

葡萄状球菌の「ペニシリン耐性 株に関する研究

金沢大学医学部第一内科教室(主任 谷野教授)

阿 部 利 夫

Toshio Abe

(昭和29年12月6日受附)

目 次

第1章 緒 言	第7項 「フォスファターゼ」
第2章 実験方法及び実験材料	第8項 「カタラーゼ」
第3章 実験成績及び考按	第9項 「デオキシノ現象
第1項 被染色性	第10項 「アミノ酸代謝
第2項 集落及び形態	第11項 菌体磷分層
第3項 糖分解能	第4章 実験成績総括
第4項 胆汁抵抗性	第5章 結 論
第5項 「ペニシリン分解酵素	文 献
第6項 琥珀酸脱水素酵素	

第1章 緒 言

細菌が一定の化学薬品に対し感受性をもつている時その細菌が滅殺されるには不十分な濃度の薬品に反覆さらされると一般にこの細菌の薬品に対する感受性は次第に低下し減弱するものである。所謂細菌の薬品耐性獲得である。このことに関しては既に生体内及び試験管内において種々細菌と各種薬品株に抗生物質とについて幾多の研究者によつてその研究の結果が発表されている。ことにその抗生物質としての歴史が最も古い「ペニシリン」においては過去数年間急速に研究が進んでいるのである。而して「ペニシリン」に対して比較的耐性を獲得し易い葡萄状球菌(以下葡球菌と略記する)が多くの場合その研究対照とされて最も早くから研究され Rammelkamp¹⁾, McKee²⁾, 野村³⁾及び高嶋⁴⁾等による研究報告がある。一方葡球菌の「ペニシリン耐性獲得は如何なる機作のもとに発生す

るものであろうかという問題に関しては幾多の研究により諸説があり未だ解明したとはいえない現状である。即ち Demerc. M (1945)⁵⁾, Luria (1946)⁶⁾, Braun⁷⁾及び秋葉等⁸⁾による突然変異説があり又 Hinshel-Wood C. N. (1946)⁹⁾等により提唱された環境に対する適応性を高めこの獲得形質は遺伝されるとする適応現象説がある。又 E. F. Gale (1948)¹⁰⁾は細菌の代謝機能から解明せんとし更に Abraham¹¹⁾, Chain (1940)¹²⁾, Kirly¹³⁾等は「ペニシリン分解酵素に耐性獲得の機作を求めんとした。余は各種葡球菌を分離し分離菌株に「ペニシリン耐性を獲得せしめたものと然らざるものと間における生物学的及び細菌学的諸性状の変化を究明し耐性獲得の機作の解明に寄与せんとしてこの研究を始めた。

第2章 実験材料及び実験方法

各種化膿性疾患の患部より排膿物をとり 2.5%普通寒天平板に塗抹し 37°C, 24時間の培養後葡萄球菌を分離しこれを母菌株とした。なお排膿採取に先立ちつては先に「ペニシリン」を用いたことがないものを選んだ。かくして得た黄色葡萄球菌 3株, 白色葡萄球菌 3株, 橙色葡萄球菌 3株, 黄色葡萄球菌 寺島株 及び黄色葡萄球菌 F.A.D. 209P 株の計11株についてこれら母菌株の発育を著しく阻止するが完全に阻止し得ないような濃度の「ペニシリン」を含むブイヨン培養液中に累代培養をなし「ペニシリン」は菌の耐え得る範囲内に逐次増加しその耐性の増強をはかつた。かくして各株は16代にして母菌株の40乃至 100 倍に「ペニシリン耐性」を獲得したので、これを耐性株として以後の各実験にあて

た。なお発育観察時間は 37°C, 24時間乃至48時間とし、使用ブイヨン培地は照内ペプトン, 肉エキスを用い、pH は 7.2 とした。寒天を混ぜる場合には 2.5%となし混合に用いた「ペニシリン」は標準ペニシリンを用いた。

以上の如くにて得られた母菌株11株, 更にこれらから耐性を得させた耐性株11株について細菌学的検索及び生物学的検索を以下述べる方法によつて行いその差異を追求した。特に細菌学的方面の検索に際しては従来のブイヨン培地及び普通寒天培地を主として用い、生物学的方面の検索に際しては時に必要に応じ半合成培地を利用した。

第3章 実験成績及び考按

第1項 被染色性

「グラム染色により母菌株と耐性株の染色性を比較したる所母菌株は正常なる染色性を示したが耐性株では一様の染色性を示さず「グラム陽性なるも濃淡種々の像を呈した。しかし「グラム染色の陰性化を示したものは見ることが出来なかつた。このことは既に Bellany, W.D. etc ¹⁴⁾, 中村 ¹⁵⁾, E. F, Gale ¹⁶⁾ によつて報告されている所であり余の成績を全く一致している。母菌株中先天的に抗ペニシリン性なる3株においても他の母菌株と同様であつた。

第2項 形態及び集落

各菌株は耐性獲得と共に菌体は膨化して大小不同を示し時に双球菌状にならぶものも認めら

れた。又正常の葡萄球菌集落は正円形、湿潤で滑沢であり菌株独得の色素を産生するものであるが耐性株における集落は小形、粗糲、顆粒状を呈し菌苔は菲薄となり一般に色素の産生は減退し時には灰白黄色の色調を呈するに至る、即ち S型より R型に変異を来す。而してこの変異を越したる菌即ち耐性株においては「ブイヨン培地 37°C, 24時間の発育状態を見るに明らかに母菌株と比較して緩慢であつた。このことは 24Gardner (1940) ¹⁶⁾, Miller (1944) ¹⁷⁾, Thomas (1945) ¹⁸⁾, Altire-Werber (1945) ¹⁹⁾ 等の詳細な報告によつて明らかである。第1表は先述の第1項, 第2項の成績を掲げた。

