

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 8 報

結核菌の薬剤耐性化および復元の機序について

第 3 篇

Myco. 607 および Myco. phlei を用いての実験補足

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

西 田 昭 治

（受付：昭和33年6月1日）

緒 言

私はさきにとり型結核菌竹尾株および Myco. 607 では glycerol 増量培地に発育させることによつて SM に対する感受性を低下させ、かつそれらの SM 耐性株を感性菌浸出液中で一定に加温後冷却せしめることによつて SM 耐性を低下させうることを認めたが、Myco. phlei ではこれと同じ条件下においては同じ結果が得られな

かつた。

そこで今回は実験条件を変更することにより Myco. phlei の SM 感受性を変化せしめうるや否やを検討することを主目的とし、その条件下の Myco. 607 の SM 感受性の変化をもあわせて観察した。ここにその成績の概要を述べる次第である。

実 験 材 料

- I 使用菌株：i) Myco. 607 および Myco. phlei
ii) Myco. 607 SM 1,000 γ 耐性株および Myco. phlei SM 1,000 γ 耐性株（607-R株 および ph-R 株と仮称）
- II 使用培地
1) 継代用培地：
i) Sauton 液体培地

- ii) 低 glycerol 含有培地：Sauton 培地の glycerol 量のみを 0.5%とした培地
2) 耐性測定用培地：最高濃度 1,000 γ /ml として以下遞減的に稀釈した SM 含有 Sauton 寒天培地
その他の実験材料は実験方法の項において随時記載する。

実験方法ならびに実験成績

I 培地の glycerol 減量と SM 耐性との関係
607-R 株および Ph-R 株を低 glycerol 含有培地に一週間ごとに5代まで継代培養し、各代ごとにその

一週間培養菌について耐性度を測定した。その成績は第1表のごとくである。すなわち低 glycerol 含有培地上に発育した 607-R 株および ph-R 株とも3代ま

では対照群 (Sauton 培地に培養された 607-R 株および ph-R 株) と差異を認めなかつたが、4 代以後において明らかな耐性の低下を認めた。しかしこれら各菌株は Sauton 培地に 1 代移植することにより、再び元の耐性に復帰した。

II 感性菌浸出液作製条件の検討

1) 浸出用液体の検討

浸出用液体として蒸留水、生食水およびクエン酸ソーダ溶液 (0.1M, 0.01M) を使用した。

上記各液の 20ml に Myco. 607 および Myco. phlei の 4 日間培養菌 400mg (湿重量) を入れ、100°C, 10 分間加温し、1 週間氷室中に保存後、遠心して上清液を得、それぞれの菌浸出液とした。Myco. 607 および Myco. phlei の浸出液 4.5ml に 607-R 株および ph-R 株の生食水菌浮遊液 (菌液濃度 10^{-1} mg/ml) をそれぞれ 0.5ml あて加え、50°C, 30 分間加温、次いで -13°C, 20 分間冷却後、それぞれ 0.1ml あてを耐性測定用培地に滴加し、37°C, 4 日間培養後発生した集落を数えた。その成績は第 2 表に示した。すなわち 607-R 株の耐性低下は生食水浸出液では全く認められず、蒸留水浸出液ではわずかに、またクエン酸ソーダ溶液 (0.1M および 0.01M) 浸出液では著明に認められた。しかし ph-R 株ではいずれの浸出液によっても耐性の変動はほとんど認められなかつた。

2) 感性菌培養日数の検討

Myco. 607 および Myco. phlei の 4 日、7 日、14 日、および 21 日間培養菌体 400mg をそれぞれ 20ml の 0.01M クエン酸ソーダ溶液に入れ、以下前述の方法に従い、607-R 株および ph-R 株の SM 耐性の変動を検討したが、両菌株とも培養日数を異にしても、それら浸出液間には対応する耐性菌の感性化能に著差を認めなかつた。次いで Myco. 607 および Myco. phlei を Sauton 培地に 3 日、5 日、7 日、14 日および 21 日間培養し、その培養ろ液を可及的に無菌操作によりろ紙でろ別し、56°C, 30 分間滅菌したものを浸出液に代用して、以下前述の方法に従い、その耐性菌感性化能を検討した。その成績を第 3 表に示した。すなわち Myco. 607 では培養 2 週以後の培養ろ液に感性化能を認めたけれども、2 週以前においては感性化能は認められなかつた。一方 Myco. phlei ではどのろ液を用いても、ph-R 株の耐性の変動を認める事ができなかつた。

