

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

3. 熱に対する抵抗性

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

緒 言

結核菌その他のミコバクテリウム(以下「 M 」と略)の熱に対する抵抗性については、井上¹⁾、柳沢²⁾らがかなり詳細に検しているが、これらの業績の多くは、いずれも「 M 」菌液全体としての抵抗性を、加熱後の菌液を培養して集落の発育の可能的限界をもつて示したもので、個々の菌体の抵抗性については顧慮穿鑿するところがほとんどなかつた。すなわちこの種の菌類が分裂菌と同じ立場から眺められ、取扱われたことは明らかである。

著者は前編³⁾において、「 M 」菌液の酸・アルカリおよび消毒剤に対する抵抗性を経時的かつ定量的に精査した結果、「 M 」菌液の抵抗性分布は分裂菌とは異なつて非連続性であり、「 M 」菌液は抵抗性が顕著に異なる概略2~3種の菌体から構成せられ、その中にはとくに抵抗性の強い菌体があることを明らかに示した。今回は各種の「 M 」浮遊液を各種の温度で一定時間、あるいは一定温度で各時間作用させ、生残菌数の消長曲線を求め、これと前回の酸・アルカリあるいは消毒剤の場合に得た成績とを比較検討したところ、この場合にもまた「 M 」は酸・アルカリあるいは消毒剤に対するとはほぼ似た様式の抵抗性を示し、分裂菌とは異なつた所見を得たので以下その概略を報告する。

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、RM株。BCG。鳥型結核菌：鳥京株、鳥獣株。雑菌性「 M 」：スメグマ菌、A1株。対照として分裂菌である大腸菌C1株とブドウ球菌寺島株を用いた。

〔菌液〕 供試「 M 」をグリセリン・ピオンに37°C 11~14日間培養(A1株だけは発育が速いため5日間)した菌膜を、濾紙で脱水後瑪瑙鉢で丁寧に磨碎し、0.1mg/mlの蒸溜水浮遊液となし、できるかぎり単個菌を得るために室温(20~23°C)に30分間放置して菌塊を洗滌させ上清を使用した。

〔実験その1〕 菌を浮遊させる媒液の種類が「 M 」の熱抵抗性に及ぼす影響

予備実験として「 M 」の熱に対する抵抗性が媒液の種類を異にすることによつてどのような差異を示すかを検した。鳥京株およびスメグマ菌の菌液をそれぞれキルヒナー液、燐酸緩衝液、生理食塩水および蒸溜水10mlに0.1ml宛加えて振盪混和し、さらに各試験管の内容から、液面および管壁を避けて5ml宛をメスピペットでそれぞれ新しい滅菌試験管の底へ静かに移し、各温度(40, 45, 50, 55, 60および65°C)の重湯煎に管口近くまで十分に深く浸して30分間加熱した。加熱後ただちに取出して流水で冷却し、よく振盪してからそれぞれ0.1mlを卵培養基3本宛に培養し、人型・牛型菌およびBCGは8週間、鳥型菌および雑菌性「 M 」は6週間後に集落数を算えてその平均値を求めた。この場合、対照の分裂菌(大腸菌、ブドウ球菌)は、24時間ピオン培養を上記各液で 10^{-6} に稀釈したものを用い、加熱後0.1mlを寒天平板3枚宛に混和培養し48時間後に集落を計算してその平均値を求めた。

他方、対照として鳥京株および分裂菌(大腸菌、ブドウ球菌)をピオン、10倍稀釈ピオン、キルヒナー液(血清10%, 1%および0%)、燐酸緩衝液、生理食塩水および蒸溜水に浮遊し、加熱せずに室温に放置した場合に、時間の経過に伴い生菌がどれほど減少するかをしらべた。すなわち一定時間ごとに0.1mlを取つて上記同様に培養基に移し発育集落数を算え、それぞれ培養基3本あるいは平板3枚の生残菌数の平均値を求めた。

上述の結果は、図1鳥京株および図2スメグマ菌のごとく、熱に対する抵抗性は媒液の種類を異にすることによつて著しい差異があり、キルヒナー液においてはその影響はもつとも緩徐であつた。また蒸溜水および生理食塩水を使用した場合は、菌株によつても異なるがスメグマ菌は図2にみるようにとくに顕著な影響を受けた。加熱せずに単に室温に放置した場合には、図3鳥京株に

