細菌の石炭酸耐性についての研究 (2)

石炭酸耐性株の養素要求性について

日本医科大学衛生学教室 (主任: 八田貞義教授)

西 田 義 春

Yoshiharu Nishida

ま え が き

プロトローフに属するグラム陰性腸内菌を試験管内で一定の期間スルホンアミド剤に接触させると、耐性を獲得すると共にメチオニンを増殖に必要とする養素要求の変異を示すことが知られ (藤野等, 1948—1953¹⁾), また Haas & Sevag (1953)²⁾ がストレプトマイシン耐性大腸菌において耐性変異が 2—3 種のアミノ酸合成能の消失に関連をもつことを報告するなど、薬剤耐性と養素要求性の変異との関係が最近多くの問題を提供している。

耐性化に伴う代謝変異は化学療法剤に限らず殺菌剤についても同じ傾向の現象が認められる可能性が多く、殺菌剤と化学療法剤の作用機構を追求する有力な手がかりが耐性化に伴う代謝変異から得られる公算も少くない。著者はさきに大腸菌及び黄色ブドウ球菌をブイオン中で長期に亘り石炭酸に接触継代せしめ、原株の 2 倍足らずのよい抵抗性を獲得せしめたが、耐性化のよき反して継代株は高度の抗生物質耐性株の多くのものに認められる同じ形態の膨大化と糖分解能の完全陰性化を示したことを報告した。

著者は以上の実験と平行して耐性株の示す発育素及びアミノ酸合成能の変異をも実験し面白い成績を得たので、以下そのあらましを報告する。

実験の方法

a. 使用した菌株: 前報と同じ黄色ブドウ球菌、寺島株、食中 I 株、P-8 株の 3 株及びそれぞれの耐性株、大腸菌阿木株、松田株の 2 株及びそれぞれの耐性株合計 10 株である。

b. 実験に用いた合成培地: 次の 2 種の組成のものをを用いた。

1) カゼインアミノ酸培地— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g, KH_2PO_4 0.3 g, NaCl 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ブドウ糖 1.0 g, カゼインアミノ酸 (日之出) 5.0 g, L-トリプトファン 6.05 g, L-シスチン 0.05 g, 再蒸溜水 1,000 cc; pH 7.0±0.2

2) 純アミノ酸培地— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g, KH_2PO_4 0.3 g, NaCl 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ブドウ糖 1.0 g, グリシン 0.2 g, L- α -アラニン 0.5 g, DL-バリン 0.1 g, L-ロイシン 0.1 g, DL-イソロイシン 0.1 g, L-シスチン 0.15 g, L-チロシン 0.05 g, L-アルギニン・HCl 0.1 g, L-ヒスチジン・HCl 0.2 g, DL-メチオニン 0.1 g, DL-セリン 0.02 g, DL-トレオニン 0.02 g, L-リジン・HCl 0.2 g, L-プロリン 0.1 g, L-アスパラギン酸 0.5 g, L-グルタミン酸 0.5 g, DL-フェニルアラニン 0.1 g, L-トリプトファン 0.2 g, 再蒸溜水 1,000 cc; pH 7.0±0.2

c. 実験に用いた発育素群: 発育促進能力を試験した化合物及びその使用濃度は次の通りである。

ニコチン酸, ニコチン酸アミド, サイアミン, リボフラビン, ピリドキシン, ピリドキサミン, ピリドキサール, パントテン酸カルシウム, プテロイルグルタミン酸, ビオチン, *p*-アミノ安息香酸……以上 0.1—5.0 r/cc. グルタミン, イノシット……5.0—50 r/cc.

各化合物はそれぞれ単独の水溶液として加熱又は濾過滅菌した後無菌的に培地に加えて実験に供した。

d. 菌の移植と観察: 菌を普通寒天に 37°C, 24 時間培養し, この 1 白金耳を 10 cc の滅菌生理食塩液に浮遊し, 駒込ピペット (2 cc) でその 1 滴を 5 cc ずつ分注した培地に移植した。培地は 37°C に 7 日間培養し, 1 日毎に濁りを観察して 0, +, ……と記録し, 時には平板培養による菌数計算を併用した。

