温度感受性薬剤耐性因子

I. Kanamycin 耐性因子の温度感受性伝達現象

東京大学医学部泌尿器科教室 寺 脇 良 郎
(主任: 高安久雄教授)

THERMOSENSITIVE DRUG RESISTANCE FACTOR I. THERMOSENSITIVE TRANSFER OF THE KANAMYCIN RESISTANCE FACTOR FROM PROTEUS VULGARIS TO E. COLI K-12 SUBSTRAINS

Yoshiro Terawaki

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo.

(Director: Prof. Hisao Takayasu)

A strain of *Proteus vulgaris* isolated from the urinary tract of a patient with postoperative pyelonephritis and resistant to all of sulfonamide (SA), streptomycin (SM), tetracycline (TC) and kanamycin (KM) was found to transfer only its KM-resistance by cell to cell conjugation.

The genetic determinant controlling the transferable KM-resistance was considered as a kind of R factor and designated R (KM), since successive transfer of this KM-resistance was also demonstrated from *E. coli* 20S0 received KM-resistance to other substrains of *E. coli* K-12 or *Salmonella typhimurium* LT-2, with rather high frequency and in no relation to the sex factor.

The transfer of this R(KM) factor was strongly affected by the temperature of the mixing culture in which the conjugation occurred. The transfer rate of KM-resistance at 25°C was about 10^5 times as high as that at 37°C.

Thus, a significant thermosensitivity of this R(KM) transfer was confirmed.

緒 言

1959年, 秋葉ら¹⁾ 及び落合ら²⁾により腸内細菌の多剤耐性伝達現象が発見されて以来, 本現象に関する疫学的あるいは微生物遺伝学上の多くの研究が主として日本の研究者によつて行われ, 今日までに, すでに見るべき数々の成果が発表されている。

これらの研究によれば, 薬剤耐性伝達に関与している遺伝学的単位は, episome¹⁰⁾ の範疇に属するものと考えられ, これに薬剤耐性因子 (drug resistance factor): R因子¹⁷⁾ という名称が与えられている。

今日まで, R因子の研究は主として赤痢菌を中心とする腸管由来の腸内細菌について行われて来たが, 最近漸く尿路由来のグラム陰性桿菌についても, R因子による多剤耐性菌の存在することが知られ, 2, 3の報告が見られるようになって来た。

泌尿器科領域で日常最も多く見られる疾患は尿路感染症であり, その起炎菌には腸内細菌を主とするグラム陰

性桿菌が多く, しかも多剤耐性菌が多い事実は夙に知られているところである。従つて, R因子研究の動向の一端が尿路感染菌へ向うのも当然の成行きということができよう。

さらに, 尿路感染由来の耐性菌が持つているR因子について, その遺伝学的性質, すなわち高い伝達頻度等, 腸管由来の菌のR因子と若干性質を異にすることを示唆する報告も2, 3見られる^{28) 29)}。

本論文に於ては, 尿路感染症患者から分離した多剤耐性 *Proteus vulgaris* の1株 (UR-75, 第2表参照) が, そのR因子の伝達に当つて, 伝達頻度が混合培養時の温度に大きく左右され, 低温の方が伝達が容易に起るといふ新たな現象を呈したので, この点に関する実験結果を報告する。

続報に於ては, この新しく見出された現象の本体について, 実験に基づいた考察を加えたいと考える。

実験材料と実験方法

使用菌株

1) *Proteus vulgaris* UR-75: 腎性尿崩症に尿路感染症を合併した患者の尿より分離された菌株で, Sulfonamide (SA), Streptomycin (SM), Tetracycline (TC), Kanamycin(KM)の4剤に耐性. Sodium azid (Az) 感性. 又, lactose 非分解, sucrose 分解性である. この菌株をR因子伝達の original donor cell として使用した.

2) *E. coli* 20S0 (F^- , Lac^- , Y^- , Z^+): *E. coli* K-12 の substrain で, SA, SM に耐性. Az 200 γ /cc にも耐性. この菌株をR因子伝達の recipient cell として使用した. (堀内忠郎博士より供与された).

