細菌の薬剤耐性に於ける 型転換現象に関する研究

日本医科大学細菌学教室 (指導 中村敬三教授)

野 口 太 郎

Tarō Noguchi

ま え が き

遺伝学の研究は、近時細菌或は原虫の如き微生物をも対象とするようになったので、細菌学の領域に於ても諸種の新研究課題を生むに至つた。一方化学療法剤の発展に伴う細菌の薬剤耐性に関する諸問題に於ても、遺伝学的解明が必要となり、この方面については Demerec⁽¹⁾, Luria⁽²⁾, 秋葉⁽³⁾ 等の多数の業績がある。所で中村⁽⁴⁾教室門下に於ても、斯様な立場から細菌の薬剤耐性の機作について種々研究を行つて来たが、私は特に型転換現象 (transformation) について検討して来た。抑々この型転換現象なるものは、最初 Griffith⁽⁵⁾ (1928) が肺炎双球菌について観察し、Neufeld & Levinthal⁽⁶⁾ (1928), Reiman⁽⁷⁾ (1929), Dawson⁽⁸⁾ (1930), Baurhenn⁽⁹⁾ (1932) 等によつて追試確認され、更に Avery, McLeod & Carty⁽¹⁰⁾ 等 (1944-1946) によつて発展せしめられたものである。即ちその原の意義はある安定した免疫学的性質が、他の菌より抽出された高分子デスオキシリボ核酸 (DNA) によつて転換する現象、即ち型の転換を意味していたが、今日では転換する細菌の性質も、菌型のみにとどまらず、例えば薬剤に対する感性、或は耐性と云う性質をも転換し得ることとなり、細菌の型転換の定義としては Austrian⁽¹¹⁾ が述べた様に、ある遺伝学的性質の突然変異を誘導する活性物質が、環境からとりいれられることによつて起る細菌の遺伝的な変化であると広義に解釈されるようになってきた。

所で斯様な細菌の薬剤耐性の transformation については、耐性菌の培養濾液、autolysate 或はデスオキシリボ核酸 (DNA) 分屑により、感性菌が耐性化する現象と、逆に感性菌の autolysate, extract, 或は DNA 分屑により耐性菌が感性化する現象とが報告されている。

即ち感性菌の耐性獲得に関しては、Sulfonamid について Wyss⁽¹²⁾ (1950), Penicillin について Hot-

chkiss⁽¹³⁾ (1951), Streptomycin について Roland & Stuart⁽¹⁷⁾ (1951), 中村⁽⁴⁾ (1952), 秋葉⁽³⁾ (1953) 等の報告があり、耐性菌の感性復帰に関しては、Penicillin について Voureka⁽¹⁸⁾ (1948), George and Pandalai⁽¹⁹⁾, 秋葉, 石井⁽²⁰⁾, 田村 (1952) の報告がある。私も大腸菌、ブドウ球菌、赤痢菌について Streptomycin (以下 SM と略), Penicillin (以上 PC と略), Chloromycetin (以下 CM と略) 感性或は耐性という性状が、如何に転換し得るかについて詳細に検討を加えた。更に SM 耐性菌代謝物質によつて SM 耐性となつた各種の菌の生物学的性状変異、並に抗原性変異についても併せ検討した。即ち薬剤耐性、又は感性への transformation の成立因子及び諸条件について検討すると共に、併せて transformation に伴う菌の諸性状についても検索したからそれらの成績を一括して報告することとした。

実験 I 薬剤感性菌株の菌体成分による耐性化に関する研究

耐性菌の培養濾液、autolysate 或はデスオキシリボ核酸 (DNA) 分屑を加えた培地に、感性菌を培養すると耐性化が起ると云う現象については、Sulfonamid について Wyss⁽¹²⁾ (1950), Penicillin について Hotchkiss⁽¹³⁾ (1951), Streptomycin について Roland & Stuart⁽¹⁷⁾ (1951), 秋葉⁽³⁾ (1953) 等の報告がある。私共は今回 SM, Pc, CM 耐性大腸菌、ブドウ球菌、赤痢菌等十数種の菌の培養濾液、またはそれら諸菌の菌体抽出物質に添加した培地に感性菌株を培養した場合、果して耐性化が起るか否かを検討した。特に斯様な耐性化現象の成立に於ける供試耐性菌株と移植感性菌株の間に、如何なる相関関係があるやについて検討してみた。以下実験の材料、方法、並に成績について概括することとする。