実験の成績

a. 耐性株の増殖能力: 上記の原株 5 株の中大腸菌 2 株はブイオン, カゼインアミノ酸培地, 純アミノ酸培地のいずれにも同様によく増殖しシモンズブドウ糖培地にもかなりよく増殖してすべての発育素物質の添加を必要としない。黄色ブドウ球菌の原株 3 株はブイオンと全発育素添加カゼインアミノ酸培地では同様に良好な増殖を示すが, 全発育素加純アミノ酸培地ではやゝ増殖がよわく, 全発育素加シモンズブドウ糖培地

第1図 耐性株の増殖

○及び●はカゼインアミノ酸培地、△及び▲は純アミノ酸培地を示し、実線は培地における増殖曲線、破線は300倍石炭酸含有培地における増殖を示す。菌数計算に一回各希釈につき平板5枚を用い、3回実験の平均をグラフに示した。

に全く増殖しない。

上記5株の耐性株は石炭酸を含まないブイオン、全発育素加カゼインアミノ酸培地及び純アミノ酸培地での増殖量は原株と少しも変りがないが、300~400倍石炭酸を含む同種の培地では原株に比し増殖速度も最大増殖量も劣っている(第1図参照)。

b. 耐性株の発育素要求: カゼインアミノ酸培地に上記のすべての発育素群を加えたものを標準培地とし、これから1種ずつの発育素の抜とりを行つて発育素必要性の変化を検討した。

黄色ブドウ球菌の3株及びその耐性株は、いずれもニコチン酸またはニコチン酸アミドの中の1種とサイアミンを必要とする点で一致した要求を示し、耐性株において要求性の变化は認められなかつた。

大腸菌の2株及びその耐性株は、いずれも発育素を添加することなしにカゼインアミノ酸培地及び純アミノ酸培地によく増殖し発育素必要性は全く認められなかつたが、シモンズブドウ糖培地では発育素添加の有無にかかわらず全く増殖を示さなかつた。

c. 耐性株のアミノ酸要求: アミノ酸要求性を検討するには、黄色ブドウ球菌の各株ではニコチン酸及びサイアミンを加えた純アミノ酸培地を、大腸菌の各株では発育素を加え

ない純アミノ酸培地をそれぞれ標準培地とし、アミノ酸の抜とりを行つて増殖に及ぼす影響をしらべた。その成績は第1表に示してある。大腸菌の原株2株では、アミノ酸1種の抜とりでは全く増殖には影響がないが、80代~136代耐性株は2株ともL-シスチンを除いた培地では全く増殖が起らず、明らかにシスチン合成能が欠落したことが示された。別にシモンズブドウ糖培地にL-シスチンを段階的に加え、増殖の有無を検査したところ、L-シスチンの0.5 r/cc以上で増殖が認められ、5.0 r/cc以上で最大増殖度に達することが知られた。

黄色ブドウ球菌の3株について抜とりを行つたところでは、共通してグリシン、バリン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、アスバラギン酸及びフェニルアラニンが重要であり、その他寺島株ではメチオニン重要、シスチン有効、食中I及びP-8株ではシスチンが重要であつた。

80代~153代耐性株では抜とりの結果は原株とほとんど変りがなかつたが、3株とも共通してシスチンが

第1表 耐性株のアミノ酸要求性

	松田		阿木		寺島		食中I		P-8	
	原	耐	原	耐	原	耐	原	耐	原	耐
グリシン	冊	冊	冊	冊	+	±	+	+	+	+
アラニン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
バリン	冊	冊	冊	冊	+	+	+	+	+	+
ロイシン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
イソロイシン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
シスチン	冊	0	冊	0	冊	0	+	0	+	0
チロシン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
アルギニン	冊	冊	冊	冊	±	±	±	±	±	±
ヒスチジン	冊	冊	冊	冊	+	+	+	+	+	+
メチオニン	冊	冊	冊	冊	+	±	冊	冊	冊	冊
セリン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
トレオニン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
リジン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
プロリン	冊	冊	冊	冊	+	+	±	±	+	+
アスバラギン酸	冊	冊	冊	冊	+	+	+	±	+	+
グルタミン酸	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
フェニルアラニン	冊	冊	冊	冊	+	+	+	+	+	+
トリプトファン	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
完全培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

