細菌の彷徨変異に関する研究

その 1 鳥型結核菌の INAH 耐性度

東 村 道 雄 三 浦 幸 二

国立療養所大府荘

[受付: 7 月 30 日・1958 年]

吾々が前に行つた結核菌の INAH 耐性についての遺伝学的研究の結果は、INAH 耐性度の種々の段階がそれぞれに相当する遺伝子型の変化によつて生じるものではなく、単一または極く少数の遺伝子型の存在での表現型変動によつて生じることを示した^{1) 2) 3)}。その後の研究では更に INAH 耐性が恐らく a single gene mutation によつて生じるものと考えられるに至つた⁴⁾。

このような考えは直ちに INAH 感性に関する遺伝子型も単一であることを想像させ、従つて INAH 感性菌にみられる INAH 感受性の変動も矢張 INAH 感性遺伝子型の存在における表現型変動であることを考えさせる。しかし、この考えは chloromycetin 感受性や Streptomycin 感受性の変動が polygene によつて支配されると云う一連の研究^{5) 6) 7) 8) 9)}とは趣きを異にしている。INAH 耐性度乃至感受性の変動が polygene に由来するものであれば、例えば INAH 0.1 γ 培地に生育する菌が作る clone の population 構成と、その 100 倍の INAH 10 γ 培地に生育する菌が作る clone の population 構成とは構成が異なる筈である。すなわち、後者の方がより高耐性菌によつて構成されている筈である。しかるに吾々の実験(人型結核菌)では、この両者に有意の差がなく、従つて INAH 耐性度の変動が polygene に由来する可能性は否定されたわけである^{1) 2)}。

いわゆる INAH 感性菌の INAH 感受性の変動についても同じことが云える。もし INAH 感受性の変動が吾々の考える如く単一な INAH 感性遺伝子型の存在における表現型変動に他ならぬものであれば、INAH 感性菌の中で比較的耐性度の高い菌(感受性の低い菌)の clone と、比較的耐性度の低い菌(感受性の高い菌)の clone とを取つて比較すれば、両者の population 構成は相似のものである筈である。一方、もし INAH 感受性の変動が polygene によるものであれば、この両者の population 構成は相似ではなく、前者においてより高率

に比較的耐性度の高い菌(感受性の低い菌)が発見される筈である。換言すれば、population 耐性度の mode は、前者においてより右方に(耐性度の高い方向に)移動する筈である。以上の可能性を検討するために次の実験を行つた。

(注)但し、この検討の対象はあくまで single clone でなければならない。もし耐性菌を含み得る如き大きい population を対象としては、より高濃度の INAH を含む培地で増殖した population では INAH 耐性菌含有率が增加する現象が selective mechanism によつて起り得るかもしれないから。

実験材料及び方法

Mycobacterium avium, 獣調株の a single clone から出発した株を被検株として使用した。培地は sodium glutamate を以つて asparagin に代えた modified Sauton medium(pH 7.0)および 1.5%寒天を含む Sauton 寒天培地を用いた。Sauton 培地はすべて 200 ml 入り Erlenmeyer flask に 50ml 宛分注したものを用い、Sauton 寒天は直径 9 cm の Petri 皿に 20ml 宛分注したものを用いた。INAH の作用は寒天によつて影響されるので、この実験では 3%寒天を用いた前の実験⁹⁾よりも低濃度で発育への影響が起つた。

survival ratio の測定は前報⁹⁾の通りである。すなわち、Sauton 培地 7 日培養の菌をとつて、ガラス玉とともに振盪した後、生食水に浮游して菌液を作り、更にこれから 10 倍段階希釈液を作つた。各希釈液の 0.1 ml 宛

TSUKAMURA Michio & MIURA Koji: Studies on the fluctuation of phenotype in bacteria. I. Phenotypic variation of the degree of isoniazid-resistance in *Mycobacterium avium*. The Obuso National Sanatorium, Aichi-Pref. — Jap. J. of Bact., 13(12), 1154-1157, 1958.

