニシリンによる多形態性となつて現れるものと思われる。〔表 1〕。

b. 純双球菌様体の時間的推移。実験 1 の方法で得た純集団に就いて 4 代 19 日間の形態を観察した。第 1 代 1 日目には典型的な双球菌様体集団が見られ、個体の大きさは、3 μ 、集団は 10 コ内外の個体から成り、2 日目にはその他に分節形及び ghost cell が見られ、3 日目には更に正常形が現れ、以後 7 日目迄少数の双球菌様体と正常形、退行形の混在した状態が続く。7 日目のものを普通ブイヨンに継代すると第 2 代には双球菌様体は次第に減少し、濃染形が増加する。即ちペニシリンの作用から開放されて正常の發育への移行が認められる。第 2 代 6 日目のものを継代すると第 3 代では 4 日間に渡り少数の ghost cell の他は概ね濃染形で排列も本来のブドウ状排列に戻る傾向が見られ、更に第 4 代では、全く正常に戻る。又第 1 代 1 日目から次代に移すと、第 2 代 1 日

目で全く正常に戻りペニシリン接触時間と形態の復帰との間には何等かの関連がある様に思われる。

c. 人工耐性上昇過程に出現した双球菌様体の時間的推移。耐性度を異にするもの 10 株即ち実験 4 の 10 株の中、pf, 中村の 2 株を除く 8 株及び 64 t(8) 株, 32T(7) 株に就いて 48 時間～4 週間に渡つて観察した。耐性菌の場合にも夫々の株の発育し得る最高濃度に於て先ず双球菌様体が現れるが、分裂して漸次正常形に至る経過は前記 b の場合と同一である。尚 10 例中 4 例に於て一旦消失した双球菌様体が再び 2 週間前後に現れているが、分裂増殖に際し、抵抗の弱い個体を生じ、それが残存するペニシリンの作用を受けて再び異常形態となつたものと思われる。

総括並びに結論

ペニシリンの作用によつて生ずるブドウ球菌の異常形態に就いて発生条件、推移及び耐性との関連を追究し、所謂双球菌様体こそ耐性上昇に主役を演ずるものである事を認めた。即ち本形態はペニシリンに対する適應の不完全な時にのみ生じ、又形態上本形態を経る事なく適應が行われる事はない。この関係は耐性の程度にかゝわらず同一で、発育が抑制された状態に於て本形態を生じ、安定した増殖が始ると正常形に戻る。又連続的に耐性を上げる場合には正常形に戻らない内に次第に移す方が効果的で、本形態は更に高濃度のペニシリンに適應する能力に於て正常形に勝る事が解る。次にその時間的推移を見ると、ペニシリン処置による各種の異常形は本形態か

ら第 1 図の経路を経て生じ、この経路は感性菌、耐性菌共同である。本形態は発育可能な限界濃度に於て生ずるが、その後同一濃度又は低濃度培地に於ては、大部分の菌は正常形として発育し、こゝに耐性菌の多形態性の主因がある様に思われる。本形態の細胞学的所見はペニシリンの作用機作に関連し、興味深いものがあるが、第 2 報に述べる。

本論文の要旨は第 7 回日本細菌学会関東支部総会に発表した。(終りに、秋葉教授の御指導を深謝致します)。

主要文献

- 1) 片山良亮: 医学通信, 165, 9, 1949.
- 2) 山田修: 抗生物質研究, 2, 5.6, 1949.
- 3) 森川利美: 医学研究, 21, 10, 1207, 1951.
- 4) 中塚正行: 抗生物質研究, 3, 2.3, 82, 1950.
- 5) 美田秀夫: 日本細菌学雑誌, 6, 3, 196, 1951.
- 6) 城谷勝光他: 日本細菌学雑誌, 6, 3, 201, 1951.
- 7) 安曾正久他: 第 24 回日本細菌学会.
- 8) Pratt R & Duffrenoy J.: J. Bact., 51, 1, 9, 1949.
- 9) Gardner A. D.: Nature, 146, 837, 1940.
- 10) Tulasne R. & Vendrely R.: Nature, 161, 316, 1948.
- 11) Florey, H. W. Chain, E. Heatley, N. G. Jennings, M. A. Sanders, A. G. Abraham E. P. & Florey M. E.: Antibiotics, Vol. II, 1113~1475., Oxford Univ. Pres, 1949.
- 12) 弓削静彦: 日本外科学会雑誌, 50, 8.9, 343, 1949.
- 13) 切目栄: 仁泉医学, 2, 3, 89, 1950.