第1表 被染色性・菌体・集落の変化

菌株名	グラム染色	菌体の変化	集落の変化	色素産生の状態	ペニシリン感受性 u/cc
1 耐1 Staphylys. albus	グラム(+)	正常型	厚, 灰白色	正常白色	25.0
	グラム(+) なれど所々に染色不良の もの認む	菌体の膨化する もの少数なれど あり	薄, 灰白色	灰白色	1000.0
2 耐2 Staphylys. albus	グラム(+)	正常型	厚, 灰白色	正常白色	25.0
	グラム(+) なれど染色不良のもの あり	菌体の大小不同 のものあり	薄, 灰白色	灰白色	1000.0

3	Staphylo. aureus	グラム(+)	正常型	厚, 黄色	黄色	25.0
耐3		染色不良にして双球菌様のものあり	大小不同のものあり	灰白黄色を帯び粗糲なり	斜面培養の周辺は灰白色, 内は黄色	1000.0
4	Staphylo. aureus	グラム(+)	正常型	厚, 黄色	黄色	0.5
耐4		染色不良にして一様でない	膨化して大小不同あり	薄, 黄色なるも粗糲なり	斜面培養の周辺は灰白色, 内は黄色	20.0
5	Staphylo. citreus	グラム(+)	正常型	橙色の厚き苔	橙 色	0.025
耐5		染 色 不 良	膨化して大小不同あり	粗糲にして灰白色の薄き苔	帯黄灰白色	1.0
6	Staphylo. aureus	グラム(+)	正常型	黄色の厚き苔	黄 色	0.5
耐6		染 色 不 良	膨化して大小不同のものあり	粗糲にして薄き苔	帯黄灰白色	20.0
7	Staphylo. citreus	グラム(+)	正常型	橙色の厚き苔	橙 色	0.5
耐7		染 色 不 良	膨化して大小不同のものあり	粗糲にして薄き苔	帯黄灰白色	20.0
8	Staphylo. albus	グラム(+)	正常型	白色の薄き苔	白 色	0.025
耐8		染色不良にして「フクシン」調強きものあり	膨化しておる	粗糲にして灰白色の薄き苔	灰 白色	1.0
9	Staphylo. citreus	グラム(+)	正常型	橙色の厚き苔	橙 色	0.02
耐9		染 色 不 良	膨化しておる	粗糲なる薄き苔	帯黄灰白色	2.0
寺	Staphylo. aureus	グラム(+)	正常型	黄色の厚き苔	黄 色	0.025
耐寺		グラム(+) ^{なれど} 「フクシン」の調強きものあり	膨化して大小不同あり	粗糲なる薄き苔	斜面培養の周辺は全白色の調あり, 内は黄色	1.0
209P	Staphylo. aureus	グラム(+)	正常型	黄色の厚き苔	黄 色	0.01
耐209P		グラム(+) ^{なれど} 「フクシン」の調強きものあり	膨化して大小不同のものあり	粗糲なる薄き苔	斜面培養の周辺は灰白色の調あり, 内は黄色	1.0

(註. No. 1, No. 2, No. 3 株は分離時既に 25u/cc 以上の「ペニシリン耐性であつた。)

第3項 糖分解能^{20, 21)}

pH 7.4 の「ブイオン培地に1%の割に「アラビノーゼ」, 「グルコーゼ」, 「ズルチワト」, 「マンニット」, 「ストローゼ」, 「サツカローゼ」, 「ガラクトーゼ」, 「ラクトーゼ」, 「レブローゼ」及び「ラムノーゼ」の各種糖加培地を作製し標示薬として 0.2% Brom thymol blue を 0.5% の割に加えたものに各菌株を接種 37°C, 24時間培養の後に各菌株の糖分解能を検した。接種菌量が一定であるようにするために各菌株の「ブイオン培地 37°C, 24時間のものを一白金耳

をとり更に「ブイオン培地 37°C, 4時間培養のもの一白金耳をとりこれにあてた。成績は第2表に示すが如くであるがこれについては耐性株とその母菌株との間において糖分解能に差異があるとする一派と又差異を認めないとする一派がある。京大柴田, 石上²²⁾等は各種糖分解能を検討し, これが母菌株に比べて稍々おくれていることを発表した。余の成績においては「グルコーゼ」, 「マンニット」, 「サツカローゼ」, 「ラクトーゼ」, 及び「レブローゼ」が全菌株によつて分解せられ「ガラクトーゼ」のみが No. 5,

7, 9 及びそれらの耐性株において分解されなかつた。又「アラビノーゼ」, 「ズルチット」, 「ヌトロローゼ」及び「ラムノーゼ」は全菌株において分解されなかつた。更に母菌株により分解されるがそれらの耐性株は分解しない, 又その逆の場合等は見られなかつた。

第2表 糖 分 解 能

菌 株	糖 種 類	アラビノーゼ	グルコーゼ	ズルチット	マンニット	ヌトロローゼ	サツカロローゼ	ガラクトローゼ	ラクトロローゼ	レブローゼ	ラムノーゼ
1		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐1		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
2		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐2		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
3		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐3		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
4		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐4		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
5		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
耐5		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
6		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐6		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
7		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
耐7		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
8		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐8		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
9		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
耐9		-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
寺		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐寺		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
209 p		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
耐209 p		-	+	-	+	-	+	+	+	+	-

第4項 胆汁抵抗性

胆汁は種々なる細菌に対して溶菌的に作用し特に結核菌に対してはその弱毒株を得る方法に用いられている。即ちこのものは細菌の原形質に対して何らかの影響を与えることが推察されているのである。余はこの点に留意して耐性株とその母菌株との間に何らかの生物学的差異なきやと考へこの実験を行つた。実験方法として

