ストレプトマイシン依存性結核菌を用いた 細菌の突然変異の研究

第5報 第4報に対する補遺

金 井 興 美 中 島 誠

(国立予防衛生研究所結核部, 部長: 柳沢謙)

[受付: 5月7日・1958年]

前報¹⁾において, 著者等は, ストレプトマイシン(SMと略) 依存性株 18b R-INH より, SM を含まぬ培地上に一段階で得られた SM 非依存性の突然変異株のうちのあるものが, 再び SM 培地におかれると, 極めて高い頻度で, SM 増強株を生ずることを報告した。本報では, この観察に更にいくつかの知見を附加して, その様相をたしかめたい。

実験材料, 実験方法

前報¹⁾のごとし。

実験と考察

実験 1 前報¹⁾ で述べられた SM 依存性株のうちの一つである e 株は, これを 80 γ /cc 以上に SM を含有する小川培地に接種すると, SM 増強性の性質をもつ集落を発生したが, 今回は, 100, 500, 1000 γ /cc SM 培地に大量接種して一段階で得られた集落を, それぞれその同一 SM 濃度小川培地で一度増菌し, これらの培養菌の性質を再試験した。即ち, 型の如く, 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 γ /cc SM 小川培地に, それらの連続10倍稀釈菌液を接種して, 上述の分離集落が, 親株 e と同一態度をとるか²⁾, 或は完全な SM 耐性であるか, 更にあるいは SM 増強性であるか完全依存型であるかを検討したのである。

成績は第1表にまとめたが, 高濃度 SM 環境で分離された集落程, SM に増強される型のものが多いが, 1000 γ /cc においてすら 100%でないことは, こゝで特に認識しておきたい。第2表は, 第1表で示された SM 増強株のうちの2つをえらび, それらの安定性について検討した成績である。100 γ /cc で3代継代したが, この条件では, 増強性の性質がよく維持されている。

実験 2 前報のごとく, 18bR-INH 株より SM を含まぬ培地上に一段階で得られた SM 非依存性の突然変異株の中には, e 株のごとく比較的高頻度に SM 増強株を出すものがあるが, すべての SM 非依存性株がこのような

第1表 ストレプトマイシン非依存性株(e)より,
高濃度 SM 培地上に一段階で得られた孤立
集落の SM に対する態度の再試験による分類

集落の分離 された培地 の SM 濃度	左の被 検集落 数	SM に対する態度の 再試験による分類			
		(親株型)	(耐性型)	(増強型)	(依存型)
1000 μ g/cc	10	0	5	5	0
500	8	0	5	3	0
100	16	14	2	2	0

註: (親株型) (耐性型) (増強型) (依存型) については
前報(4)または本報第3報参考のこと

第2表 e 株より得られたストレプトマイシン
増強株の増強性についての安定度

継 代	株 1 SM 濃度 μ g/cc				株 2 SM 濃度 μ g/cc			
	0	10	100	300	0	10	100	300
1代	+	++	⊕	+++	0	+	⊕	+++
2代	0	++	⊕	+++	0	3	⊕	+
3代	0	+	++	+++	4	++	++	+++

註: 各代 0.1 mg 接種, 4 週判定
○印発育をもつて次代へ接種

KANAI Koomi and NAKAJIMA Makoto: Studies on bacterial mutation using streptomycin dependent (18b strain) tubercle bacilli V. Supplement to Report IV, Dept of Tuberc. Nat. Inst. Health, —Jap. J. of Bact., 13(10), 919-921, 1958.