3) *E. coli* W3630 (Hfr_s , F^- , Mal^- , Lac^+ , Lp^s , Tr): *E. coli* K-12 の substrain で, 何れの薬剤にも感性. この菌株は, *E. coli* 20S0 が *P. vulgaris* UR-75 から受取ったR因子を, 更に再伝達させる時の recipient cell として実験に供した. (本菌株は横田健博士より供与された).

4) *E. coli* W 3104 (F^- , Gal^- , Mal^+ , Lp^-): 同じく *E. coli* K-12 の substrain で, 何れの薬剤にも感性である. この菌株は, *E. coli* W3630 が受取ったR因子を更に再々伝達する時の recipient cell として使用した. (本菌株も横田健博士より供与された).

使用培地

実験の全過程を通じて液体培養には nutrient broth (栄研)を使用した.

又, 平板培養には MacConkey agar, (栄研), lactose を抜いた1% sucrose 加 MacConkey agar, 1% lactose 又は1% maltose 加 Eosin Methyleneblue Synthetic agar⁴⁾ (EMS agar) を使用した.

実験方法

R因子の伝達は donor cell と recipient cell の混合培養により行つた.

すなわち, donor cell と recipient cell を各々 nutrient broth 各5 ccに接種し, 25°C又は37°Cで18時間静置培養(前培養)の後, 各菌液の等量を混合し, 25°C又は37°Cに24時間静置培養した. ただし, 一部の実験では混合培養の時間を30分に制限した.

R因子を受取った recipient cell の選択は次のような方法で行つた. すなわち, donor cell として *P. vulgaris* UR-75, recipient cell として *E. coli* 20S0 を使用した時は, 両者の混合培養液を, sucrose 1%, Az 200 γ /cc, KM 25 γ /cc の濃度に加えた MacConkey agar

plate に塗布して, 25°C又は37°Cに24時間培養した.

P. vulgaris UR-75 から KM 耐性を受取った *E. coli* 20S0は, このような選択培地上では白色集落を形成した. 一方, *P. vulgaris* UR-75 は Az 感性であり, 又, KM 耐性を受取っていない *E. coli* 20S0 はKM感性であるため共にこの選択培地上では発育することができないので, KM耐性化 *E. coli* 20S0 は容易に選択することができた.

又, 新たな donor cell として, R因子を受取った *E. coli* 20S0 を用い, recipient cell に *E. coli* W3630 を選んだ時は, 両者の混合培養液を, lactose 1%, KM25 γ /cc の濃度に加えた EMS agar plate に塗布25°C又は37°Cに48時間培養した. KM耐性を受取った *E. coli* W3630は, この選択培地上で黒い大きな集落を形成するが, donor cell は lactose を栄養源として利用できないために, 又 KM耐性を受取っていない recipient cell は KM感性のために, この培地上には発育することができなかった. 従つて, KM 耐性を受取った *E. coli* W3630 は容易に選択することができた.

更に, KM耐性を受取った *E. coli* W 3630 を新たな donor cell とし, *E. coli* W3104を recipient cell として選んだ時は, 選択培地には maltose 1%, KM 25 γ /cc 加 EMS agar plate を使用した. 本培地上では, donor cell は maltose を利用できないために発育せず, recipient cell も KM 感性のため発育できなかった. しかし KM 耐性を受取った recipient cell は, 大きな黒色集落を形成するので容易に選択することができた. 但し KM 耐性化 recipient cell は, 本培地上で発育するに当つて培地に含まれる maltose を分解して glucose を生ずるため, donor cell の一部がこの glucose を利用して僅かながら発育し, KM 耐性化 recipient colony の周囲に小さな黒色の satellite colony を形成することがあつたが, これは容易に鑑別可能であつた.

なお, EMS agar を選択培地に使用した時は, 混合培養に使用した nutrient broth の影響を除くために, 培地上に塗抹する混合培養液は生理的食塩水で10倍以上に希釈した後, 実験に供した. 又, EMS agar plate の培養時間は48時間とした.

伝達頻度は, donor 当りの耐性化 recipient 菌数によつて表わした.