は母菌株及び耐性株を5%, 10%, 20%及び40%の牛胆汁加ブイオン培地に接種, 培養37°C, 24時間後その一白金耳をとり普通寒天平板に移植培養し37°C, 24時間培養後菌の發育の有無と検した。即ち第3表に示す如く40%においては全株においてその發育を見なかつたが20%においては耐性株 No. 6, 9 の二株においては母菌株より發育が良く寺島株においては耐性株は稍々發育がおとつていた。10%及び5%においては母菌株と耐性株との間に差異を見出さなかつた。即ち兩者の間においては特別の差異を見出すことは出来なかつた。

第3表 胆汁抵抗性

濃度	菌株	5%	10%	20%	40%
1		++	+	-	-
耐1		++	+	-	-
2		++	±	-	-
耐2		+	±	-	-
3		++	±	-	-
耐3		+	±	-	-
4		++	++	+	-
耐4		++	++	+	-
5		++	+	-	-
耐5		++	+	-	-
6		++	+	-	-
耐6		++	+	±	-
7		++	++	+	-
耐7		++	++	+	-
8		++	+	-	-
耐8		++	+	-	-
9		++	+	±	-
耐9		+	+	+	-
寺		++	+	±	-
耐寺		++	+	±	-
209 p		++	+	-	-
耐209 p		+	+	-	-

判定…集落数0…-, 数個…±, 稍々多数…+, 50以上…+, 甚だ多数…++とした。

第5項 「ペニシリン分解酵素」²⁵⁾

耐性株とその母菌株との間における生物学的差異を見出さんとする一連の研究において「ペニシリン分解酵素即ち「ペニシリナーゼ」の産

生能を検討するのは当然のことである。余は下記の如き実験方法²⁴⁾によりその差異を検討した。即ち「ブイヨン培地に各菌株を接種、37°C、5日間培養したる後「ブイヨン培養液を1ccとり「ペニシリン溶液、50u/cc、1ccを混和し37°C、2時間作用させたる後に100°C、5分間加熱して菌及び「ペニシリナーゼ」を不活性化させ冷却せるものを被検材料とした。測定方法は重層法により残余の「ペニシリン量を測定した。即ち第4表に示すが如くであり病的材料より分離後既に25u/cc.以上のペニシリン耐性を有したる先天的抵抗性株であつたNo. 1, 2, 3及びそれらの耐性株は「ペニシリナーゼ産生著しきを認めたと耐性獲得株及びその母菌株との間においては「ペニシリナーゼ産生の差異を見出すことは出来なかつた。このことは耐性の増強ということは「ペニシリナーゼ産生の有無

によるものではなく「ペニシリナーゼ産生の如何はすでに先天的に抵抗性を持つということの一つの要素にしか過ぎないものと思われる。或る種の細菌が「ペニシリン抵抗性を有すること即ち非感受性であるということについてはAbraham & Chain (1940)¹¹⁾によつて研究が進められその後幾多の学者達によつてこの方面の研究がなされて来た。而して現在においては「ペニシリン抵抗性の原因の一つとして細菌の「ペニシリナーゼ産生が考えられるに至つたがしかしこれが唯一の因子ではないとされている。Bondi et al²⁵⁾によれば彼等が臨床材料から分離した葡萄球菌のペニシリン抵抗性株はすべて「ペニシリナーゼ」を産生したと述べているが余の実験の結果においては耐性獲得により「ペニシリナーゼ産生が増加されなかつたが先天的抵抗性株はすべて「ペニシリナーゼ産生が著明

第4表 「ペニシリナーゼ産生 (阻止帯 mm)

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	寺	209p
母株	1.2	1.0	0	16.7	17.0	15.5	15.8	18.0	17.0	16.9	16.7
耐株	1.3	1.0	0	16.8	16.9	15.8	16.2	17.8	17.1	16.9	17.0

であつた。

第6項 琥珀酸脱水素酵素

Schuler等はWarburgの検圧計を用いて細菌の呼吸曲線を調べ「ペニシリン」の作用は細菌の増殖に際してその呼吸酵素系の封鎖により瓦斯代謝を阻害するにあるといつておる。余は「ペニシリン」の存在の下に長く培養され「ペニシリン抵抗性を獲得した葡萄球菌の生体内で呼吸系に属する酵素が如何なる変化をとるかを知る目的でその一つ、琥珀酸脱水素酵素を測定した。測定方法はKuhm, E. and Abood, L. G.²⁶⁾法によつた。被検菌液は37°C、24時間寒天斜面培養の各株葡萄球菌をかきとり菌体を生理的食塩水にて3回、2000回廻転、20分の遠心沈澱により洗い窒素量として1mg/ccの菌浮遊液を用いた。先ずM/10 磷酸緩衝液(pH

7.4) 0.5cc, 0.2 M の琥珀酸ソーダ液 0.5cc, 0.1% 2,3, 5-Triphenyl-tetrajadum-chlorid (T. T. C.) 液 10cc の各試薬を2ccの菌浮遊液に加え37°C、3時間恒温槽に入れ、次いで5%のTrichlor 醋酸液(T.C.A.液) 0.5ccを加えて反応を停止せしめたる後醋酸エチル] 10ccを加えて十分に攪拌し完全に「ホルモザン」を醋酸エチル」の層に移行せしめ遠心分離してその上澄をとり光電比色計にて比色し既知の「ホルモザン」量より得られた標準曲線より琥珀酸脱水素酵素の活性度を測定した。成績は第5表に示す通りで耐性株は母菌株に比しその活性度が充進しており又先天的に「ペニシリン抵抗性を有する菌株においては既にその活性度が感受性を有する菌株よりはるかに充進していることを知つた。このことは既に石上²⁷⁾を始め諸学者