図1 浮游媒液の種類が「ミ」の熱抵抗性に及ぼす影響
〔その1 鳥京株 各温度 30 分間加熱〕

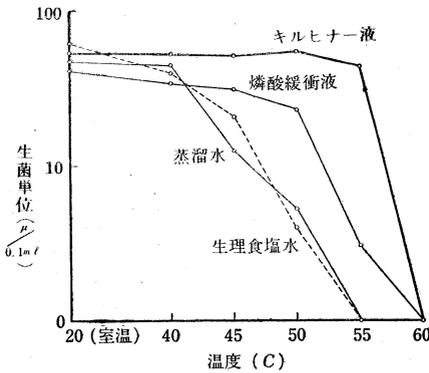


図2 浮游媒液の種類が「ミ」の熱抵抗性に及ぼす影響
〔その2 スメグマ菌 各温度 30 分間加熱〕

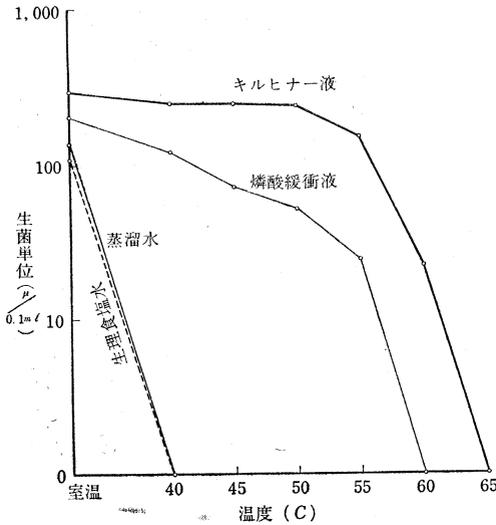
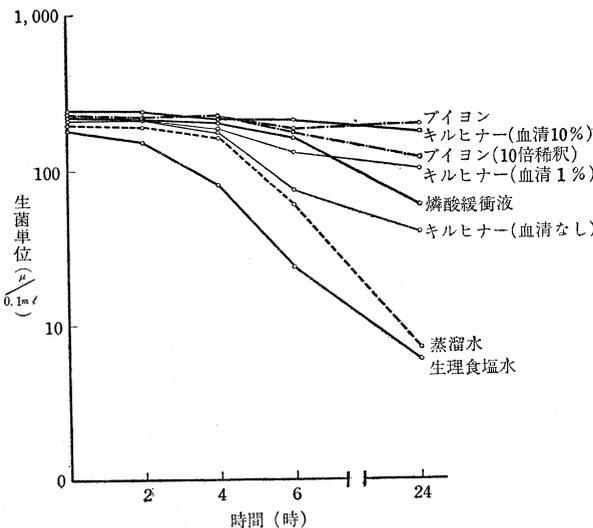


図3 浮游媒液の種類が「ミ」の熱抵抗性に及ぼす影響
〔その3 鳥京株 室温 20~23°C 放置〕



ついてみるごとく、6 ないし24時間後にパイオンおよびキルヒナー液の生菌の減少がもつとも少なく、蒸留水および生理食塩水ではかなり顕著に減少するにいたつた。大腸菌およびブドウ球菌(図4, 5)は、室温においてパイオンおよびキルヒナー液では増殖し、「ミ」とは逆に生理食塩水よりも蒸留水において生菌の減少がより多かつた。このように室温で時間の経過とともに著しく生菌が減少するような媒液を除外して、以後の実験にはキルヒナー液を使用した。

〔実験その2〕 各種温度に 30 分作用させた場合の生残菌数

実験その1と同じ方法で作つた供試各菌のキルヒナー-浮游液を、40, 45, 50, 55 および 60°C に 30 分間加熱後、それぞれ 0.1 ml を培養し、実験その1の方法に準じて発育集落数(生残菌数)の平均値を求めた。

図6のように、大腸菌以外の供試各菌株は 45°C では生菌数にはほとんど影響がなく、50°C ではじめて生菌の減少が認められ、55°C では人型・牛型菌および分裂菌はともに全部死滅したが、鳥型菌および雑菌性「ミ」の菌液中の一定数の菌体は強く抵抗して生残つた。

