

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

1. 硫酸および苛性ソーダに対する抵抗性

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) の抵抗性に関しては、たとえば酸・アルカリ、消毒剤、熱、あるいは光線等に対する抵抗性についてすでに多数の報告^{1)~5)}をみるが、芽胞を有しない分裂菌の抵抗性に比して概して強いとされている。とくに、酸・アルカリに対する特殊な抵抗性は周知の事実である^{4)~8)}。しかしながら、従来行われてきた抵抗性の検査方法は「 M 」菌液全体としての抵抗性の限界を知ろうとしたのにとどまり、菌液中の個々の菌体のそれについては顧慮穿鑿するところがほとんどなかつた。すなわち従来「 M 」の抵抗性もまた分裂菌のそれとほぼ類似した立場から眺められたことは明らかである。しかるに上述のごとく酸・アルカリに対する抵抗性の1例をみてもこのような見地からは説きかたい事実と考えられる。このような点についてはすでに古くから蠟燭被膜の存在、豊富な脂質の含有等をその拠りどころとする説がないではないが、このような説明は今日既に取上げられないことはいうまでもない。ひるがえつてこの種の菌の発育様式が分裂菌とは基本的に異なることはすでに植田⁹⁾によつて闡明されているのであるから、この点からもこの抵抗性の問題は大きいに再検討されなければならないと考える。著者はこのような見地から「 M 」の抵抗性を再検討すべく酸・アルカリ、消毒剤、熱および抗結核剤に対するそれを、常に菌液中の個々の菌体の抵抗性に留意しつつ検索することを企てた。なおこのようにして得られた抵抗性の理解にたつて薬剤耐性獲得機作の一端をうかがおうと試みた。

まず本編においては、硫酸及び苛性ソーダに抵抗して生残する菌体を経時的かつ定量的にできる限り詳しく追究して、「 M 」菌液全体としてではなくその中の個々の菌体についての抵抗性の分布を明らかにしようとした。

材 料

〔供試菌〕 人型結核菌：H37 Rv 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 号株および RM 株。BCG。鳥型結核菌：鳥京株および鳥嶽株。雑菌性「 M 」：スメグマ菌および AI 株。対照の分裂菌としては大腸菌 CI 株とブドウ球菌寺島株を用いた。

〔菌液〕 「 M 」はグリセリンパイオンに11~14日間 37°C に培養した菌膜 (AI 株は発育が早いので 5 日間培養) を濾紙で脱水後瑪瑙乳鉢でていねいに磨碎し 1mg/ml 蒸溜水菌液を作り、できるだけ単個菌とするために室温に 30 分間放置後、上清を使用した。大腸菌およびブドウ球菌は 5 ml のパイオンに 24 時間培養したものを遠沈洗滌し生理食塩水 5 ml に浮遊させさらに 100 倍に稀釈して用いた。菌液濃度についてはあらかじめ検討し、濃度が高すぎても低すぎてもこの種実験には供しがたいので下記実験成績中に示すごとく適当濃度のものを使用した。

〔実験その 1〕 各種濃度硫酸に対する抵抗性

各種濃度の硫酸 (1/16, 1/12, 1/8, 1/4, 1/2, 1.0, 1.5, 2.0 規定液) を 5 ml 宛試験管に分注し、上述菌液 0.5 ml を加えて振盪混和し、30 分間室温 (17°~20°C) で作用させてから、附着した薬剤が引続き卵培養基上で影響するのを可及的除去するために蒸溜水でそれぞれ 100 倍に稀釈し、その 0.1 ml を卵培養基 3 本宛に培養した。人型・牛型菌は 6 週間、鳥型および雑菌性「 M 」は 4 週間後に集落数を算え、それぞれの場合培養基 3 本についての平均値を求めた。対照の大腸菌およびブドウ球菌は各 3 枚宛寒天平板に混和培養し、48 時間後に集落を算えそれぞれの場合平板 3 枚についての平均値を求めた。上述各種供試菌のうちたとえば鳥型鳥京株、人型 F 株、牛型牛 1 号株および雑菌性「 M 」AI 株、スメグマ菌の成績を示せば図 1 のごとくである。この実験は一定濃度硫酸を菌に接触させて経時的に生残菌の消長をしらべる場合に、硫酸の殺菌作用が強すぎたり、逆に弱すぎると個々の菌体間の抵抗性の差異を識別することが困難となるから、適当な濃度を選定するために予備的に行つたものであるが、この図からもすでに明