第3表 ストレプトマイシン非依存性株(c)の
ストレプトマイシン環境中における
変異株分離試験

接種量 (mg)	ストレプトマイシン濃度 (μg/cc)							
	0	10	20	40	80	160	320	640
10 ⁻¹	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	⊕
10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	0
10 ⁻⁵	+	+	+	+	④	0	0	0
10 ⁻⁶	27	20	⑮	⑯	0	0	0	0

発生集落再試験 (上の○印よりえらぶ)

被検集落の 発生した培 地の SM 濃 度 μg/cc	被検集 落数	被検集落の SM に対する態度 の類型による分類							
20	4	P	P	P	P				
40	5	P	P	P	P	P			
80	4	P	P	P	R				
360	8	P	P	P	P	R	R	E	D

註: P: 親株型表上半と同一傾向を示すもの

E: SM により発育の増強される型

D: SM に完全に依存する型

R: 完全耐性型

性質をもっているわけではなく、中には、それより SM 培地上で分離される集落の大部分が、親株型または耐性型に属するような SM 非依存性株も多かったのである。

第3表に示した SM 非依存性の c 株も、やはり 18b R-INH 株より SM を含まぬ培地上に一段階で得られた株の一つであつたが、これは表に示すごとく、e 株と異つて SM 培地上に再接種された場合に、SM 増強型を出

第4表 ストレプトマイシン非依存性 c 株より分離した SM に完全
に依存する株の (第3表) 依存度について

各試験管 への接種 量 (mg)	薬 剤 濃 度 (μg/cc)							
	SM				INH		SM 100	INH 50
	0	20	100	500	50			
1	*1, 0, 3, 4, 4 1, 0, 0, 0	/	/	/	**0, 0, 0, 0, 0	/	/	/
10 ⁻¹	0, 0	+, +	+++	+++	0, 0	++	++	++
10 ⁻²	0, 0	+, +	+++	+++	0, 0	++	++	++
10 ⁻³	0, 0	0, 0	++, ++	++, ++	0, 0	++	++	++
10 ⁻⁴	0, 0	0, 0	+, +	+, +	0, 0	+	+	+
10 ⁻⁵	0, 0	0, 0	23, 38	43, 48	0, 0	28	33	

註: 4 週培養後の各試験管毎の発育を示した,

* 8 週後では (3, 3, 5, 6, 5, 3, 3, 4, 2)

** 8 週後では (0, 1, 1, 0, 2)

す頻度の少かつたものである。しかし、これを特にこゝで例示したのは、360 μg/cc で分離された被検集落の一つが、完全な SM 依存型であり、しかも、それは、第4表に示すごとく 18b 株と全く同一 SM 依存領域を示したのである。即ち、こゝでは、18b R-INH → C 株 → 18b R-INH といった真の Back mutation が観察されたことが暗示されている。更にまた、これを再び SM を含まぬ小川培地に接種した場合に、SM 非依存性集落の発生する率

第5表 ストレプトマイシン非依存性 c 株より
得られた SM 完全依存株 (第4表) より、
一段階で得られた 12 の SM 非依存性集落
SM の感受性

集落 No.	SM 濃 度 (μg/cc)				
	0	10	50	100	500
1	++	++	+	+	+
2	+++	+++	+	0	0
3	+++	+++	+++	+++	0
4	+++	++	+	0	0
5	+++	+++	+++	++	0
6	+++	+++	+++	+++	+++
7	++	+	+	+	+
8	+++	+++	+++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++	+
10	+++	++	+	0	0
11	++	+	33	5	4
12	65	58	55	56	49

註: No. 1~3 は INH 50 μg/cc 上で分離され、のこりは普通の薬剤を含まぬ培地で分離された。

が、10⁶~10⁷ に1つであつた点
は、これまた初代 18b R-INH 株
と同一であつた²¹⁾。したがつて、
著者等は、この場合に限り、言葉
通りの Back mutation と断定し
てよいと考えるのである。再分離
された上述の SM 依存株は、こゝ
で 18b R-INH' と名づけて 18b R-
INH 株と区別することにする。
著者等は、この 18b R-INH' は c 株
を構成していた菌細胞群、即ち
population の中で、特に SM 依
存性因子を獲得あるいは再現し易
い性質の細菌細胞に基因したもの
と推測し、これを用いて次の実験

第6表 第5表の No. 11, 12 株の SM 上の
発生集落の再試験

被検集落の 分離された 培地の SM 濃度	被検集 落数	SM に対する態度の類型別 (親株型) (耐性型) (増強型) (依存型)			
		0	3	7	0
500 $\mu\text{g}/\text{cc}$	10	0	3	7	0
100	14	0	1	13	0
50	6	0	2	4	0