〔実験その3〕 55°C に各時間作用させた場合の生残菌数

加熱温度が高すぎたりあるいは低すぎると、個々の菌体間の抵抗性の差異は識別しがたいから、実験その2を参考として 55°C を選び、温度を一定にして時間の経過に伴う生残菌数の消長をしらべた。すなわち実験その1と同様の方法で、供試各「ミ」および分裂菌のキルヒナー-浮游液を作り、55°C に加熱し、10 分間ごとに 60 分にいたるまでそれぞれ 0.1 ml を培養して生残菌数の推移を観察した。

図7のごとく分裂菌(大腸菌、ブドウ球菌)は急峻な傾斜をもつてほぼ直線状に下降し、30分後にはすべての菌体が死滅した。しかるに「ミ」ことに鳥型菌、雑菌性「ミ」においては分裂菌と同様に10分間で死滅する菌体がある一方、各時間ごとに一部の菌体が生残の傾向を示し、60分後にもなお少数の菌体が強い抵抗性を示した。人型・牛型菌は分裂菌と鳥型・雑菌性「ミ」との中間に位したが、鳥型・雑菌性「ミ」ほどではないにしても多少それに近似した傾向を示した。

〔実験その4〕 供試菌の培養日数を異にした場合の抵抗性の相違

鳥京株の1週と6週、A1株の1週と6週、ならびにスメグマ菌の1週と8週の培養菌からそれぞれ生理食塩水菌液を作り、実験そ

図4 各種媒液に大腸菌を浮遊 室温20~23°Cに放置
〔生菌数の消長〕

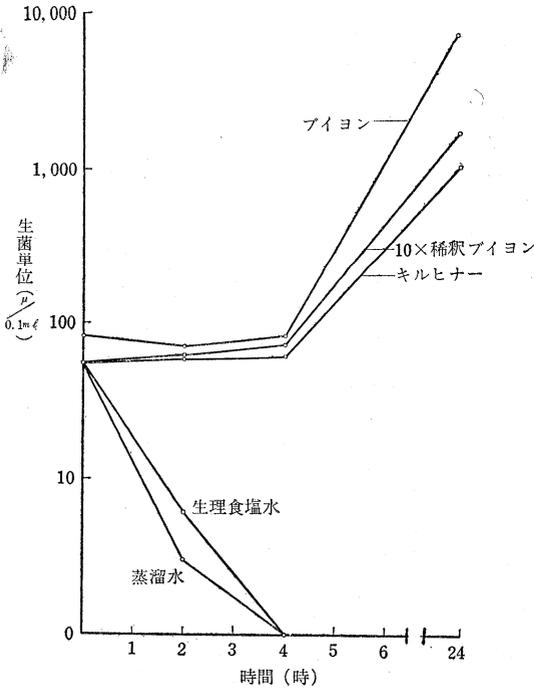
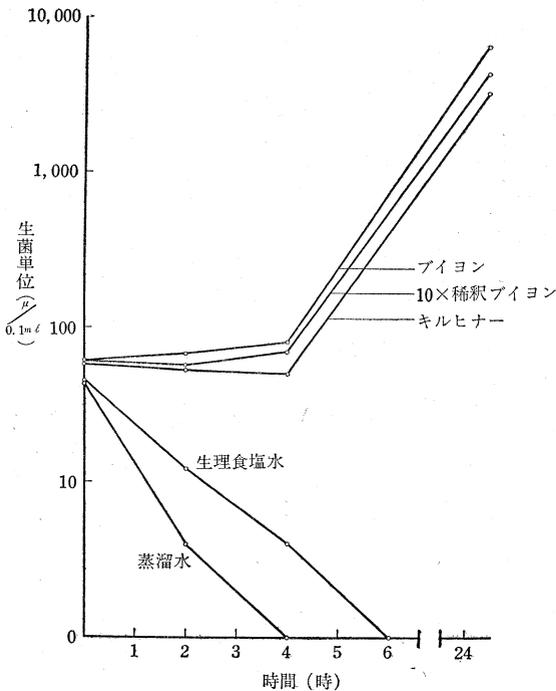


図5 各種媒液にブドウ球菌を浮遊 室温20~23°Cに放置
〔生菌数の消長〕



の1の方法に準じて各温度(40, 45, 50, 55 および 60°C) 30分間加熱後、それぞれ0.1 mlを培養し生菌数(集落)を比較した。対照として大腸菌の24時間と10日間とのアيون培養菌を用いた。

