

# ストレプトマイシン耐性菌出現に関する 遺伝生化学的研究

名古屋大学医学部内科第一講座（主任 日比野進教授）

杉山 正雄・田中 伸一

（昭和 29 年 7 月 16 日受付）

## 第 1 章 緒 言

結核菌の Streptomycin（以下 SM と略記）耐性菌の発現に関しては、従来臨床的にも、又試験管内においても、種々の方面より多数研究されている問題であるが、私はこの問題を細菌の遺伝学的な見地より生化学的な方法による検索を行つた。すなわちその概念として、近年二、三の生化学者等<sup>1)2)</sup>により、染色体が核蛋白を主要成分としていることが明らかにされ、機能の面より、概念的にその存在が主張されてきた遺伝子なるものを、物質的な面より究明せんと企てられている。そして遺伝子の存在するところには常に Desoxyribonucleate(DNA)の存在が確認された。この線に沿う遺伝学の著しい進展、特に遺伝子と核酸との関係が明らかにされるに伴い、細菌の遺伝現象、殊に細菌の核酸による菌型転換現象、薬剤耐性の獲得及び復帰に関する一連の現象に関しても、この観点より追求されてきた。

たまたま 1944 年 Avery, McLeod & McCarty<sup>3)</sup>等により酵素の支配する遺伝的 Factor の存在が確認された。これは肺炎球菌の多糖類被膜の形成を支配する因子に関係するもので、肺炎球菌は血清学的に多数の Type に分類されているが、この型特異性は菌体被膜の多糖類の化学構造と関連するものである。すなわち、第Ⅲ型肺炎球菌の抽出物を第Ⅱ型肺炎球菌と培地中に共存させることにより、そのⅡ型肺炎球菌がⅢ型になることを発見した。このⅡ型→Ⅲ型への転換を起すⅢ型菌体内の有効物質は DNA であつて、この DNA がⅢ型肺炎球菌の遺伝的性格をⅡ型菌の移譲したものと思惟し、この遺伝的な Trait を移譲する能力を有する物質を "Transforming substance" と名付けた。この細菌の定向性変異の現象が Bovin<sup>4)</sup>により、大腸菌において、Weil<sup>5)</sup>により赤痢菌において、Alexander<sup>6)</sup>により "Hemophilus influenzae" において知られた。

細菌の核酸と薬剤耐性に関する問題に関しては、極く最近にはじまり、Wyss<sup>7)</sup>は Sulfonamide 剤耐性大腸菌の核蛋白分割が感性株を耐性化すると報告し、Hotchkiss<sup>8)</sup>は Penicillin 耐性肺炎双球菌の DNA が感性株を耐性化するという事実を詳細に報告している。Roland & Stuart<sup>9)</sup>は SM 耐性 *S. wichita* 及び *E. coli*

の培養濾液、Autolysate、核酸分割を以つて SM 感性 *S. Typhi* を耐性化することを得たと報告し、Ephrussi-Taylor<sup>10)</sup>は肺炎球菌で SM 及び Penicillin の薬剤耐性問題をこの観点より取扱つている。

結核菌の SM 耐性問題に関しては、本邦においては、勝沼等<sup>11)12)13)</sup>は私<sup>14)15)</sup>とはほぼ時を同じくして、独立に鳥型結核菌を使用して、SM 耐性問題を取りあげ観察している。又耐性復帰の問題には、Vourekal<sup>16)</sup>、Beadle<sup>17)</sup>、Horowitz<sup>18)</sup>等、秋葉、石井、及び田村等<sup>19)</sup>が触れたことは特筆すべきであろう。

私はこのような McCarty, Avery 及び Bovin 等のいわゆる Transforming principle は最近問題の中核となりつつある、Gene の行動を研究を聊かでも推進させる、一応好適なる材料であると考え、鳥型結核菌の SM 耐性問題について若干研究を試みたのである。すなわち私は、Transforming principle について、この Transforming と目すべき現象が菌体内の如何なる条件を背景として起るか、如何なる代謝過程と共転しているか、又 Transforming substance の物質的把握及びその生物学的特異性の限界、又 Transforming substance で変異せしめ得たと考えられる菌の同定等の諸項について一応今日迄の結果をまとめここに報告する。