3) 浸出液作製時の pH と耐性菌感性化能との関係

クエン酸溶液の pH を 3.5, 5.0, 6.0, 7.0 および 8.0 とし、その各 20ml に Myco. 607 および Myco. phlei をそれぞれ 400mg 入れ、100°C, 10 分間浸出後氷室に一週間保存し、次いで再び硫酸および苛性ソーダでもつて pH 7.0 に修正して、遠心、その上清液を浸出液として使用、以下前述の方法に従いおのおのの感性化能を検討した。その成績は第 4 表のごとくである。すなわち Myco. 607 では浸出用液体の pH が酸性側においては感性化能物質の浸出がよく、アルカリ性側においてはほとんど浸出されないと言う成績を得た。一方 Myco. phlei ではいずれの浸出液を用いてもほとんど ph-R 株の耐性の変動を認めなかつた。

4) 浸出液作製時の加温温度および時間の検討

Myco. 607 および Myco. phlei の 4 日間培養菌 400mg をそれぞれ 0.01M クエン酸ソーダ溶液 2 ml に入れ、

- i) 直ちに氷室に一週間保存
- ii) 室温に一週間放置後、氷室に一週間保存
- iii) 37°C, ふ卵器中に一週間保存後、更に氷室中に一週間保存
- iv) 56°C, 30 分あるいは 60 分間加温後、氷室に一週間保存
- v) 100°C, 10 分、20 分あるいは 60 分間加温後、氷室に一週間保存

の 5 群に分けて、浸出を行い、遠心上清液を浸出液として、以下前述の方法に従い、各浸出液の感性化能を比較検討した。その成績は第 5 表に示したごとくである。すなわち、氷室、室温および 37°C 保存による浸出液 (i), ii) および iii)) では両菌株の感性化が認められず、56°C, 30 分および 60 分間加温浸出液では 607-R 株にその耐性の低下が認められたが、ph-R 株の耐性低下は全く認められなかつた。100°C 加温による浸出液中、607-R 株では 10 分間加温浸出液により明らかな耐性低下が認められたが、20 分および 60 分間加温浸出液では耐性の変動は認められなかつた。ph-R 株においては 100°C, 10 分間加温浸出液にわずかに耐性低下の傾向を認めたが、20 分および 60 分間加温浸出液によつては全く耐性の変動は認められなかつた。

5) 氷室保存期間の検討

Myco. 607 および Myco. phlei の 4 日間培養菌 400mg をそれぞれ 0.01M クエン酸ソーダ溶液 20ml に入れ、100°C, 10 分間加熱浸出後、直ちに遠心、その上澄液を浸出液としたもの、および 2 日、7 日、14 日

および21日間氷室中に保存後、その遠心上清液を浸出液としたものについて、それらの感性感能の有無を前述の方法に従い検討した。その成績は第6表のごとく、Myco. 607においては氷室保存2日以内の浸出液に感性感能を認める事ができなかった。一週以上保存

の浸出液に感性感能を認め、一週間保存浸出液に比し、二週以上保存浸出液がわずかながら強い感性感作用を有するように思われた。一方 Myco. phlei においてはいずれの氷室保存条件下の浸出液もほとんど感性感作用を示さなかった。

総括ならびに結論

さきに私はトリ型結核菌竹尾株の菌膜透過性と SM 感受性との間にはかなり密接な関係のあることを実証したので、更にその菌膜透過性を変化せしめえた一定条件下において Myco. 607 および Myco. phlei の SM 感受性の変動を検討したところ、Myco. 607 は竹尾株と同様耐性の変動を示したが、Myco. phlei ではほとんど変化が認められない事を明らかにした。そこで今回は更に実験条件をいろいろかえて補足検討を試みたけれども、ほとんどさきの結果と異なるところがなかった。ただ一つその中で低 glycerol 含有培地に継代培養された Myco. phlei SM 耐性株の耐性低下を認めた事実は Myco. phlei においてもまた SM 感受性に菌膜透過性が若干の関連性を持つているのではないかと推定せしめるものである。本実験におい

て得られた結果を要約すると次のごとくである。

1) Myco. 607 および Myco. phlei の SM 1,000r 耐性株を低 glycerol 含有培地に継代培養する事によつて耐性低下を認めた。