実験結果

実験 (1) *Proteus vulgaris* UR-75 から *E. coli* 20S0 へ, 接合による KM 耐性の伝達:

Proteus vulgaris UR-75 を donor cell とし, *E. coli* 20S0 を recipient cell として混合培養した時第1表に示したように *E. coli* 20S0は KM 耐性を受取った。そして, 混合培養を37°Cで行った時の R 因子の伝達頻度は 1.3×10^{-7} にすぎなかったが, 25°Cで行った時は 3.6×10^{-2} であり, 25°Cの方が約 10^5 倍高かった。

実験(2) KM 耐性を受取った *E. coli* 20S0 の KM 耐性度と, 他薬剤に対する耐性の有無:

(1)の実験で選択培地上に発育した 109 コの KM 耐性化 *E. coli* 20S0 の集落について, KM に対する耐性度と, TC に対する耐性の有無を調べた。実験方法は, 0.39, 0.78, …… 200, 400 γ /cc の各濃度の KM を含む MacConkey agar plate 及び 25 γ /cc の TC を含む MacConkey agar plate に, 上に述べた 109 コの集落を replica 法¹⁰⁾に基づき press して 37°C に 18 時間培養後, 発育の有無を調べた。その結果第2表に示したように 109 コの集落全部が KM 200 γ /cc に耐性でこれは original

第1表 *Proteus vulgaris* UR-75 (R:KM) から *E. coli* 20S0 への R (KM) 因子の伝達頻度

培 養 温 度			R (KM) の 伝達頻度 *
前 培 養		混合培養	
donor	recipient		
37°C	37°C	37°C	
37 "	37 "	25 "	

$1.3 \times 10^{-7} \left(\frac{1.1 \times 10^{11}}{8.1 \times 10^7} \right)$		
$3.6 \times 10^{-2} \left(\frac{1.0 \times 10^6}{2.8 \times 10^7} \right)$		

1% suerose, 200 γ /cc sodium azid 及び 25 γ /cc KM を含む lactose (—) の Mac Conkey agar plate を選択培地に使用した。

平板培養は全て 37°C に統一した。

* 伝達頻度: donor 生菌数当りの, R (KM) を受取った recipient 生菌数。

第2表 各種菌株の耐性 pattern

菌 株	SA* 100 γ /cc	SM ₂₅	CM ₂₅	TC ₂₅	KM ₂₅	KM ₂₀₀	耐 性 pattern
<i>P. vulgaris</i> UR-75 (R:KM)	r	r	s	r	r	r	SA, SM, TC, KM
<i>E. coli</i> 20S0	r	r	s	s	s	s	SA, SM
<i>E. coli</i> 20S0 (R:KM)	r	r	s	s	r	r	SA, SM, KM
<i>E. coli</i> W3630	s	s	s	s	s	s	(—)
<i>E. coli</i> W3630 (R:KM)	s	s	s	s	s	r	KM

* SA 耐性 marker の検査には Mühler-Hinton 培地を使用した。 r: resistant s: sensitive

donor cell: *P. vulgaris* UR-75 の耐性度に一致した。これに対し, *E. coli* 20S0 の原株は, KM 0.39 γ /cc 耐性であつたに過ぎなかった。又, 109 コの集落のすべてが TC 25 γ /cc に感性であつた。 *E. coli* 20S0 は元来 SA, SM に耐性であるため, この両薬剤については調べることができなかつた。そこで, *P. vulgaris* UR-75 が持っていた耐性 marker を, *E. coli* 20S0 を介してさらに *E. coli* W3630 に移した後, その耐性 pattern を調べたところ, KM のみに耐性で, SA, SM には感性であつた。

以上の実験結果から, *P. vulgaris* UR-75 から *E. coli* 20S0 へ伝達された KM 耐性は R 因子によるものであること, 及びこの R 因子は KM 耐性 marker のみを持っていたことが確認できた。従つて, 今後この R 因子を R (KM) 因子と呼び, R (KM) 因子を受取った株を, 各々 *E. coli* 20S0(R:KM), *E. coli* W3630(R:KM) 等と記載することにする。

実験(3) R (KM) 因子の再伝達性と, 再伝達に当つての温度感受性:

