ペニシリン耐性の研究 (第3報)

—耐性獲得に対する Cytochrome 系呼吸酵素と
Flavin 酵素の役割について—

Studies on the Penicillin Resistance (3)

—Studies on the Role of Cytochromes and Flavoprotein Enzymes
in the Development of Penicillin Resistance of Staphylococci—

順天堂大学医学部衛生学教室

阿 部 温 男

Atsuo Abe

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Juntendo University

著者は *in vitro* における ペニシリン耐性菌の研究を行い、耐性菌の正常菌と異なる生物学的性状のうち、呼吸酵素の含量の相違に注目し、これに関連せる実験を行い、その成績を発表して来た。

第1報においては、耐性菌の正常菌と比較せる生物学的性状の相違について、第2報においては、物質酸化機構の変化について述べた。

しかし、以上の報告のみでは、未だ、正常菌が *in vitro* で耐性を獲得する機序は説明されず、耐性獲得防止の理論的根拠が得られぬのみならず、ペニシリンの作用機作についても推定が行えないのである。

本報においては、ペニシリンの作用に拮抗する酵素を確認するとともに、耐性獲得防止の理論的根拠を得、併せてペニシリンの作用機作について推定しえたので報告する。

細菌が薬剤に対して耐性を獲得する現象は種々の細菌と薬剤との間に観察されているものであるが、耐性菌の発生の機序に関しては、次の2つの学説により説明されるところである。

- (1) Spontaneous mutation and selection theory
- (2) Adaptation or induced mutation

この2学説は、耐性菌の発生前に薬剤が直接重要な役割を演ずるか否かの点において、根本的な相違が存する。ペニシリンの場合は、Demerec (1945) の提唱する第1の学説が、一般的となっているが、培地の条件、培養方法によつて、第2の方によつても説明される現象がないわけでもなく、両学説を折衷しなければならぬように思

われる。

しかし、発生の遺伝学的研究はいずれであつても、耐性菌の発生にはペニシリンの作用が重要な意味を持つてゐることは確実であり、かくて発生した耐性菌について考察すると、耐性菌はペニシリンによつて阻害されぬために、ペニシリンの影響を受けがたい代謝様式を獲得するか、或は発達させていると推測されるのである。しかし、耐性復帰の現象から推定すると、耐性発現には、突然、新しい酵素系ができることは考えがたく、むしろ、ペニシリンによりある酵素系が阻害され、これを代償する酵素系が発達するものであると考えざるをえないのである。

ここに、ペニシリン耐性となるための酵素系の発見が必要となつてくる。また、これを知るために耐性菌の正常菌と相違した生物学的性状の研究の意味が存する。第1報に述べた、呼吸酵素の含量の相違より、第2報に述べた、物質酸化機構の変化を見出したのであるが、この間に、ペニシリンによる阻害され易い酵素系、阻害されがたい酵素系の関係が存在するものと推定される。ある酵素が量的に増減している場合、これをいかに解釈するかは、種々実験して検討しなければ、その意義が明確にならないのは当然であらう。

実験 I

正常菌 (Staph. aureus 209-P) 及び耐性菌 (10⁴ 倍ペニシリン耐性) を用い、これがブイヨン中で発育する時に、培地中に産生する Riboflavin の量を測定した。この時、ペニシリンの Riboflavin 産生に対する影響を調べるために、正常菌に対しては 0.005 u/cc 及び 0.01

u/cc, 耐性菌に対しては 1.0 u/cc, 10 u/cc 及び 100u/cc ペニシリンを添加せるものについても実験を行った。

測定方法

上記の条件を満たす試験管にそれぞれ正常菌及び耐性菌を培養し、次の如き測定を行った。即ち、各試験管について、先ず、発育菌量を測定し、ついで培地に産生された Riboflavin の量を測定した。発育菌量の測定には比濁汁を用い、Riboflavin の量の測定には、遠心沈澱器を用いて菌体を分離し、その上清に含まれる Riboflavin を型の如く Lumiflavin に光分解し、その蛍光を標準液と比較し、量を決定した。