## 第 2 章 SM 耐性菌より抽出せる核酸による、SM 感性菌の SM 耐性化

### 第 1 節 実験材料

#### 1) SM 感受性菌

未だ SM に接触したことのない、鳥型結核菌竹尾株及び獣調株の SM 0.5γ/ml にて発育阻止されるもの。

#### 2) 核酸抽出用 SM 耐性菌

上記 SM 感性鳥型結核菌竹尾株及び獣調株を SM 含有 Sauton 培地に継代培養することにより、SM 1,000 γ/ml 以上の耐性菌を試験管内で調製し、然る後 SM を含有しない培地に数代継代培養し、使用前 SM 1,000 γ/ml 以上に耐性であることを確認した後使用に供した。

#### 3) SM 耐性鳥型結核菌より核酸の抽出

##### A) 核酸抽出条件の検討

遺伝原性の如き、微妙な生物学的性格を宿した核酸を、一応純粋に抽出することは、かなり至難事である。すな

わち核酸の Depolymerase 作用を抑えておくこと、pH、温度等の諸条件に留意して、核酸の不慮の破壊を防止すること等は当然必要な事項である<sup>20)21)</sup>。しかしこの場合、一般材料と若干趣を異にすることは、菌体から核酸を溶離させる第一段階の吟味である。結核菌が脂質に被覆されていて、Detergent<sup>20)</sup> 類に抵抗が強いため、上述の如く、高重合の核酸を可及的温和な条件で、且つ好収量で分離するには、高等動物組織や一般微生物を材料とする時には不必要な配慮も払わなければならない。よつてこの目的のためにまず鳥型結核菌を Sauton 培地に培養したものの培養3日目位の対数期に入りかけた、核酸量の最も豊富な時期を見計らつて集菌し、次いで蒸留水で数回洗菌を繰返し培地成分を除去する。これを Potter Elvehjem 型<sup>22)</sup> Homogenizer で水で均等化、ついで遠心集菌する。かかる方法で得た菌塊を -10°C アルコール中に約 30 分間投入し、ついで氷冷エーテルアルコール (1:1) 中で 24 時間脱脂した後遠沈して菌体のエーテルアルコールパウダーを調製する。この菌体より従来賞用されている数種の Detergent を用いて次に示す各項の条件で抽出し得る核酸の量を Schneider<sup>23)</sup> の方法及び Schmidt et Thannhauser<sup>24)</sup> の方法と比較検討した。すなわち、

① 乾燥菌 1g を氷冷下で、硝子粉約 5~10g とともに 0.5% の割合に Sod. desoxycholate を添加せる Borate Buffer (pH 7.8) で湿しつつ約 1 時間磨砕を行い、全量 30ml の Borate Buffer で 0°C, 48 時間抽出を行つた場合。

② ①の場合に用いた Sod. desoxycholate の代りに同じ割合で Sod. cholate を用い、同様の操作を行つた場合。

③ 1g の乾燥菌を①の場合と同様の方法で、この場合は変性剤を使用せずして、Borate Buffer のみで抽出を行つた場合。

④ 1g の乾燥菌を 37°C において 48 時間飽和尿素液 20ml で変性後①の場合と同様に硝子粉と共に菌体を磨砕し、Borate Buffer で抽出を行つた場合。

⑤ 1g の乾燥菌を 5% グアニジン 20ml にて 0°C, 48 時間変性後①の場合と同様に菌体を磨砕し Borate Buffer で抽出を行つた場合。

⑥ 1g の乾燥菌を Soxhlet 装置にてエーテルにて処理後、①の場合と同様に菌体を磨砕し Borate Buffer で抽出した場合。

以上の各項の条件について核酸の抽出を行つた場合の、抽出し得る核酸の量を比較した成績は第 1 表及び第 2 表に示す通りである。検討して得た成績はいずれの場合についても核酸の溶離には、精力的な機械的磨砕は絶対不可欠であるが、この際核酸には無影響な Detergent を添加することが有利であつて、尿素、グアニジン等の蛋

第 1 表 Schmidt &amp; Thannhauser 法

抽出条件	DNA-濃		RNA-濃	
	抽出量 (mg)	抽出率 (%)	抽出量 (mg)	抽出率 (%)
デオキシコール酸ソーダ	1.469	21.1	8.867	46.6
コール酸ソーダ	0.917	13.1	8.442	44.5
エーテル抽出	0.295	4.2	4.306	22.7
硼酸緩衝液のみ	0.599	8.6	7.910	41.6
尿素変性	0.279	4.0	1.932	10.2
グアニジン変性	0.252	3.6	1.864	9.8
菌体 1g 中核酸量	6.972		19.011	

