細菌の人工ストレプトマイシン耐性 變異についての研究

Studies on the Induced Streptomycin-Resistance of Bacteria

日本醫科大學衛生學教室 (主任: 八田貞義教授指導)

研 究 生 井 上 種 子

Inoue Taneko

I. ま え が き

スルホンアミド剤が現われて以來、細菌の化學療法劑に對する耐性變異の問題は、急激にその比重を増しつつある。かつて化學療法が原虫に對する比素劑、一部の細菌に對するキニン誘導體などに限局されていた時代はさておき、細菌の化學療法が事實上新生の歩みをふみだした 1933 年から 20 年の間、多くの研究者の作り出したすぐれた化學療法劑の普及にもかかわらず依然として多くの患者が細菌性疾患のために苦しんでいるのは、ひとえに細菌の耐性變異のためであると考えられる。

いうまでもなく細菌は生物の中で最も構造の單純なものではあるけれども、その示す生活反應 (いゝかえれば酵素系の作用) は高等生物の細胞のそれに較べてそれほどひけをとらぬ程多岐なものである。そしてそれらの酵素系は、細胞そのものが未分化であるだけにきわめて融通性に富み、外部からの阻害に對して容易に廻り道してこれに順應し (適應酵素系—adaptive enzyme—の生成)、これが耐性變異のできる原因の 1 つであると考えられている。

現在までに現われた化學療法劑の中で、もつとも耐性のために苦しめられているのは何といつてもストレプトマイシンであろう。特にその結核症に對するきわめて強い *in vivo* 効果が多くの抑制を受ける原因の大部分は耐性の問題である。しかもストレプトマイシンに對する菌の耐性は單に抵抗性の増強だけでなく、ストレプトマイシン依存性 (streptomycin-dependence) の發生がみられるという點でもかなり他

の治療劑と異つている。

著者は、ストレプトマイシン耐性の出現の機作をさぐる一助として、ブドウ球菌とシゲラとを用いて、耐性のできる經過、耐性株の生物學的性狀、榮養要求度の變化及び耐性の成因についての追究を行ない、その結果について検討した。以下にそのあらましを報告する。

II. 實驗の材料と方法

1. 實驗に使つた菌株: 實驗に使つた菌株は黄色ブドウ球菌 3 株 (寺島株, Heatley 株, FDA 209P 株), 志賀赤痢菌 1 株 (花房株) で、いずれも國立衛生試験所細菌試験部で保管されたものである。分與を受けた後は、牛肉浸出液—照内ペプトン—寒天培地に週一回繼代保存した。

2. 藥劑耐性株のつくり方: 實驗にはすべて「メルク」製のジヒドロストレプトマイシンを用いた。—以下の記述ではこれを SM の略號で示すことにする。—すなわち肉汁ブイヨン (pH 7.0) に SM を 1 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 5 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 10 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 20 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 50 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 100 $\mu\text{g}/\text{cc}$, …, 1,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 2,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ……にとかけた稀釋系列をつくり, 100°, 30分, 3回の加熱滅菌をして氷室に保存して、用に臨んで使用した (試験管はすべて 1.8 cm × 17.0 cm の中試験管を用い、培地量は 5 cc とした)。各菌株を普通寒天培地に 35°~37°, 20 ± 2 時間培養後、滅菌生理食鹽水 10 cc に 1 ニクロム環を浮游した菌液をつくり、これから 2 cc の駒込ピペットで上記の稀釋系列に 1 滴ずつ移植する、移植した系列は 35°~37°, 48 ± 3 時間培養し、菌の増殖した試験管の中 SM 濃度の最も高いものか

ら、次の同じ系列に移植し、隔日にこの操作をつづける。各種の検査を行なう場合は、培地から普通寒天培地に移植し、できるだけ早い期間に試験を完了するようにした。

3. 耐性株の生物學的性狀の検査：生物學的性狀の検査には、検査しようとする世代から前項にのべた通り1度普通寒天培地に移植し、これから目的の試験培地に移植するか又は必要とする反応を行つた。

4. 耐性株の栄養要求度の検査：耐性株のいろいろの時期のものについて、必要とする發育素の検索とアミノ酸の要求度の調査を行つた。

a. 發育素の検査を行なう培地

必要な發育素の検査には栄養源として充分の材料を含むことが基本になるから、アミノ窒素源としてビタミンを含まないカゼインアミノ酸を用い、水解によつて消失するトリプトファンと含量の少ないチスチンを補給した。培地の組成は次の通り。

KH_2PO_4	450 mg
NaCl	200 mg
ブドウ糖（無水）	100 mg
l-トリプトファン	10 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
カゼインアミノ酸（日之出）	200 mg
l-チスチン	5 mg
再蒸溜水	100 cc
N-NaOH で pH : 7.0 ± 0.2	