第3表 *E. coli* 20S0 (R:KM) から *E. coli* W3630 への R (KM) 因子の伝達頻度

培 養 温 度			R (KM) の 伝達頻度
前 培 養		混合培養	
donor	recipient		
37°C	37°C	37°C	
25	37	25	

1% lactose と 25 γ /cc KM を含む EMS agar plate を選択培地に使用した。

plating culture は全て 37°C で行った。

第4表 各種菌株の25°C及び37°Cに於る増殖速度（濁度による）

培養時間 (hr)	7	9	12	15	24
菌 株					
P. vulgaris UR-75 (R:KM)	290/ 310	305/ 332	367/ 380	380/ 480	730/2300
E. coli 20S0	240/ 265	275/ 285	322/ 340	360/ 358	425/ 460
E. coli 20S0 (R:KM)	235/ 254	270/ 290	310/ 318	348/ 350	395/ 437
E. coli W3630	185/ 276	228/ 310	300/ 360	360/ 410	670/ 950
E. coli W3630 (R:KM)	160/ 250	220/ 289	260/ 332	300/ 380	490/ 920

$$\text{数 字} : \frac{\text{OD}_{560} \times 1000, 25^\circ\text{Cに於る}}{\text{OD}_{560} \times 1000, 37^\circ\text{Cに於る}}$$

第5表 長時間混合培養の際の E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104への R (KM) 因子の伝達頻度に与える混合培養及び平板培養の温度の影響

培 養 温 度				混合培養 時 間	R (KM) の 伝 達 頻 度
前 培 養		混合培養	平板培養		
donor	recipient				
25℃	25℃	37℃	37℃	24時間	$4.9 \times 10^{-4} \left(\frac{1.1 \times 10^5}{2.4 \times 10^8} \right)$
25	25	37	25	24	$5.0 \times 10^{-4} \left(\frac{1.2 \times 10^5}{2.4 \times 10^8} \right)$
25	25	25	37	24	$2.2 \times 10^{-1} \left(\frac{4.7 \times 10^7}{2.1 \times 10^8} \right)$
25	25	25	25	24	$3.3 \times 10^{-1} \left(\frac{7.0 \times 10^7}{2.1 \times 10^8} \right)$

1% maltose と25γ/cc KMを含むを EMS agar plate 選択培地として使用した。

この R (KM) 因子は、共に E. coli K-12のsubstrain である E. coli 20S0 (R:KM) から E. coli W3630 へ伝達された。そして、donor cell を25°Cで培養し、さらに donor 及び recipient cell の混合培養を25°Cで行った時の R (KM) 因子の伝達頻度は 3.4×10^{-2} であつたが、donor 及び recipient cell の前培養並びに混合培養をすべて37°Cに行つた時は 2.3×10^{-4} に過ぎず、25°Cの方が約 10^2 倍高かつた（第3表参照）。

実験 (4) donor cell と recipient cell の増殖に及ぼす温度の影響：

R(KM) 因子の伝達に当つて見られた温度感受性が、donor 又は recipient cell の特殊な代謝に基くものかどうかを調べるために、P. vulgaris UR-75, E. coli 20S0, E. coli 20S0 (R:KM), E. coli W3630, E. coli W3630 (R:KM) の5菌株を25°C又は37°Cで培養し、各々の増殖速度を濁度によつて比較した。

即ち、これらの菌株の37°C、18時間培養菌液の濁度

を nutrient broth で適宜希釈することにより合わせた後、37°C又は25°Cで培養し、経時的に各菌液の濁度を Beckman の光電比色計で測定、比較した。

その結果、第4表に示したように、どの菌株でも例外なく37°Cで培養した方が25°C培養時よりも発育は良好で、37°Cで菌の代謝は最も活発に行われていることが判つた。

以上の実験結果から、R (KM) 因子の伝達に当つて見られた温度感受性は宿主菌に原因があるのではなく、R (KM) 因子の伝達の場合又はその周辺にあることが考えられたので、この点をより明確にするため、以下の実験を行つた。

実験 (5) donor cell と recipient cell を長時間混合培養した時、R (KM) 因子の伝達に及ぼす混合培養と平板培養の温度の影響：

E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104 への R (KM) 因子の伝達を第5表に示したような温度の組合せで行つた。donor 及び recipient cell の前培養は25°C。

第6表 長時間混合培養の際の E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104への R (KM) 因子伝達頻度を与える前培養及び混合培養の温度の影響

