細菌の彷徨変異に関する研究, その4. 人型結核菌 H₃₇Rv 株の Streptomycin 感受性及び Streptomycin 耐性菌変異率

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

[受付: 11 月 9 日・1959 年]

細菌は、特殊な場合を除いて、無性生殖により増殖し、親細胞の性質は娘細胞に受け継がれると考えられている。細菌の変異に古典遺伝学の考えをそのまま適用すれば、遺伝子の変異を起した突然変異と、遺伝子の変異を伴わない彷徨変異とが存在すると考えられる。細菌の突然変異については既に多数の報告があり、かなり広い知識が得られるに到ったが、彷徨変異については、古典遺伝学の概念が常識的に適用されるにすぎず、十分な実験的根拠が欠けているように思われる。著者がこの研究を開始した目的はこのためであるが、高等動物では個々の個体の表現型を観察し得るのにたいして、細菌では個々の菌の表現型を観察することは不可能で、観察対象となるのは個々の菌に由来する菌集団の性状である。しかし、これは細菌における彷徨変異観察の理論が高等生物と全然異なることを意味するものではない。高等生物の個体も多数の細胞集団よりなり、吾々はこの細胞集団の示す表現型を観察するのが通常であるから、単一細胞に由来する高等生物の個体と、単個菌に由来する菌集団(clone)とは対応させてしかるべきものである。

遺伝学の通念に従えば¹⁾, one clone (単個菌に由来する菌集団)に属する個々の菌はその表現型(正確には、個々の菌に由来する集落の性質、例えば薬剤含有培地上の集落の大きさまたは発育速度など)に環境的要因に由来する彷徨変異があつても、遺伝子型は、突然変異を起さない限り、同一であると考えられる。少くとも、少数の菌を無作為にとれば、この中に突然変異菌が含まれる確率は極めて小さいから、これらの菌は同一遺伝子型をもつと考えられる。例えば、one clone に属する10個の菌から各々 subclone を作れば、この10個の subclone の SM 感受性の各 mode は相等しい筈である。吾々が細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究を行う際には、このような仮定に立つことが多いので、この仮説が正しいことを実験

しておく必要がある。本報はこの目的で行った。

実験方法

1) 菌株. 人型結核菌 H₃₇Rv 株を用い、単一集落分離とその subculture を3回繰返して原株を得た。更に被検原株が単個菌に由来することを確実にするために INAH 0.03 μg/ml 培地の単一集落をとつて原 clone とした。INAH 0.03 μg/ml 培地に発育可能な菌は、原株中に約1%の割合にしか見出されず、一方接種菌液は殆んど単個菌か数個の菌の Clumps からなつていたので、この集落が単個菌から由来していることは確実に考えられる。なお、原 Clone の INAH 耐性は small inocula 法(下記)で 0.02~0.03 μg/ml であつて、INAH 0.03 μg/ml にふれる前の原株の耐性と等しかった。

2) Clone の分離培養. 単個菌に由来する菌集団すなわち clone を分離培養するには、micromanipulator による方法が普通であるが、これに代つて確実に単個菌に由来する集落を得る方法として次の方法を用いた。原 clone の大量菌を INAH 0.1 μg/ml を含む1%小川培地に接種培養して4週後に INAH 耐性集落を得た(方法は文献2に記載した)。この INAH 耐性集落は原 clone 中に生菌数10⁷ 当り5個(4.88×10⁷)と云う稀な率でしか見出されず、しかも培地当り1~3個の耐性集落を得るような実験条件を用いたので、これらの耐性集落が単個 INAH 耐性菌に由来することは確実である。これらの耐性集落は原 clone 中の10個の単個菌に由来する subclones に当たる。これらの subclones は各々薬剤なし培

TSUKAMURA Michio: Studies on the fluctuation of phenotype in bacteria. IV. Streptomycin susceptibility and mutation frequency to streptomycin resistance of *M. tuberculosis* var. *hominis* (H₃₇Rv). —Jap. J. of Bact., 597-600, 1960.

地 5 本ずつに subculture して実験 (SM 感受性及び SM 耐性菌変異率測定) に用いた。

3) 培地. 中試験管 (17×18×170mm) に 8 ml²⁾ ずつ分注して 90°C 60 分滅菌した 1% 小川培地を用いた。SM は dihydrostreptomycin sulfate (明治) を用いた。SM の力価は添加量をそのまゝ表示した (C/2 換算を行わない)。