著者の用いた方法は、上清 1 cc に 1 N-NaOH 2 cc 加え、これを光分解 1 時間、ついで氷醋酸 1 cc 加えて酸性とし、Chloroform 2 cc 加えて、この層に移った Lumiflavin の量を測定したのである。

測定成績

試験管番号	発育菌量 mg/cc	Riboflavin 量 γ/cc	Riboflavin 量/菌mg
(1) 正常菌	0.169	0.086	0.5r
(2) " (0.005u/cc)	0.020	0.141	7.1r
(3) " (0.01 u/cc)	0.013	0.052	4.0r
(4) 耐性菌	0.150	0.156	1.0r
(5) " (1.0u/cc)	0.082	0.123	1.5r
(6) " (10.0u/cc)	0.020	0.113	5.7r
(7) " (100.0u/cc)	0.015	0.030	2.0r

この測定成績より次の 2 つの事実を知りうる。

(1) ペニシリンを添加しない場合について観察すると、発育せる単位菌量について、耐性菌は正常菌よりも Riboflavin の産生量は増大している。

(2) ペニシリンを添加せる場合について観察すると発育を完全に阻止しない量でも、発育に相当の影響を与えていることがみられるが、単位菌量について、正常菌及び耐性菌ともに Riboflavin の産生量は、ペニシリンを添加せぬ場合に比較して増大している。そして、Riboflavin の産生量は正常菌及び耐性菌ともにペニシリンが完全発育阻止濃度附近よりも低濃度、即ち正常菌においては 0.01 u/cc よりも 0.005 u/cc, 耐性菌においては 100u/cc よりも 10u/cc において増大していることがみられる。

考 察

実験 I においてみられた Riboflavin の産生量の問題について考察する。

細菌を培養した場合、培地中に産生される Riboflavin については、菌体に含有されていたものが、死滅による菌体の崩壊のために、単に遊離されたものであるという見解がとられていた。しかし、一方では Yeast 等の実験で、培地の鉄を減ずるか、青酸等を作用させると急激に Riboflavin の産生量が增大することより、なにか代謝に関係があるという見解もとられているところである。

しからば、耐性菌が正常菌よりも産生する Riboflavin、及び正常菌、耐性菌がペニシリンの影響下に産生する Riboflavin はいかなる意味を持つているかという問題が出てくる。第 2 報において菌体内に増量した Riboflavin が関係する酵素について、一応の推定をしたところである。そして、耐性菌を培養した場合、この酵素が当然、活動するものと想像される。そのために、耐性菌において Riboflavin が正常菌より増量して産生されると解釈すれば、一応説明がつく。次のペニシリンの影響下の Riboflavin の産生に関する問題は、ペニシリンの作用である酵素が阻害され、影響を受けない耐性菌にみられるような酵素の活動が表面に現われ出るとすれば、正常菌耐性菌ともに Riboflavin の産生が増量することは考えられるところである。しかし、ペニシリンの作用が発育阻止濃度付近で、Riboflavin の産生にも影響を与えていることは、ペニシリンの作用が Riboflavin の合成にも影響を与えるものと考えられ、合成に必要な energy が与えられなければ、即ち、ペニシリンの濃度が高くなれば、Riboflavin は合成されず、菌の発育も起らないわけである。

以上の考察より、耐性菌にとつてペニシリンに阻害されぬ重要な酵素は Riboflavin になにか関係があることと、ペニシリン耐性発現には Riboflavin が関係するのではないかということが推定される。しかも Riboflavin というものの細菌における意義より、Flavin 酵素が問題となつてくる。

細菌の酵素として Riboflavin を prosthetic group とする Flavin 酵素には次のものがあることが知られている。

- (1) d 及び l-amino 酸化酵素
- (2) Diaphorase
- (3) autoxidizable の Flavin 酵素

耐性菌に増大していると思われるものは、第 2 報にお

ける実験より、(1)と(3)の Flavin 酵素であり、(2)の Flavin 酵素は Krebs-cycle に関する物質には減少しているのがみられた。この Flavin 酵素が活動するために耐性菌は Riboflavin の産生を増大させると思われるが、正常菌及び耐性菌がペニシリンの影響を受ける時には、一層活動が必要となり、Riboflavin が産生されるものと考えられる。