に修正し、次にあげる發育素群を適量に加えて滅菌を行なう。滅菌は加熱によつて成分の分解のおそれがない場合は 100° , 30 分, 3 回の間歇滅菌, 分解のおそれのある場合にはザイツ濾過滅菌を行つた。この實驗に關する限り、基本培地を加熱滅菌するか、濾過滅菌するかは發育そのものには關係がなかつた（これまでである培地成分の發育促進効果が加熱滅菌と濾過滅菌の場合で異なることがある事實が知られているので、特にこの點に留意した¹⁻²⁾）。

發育素としての効果をしらべた物質は次の12種である。

ニコチン酸, 同アミド, パラアミノ安息香酸,

パラアミノフェニル酢酸, ビタミン B_1 , ビタミン B_2 , ビタミン B_6 , パントテン酸 カルシウム, 葉酸, ビメリン酸, イノシット, 酵母核酸。

原株の發育素要求度は大體見當がついているから上記發育素の添加量は特に斷りのない場合は次の量に一定した。

パラアミノ安息香酸, パラアミノフェニル酢酸, ビタミン B_1 , B_2 , B_6 , イノシット, 酵母核酸……………10 $\mu\text{g/cc}$.

ニコチン酸及びそのアミド……………5 $\mu\text{g/cc}$.
パントテン酸, 葉酸, ビメリン酸……………0.5 $\mu\text{g/cc}$.

b. アミノ酸必要度を検査する培地

試験のもとになるアミノ酸—鹽類混液は志賀菌もブドウ球菌も一律に次の組成のものをを用いた。

KH_2PO_4	400 mg
NaCl	200 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
無水ブドウ糖	100 mg
dl-バリン	10 mg
l-チロシン	2 mg
d-アルギニン・HCl	5 mg
dl-トレオニン	5 mg
l-アスパラギン酸	15 mg
グリシン	5 mg
l-ロイチン	15 mg
l-ヒスチジン・HCl	5 mg
l-プロリン	5 mg
dl-セリン	5 mg
l-トリプトファン	5 mg
l- α -アラニン	10 mg
l-チスチン	2 mg
dl-メチオニン	7 mg
dl-リジン・HCl	5 mg
d-グルタミン酸	15 mg
dl-フェニルアラニン	5 mg
再蒸溜水	100 cc
pH : 7.0 ± 0.2	

無機鹽はすべて再結晶したものをを用い、アミノ酸は、d-グルタミン酸とl-トリプトファンは和光純藥の製品、その他のものは日之出製藥の

ものである。

c. 菌のうえ方

菌液のつくり方と移植の方法は次のようにした。菌を肉汁寒天斜面に 37°C , 20 ± 2 時間培養し、菌苔をかきとり滅菌生理食鹽水で3回洗い、大約 $0.2 \text{ mg}/10 \text{ cc}$ の生理食鹽水浮游液をつくり、2 cc 駒込ピペットで培地 5 cc に對し1滴ずつ移植した。

d. 發育度の測定

發育度は肉眼による觀察又はチンダルメーター、時には光電比濁計を用いた。

III. 實驗成績

1. 耐性のできる経過について：Ⅱ-2でのべた方法によつて耐性のできる経過をたどつてみると、大體第1圖に示したようになる。

a. ブドウ球菌

ブドウ球菌は3株ともほとんど變らぬ徑路をたどつてきわめて速やかに耐性を獲得する。すなわち寺島株と 209 P 株では初代 $2.5 \mu\text{g}/\text{cc}$ の抗菌價を示したものが2代で、 $100 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、3代で $500 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、5代で $5,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、11代で $20,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ とはじめからかなりな速度で耐性が上昇した。Heatley 株は初代 $2.5 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、3代 $1,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、5代 $2,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、10代 $20,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ と數値こそちがうが、同じ速度で耐性化している（著者の研究は耐性株を目標にしているので、菌が依存性にならぬよう15以後は SM 濃度を $5,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ に停止し繼代保存した。抗菌價は20代 $20,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、30代 $10,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、50代 $10,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ と大差なく保持され、依存化の傾向は見られなかつた）。

b. 志賀菌

花房株はブドウ球菌とはやゝ異つた狀況を示した。すなわち初代—第4代までは $10 \mu\text{g}/\text{cc}$ で全く變りがなく、5代 $20 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、7代 $50 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、10代 $200 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、15代 $1,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、18代 $2,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、25代 $5,000 \mu\text{g}/\text{cc}$ で以後48代まで上昇の傾向を示さない。耐性上昇の速度がおそく、はじめに停止期があつた點が注目された。