第5表 琥珀酸脱水素酵素 (ホルモザン生成単位 γ)

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	寺	209p
母株	72.0	61.5	42.6	19.5	23.4	25.2	8.95	27.8	19.2	19.4	18.3
耐株	10.1	93.4	60.9	23.4	30.8	32.3	12.2	34.5	23.8	24.1	25.4

²⁹⁾の述べる所であり「ペニシリン」による呼吸機序抑制に対する代謝的現象の如く思われる。

第7項 「フォスファターゼ」^{29), 30)}

「フォスファターゼ」は重要な生物学的意義を有しており含水炭素の酸化、生体内触媒として作用する種々の磷酸塩の生成に対する役割をもっている。生体内で酸化されて「エネルギー供給源となる物質の最も主なものは含水炭素であり、これが磷酸エステル」となつて始めて酸化分解されるのである。従つて含水炭素及びその分解物が磷酸と結合し又は離れる反応を触媒する「フォスファターゼ」は含水炭素の生体内酸化には欠くべからざるものであり、代謝の盛んなる細胞内にこの酵素の多いことも亦当然と思われる。余はこの所に留意して耐性株とその母菌株との間に如何なる差異があるかと思ひこの実験を行つた。実験方法は吉川、細谷³⁰⁾の方法によつた。即ち 37°C, 24時間寒天斜面培養

の各菌株を生理的食塩水で洗い取り、更に生理的食塩水にて3回、2000回廻転、20分の遠心沈澱を行つて菌体を洗滌し 1mg/cc 窒素量の菌浮遊液を行つて被検液とした。この浮遊液を 5.0cc の基質溶液と共に 37°C の恒温槽中で正確に5分間温め次いで被検液を 0.5cc とり出して基質液中に入れ混和後 37°C の恒温槽中に1時間放置、次いで 0.2 M の Na₂CO₃ 溶液 4.5cc を加えて発色させ光电比色計にて測定、標準曲線より分解したる「フェノールフタレイン量」を算出した。基質溶液は無水炭酸ソーダ 4.24g, 重炭酸ソーダ 5.04g Na p.p.p. 600mg 浄水 1000cc である。成績は第6表に示すように「アルカリ性フォスファターゼ」は耐性株において母菌株に比し増加を認めた。又先天的に抵抗性を有する菌株ではその量が明らかに大であつた。而して酸性フォスファターゼ量は微量のため測定出来なかつた。

第6表 「アルカリ性フォスファターゼ」 (フェノールフタレイン量単位 γ)

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	寺	209p
母株	15.7	12.5	9.4	5.3	5.0	5.6	5.0	5.03	5.03	6.07	3.4
耐株	18.4	15.8	10.8	7.4	6.3	7.1	6.5	7.0	7.2	8.01	5.2

第8項 「カタラーゼ」

「カタラーゼ」は葡萄球菌の著明に産生する酵素であり生体内においては有害なる過酸化水素を分解する役割をなすものである。この「カタラーゼ」能が母菌株とその耐性株との間において如何なる差異を示すかを検した。定量方法は Euler, Josephson³¹⁾ の KMnO₄ 滴定法によつた。反応温度は 30°C の恒温槽を用いた。なお酵素液としての菌浮遊液は母菌株、耐性株共に 37°C, 24時間普通寒天培養のものを用ひ比濁法

により同一濃度 (窒素量 1mg/cc) のものを用いた。実験方法は「コルペン」に 0.01 N の H₂O₂ 溶液 10cc, N/30 の磷酸緩衝液 (pH 7.0) 4cc 及び酵素液として上述の菌浮遊液の 1cc を添加して 30°C の恒温槽に30分間放置しこの反応液の 10cc を他の予め 5% H₂SO₄ 1cc を入れた「コルペン」に取り出し 0.01N の KMnO₄ 溶液にて滴定した。かくして得られた値をもつて次の式により反応速度恒量 K を求めた。

即ち

$$K = 2.303 \times \frac{\log a - \log(a-x)}{t}$$

但し t は時間, a は最初の H₂O₂ の量, X は t 時間に分解された H₂O₂ の量とする.

即ちその成績を見るに第7表に示すが如き結果を得, 耐性株は母菌株に比較してその活性が

一般に低下しているが No. 8 及び No. 209 P 株ではその母菌株と同程度であることを知つた. なお先天的に抵抗性であつた No. 1, No. 2, 及び No. 3 の株は他の感受性の菌株に比較して大であつた. このことは伊勢³²⁾等の成績と

第7表 「カタラーゼ活性 (但し 0.0779 の恒数を乗せず)

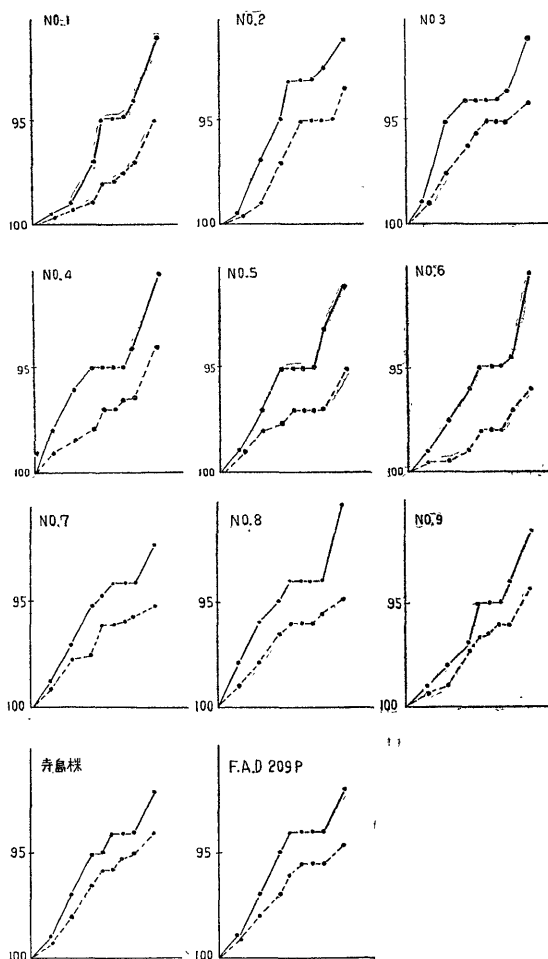
菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	寺	200p
母株	0.052	0.045	0.046	0.035	0.032	0.032	0.032	0.028	0.032	0.035	0.028
耐株	0.043	0.040	0.040	0.028	0.027	0.028	0.028	0.028	0.027	0.027	0.027

一致しておつた.

