

結核菌の SM 耐性発現に及ぼす pH の影響について

岡 武 雄

国立宇多野療養所 (所長 日下部周利)

受付 昭和 35 年 11 月 22 日

I 緒 言

諸種抗結核剤の耐性発現機序の解明の方法として、試験管内で諸種の因子が耐性結核菌の発現にいかなる影響を与えるかを観察し、これより耐性結核菌の発現の機構を探らんとし、まず培地の pH が SM の耐性結核菌の発現にいかなる影響を及ぼすかを検討してみた。

Hurwitz & Miller⁴⁾ は SM 感性人型結核菌は pH 6.0, 7.0 および 8.0 のいずれの培地においても SM 1.0 γ /cc で発育が阻止されるが、SM 耐性結核菌の場合は pH 7.0 で 10 γ に発育し、100 γ 以上で阻止されるものが、pH 6.0 および 6.5 では SM 1,000 γ でも発育が阻止されなかつたと報告し、さらに彼ら⁵⁾ は培地の pH が 6.5 以下になると SM はかえって SM 耐性結核菌の発育を促進し、起始 pH 6.0 ではその結核菌は SM 依存性になるといい、酸性培地が SM 耐性結核菌の発育に適していることを示している。また小嶋⁹⁾ も酸性培地で SM はその一定範囲内で SM 耐性結核菌の発育を多少とも促進することがあるが、SM 感性結核菌ではかかることは認められなかつたと報じている。しかしこれらの実験は酸性の培地が SM 耐性結核菌の発育に適しているとの実験成績であるので、本実験では SM 感性菌から SM 耐性菌に変異してゆく場合に培地の pH はいかなる役目を演ずるかを観察し、2, 3 の知見を得たのでこれを報告する。

II SM の増量的継代培養における培地 pH の影響

(1) 人型結核菌フランクフルト株について

実験方法：使用培地は 10% 山羊血清加 キルヒナー

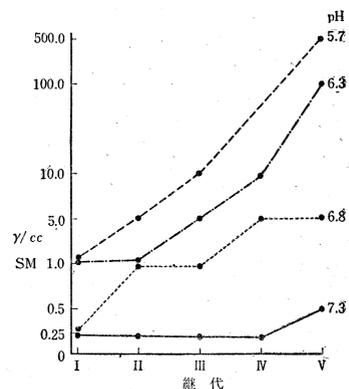
表 1 磷酸塩の組成を変えたキルヒナー培地の pH

培地の pH	KH_2PO_4 g	Na_2HPO_4 g
5.7	2	0
6.5	6	3
6.8	4	3
7.3	1	6
7.4	1	7

磷酸塩の量は水 1,000 cc に対する量を示す

培地である。ただし表 1 に示すごとく、キルヒナー培地の基液の磷酸塩の組成を変えて、相異なる 4 種の pH 値を有する培地を作製した (pH 測定は島津製ガラス電極 pH メーターを使用)。この 4 種の各 pH 培地に SM を 1 cc 中 0, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 γ ……になるように含有せしめ試験に供した。使用菌は 3% 小川培地に 1 カ月培養の F 株菌をガラス球入りコルベンに移し、振盪混和し、生塩水で湿菌量 1 mg/cc の菌液を作り、この 0.1 cc 宛を上記の SM 含有の各 pH 培地に植え培養し、3 週後各 pH の培地で SM を最高濃度に含有する培地に発育をみた菌を小川培地に移植し、1 カ月培養後これに発育した菌を再び上記のごとくして、1 mg/cc の菌液を作り、この菌液 0.1 cc 宛をおのおの相当する pH 値を有する SM 含有キルヒナー培地に移植培養、3~4 週後再び各 pH 培地で上記同様 SM を最高濃度に含有する培地で発育をみた菌を小川培地に移植するといった操作を繰返し、継代 5 代に及んだ。なお参考までに PAS および INH についても上記同様の方法で 3 代まで継代した。

表 2 相異なる pH 培地における SM 耐性上昇曲線 (菌株: F 株)



実験成績：表 2 に示すごとく、第 1 代で pH 5.7 および 6.3 の培地で 1 γ /cc (以下 1 γ のみとし /cc を略) SM 含有培地まで菌の発育をみるに對し、中性およびアルカリ性の培地では SM 0.25 γ までしか菌の発育をみなく、代を重ねるに従い、SM 耐性となる速度は pH が低いほど早く、結局 5 代継代で pH 5.7 の

培地では結核菌は 500 γ SM 耐性となつたのに対し、pH 7.3 の培地の結核菌はわずかに SM 0.5 γ に耐性となつたにすぎなかつた。なお pH 5.7 の培地で 500 γ 耐性となつた菌は中性培地でも同様に 500 γ SM 耐性となつていた。

