

ミコバクテリウムの特殊な抵抗性とそれが薬剤耐性獲得に さいして演ずる役割について

2. 消毒剤に対する抵抗性

山 田 修

京都大学結核研究所細菌血清学部 (指導 植田三郎教授)

受付 昭和34年3月14日

結 言

結核菌その他のミコバクテリウム(以下「 M 」と略)の消毒剤に対する抵抗性に関する業績は少なくないが、とくに本邦では井上¹⁾がかなり詳細に記載している。しかしながら従来この種研究においては、この種の菌類を分裂菌とみなして取扱ひ、菌液全体としての抵抗性を薬剤の濃度と作用時間との関係において吟味したにすぎないようであつて、菌液中の個々の菌体の抵抗性に関してはほとんど留意するところがなかつたようである。したがつて菌液中のすべての菌体の抵抗性が一様に強いのかあるいは一部の菌体のみが強い抵抗性を有するのか等の点についてはうかがうべくもなかつた。

著者は前編²⁾において、「 M 」の酸およびアルカリに対する抵抗性を検討した結果「 M 」菌液は分裂菌のそれとは異なつて、著しく抵抗性を異にするところの少なくとも2種以上の菌体から成立ち、その中には特別に強い抵抗性を有する少数の菌体もまた存在することを明らかにした。そしてこのような「 M 」の示す特殊な抵抗性を理解するためには、植田³⁾が闡明したこの種菌類の特別な発育様式と関連せしめて考えるのがより容易であることを示唆した。

本実験においては「 M 」菌液中で昇汞および石炭酸に抵抗して生残る菌体を、経時的かつ定量的に精査して従来の「 M 」の抵抗性に関する業績と対比しさらに進んでは個々の菌体についての抵抗性分布が従来観察せられた分裂菌のそれとどのように異なるかを検討し、前編と同様な観点からこの種の菌の抵抗性の拠りどころを解明する資料とした。

材 料

〔供試菌〕 人型結核菌：H37Rv株、フランクフルト株(以下F株と略)および青山B株。牛型結核菌：牛1号株。BCGおよびVole菌。鳥型結核菌：鳥京株および鳥獣株。雑菌性「 M 」：スメグマ菌およびA I株。対照として分裂菌である大腸菌およびブドウ球菌を用い

た。

〔菌液〕 「 M 」はグリセリンパイオンに37°C 11~14日間培養(A I株だけは発育が速いため5日間)した菌膜を濾紙で脱水後、瑪瑙乳鉢で丁寧に磨碎し1mg/mlの蒸溜水菌液を作り、できるだけ単個菌を得るために、室温(15~18°C)に30分間放置して菌塊を洗滌させ、上清を使用した。大腸菌およびブドウ球菌は24時間パイオン培養5mlを遠洗洗滌して同量の蒸溜水に浮游しさらに100倍に稀釈したものをを用いた。

〔実験その1〕 各種濃度の昇汞および石炭酸に対する抵抗性

各種濃度の昇汞および石炭酸に30分間作用させた場合の菌の生残の様相を知るために下記実験を行なつた。0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01%の昇汞水ならびに0.05, 0.1, 0.25, 0.5および1.0%の石炭酸液を各5ml宛試験管に分注し、上記各型菌の菌液をそれぞれ0.1ml宛加えて混和し、室温(15~18°C)で30分間作用させたのち、蒸溜水で100倍に稀釈し0.1mlを3本宛卵培養基に培養した。人型、牛型および鳥型菌は6週間、雑菌性「 M 」は4週間後に集落数を計算し、それぞれ培養基3本についての平均値を求めた。大腸菌およびブドウ球菌は寒天平板各3枚に混和培養し、37°C 48時間後に集落を計算し、それぞれ平板3枚について平均値を求めた。

この実験は、一定濃度の薬剤に菌を接触させて経時的に生残菌数の消長をしらべるさいに、薬剤の殺菌作用が強すぎたり、または弱すぎると個々の菌体間の抵抗性の差異を識別しがたいから、適当な濃度を選定するために行なつた予備実験である。

