

SM 耐性鳥型結核菌より抽出せる特異的 Desoxyribonucleic acid による Streptomycin 耐性化機構の研究

国立療養所大府荘(荘長 勝沼六郎)
名古屋大学医学部生化学(教授 堀田一夫)

勝沼信彦・中里博昭

(昭和 28 年 8 月 17 日受付)

緒 論

概念の沿革としては、Avery¹⁾ 及び Boivin²⁾ に始まる R→S 型変異を有型 Desoxyribonucleic acid (DNA) で誘導した実験に、その源を発している。

耐性菌より抽出した DNA 分画と共に培養する時、感受性菌を耐性化できることは、1952年³⁾ 発表以来実験を続けてきたが、この度次の諸要点に関し一応の結果を得た。すなわち

1) 遺伝学的に見て、DNA による耐性化は如何なる様式で行われるか？

2) 生化学的に見て、DNA による Gene の改変(SM に耐性を示す菌への変化の意)には如何なる作用条件を必要とするか、この問題は直接 DNA の Transformation 及び Biosynthesis の問題に連なるので、この現象を指針として、この未知の分野に多少とも暗示を与える結果は得られないだろうか？

3) SM 中継代培養による耐性上昇において、DNA による耐性化現象は如何なる役割を演じているであろうか？

この種の有型核酸と薬剤の耐性に関する研究は極めて最近に始まり、歴史らしきものではなく、又研究者も少ない。耐性化に関しては Hotchkiss⁴⁾ が 1951 年、Pneumococci 対 Penicillin で成功したのに始まり、E. Alexander⁵⁾ が 1952 年、Haemophilus influenzae 対 Streptomycin (SM) で、又勝沼信彦・中里博昭は 1952³⁾ 及び 1953⁶⁾ 年、又磯江・杉山が同年全く独立に結核菌対 SM で報告したのがこれに次ぐ。少しく意味は異なるが、皆川⁸⁾ が 1952 年銅抵抗性を RNA で得ることを報じている。

耐性復帰に関しては 1948 年 Vourek⁹⁾ に始まり、Winner¹⁰⁾、George & Pandolai¹¹⁾、秋葉・石井・田村¹²⁾ により研究せられた。

これ等現象の発見初期の論文には、DNA の耐性化機構に関し未だ解析の実験が行われておらず、特に我々が研究方向として指向してきた DNA による耐性化の生化学的機構への試みは、全文献を見ず、詳細に関しては未だ不明の点も多く、なお今後の研究に俟たねばならぬが、一応今日迄の結果をまとめ此処に報告する。

材 料

感受性菌：鳥型結核菌(獣調株)の中、特に Smooth なコロニーを作る SM 感受性高き菌を分離して使用、この菌の自然耐性菌出現率は最大限の範囲で SM 0.25 γ /cc 中 0~5% である。Survival test により我々の行った中、最大なものとし最小のものを示せば第 1 表の通り。

第 1 表 感受性菌よりの自然耐性菌出現率

SM 濃度 (γ /cc)	0	0.125	0.25	0.35	0.5	1	
出現率 (%)	最大	100	14.6	3.2	0	0	0
	最小	100	0.7	0	0	0	0

Sauton 液体培地で菌膜形成で検定すると、稀に 0.25 γ /cc は(±)になる程度で、普通は 0.1 γ /cc が境界である。

核酸抽出用耐性菌：上記同一菌株を SM 中に継代分離した 64mg/cc 以上の耐性菌。

培地：すべて Sauton 無蛋白培地を使用。

DNA の抽出法： mild な条件下で抽出した高重合 DNA に活性があるので、純度よりも生物学的活性に重点を置き Chargaff 法を基礎として考え次の変法を決定した。

Sauton 培地で 7 日培養菌を 0.01mol Citrate-Na で洗滌、水冷 Ether-Aceton で脱脂、Aceton 処理により Dry-powder を作る。少量の 0.01 mol Citrate-Na 添加 Borate buffer (PH 7.5)を加え、Dryice-Aceton で凍結しつつ、4 倍重量の硝子粉と磨砕約 1 時間、7~8 倍重量の buffer で 0°C 24 時間抽出後、前に一度軽く遠心沈澱で硝子粉を除き、次に 12,000 回転で透明な上清を得る。これを蒸留水に 24 時間透析、PH 6.5 にする。沈澱は再抽出する。PH 6.5 に正確にして硫酸半飽和、上清を蒸留水に 1 日、0.9% 食塩水に 1 日透析し、PH 7.5 に直し、0.5% 溶液になる如く Desoxychorate-Na 添加強振、0°C 2 日間放置後 Sevag 法で除蛋白、3~4 倍容のアルコールで沈澱させ、これを少量の 0.9% NaCl に溶解遠心沈澱し、核蛋白を除去、上清に 2 倍容のアルコールを添加し、生ずる絹糸状沈澱をガラス棒で巻き取る。これにより低分子 DNA、及び RNA をかなり除き得る。Sevag 法以下を繰返せば精製できる。