図1 各種濃度の硫酸に対する抵抗性
30分間作用後の生残菌数

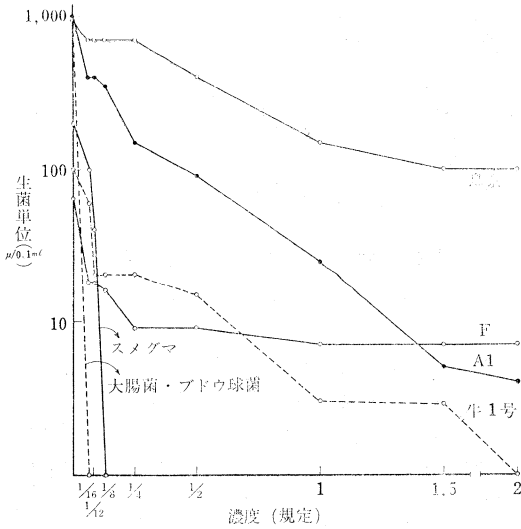
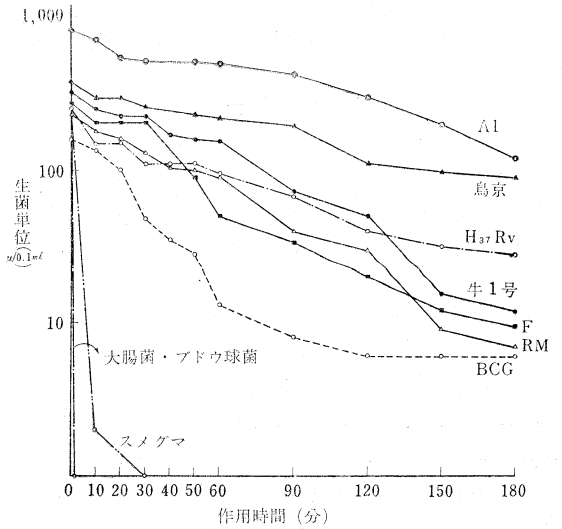


図2 1規定硫酸に対する抵抗性
各時間作用後の生残菌数



らかなように「ミ」と分裂菌とではその抵抗性に著しい差異があることがうかがえる。すなわち、分裂菌である大腸菌およびブドウ球菌ではもつとも稀薄な 1/16 N 硫酸ですべての菌体が死滅した。スメグマ菌は同種の A1 株と相違して他の「ミ」に比べると著しく敏感であつたがその他の供試「ミ」菌液では、分裂菌に類似して低濃度ですでに死滅する菌体がかかなりの数含まれていることがまず注意をひいた。しかして生残した菌体は濃度がそれ以上に増加しても、その死滅する割合は比較的小であることが次に注意せられた。たとえば F 株あるいは牛 1 号株をみるに、大多数の菌体は低濃度の硫酸で死滅したが、1.5~2.0 N 30 分間作用後においてもなおかつ一部少数の菌体が生残した。鳥型菌はやや趣きを異にし、低濃度硫酸に影響されることは少なく 1/2 N 内外でかなり殺菌されたがこの場合にもまた上述人型・牛型菌と似た経過を辿つた。すなわち硫酸濃度の点からみても菌液中の個々の菌体の抵抗性にはかなり顕著な差異があることは明らかになつた。

〔実験その 2〕 1 規定硫酸に対する抵抗性

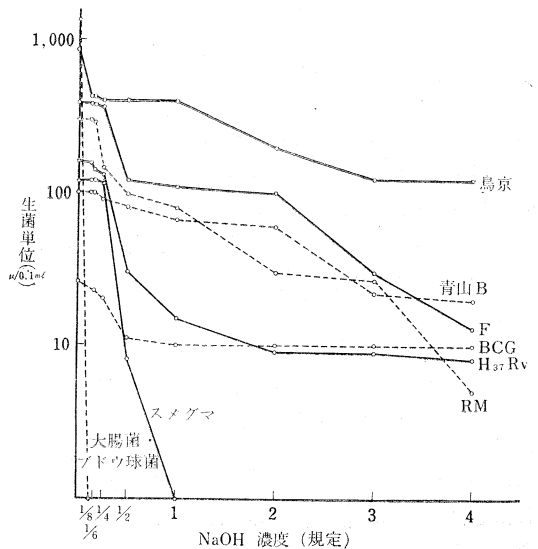
実験その 1 を参考にして 1N 硫酸各 5 ml に前述と同様にして各菌株の菌液を 0.5 ml 宛混和して室温に放置し、10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150 および 180 分後にそれぞれ 0.1 ml を実験その 1 と同様にして培養し生残菌数の消長をしらべた。その成績は図 2 のごとくである。(青山 B 株および鳥京株はそれぞれ F 株および鳥京株に似た曲線であつたから図中から略した。)この場合にも前述のように分裂菌である大腸菌およびブドウ球菌はきわめて短時間に菌液中のすべての菌体が死滅したが、スメグマ菌を除くその他の供試各「ミ」相