をメスピペットで種々の INAH 濃度の組の Sauton 寒天平板に接種し, 白金線ローラーで平板に均等に塗抹した。集落数算定は 37°C 5 日後に行い, 平板 5 枚の平均値で示した。

実験成績並びに考察

(1) 感性菌の INAH 耐性度変動の由来。

被検株の感性菌は表 1 のように総生菌数の約 37% が INAH 0.5 γ 培地に生育 (集落形成) した。従つて, この 0.5 γ は感性菌にたいして部分的撰択の濃度であると云える。この濃度で比較的大きい集落を示すもの, 中等度の集落を示すもの, 比較的小さい集落を示すものを

表 1 M. avium 獣調株感性菌の INAH 0.5 γ にたいする survival ratio.

Isoniazid Concentration	No. of Survivors Per Plate *
0 /ml	240.8 $\pm$ 52.4 (100%)
0.5	90.0 $\pm$ 55.9 (37.3%)

* 平板 5 枚の平均値及び標準偏差

(注) この INAH 0.5 γ 培地に発育した集落の中で比較的大きいもの, 中程度のもの, 小さいものをつとて, 夫々 Fl, Fo, Fs と名づけた。

one clone 宛取つて, 夫々 Fl (直径約 4 mm の集落), Fo (直径約 1.5 mm の集落), Fs (直径約 0.5 mm の集落) と名づけた。これらの集落は夫々, 比較的耐性度の高い (感受性の低い) 菌, 中等度の菌, 比較的耐性度の低い (感受性の高い) 菌に由来する clone であると考えられる。もし集落の大きさの差が接種された菌数 (単個菌か菌塊かの意味) の不揃いによるものであれば, 培養を続ければ集落の大きさが平均してくる筈である。例えば単個菌と 30 個の菌よりなる菌塊とがあつたとしても, この差は一日以内で追いつくことができる。一方, 集落は或程度に発育すれば, 発育が緩徐になるから, 或

程度の培養日数の後には, いずれの集落も略等大になる筈である。実際に INAH なしの対照培地では集落の大きさはよく揃っている。しかるに INAH 培地では集落の大きさが不揃いで, しかも日数を経ても小集落は依然として小集落にとどまつている。従つて, 上述の集落の大小は出発点となつた菌数の差によるものではなく, INAH 耐性度 (INAH 感受性) の差に基づくものと考えられる。

また吾々の実験条件では各集落は殆んど大抵のものが single viable cell から由来していると考えられる。何となれば, 被検菌液には数個以上の菌塊は稀であり, 一方, 別の実験 (単位重量当りの生菌単位数測定) から, 培養 7 日後の培養中では viable な菌は数個に 1 個しかないと考えられるからである。

上述の Fl, Fo, Fs の 3 clones を各々 Sauton 培地に 7 日間培養して population 構成をしらべた。その結果を表 2 に示す。表のように, INAH 1 γ 培地に生育する菌の含有率は, これら 3 つの clones の間で著明な差がない。もし, これら 3 clones の INAH 0.5 γ 培地での発育速度の差が遺伝子型の差によつて規定されていたのであれば——この場合は polygene の存在を意味する——Fl, Fo, Fs はこの順序に INAH 1 γ 培地生育菌 (INAH 1 γ 培地で集落形成可能な菌) を高率に含んでいる筈である。しかるに事実は表 2 のように, そうではなく, 3 つの clones が相似の population 構成を示している。すなわち, Fl, Fo, Fs の各々の起原となつた菌の表現型が異なるにも拘らず, 薬剤なし培地で増殖を繰返した後は, 同一 population 構成の population を与えたわけである。この結果は, これら 3 clones の起原となつた菌の耐性度の差が遺伝子型の変化によるものではなく, たんに表現型の変化であり, 遺伝子型は不変に保たれていたことを示している。すなわち, この現象は遺伝学に云う彷徨変異の現象に他ならない。