抽出 DNA の性状：高重合糸状で、ガラス棒で巻き取り得。水溶液は極めて粘度が高い、精製により純度は高くなる (DNA-P 4.8% にしたものあり。これは耐性化能も極めて強く 5% まで上昇能力を有した)。然し以下の多くの生物実験に使用したものは未精製で、DNA-P は 1.26% (Diphenylamin 反応による)、RNA-P は 0.13% (Orthin-HCl 反応による)、吸収スペクトル (Beckmann Spectrophotometer 使用) は典型的な核酸のスペクトルを示し、最大は 258 μ 、最小は 235 μ である。この核酸は DNA-20 番の核酸の性状である。

実験法

DNA の作用法として、次の 2 方法を決定した。培養法と Resting cell method (分裂していない状態で DNA と接触) である。定性的な予備実験及び本報告以前に報告した論文の実験には前者を使用してきたが、この論文の結果、すなわち定量的な実験、薬物による影響を見る場合等すべて後者を使用した Data である。

1 Restig cell Method

Resting cell の調製：基礎実験よりできるだけエネルギーを多く保持している菌がよく、然し分裂しては困るので厳密ではないが、次の方法によつた。盛んに発育する 48 時間培養菌を 0°C に冷却しつつ完全に Isotonic phosphate buffer で洗滌 5 回、0°C に 24 時間放置後更に 1 回洗つた菌を使用する。

感作用 DNA 溶液調製：DNA を 100% 割に PH 7.4 の Phosphate buffer に溶解、Seiz 氏細菌濾過器を通す。各種薬物の影響を見る実験では、この DNA-Buffer 溶液に目的の薬物を同時に添加溶解したものを使用する。

感作法：上記 DNA 溶液に Resting cell を McFarland No.1 の標準比濁度に光電比濁計で浮游したものを同一容ずつ入れる (DNA 濃度と菌量の関係は非常に大きな影響を持つので、できる限り一連の実験は全部同時に行つた)。37°C に 20 時間感作後、Buffer で完全に DNA を洗滌除去する。感作前後で生菌数に有意の差は認められぬので、増殖も死滅もしていない。すなわちこの間に DNA による Selection は起つていない。

培養：上記感作菌を普通 Sauton 液体培地中に 20 時間培養する。後章の実験で DNA と共に諸種薬物を使用するのであるが、培養時 SM、2.4 Dinitrophenol (DNP) が共存すると Lag phase が非常に変化したが、上記の如く洗滌した菌では、発育曲線に全然変化を与えないので感作時共存させたこれ等薬物の影響は、この後の培養に何等の影響を及ぼしていないといふことができる。

耐性菌含有率測定法：この菌を単個菌になる迄ガラス球入り茄子型コルバンで磨砕後、2,000 回転 1 分間程軽く遠心し上層を取ると、ほぼ単個菌に分離している。単

個菌になると、平板培地に散布した時均一なコロニーを作り、而も測定可能なコロニーになるのに 4~5 日間を要する。この菌を一定度に稀釈し SM を 0.25% と 0% 含有 Sauton agar 平板培地 3 枚に散布 4~5 日培養でコロニー数を計算し、3 枚の平均を取る。

$$\text{耐性菌出現率} = \frac{\text{SM 含有平板中のコロニー数}}{\text{SM 無含有平板中のコロニー数}} \times 100$$

この方法で 0% の培地に 300~500 程散布できた時が理想的である。すなわち感受性菌 100 匹に対し耐性菌が何匹出現したかを表現する。抽出物は抽出度毎に耐性化能の力価が異なるので、耐性菌より抽出 DNA (DNAR と略) 100% 溶液による上記出現率を DNAR-31, DNAR-20 の如く数字を附してその DNAR の力価を記す。すなわち、DNAR-20 は 100% 溶液で感作した時、20% の耐性菌を出現させる能力を有する DNA の意である。

2. 培養法

DNAR を Sauton 液体培地に溶し増殖中感作。

実験結果

1. DNAR の耐性化能

抽出の度毎に変化するが、同一抽出物に就いては同一条件で感作すれば一定した耐性化能を示し、DNAR-31 で 2 度の実験で、30.9%、及び 31.5% 程度の動きしか示さない。

乾燥 0°C 保存によれば、10~15 日は力価に変化を示さなかつた。

1) 加熱の影響：DNAR-31 を 100°C 15 分間加熱すると、0% となり全然失活する。

2) DNA の特異性：DNA_S (感受性菌より抽出 DNA) には全然耐性化能無し。DNA には特異性あり。

3) DNase 処理による影響：DNAR-20 に Kunitz 氏条件で DNase を作用後 Sevag 法で酵素を除去し使用すると活性は全然なくなる。故にこの活性成分は DNA なるを知る。本 DNase は牧野堅先生の御厚意により Kunitz 教授抽出の結晶 DNase を御分与下さつたものを使用した。本 DNase には RNase は全然混在していない。