培 養 温 度			混合培養 時 間	R (KM) の 伝達頻度
前 培 養		混合培養		
donor	recipient			
37℃	37℃	37℃	24時間	$1.3 \times 10^{-4} \left(\frac{3.8 \times 10^4}{2.8 \times 10^8} \right)$
37	37	25	24	$3.6 \times 10^{-1} \left(\frac{4.8 \times 10^7}{1.3 \times 10^8} \right)$
25	25	37	24	$6.5 \times 10^{-4} \left(\frac{1.1 \times 10^5}{1.8 \times 10^8} \right)$
25	25	25	24	$3.7 \times 10^{-2} \left(\frac{5.2 \times 10^5}{1.4 \times 10^8} \right)$

平板培養の温度は全て37°Cで行った。選択培地は第4表に同じ

第7表. 短時間混合培養の際, E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104 へのR (KM)因子の伝達頻度を与える前培養及び混合培養の温度の影響

培 養 温 度			混合培養 時 間	R (KM) の 伝達頻度
前 培 養		混合培養		
donor	recipient			
37℃	37℃	25℃	30分	$1.5 \times 10^{-6} \left(\frac{3.0 \times 10^2}{2.0 \times 10^8} \right)$
25	25	25	30分	$2.4 \times 10^{-5} \left(\frac{2.3 \times 10^3}{9.0 \times 10^7} \right)$

平板培養は全て37°Cに統一した。選択培地は第4, 5表に同じ。

で行い、両者の混合静置培養時間は24時間とした。

その結果、(第5表参照) 混合培養を37°Cで行った時の R (KM) 因子の伝達頻度は $4.9 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ に過ぎなかったが、25°Cで行った時は $2.2 \times 10^{-1} \sim 3.3 \times 10^{-1}$ であり、25°Cの方が約10³倍伝達頻度が高かった。

しかし、KM 耐性化 recipient cell 選択時の平板培養の温度は R (KM) 因子の伝達に有意の影響を与えなかった。

実験 (6) 長時間混合培養時、R (KM) 因子の伝達に及ぼす donor 及び recipient cell の前培養と混合培養の温度の影響：

第6表に示したように、E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104 への伝達系で、混合培養を 37°Cで行った時、R (KM) 因子の伝達頻度は $1.3 \times 10^{-4} \sim 6.5 \times 10^{-4}$ であつたが、25°Cで行った時は $3.7 \times 10^{-2} \sim 3.6 \times 10^{-1}$ であり、25°Cの方が10²⁻³倍の伝達頻度を示した。

しかし前培養37°C—混合培養25°Cの時の伝達頻度 3.6×10^{-1} と、前培養25°C—混合培養25°Cの時の伝達頻度 3.7×10^{-2} の間には大きな差がないため、この実験では前培養の温度の影響は明らかでなかった。

混合培養を長時間行くと、donor 及び recipient cell の前培養の温度の効果が減殺されること、並びに、R (KM) 因子を受取つた recipient cell 自体が優勢に増殖 (overgrow) するようになること、以上二つの原因より、真の伝達頻度と温度の関係が修飾される危険がある。これを避けるために、次の実験では混合静置培養の時間を30分に制限した。

実験 (7) 短時間混合培養時、R (KM) 因子の伝達に及ぼす donor 及び recipient cell の前培養と混合培養の温度の影響：

donor 及び recipient cell には、実験 (5)、(6) と同様に E. coli W3630 (R:KM) と E. coli W3104 を使

第8表 短時間混合培養の際、E. coli W3630 (R:KM) から E. coli W3104への R (KM) 因子の伝達頻度に与える recipient 前培養の温度の影響

培 養 混 度			混合培養 時 間	R (KM) の 伝達頻度
前 培 養		混合培養		
donor	recipient			
25℃	37℃	25℃	30分	$6.5 \times 10^{-5} \left(\frac{1.3 \times 10^4}{2.0 \times 10^8} \right)$
25	25	25	30	$4.6 \times 10^{-5} \left(\frac{1.7 \times 10^4}{3.7 \times 10^8} \right)$