4) SM 感受性及び SM 耐性菌変異率測定法. 正確な SM 感受性検査を行うために必要なことは、接種生菌数 (菌量でなく) と判定期日を一定化することである³⁾。後者を行うことは容易であるが、前者を実施することは容易ではない。本報では次の方法を採用した。SM40, 20, 14, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0 μg/ml を含む培地を大量に作り、全実験を通じて同一 SM 濃度は同一 pool から分注した。従って SM 濃度の稀釈誤差 (各系列間) は除外される。この SM 系列に、各 clone からガラス玉振盪法で調整した種々の稀釈菌液の aliquot を渦巻白金耳で等量 (0.02ml) ずつ接種した²⁾。各 clone の菌液は 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ の 6 種類を用いた。37°C 4 週後に発育を観察し、薬剤なし培地で分離集落を生じる濃度の系列で発育可能な最高 SM 濃度 (small inocula が発育可能な最高濃度) を以て、その clone の SM 耐性度とした。接種生菌数を可及的揃えるために、各培地 50 生菌数の接種量に可及的近い系列をとって判定の基とした。SM 耐性菌変異率は、SM40 μg/ml 耐性菌

の出現率を指標とし、上述の実験で、10⁰ または 10⁻¹ 菌液接種で得た SM40 μg/ml 培地の集落数と接種された総生菌数の比から算定した。方法は文献 2 に記載した。

実験成績

1) SM 感受性. I N A H 耐性単個菌に由来する 10 clones の SM 感受性の実験成績は表 1 の通りで、これが更に表 2 に要約されている。被検 10 clones の SM 耐性度は、SM 6 μg/ml 3 clones, SM 8 μg/ml, 5 clones, SM 10 μg/ml, 2 clones であつて平均値は、約 8 μg/ml であつた。一般に行われる如く SM の滅菌後の力価を半分に換算すれば、SM 3~5 μg/ml, 平均 4 μg/ml となる。なお、表 2 に各 clone の I N A H 耐性度を同じく small inocula 法で測定して示した。

2) SM 耐性菌変異率. 各 clone の SM40 μg/ml 耐性菌出現率は表 2 の通りで、最小は clone IX の 0.380×10⁻⁶, 最大は clone VI の 16.7×10⁻⁶, 平均値は (5.99±5.88) ×10⁻⁶ であつた。

Table 2. Mutation frequencies to streptomycin resistance in ten isoniazid-resistant clones derived from *M. tuberculosis* var. *hominis*, strain H₃₇Rv.

Clone	Ratio of mutants resistant to 40 μg/ml. of streptomycin per 10 ⁶ viable cells	Highest concentration of streptomycin, on which small inocula can grow	Highest concentration of isoniazid, on which small inocula can grow
I	1.01	8 μg/ml.	0.1 μg/ml.
II	0.950	6	0.1
III	1.60	6	0.1
IV	2.47	8	0.1
V	5.88	8	0.1
VI	16.7	8	1
VII	6.20	8	0.1
VIII	14.1	10	0.1
IX	0.380	6	0.05
X	10.6	10	0.05

The clones tested were isolated by first-step selection of the parent H₃₇Rv strain with 0.1 μg/ml. of isoniazid. Clones IX and X were obtained as small colonies on medium containing 0.1 μg/ml. of isoniazid by the selection.

考 察

1) SM 感受性. 本実験の各 clone は I N A H 耐性菌

Table 1. Streptomycin susceptibilities of ten isoniazid-resistant clones derived from *M. tuberculosis* var. *hominis*, strain H₃₇Rv.

SM Conc. (μg/ml)	I Clone	II Clone	III Clone	IV Clone	V Clone	VI Clone	VII Clone	VIII Clone	IX Clone	X Clone
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	2*	—	1*
8	2*	—	—	5*	13	1*	2*	14*	—	15*
6	2*	6*	7*	10*	22	2*	31*	20*	12*	c
4	10*	29	20	25	30	9	28	13*	24	94
2	42	43	43	24	48	18	47	40	56	71
1	63	38	46	23	37	55	64	c	60	64
0	69	46	47	39	39	33	82	37	126	76

* Small or minute colonies. c: Contamination. Numbers in table indicate numbers of colonies on media inoculated by the same size of inoculum and calculated after 4 weeks of incubation.