第9項 デオキシ現象³³⁾

フランスの微生物学者 Jacques monod の創意による酵素能力の変動を示す「デオキシ現象」について母菌株とその耐性株との間における差異を検した. 「デオキシ」とは或る種の2群の糖の各一つを組合せて与える時に微生物はその成長に当り, 先ず第1群に属する糖を優先的に利用し尽したる後に更に第2群に属する糖を利用して生長する現象であるが生長の最初に利用される糖は微生物の構成酵素によつて利用されるものであり次いで利用されるものは微生物の適応酵素によつて利用されると著者は述べている. 余は第1群に属する糖として葡萄糖を, 第2群に属する糖として乳糖を用い構成酵素の作用が終つた後に適応酵素作用の発現するまでの時間的差異の有無を母菌株と耐性株との間において比較した. 即ち葡萄糖 75mg/l, 乳糖 50mg/l を下記の如き半合成培地に混んで実験に供した. 接種菌液は「ブイオン培地 37°C, 24時間培養のものから一白金耳をとり半合成培地に接種し 37°C, 24時間培養後その一白金耳をとり実験培地へ接種し 37°C にて一定時間後培養液をとり出しその発育状態を光電比色計により濁濁度

第1図 「デオキシ」



但し 実線は母菌株, 破線は耐性株, 縦軸には菌量を示す (比濁計の読み) 横軸には時間を示す

により比較した。

半合成培地³⁴⁾の組成は次の如きである。

Glucose	2.0g	Nicotinic acid	20mg
KH ₂ PO ₄	0.35g	VB ₁	30mg
FeSO ₄	0.01g	Casein acid hydrolysate	
MgSO ₄	0.01g		2.0g
Na ₂ HPO ₄	2.0g	Aq destil	1000cc
NaCl	5.0g		

なお「デオキシ-」に用いる培地においては Glucose を除去して改めて Glucose 75mg/l, Lactose 50mg/l を混じた。

この結果は第1図に示す通りであつて第1群の糖利用から第2群の糖利用に及ぶと推察される間には各菌株共に一定時間の発育停止期が認められるが構成酵素作用終末から適応酵素作用出現迄の時間は母菌株 1.0~1.5 時間、耐性株 0.5~1.5 時間耐性株 0.5~1.5 時間で耐性株の方が短きもの7株両者等しきもの3株であつた。即ち耐性株においては稍々短縮されている場合が多い。先天的抵抗性株と然らざるものとの間には大差はない。

第10項 「アミノ酸代謝^{35), 36)}

母菌株と耐性株と更に先天的抵抗性株との間における「アミノ酸代謝の異同を比較した。即ち既述の半合成培地 2cc に「グルタミン酸及び「アスパラギン酸を各 0.2g/l の割に加え半合成培地接種 37°C, 24 時間培養の各菌株を一白金耳宛接種し12時間 37°C 培養後被検液と同量の純アルコールを加えて遠心沈澱し除蛋白したる後上澄を用いて一次元上昇法によりて「ペーパークロマトグラフィー」³⁷⁾を行つた。展開剤は 0.1%アンモニヤ水を23%に加えた「フェノール」を用い呈色剤には0.2%「ニンヒドリン含水ブタノール溶液を用いた。その成績は第8表に示す如くであつて母菌株及び先天的に抵抗性を有する菌株においては「グルタミン酸及び「アスパラギン酸の微量を検出することが出来た。而して耐性株の6例ではその母菌株の場合と同程度に「アスパラギン酸を検出し得たが他の5例ではその呈色反応が甚だ淡薄で殆んど認

第8表 「アミノ酸代謝 Rf (.:アスパラギン酸の色調殆んどなし)

	グルタミン酸	色 調 濃 淡
	アスパラギン酸	
1	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 1	0.17 .: 0.12	色 調 分 明 色 調 甚 だ 淡 薄
2	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 2	0.16 .: 0.11	色 調 分 明 色 調 淡 薄
3	0.16 0.12	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 3	0.16 .: 0.12	色 調 分 明 色 調 淡 薄
4	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 4	0.17 0.12	色 調 分 明 色 調 稍 々 分 明
5	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 5	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
6	0.17 0.12	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 6	0.17 0.12	色 調 分 明 色 調 分 明
7	0.17 0.12	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 7	0.17 0.12	色 調 分 明 色 調 稍 々 分 明
8	0.16 0.11	色 調 分 明 色 調 分 明
耐 8	0.16 .: 0.11	色 調 分 明 色 調 淡 薄
9	0.18 0.12	色 調 分 明 色 調 分 明

耐 9	0.18	色 調 分 明
	0.12	色 調 分 明
寺	0.18	色 調 分 明
	0.12	色 調 分 明
耐 寺	0.18	色 調 分 明
	∴ 0.12	色 調 甚 だ 淡 薄
209p	0.16	色 調 分 明
	0.11	色 調 分 明
耐 209p	0.16	色 調 分 明
	0.11	色 調 稍 々 分 明
対	0.17	色 調 分 明
	0.12	色 調 分 明