図1(昇汞)のごとくA I株は全体として抵抗性が強く、大腸菌はとくに弱いのが、供試人型・牛型・鳥型結核菌およびBCGはいずれも0.005% 30分間で菌液中のすべての菌体が死滅し、また0.0005%では作用が弱すぎることを知つた。したがつて、次の実験(各時間ごとの生残菌の検査)には0.001%を使用するこ

図1 各種濃度昇汞に対する抵抗性 [30分間作用後の生残菌数]

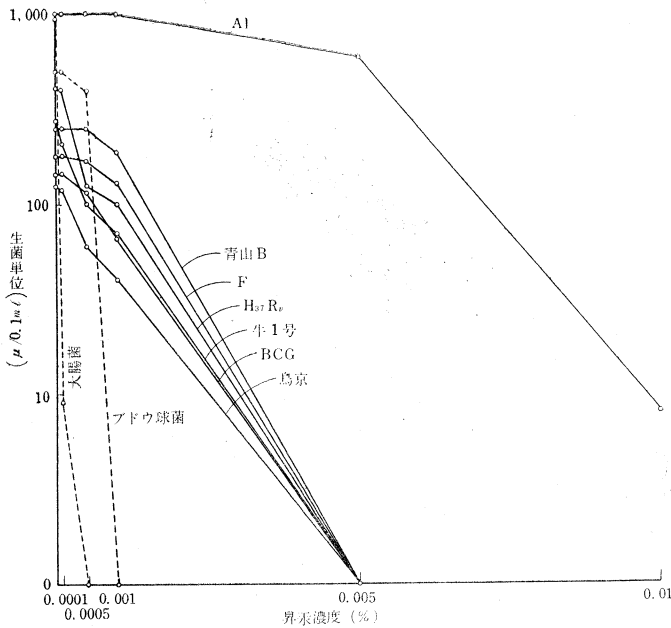
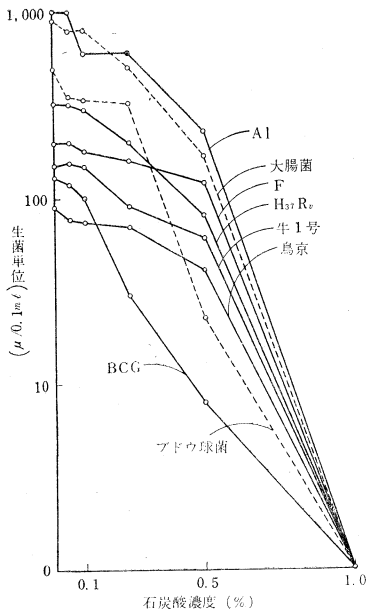


図2 各種濃度の石炭酸に対する抵抗性 [30分間作用後の生残菌数]



とにした。さらに濃度の薄い0.0001%では大腸菌のほかは、細菌の減少がほとんど認められなかつた事実から、0.001%に作用後100倍に稀釈して培養すれば、もはや薬剤の残留による影響は顧慮しなくても差支えないことを知つた。なお図1のごとく0.001%昇汞30分作用後にブドウ球菌はすべての菌体が死滅し、人型・牛型および鳥型菌等では一部の菌体が死滅した。すなわ

ち「ミ」の菌液中にはブドウ球菌と同程度の抵抗性しか有しない菌体が同時に含まれることが明らかになつた。

図2には各種濃度の石炭酸を30分間作用させた場合の生残菌数を示した。昇汞の場合と異なつて、供試各菌株間の抵抗性の差異はさほど顕著でなかつた。1%で30分後にはいずれの菌もすべて死滅し、0.25%では作用が弱すぎたので上記と同じ理由により次の実験には0.5%で各時間ごとの生残菌の消長をしらべることにした。