2. 耐性株の示す各種生物學的性状

a. 形態と染色

第1圖 耐性のできる経過

イ. ブドウ球菌 3株とも原株では大きさ $0.8 \sim 1.0 \mu$ の球菌であるが、耐性第5代株 (R-5 と略) では $1.0 \sim 1.2 \mu$ 、R-20 では $1.5 \sim 2.3 \mu$ と大體 2~3 倍程度に膨化する。菌體のメチレン青に對する染色性、グラム染色性ははつきりした差を示さなかつたが、209 P 株だけは R-30 以後菌體の染りがわるくなり、時にメチレン青に濃染する 1~3 箇の小顆粒、馬蹄形の大顆粒を認めるようになった。

ロ. 志賀菌 花房株の原形態は $0.2 \times 1.0 \mu$ 程度であるが、R-5 は長さが $1.2 \sim 1.5 \mu$ 位になり、R-20 では横徑、長徑ともかなり大きくなるが ($0.5 \sim 0.8 \times 1.5 \sim 2.0 \mu$) 染色性はそれ以後でも變りがなく、顆粒構造は認められなかつた。

b. 糖分解作用

糖分解作用はすべて Barsiekow 培地を用い行なつた。

イ. ブドウ球菌 ブドウ糖、乳糖、マンニット、ガラクトースの分解能がいずれも相當おくれ、特にマンニット分解能は3株とも全く消失していた。しかし新に分解能を誘起したものはない。

ロ. 志賀菌 ブドウ糖の分解は10日前後までのびているが、他の糖分解能は著しい差を示さない。

c. その他の性状

ゼラチン液化能、リトマス牛乳、インドール産生能、硝酸鹽還元はいずれの場合も差がないが、ブドウ球菌では全株について血漿凝固作用、食鹽耐性、溶血能は消失又は減弱した。特に 209 P 株では病原性を示す 3 作用はいずれも全

く消失し、もつとも變異が著明であり、これに對して Heatley 株は 3 株中もつとも變異が少いようであつた。

以上耐性株の性狀を原株のそれと比較表示したのが第 2 表である。

第 2 表 耐性株の生物學的性狀 (+) の肩の數字は分解に要した日數

		運 動	イン ドール 産生	牛 乳	硝 酸 鹽 還 元	ゼ ラ チ ン 液 化	溶 血 作 用	血 漿 凝 固	食 鹽 耐 性	糖 分 解 作 用									
										乳 糖	ブ ド ウ 糖	し よ 糖	マン ニ ット	ガラ クト ース	マル ト ース	ラ フ イ ノ ース	キシ ロー ーズ	ザ リ チ ン	ゾ ル チ ット
寺 島 株	原	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	R-20	—	—	+	+	+	±	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—
Heatley 株	原	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	R-20	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
FDA 209 P 株	原	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	R-20	—	—	+	+	+	—	—	—	+	±	+	—	+	—	—	—	—	—
花 房 株	原	—	—	—	+	—	/	/	/	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—
	R-20	—	—	—	+	—	/	/	/	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—

3. 耐性株の栄養要求度：耐性株は 5 代、10 代及び 20 代のものについてそれぞれ發育素及びアミノ酸必要度をしらべた。

イ. ブドウ球菌

i) 發育素要求度 ブドウ球菌の 3 株はいずれもニコチン酸 (又はそのアミド) とビタミン B₁ を必要とし、前者は 10^{-7} モル濃度 (Heatley 株は 10^{-8} モル濃度を必要とする)、後者は 2×10^{-8} モル濃度が最小限度である。又ニコチン酸アミドは 3 株とも 10^{-8} モル濃度まで有効である。

耐性株は R-5, R-10 では 3 株ともにビタミンの要求度には變りがない。しかし R-20 になると各株の態度はかなり異つてゐる。すなわち Heatley-R-20 はニコチン酸 (アミド)、ビタミン B₁ の他にビタミン B₆、葉酸が必須になつてくる——こゝでは前に 3. a. にのべた基本培地に 12 種のすべて (ニコチン酸とそのアミドは別に用いた) を加えたものを標準としてそれから一種ずつの發育素を抜いて増殖度の變化を見ると、いわゆる拔取り實驗 (elimination test) が用いてある。——のに 209 P-R-20 はビタミン要求度には變りがなく、寺島-R-20 は標準の

ビタミン加培地にも全く發育出来なくなつてゐる。

なお注目すべきことは水解カゼイン培地における増殖度がそれぞれに異つてゐることである。Heatley 株では R-5, R-10 とともに原株とかわりがなく、R-20 ではやゝ原株より發育がよくなつてゐる。寺島株では R-5 ですでに原株より 20% 程度よくなり、R-10 では 40% 減少し、R-20 では全くはえなくなる。これに反して 209 P 株では R-5 は原株と變りがないか、R-10, R-20 はいずれも原株より發育がかなりよくなつてゐる。

ii) アミノ酸要求度 耐性株のアミノ酸要求度は II-4-b のアミノ酸培地に、R-5, R-10 ではニコチン酸とビタミン B₁ を加え、更に R-20 ではその他にビタミン B₆ と葉酸を加えたものを標準培地としてこれからアミノ酸を 1 種ずつ抜きとつた培地をつくつて發育の變化を觀察した。