なお PAS および INH についても同様の実験を継代 3 代まで行つたところではかかる傾向を認めなかつた (表 3, 4)。

表 3 相異なる pH 培地における PAS の耐性上昇曲線

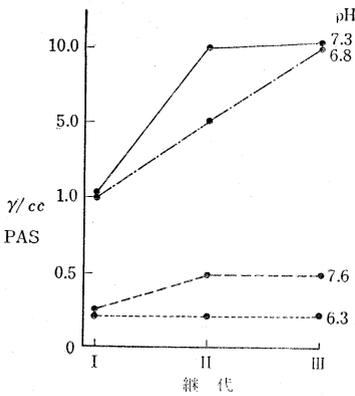
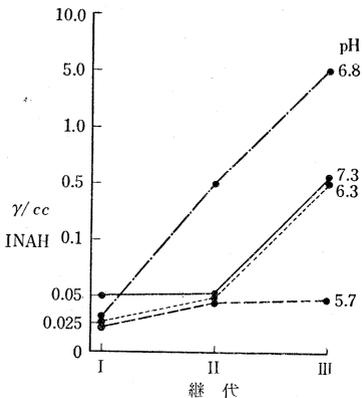


表 4 相異なる pH 培地における INH の耐性上昇曲線

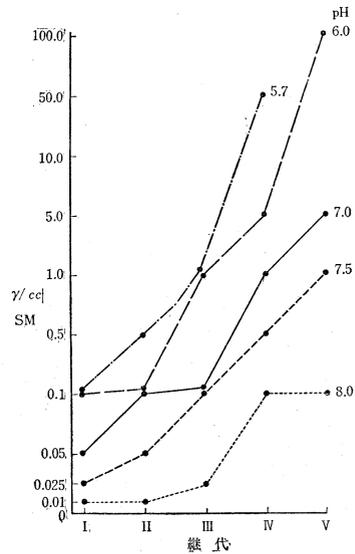


(2) 枯草菌について

実験方法：培地はブイオンを HCl および NaOH で修正し、pH 5.6, 6.0, 7.0 および 8.0 の 5 種の培地を用い、これらの培地のそれぞれに SM を漸増的に含有せしめ、この各種培地に寒天培地 1 日間培養の枯草菌を 1 白金耳宛移植し、2 日間培養後、各 pH 培地で SM 最高濃度含有培地に発育した菌を、おのおの 1 度普通寒天培地に移植培養し、2 日後その培養菌の 1 白金耳宛を各相当する pH のブイオン培地に移植するといった操作を繰返し、継代 5 代目まで行つた。

実験成績：この場合も表 5 にみるごとく培地の pH

表 5 各 pH 培地における SM 耐性上昇曲線 (菌：枯草菌)



が低いほど、SM 耐性菌は早く出現するのを認める。

III 各種 pH 培地でおのおの最高濃度の SM 含有のものに発育した結核菌の SM 耐性度の比較について

前回の実験では継代にさいして、小川培地に発育した菌の同量について、継代したもので、生菌数がはたして同数であつたか否か不明であるので、本実験では相異なる pH の 1 系列の SM 含有培地で一度結核菌を培養した場合、培地の pH は次代の SM 耐性発現にいかなる影響を与えるかを、接種生菌数を測定して検討してみた。

実験方法：菌株は人型結核菌 H₃₇Rv 株で、培地は Dubos Tween Albumin 培地を使用した。すなわち Dubos 培地は Difco の製品で、これを所定のごとく作製すると、培地の pH は 6.9 となる。この培地とこの培地 100 cc に対しそれぞれ KH₂PO₄ 0.4 g, Na₂HPO₄ 0.4 g および Na₂HPO₄ 0.6 g を別々に加え、pH 6.4 7.3 および 7.6 の 4 種の相異なる pH 培地を用いた。この各培地に Dubos 培地に 2 週間培養した H₃₇Rv 菌を 0.1 cc 宛加え、2 週培養後各 pH の培地で SM を最高濃度に含有するものに発育してきた菌液を採り、おのおの生塩水で洗滌して、おのおの生塩水で比濁により同濃度の菌液として、おのおのの 0.1 cc 宛を 1 系列の SM 含有 1% 小川培地に移植し、同時にそのおのおのの 0.1 cc 中の接種菌数を小川培地によつて測定した。

実験成績：表 6 にみるごとく、酸性培地で SM 1.0 γ まで菌の発育をみるに對し、中性あるいはアルカリ性

表6 培地のpHの差によるSMの抗菌価の比較 (H₃₇Rv Dubos Tween Albumin)

培地 pH	γ/cc SM									培養 日数
	0	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.5	5	
6.4	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	-	14日
6.9	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	
7.3	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	
7.4	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	
6.4	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	±	-	21日
6.9	≡	≡	≡	≡	±	-	±	-	-	
7.3	≡	≡	≡	≡	±	-	-	-	-	
7.4	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	