〔実験その2〕 0.001% 昇汞および 0.5% 石炭酸に対する抵抗性

実験その1を参考とし、一定濃度の薬剤に対する各時間ごとの生残菌数の消長をしらべた。0.001% 昇汞および 0.5% 石炭酸を各5ml分注した試験管に各供試菌液0.1mlを加えて混和し室温において、5~10分ごとに60分にいたるまで、その後は30分ごとに180分にいたるまでそれぞれ0.1mlをピペットで取出し、100倍に稀釈後上述と同様にして培養した。

その成績は図3のごとく、分裂菌(大腸菌およびブドウ球菌)は30分以内に直線的に減少して菌液中のすべての菌体が死滅し、個々の菌体間に抵抗性の幅を認めることは困難であつた。しかるに「ミ」の供試各株においては、菌株間には多少の程度の差はあつたがそれぞれの菌液中には長時間の作用に耐えて生残る菌体があつた。とくに鳥型菌および雑菌性「ミ」AI株は、菌液中に抵抗性の強い菌体が多く180分作用後にもなおかつ生残る菌体が他の菌型、菌株に比べて多かつた。同じ雑菌性「ミ」でもスメグマ菌の抵抗性はAI株とは異なり、人型および牛型菌に近い位置を占めた。人型および牛型菌では、菌液中の一部の菌体は分裂菌と同様に30分以内で死滅したが、60分後には最初の全生菌数の1/15~1/18が抵抗して生残り、さらに60分後、すなわち合計120分の間では殺菌される率は少なく、階段状をなして抵抗するように思われた。このように「ミ」の菌液を構成する個々の菌体間の昇汞に対する抵抗性の幅は、分裂菌に比べると著しく広かつた。

0.5% 石炭酸液中における各時間ごとの生残菌数の消長は図4のごとく、「ミ」だけについてみれば上述昇汞と多少類似の傾向がみられ、ことに鳥型鳥京株および雑菌性「ミ」AI株は、他の菌株、菌型に比較して生残曲線は幾分緩やかであつた。しかしながら、分裂菌と「ミ」との間には昇汞の場合のような顕著な差異はみら

図3 0.001% 昇汞に対する抵抗力
〔各時間ごとの生残菌数〕

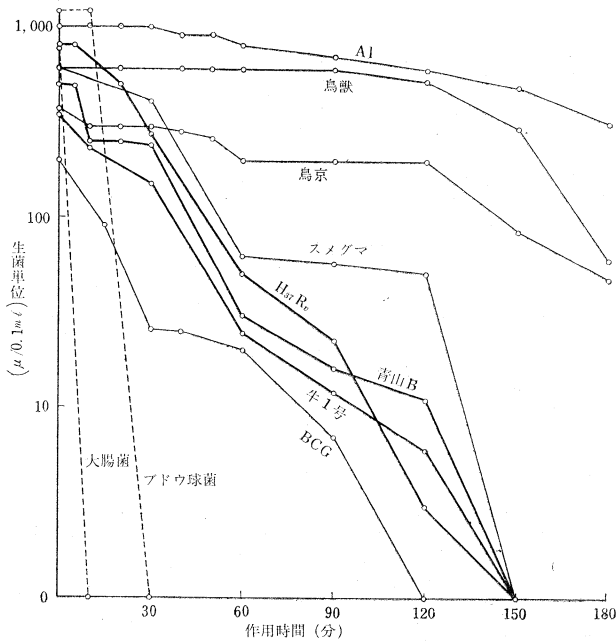
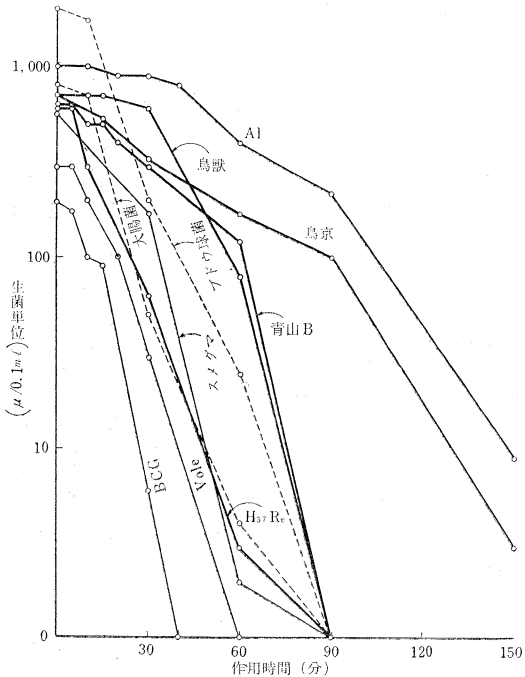