寺島株：寺島株は 17 種のアミノ酸の中で、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、チスチンが大概必須で、グリシン、アスパラギン酸、フェ

ニルアラニンなどが發育を助ける。寺島-R-5では上記の中でグリシンが必須となるだけでほとんどで原株と變りがない。ところが R-10 になるとバリン、チロシン、リジン、トリプトファンその他のアミノ酸はすべて必須となってくる。R-20 は純合成培地にはえないので、何か不足しているのかよくわからない。

Heatley 株: Heatley 株も寺島株とよく似ているが、ヒスチチンが必要でなくアラニンが重要である點が異つている。Heatley-R-5, R-10

第3表 ブドウ球菌の原株及び耐性株の
營養要求の比較

	Heatley		寺島*		209 P	
	原	R-20	原	R-10	原	R-20
nicotinic acid	++	++	++	++	++	++
thiamin	++	++	++	++	++	++
riboflavin	-	-	-	-	-	-
pyridoxine	-	++	-	-	-	-
folic acid	-	-	-	-	-	-
pantothenic acid	-	-	-	-	-	-
pimelic acid	-	-	-	-	-	-
ribonucleic acid	-	-	-	-	-	-
glycine	++	++	+	++	++	++
α-alanine	++	++	+	++	++	++
valine	-	++	-	-	-	-
leucine	-	-	-	++	-	++
cystine	++	++	++	++	++	++
tyrosine	-	-	+	+	-	-
histidine	-	++	++	++	-	-
methionine	-	++	-	++	++	++
arginine	++	++	++	++	++	++
proline	++	++	++	++	++	+
lysine	-	-	-	-	++	++
threonine	-	++	-	++	-	-
serine	-	++	-	++	-	-
glutamic acid	+	++	+	++	+	++
aspartic acid	++	++	++	++	++	+
phenylalanine	++	++	++	++	++	++
tryptophane	-	+	-	-	-	-

(註) (++)—發育に必須 (++)—とりのけると發育が 50% 以上へるもの (+)—とりのけると發育が 50~30% へるもの (—)—發育に關係のないもの

* R-20 はアミノ酸ビタミン混合培地に増殖しない。

では營養要求は全く變りがなく、わづかに R-10 でヒスチチンが重要になる點が異つている。R-20 ではロイチン、チロシン、リジン、トリプトファンの他はすべて必須になる。

209 P 株: Heatley 株に比べ更にメチオニン、リジンが必要である點が異つている。R-5, R-10 ではアミノ酸の必要度には變りがないが、R-20 ではアスパラギン酸、プロリンの必要度が減じ、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイチンが必須になる點が他の株と異つていた。

以上のブドウ球菌の營養所見は第3表、第4圖に示されている。

第4圖 耐性株のカゼイン培地に於ける増殖

ロ. 志賀菌

i) 發育素要求度: 原株は水解カゼイン培地(トリプトファンを含む)、アミノ酸培地では特異の發育素を要求しない(たとえトリプトファンを含まない培地ではニコチン酸は發育促進的に作用する)。しかし R-5, R-10 はいずれもニコチン酸(アミド)がないと兩種の培地に増殖できず、R-20 はこの實驗のすべての發育素に對して反應しなかつた。

ii) アミノ酸要求度: 原株はニコチン酸が存在するとグルタミン酸だけを必須とするが、R-5, R-10 はグルタミン酸の他に、アスパラギン酸、プロリン、ヒスチチン、チスチンが必須になつた。

以上の志賀菌の營養所見は第5表に示されている。

第5表 志賀菌の原株及び耐性株の栄養
要求度の比較

	原	R-10
nicotinic acid	⊕	⊕
glycine	—	—
α-alanine	—	—
valine	—	—
leucine	—	—
cystine	—	⊕
tyrosine	—	—
histidine	—	⊕
methionine	—	—
arginine	—	—
proline	—	⊕
lysine	—	—
threonine	—	—
serine	—	—
glutamic acid	⊕	⊕
aspartic acid	—	⊕
phenylalanine	—	—
tryptophane	—	—