しかし、次に重要なことは、耐性菌における Flavin 酵素、及び正常菌、耐性菌がペニシリンの影響下に活動すると思われる Flavin 酵素が、細菌の生理にいかなる意味を持つかという問題である。

この問題を解明するために酵素の阻害剤である metabolic inhibitor を利用することを考えた。Riboflavin の metabolic inhibitor には次の物質がある。

- (1) Riboflavin の誘導体
- (2) Phenazine の誘導体
- (3) 抗マラリア製剤

実験に供することができたのは、抗マラリア製剤の quinine と、同じく acridin の誘導体である acriflavin であった。

抗マラリア製剤の Flavin 酵素阻害作用、及びその阻害作用が Flavin-adenine-dinucleotide により回復されることは、Hellerman 等 (1946) がみており、acriflavin の Flavin 酵素阻害作用については、Martin 等 (1949) の推定がある。また Sevag 等 (1948) はこの製剤を使用し阻害実験を行っている。

実験 II

quinine 及び acriflavin を用い次の実験を行った。

(1) 細菌に対しペニシリンとともに作用させた場合いかなる態度を示すか。

(2) 細菌がペニシリン耐性を獲得した場合、即ち、耐性菌となった場合に両薬剤に対しいかなる態度を示すか。

(3) 細菌が quinine 耐性を獲得しうるならば、この菌がペニシリンにいかなる態度を示すか。

(4) 細菌が acriflavin 耐性を獲得しうるならば、この菌がペニシリンにいかなる態度を示すか。

使用菌株は Staph. aureus 209-P、培地は肉汁ブイヨン、薬剤は市販の塩酸キニーネ及びアクリフラビンを用いた。

(1) の実験は、ペニシリン及び両薬剤をブイヨンにて稀釈混合したものに、菌を移植し、24時間後の発育を調べた。

実験成績

(a) ペニシリンと quinine の場合

(— 発育陰性, + 発育陽性)

quinine \ PC	0.05 u/cc	0.025 u/cc	0.012 u/cc	0.006 u/cc	0.003 u/cc
700 r/cc	—	—	—	—	+
350 r/cc	—	—	—	+	+
175 r/cc	—	—	+	+	+
87.5 r/cc	—	+	+	+	+
対 照	—	+	+	+	+

(b) ペニシリンと acriflavin の場合

acriflavin \ PC	0.05 u/cc	0.025 u/cc	0.012 u/cc	0.006 u/cc	0.003 u/cc
25 r/cc	—	—	—	—	+
12.5 r/cc	—	—	—	+	+
6.2 r/cc	—	—	+	+	+
3.1 r/cc	—	+	+	+	+
対 照	—	+	+	+	+

両薬剤はともにペニシリンと協力作用が認められ、濃度が高い方が顕著なることが観察される。しかし、quinine においては 87.5 r/cc, acriflavin においては 3.1 r/cc の濃度では協力作用が認められない。

(2) の実験は、細菌をペニシリンに 10 倍、10² 倍、

実験成績

(a) quinine の場合

細菌 \ quinine	正常菌	耐 性 菌			
		10倍	10 ² 倍	10 ³ 倍	10 ⁴ 倍
800 r/cc	—	—	—	—	—
700 r/cc	+	—	—	—	—
350 r/cc	+	+	—	—	—
175 r/cc	+	+	+	—	—
87.5 r/cc	+	+	+	+	+

(b) acriflavin の場合

細菌 \ acriflavin	正常菌	耐 性 菌			
		10倍	10 ² 倍	10 ³ 倍	10 ⁴ 倍
30 r/cc	—	—	—	—	—
25 r/cc	+	—	—	—	—
12.5 r/cc	+	+	—	—	—
6.2 r/cc	+	+	+	—	—
3.1 r/cc	+	+	+	+	+