図4 0.5% 石炭酸に対する抵抗力
〔各時間ごとの生残菌数〕



れなかつた。これは薬剤の作用機作の相違によるものと思われる。

総括ならびに考案

消毒剤の代表的かつ古典的な地位を占める昇汞および

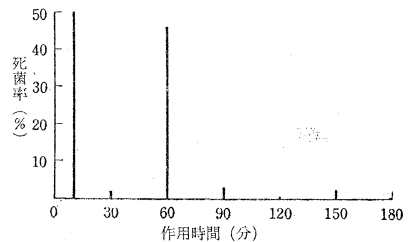
石炭酸を選んで、「ミ」の菌液の抵抗力を個々の菌体のそれに留意しながら検討した。従来昇汞は結核菌およびそれを含む病原材料の消毒にはやや不適當とされ、他方石炭酸の効果は高く評価されている。

上述の実験によつてすでに明らかなように「ミ」の菌液中の個々の菌体についての、昇汞に対する抵抗力の幅は、分裂菌(大腸菌、ブドウ球菌)のそれとは異なつて著しく広いこと、および「ミ」の菌液中にはとくに抵抗力の強い一定少数の菌体が存在することがわかる。しかしながら、0.0001~0.0005% 昇汞を30分間、または0.001% 昇汞を10~30分間作用させることによつて、分裂菌とほぼ同様に速やかに死滅するかなり多数の菌体もまた同時に含まれている点に注意しなければならない。

上記昇汞の場合の実験成績について、さらに詳細に検討するために前編において述べたごとくにして抵抗力の分布図を求めた。すな

わち図3から、各作用時間における死滅菌数のもの全生菌数に対する百分率(%)を求めた。図5はその1例と

図5 0.001% HgCl₂ に各時間作用させた場合
〔青山 B 株の抵抗力分布〕



して人型青山 B 株の抵抗力の分布を示したものである。同図によれば、青山 B 株の菌液は、0.001% 昇汞に対して10分内外のところで死滅する菌体(A群)と60分内外のところで死滅する菌体(B群)、および90分以上抵抗するごく少数の菌体(C群)との、以上3種から成り、かつA群とB群とは非連続性でそれぞれ明らかに体制を異にする菌体から成ると考えられる。このことは前編において述べたところの、酸およびアルカリに対する抵抗力の場合と類似の現象である。

近時、細菌に対する薬物の作用機作は、スルファミンに関する業績以来、代謝拮抗に関する研究が活発になり、その方面の解析を通じても行なわれるようになった(Woodley⁴), Peterson⁵) および Foster⁶) けれども、従来分裂菌に対する消毒剤の殺菌作用に関する数多くの業績(Chick⁷), Madsen⁸), Brooks⁹), Behring¹⁰)

Zinsser¹¹⁾において、時間的な殺菌過程を対数尺で作図すれば、しばしば直線的な函数を示すことから、細菌の死は単分子の反応であると説明された。これは前編においても述べたごとく菌集団 (population) が一様にほぼ等しいような抵抗性の菌体から成つているという仮定に基づいている。近年になつて Jordan & Jacobs¹²⁾ は大腸菌の抵抗性が正規分布を示さないことを明らかにし、また Lamanna¹³⁾ および Dubos¹⁴⁾ は、細菌は増殖過程の各時期において、あるいはその他の条件によつて、生理的、形態的に相違することを述べているが、今回著者が「ミ」に消毒剤、たとえば昇汞を作用させたさいに認められた上述のごとき非連続性の分布、すなわち同一培養中において抵抗性を著しく異にするような菌体が存在することは分裂菌においては未だかつてみられなかつたところである。「ミ」菌液はその抵抗性からみて少なくとも3種以上の菌体から成立つものと察知されると同時に、その中にはとくに抵抗性の強い少数の菌体が存在することは注意されなければならない。