(註) 表示は第3表と同じ、⊕は条件により有効なことを示す

4. 耐性株の復歸：各菌株の R-20 を SM を含まない寒天斜面に隔日に繼代し、適宜に各種の性状を検査した。

a. 形態の復歸：どの菌株についても形態は5代繼代でかなり小さくなり、10代で全く原株と同じになる。形の復歸はもつとも速やかであった。

b. 生物學的性状：5代、10代では性状の復歸は全く見られないが、20代になるとブドウ糖の分解速度がやゝ早くなり、40代では溶血作用、食鹽耐性はかなり元にもどつたが、マンニト分解能、血漿凝固作用は70代になつても回復しなかつた。

c. SM 耐性：SM 耐性の復歸はかなりおそく、志賀菌、ブドウ球菌ともに10代、20代では耐性の低下がなく、30代では志賀菌は 2,000 $\mu\text{g/cc}$ に、ブドウ球菌は 209 P 株のみ、2,000 $\mu\text{g/cc}$ に、他は 5,000 $\mu\text{g/cc}$ に低下し、50代では志賀菌は 500 $\mu\text{g/cc}$ 、ブドウ球菌は 1,000 $\mu\text{g/cc}$ の抗菌價を示し、70、80代では差がない。

d. 栄養要求度の復歸

栄養要求度の復歸はきわめておそく、70代に至るまで要求度の變化はみられなかつた。

5. 耐性株を用いた細菌の接合についての一實驗：ちかごろ細菌にも接合(recombination)による有性生殖があるという知見が多くの研究者によつて得られている。それで著者も花房-R-10を用いてこの點についての實驗を試みた。

まず R-10 をニコチン酸カゼイン水解培地 + SM 200 $\mu\text{g/cc}$ の平板とニコチン酸を含まない同じ SM 含有培地平板に培養したところ、後者には全く菌が發育してこなかつた。すなわち R-10 は大體において全くニコチン酸必要性に變異しているものと見られる。

次にニコチン酸 + SM 培地の定型的な集落とニコチン酸を含まないカゼイン培地に培養した志賀菌原株の集落とからそれぞれ1ニクロム環ずつを普通ブイヨンに混合培養する。24時間培養後、次の各種の培地にそれぞれ平板培養した。

イ. カゼインアミノ酸培地にニコチン酸と SM 200 $\mu\text{g/cc}$ を含むもの。

ロ. ニコチン酸のみを含むもの

ハ. SM 200 $\mu\text{g/cc}$ のみを含むもの

ニ. カゼインアミノ酸培地

この中でイ、ロ、ニ、の平板にはいずれも多数の集落が発生したが、ハ、の培地にも同時に12箇の集落(30枚の平板から)が認められた。これらの集落はいずれも志賀菌免疫血清と明かに凝集し、志賀菌であることは確實であるが、ニコチン酸を要求することなく、SM 耐性を示している點が特異である。

そこで念のため ロ、の培地に得られた集落の中 148 箇についてニコチン酸の要否と SM 耐性を別にしらべてみたところ、ニコチン酸要-SM 耐性の集落が 46、ニコチン酸不要-SM 感性的集落 93、ニコチン酸要-SM 感性的集落、9 という成績が得られた。

6. 静止菌の耐性獲得の有無について：増殖菌についての耐性獲得の實驗は上にのべた通りであるが、静止菌についてもこの現象が起るかど

うかにはかなり問題がある。それで著者は事實上静止状態とみられる菌に SM を働かせ耐性の有無をしらべてみた。

志賀菌花房株をナス型コルベン—普通寒天培地に 24 時間 37° に培養する。この菌苔をかきとり、大約 1 mg に對し 5 cc の無菌生理食鹽水を加え、3 回菌體を洗う。更に同量の生理食鹽水を加え、ふり動かしながら 30 分放置し、速沈後この操作を 5 回くりかえす。こうすれば檢壓計ではかつて呼吸はほとんど全く認められない。

この状態の菌を 1.5×10^8 /cc の浮游液とし 100 μ g/cc, 500 μ g/cc の 2 種の濃度の SM を加え、37° に保存し、12 時間毎に菌数と SM 抵抗性を測つた。菌数をはかるには生理食鹽水で菌液を 10 倍階段稀釋し各稀釋について 1 cc ずつ 15 枚の平板に混釋培養し、その平均値を菌数とした。SM 耐性の試験は同じ菌液の 0.5 cc を SM を 10 μ g/cc, 20 μ g/cc, 50 μ g/cc, 100 μ g/cc に含む平板に塗布して菌集落を数えた。なお静止菌の對照として SM を含まない菌浮

游液をとり、同じ試験を行つた。

實驗の結果は第 6 表に示してある。菌数は 48 時間までは大體恒常であるが、96 時間といくらか下る傾向を示しており、SM の存在するとしなないとでは變りがない。24~96 時間の菌の抵抗性の分布はいずれの例についてもほとんど差がなく少數の 20 μ g/cc 耐性菌が認められ 50 μ g/cc 以上に耐える個體はほとんど存在しなかつた。