(註) 各ランは当該アミノ酸をぬいた時の増殖度を示す。

必須となり、シスチンを除くと全く増殖が起らなくなった。また寺島株ではグリシン、メチオニンの重要性が増し、食中1株ではアスパラギン酸、p-8株ではロイシンの重要性がそれぞれ増加した。耐性株に対するL-シスチンの最小有効濃度は1.0 r/cc、最適濃度は5.0 r/ccであつた。

d. 耐性株における硫黄源利用性：耐性株は共通してL-シスチンの必須化を示している所以他の硫黄化合物の利用性をしらべてみた。

1) 大腸菌：原株は2株ともシモンズブドウ糖培地によく増殖し、硫酸マグネシウムの代りに $MgCl_2$ と Na_2SO_4 , Na_2SO_3 , $Na_2S_2O_3$, Na_2S , L-シスチン, DL-ホモシスチン, DL-メチオニンを用いても増殖に変わりがない。

これに反して耐性株は2株ともに、L-シスチン及びDL-ホモシスチンを加えた場合のみ増殖できるが、チオグリコール酸ナトリウム, DL-メチオニン, Na_2S , $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3 及び $MgSO_4$ を0.1%に加えた場合は増殖が認められなかつた。DL-ホモシスチンの最小有効濃度は5.0 r/cc、最大増殖度に達する濃度は20 r/ccであつた(第2図)

3) 黄色ブドウ球菌：前にのべた純アミノ酸培地からL-シスチンを除き、発育素としてニコチン酸とサイアミンを加えると、原株の3株はいずれもよく増殖できるが、耐性株は3株とも全く増殖不能になる。これにL-シスチンその他大腸菌と同じ硫黄化合物を加えて増殖支持能力をしらべたところ、増殖を支持できたのはシスチンだけで、ホモシスチン, Na_2S , $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3 , Na_2SO_4 は全く増殖を支持することができなかつた。

e. 耐性株の変異性状の復元：耐性80代及び158代の菌を石炭酸を含まないブイオンに継代し、第1報及び上にのべた変異性状の復元状態をしらべてみたところ、最も復元の速やかなのは形態で5代ではやゝ膨大化を示したが、10代では全く原形に復元した。これに次では石炭酸耐性が40代(松田株, P-8株)から50代(他の3株)が完全に復元した。これに対して糖分解作用と栄養要求性の変異は復元90代まで完全に保存され、強い持続性を示した。

考 察

石炭酸耐性についての実験は第1報でものべたようにかかなり古くから行われているが、いずれも単に耐性株の作成または生物学的性状の観察に止どまつてそれ以上の代謝変異にふれたものはない。

第2図 耐性株に対するシスチン、ホモシスチンの増殖促進作用
増殖はすべて培養48時間で判定

A) 松田耐性株(100代)

(阿木耐性株ではシスチン添加の場合松田耐性株と同等、ホモシスチンの場合は 10^8 を超えることができなかった)

B) 寺島耐性株(120代)

(食中1耐性株は寺島耐性株と同等、P-8耐性株は5.0 r/ccで $8 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ に達した)

一般に薬剤耐性株ができる場合、1試験管継代系列から生ずる代謝変異株は一通りではなくて、いくつかの変異細胞群の集団であることが多いが³⁾⁴⁾、その多くは薬剤との接触が長期に亘るに従つて1つの変異に淘汰集約されるようである⁵⁾。著者がこの報告にあげた成績は長期間の接触によつて得られた最終の固定的変異とみられ、このことは得られた変異代謝形式が他の変異性状に比べてはるかに固定的であつた点からも首肯できる。

得られた代謝変異の中で特筆すべきは、5株の菌のすべてに認められたシスチン必要性変異である。含硫アミノ酸の代謝変異については、すでにはじめにも述べたようにプロトトロフに属するグラム陰性腸内菌のスルホンアミド剤耐性菌に認められるメチオニン依存性、ニトロフラゾール耐性腸炎菌に認められるシスチン依存性⁶⁾など耐性変異の一部が含硫アミノ酸の代謝に関連をもつことが報告されているが、この実験の

ようにグラム陽性で比較的高い養素要求性をもつ黄色ブドウ球菌と、グラム陰性で栄養要求のかんたんな大腸菌が一致してシスチン必要性変異を起したことはむしろ珍らしいことであり、同時にきわめて大切な知見と考えなくてはなるまい。