では、このような「ミ」の特殊な抵抗性は、はたして何に起因するのであろうか。諸種の化学物質の殺菌作用の機作については、難解未詳の点が多いけれども、分裂菌に対する昇汞の殺菌作用の1つは、水銀イオンとSH基との結合であつて (Lamanna¹⁵⁾, Dubos¹⁴⁾, Oginsky & Umbreit¹⁶⁾), 細胞内への拡散およびSH基との反応の段階はいずれも可逆的であり、さらに作用が進むと不可逆的となることが知られている。この点は「ミ」といへども現在の段階では、その基本的なものは分裂菌と類似の酵素系に依存していると考えられるから「ミ」においても同様な考え方が許されるであろう。したがつて、「ミ」菌液が昇汞に対する抵抗性からみて少なくとも3種の菌体から成るといふ上述実験成績も、同じ機転によつて、これら3者の水銀イオンに対する感受性の差異によつて現われているのではないかと思う。

「ミ」が諸種の毒性物質に感受性を示しがたい理由として、これが豊富な脂質を有するためと一般には考えられやすいが、前編において述べたごとくこのような脂質が被膜として菌体表面に存在するわけではなく、また脂溶性物質によるよりも水溶性物質の方がはるかによく「ミ」に作用する¹⁴⁾。事実、「ミ」は水溶性栄養物質を容易に利用するし、水溶性ストレプトマイシンによつて顕著な影響を受ける。元来、「ミ」の脂質とか被膜とかいわれているのは、すべての菌体にこれらの物質が一律に含まれているという仮定にすぎず、この種の菌の個々の菌体を分裂菌同様に均一視した考え方である。このような考え方をもつては、上述のごとき、「ミ」菌液が特殊な抵抗性分布を示したり、あるいは水溶性物質がよく影響する等の機転は到底説明しがたい。したがつて「ミ」の抵抗性を理解するための拠りどころは、特別に

異常な代謝とか菌体の脂質、被膜とかを離れて他に求められねばならない。

ひるがえつてこの種の菌の発育様式をみるに、植田⁵⁾はこの種の菌が分裂菌とは異なつたやや複雑な発育を営み、またその発育の過程において、自然に形成せられるところの特別な構造を有する一定の形態が存在することを指摘した。これによつても、「ミ」の各菌体の脂質、被膜あるいはその他の構造を均一視した従来の考え方がいし実験結果の考察の仕方は再検討されねばならぬことがうかがえる。「ミ」の菌液中の菌体が、昇汞に対する抵抗性からみて3種に区別できるという事実は、植田⁵⁾ 16) の発育様式に関する研究、とくに発育の段階によつて菌体の構造が変化するというような所見が、このような事実を理解する一助となるのではないかと思う。一定少数のとくに強い抵抗性を示す菌体についてもまた同様な立場から、その特殊な抵抗性を理解する端緒があるように思われる。

石炭酸の場合には昇汞の場合とは異なつて、「ミ」もまた分裂菌と同様に顕著に影響せられ、微弱な抵抗性しか示さなかつた。これは作用機作が昇汞とは異なるためであろうと考えられるが非常に興味のあることである。元来石炭酸は表面活性剤であり、また非解離の分子としても作用するから、その殺菌作用は著しく強く、その作用はきわめて早い段階で除かぬかぎり完全に不可逆性であるといわれている^{15)~16)}。また表面活性のゆゑに菌体表面に集中し、溶液自身の濃度以上の濃度で作用するであろうが、それが毒性を発揮するには細胞内に拡散滲透することを必ずしも必要とせず、細胞表面のある要素と結合して細胞膜のある機能を傷害すれば殺菌の目的は達せられるといわれる^{13) 14)}。本剤に関するかぎり「ミ」と分裂菌との間に、昇汞におけるほどには顕著な差異が現われなかつたのは、あるいはこのような機転の差異と多少関連するのかもしれない。薬剤の脂溶性と「ミ」の菌体脂質および抵抗性との間に因果関係を確立させがたいことはすでに述べた。作用時間、濃度等についてさらに検討し、他の方法を用いれば、石炭酸に対する「ミ」と分裂菌との抵抗性の差異はもつと明らかになるかもしれないが、この点に関する検討は他日に期したい。