VII. 得られた結果についての考察

1. 耐性のできる経過について

耐性のでき方については Klimek, Cavallito & Bailey (1949)²⁾ がブドウ球菌 FDA-209 P 株について、榊原 (1951)¹⁾ がブドウ球菌 (寺島株)、大腸菌その他について、又寺田 (1951)³⁾ は主として腸内病原細菌 (パラチフス A 菌、同 B 菌、ゲルトネル菌) についてそれぞれの経過を報告している。これらの報告をまとめてみると、大體 SM 耐性の上昇のしかたには 2 通りあるように見える。その 1 つは最初又は 2~3 代目から毎代急速に耐性が上昇して比較的早く依存化の傾向を示すものであり、他の 1 型ははじめ 5~6 代はほとんど抗菌價の變りがなくその後も比較的ゆるやかに耐性が上昇するものである。たとえば Klimek, Cavallito & Bailey (1948) の報告では、209 P 株ははじめ 0.5 r/cc (彼らは 18 時間培養の抗菌價をとっている) であつたものが、7 代で 1 mg/cc, 12 代で 4 mg/cc と上昇し、榊原 (1951) の報告における寺島株もわづかの停止期を経て同じような早いテンポの上昇を示している。著者の實驗した 3 株のブドウ球菌も全く停止期なしに急速な上昇を示し 10 代内外で、1,000 倍以上の高い濃度に達している。山田 (1949)⁴⁾ の報告した大腸菌についての成績も大體この型にあてはめられるものであろう。これとは逆に寺田 (1951) の實驗したサルモネラ菌群はいずれも 20 代以上數十代を経過しながら耐性上昇度は 1,000 倍以内に止まつている。著者の實驗した花房株は 25 代で 500 倍の耐性度に達し、その後 20 代以上この抗菌價に停滯しているが、これは上記のサルモネラと共にこれらの 1 連の菌群が後者の型に入り、比較的耐

第 6 表 静止菌の耐性獲得の程度
(志賀菌花房株使用)

ストマイ 0 (γ /cc)

接 触 時 間	12	24	36	48	60	72	96
菌数 ($\times 10^8$ /cc)	1.5	1.3	1.5	1.2	—	0.8	0.8
ス ト マ イ (γ /cc)	10	∞	∞	∞	∞	—	∞
	20	5	8	13	4	6	2
	30	0	0	0	0	2	0

ストマイ 100 (γ /cc)

菌数 ($\times 10^8$ /cc)	1.2	1.3	1.0	1.0	—	0.7	—
ス ト マ イ (γ /cc)	10	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	20	18	6	21	8	8	15
	30	0	0	0	0	0	0

ストマイ 500 (γ /cc)

菌数 ($\times 10^8$ /cc)	1.7	1.2	1.5	1.0	—	1.0	—
ス ト マ イ (γ /cc)	10	∞	∞	—	∞	∞	—
	20	16	22	—	13	5	—
	30	0	0	0	0	0	—

性ができにくいことを示すものと見られる。

細菌の抗生物質に対する耐性のでき方の原因については必ずしも明確な考え方があるわけではないが(これについては後にのべる) Demerec (1950)¹¹⁾ のように耐性株は突然変異によつてつくられ、SM の場合はこれに適應の要素が加わるものと見れば、次のような考え方となりたつ、著者の試験した花房株についての成績は、他の比較的耐性獲得のおそい抗生物質(たとえばスルホンアミド剤¹²⁾、クロロマイセチン¹⁰⁾など)における耐性のでき方とよくにている点から見て、志賀菌、サルモネラの場合は適應の要素はブドウ球菌ほど強くは働いていないと考えられる。

2. 菌形の變化: SM による菌形の變化については、Klimek, Cavallito & Bailey (1948) は 209p 株では形の變化はないといっているが、榊原 (1951) は寺島株について巨大型の出現と種々の形の顆粒の存在をのべている。著者の實驗例では 3 株のブドウ球菌、1 株の志賀菌はいずれも膨大化するが、3 株のブドウ球菌の中 209P 株のみが R-30 以後染色がわるくなり、菌体内に大小の顆粒を認めるようになった。これは同じ株について得られた Klimek らの成績とはいくらか異つてゐる。

Bellamy & Klimek (1948)¹³⁾、Klimek, Cavallito & Bailey (1948) はいずれも 209 P 株のペニシリン耐性株がグラム陰性となりジフテロイド化、短桿菌化したと報じている。これはその後追試されたわけではないが、SM の場合はこれに比べればはるかに變形の程度がかかるといえる。

著者は菌形の變化は菌が耐性になるために必然的に起る重要な現象とは認めない。なぜならば菌と SM の接觸をなくして繼代すると、數代で形はほとんど原形にもどるにかかわらず、菌の耐性はほとんど低下していない。すなわち菌形の變化は薬剤の「存在」によつて起される現象で、耐性の進展のために變つた代謝過程の表現とは考えられないのである。

3. 生物學的性狀の變化: Klimek ら (1948)