10³ 倍, 10⁴ 倍耐性となし, それぞれ両薬剤に対する感受性を調べた。

この実験成績より, 細菌はペニシリンに耐性度が高まるに従って, 逆に両薬剤に感受性が高まって行くのが観察される。しかし, 両薬剤に対する感受性にも限界があり, quinine 87.5 r/cc, acriflavin 3.1 r/cc の濃度が限界の如く認められる。

(3) の実験は, quinine 耐性菌を得ることができず実験は失敗した。

(4) の実験は, 細菌を 25 r/cc から始めて, 50 r/cc, 100 r/cc, 200 r/cc に耐性を獲得した菌について, ペニシリンに対する感受性を調べた。

実験成績

PC		0.05 u/cc	0.025 u/cc	0.012 u/cc	0.006 u/cc	0.003 u/cc
細菌						
耐アラ	50 r/cc	—	—	+	+	+
クビ	100 r/cc	—	—	—	+	+
性リ	200 r/cc	—	—	—	—	+
菌フン						
正 常 菌		—	+	+	+	+

この実験成績より, 細菌は acriflavin に耐性になるに従って, 逆にペニシリンに感受性が高まって行くのが観察された。

考 察

この一連の実験は, 耐性菌におけるペニシリンに阻害されない酵素として, Flavin 酵素の意義を明確にしたものといえる。

(1) の実験において, 両薬剤にペニシリンとの協合作用が認められたことは, ペニシリンと両薬剤の作用機作が同じであるか, 或は全く異なるものであるかを示すものである。即ち, ある酵素に対してペニシリンとともに作用しているか, 或は代償して活動する酵素に作用することによってペニシリンと協合作用が現われているものと思われる。quinine 及び acriflavin がペニシリンと同じ酵素に作用するという考え方は (2) の実験によって否定される。これに, (4) の実験を考慮に入れると, 明らかに, ペニシリンの作用は acriflavin の阻害しがたい酵素に, acriflavin (或は quinine) の作用はペニシリンの阻害しがたい酵素に作用していることが観察される。

本実験は実験 I にみられた耐性菌の産出する Riboflavin, 及び正常菌及び耐性菌がペニシリンの影響下に産生する Riboflavin の意味を確実にするために行った

のであるが, この Riboflavin を prosthetic group とする Flavin 酵素が, 耐性菌にとつてのみならず, 正常菌及び耐性菌がペニシリンの影響を受ける時, 即ち拮抗して発育する時に, 重要な意味, 即ち生命を維持するのに必要な酵素であることを知った。

この立場より, 細菌がペニシリンに拮抗して発育するためには, 即ち, 耐性を獲得するためには, 細菌としては Flavin 酵素を合成するに必要な energy を持つて, この酵素を活動させることが必須の条件であること, 及び, 逆に耐性獲得を防止するためには, 発達ないし増量する Flavin 酵素を阻害すること, 即ち, 合成の energy を与えないようにペニシリンを大量に与えること, 及び, Flavin 酵素の活動を阻害する metabolic inhibitor を用いることという結論に到達する。

この結論は, その後行つた実験の事実によつて, 一応裏付がてき, 確実性を得られたが, 問題は, ペニシリンのいかなる作用によつて, 即ち, ペニシリンがいかなる酵素を阻害するために, Flavin 酵素が重要になつてくるかである。(4) の実験より, acriflavin に耐性を獲得した菌が得られたが, これがペニシリンに感受性が高く, この問題の解決に手掛を与えることを知った。この菌を感性菌と名付け, この菌の種々の基質の酸化速度を測定し Q₀₂ を求めた。

感性菌の諸基質に対する Q₀₂ 一覽表

葡 萄 糖	1051.0	dl-a-Alanin	268.0
焦性葡萄糖酸	599.0	l-Alanin	167.0
Citric acid	96.0	d-Glutamic acid	1482.0
Succinic acid	1025.0	l-Glutamic acid	1675.0
Malic acid	820.0		