≡：菌の発育による濁濁のために全く培地の不透明となつたもの
 ≡： " " やや不透明のもの
 ±：培地透明であるが、わずかに菌の発育を認めるもの
 -：培地透明で、菌の発育全く認めないもの

表7 各pHの培地でSM最高濃度含有培地に発育した菌のSM耐性度

菌	γ/cc SM						培養 日数
	0	1	2.5	5	10	100	
pH 6.4 SM 1γ+		≡	≡	≡	≡	≡	14日
pH 6.9 SM 0.25+		+	+	+	-	-	
pH 7.3 SM 0.25+		+	15	-	-	-	
pH 7.4 SM 0.25+		+	3	-	-	-	
pH 6.4 SM 1γ+	38×10 ⁵	≡	≡	≡	≡	≡	28日
pH 6.9 SM 0.25+	65×10 ⁵	≡	≡	≡	≡	5	
pH 7.3 SM 0.25+	18×10 ⁵	≡	20	200	30	-	
pH 7.4 SM 0.25+	71×10 ⁵	≡	200	+	73	30	

≡：コロニー多数で互いに融合し、培地全面にわたるもの
 ≡： " " 培地の一部部に止まるもの
 ≡：コロニー多数であるが、互いに融合していないもの
 +：コロニーの数 300~500 コ
 数字：コロニー数

培地では SM 0.25 γ までしか菌の発育をみない。そこで pH 6.4 で SM 1.0 γ に発育した菌と pH 6.9, 7.3 および 7.4 の培地に発育した菌について各 SM 耐性度を比較したのであるが、その結果は表 7 にみるごとく、培養 28 日目で SM 100 γ の小川培地で pH 6.4 からの菌は非常に多数のコロニーを認めるに対し、pH 6.9 でコロニー 5 コ、pH 7.3 で 0 コ、pH 7.4 で 30 コと酸性よりの菌と中性あるいはアルカリ性培地よりの菌との間には有意の差が認められる。なおこの場合

接種生菌数は pH 6.4 のものがとくに他より多数ではなく、pH 7.3 のものを除いて、ややより少数でさえあつた。ただし本実験ではなんらかの培地条件で SM 耐性菌が異常に多く発現しているの、さらに今度は Dubos 培地の pH を HCl および NaOH で修正して pH 6.2 と pH 7.4 について、上記同様にして、SM 10 γ 含有小川培地に発育したコロニー数を比較してみたが、この場合も pH 6.2 の培地よりの菌は 1 cc 中 65 コの SM 10 γ 耐性菌を算したに対し、pH 7.4 の培地よりの菌はわずか 2.5 コにすぎず、この場合の接種菌数もほぼ同数であつた。

IV 各種 pH の培地で SM を同濃度に含有する培地に発育した菌の SM 耐性度の比較について

実験方法：Ⅲの実験と同じ材料ならびに方法で行つた。ただ今度は各 pH の培地で、いずれも SM 0.25 γ 含有培地に発育した菌について、SM 含有小川培地でおのこの SM 耐性度を比較した。

表8 各種のpH培地でSM同濃度(0.25γ/cc)含有培地に発育した菌のSM耐性度

菌の種類	γ/cc SM					
	0	1.0	2.5	5.0	10.0	100.0
pH 6.4の培地菌	5.0×10 ⁷	13×10 ⁴	100	0	0	0
γ 6.9 "	4.0×10 ⁷	27×10 ⁶	1,000	750	250	50
γ 7.4 "	12.0×10 ⁷	20×10 ⁴	700	270	10	0

接種菌：H₃₇Rv, 培地：1%小川培地, 培養日数：35日
 各欄の数字は各培養菌 1cc 中の菌数を示す

実験成績：表 8 にみるごとく、今度は先と反対に酸性培地よりの菌は中性あるいはアルカリ性培地よりの菌より SM 耐性度が低い。すなわち pH 6.4 よりの菌は SM 5 γ, 10 γ の小川培地で菌の発育を全く認めないのに対し、pH 6.9 ではコロニー 100 コを認め、また pH 7.4 でもわずかではあるがコロニーを認めた。その他も同様の傾向を認めた。この場合も接種生菌数はほぼ同数であつた。なお本実験は Dubos 培地の pH を磷酸塩で修正したものであるが、これを HCl, NaOH で修正して同様の実験を行つたが同様の結果を得た。

V 考 察

Ⅱにおいて述べた実験成績にみるごとく、それぞれ pH の異なる培地で SM の増量的継代培養を行うと、結核菌および参考までに用いた枯草菌ともにその SM 耐性発現は明らかに培地の pH が低いほど早く現われ、こ