め難かつた。しかし「グルタミン酸は対照と略々同程度の呈色を見た。即ち耐性株においては「グルタミン酸の消費は見られなかつた³⁵⁾。又両者以外の「アミノ酸を検出するような呈色反応は母菌株及び耐性株共に見出すことは出来なかつた。

第11項 菌体 磷分層³⁶⁾

細菌の生活力の根源をなすものはその菌体内に存する核酸であるということは現在では既に諸学者の一致した論説である。いま核酸の主成分の一つである磷を考える時その生物学的意義も亦重大で磷は無機の磷酸塩及び有機化合物の「磷酸エステル」の形で存在し磷脂質核酸及び磷蛋白質の形成にあたり又「トリクロール 醋酸で浸出し得る酸可溶性磷は代謝に重要な役割を有していることは今更論するまでもないことである。余は「ペニシリン」に抵抗性を獲得させた菌株とその母菌株との間における生物学的及び細菌学的の差異の一連の研究の一つとして細菌体内における各磷分層の分割を行い両者間の差異

を検した。被検材料は各菌株の大量培養を行い(乾燥菌量にして約 100mg)これを集めて 0.85%氷冷食塩水で3回、遠心沈澱をなして洗滌し凍結融解による菌体の破壊をなし「トリクロール 醋酸及び塩酸を用いて Schneider²⁹⁾の方法に準じて菌体中の磷を次の如き分層に分離し Allen²⁹⁾の方法によつて磷を比色定量した。

各態磷の分層²⁹⁾

- I. 酸溶性磷 (冷トリクロール 醋酸可溶部分)
 - 1° 無機磷
 - 2° 有機磷
 - 3° $\Delta 7-P$ (2°以外の有機磷で N-HCl 中で7分間煮沸するとき遊離に来る磷でエネルギーに富む磷酸)
- II. 磷脂質 (アルコール・エーテル可溶部分)
- III. 核酸磷 (熱トリクロール 醋酸可溶性磷)
 - 1° 最も容易に水解する磷酸 (5%トリクロール 醋酸中で15分間2回の煮沸で遊離して来る磷酸)
 - 2° 比較的水解しやすい磷酸 (1°の処理後 N-HCl 中で7分間煮沸すると遊離して来る磷酸)
 - 3° 残余の部分
- IV. 磷蛋白 (以上の処理後に残る分層)

その成績は第9表に示す如くであつて核酸磷 3°分層では成績が不同であるが他の分層では母菌株に比し耐性株において増加が屢々認められ殊に $\Delta 7-P$, 磷脂質, 核酸磷 1°, 核酸磷 2°, 磷蛋白では夫々平均 8.5, 11.3, 11.0, 9.5, 12.4%の増加となつており減少したものは認められない。先天的抵抗性株と感受性母菌株とを比べると酸溶性磷 2°, 核酸磷 1°, 核酸磷 2°, 磷蛋白の各分層では前者の方が後者よりも一般に高位にあつた。

第9表 菌体各態磷分層 (磷量 γ /mg 乾燥菌量)

菌 株	I 酸 溶 性 磷			II 磷 脂 質	III 核 酸 磷			IV 磷 蛋 白
	1°	2°	3°		1°	2°	3°	
1	0.247	0.305	0.156	0.116	0.176	0.135	1.678	0.101
耐 1	0.249	0.373	0.173	0.125	0.176	0.135	1.618	0.113

	2	0.234	0.325	0.141	0.096	0.130	0.222	1.879	0.109
耐	2	0.247	0.340	0.164	0.146	0.147	0.234	1.378	0.113
	3	0.186	0.312	0.169	0.113	0.132	0.179	1.421	0.100
耐	3	0.221	0.356	0.176	0.121	0.148	0.216	1.643	0.109
	4	0.201	0.304	0.145	0.107	0.116	0.098	1.360	0.096
耐	4	0.211	0.312	0.158	0.121	0.124	0.118	1.401	0.104
	5	0.229	0.290	0.130	0.094	0.111	0.110	1.509	0.092
耐	5	0.236	0.297	0.134	0.100	0.123	0.129	1.583	0.100
	6	0.229	0.310	0.165	0.098	0.117	0.109	1.714	0.088
耐	6	0.232	0.317	0.171	0.102	0.125	0.118	1.752	0.102
	7	0.200	0.305	0.147	0.112	0.119	0.100	1.444	0.088
耐	7	0.200	0.306	0.159	0.116	0.123	0.111	1.483	0.096
	8	0.206	0.288	0.155	0.100	0.125	0.129	1.422	0.096
耐	8	0.212	0.301	0.166	0.112	0.135	0.130	1.583	0.110
	9	0.180	0.227	0.133	0.098	0.122	0.120	1.633	0.070
耐	9	0.181	0.230	0.141	0.114	0.149	0.128	1.714	0.088
	寺	0.207	0.293	0.134	0.116	0.088	0.127	1.460	0.092
耐	寺	0.215	0.312	0.153	0.120	0.111	0.137	1.498	0.107
	209p	0.202	0.239	0.142	0.094	0.099	0.129	1.608	0.097
耐	209p	0.211	0.249	0.157	0.101	0.111	0.136	1.635	0.105

第4章 実験成績総括

以上余が行つて来た「ペニシリン耐性獲得葡萄球菌株とその母菌株及び先天的に抵抗性を有している菌株との間における細菌学的、生物学的差異の比較実験成績を先人のそれと比較検討するに次の如き結果を得た。