しかし, ここに問題となる点が 1 つある。それは,

表 2 Fl, Fo, 及び Fs clones の population 構成

Isoniazid Concent.	No. of Survivors Per Plate *		
	Strain Fl	Strain Fo	Strain Fs
0 /ml	354.2 $\pm$ 156.7	163.4 $\pm$ 80.9	509.6 $\pm$ 254.6
1	77.7 $\pm$ 50.8	42.0 $\pm$ 21.1	211.0 $\pm$ 110.0
Ratio of Survivors on 1 of Isoniazid	2.19 %	2.57 %	4.14 %

* 平板 5 枚の平均値及び標準偏差。

表 3 INAH 耐性株の population 構成

(各株は one-step selection で得た single clone に由来する)

Isoniazid Concent.	No. of Survivors Per Plate *		
	B	C	D
0	219.2±107.0 (100%)	364.4±63.9 (100%)	69.2± 27.3 (100%)
3	288.6± 60.1 (131%)	329.0±63.3 (91%)	64.2± 31.0 (93%)
10	167.8± 89.2 (77%)	279.2±80.0 (77%)	40.6± 17.6 (59%)
20	0.0	0.0	0.0
	F	G	I
0	80.0± 12.2 (100%)	59.4±37.8 (100%)	619.8±195.0 (100%) #
3	80.8± 79.4 (101%)	33.4± 8.33 (56%)	516.2±159.5 (83%)
10	89.2± 49.6 (111%)	46.8±33.4 (79%)	324.8±134.2 (53%) #
20	0.0	0.0	0.0
	H	J	
0	135.8±41.1 (100%) ###	149.4±63.8 (100%)	(Remark)
3	98.0±31.4 (72%)	176.4±43.1 (118%)	# 危険率 2.5 % 以下で有意差
10	58.4±20.4 (43%) ###	101.0±38.7 (68%)	## 危険率 1 % 以下で有意差
20	0.0	0.0	

* 平板 5 枚の平均値及び標準偏差

INAH 培地で発育速度の差を生じた原因がたんに表現型の変動に由来するものであれば、例えば **Fs clone** で増殖が起る間に発育速度の比較的速い菌 (耐性度の比較的高い菌) を生じて結局集落の大きさが平均されてよいのではないかと云う疑問である。しかるに実際には、**Fs clone** の集落の大きさは INAH 0.5 γ 培地では最後まで小さかつたのであるから、比較的耐性度の低い表現型の菌が、次々と高率に耐性度の比較的低い菌を作っていたことになる。但し、この現象は INAH 培地で増殖を続けている間だけのことであつて、薬剤なし培地に移されて増殖すれば、前述のように、比較的耐性度の高い菌と同じような **population** を作るのである。従つて、これらの観察から、耐性度の遺伝に INAH の影響と云う環境的要素が或程度の規制を与えていることを考えぬわけにはゆかないし、また耐性度乃至感受性の遺伝が遺伝子のみによらず細胞質によつても影響されることを——遺伝子型が不変であるのに、低耐性の菌を次々と産生したのであるから——考えなくてはなるまい。なお、ここに述べた現象は、INAH の存在により感性遺伝子型が耐性遺伝子型に変化する如き考え (いわゆる誘導変異) を決して意味するのではないことを特に断つておく、遺伝子型は不変のままに保たれていたと前述の結果から考え

られるからである。

(2) 耐性菌の INAH 耐性度変動の由来

吾々は前に INAH 耐性に関する単一遺伝子型の存在のもとにも、耐性度の変動が起ることを報告したが、この変動は遺伝学的立場から **彷徨変異** に相当するものと云える¹⁾²⁾³⁾。この所見を更に確めるために次の実験を行った。

感性株から菌液を作り、その 10^{-4} 液を薬剤なし培地に接種して総生菌数を数え、原液を INAH 10 γ 培地に接種して 37°C 5 日後に観察すると、総生菌数 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ に 1 個の割合で、INAH 10 γ 培地生育集落を得た。これらの集落の起原となつた耐性菌は上述のように、 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ に 1 個の割合で見出され、一方、接種に用いた菌液には数十個を越える菌よりなる菌塊は殆んど存在しないので、各集落が単個菌 (**single viable cell**) に由来することは確実である。これらの **single clones** の中で 8 個を任意にとつて別々の **subculture** として Sauton 培地に 7 日菌培養し、各 **subculture** の **population** 構成をしらべた。その結果は、表 3 のとおりである。使用した平板数が各濃度 5 枚であつたためと接種方法にメスピベット法をとつたために標準偏差は比較的大であり、危険率 5 % 水準では検討した 8 clones の中で 6 clones に