実験の材料並に方法

供試菌：供試耐性菌としては、

SM 10 mg/ml 耐性大腸菌 *E. Coli* (N株), 及び *E. Coli* (OR 株); SM 10 mg/ml 耐性ブドウ球菌 *Staphylo. coccus aureus* (209 P 株) 並に *Staphylococcus albus* (WS 株); SM 10 mg/ml 耐性赤痢菌 *Shigella dysenteriae* (Type 1), (Type 2) 並に *Shigella flexneri* (2.2 a); 及び CM 100 γ /ml 耐性ブドウ球菌 (209 P 株), 大腸菌 *E. Coli* (N 株) を使用した。

又供試感性菌としては

ブドウ球菌 (209 P 株), *Staphylococcus albus*; 大腸菌 (N 株) 及び (OR 株), 並に赤痢菌 *Shigella dysenteriae* Type 1, Type 2; *Shigella flexneri* (2.2 a) の各保存原株を使用した。

培養濾液の製法: 前記薬剤耐性菌をブイオンに一白金耳移植, 37°C 72時間培養し, Seitz で濾過したものを, 無菌試験を行った後実験に供した。

菌体成分の抽出: 普通寒天 48 時間培養菌をアセトン中に掻き集め, Goebel 法に準じた方法でアセトン飽和度により分割した。即ちアセトン 33% 沈降分割, 66% 沈降分割並にその上清の 3 分割に抽出した。

供試菌の抗菌力検定法: 普通寒天培地に 24 時間培養後, ブイオンに移植し, 更に 24 時間培養後, 純系菌株を得るために坂本⁽²¹⁾の方法に従って単個菌を分離し, 単個菌フィルム培地上に形成された単一の集落を更にブイオンに移植した後, 型の如く dilution method または plate 法によつて検討した。

実験成績

[I] 耐性菌培養濾液に感性菌を培養した場合

前述の SM, PC, CM 耐性各菌の培養濾液をブイオンで 2 倍に希釈し, 之に SM 感性大腸菌, ブドウ球菌, 赤痢菌等の 24 時間ブイオン培養菌液の 0.1 ml を加え, 37°C, 48~72 時間作用せしめることにより, 感性菌株の耐性化が起るか否かについて検討した。第 1 表は SM 10 mg/ml 耐性大腸菌またはブドウ球菌培養濾液のブイオン 2 倍希釈液に, 感性大腸菌又はブドウ球菌を 48 時間培養した後, その 10^{-4} 液 0.1 ml に dilution method に従つて SM 含有ブイオンに移植し, 抗菌力を検べたもので, 実験成績は表に示す様に, 供試菌として *E. Coli* (N 株) を用いた場合に最も顕著に, 又大腸菌 (OR 株) を用いた場合にも弱度ながら耐性の上昇を来すが, ブドウ球菌の場合には斯かる現象を認め得ない。

又 CM 耐性菌培養濾液について同様な方法で検討した成績は, 第 2 表に示すが如くである。即ち SM

第 1 表 SM 耐性菌培養濾液の各種感性菌に及ぼす影響

供試感性 菌 株	濾 液	Streptomycin γ /ml								対照
		10,000	2,000	400	80	16	3.2	4.2		
E. coli (N株)	K	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
	E. coli(N)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	E.coli(OR)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	209 P	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	St. alb.	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
E. coli (OR 株)	K	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
	E. coli(N)	—	—	—	+	+	+++	+++	+++	+++
	E.coli(OR)	—	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++
	209 P	—	—	—	—	+	+++	+++	+++	+++
	St. alb.	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
St. aureus (209 P)	K	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
	E. coli(N)	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
	E.coli(OR)	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
	209 P	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
	St. alb.	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
St. albus	K	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
	E. coli(N)	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
	E.coli(OR)	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
	209 P	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
	St. alb.	—	—	—	—	—	—	—	++	+++