1) 被染色性 形態及び集落

この実験は先に述べた如くに幾多学者により早くから発表されているものであつて余の成績においても全く同様の結果を得た。即ち実験に供された葡萄球菌が耐性を獲得することによつて菌体は膨化して大小不同となり被染色性も亦不充充分となり「グラム染色陽性なるも濃淡種々の相を示し双球菌様配列を示すものもあつた。集落も亦S型からR型への変化が見られ固有色素の産生は不良となり灰白色の色調を帯ぶるに至つた。先天的耐性の菌株は他の母菌株と同様であつたがこれも耐性を獲得するにつれて他の耐性株同様の傾向を示した。

2) 糖分解能

耐性株における糖分解能をこれらの母菌株と

比較するに両者の間においては何ら特異的な差異を見出すことは出来ないように思われる。又先天的に抵抗性を有する菌株においても特にその能力が充進していると思われなかつた。このことは柴田、石上等の述ぶる所と同様であつた。

3) 胆汁抵抗性

胆汁抵抗性を検する意義は胆汁は種々なる細菌に対して溶菌的に作用し細菌の原形質に対して何らかの影響を与えると思われたからである。この実験においては耐性株はその母菌株と比較して抵抗性が強いと思われず又先天的に抵抗性を有する菌株においても他の母菌株と比較して抵抗性に差異があると思われなかつた。

4) 「ペニシリン分解酵素

耐性株においてはその母菌株と比較してその能力が充進しているとは思われなかつた。而して先天的に抵抗性を有する菌株においてはすべて「ペニシリン分解酵素産生が見られた。このことは Bondi et al の報告、永井の報告と一致

していた。「ペニシリン分解酵素産生の有無のみが耐性獲得の生物学的機作ではないと考えられるのであるが臨床材料から分離した先天的に抵抗性を有する菌株はその多くに「ペニシリン分解酵素産生を見たと考えられる。

5) 琥珀酸脱水素酵素

耐性株においては母菌株に比し活性度の亢進していることは諸学者の一致した結論であり余の成績も亦これを裏づけるものであつた。又先天的に抵抗性を有する菌株はその活性度がはるかに強大であることを知つた。而してこのことは「ペニシリン」の呼吸機序抑制作用に対する代償現象ではないかと考えられる。

6) 「フォスファターゼ」

耐性株とその母菌株との「アルカリ性フォスファターゼ」を比較したるに耐性株においては全例において増加していることを知つた。又先天的に既に抵抗性の菌株においては他の母菌株と比較して3例共に増加していた。これらのことは各菌株が何らかの形で耐性を獲得するに際しその悪環境に対する生活反応であると思考される。

7) 「カタラーゼ」

この酵素は葡萄球菌の産生する酵素の中でも著明なものであるので多くの学者により深く研究されているが一般に伊勢、松井等の報告の如く耐性株は母菌株に比し一般に稍、その活性が低下しているようである。又先天的に抵抗性を有する菌株と感受性株との比較においては前者の方が後者より大であつた。即ち先天的に抵抗性の菌株は生物学的活性が亢進していると思考される。

8) 「デオキシナー現象」

構成酵素作用終末から適応酵素産生への移行に要する時間を比較するに「デオキシナー現象」によつたが耐性株では母菌株に比しその短縮を示すものが多い。先天的に抵抗性を有する菌株と然らざるものとの間においては確然とした差異を見出すことは出来なかつた。

9) 「アミノ酸代謝」

耐性獲得菌の出現する機作についての諸説ある中に「アミノ酸の關係を見たのは E. F. Gale (1948) であり「ペニシリン耐性が増加して来ると細菌の増殖にとつて「グルタミン酸の同化作用は關係がなくなると述べて「グルタミン酸は細胞内で合成されると説いている。余の実験における成績でも「グルタミン酸の利用を見出すような結果は得られなかつた。

10) 菌体燐分層

耐性獲得株の特徴の一つとして菌体内における「リボ核酸の「デスオキシリボ核酸に対する比の変化が注目せられたがこの点に関する先人の業績を見るに組織化学的に又は生化学的に著明な変化は認められないか或いは稍、低下の状態にあると述べている。しかしその他の燐分層をも含めて系統的に検索した報告は見られない。余の行つた実験では耐性株の大多数においては母菌株に比し $\Delta 7-P$, 燐脂質, 核酸燐 1° 及び 2° , 燐蛋白の各分層が増加するのを認めた。燐酸化合物, 殊に有機燐化合物が生体の物質代謝に必要欠くべからざるものであることは今更述べる必要もない所である。その中でも A. T. P. は代謝エネルギー」の中心として「エネルギーを消費する過程にはすべて關係している^{40, 41)}。燐脂質は細胞の各種酵素の構成成分としてその活性と維持する上に必要欠くべからざるものであることは Balle and Cooper⁴²⁾ の述べる所によつても明らかである。更に核酸については Caspasson⁴³⁾ 及び諸学者の実験の示すように生物活性の中心と考えられるもので増殖, 蛋白合成引いては酵素生産の根源となるものであるといわれ生体内の必須成分である所の脂肪, 蛋白, 含水炭素の三大要素に現今では核酸と加えなければならない程に考えられている。以上の見地より余の成績を見るに一般にこれらの因子の増加はその生体の活性度が一般に亢進していることを知るものである^{43, 44)}。

第5章 結 論

病的材料から分離した葡萄球菌9株と黄色葡萄球菌寺島株及び F. A. D. 209 P 株の計11株についてそれより「ペニシリン耐性株を作り母菌株と耐性獲得菌株との間における細菌学的及び生物学的性状の比較をなし次の如き結果を得た。

1. 被染色性、形態及び集落

「グラム染色の不良染色性を見たが「グラム陰性化を見ることはなかつた。菌形態においては菌体の膨化、大小不同、双球菌様配列のものを見た。集落についてはS型からR型への変化が見られ菌種特有の色素産生が減退するのを見た。先天的に抵抗性を有する菌株では他の母菌株同様に斯くの如き変化は見出されなかつた。