互の間にはそれぞれ多少の差異はあつたがいずれもよく抵抗し、時間の経過とともに生残菌は漸減したが、2~3 時間後にもなお依然として一定数の菌体は生残つた。たとえば BCG をみるにおよそ 60~90 分までに比較的急速に死滅したがここで生残つた菌はよく 3 時間後にも抵抗した。すなわちこれらいずれの「ミ」の菌液においても個々の菌体の抵抗性の間には作用時間の点からみてもかなり顕著な差異があることが明らかになつた。

〔実験その 3〕 各種濃度苛性ソーダに対する抵抗性

実験その 1 と同様の方法によつて、各種濃度の苛性ソ

図3 各種濃度苛性ソーダに対する抵抗性
30分間作用後の生残菌数

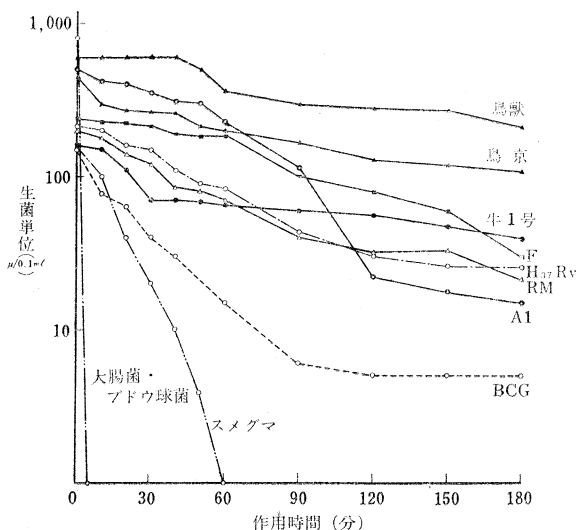


ーダ (1/8, 1/6, 1/4, 1/2, 1, 2, 3 および 4 規定液) を 30 分間作用させ、100 倍に稀釈後 0.1 ml 宛を培養して生残菌数を計算した。その結果は図 3 にみるようであつて、実験その 1 (硫酸) とほぼ類似した傾向を示した。すなわち分裂菌である大腸菌およびブドウ球菌ではもつとも稀薄な 1/8N ですべての菌体が死滅した。しかるにスメグマ菌を除くその他のミはこれに反して比較的強く抵抗した。しかしこれを詳細に検討すると、その菌液中には分裂菌と類似して低濃度で死滅した菌体がかなりの数含まれていることがまず注意をひいた。しかし生残した菌体は濃度がそれ以上増加してもその死滅する割合は比較的小であることが次に注意せられた。たとえば人型 F 株あるいは牛型 RM 株をみるに、大多数の菌体は低濃度 (1/6~1/4N) 苛性ソーダで死滅したが、1.5~2.0N 30 分間作用後にもなおかつ一部少数の菌体が生残した。鳥京株はやや趣きを異にし低濃度苛性ソーダ (1/6~1/4N) に多少影響され、1/4~1.0N では影響されることはなく、それ以上 3N までにおいては再び多少影響せられ、ここで生残した菌体は 4N にもよく耐えた。すなわち苛性ソーダの濃度の点からみてもそれぞれの菌においてその菌液中の個々の菌体の抵抗性にはかなり顕著な差異があることが明らかになつた。