第 2 表 Schneider 法

抽出条件	DNA (デアミネー ルアミン反応)		RNA (オルシン塩 酸反応)	
	抽出量 (mg)	抽出率 (%)	抽出量 (mg)	抽出率 (%)
デオキシコール酸ソーダ	6.226	46.0	143.598	60.3
コール酸ソーダ	4.573	33.8	113.076	47.5
エーテル抽出	3.030	22.4	57.222	24.0
硼酸緩衝液のみ	3.575	26.4	72.774	30.6
尿素変性	0.743	5.5	24.012	10.1
グアニジン変性	1.269	9.4	18.450	7.8
菌体 1g 中核酸量	13.530		238.020	

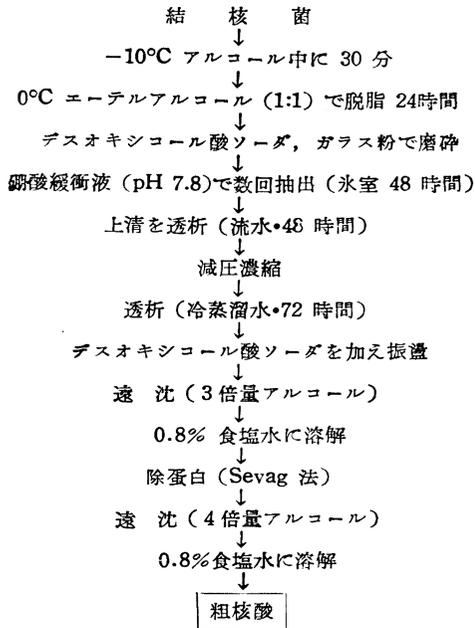
白変性剤は意味が少ない。すなわち Sod. desoxycholate、及び Sod. Cholate 殊に前者の共存は核酸の溶離に極めて好都合な条件を与えることを知つた。従つて私は核酸の抽出に際しては、Sod. desoxycholate を用いることにした。

#### B) 核酸抽出法

上記の核酸抽出条件の検討並びに Chargaff<sup>21)</sup> の方法を基礎として、私は第 3 表に示すような方法により、S M 耐性鳥型結核菌竹尾株及び獣調株より核酸の抽出を行つた。

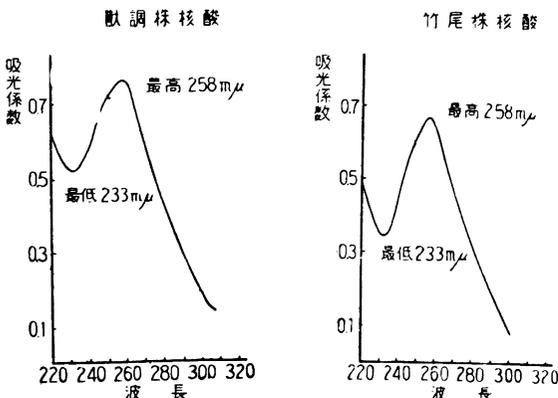
すなわち、上述の方法で調製した菌体のアルコールエーテルパウダーを、約 4 倍量の硝子粉と共に 0.01 M Citrate 添加硼酸緩衝液 (pH 7.8) に 5% の割合に Sod. desoxycholate を加えたもので湿しつつ乳鉢で氷冷しながら約 2 時間菌体の磨砕を行う。ついで菌乾燥重量 25g に対し 500ml の硼酸緩衝液と共に冷室において振盪しながら 48 時間抽出を行つた後、遠沈して上清を取り且つ濾過する。沈渣は更に乳鉢で磨砕を行い、Buffer で再抽出を 2~3 回反覆した後同様上清を濾過して先の上清と一緒にする。この抽出液を流水に対して 48 時間透析を行い、1/10 容量迄減圧濃縮後、氷室にて蒸留水に対