2. 糖分解能

耐性株及びその母菌株並びに先天的に抵抗性を有する菌株との間に余の検した範囲では糖分解能について確実な差異は見出されなかつた。

3. 胆汁抵抗性

母菌株、耐性株及び先天的抵抗性の三者相互間に差異は認められなかつた。

4. 「ペニシリン分解酵素

母菌株及び耐性株との間に差異は見出されなかつた。但し先天的抵抗性株ではその産生が他の感受性株に比して著明に増加していた。

5. 琥珀酸脱水素酵素

耐性株及び先天的抵抗性株の何れにおいてもその活性度が感受性株に比して亢進していた。

6. 「フォスファターゼ」

耐性株及び先天的抵抗性株の何れにおいてもその活性度が感受性株に比較して一般に亢進していた。

7. 「カタラーゼ」

耐性株は母菌株に比較して活性度低く先天的抵抗性株は感受性株に比して高かつた。

8. 「デオキシー」

耐性株においては母菌株に比し構成酵素から適応酵素への移行が一般に促進している。

9. 「アミノ酸代謝

耐性株においては「グルタミン酸の利用がなされないか又は遅延しているように思われる。先天的抵抗性株においては変化を見出さなかつた。

10. 菌体燐分層

耐性株においては母菌株に比して一般に $\Delta 7-p$, 燐脂質, 核酸燐 1° , 2° , 燐蛋白の各分層が多少共増加している。

終りに臨み御指導御校閲を賜つた恩師谷野教授に深謝の意を表し、又種々御援助賜つた元石川病理学教室助教授大原実博士に深謝します。

本報告の要旨は第8回北陸医学会で口演した。

文 献

- 1) Rammel kamp : Proc. soc. Exp. Biol & med. 51 (1942).
- 2) Mac Kee C. M. : Proc. soc. Exp. Biol & med 53 (1943).
- 3) 野村 : Janal antibiol. Vol. 2. No. 8 (1948).
- 4) 高島 : Janal penicillin. Vol. 1. No. 4 (1947).
- 5) Demerc, M. : Janal. Bact. Vol. 56. No. 1 (1948).
- 6) Luria, E. : Bact. Review. Vol. 11. No. 1 (1947).
- 7) Braam, W. : Bact. Review. Vol. 11. No. 75 (1947).
- 8) 秋葉 : 医学のあゆみ, Vol. 13. No. 5 (1952).
- 9) Hinshelwood, C. N. : 診断と治療, Vol. 40. No. 5 (1952).

- 10) E. F. Gale : Nature 158 (1946).
- 11) Abraham, E. P. : Nature 146 (1940).
- 12) Chain : Nature 146. 837 (1940).
- 13) Kirly : Science 99. 452 (1944).
- 14) Bellany, W. D. etc : Janal. Bact. Vol. 55. No. 2 (1948).
- 15) 中村 : 日本医事新報, No. 3323 (1949).
- 16) Gardner, A. D. : Nature 146 (1940).
- 17) Miller, C. P. : J. A. M. A. 125 (1944).
- 18) Thomas, A. R. : Janal. Bact. Vol 49 (1945).
- 19) Altire werber, E. : Janal. Bact. Vol 50 (1945).
- 20) 野嶽 : Jounal

Penicillin Vol. 1. No. 7, No. 8 (1948).

21) 谷 : 医学微生物学. 22) 柴田・石上 : 診断と治療, Vol. 40. No. 6 (1952).

23) 鍵和田 : Journal antibio. Vol 3. No. 4 (1950).

24) 萩原 : Journal Antibio. Vol. 3. No. 2 (1950).

25) Bondi et al : Proc. sec. Exp. Biolo & med 60 (1945).

26) Kuhu, E and Abood, L. G. : Science 109 (1949).

27) 石上 : Journal antibio. Vol. 4. No. 7 (1951).

28) 柳田 : 自然, Vol. 6. No. 11 (1951).

29) 江上 : 核酸及び核蛋白質, (上下巻).

30) 吉川・細谷 : 酵素化学シンポジウム, 第2集, (1949).

31) Euler, Josephson : 医学研究, 第9巻, 第3号, (1949).

32) 伊勢 : 医学研究, 第9巻, 第3号, (1949).

33) Jacques

manad : 生物科学. 第3巻, 第3号, (1951).

34) 秋葉 : Journal Antibio. Vol. 3. No. 3 (1952).

35) 中塚 : 広島県立医科大学論文集, (第2集).

36) 三浦 : 化学の領域, Vol. 6. No. 8 (1952).

37) 佐竹 : クロマトグラフ, 共立全書.

38) E. F. Gale : Bulle of the John Hopkins Hospitol Nall. 83. No. 2 (1948).

39) 中川 : 科学, Vol. 22. No. 6 (1952).

40) Kalckar, H. M. : Chemi. Rw. 18, 71 (1941).

41) Lipman, F. : Adv. in Enzymol. 1, 99 (1941).

42) Balle, E. and Cooper, D. : Jcncl. Biol. Chem. 180, 13 (1945).

43) Phosphorius Metabolism Vol II. 44) W. D. Mc Elroy and B. Glass G. H. Wer-

kman : Bacteriol Physiology.

十全医学会雑誌 第57巻 第3号

正 誤

阿部利夫著

葡萄状球菌の「ペニシリン耐性株に関する研究 (539頁)

- 論文中デオキシーとあるをデオキシに改める。
- 545頁の第1図の説明を次の通りに改める。

第1図 「デオキシー」

但し 実線は母菌株，破線は耐性株，縦線には菌量を示す
(比濁計の読み) 横軸には時間を示す，(即ち 2, 3,
4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7 時間)