図8のごとくA1株においては、6週培養菌は1週培養菌に比べて抵抗性の強い菌体をより多数含有していた。鳥京株の6週と1週、スゲマ菌の8週と1週培養菌の間にもこれと同様な関係が認められた。すなわち培養日数の長い菌は、短い菌に比べて抵抗性の強い菌体をより多く含有することを知られた。他方、大腸菌では図9のごとく「ミ」とは逆に24時間培養菌は10日間培養菌よりもよく抵抗した。

総括ならびに考案

微生物の熱抵抗性に関連をもつ各種の環境因子は先人の業績にもあるごとくかなり複雑である(4)~(6)。とくに「ミ」の場合は均質な菌液を得がたいという点だけからみても、この種の菌の抵抗性に関する研究は分裂菌のそれのごとく容易でないことが是認せられるが、実験方法においてすでに述べたごとく、上記の点についても十分の注意を払って実験を行ないかつ考案したことはいうまでもない。

上述の実験成績によりすでに明らかなごとく、菌を浮遊させる媒液の種類によつて熱に対する抵抗性は著しく異なるが、その程度は菌の種類によつても差異があり、たとえばスゲマ菌(図2)のごときは、キルヒナー液では他の「ミ」に比べて強い抵抗性を示すにもかかわらず蒸溜水、生理食塩水においては著しく敏感である。また、菌液を室温に放置する場合(図3~5)、たとえば、鳥京株では分裂菌とは逆に生理食塩水菌液におけるほうが蒸溜水の場合よりも生菌の減少が著しい。このことは「ミ」菌液を作るさいに従来慣用の生理食塩水を使用することは再考を要すると思う。磷酸緩衝液の場合における生菌の減少する程度はキルヒナー液と蒸溜水との中間に位する(図3参照)。

さて個々の菌体の抵抗性の差異を識別するために、上記予備実験において知りえたところに従いもつとも適当な媒液として、熱の影響の緩やかなキルヒナー液を用い、かつ温度としては55°Cを選び、経時的に熱に対して抵抗する生菌数の消長曲線(図7)を得た。これによれば分裂菌である大腸菌、ブドウ球菌は、比較的急峻な傾斜をえがいてほぼ直線状に、時間の経過に比例して生菌が減少し、55°C30分後にはすべての菌体が死滅するが、「ミ」ことに鳥型菌、および雑菌性「ミ」の菌液中には分裂菌と同様に30分で死滅するような抵抗性の弱い菌体がある一方で、50~60分後にもなお抵抗して生残る菌体が同時に含まれていることがわかる。このことはすでに前編においてみたところの、酸・アルカリあるいは消毒剤に対する抵抗性と類似の性質であつて強くわれわれの注意を惹くところである。ただこの場合、供試人型・牛型菌およびBCGの抵抗性が鳥型菌や雑菌性「ミ」ほどではなかつたのはこれらの菌に対する熱の影響が酸・アルカリ

図6 各温度 30 分間作用後の生残菌数
〔キルヒナー浮游液〕

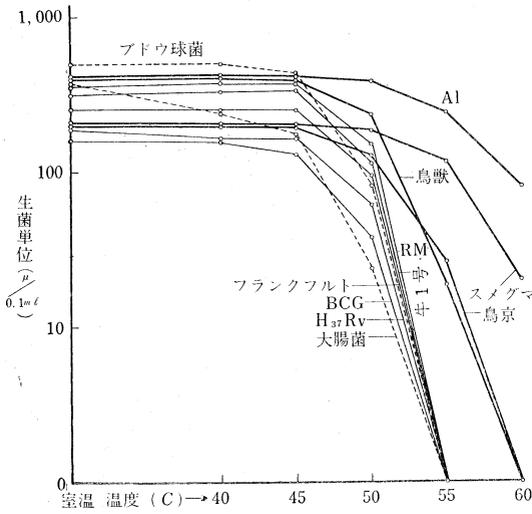
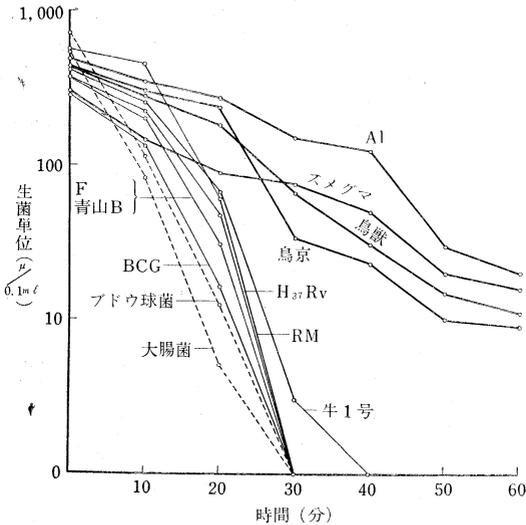