10 mg/ml 耐性大腸菌, ブドウ球菌の培養濾液に感性大腸菌並にブドウ球菌の各 2 種を各々培養した場合であるが, この場合は全く耐性の上昇は認め得ない。

第 2 表 CM 耐性菌培養濾液の各種感性菌に及ぼす影響

供試感性菌株	濾液	Chloromycetin γ /ml								対照
		200	100	50	25	12.5	6.3	3.2	1.6	
<i>E. coli</i> (N 株)	K	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	<i>E. coli</i> (N)	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	209 P	—	—	—	—	—	—	—	—	++
<i>E. coli</i> (OR 株)	K	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	<i>E. coli</i> (N)	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	209 P	—	—	—	—	—	—	—	—	++
<i>St. aureus</i> (209 P)	K	—	—	—	—	—	+	+++	+++	++
	<i>E. coli</i> (N)	—	—	—	—	—	—	+++	+++	++
	209 P	—	—	—	—	—	—	+++	+++	++

St. albus	K	— — — — —	++ ++
E. coli (N)	— — — — —	— — — — —	++ ++
209 P	— — — — —	— — — — —	++ ++

以上は耐性菌培養濾液に感性菌を作用させた場合の

第 3 表 SM 耐性菌培養濾液の感性菌に及ぼす影響
(SM 含有平板培地に於ける分布菌数)

供 試 感 性 菌	供 試 耐 性 菌 濾 液	稀 釈 倍 数	SM 濃 度 per ml				対 照
			10 mg	1 mg	100 r	10 r	
Sh. dysenteriae Type 1.	K	10 ⁻¹	0	0	0	0	8 × 10 ⁷
	Sh. dys. 1.	10 ⁻¹	0	0	0	0	8 × 10 ⁷
	Sh. dys. 2.	10 ⁻¹	0	0	0	0	4 × 10 ⁷
	Sh. flexneri 2.2 a	10 ⁻¹	0	0	0	0	11 × 10 ⁷
	E. coli (N)	10 ⁻¹	0	0	0	0	59 × 10 ⁷
Sh. dysenteriae Type 2.	K	10 ⁻¹	0	0	0	0	15 × 10 ⁷
	Sh. dys. 1.	10 ⁻¹	0	0	0	0	16 × 10 ⁷
	Sh. dys. 2.	10 ⁻¹	0	0	0	0	15 × 10 ⁷
	Sh. flexneri 2.2 a	10 ⁻¹	0	0	0	0	19 × 10 ⁷
Sh. flexneri 2.2 a	K	10 ⁻¹	0	0	0	0	14 × 10 ⁷
	Sh. dys. 1.	10 ⁻¹	0	0	0	0	4 × 10 ⁷
	Sh. dys. 2.	10 ⁻¹	0	0	0	0	10 × 10 ⁷
	Sh. flexneri 2.2 a	10 ⁻¹	0	0	0	0	14 × 10 ⁷
ブ ド ウ 球 菌 (209 P)	K	10 ⁻¹	0	0	0	0	41 × 10 ⁷
	Stephy. aureus (209 P)	10 ⁻¹	0	0	0	0	41 × 10 ⁷
E. coli (N 株)	K	10 ⁻¹	9	12	21	34	10 ⁷
	K	10 ⁻³	0	0	0	0	10 ⁵
	E. coli (N)	10 ⁻¹	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	10 ⁷
	"	10 ⁻³	210	261	151	469	10 ⁵
	"	10 ⁻⁵	7	11	17	22	285
	"	10 ⁻⁷	0	0	0	0	10

即ち SM 10mg/ml 耐性の赤痢菌 3 種・ブドウ球菌並に大腸菌各 1 種の 72 時間培養濾液に、前記の感性菌株を移植し、72 時間培養後 plate 法によつて検討した成績である。即ち培養 72 時間菌液の 0.5 ml を各種濃度の SM 含有寒天と混合し、37°C 48 時間培養後の発生集落数を検べたのであるが、赤痢菌、ブドウ球菌の場合は、ブイオン培養或は耐性菌濾液加ブイオン培養凡そ 4~59 × 10⁷ 菌の中に SM 10 r 以上の耐性菌の発生は全く認め得なかつたこととなる。大腸菌 E. Coli (N 株) の場合は 10 × 10⁷ 菌中には感性原株そのもののの中に SM 10 mg/ml 耐性菌 9, SM 1 mg/ml