この成績は感性菌の菌体に含まれる呼吸酵素の量とも関係すると思われるので, 調べてみると正常菌と比較して Cytochrome の量が減少せず, Riboflavin が減少しているのがみられた。即ち, 耐性菌にみられた呼吸酵素の含量の関係と逆になつているのが知られる。Q₀₂ の値は Amino 酸の酸化の場合を除いてすべて耐性菌よりも増大していることは, 第 2 報と比較すれば, 明らかで, Cytochrome-cytochrome oxidase の活動と, Amino 酸酸化酵素の量的減少を示すものといえる。しかし, 感性菌は, acriflavin の作用のために, Cytochrome 系はある程度, 維持されていても, これを還元する Flavin 酵素の量的減少をきたし, 正常菌に比較し, 焦性葡萄糖酸 Succinic acid, Malic acid の酸化速度が低下していることがみられるが, 当然のことであろう。感性菌がペニ

シリンと拮抗する **Flavin** 酵素が減少ないし生産されぬためにペニシリンによって容易に阻害されるとすれば、呼吸系に関する限り、ペニシリンの作用は **Cytochrome** 系の阻害ということに限定される。徒来、耐性菌の呼吸酵素の含量の問題より、ペニシリンの作用機作として **Cytochrome** 系の合成の阻害を唱えて来たのであるが、一証明となりうると考える。

以上の推論より、ペニシリンの阻害する酵素として、**Cytochrome** 系が挙げられ、また、ペニシリンに拮抗する酵素として **Flavin** 酵素が挙げられる。

実験 III

Warburg 検圧計を用い、正常菌、耐性菌 (10^4 倍ペニシリン耐性) 及び感性菌の葡萄糖、焦性葡萄糖及び **Succinic acid** の酸化時における酸素摂取阻害実験を行った。阻害剤としては、**Cytochrome** 系に対するものとして NaN_3 を、**Flavin** 酵素の阻害には **acriflavin** を用いた。

阻害剤の濃度は予備実験を行つて、 NaN_3 は 2,000 倍、4,000 倍、8,000 倍にしたもの、**acriflavin** は 8,000 倍、16,000 倍、32,000 倍にしたものを、Warburg の主室に 0.5cc 入れて、型の如く測定した。

測定後、それぞれの QO_2 を算出するとともに、阻害剤を入れぬ対照実験に対する比率を計算した。

実験成績

次に実験成績の一例を挙げる。

(1) NaN_3 による阻害実験

(a) 葡萄糖の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
NaN_3						
× 2,000	483.0	65.7	622.0	83.9	558.0	52.7
× 4,000	501.0	68.2	635.0	85.6	661.0	62.5
× 8,000	541.0	73.6	674.0	90.7	777.0	73.9
対 照	735.0	100.0	742.0	100.0	1058.0	100.0

(b) 焦性葡萄糖の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
NaN_3						
× 2,000	747.0	80.0	385.0	86.5	326.0	55.8
× 4,000	747.0	80.0	389.0	87.3	411.0	70.1
× 8,000	747.0	80.0	396.0	89.5	431.0	73.6
対 照	934.0	100.0	445.0	100.0	586.0	100.0

(c) **Succinic acid** の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
NaN_3						
× 2,000	209.0	15.6	166.0	38.4	142.0	13.8
× 4,000	271.0	21.1	219.0	51.5	187.0	18.2
× 8,000	355.0	27.5	321.0	73.4	242.0	23.5
対 照	1290.0	100.0	425.0	100.0	1028.0	100.0

(2) **Acriflavin** による阻害実験

(a) 葡萄糖の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
Ac.						
× 8,000	583.0	79.3	345.0	46.5	984.0	93.0
× 16,000	672.0	91.5	372.0	50.2	961.0	90.9
× 32,000	735.0	100.0	405.0	54.5	962.0	91.0
対 照	735.0	100.0	742.0	100.0	1058.0	100.0

(b) 焦性葡萄糖の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
Ac.						
× 8,000	693.0	74.2	150.0	33.7	537.0	91.6
× 16,000	796.0	85.4	167.0	37.5	517.0	88.2
× 32,000	864.0	92.5	187.0	42.4	502.0	85.6
対 照	934.0	100.0	445.0	100.0	586.0	100.0