図7 55°C 各時間作用後の生残菌数
〔キルヒナー浮游液〕



等とは多少異なるためではないかと考えられる。

上述の実験成績をさらに詳細に分析するために、図7の中のとえば鳥京株について各観察(作用)時間において死滅する菌数のもとの全生菌数に対する百分率を求めると図10のごとくなる。この図から明らかなように鳥京株の菌液はおおむね10分内外で死滅する菌体と30分内外で死滅する菌体および60分加熱によつてもなお死滅しないごく少数の菌体の以上概略3種から成ることがわかる。このような事実は、「 \equiv 」の発育過程には構造ないしは生活機能の異なるほぼ3種の細胞が形成せられることを暗示するものであろう。この点については後日われわれの研究室における形態学的な研究が解決を与えるであろう。

図8 培養日数を異にした場合の熱抵抗性の差異
〔生理食塩水浮游液 各温度 30 分間加熱〕

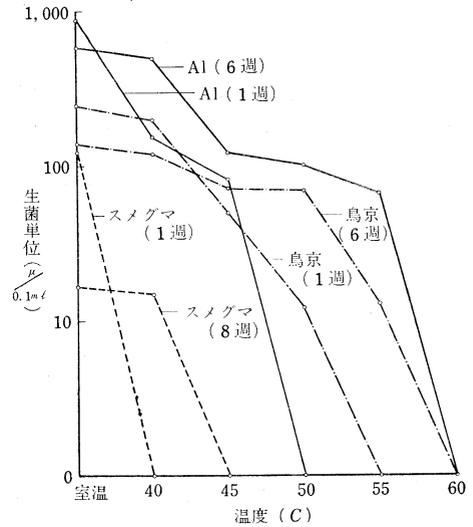
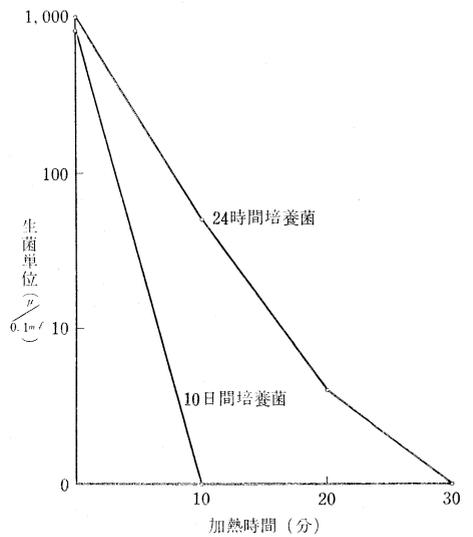


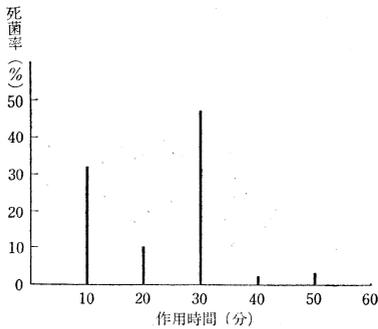
図9 培養日数を異にした場合の熱抵抗性の差異
〔生理食塩水浮游液 大腸菌 55°C 加熱〕



ひるがえつて一般分裂菌に関する殺菌作用の研究^{6)~10)}をみるに、その抵抗性分布が正規分布ないしそれに似た連続性の分布曲線を示すところから、分裂菌の各細胞の抵抗性はほぼ均一視せられた。この点からも上述の著者の得た「 \equiv 」の抵抗性は一般分裂菌のそれとは本質的に異なる。

また、橋本¹¹⁾も認めているように分裂菌の場合とは逆に短時日培養菌よりも長時日培養菌のほうが熱に対する抵抗性が強い。このような「 \equiv 」の培養日数による抵抗性の差異は第1編の酸・アルカリに対するその所見とよく一致する。何ゆゑに陳旧培養の中には抵抗性の強い菌体が比較的多いかという理由の詳細に関しては、今日