〔実験その 4〕 1/2 規定苛性ソーダに対する抵抗性

実験その 3 を参考とし、1/2N 苛性ソーダ 5 ml に前述

図 4 1/2 規定苛性ソーダに対する抵抗性 各時間作用後の生残菌数



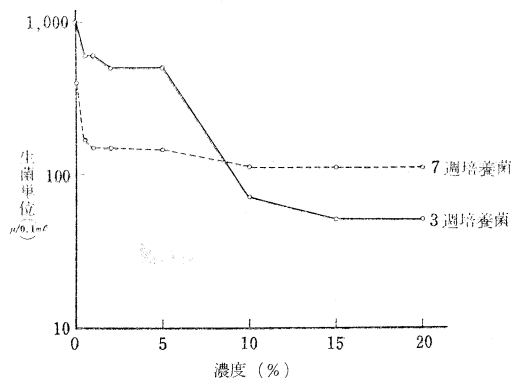
と同様にして各種菌液を 0.5 ml 宛混和して室温に放置し、10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150 および 180 分後にそれぞれ 100 倍に稀釈し 0.1 ml 宛培養して生残菌数の消長をしらべた。すなわち図 4 に示すごとく

実験その 2 にほぼ類似した傾向を示し、この場合にも分裂菌である大腸菌およびブドウ球菌はきわめて短時間に菌液中のすべての菌体が死滅したが、スメグマ菌を除くその他の供試各「ミ」相互の間にはそれぞれ多少の差異はあつたがいずれもよく抵抗し時間の経過とともに生残菌は漸減したが、3 時間後にもなお依然として一定数の菌体は生残した。たとえば BCG をみるにおよそ 90 分までに比較的急速に死滅したが、ここで生残した菌はよく 3 時間後にも抵抗した。すなわちこれらいずれの「ミ」の菌液においても個々の菌体の抵抗性の間には作用時間の点からみてもかなり顕著な差異があることが明らかになつた。

〔実験その 5〕 培養日数を異にする F 株の各種濃度硫酸に対する抵抗性の相違

供試菌 F 株の培養日数を異にする場合、抵抗性に差異があるかどうかを知るために、実験その 1 と全く同じ手続きによつて、各種濃度の硫酸に 3 週および 7 週培養菌を 30 分間作用させ生残菌数の消長の様相を比較したところ、図 5 のごとく、培養 3 週の菌も同 7 週の

図 5 培養日数を異にする F 株の各種濃度硫酸に対する抵抗性の相違 30分間作用後の生残菌数

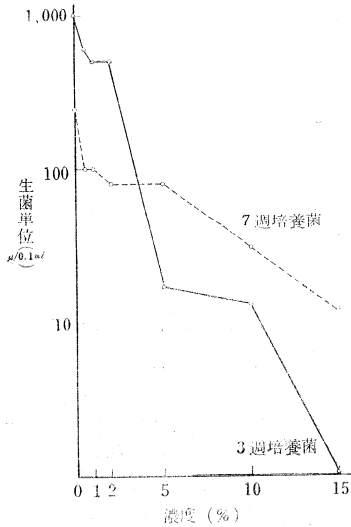


菌もともに低濃度硫酸には顕著に影響せられたが、2~5% ではともによく抵抗した。次に 5~10% においては 3 週菌は顕著に影響せられたにもかかわらず 7 週の菌は比較的抵抗し、10% 以上の濃度においては両者ともに強く抵抗した。すなわち 3 週の菌液中には 7 週の菌液に比較して 5~10% の間において顕著に影響せられる菌体をかかなりの数含有することがわかつた。

〔実験その 6〕 培養日数を異にする F 株の各種濃度苛性ソーダに対する抵抗性の相違

上記実験その 5 と同様にして、供試菌 F 株の 3 週および 7 週培養菌を各種濃度苛性ソーダに 30 分間作用させ生残菌数の消長を比較した。すなわち図 6 のごとく、

図6 培養日数を異にするF株の各種濃度苛性ソーダに対する抵抗性の相違
30分間作用後の生残菌数



上記実験その5(硫酸)の場合と類似の傾向を示し、7週菌は3週菌に比して抵抗性菌体を比較的多数含有することがわかった。3週菌も7週菌もともに0.5%には顕著に影響せられたが1~2%ではともによく抵抗した。次に2~5%においては7週菌はほとんど影響を受けなかつたにもかかわらず3週菌は顕著な影響を受けた。5%以上の濃度においては3週菌は死滅しきつたにもかかわらず7週菌は一定数が残存した。