耐性上昇の様相を dilution method によつて検べた例であるが、更に大腸菌、ブドウ球菌のみならず、赤痢菌 3 種について plate 法によつて検べた成績は第 3 表に示す如くである。

以上耐性菌 12 を含むが、10⁵ 菌中には SM 10 r/ml 以上の耐性菌は存在しないことを示す。然し乍ら SM 耐性菌濾液の作用を受けた菌株は、10⁵ 菌中に SM 10 mg/ml 耐性菌 210, SM 1 mg/ml 耐性菌は 261 出現する。

以上の事実は E. Coli (N 株) が SM 耐性 E. Coli (N 株) の濾液の作用で耐性化を起す変異率を示していることとなる。以上の実験成績を総括して、供試感性菌株と供試耐性菌培養濾液の耐性化作用の発現に於ける関係を図示すると、第 1 図の如くである。

第1図 細菌の薬剤耐性化に於ける供試感性菌と耐性菌培養濾液の関係

即ち感性菌として大腸菌 N 株を耐性菌濾液に作用せしめた場合は、大腸菌 N 株、OR 株、並にブドウ球菌 *St. aureus*, *St. albus*, 何れの耐性菌株濾液を用いても強力な耐性化作用を示し、感性菌株として大腸菌 OR 株を用いた場合は、大腸菌 OR 株耐性濾液に作用させた時の方が、N 株濾液に作用させた場合よりやや強度の耐性化が起るが、ブドウ球菌又は赤痢菌濾液を作用させたのでは全く耐性化が起らない。更に移植感性菌株としてブドウ球菌、赤痢菌等を用いた場合は、何れの濾液に作用させても全く耐性化現象が認められなかった。また PC, CM 耐性ブドウ球菌、或は CM 耐性大腸菌濾液を使用した場合は、移植感性菌としてブドウ球菌、大腸菌の何れの菌株を用いても全く耐性化が見られない。之等の事実を総括すると、感性菌株の耐性濾液による耐性化の成立には、移植感性菌、抗生剤の種類、並に菌種、菌株間に一定の相関関係が存在することを示している。

[2] 感性菌、耐性菌を混合培養した場合

SM 感性 *E. Coli* (N 株) の原株並に SM 耐性 *E.*

第4表 感性菌、耐性菌の混合培養

菌株	SM濃度	10 mg	1 mg	100 r	10 r	K
		28	23	21	26	22
混合	感 + 耐	28	23	21	26	22
	感 性	0	0	0	0	85
対 照	耐 性	63	40	37	56	43

註. 数字は培養液の 10^{-7} 稀釈液 0.5 ml 中の菌数を示す。

Coli (N 株) を混合培養し、培養 48 時間後の菌について SM 耐性を plate 法によつて検討した。実験成績は第4表に示す如くである。

即ち *E. Coli* (N 株) の SM 感性並に耐性株のブイオン 24 時間培養菌液の 10^{-4} ブイオン稀釈液の各一滴をブイオンに混合移植し、 37°C 48 時間培養した。また対照として前記稀釈菌液の各一滴を各々ブイオンに培養し、それ等の培養液 0.5 ml 中の菌の SM 耐性を検べた。斯くして得た 3 種の培養液の 10^{-7} 稀釈液 0.5 ml 中に於ける菌数を検べた所、表に示す様に感性菌株殆ど全部が SM 10 mg/ml 耐性となったことを示している。尚且耐性株、感性株の混合培養液中に増殖した菌の耐性分布を検べてみると、凡ての菌が SM 10 mg/ml の耐性を獲得していることが分る。この事実を確かめるために、混合培養液より単個菌分離の方法に従つて単個菌 10 数個を分離し、フィルム培地上に発育した集落を更にブイオンに培養後、*dilution method* によつて抗菌力を検べた所、第5表に示す如く何れも SM 10 mg/ml 耐性となることを示している。