に由来するが, I NAH耐性とSM耐性とは無関係と一応考えられる。M. avium 及び人型結核菌で測定された結果では, 感性菌とI NAH耐性菌とでSM耐性菌変異率が等しいことが知られ^{4,5)}, また本報の表2にも示す如く, clonesのSM感受性とI NAH耐性度とは関係がない。問題は, 本報の10 clonesのSM感受性が6~10 $\mu\text{g/ml}$ の間を変動していることである。この原因として次の可能性が考えられる。(a) 被検10 clonesの起原菌が遺伝子型を異にする場合, (b) 被検10 clonesの起原菌が遺伝子型は等しいが, 測定に際しての環境的変動によつて測定値の変動が生じた場合である。第一の可能性は次の理由から考え難い。起原菌は何れも原cloneのmembersであるから, 無作為にとつた10個の菌が遺伝子型を異にすれば, 非常に頻繁に突然変異が起つたことになるが, これは考え難いことである。第2の可能性は次の理由から存在し得るように思われる。実験結果は, modal resistance とでも云うべき, cloneのSM感受性が近似でありうることを示し, みられる僅かの変動は測定誤差によるとも考えられるからである。本実験では, 試験管の系列を10本1組として木枠に入れて, 計600本をフラン器に入れたのであるが, フラン器内の位置により多少の温度の変動があり, このため菌の発育速度が若干異なることがあり得るのでないかと思われる。耐性度乃至感受性判定が発育速度の影響を受けることの少ないI NAH³⁾を用いた場合には, 薬剤にふれない単個集落に由来する7 clonesのI NAH感受性は, I NAH 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0 $\mu\text{g/ml}$ の系列でI NAH 0.02~0.03 $\mu\text{g/ml}$ となつて殆んど等しい成績が得られた(別報)。この成績は, 本実験のSM感受性の僅少の差が環境的要因による発育速度の差に由来することを強く暗示する如く思われる。

勝山⁶⁾はmicromanipulatorでH₃₇Rv株から単個菌を分離培養して15集落を得, そのSM感受性を小川培地で測定している。micromanipulatorで薬剤にふれぬ単個菌を釣菌した点は吾々の実験よりすぐれているが, SM感受性測定にかなり変動の多い接種生菌数を用いたことには若干難点がある。結局, 勝山は, H₃₇Rv株がSM感受性が一様でない細菌細胞の集合であると結論しているがこの結論が遺伝子型を異にする細菌細胞の集団と云う意味か, 遺伝子型が同一で表現型を異にする菌の集合と云う意味かは判然としない。文面よりすれば, 前者ともとれるが, もしそうなれば, 接種生菌数の影響(比較的大きい接種生菌数では環境的要因の誤差が大きいため全実験をsmall inoculaとすることが望ましい), 温度差の

影響などの測定誤差の問題も更に今一步検討することが望ましく思われる。また, “単個菌から出発した集落はその遺伝的性質が親株より更に純化された”と云う結論にも実験の裏づけが望ましい。このためには, 単個菌から由来したcloneから更に単個菌分離を行つてsubclonesを得て, これらsubclones間の感受性変動と, 親株(H₃₇Rv)から得た15 clonesの間の感受性変動(勝山論文の表3)とを比較して, 前者の変動が後者より小さいことを証明する必要があると思われる。これらは細菌遺伝学の基礎的問題であるので, 向後の検討を期待する次第である。

2) SM耐性菌出現率. 表2に示した成績は, a large populationまで増殖させた各cloneにおけるSM40 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌数対総生菌数の比であつて, 実はSM耐性菌出現率と云うべきものである。この率は生菌数10⁶当り0.38~16.7と云うかなり大きい変動を示した。しかし耐性菌出現率の測定には分布誤差と稀釈誤差を含み, これが結核菌ではかなり大きいので²⁾, 積極的に有意の差と結論することはできないと思われる。

吾々は, one cloneに属する個々の菌の大部分は彷徨変異を示しても遺伝子型的には均一であると云うことを前提として細胞遺伝学に関する実験を行うことが多い。また遺伝子型の等しい菌に由来するclonesは互にcloneの耐性度(mode of resistance)が等しいと云う仮説を用いることも多い。本報の実験で, subclonesのSM感受性が近似であつたことは, これらの仮説の成立を支持するものである如く思われた。

結 論

人型結核菌H₃₇Rv株のparent cloneからI NAH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ でのfirst-step selectionで得た10系のsubclones(cloneは単個菌に由来する菌集団)について, 各cloneのSM感受性を測定したが, small inoculaが発育し得る最高濃度で示されたSM感受性は互に近似であつた。また各cloneにおけるSM耐性菌数対総生菌数の比率も測定誤差以上の変動であるとは思われなかつた。従つて, one clone内の大多数の菌は同一遺伝子型を有し相似の耐性度を示すclonesを作ると云う仮説の成立を支持する結果が得られた。

文 献

- 1) 田中義磨: 遺伝学, 裳華房, 東京, 1955, (p. 471-630).
- 2) 東村道雄, 野田用, 中村栄一: 結核, 32: 639-

642, 1957 : 33 : 43-46, 1958.

- 3) 東村道雄 : 結核, 33 : 815-819, 1958 : 一河西榮文, Chemotherapy, 4 : 227-231, 232-235, 1956.
4) 東村道雄, 三浦幸二, 橋本 正 : J. Antibiotics,

A, 9 : 19-21, 1956.

- 5) 東村道雄, 三浦幸二, 野田用 : J. Antibiotics, A, 9 : 182-185, 1956.
6) 勝山 茂 : 日本細菌学雑誌, 14 : 296-301, 1959.