平板培養は全て37°Cで行った。選択培地は第4, 5, 6表に同じ。

用した。混合静置培養時間は、R (KM) 因子を受取った recipient cell の分裂が起らないよう30分に制限した。又、実験(5), (6)から少くとも混合培養を25°Cで行った時、伝達が容易に行われることが判つたので、この実験では混合培養はすべて25°Cで行った。

その結果、第7表に示したように、donor及びrecipient cell の前培養を37°Cで行った時、R (KM) 因子の伝達頻度は 1.5×10^{-6} であったが、25°Cで前培養した時は 2.4×10^{-5} であった。R (KM) 因子を受取った recipient cell の増殖が起らないよう、混合培養時間を30分に制限したことを考慮すると、この実験で見られた10倍の伝達頻度の差は有意であると考えられる。

又、第8表に示したように、recipient cell の前培養は25°Cで行っても37°Cで行っても、伝達頻度に大きな差は与えなかつた。

以上の実験から、R (KM) 因子は donor cell を25°Cで前培養し、donor 及び recipient cell を25°Cで混合培養した時、最も高頻度に伝達されることが判つた。

考 察

R 因子は一般には細菌細胞の細胞質内に存在し、宿主菌の増殖とは無関係に自律的に増殖し得るが、時には宿主菌の染色体に組み込まれた状態でも存在し得ると考えられている。また、R 因子は宿主菌の存在にとつて必ずしも必須のものではない。すなわち、R 因子は宿主菌の薬剤耐性を規定する他に、菌と菌との接合能⁹⁾ (mating ability) 及び R 因子の伝達能²⁴⁾その他を制御しているにすぎないと考えられているが故に Jacob らの言う episome¹⁰⁾ の概念に入る遺伝因子の一つとされている。この他に、R 因子について今日まで知られている一般的な事実は、概略、つぎの諸点に要約されよう。

R 因子は主として菌と菌との接合により伝達される¹⁸⁾が、phage による導入も特定の株では可能である²²⁾³⁴⁾。

又、R 因子と同じ episome に属する大腸菌の性決定因子：F 因子程高率ではないが、Acriflavine を初めとする Acridine 系色素により、R 因子はその感染細胞から除去される²¹⁾³³⁾。R 因子を既に持つている細菌細胞へは、他の R 因子が入り難くなる (R 因子の干渉)⁷⁾⁸⁾。F 因子との関係では、R 因子が F 因子と共存している時は、F⁺ 菌と F⁻ 菌の間に起る染色体の組換え率が低下する (稔性の抑制)²³⁾³¹⁾³⁶⁾。更に、F⁺ 菌又は Hfr 菌 (F 因子が宿主菌の染色体に組込まれた状態にある菌) へは R 因子が伝達され難い³⁰⁾等の事実が明らかとなつている。

又、R 因子により耐性化した腸内細菌の生化学的耐性機構については、菌の細胞質膜の薬剤に対する透過性の低下が主な機序であろうとされている³⁵⁾。

更に、R 因子の物質的本体については、³²P の崩壊実験³²⁾、R⁺菌の核酸組成の分析²⁵⁾、base analogue のとりこみによる R 因子の脱落⁹⁾等の実験事実から、R 因子は DNA より成つていていると考えられている。

donor cell から recipient cell への R 因子の伝達は、in vitro に於てのみでなく、ヒト及びマウスの腸管内でも起ることが確認されている³⁾。

又、R 因子の伝達阻害物質としては、胆汁酸塩¹³⁾等が挙げられている。

R 因子が伝達される菌種、即ち R 因子の宿主域は Enterobacteriaceae の殆んど全域に亘つている⁶⁾。

Lebek¹⁵⁾ は、Proteus 並びに Pseudomonas へも R 因子が伝達されることを報告したが、逆に Proteus から他の腸内細菌へ R 因子が伝達されたことの報告はまだない。しかし最近三橋²⁰⁾は、臨床材料から分離された

Proteus が、R 因子を持っていたとの報告を行った。

又、R 因子が規定する薬剤耐性の pattern には、SA, SM, CM, TC 4 剤相互間の種々の組合せがあるが、KM 耐性 marker を含む R 因子については、わずかに Lebek¹⁴⁾ が病原大腸菌の 1 株及び *Klebsiella-Aerobacter* に属する 2 株において、又、木村ら¹¹⁾ が *Shigella sonnei* の 1 株において見出したことを報告している他、尿路から分離した *Cloaba* の 1 株についての著者²⁹⁾ の報告があるのみである。