(c) **Succinic acid** の酸化

細菌	正 常 菌		耐 性 菌		感 性 菌	
	QO_2	%	QO_2	%	QO_2	%
Ac.						
× 8,000	1051.0	81.5	304.0	71.6	508.0	49.5
× 16,000	1140.0	88.5	286.0	67.1	534.0	51.9
× 32,000	1225.0	95.0	275.0	64.8	568.0	55.3
対 照	1290.0	100.0	425.0	100.0	1028.0	100.0

考 察

本実験は耐性菌及び感性菌の呼吸酵素系について、その構成を一層、明確にするために行つたものである。

NaN_3 の阻害実験について観察すると、耐性菌は、葡萄糖、焦性葡萄糖、**Succinic acid** の酸化時における阻害が正常菌及び感性菌より少いことがみられ、阻害されがたいことが認められる。このことは、 NaN_3 の作用から推定して、**Cytochrome** 系以外の酸化酵素で耐性菌は物質の酸化、即ち、呼吸を行つているものと推定されるの

である。正常菌と感性菌について観察すると、感性菌は阻害の影響が強く、その呼吸は **Cytochrome** 系に正常菌よりも頼っていることが認められるのである。

次に **acriflavin** の阻害実験について観察すると、耐性菌は葡萄糖、焦性葡萄糖の酸化時に正常菌及び感性菌より阻害され易いことが認められる。このことは、**acriflavin** の作用から推定して、**Flavin** 酵素で耐性菌が呼吸を行っているものと推定されるのである。正常菌と感性菌について観察すると、感性菌は阻害されがたいことが認められ、その呼吸は **Flavin** 酵素の重要性が薄いことが認められる。しかし、この関係が、**Succinic acid** において、耐性菌と正常菌の間には認められても、感性菌には認めがたい結果が得られている。この結果について考えることは、感性菌の発生する時の状況である。**acriflavin** は **Flavin** 酵素を阻害し、細菌としては、**Cytochrome** 系に頼って行こうとする傾向をとるが、**Cytochrome** 系の還元には **Flavin** 酵素が必要なわけで、**Succinic acid** の場合は特に維持されるし、重要な意味を持っていると考えられるのである。**NaN₃** による実験では明らかにされなかったことが、ここに明らかにされたわけである。

以上の推論により、耐性菌は **Flavin** 酵素により、感性菌は **Cytochrome** 系により呼吸を行っているものと一般的にいえるわけで、実験 I, II の裏付が行えたわけである。

結 論

著者の行った実験 I, II, III より、次の結論が下せ

る。

(1) ペニシリンは細菌の **Cytochrome** 系呼吸酵素の合成を阻害する。

(2) 細菌がペニシリンに耐性になる場合、**Flavin** 酵素が **Cytochrome** 系呼吸酵素の代償をなす。

(3) 細菌のペニシリン耐性獲得を防止するには **Flavin** 酵素の合成を阻害するか、発生した **Flavin** 酵素の生理的機能を阻害することによってその目的を達することができる。

擧筆するに当たり、絶えざる御指導及び御援助を賜わった東大衛生学教室の羽里教授、豊川助教授及び教室の諸兄に深く感謝致します。

文 献

- 1) 阿部温男: 日本衛生学雑誌, 4, 427 (1950)
阿部温男: 日本衛生学雑誌, 10, 158 (1955)
阿部温男: 順天堂医学雑誌, 1, 2 (1955)
- 2) 秋葉朝一郎: 日本化学療法学会雑誌, 1, 1, 1 (1953)
- 3) Demerec, M.: Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 31, 16 (1945)
- 4) Hellerman, L.: J. Biol. Chem., 163, 553 (1946)
Hellerman, L.: Federation Proc., 5, 400 (1946)
- 5) Martin, Moss: Am. J. Pharm., 121, 169 (1949)
- 6) Sevag, M.G.: J. Bac., 56, 709 (1948)
- 7) Lardy, Henry A.: Respiratory enzymes
Burgess Publishing & Co., U.S.A. (1950)

(受付: 1955 年 12 月 15 日)