第5表 平板培養の集落数 (10^{-7})

SM 濃度	10 mg	1 mg	100 r	10 r	K
感 性	0	0	0	0	86
耐 性	69	73	88	62	89
混合培養	24時間	50	61	56	74
	72時間	437	457	485	496

[3] SM 耐性死菌と感性菌を混合培養した場合

SM 耐性大腸菌 (*E. Coli* N 株) のブイオン 72 時間培養菌液を 60°C の温水中で 30 分間加熱した後、遠沈して沈渣をとり、一方またその上清を Seitz で濾過し、この沈渣と濾液の兩者について耐性化作用を検べた。即ちブイオンに上記沈渣を加えた培地、並に 60°C 30 分加熱濾液のブイオン 2 倍稀釈液に、感性菌 *E. Coli* N 株のブイオン 24 時間培養菌の 10^{-4} 稀釈液 1 滴を移植し、 37°C 24—72 時間培養後の菌の耐性を *dilution method*, 又は plate 法によつて検討した。実験成績は第6表に示す如くである。

即ち 6 表に明かな様に、耐性菌加熱死菌には全く耐性化作用が認められないが、 60°C 加熱濾液には非加熱の場合と全く同程度に耐性化作用が認められる。

第 6 表 SM 耐性死菌と感性菌を混合培養した場合
(A) dilution method

菌株	SM 濃度						
	10mg	1mg	100r	10r	1r	0.1r	K
大腸菌 SM 感性株 (対照)	—	—	—	—	—	+++	++
感性株 + 耐性死菌	—	—	—	—	—	+++	++
感性株 + 耐性菌濾液 (60°C 30分加熱)	++	++	++	++	++	++	++

(B) plate 法

菌株	SM 濃度						
	10mg	1mg	100r	10r	1r		K
大腸菌 SM 感性株	0	0	0	0	0	68	
感性株 + 耐性死菌	0	0	0	0	0	62	
感性株 + 耐性菌濾液 (60°C 30分加熱)	43	34	37	56	58	54	

[4] 感性菌培養濾液又は感性死菌と共に耐性菌を培養した場合

感性大腸菌 (E. Coli N 株) 濾液又は実験 I の [3]

第 8 表 感性菌培養濾液又は感性死菌と共に耐性菌を培養した場合
(単個菌を使用して)

SM 濃度	10 mg	5	2.5	1250 r	625	312	156	78	39	20	10	K
培養濾液	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
死菌	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

実験 II 耐性化作用物質の本態に関する研究

菌体物質の抽出は、今回教室に於ける菌体物質の抽出研究の便宜上、Goebel 法に従つて行つた。即ち SM 耐性大腸菌 (E. Coli N 株) 普通寒天 48 時間培養菌をアセトン中に掻き集め、Goebel 法に倣つてピリヂンを抽出後、アセトン飽和度によつて第 9 表の如く 3 分割した。

即ち Goebel 法による抽出過程で得られるアセトン 33% 飽和沈降分割を (A)、アセトン 66% 飽和による沈降分割を (B)、同上清を (C) 分割とした場合、之等の分割をバイオンに 1 mg/ml の割にとかし、こ

に示したと同様の方法で得た感性死菌に SM 耐性 E. Coli N 株を前記同様の方法で培養した場合の培養菌の耐性度を plate 法によつて検べた結果は第 7 表に示す通りである。

第 7 表 平板培養の集落数 (10⁻⁷)

SM 濃度	10 mg	1 mg	100 r	10 r	K
培養濾液	32	33	35	37	52
	37	38	50	44	52
死菌	27	24	36	27	43

即ち感性培養濾液又は感性死菌加バイオンに發育した菌の SM 含有培地上の發生集落数は、対照のそれと殆ど相違なく、感性化作用は全く認められない。更に此の事実を確めるために、培養菌をフィルム培地上に単個分離した後、その集落数個を各々バイオンに移植培養した後、型の如く dilution method によつて抗菌力を検べた結果は、第 8 表に示す通りで、SM 10 mg/ml 耐性を示し、感性化作用は認められない。