は population 構成に有意の差を見出せなかつたが、それでも 2 clones には高度に有意な population 構成の不均一性を認めた。すなわち、対照培地の集落数と INAH 10 γ 培地の集落数との間に有意の差（危険率 2.5% 以下および 1% 以下）を認めた、なお、20 γ 培地に可視集落を示す菌は全例に見出せなかつた。

単個菌に由来する集落 (clones) では、mutants を除く大部分の菌が遺伝的に均一で同一遺伝子型を保有するものと考えられる。それにもかかわらず、同一 clone の中で INAH 耐性度に差があることは、この耐性度の変動が 彷徨変異によるものであることを示している。すなわち、遺伝子型の変化によるものではなく、表現型のみの変動によるものと考えられる。

結 論

(1) *Mycobacterium avium* の感性株にみられる INAH 感受性の変動は、INAH 感性遺伝子型の存在における表現型変動すなわち 彷徨変異に由来すると考えられる。

(2) 感性株にみられる INAH 感受性の変動は polygene に由来するものではない。

(3) INAH 耐性菌の single cell に由来する遺伝的に均一な population の中でも、個々の菌の耐性度変動が認められる。この変動は INAH 耐性遺伝子型の存在のもとにおける 彷徨変異によるものと考えられる。

(4) 以上の如く、細菌にも 彷徨変異の現象が存在する。

(5) INAH 感受性なる表現型の規定に INAH の存在と云う環境的要因が影響し得ることが考えられ、また遺伝子以外の要因により INAH 感受性と云う表現型

発現が影響され得ることが考えられる。但し、この影響は一時的のものであつて、環境が変れば消失する性質のものである。決して遺伝子を変更する如きものではない。

文 献

- 1) 東村道雄, 野田用, 安保孝: 結核菌の INAH 耐性の遺伝についての考察, 医学と生物学, 44: 180-183, 1957.
- 2) 東村道雄, 野田用, 山本昌邦: 結核菌の INAH 耐性の遺伝, 続報, 医学と生物学, 46: 49-52, 1958.
- 3) 東村道雄, 安保孝: Some genetic considerations on the isoniazid-resistance system of *Mycobacterium avium*, Amer. Rev. Tuberc., 77: 519-523, 1958.
- 4) 東村道雄, 野田用, 山本昌邦, 林光男: A genetic study on the isoniazid-resistance system of *Mycobacterium tuberculosis*. In press.
- 5) Cavalli, L. L., and Maccacaro, G. A.: Chloromycetin resistance in *E. coli*, a case of quantitative inheritance in bacteria, Nature, 166: 991-992, 1950.
- 6) Yudkin, J.: Origin of acquired drug resistance in bacteria, Nature, 171: 541-546, 1953.
- 7) 牛場大蔵, 渡辺力: 細菌のストレプトマイシン耐性の上昇及び下降の機序, 日本細菌学雑誌, 9, 349-353, 1954; 10: 231-237, 1955.
- 8) Hotchkiss, R. D.: Bacterial transformation, J. Cellular Comp. & Physiol., Suppl. 2, 1-22, 1955.
- 9) Hsu, Y.: Genetic recombination of streptomycin resistance in *Escherichia coli* strain K-12, Jap. J. Microbiol., 1: 407-413, 1957.

会 報

日本細菌学雑誌編集現況報告

昭和34年1月26日

編 集 幹 事

14 巻 1 号 12 月 10 日印刷所渡, 校正中。2 月上旬刊行予定

2 号 1 月 26 日印刷所渡。

3 号 以降の分として受付済の原著 71 篇。従つて今後御投稿の分は少くとも 8 号以降になりますから、御含み置下さい。

会員御逝去 謹んで弔意を表します

牧 角 大 殿

昭和33年12月31日

(化学及血清療法研究所員)