しかし、KM のみの単独耐性 marker を持つ R 因子の伝達については、今日まで報告がなかった。

本論文に報告した R 因子は、*Proteus vulgaris* が original に持っていたこと、及び KM 耐性 marker のみを持つ伝達能ある R 因子：R (KM) 因子であることの 2 点で新しい知見と言える、

更に、第 3 のより重要な事実、この R (KM) 因子の伝達に当つて、温度感受性が確認されたことである。

従来、R 因子の伝達は、donor cell と recipient cell とを 37°C で混合培養した時最も高頻度に行われることが知られていた²⁾。今回の実験結果を総括すると

(1) R (KM) 因子の伝達を、*E. coli* K-12 の substrain である *E. coli* W3630 と *E. coli* W3104 の間で行った時も、R (KM) 因子を original に持っていた *Proteus vulgaris* UR-75 を donor cell とした時と同様に、その伝達に当り、温度感受性が見られた。

(2) donor cell を 25°C で前培養し、更に donor 及び recipient cell の混合培養を 25°C で行つた時、R (KM) 因子の伝達は最も高頻度に行われることが確認された。

本現象発現の機序として、R (KM) 因子自体の温度感受性を一応除外した場合次のことが言える。

(1) R (KM) 因子を持つ donor cell と recipient cell の mating のために必要な donor cell 側のある物質 (おそらく mating substance) は、37°C で培養した時は、30 分以内には殆んど形成されない。

(2) donor cell を 25°C で培養することにより良好に準備形成された mating substance は、37°C に incubate すると不活性化されるか、又は、37°C では 30 分以内には菌の接合は殆んど起らない。

(3) この mating substance は、R (KM) 因子を持つ donor cell を 25°C で培養した時、最も良好に準備形成され、25°C で recipient cell と混合培養した時、最も強く活性化される。

もしこの R (KM) 因子を持つ宿主細菌に於て、R pilli²⁹⁾ の形成に温度感受性が見られるならば R 因子の伝達を規定している場がより明確にされと言えよう。

続報では、立場をかえて、この R (KM) 因子自体が温度感受性を持つか否かを、実験的に検討する予定である。

結 論

尿路感染症患者の尿より分離された、SA, SM, TC, KM の 4 剤に耐性の、*Proteus vulgaris* UR-75 の持つ R 因子について実験を行い、次のような成績を得た。

(1) *Proteus vulgaris* UR-75 を donor cell とし、*E. coli* K-12 の substrain を recipient cell とした時、KM 耐性 marker のみが伝達された。

(2) この耐性 marker は、*E. coli* K-12 の substrain を各々 donor 及び recipient cell とした時も伝達可能であつた。

以上より、*Proteus vulgaris* UR-75 が、伝達可能な R 因子を持っていたこと、並びに、この R 因子は、KM 耐性 marker のみを持っていたことが確認された。これは今まで報告されていない新しい型の R 因子である。

更に、この R (KM) 因子の伝達に当つて、次のような新しい現象が見出された。

(1) original に R (KM) 因子を持つ *Proteus vulgaris* UR-75 から、*E. coli* K-12 の substrain へ R (KM) 因子が伝達される時、37°C よりも低温 (25°C) で混合培養を行つた時の方が、伝達頻度が約 10³ 倍高かつた。

(2) この温度感受性伝達現象は、R (KM) 因子の伝達が *E. coli* K-12 の substrains の間で行われる時も同様に見られた。

(3) R (KM) 因子の伝達は、R (KM) 因子を持つ donor cell を 25°C で培養し、更に recipient cell との混合培養を 25°C で行つた時、最も容易に行われた。

R 因子の温度感受性伝達現象については今まで全く報告されていない。

本現象の原因として、R (KM) 因子自体が温度感受性であるか、R (KM) 因子を持つ宿主菌の接合の場が温度感受性であるかの 2 つの可能性が考えられる。

続報においては、この点につき検討する。

(本論文の要旨は、第 21 回日本細菌学会関東支部総会に於て発表した。)