4) DNAR 量と耐性化能の関係：第 2 表に示す。

第 2 表 DNAR 量と耐性化能の関係
(DNAR-34 を使用)

DNAR の濃度 (%cc)	0	10	100	1,000
出現率 (%)	1.5	18.3	34.0	46.0

上表の如く同一菌量に対して、感作 DNA の量が多い程耐性菌出現率は多くなる。

5) SM 耐性度変化：DNAR-20 を用い 1 回感作で、どの程度耐性が上昇するか、又同一 SM 濃度における

出現率の上昇と、耐性度の上昇との関係を見ると第3表の如くなる。

第3表

SM 濃度 (γ/cc)	0.25	0.5	1.0
DNAR-20 (%)	20.2	6.4	0.8
DNAR-20 + ATP (%)	43.1	10.3	6.2
DNAR 無し (%)	3.2	0	0

液体培地にて菌膜形成で検定したものを第4表に示す。

第4表

SM 濃度 (γ/cc)	10	5	1	0.75	0.5	0.35	0.25	0.1	0.5
感受性菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DNAR-20	-	-	+	+	+	+	+	+	+

この程度の純度の DNAR では、1回感作では1γ/cc程度で、この間の各 SM 濃度での出現率を高めるといふ様式で耐性化する。勿論 DNAR の純度を高め、作用濃度を高めるか、又感作回数を重ねれば、更に高まる。感作回数を重ね我々は 20γ/cc 耐性菌を得ている(既報)。

6) 菌株による差: Raugh 型の菌株は核酸による耐性化は起し難い。

2. 耐性化の遺伝学的様式

この変化が Adaptation であるか、Selection であるか、遺伝子の変化によるものであろうかを明らかにせんとするもので、核酸による Selection でないことは、DNAR と接触中に生菌数の変化なきことより明らかにした。此処で Gene なる言葉の意味を、我々の場合に関し定義しておく必要を認める。従来 Gene といえば、核内染色体上のものをいうが、T.M. Sonneborn¹⁵⁾ 等は Plasmagene の存在を明らかにしている現状である。結核菌では核、細胞質の区別、又染色体も明らかにされていないので、ただ、遺伝形質を担つたものを総称して Gene と呼ぶことにする。

実験: Resting cell method で DNAR-31 と感作後 Buffer で洗つた菌を、そのまま培養せずに耐性度を測定すると、5.6%、この菌を 24 時間培養して耐性度を測定すると、31.5% に上昇している。

すなわち Resting cell 状態で感作したままの菌では、未だ耐性化していない(この実験で多少の増加があるが、これは Resting cell 製法の不備によるのであろう)。この事実及び感作耐性菌が遺伝的である点より推して、Adaptation ではないであろう。又 DNAR との接触中は分裂していなくても感作できるのだから DNAR による耐性菌のみの Selection でないことは明らかで

ある。DNAR で感作するには Resting cell state で充分であるが、それが耐性菌としての性状を呈するためには一度培養する必要があることは、耐性を具備せる菌は次代以下からしかでぬにしても、又その菌自身が耐性という一つの性質を具えるのに一度正常代謝を行なう必要があるにしても、この何れかは未だ不明なるも、兎角 genofactor を得る段階と phenofactor を得る段階とが必ずしも同一(同時)ではないということを推察し得る。

この方法で得た耐性菌は遺伝的で、継代培養(普通培地)するも耐性の低下を見ていない(液体培地を使用し、菌膜形成により 12 代まで検定)。以上のことより Gene S → DNAR GeneR なる機構によることを知り得る。

3. 生化学的に見た感作条件の影響

DNAR で感作時、この章に記す各種薬物共存による耐性菌出現率へ及ぼす影響を見ることにより、この Gene の改造は如何なる作用条件の下に行われるかを通じ、その機構を多少推察しうる結果を得た。

1) ATP+DNAR-31	65.8%
ATP+DNAR-20	43.1%
Na ₂ HAsO ₄ +DNAR-31	0.85%
ATP	0.6%

ATP 濃度は 100γ/cc、Na₂HAsO₄ は 5×10⁻³mol、ATP は明らかに DNAR による耐性菌出現率を増加する。Na₂HAsO₄ の抑制及び前記の如く後培養にはこれ等薬物の影響はほとんど及んでいないので、感作に ATP の高エネルギー-磷酸結合のエネルギーが利用されると考えられる。

2) 感作温度の影響として、0°C で DNAR と感作、氷冷 buffer で洗滌した場合、後培養するも耐性化は全然起らない。感作には一度以上の温度条件を必要とする。