昇汞に対する「ミ」菌液の生残菌曲線ないし抵抗性分布の傾向が、前編における酸およびアルカリに対する場合に近似しており、同じことがまた後編の熱および抗菌物質に対する抵抗性についても認められるのであるが、

「ミ」の抵抗性はこれら各種の影響にさいして、ある相似した傾向を示す。すなわちこれらの影響のそれぞれについて特異性がなく、むしろこれら各種の影響に対して常にほぼ共通したある基本的な態度をもつて対応することにとくに留意しなければならない。

結 論

「ミ」菌液の昇汞および石炭酸に対する抵抗性を、菌液中の個々の菌体のそれに留意しながら、定量的かつ経時的に検討した結果次の所見を得た。

1) 「ミ」の菌液は、昇汞に対して、分裂菌の場合とは全く異なり、顕著に抵抗性を異にする少なくとも3種の菌体から成立ち、とくに特別に抵抗性の強い一定少数の菌体が存在することに注意したい。このことは前編において、酸およびアルカリについて観察した所見と相似している。

2) 「ミ」菌液が昇汞に対して特殊な抵抗性分布を示すこと、とくに一定少数の菌体がとくに強い抵抗性を示す理由を、この種の菌類の有する豊富な脂質ないしは蠟様被膜等に求めることはもはや困難であつて、理解の拠りどころは当然他に求められねばならない。発育様式からする理解はその一助となるものと思う。

3) 石炭酸に対しては、上記実験に使用した濃度あるいは作用時間の範囲内では「ミ」もまた分裂菌と同様に微弱な抵抗性しか示すことができなかつた。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜わつた恩師植田三郎教授に深謝し、上坂一郎助教授の御助言を謝す。

主 要 文 献

- 1) 井上棟樹：熊本医学会雑誌，8：1336，昭7.
- 2) 山田修：結核，34：614，昭34.

- 3) 植田三郎：結核菌の研究 1.形態及び発育様式，南江堂，昭26.
- 4) D.W. Woodlley：A study of antibiotics, Published by John Wiley & Sons, N.Y., 1952.
- 5) A. Peterson & H. Pope：J. Bact., 64：25, 1952.
- 6) J.W. Foster & R.F. Pittilo：J. Bact., 66：478, 1953.
- 7) Chick, H.：J. Hyg., 8：92, 1908；A System of Bacteriology, Vol. 1, 101, 1930, Published by His Majesty's Stationary Office, London.
- 8) T. Madsen & N. Nyman：Z. Hyg., 57：388, 1907.
- 9) Brooks, C.：Botan. Gaz., 42：359, 1906.
- 10) Behring, E. Von：Z. Hyg. Infektionskrank., 9：395, 1890.
- 11) Zinsser & Bayne-Johns：Textbook of Bacteriology, 1939, D. Appleton Century Co. Inc., N.Y., London.
- 12) Jordan, R.C. & Jacobs, S.E.：cited in (13).
- 13) C. Lamanna & M.F. Mallete：Basic Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., 1953.
- 14) R.J. Dubos：The Bacterial Cell, Harvard Univ. Press, Cambridge Mass., 1949.
- 15) E.L. Oginsky & W.W. Umbreit：An introduction to bacterial physiology, Copyright 1954 by W.H. Freeman and Company, Inc.
- 16) 植田三郎：結核，32：181, 241, 昭32.