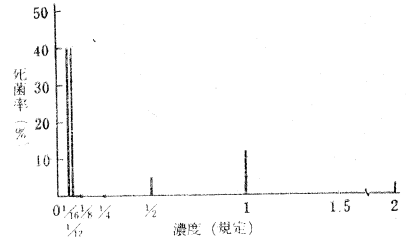
総括ならびに考察

「ミ」が酸およびアルカリに対して特殊な抵抗性を示すことは周知であるが、このことに関しては菌液中の全ての菌体が、均しく分裂菌の菌液におけると同様にそれに関与するかのごとく一般には考えられがちである。しかるに上述の実験成績からみれば「ミ」の菌液中にはその抵抗性が弱く、分裂菌のそれと逕庭のない菌体があり、また他方で抵抗性が著しく強い菌体が同時に含まれていることがわかる。さきに植田ら¹⁾も結核菌の菌液中には5%硫酸によく抵抗する菌体がある一方で、0.5%のそれにも抵抗しえないものがあることを観察したが、「ミ」菌液中の個々の菌体についてみればその抵抗性の巾が分裂菌に比べて著しく広いことは明らかである。著者は従来の研究者が行ってきたように、菌液中のすべての菌体が死滅する限界(濃度あるいは時間)をもつてその菌の抵抗性として示すごとき方法にあきたらず、時間を追つて、あるいは濃度に従つて死滅してゆく菌体を詳細に追跡した結果、上掲図1~4にみるごとき成績を得た。もとより供試菌株相互の間には差異があり、ことに雑菌性スゲマ菌の弱いこと等が注意をひく。この点興味はあ

るが少数の供試菌株からは、それが病原性と関連することなのか、あるいはまた菌型となんらか関係することなのか、ここではわかに判断しがたい。

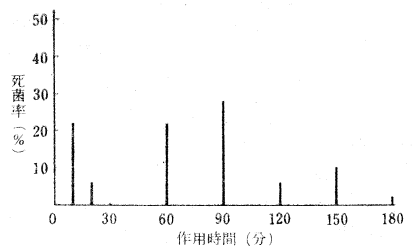
上記実験から2, 3の例を抽出して「ミ」の上述のごとき特異な抵抗性を一応考察してみたい。図1における牛1号株の場合について硫酸の各濃度ごとに死滅する菌のものと全生菌数に対する百分率(%)を求めると図7のごとくである。この図をみるに、牛1号株菌液中の菌

図7 各種濃度硫酸に30分間作用させた場合牛1号株の抵抗性分布



体は低濃度硫酸の作用によつて1/16Nにおいては40%が死滅し、この率は1/12Nにおいても同値であるが1/8および1/4Nにおいては死滅せず、1/4Nをこえると残存生菌は再び徐々に死滅しはじめるものごとく、1/2Nでは5%、次では1Nにおいては12%を示す。以後硫酸濃度が1.5Nに増加しても残存菌は死滅せず、2Nにいたつてはじめて死滅する。すなわち死菌率からみれば3つの峰があることがわかる。すなわち1/16~1/12, 1/2~1.0および2.0Nのところにおける峰である。同様にして硫酸濃度を一定にして(1N)作用時間を変えた場合の死菌率をみると図8のごと

図8 1規定硫酸に各時間作用させた場合牛1号株の抵抗性分布



くであつて、前述図7と多少相違するが基本的には類似の傾向を示していることは明らかであつて、概略10~20分作用で死滅する菌体、60~90分作用および150分の作用ではじめて死滅するところの抵抗性を異にする3種の菌体がこの場合にもまた菌液中に同時に存在することが判断できるようである。鳥型鳥京株および雑菌性A1株の場合にもほぼ同様であつて、N/2苛性ソーダ作用時における死菌率は図9, 10のごとくである。すなわち菌液中には短時間の作用で死滅する菌体と長時間の

図 9 1/2 規定苛性ソーダに各時間作用させた場合
A 1 株の抵抗性分布

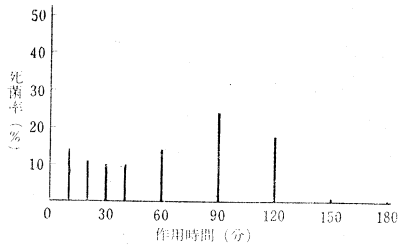
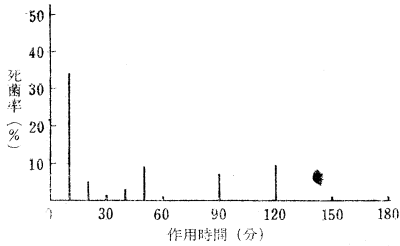