第 9 表 菌体—水洗、脱水 (アセトン) 脱脂
(エーテル、アルコール) ピリヂン (中性)
37°C 24 時間抽出、遠心。

上	清
濾液	濃縮
残渣	渣
透析	
内液	アセトン (33%) 遠心
沈 澱 (A)	上 清アセトン (66%)
	遠 心
沈 澱 (B)	上 清 (C)

れに SM 感性大腸菌 N 株の 24 時間ブイオン培養菌の 10^{-4} 稀釈液 0.1 cc を移植し、48 時間後に plate 法によつて SM 耐性菌の発生度を検べた結果は第 10 表に示す如くである。即ち表に示す如く、Goebel 抽出菌体成分 (A) 分割に認められた弱度の作用以外は取り立てゝ言うべき何等の耐性化作用も認められない。

第 10 表 感性菌株の耐性化物質による誘導変異

	移植菌量	10 mg	1 mg	100 γ	10 γ	K
A 分割	0.1ml(10^{-4})	0	11	12	11	556×10^7
B 分割	0.1ml(10^{-4})	0	0	0	1	871×10^7
C 分割	0.1ml(10^{-4})	0	0	0	9	511×10^7

実験 III 耐性の獲得と菌の生物学的諸性状並に抗原性変異との関係

薬剤との直接接触によつて耐性を獲得した菌種と、耐性菌代謝物質による transformation によつて耐性を獲得した菌種との生物学的諸性状について比較検討した。

実験の材料

供試菌：

- A……SM 10 mg/ml 耐性大腸菌 E.coli N 株
- B……A の培養濾液による transformation によつて SM 10 mg/ml 耐性となつた菌種
- C……SM 10 mg/ml 耐性ブドウ球菌 209 P 株培養濾液による transformation によつて SM 10 mg/ml 耐性となつた菌種
- D……SM 10 mg/ml 耐性 Shigella flexneri 2,2a の培養濾液による transformation によつて SM 10 mg/ml 耐性となつた菌種
- K……対照として用いた最初の感性大腸菌 E.coli N 株

実験の方法並に成績：

上記各菌種についての生物学的性状並に抗原性について検討した成績は第 11 表に示す如くである。

即ち本実験結果からすれば Imvic System, 糖分解能等において、供試菌の間に何等の差異はなく、また抗原性においても全く変異を認めない。換言すれば、薬剤との直接接触或は SM 耐性培養濾液による transformation によつて耐性を獲得した菌種の間の生物学的諸性状、或は抗原性に何等の変異は認められぬと云うことになる。

第 11 表

		A	B	C	D	K
Imvic System	インドール	+	+	+	+	+
	M. R.	+	+	+	+	+
	V. P.	-	-	-	-	-
	クエン酸ソーダ	-	-	-	-	-
Antigen analyse		O ₆	O ₆	O ₆	O ₆	
糖分解能	Xylose	+	+	+	+	+
	Arabinose	+	+	+	+	+
	Glucose	+	+	+	+	+
	Galactose	+	+	+	+	+
	Saccharose	-	-	-	-	-
	Maltose	+	+	+	+	+
	Lactose	+	+	+	+	+
	Raffinose	-	-	-	-	-
	Dextrin	-	-	-	-	-
	Adonit	-	-	-	-	-

總括並びに考按

私は今回細菌の薬剤耐性獲得の機序に於ける transformation の機構並に之に伴つて菌の生物学的或は抗原性等の変異が起るか否かに関し種々研究を行つた。そもそも型転換現象に関しては、既にまえがきでも述べた様に肺炎双球菌に関して Griffith, Neufeld & Levinthal を始め多数の業績があるが、私は今回特に薬剤耐性上の transformation について検討を行つた。斯様な意味の研究は茲数年間に活潑な発展をみせ、耐性菌体成分又は代謝物質によつて感性菌が耐性化する現象については、Sulfonamid について Wyss⁽¹⁵⁾(1950), Penicillin について Hotchkiss⁽¹⁶⁾(1951), Streptomycin について Roland & Stuart⁽¹⁷⁾(1951), 中村⁽¹⁾(1952), 秋葉⁽³⁾(1953)等の研究があり、逆に感性菌又はその代謝物質によつて耐性化が起る現象については、Penicillin に関し Voureka⁽¹⁸⁾(1948), George & Pandalai⁽¹⁹⁾(1949), 秋葉, 石井⁽²⁰⁾, 田村(1952)の報告がある。斯様な研究は薬剤耐性のメカニズムを究明する上からも、又微生物の遺伝学的研究の上からも種々興味ある点であろう。そこで私は今回 SM, PC, CM 感性並に耐性大腸菌, ブドウ球菌, 赤痢菌等の代謝産物又は菌体物質による薬剤感性又は耐性の transformation の成立条件について詳細に検討を加えた。実験結果は本文中に示す如く、薬剤耐性菌の代謝物質によつて感性菌株の resistisation を来したのは、高度 SM 耐性菌代謝物質を感性大腸菌に作用せしめた場