3) RNA(yeast)+DNAR-20	4.3%
Uracil+DNAR-20	15.2%

RNA は 100γ/cc、Uracil は 50γ/cc の作用濃度 RNA 及び RNA のみの構成成分で抑制される。

細胞質内での蛋白合成に関係ある RNA で抑制することは興味ある結果である。

4) CH ₂ (CN) ₂ +DNAR-20	3.8%
CH ₂ (CN) ₂ +DNAR-31	2.2%
Sulfathiazol+DNAR-31	0.1%

CH₂(CN)₂ の濃度は 6.6×10⁻³mol、Sulfathiazol は 10γ/cc である。核酸代謝阻害剤で DNAR の作用は消失し、後培養における自然耐性菌出現率まで低下する。

5) Citrate Na+DNAR-20	52%
-----------------------	-----

Citrate Na の濃度は 0.05mol、TCA Cycle の一員であり、又 DNase 阻害作用を有するこの薬剤により増加する。Citrate Na 自身にはない。

6) SM+DNAR-20	46.6%
SM 濃度は 0.17/cc	
SM+DNAR-31	41.4%

SM 濃度は 0.057/cc であり、共に Sublethal で Resting cell で作用する時生菌数に変化をきたさぬ。SM 共存の場合のみは、buffer に 0.9% になる如く NaCl を添加して使用すると DNA と SM の沈澱は起らない。これに関し Euler Heller¹⁵⁾ の研究あり。

DNAR による耐性化反応を SM が増加することは、SM 中継代培養による耐性上昇機作推察の上に重要な示唆を与える。又細胞質内での蛋白（適応酵素）合成抑制作用を有する SM で促進されることは、RNA にて抑制を受ける結果と相俟つて、又重要な意味を持つものと思われる。

総括及び考按

DNAR による耐性化は、SM の各濃度範囲に涉つて、耐性菌の出現率を増加するという方式で起り、しかも遺伝的変異を起させるものである。生化学的意義を有する薬剤による影響に関しては、その意味付けをするには、各薬剤に就いて、更に深い追求に俟たねば確言し得ないので、現象的結果の記述に止めた。

次に SM 中継代培養による耐性上昇において、DNAR による耐性化現象は、どの程度の役割を演じているか、の問題に関しては推察に止まるのであるが、Sulfathiazol は後者を著明に阻害することを知つたが、当大府君野野医学士はこれが前者を著明に抑制することを実験、報告¹⁶⁾ している。この間の関係を明らかにせんとして行いつつある別の我々の実験でも、この両者が相伴っていることを見ている。故に SM による耐性上昇には、核酸による耐性上昇現象が、かなり大きな役割を演じており、しかも SM 自身が DNAR による耐性化作用を増幅する効果を有することも相助け合つて、SM が独特な耐性上昇され易い薬物である性質を作っている理由の一つと考える。

故に DNAR による耐性化を抑制するという注意は、今後耐性上昇防止研究の上に、有力な一方向性を与えるものであると信ずる。

終りに臨み堀田一夫教授、勝沼六郎荘長、渡辺三郎教授の御指導の賜物であることは申すまでもなく、貴重な DNase 御分与下さつた牧野堅教授に深謝致します。終始直接御教示下さつた山村雄一先生又有益な御助言賜つた敬友杉野幸夫君、及び君野徹三、田中伸一、米田正彦の諸先生に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Avery, MacLeod and McCarty: J. exp. Med. 79 1944.
- 2) A. Boivin: Cold. Spr. Har. Symp. 1947.
- 3) 勝沼信彦・中里博昭: 第4回日本結核病学会東海地方会演説, 1952.
- 4) Hotohkiss: Cold. Spr. Har. Symp. 1951.
- 5) E. Alexander: J. exp. Med. 1952.
- 6) 勝沼六郎・勝沼信彦・中里博昭: 第28回日本結核病学会総会演説, 1953.
- 7) 磯江・杉山: 第4回日本結核病学会東海地方会演説, 1952; 第28回日本結核病学会総会演説, 1953.
- 8) 皆川: 第5回細胞化学シンポジウム, 1952.
- 9) Voureka: Lancet 1; 63, 1948.
- 10) Winner: Lancet 1; 674, 1948.
- 11) George & Pandalai: Lancet 1; 955, 1949.
- 12) 秋葉・石井・田村: 医学と生物学, 24, 1952.
- 13) Chargaff: J.B.C 177, 1949.
- 14) T.M. Sonneborn: Proc. Natl. Acad. Sci. 34, 1948.
- 15) Euler & Heller: Auk. Kemi. Men. Geol. 26A, 1948.
- 16) 君野徹三: 第4回日本結核病学会東海地方会演説, 1952.
- 17) Kunitz: J. Gen. Physiol. 33. 84, 1903.