図 10 55°C に各時間作用させたときの抵抗性分布〔鳥京株〕



なお具体的な説明はもちろん困難であるが、発育様式となんらかの関連があるのではないかというようなことも考えられる。すなわち「ミ」の発育様式の過程において、自然に形成されるある菌体が不適当な環境において発育力を保持するためにどのように変形するかということ(植田¹²⁾)と関係するのではないかと思う。

前 2 編の酸・アルカリおよび消毒剤に対する所見にさらに上記熱に対する抵抗性所見をあわせ考えると、「ミ」が一般に分裂菌とは著しく異なる特殊な抵抗性を有することがおのずから明らかになってくる。しかもここにみた抵抗性は、酸・アルカリ、消毒剤、熱等、影響する因子の種類を問わずいずれの場合にも共通して非特異的に表現される性質であつて、おそらくは「ミ」の発育のそれぞれの段階における菌体の構造ないしは機能に起因するものと推測される。

結 論

各種の「ミ」の浮游液の熱に対する抵抗性を、菌液中の個々の菌体のそれに留意しながら検討した結果次の所見を得た。

1) 熱に対する抵抗性は、菌を浮游させる媒液の種類によつて異なり、キルヒナー液、プイオンでは強く、蒸溜水、生理食塩水では弱いがとくにスメグマ菌ではその傾向が顕著であつた。対照として室温に放置した場合にも蒸溜水ことに生理食塩水では時間の経過に伴う生菌の減少が著しく、たとえば鳥京株の生菌数は 6 時間後に最初のそのほぼ 1/2 に減少した。この場合分裂菌(大腸菌、ブドウ球菌)は「ミ」と逆に生理食塩水では蒸溜水におけるよりも生菌の減少が少ない。

2) 「ミ」のキルヒナー浮游液を一定温度 55°C に加熱し、経時的に生残菌数(発育集落数)の消長をしらべたところ、人型・牛型菌および BCG は上記実験においてはそれほど明らかではなかつたが鳥型菌、雑菌性「ミ」は

一般分裂菌の場合とは著しく異なり、個々の菌体間の抵抗性の幅が広く、その菌液は抵抗性が顕著に異なる概略 3 種の菌体から成立つことが判明した。すなわち 55°C 10 分内外および 30 分内外で死滅する菌体と、50 ~ 60 分以上にも耐えて生残る抵抗性の強い菌体がある。

3) 前 2 編の酸・アルカリおよび消毒剤に対する所見にさらに上記熱に対する抵抗性の所見をあわせて考えると、「ミ」が一般に分裂菌とは著しく異なる特殊な抵抗性を有することは明らかである。しかもその抵抗性は酸・アルカリ、消毒剤、熱等、影響する因子の種類を問わずいずれの場合にも共通して非特異的に表現される性質であつて、おそらくは「ミ」の基本的な構造ないしは機能に起因するものと推測される。

4) 培養日数の相違によつて熱抵抗性に差異があり、「ミ」の陳旧培養中には短時日培養に比較して抵抗性の強い菌体がより多く含まれることを認めた。その理由についてはここでは深くふれることはできないが、おそらくは陳旧培養中には発育力保持のため特殊な形態が形成されていることと関係するのではないかと考えられる。

御指導と御校閲を賜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，10：1175，昭9.
- 2) 柳沢謙：実験医学，19：137，昭10.
- 3) 山田修：結核，34：614，677，昭34.
- 4) A System of Bacteriology：Vol. 1, 101, 1930, Published by His Majesty's Stationary Office, London.
- 5) Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity：Vol. 1, 101, 1946.
- 6) C. Lamanna & M.F. Mallette：Basic Bacteriology, The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1953.
- 7) Chick, H.：J. Hyg., 8：92, 1908；10：237, 1910.
- 8) T. Madsen & N. Nyman：Z. Hyg., 57：388, 1907.
- 9) Brooks, C.：Botan. Gaz., 42：359, 1906.
- 10) Dubos, R.J.：The Bacterial Cell, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1949.
- 11) 橋本達一郎：日本細菌学雑誌，7：43，昭27.
- 12) 植田三郎：病巣内の結核菌，医学書院，昭32.