Lampen その他 (1947)⁷⁾⁸⁾⁹⁾ の *Neurospora* についての研究から、微生物体内における含硫アミノ酸の合成経路が

$\text{SO}_4^{--} \rightarrow \text{SO}_3^{--} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{--} \rightarrow \text{S}^{--} \rightarrow \text{シスチン} \rightleftharpoons \text{ホモシスチン} \rightleftharpoons \text{メチオニン}$

という点まで明かにされているので、耐性株でこの合成経路のどこが切断されたかが問題になるが、大腸菌原株ではこの経路のすべてが確保されているのに、耐性株では S^{--} 、メチオニンは利用されないから $\text{S}^{--} \rightarrow \text{シスチン}$ 及び $\text{メチオニン} \rightarrow \text{ホモシスチン}$ の経路が切断されたものとみられる。また黄色ブドウ球菌では S^{--} 、ホモシスチンが利用されないから $\text{S}^{--} \rightarrow \text{シスチン}$ 及び $\text{ホモシスチン} \rightarrow \text{シスチン}$ の経路が切断されたものとみられる。すなわち両者の合成経路を標示すれば、

大腸菌: $\text{SO}_4^{--} \cdots \text{SO}_3^{--} \cdots \text{S}_2\text{O}_3^{--} \cdots \text{S}^{--} \cdots \text{シスチン} \rightleftharpoons \text{ホモシスチン} \cdots \text{メチオニン}$ 。

黄色ブドウ球菌: $\text{SO}_4^{--} \cdots \text{SO}_3^{--} \cdots \text{S}_2\text{O}_3^{--} \cdots \text{S}^{--} \cdots \text{シスチン} \cdots \text{ホモシスチン} \cdots \text{メチオニン}$ となる。この結果は上記のニトロフラゾーン耐性の場合⁶⁾に比し、合成能欠落の幅がかなり大である点で注目すべきものである。黄色ブドウ球菌の3株に認められた他のアミノ酸合成能の減退は一貫性がなくむしろ菌株に特有なものと認めるべきであろう。

結 論

著者は石炭酸耐性を獲得した黄色ブドウ球菌3株と大腸菌2株を用いて栄養要求の変化を追求し次の結論

を得た。

1. 耐性株の発育素要求は原株と全く同じで、黄色ブドウ球菌耐性株3株はいずれもニコチン酸(アミド)とサイアミンを必要とし、大腸菌耐性株2株は発育素を要求しなかつた。

2. 耐性株は5株ともシスチンを必須とする変異を示した。すなわち大腸菌の増殖にはシモンズ培地にシスチンの添加を必要とし、黄色ブドウ球菌ではシスチンを欠く培地に増殖できなくなつた。

3. 大腸菌においてはシスチンはホモシスチンによつて代用されたが、黄色ブドウ球菌ではシスチンは他の物質では代用されなかつた。

4. 栄養要求の変異は他の変異性状に比しはるかに持続的であつた。

終りに御指導を賜つた恩師八田貞義教授に深甚の謝意を表し、御援助をいただいた東邦大学桑原教授に敬意を表します。

文 献

- 1) 秋葉, 桑原, 最新医学, 9 (3), 271~278 (1954) より引用
- 2) Haas, G.J. & Sevag, M.G.: *Arch. Biochem.* 43 (1), 11~24 (1953).
- 3) 中田, 三輪谷, 繁田, 上保, 菅: *J. Antibiot., Ser. B*, VI (6), 327~329 (1953).
- 4) 石井: 阪市医大誌, 2(3), 214~219 (1953)
- 5) 小山: 桑原教授私信
- 6) 中田: 科学, 23(4), 214~215 (1953)
- 7) Lampen, J.O., Roepke, R.R., & Jones, M.J.: *Arch. Biochem.*, 13, 55~66 (1947).
- 8) Horowitz, N.H.: *J. Biol. Chem.*, 171, 255~267 (1947).
- 9) Teas, H.J., Horowitz, N.H., & Fling, M.: *J. Biol. Chem.*, 172, 651~658 (1948)
- 10) 西田: 日医大誌, 21(6), 416~420 (1954)