図 10 1/2 規定苛性ソーダに各時間作用させた場合
鳥京株の抵抗性分布



作用後にはじめて死滅する菌体とが含まれることが同様に明らかである。

なお培養 3 週菌と 7 週菌とでは抵抗性に差異があることを明らかにしたが、これは、培養日数によつて菌膜あるいは集落を構成する菌体 (抵抗性を異にする) の割合が違つてゐることを考えさせる。形態学的な抛りどころについては後日われわれの研究室からさらに公けにするが、温熱その他に対する抵抗性についてもまた検討したいと考えている。

従来分裂菌については殺菌過程の動態的観察の方法として、生残菌数 (また反対に死菌数) を定量した実験はかなり多く (Behring 11), Chick 12), Porter 13) およびその他 14) 15)) これら研究の大多数において、生残菌数を対数尺で作図すれば、しばしば直線的な函数となることが知られており、これは観察の各時間中に細菌の死滅する割合が一定であることを示すものであるから、かつては薬剤の殺菌に関する式と 1 分子反応とが同一視された (Chick 12), Madsen & Nyman 16)). すなわち、菌集団 (population) 中のすべての菌の抵抗性を均一視した。近年にいたつて Jordan & Jacobs ら 17) の検討によつて、非対称性の連続性の分布曲線を得て細菌集団 (大腸菌) の抵抗性が均一であるという仮説は成立しないことが明らかにされ、それに影響する因子として La-manna 8) は培養基上菌の発育する部位の相違、あるいは分裂サイクルの段階および個体の大きさ、重さ、横断隔壁形成の段階等をあげている。しかるに「ミ」の場合には上記実験成績のごとく死菌率が薬剤濃度の増加あるいは作用時間の長さにつれて、非連続的な 2 ないしそれ以上の峰を形作つた。このような事実は未だかつて分裂

菌においては観察されなかつたものであつて強くわれわれの注意をひくところである。この点からみれば、「ミ」の菌液は概括的にいつて著しく抵抗性を異にする少なくとも 2 種の菌体から構成せられていることが明らかであつて上記大腸菌およびブドウ球菌と比較して本質的に相違することを考えさせる。「ミ」のこのような特殊な抵抗性が果して何に起因するかは十分に検討せられなければならない。この点に関しては在来からいわれる豊富な菌体脂質あるいは蠟様被膜による解釈があるが、これらのいずれもが憶測の範囲をでないものであつて (Dubos 19), 著者 20) もかつて形態学的にいわれる菌体表物質の存在を検討したがそのようなものを認めることはできなかつた。最近 Hart 21) もまたストレプトマイシンその他の水溶性物質が結核菌に顕著に作用する事実から反駁しているが、本来これらの解釈はこの種の菌を分裂菌とみなし、したがつて菌液中の菌体を均一視するところから出発しているものであるから、抵抗性の点からみて上記私の確かめえた「ミ」の特殊な抵抗性の様相を説明するには不備であることは明らかである。

この問題の解明には、もとより各面からする慎重な検討を要することはいうまでもないが、さきに植田 9) はこの種の菌がやや複雑な発育様式を営むところの、分裂菌とは異なる菌類であることを明らかにし、その特殊な抵抗性の抛りどころを発育の一定の段階にある菌体の構造に求めべきことを示唆した。上述のごとき実験において確かめえた「ミ」の特殊な抵抗性ないしは菌液中に含まれる抵抗性の強い菌体を理解するための手掛りを上述のごとき発育様式に立脚する考え方に求めることができるのではないかと考える。このような考え方にたつ方が「ミ」の特殊な抵抗性を理解しやすいのではないかと考えて上述のような検討を繰返したのであるが、はたしてこの種の菌がとくに抵抗性が強く、しかも抵抗性は菌液中の菌体がすべて一様に保持するものではなくて、個々の菌体について差異があり、いわば抵抗性の巾は顕著に広いことを知りえた。それをさらに詳しくみると、とくに死菌率からみるとわかりやすいが、菌液は本来酸、アルカリの濃度あるいはそれらの作用時間からみて、概括的にいつて抵抗性の異なる 2 種ないしそれ以上の菌体から成立つことをほぼ明らかにすることができた。このことは「ミ」の発育の配列の中に、構造、生活機能の異なる概略 2 種以上の細胞があることを暗示するものと考えられ、後日形態学的な研究が解決を与えるであろう。さらに各種消毒剤、温熱および抗結核剤に対する抵抗性についてもまた以下において同様な立場から検討を加えたいと考えるが、上記のような所見はこの種菌類の抵抗性を考える 1 つの新しい抛りどころを提供するものと思う。