菌株を御分与下さつた山梨研所長、横田健博士並びに予研 (現九大助教授) 堀内忠郎博士に感謝致します。

文 献

- 1) 秋葉朝一郎, 小山恒太郎, 一色義人, 木村貞夫, 福島敏雄: 日本医事新報, 1866, 46, 1960.
- 2) 秋葉朝一郎, 岩原繁雄: 医学と生物学, 60, 42, 1961.
- 3) 秋葉朝一郎, 小山恒太郎, 木村貞夫, 福島敏雄: 医学と生物学, 59, 185, 1961.
- 4) Davis, B.D. and Mingioli, E.S.: J. Bacteriol., 60, 17, 1950.
- 5) 藤井敏男, 所美都子, 広田幸敬: 遺伝学雑誌, 37, 383, 1962.
- 6) Harada, K., Suzuki, M., Kameda, M. and Mitsuhashi, S.: Jap. J. Exp. Med., 30, 289, 1960.
- 7) Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M., Kakinuma, Y. and Mitsuhashi, S.: Gunma J. Med. Sci., 10, 201, 1961.
- 8) Hashimoto, H., Morimura M., Tanaka, S., Nakano, T., and Mitsuhashi, S.: Gunma J. Med. Sci., 10, 206, 1961.
- 9) 伊予部志津子, 三橋進: 日本細菌学雑誌, 17, 978, 1962.
- 10) Jacob, F. and Wollman, E.L.: Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 247, 154, 1958.
- 11) 木村貞夫, 水野孝重, 秋葉朝一郎, 篠川至, 池村謙吾: 医学と生物学, 68, 61, 1964.
- 12) Kondo, E. and Mitsuhashi, S.: Gunma J. Med. Sci., 30, 289, 1960.
- 13) 小山恒太郎, 秋葉朝一郎: 医学と生物学, 60, 59, 1961.
- 14) Lebek, G.: Zbl. Bakt. Parasit., 183, 213, 1963.
- 15) Lebek, G.: Zbl. Bakt. Parasit., 191, 387, 1964.
- 16) Lederberg, J. and Lederberg, E.M.: J. Bacteriol., 63, 399, 1952.
- 17) 三橋進: 科学, 30, 628, 1960.
- 18) 三橋進: 医学と生物学, 55, 49, 1960.
- 19) 三橋進: 蛋白質・核酸・酵素, 8, 216, 1962.
- 20) 三橋進: 第14回日本化学療法学会総会, 於熊本, 1966.
- 21) Mitsuhashi, S., Harada, K. and Kameda, M.: Nature, 189, 947, 1961.
- 22) 中谷林太郎: 伝研予研學術集談会, 於東京, 1960.
- 23) 中谷林太郎: 医学生物学最近の展望 (I), 1, 109, 1960.
- 24) 中谷林太郎, 中村明子, 山田千昌: 日本細菌学雑誌, 16, 848, 1961.
- 25) 中谷林太郎, 中村明子: 日本細菌学雑誌, 18, 249, 1963.
- 26) 西村行雄, 石橋正英: 遺伝学雑誌, 40, 410, 1965.
- 27) 落合国太郎, 山中敏樹, 木村勝直, 沢田収: 日本医事新報, 1861, 34, 1959.
- 28) 田波洋, 松本顯樹, 田崎忠勝, 中村進: 日本細菌学雑誌, 21, 182, 1966.
- 29) 寺脇良郎: 医学と生物学, 71, 217, 1965.
- 30) 渡辺力, 深沢俊夫: 医学と生物学, 57, 167, 1960.
- 31) 渡辺力, 深沢俊夫: 医学と生物学, 59, 42, 1961.
- 32) 渡辺力, 深沢俊夫: 医学と生物学, 65, 111, 1962.
- 33) Watanabe, T. and Fukasawa, T.: J. Bacteriol., 81, 679, 1961.
- 34) Watanabe, T. and Fukasawa, T.: J. Bacteriol., 82, 202, 1961.
- 35) 横田健: 生体の科学, 13, 305, 1962.
- 36) 吉川昌之介, 秋葉朝一郎: 医学と生物学, 58, 126, 1960.

(昭和41年11月11日受付, 特別掲載)