合であつた。斯様な resistization の成立は、SM の場合に限つて観察されたことで、PC、CM 等については全く実証することは出来なかつた。また resistization の成立難易について言うならば、同一又は近縁菌株間に於ける程、より容易に、またより確実にその成立をみるのが実証せられた。殊更注目すべきは薬剤感性大腸菌 N 株を用いた場合は、該菌の SM 耐性株培養液によつては勿論、菌株の異なる大腸菌 OR 株又はブドウ球菌 SM 耐性株培養液によつてすら確実に SM 耐性を獲得することが実証された点である。然し乍ら斯様な事実は PC 耐性株或は CM 耐性株培養液に作用させても全く耐性化を来し得ないことも明かにせられた。

要するに斯様な resistization は SM 耐性についてのみ実証せられた訳であるが、一方この resistization の成立に於ては供試感性菌株の側にも一定の条件があり、耐性化を来し易い菌株と、来し得ない菌株とが観察されるのである。例えば、実験成績中に示した様に、ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, *albus* 又は赤痢菌 *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella dysenteriae* type 2, *Shigella flexneri* type 2, 2a 株等は、何れもその各々の SM 10 mg/ml 耐性株培養液によつても、SM 耐性化を実証することは出来なかつたのである。そこで更に耐性菌培養液中の耐性化作用の本性並に斯様な作用が菌体又は菌体物質中の如何なる劃分に存するかについても併せ検討してみた。実験結果は本文中に示した如く、60°C 30 分加熱培養液または死菌体中に存することが明かにせられたし、また SM 感性並耐性大腸菌株を同時に混合培養することによつても感性株がその發育過程で容易に耐性化を起すことも明かにせられた。

斯様な SM 耐性菌中の耐性化作用物質は SM 耐性菌の主として DNA 分屑に関係ありと従来報告されているが、私は偶々教室に於て菌体の Goebel 法による菌体分割の研究が行われていた関係上、SM 耐性菌について Goebel 法による抽出過程に得られた分屑について実験してみた。即ち SM 耐性菌のアセトン抽出液について、型の如く Goebel 法によつて分割し、アセトン 33% 上清、66% 上清並にその沈降劃分について実験した。実験結果はこれら核酸反応の多少に係らず、何れの分屑も耐性化作用を示さぬことが明かにされた。この事実は大腸菌体より核酸抽出法が適当でなかつたことに依ると考えられ、アセトン、ピリジン等の化学薬剤を必要とする Goebel 法の抽出によると

DNA 分屑等には可なり変性を与える可能性が大きいためと予想される。何故ならば Goebel 法は元来、菌体多糖体の抽出を主目的とする故で、斯様な意味からすれば SM 耐性菌の精製多糖体分割は、少くとも耐性化作用を持たないことが実証されたものとして差支えないであろう。かくて SM 耐性物質の resistizer としての意義が明かにせられたものと考えるが、次に同物質が sensitizer としての作用を持つか否かについても併せ実験したが、SM 感性大腸菌培養液又は死菌体には、何等 sensitizer としての作用が認められないことも明かにせられた。