ここで現在結核菌その他の「ミ」の分離培養に際し普く賞用されている硫酸あるいは苛性ソーダによる前処置法

について一応考えてみたい。上記実験と実際の分離培養とは菌の存在するメヂウムが異なることはもとより顧慮しなければならないが、これらの方法が可能なることはもちろん上記実験成績からみて明らかであるが、ただここで、上記実験成績からみて、これら分離培養法で发育してくる菌数が病原材料中にあらかじめ存在した生菌数のすべてを示すものでないことは十分注意せられねばならない。

結 論

各種の「ミ」の菌浮游液を各種濃度の硫酸または苛性ソーダに一定時間(30分)作用させた場合、あるいは一定濃度の硫酸(1N)および苛性ソーダ(N/2)に各時間作用させた場合の生残菌数の消長を、個々の菌体についての抵抗性に留意しながら詳細に検討したところ次の結果を得た。

1) 硫酸あるいは苛性ソーダに対する「ミ」の抵抗性は従来からいわれているように著しく強い事を確認した。そして高濃度あるいは長時間の作用にも耐えて生残る菌体があった。

2) これを個々の菌体についてみると、抵抗性の非常に弱いものから顕著に強いものいたるまで種々あり、抵抗性の巾が広いことがわかった。

3) 生残菌数とくに死菌率からみて明らかであるが、ある一定の濃度あるいは作用時間からみて、抵抗性の点からみれば「ミ」菌液は2種ないしそれ以上の菌体から成ることを明らかにした。

4) 適当に古い培養菌膜から作った菌液には抵抗性の強い菌体が、若い培養から作った菌液に比べてより多数含まれていた。

5) この種の菌の特殊な抵抗性は豊富な脂質、あるいは蠟様被膜の考え方で到底説明できない。当然他にその抛りどころを求めなければならない。

御指導と御校閲を賜わった恩師植田三郎教授に深謝するとともに、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) H.J. Corper & M.L. Cohn：Am. Rev. Tuberc.，28：856，1933。
- 4) 住吉彌太郎：結核，3：16，大14。
- 5) 笹生菊夫：結核，13：338，昭10。
- 6) 占部薫：福岡医学会雑誌，21：341，昭12。
- 7) 井上棟樹：熊本医学会雑誌，8：1336，昭7。
- 8) G.A. Splendlove, M.M. Cummings & R.A. Patnode：Am. Rev. Tuberc.，60：628，1949。
- 9) 植田三郎：Rev. Tuberc.，19：984，1955；21：95，1957；結核菌の研究，1. 形態および发育様式，南山堂，昭26；病巣内の結核菌，医学書院，昭32。
- 10) 植田三郎・大岩弘治：結核，25：348，昭25。
- 11) Behring, E. Von：Z. Hyg.，9：395，1890。
- 12) Chick, H.：J. Hyg.，8：92，1908；10：237，1910。
- 13) Porter, J.R.：Bacterial chemistry and physiology, John Wiley and Sons, New York, 1946。
- 14) Jordan-Burrows：Textbook of Bacteriology, 15th Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia & London, 1950。
- 15) Zinsser & Bayne-Johns：Textbook of Bacteriology, D. Appleton-Century Co. Inc., N.Y., 1939。
- 16) T. Madsen & N. Nyman：Z. Hyg.，57：388，1907。
- 17) Jordan, R.C. & Jacobs, S.E.：cited in (18)。
- 18) C. Lamanna & M.F. Mallete：Basic Bacteriology, The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1953。
- 19) Dubos, R.J.：The Bacterial Cell, Harvard Univ. press Cambridge Mass., 1949。
- 20) 植田三郎・山田修：東京医事新誌，63：3，6，昭25。
- 21) P.D'Arcy Hart：Am. Rev. Tuberc.，59：223，1949。