れは前述の Hurwitz⁴⁾ や小嶋⁹⁾ らの SM 耐性結核菌が酸性培地で発育が促進されるという成績と相通ずると考えられる。しかし上述の実験には種々の条件が加わっているので一応これを考察する必要がある。まず培地の pH を変えるのに 磷酸塩を用いているが、同時に行った培地 pH の修正を NaOH, HCl でしても同様の結果を得ているので、これは考慮に入れる必要がない。次に結核菌の発育至適 pH であるが、これは諸家¹¹⁾ により弱酸性あるいは中性付近とされているが、Dubos¹⁾ らは pH 6.7~6.4 であるとしている。もし結核菌の発育至適 pH が酸性であるために上述の結果がでるものとすれば、PAS および INH でも同様の結果が得るはずであるが、かかる傾向は両者では、3 代までの継代ではあるが、認められなかった。したがって結核菌の発育至適 pH が SM 耐性発現に影響を及ぼしているとは考えられない。次に SM が酸性でその力価を減少するために上述の結果がでたのではないかということである。事実結核菌以外の菌については酸性の環境は SM の力価を減少させると報じられている^{2) 3) 6) 6)}。しかし結核菌では小嶋は SM は酸性側でその抗菌価を減少するといっているが、Hurwitz, 白井¹⁰⁾ は pH 6.2~7.4 では SM の力価に差異がないといっている。また松尾⁷⁾ もキルヒナー培地では pH 7.2 で SM の力価は最強でついで 6.2, 6.8 の順となり、ソートン培地では pH 7.2 の培地で SM の力価は他に比し弱いといっており、必ずしも結核菌においては酸性の環境が SM の力価を減少するとは限らないようである。しかし本実験の Dubos 培地を用いての結果では明らかに酸性で SM の力価は減少している(表 6)。このことは IV の実験成績からでも明らかである。すなわち相異なる pH 培地で、SM の同濃度含有培地に発育した菌についておのおの SM 耐性を調べると酸性培地よりの菌は中性あるいはアルカリ性からのそれより SM 耐性菌の発現率は低い。これは酸性で SM の力価が減少するために、それだけ SM による SM 耐性菌の発現に対する Selection が弱く、したがって SM 耐性菌の発現率が低くなったと考えられる。かく酸性の環境は SM の力価を減少するので、相異なる pH の培地で SM を最高濃度に含有する培地に発育した菌はたとえ酸性培地で SM のより高濃度含有培地まで菌の発育を認めたと

しても、当然他の pH 培地の菌と同程度に SM の発育阻止作用を受けているはずである。したがって各 pH 培地よりの菌の SM 耐性分布は等しいはずである。しかるに実際は III に述べた実験成績のごとく、酸性培地で SM の最高濃度含有に発育した菌がもつとも SM 耐性度が高い。したがって酸性の環境で SM の効菌価が下ることより上述の酸性ほど早く SM 耐性菌ができるということを説明することはできず、他のなんらかの因子により SM の増量的継代培養をするとき酸性の培地ほど早く SM 耐性菌が出現するといえる。

VI 結 論

結核菌を SM の増量的継代培養すると pH の低い培地ほど早く SM 耐性菌が発現する。また相異なる pH の SM 含有培地で一度結核菌を培養し、おのおの SM 最高濃度含有培地に発育した菌について、SM 耐性分布を調べてみても酸性培地のものがもつとも SM 耐性度が高い。しかしこれは SM の同濃度に発育した菌の場合は反対に酸性培地の菌がもつとも SM 耐性度は低い。以上のことより酸性は SM の抗菌価を減弱するが、しかも SM 耐性発現に対しては促進的に働くなんらかの因子があると考えられる。

文 献

- 1) Dubos, R.J. & Middlebrook: Am. Rev. Tuberc., 56: 334, 1947.
- 2) Geiger, W.G., Green, S.R. & Waksman, S.A.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 61: 187, 1946.
- 3) 早野正己: J. Antibiotics, 2: 24, 1948.
- 4) Hurwitz, C. & Miller, J.B.: Am. Rev. Tuberc., 62: 91, 1950.
- 5) Hurwitz, C. & Miller, J.B.: Am. Rev. Tuberc., 63: 568, 1951.
- 6) 加藤嵩一・大島宏作: ペニシリン, 3: 307, 昭24.
- 7) 松尾吉恭: J. Antibiotics, 5: 11, 1952.
- 8) 宮村定男: J. Antibiotics, 4: 295, 1951.
- 9) 小嶋三喜男: 広島医学, 8: 306, 昭29.
- 10) 白井茂: 抗酸菌病研究雑誌, 8: 157, 昭27.
- 11) 戸田忠雄: 結核菌と BCG, 南山堂, 41, 昭19.