は 209 P 株の SM 耐性株の糖分解能の抑制を報告し、榊原 (1951) も同様な糖分解の變化を報告している。著者の實驗ではブドウ糖を含んで 2~3 の糖の分解がおくれ又は消失したが分解を誘起されたものはない。ブドウ球菌については病原性を表徴する血漿凝固作用、食鹽耐性、溶血能はいずれもマンニツト分解能とともに減弱の傾向を示している。これは一面からみて菌の原始的な方向への變異といえないこともない。Clapper & Heatherman (1950)¹⁴⁾ は *Streptococcus mitis* のスルホンアミド耐性菌が著しく腸球菌的性狀をそなえてきたことをのべているが、これは上にのべた点のもつと明確な表現とみられる。

Newcomb & Nyholm (1950)¹⁵⁾ は大腸菌について耐性を規正する遺伝因子と依存性を表すそれとは同じゲンの變化によるもので、キシロースや麦芽糖の分解と同じ連鎖にあることを示した。このことからみて耐性の發現と解糖作用の變化はかなりつながりのある可能性がある。著者の實驗でも耐性と糖分解の間には菌形の場合ほどにはつきりした、分離を認めることができなかった。

4. 榮養要求度の變化: 細菌の榮養要求度の變化はいうまでもなく 2 つの型に分けられる。その 1 つは菌の榮養要求がきびしくない (non-exact) 方向に變化する型、いかえれば菌が今までよりもつと單純な組成の培地にはえるように變化する型である。他の 1 つは菌の榮養要求がきびしい (exact) 方向に變る型、いかえれば菌が今までの組成の培地にはえなくなるように變る型である。Gale & Rodwell (1948)¹⁶⁾ によると、ブドウ球菌 209 P 株を 100 代近くペニシリンに接觸させた變異株はニコチン酸が不要になると共に、すべてのアミノ酸が不要になり、サイアミン加アンモニウム鹽培地に發育できるようになった。これに對して Steers & Sevag (1949)¹⁷⁾ はスルフアチアゾール耐性ブドウ球菌について、藤野、高木、中田、西野 (1950)¹⁸⁾ はスルフアチアゾール耐性サルモネラについて、中尾 (1951)¹⁷⁾、桑原ら (1951)¹⁸⁾ はい

ずれもスルファチアゾール耐性志賀菌について、Harrison & Clapper (1950)¹⁹⁾ はスルホンアミド耐性 *Streptococcus mitis* について、それぞれ原株と耐性株の栄養要求を比較し、耐性株の方が栄養要求がきびしいことを示している。これは後者の型に属する變異とみられる。

著者の実験では4株のブドウ球菌と志賀菌はいずれも程度の差こそあれ、ビタミン要求又はアミノ酸要求のいずれかがきびしくなっている。要するに著者の試験したSM耐性株のすべては後者の型に入るわけである。

しかしここで問題にしなければならないことは、耐性の進行と栄養要求の變化の程度の平行関係である。著者の実験した3株のブドウ球菌はいずれも10代内外で20 mg/ccの高い耐性度に達しているにもかかわらず、栄養要求度の變化は寺島株を除いてはあまり著明なものでなく、R-20 になつてはじめて強い變化を示している。これとは逆に志賀菌花房株では、まだ耐性がほとんど上昇していないR-5で、すでにニコチン酸の合成能と2~3のアミノ酸合成能の消失が認められる。

このような變異の進行のずれは各種性狀の復歸の場合にも認められる。SM耐性はいずれの株においても30~50代で中間的低下を示したのに、栄養要求の高化は70代まで全く復歸のしるしを示さなかつた。これらの事實は菌形の變化と同じく、必ずしも必然的な平行現象ではないことを示す證據ともみられる（このことは後に論ずるゲン交叉の実験からもかなり明かである）。

なおブドウ球菌耐性株は水解カゼイン培地で原株と異つた發育を示す。すなわち Heatley-R-20 は原株とほとんど差なく發育し、寺島株は著しく發育を損われ、R-20 は發育不能であるのに反し、209 P 株耐性株は原株に比しかなりよい發育を示している。English & McCoy (1951)²⁰⁾ はSM耐性209 P 株がFrieden & Frazier 培地(1947)²¹⁾で感性株よりもよく發育すると報じ、又感性株の培養に0.2 µg/ccのビオチンを加えると耐性株と同じ發育度になるこ

とを示している。著者はビオチンを入手できなかったため、この點までは實驗できなかったが、少なくとも209 P 耐性株が感性株よりよい發育を示す點は正しく一致している。

この問題に限らず、耐性株の栄養要求の變異の狀況は上にのべたことからわかるようになり菌株による個性が表現されている。なお全體を通じてSM耐性に特異的な栄養要求の變異（たとえばKohn, Harrisのいうスルホンアミド耐性におけるメチオニン必要性變異のような）は認められなかつた。