2) Myco. 607 SM 感性株浸出液の SM 耐性株感性感能は浸出液作製時の感性菌の培養日数(4~21日)に関係せず、浸出液体およびその pH、浸出時間および温度、さらに氷室保存期間に関係し、感性感能を最高ならしめる浸出条件は酸性クエン酸ソーダ溶液中で 100°C、10分間加温を行い、氷室保存二週以上であつた。

3) Myco. phlei SM 耐性株は試みられたいかなる条件下の浸出液によつても、ほとんど耐性の変動を示さなかった。

第 1 表 低 Glycerol 含有培地に継代された菌のSM耐性度の変動

GL. 濃度		菌株	SM濃度 (γ /ml) 世代および処理	1,000	500	250	125	62.5	0(control)
0.5%		607-R	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
		607-R	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
		607-R	3	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6 %		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
		607-R	4	卄	卄	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卄	卅	卅	卅	卅	卅
		607-R	5	+	+	卄	卅	卅	卅
		ph-R		+	卄	卄	卅	卅	卅
6 %		607-R	5より 代り菌	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
6 %		607-R	対	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R	照	卅	卅	卅	卅	卅	卅

第 2 表 浸出用液体の相違による感性化能の異同

感性菌 浸出用液材料		菌株	SM濃度 (γ /ml)	1,000	500	250	125	62.5	0(control)
蒸 留 水		607-R		卄	卅'	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
生 食 水		607-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
citrate (0.1M)		607-R		+	卄	卄	卅	卅	卅
		Ph-R		卄	卅'	卅	卅	卅	卅
citrate (0.01M)		607-R		+	卄'	卄	卅	卅	卅
		ph-R		卅'	卅'	卅	卅	卅	卅
・		607-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅
		ph-R		卅	卅	卅	卅	卅	卅

註； ・はいずれの感性菌浸出液による処置をも加えなかつた場合

第 3 表 感性菌培養ろ液の耐性菌感性能と感性菌培養日数との関係

日数	SM濃度 菌株 (γ/ml)	1,000	500	250	125	62.5	0(control)
3	607-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	607-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	607-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
14	607-R	+	++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++
21	607-R	+	++	+++	+++	+++	+++
	ph-R	++	+++	+++	+++	+++	+++

第 4 表 浸出液 pH と耐性菌感性能との関係

(i) 0.1M ケン酸溶液使用

(ii) 浸出 100°C, 10' → pH 6.8~7.0 に修正 → 氷室 1 週間保存 → ろ別

pH	SM濃度 菌株 (γ/ml)	1,000	500	250	125	0(control)
3.5	607-R	+	++	+++	+++	+++
	ph-R	+++'	+++	+++	+++	+++
5.0	607-R	+	++'	++'	+++	+++
	ph-R	+++'	+++'	+++	+++	+++
6.0	607-R	+	++	++	+++	+++
	ph-R	+++'	+++'	+++	+++	+++
7.0	607-R	+	++	+++'	+++	+++
	ph-R	+++'	+++'	+++	+++	+++
8.0	607-R	+++'	+++	+++	+++	+++
	ph-R	+++	+++	+++	+++	+++

第 5 表 浸出液作製時の加温温度および時間と、浸出液の感
性化能との関係

温度 \ 時間		SM濃度 (γ /ml)	1,000	500	250	125	62.5	0(control)
		菌株						
2°C		607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
室温 (15°C)	1 週	607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
37°C	1 週	607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
56°C	30'	607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	60'	607-R	≡'	≡'	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
100°C	10'	607-R	+	+	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡'	≡'	≡	≡	≡	≡
	20'	607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	60'	607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡

第 6 表 浸出液作製時の氷室保存期間と浸出液の感
性化能との関係

氷室内保存 日数		SM濃度 (γ /ml)	1,000	500	250	125	62.5	0(control)
		菌株						
0		607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
2		607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
7		607-R	+	≡'	≡'	≡	≡	≡
		ph-R	≡'	≡'	≡	≡	≡	≡
14		607-R	≡'	+	≡	≡	≡'	≡
		ph-R	≡'	≡'	≡	≡	≡	≡
21		607-R	≡'	+	≡	≡	≡'	≡
		ph-R	≡'	≡'	≡	≡	≡	≡
・		607-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡
		ph-R	≡	≡	≡	≡	≡	≡

註：・は第2表と同じ