結 論

細菌の薬剤耐性獲得または感性復帰の機序に伴う transformation の成立機構に関し、種々な角度より詳細に検討し、次の結論を得た。

1. SM 高度耐性菌の培養液は、感性株を耐性化する作用を持つ。このことは SM 耐性の transformation の成立を意味する。
2. 斯様な SM 耐性の transformation の成立する上には、供試耐性菌株と移植感性菌株の間に一定の関係が見出される。即ち transformation によつて耐性化を来し易い感性大腸菌の 1 株 (N 株) を使用する場合は、SM 高度耐性の大腸菌、ブドウ球菌等の何れの菌株の培養液を用いても、容易に耐性化が成立する。
3. SM 耐性の transformation は同一菌種、同一菌株の間に於て容易に成立する。即ち近縁菌株の間で最も容易に起る様である。
4. SM 耐性の transformation の成立に関与する耐性化物質の本性について検討した所、耐性菌培養液は 60°C、30 分間の加熱によつてもその作用を失わず、また 60°C、30 分加熱耐性死菌中にも斯る作用が認められる。
5. 本作用は Goebel 法による抽出過程に得られた各分屑には証明せられない。
6. SM 耐性の transformation は SM 耐性株、感性株を混合培養した場合にも明かに証明された。このことは SM 耐性株の發育分裂の初期より、この様な作用物質が産生されることを意味する。ブドウ球菌、赤痢菌種の間に於ては、SM 耐性の transformation は証明し得なかつた。
7. PC 耐性、CM 耐性の transformation は全く証明せられなかつた。
8. SM 感性菌株培養液又は 60°C、30 分加熱死菌

体によつて, SM^r耐性株は感性化することがない。
即ち SM^s感性株又はその代謝物質による SM^s耐
性菌の resistization は観察せられない。

稿を終るに臨み, 終始絶えざる御指導, 御鞭撻並び
に御校閲を賜つた恩師中村敬三教授に衷心より感謝
し, 尚懇切な御教示を賜つた木村義民助教授, 並に教
室員各位に深甚の謝意を表す。

主 要 文 献

- (1) Demerec, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **31**, 15(1945)
- (2) Luria, S.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **61**, 46 (1946)
- (3) 秋葉朝一郎 : 医学のあゆみ, **13**(5), 1(昭27)
; 細菌学の新領域, 医学書院 204(昭 29)
- (4) 中村敬三・他 : 日本細菌学会関東支部秋期総
会発表 (1952)
- (5) Griffith, F. : J. Hyg., **27**, 113-159, (1928)
- (6) Neufeld, F. & Levinthal, W : Z. Immun-
itäts., **55**, 324-340 (1928)
- (7) Reiman, H.A. : J. Exp. Med., **49**, 237-249
(1929)
- (8) Dawson, M.H. : J. Exp. Med., **51**, 123-147
(1930)
- (9) Baurhenn, W. : Zenbl. Bakt. Parasitenk.
Inf. 1 Orig., **126**, 68-92 (1932)
- (10) Avery, O.T., McLeod, C.M. & McCarty
M. : J. Exp. Med., **79**, 130-158 (1944)
- (11) Boivin, A. : Cold Spring Harbor Symposia
on Quantitative Biol., **12**, 7-17 (1947)
- (12) Weil, A.J. & Binder M. : Proc. Soc. Exp.
Biol. Med., **68**, 349-352 (1947)
- (13) Alexander, H.E. & Leidy, G. : Proc. Soc.
Exp. Biol. Med., **73**, 485-487 (1950)
- (14) Austrian, R. : Bacteriological Review., **16**,
31-50 (1951)
- (15) Wyss, O. : Annals N.Y. Acad. Sci., **53**,
183 (1950)
- (16) Hockiss, R. : Cold Spring Harbor Sympo-
sia on Quantitative Biol., **16**, 457(1951)
- (17) Roland, F. & Stuart, C.A. : Antibio. Ch-
emotherap., **1**, 523 (1951)
- (18) Voureka, A. : Lancet, **1**, 63 (1948)
- (19) George, M. & Pandalai, K.M. : Lancet.,
1, 955 (1949)
- (20) 秋葉, 石井, 田村 : 医学と生物学, **24**, 55
(1952)
- (21) 坂本成男 : 日本細菌誌, **5**, 337-344(1954)
6, 395-398(1954)