5. 耐性の機作について：現在まで細菌の耐性のでき方については2つの考え方がある²²⁾。その1つは菌群の中には抗生物質の作用とは無關係に突然變異により耐性をもつ個體が存在する。抗生物質はたゞその突然變異個體を選択する役目をするにすぎないと考えるのである。他の1つは耐性は抗生物質との接觸により適應酵素系 (adaptive enzymes) を發現させることによつて生ずると考えるのである。

適應説 (adaptation hypothesis) という考えの中には靜止菌においても適應酵素の發現を考えるものもあるが、この考えは著者の實驗では少なくともその可能性はないと見られる。

最近 Sevag & Rosanoff (1952)²³⁾ は、SM耐性はある種のアミノ酸（ブドウ球菌ではプロリン、アスパラギン酸、フェニルアラニンなど）+ブドウ糖+SMなる關聯においてのみ發生することを實驗し、間接に適應説を支持している。しかし著者の考えからみると、こゝにあげられたアミノ酸のすべては多くのブドウ球菌の發育に必須又は重要でこれらを缺いてはもともと發育が起りにくいということを思い合せれば必ずしも直にこの説を受入れるわけにはいかないようである。

變異に關聯して菌の“Recombination”が近來問題になつてゐる。著者の實驗でも、ニコチン酸要-SM耐性の菌株、ニコチン酸不要-SM感性の菌株を混合培養することによつて、兩者の性狀の交叉した菌を認めることができた。同時に經驗的にSM耐性の遺傳因子とニコチン酸

合成に關聯する因子とは別の座にあると考えてよいであろう。

V. 結 論

著者は3株のブドウ球菌と1株の志賀菌のSM耐性菌の各種性狀を検査して次の結果を得た。

1. ブドウ球菌は3株ともきわめて速やかに、志賀菌ではやゝおそい速度で耐性を獲得した。
2. 耐性株はいずれも巨大型を呈し、一部の菌は小顆粒を示した。糖分解作用の一部は抑制され他の性狀も一部分は消失した。
3. 耐性株は程度の差はあるがビタミン又はアミノ酸の合成能を一部失つた。
4. 静止菌の耐性獲得についての實驗は陰性におつた。
5. 耐性株について菌の接合を實證する實驗を行つた。

終りに終始御親切な御指導をいただいた八田貞義教授、日赤愛知支部病院内科醫長芳賀圭五博士に深い感謝の意を表し、御協力下さつた國立衛生試驗所細菌試驗部藥品試驗係の皆様併せて御禮申し上げます。

文 献

- (1) Bovarnick, M.R. : J. Biol. Chem., 151, 467~475, 1943.
- (2) Carpenter, L.E., Elvehjem, C.A., & Strong, F.M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 154, 123, 1943.
- (3) Klimek, J.W., Cavallito, C.J., & Bailey, J.H. : J. Bact., 55(2), 139~145, 1948.
- (4) 榑原 : 醫學と生物學, 18(6), 336~339, 1951.
- (5) 寺田 : ストレプトマイシン協議會報告, 1951

--4--10.

- (6) 山田 : 桑原を通じ私信による
- (7) Demerec, M. : Ann. Rep. Carnegie Inst., 49, 144, 1950.
- (8) 桑原他 : 醫學と生物學, 17(1), 38~41, 1950
- (9) 中塚, 荒谷 : J. Antibiotics, 4(3), 141~147 1950.
- (10) 桑原他 : 日新醫學掲載豫定
- (11) Bellamy, W.D., & Klimek, J.W. : J. Bact., 55(2), 153~160, 1948.
- (12) Clapper, W.E., & Heatherman, M.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73(2), 153~156, 1950.
- (13) Newcomb, H.B., & Nyholm, M.H. : Genetics, 35, 603, 1950.
- (14) Gale, E.F., & Rodwell, A.W. : J. Bact., 55(2), 161~167, 1948.
- (15) Steers, E., & Sevag, M.G. : Arch. Biochem., 24, 129~143, 1949.
- (16) 藤野外 : 日本細菌學雜誌, 5(5), 299~303, 1950.
- (17) 中尾 : 日本醫大雜誌, 18(6), 563~571, 1951.
- (18) 桑原外 : 醫學と生物學, 21(1), 39~41, 1951.
- (19) Harrison, V.M., & Clapper, W.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74(4), 857~860, 1950.
- (20) English, A.R., & McCoy, E. : J. Bact., 62(1), 19~26, 1951.
- (21) Frieden & Frazier : Arch. Biochem, 15, 265, 1947.
- (22) 吉川 : 科學, 22(3), 139~143, 1952.
- (23) Sevag, M.G., & Rosanoff, E.I. : J. Bact., 63(2), 243~251, 1952.