に移った。

実験 3 第4報の註に述べた8週後における薬剤不含小川培地上の集落, 即ち, 18b R-INH $\rightarrow$ C $\rightarrow$ 18b R-INH' $\rightarrow$ SM 非依存性株の経歴を経た12株をえらび, これらの SM に対する態度を型の如く再検討して第5表の如き成績を得た。即ち, 大部分は, 第3, 4報⁽¹⁾で述べられたような SM 非依存性株と同一型であるが, このうち, No. 11, 12株より SM 50 γ/cc 以上で再分離された孤立集落を, それぞれ同一 SM 濃度小川培地で継代増菌して, それらの SM に対する態度を再検討した。成績は第6表に示したが, 前の c 株と異り, 今度は極めて高率に SM 増強性の菌を出すことが明となった。即ち, 第1表の e 株の場合と比べてもはるかにその傾向はつよいのである。これは, 前述のごとく, SM 依存性因子を発現し

第7表 第6表で得られた SM 増強株の
一つにおける安定性の実験

観察週	SM 濃度 $\mu\text{g}/\text{cc}$						
	0	10	20	40	80	160	320
3 週	—	+	++	+++	+++	+++	+++
5 週	⊕	⊕	+++	+++	+++	+++	⊕

○印発育をもつて次代の再試験へ

	*	SM 濃度 $\mu\text{g}/\text{cc}$						
		0	10	20	40	80	160	320
3 週	0	—	+	++	+++	+++	+++	+++
	10	—	++	++	+++	+++	+++	+++
	320	—	+	+++	+++	+++	+++	+++

註: * 被検発育の得られた培地の SM 濃度 $\mu\text{g}/\text{cc}$

易い素因の cell line を扱っているためと, こゝでは一応推測しておく。

第7表は, 第6表で得られた SM 増強株の一つの安定性について検討したもので, 長期観察後 SM を含まぬ培地上に発育する培養を用いても, 次代で顕著な SM 増強性の傾向を維持していることが明らかとなった。

綜 括

18b R-INH (SM 依存性) $\rightarrow$ C 株 (SM 非依存性) $\rightarrow$ 18b R-INH' (SM 依存性) $\rightarrow$ C' 株 (SM 非依存性) の経歴をもつ SM 非依存性の一株 (C') を分離した。この株は, 50 γ/cc 以上に SM を含有する小川培地に接種されると, 極めて高率に, 前報⁽¹⁾の e 株の場合以上の率で SM 増強株を生ずることが明らかとなった。

最後に, 室橋博士の御校閲と, 東大秋葉教授の御教示, また丸山米夫君の技術援助に深謝します。また, この研究の要旨は, 昭和32年6月末の松本における日本細菌学会関東支部例会で発表した。なお, 実験実施にあつての費用は, 文部省科学研究費に負うところ大であることを附記します。

文 献

- 1) 金井興美・中島誠・勝山茂: ストレプトマイシン依存性結核菌を用いた細菌の突然変異の研究, 第4報, 18b R-INH 株より一段階で得られたストレプトマイシン非依存性株のうちの一つ, e 株について, 日本細菌学雑誌, 13, 498~500, 1958.
- 2) 金井興美・勝山茂: ストレプトマイシン依存性結核菌を用いた細菌の突然変異の研究, 第1報, ストレプトマイシン依存性イソニアジッド耐性結核菌の分離, 日本細菌学雑誌, 13, 43~46, 1958.
- 3) 金井興美・勝山茂: ストレプトマイシン依存性結核菌を用いた細菌の突然変異の研究, 第2報, 18b R-INH 株よりストレプトマイシン非依存性株の分離について, 日本細菌学雑誌, 13, 101~104, 1958.
- 4) 金井興美・勝山茂・中島誠: ストレプトマイシン依存性結核菌を用いた細菌の突然変異の研究, 第3報, 18b R-INH 株より一段階で得られたストレプトマイシン非依存性株のストレプトマイシンおよびイソニアジッドに対する態度, 日本細菌学雑誌, 13, 201~203, 1958.