第3表 鳥型結核菌より核酸の抽出法



して3日間透析を行う。つぎに0.5%の割合に Sod. desoxycholate を加えて、pH 7.0 に修正し、氷室にて24時間振盪する。しかる後3倍量のアルコールを加えて遠沈し、これを0.8%の食塩水に溶かして Sevag 法<sup>20)</sup>を嚴重に反覆行つて除蛋白を行い、約3~4倍量のアルコールを加えて遠沈により絹糸状沈澱、すなわち粗核酸を得る。ついで Sevag 法より以後の方法を数回反覆して核酸を精製する。なお DNA, RNA, に分割する際には、それぞれ牛の膵臓より Mc Donald 及び Kunitz の方法で得た RNA-ase<sup>25)</sup>, DNA-ase<sup>26)</sup>, をこの核酸に作用させ各々一旦 Sevag 法で蛋白を除去後、アルコール沈澱を2回反覆して、精製DNA, 精製RNA, としてこれを実験に供した。私の使用した DNA-ase には RNA

第1図 抽出せる核酸の紫外線吸収スペクトル



ase は全然混在していない。

## C) 抽出せる核酸の性質

## ① 紫外外部吸収スペクトル

抽出した核酸を 100  $\gamma/ml$  の割合に生理的食塩水に溶解し、Beckmann Spectrophotometer により吸収スペクトルを調べた結果は第1図に示す通り、竹尾株及び獸調株の核酸は共に典型的な核酸のスペクトル<sup>27)28)</sup>を示し、両者共に最大は 258  $m\mu$ , 最小は 233  $m\mu$  である。

## ② 核酸の定量

竹尾株及び獸調株より抽出せる核酸各々両者について、Schneider法<sup>23)</sup>及び Schmidt, Thannhauser<sup>24)</sup>の方法により RNA, DNA の含有量を測定し、総磷及び窒素は各々 Fiske & Subbarow法<sup>29)</sup>及びマイクロ-Kjeldahl 法<sup>30)</sup>によつて測定したもので、その成績は第4表に示す通りで、表中の数字はそれぞれ核酸 1  $mg$  についての測定値 (単位  $\gamma$ ) を示す。蛋白反応は総て陰性であった。この表の値より竹尾株より抽出せる核酸も、獸調株より抽出せるものもほぼ同程度の純度を有するものを抽出することができた。

第4表 核酸の定量

	獸調株	竹尾株
D N A (チフェニールアミン反応)	101	185
R N A (オルシン塩酸反応)	312	330
DNA-磷	14	11
RNA-磷	27	31
磷	41	42
窒素	67	77
N : P	1.63	1.83

(註 核酸 1  $mg$  についての測定値 単位  $\gamma$ )

## 4) SM 耐性測定法

## A) 使用培地

SM耐性測定に際しては鳥型結核菌の場合は総て試験管に Sauton 寒天培地を 4.5  $ml$  宛分注し、これに SM の各濃度の稀釈液 0.5  $ml$  を加えて、その終末濃度が 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100  $\gamma/ml$  となるようにし斜面にしたものを用い、BCG の場合には 3% グリセリンブイヨン寒天培地を使用した。

## B) 接種菌量

SM 耐性測定培地に接種する際菌量を一定にするために、菌を秤量後硬質コルペンに入れ、これに硝子玉を入れ手振り法により 5  $mg/ml$  の均等な生理食塩水菌浮游液を作成し、SM 添加培地に 0.1  $ml$  宛接種し定量的に培養した。菌液接種後は菌液が培地全面を均等に潤すように流した後、培地斜面が水平を保つように試験管を横にして孵卵器に入れ培養した。

## C) 培養成績判定基準

菌液接種後3日間、37°Cで培養後成績を判定した。成績判定基準は下記の如し。

- (卍) 対照と大略同様か乃至はその2/3以上の菌発育を認めるもの
  - (卅) 対照の1/2以上2/3程度迄の菌発育状態を認めるもの
  - (+) 対照の1/2以下の発育を示すもの
  - (0) 培地表面にコロニーの形成を全く認めないもの
- コロニー数を数え得るものは数字を以つてその数を記載した

5) アデニン・5・三磷酸 (ATP)

Dounce等<sup>31)</sup>の方法で抽出したATP-Ba塩を使用し、際してATP-K塩として実験に供した。

第2節 実験方法及び実験成績

1) SM耐性鳥型結核菌より抽出せる核酸(以下NARと略記する)を添加せる培地にSM感性鳥型結核菌を継代培養せる場合

Sauton培地にNAR(竹尾株)をそれぞれ1,000γ/ml, 100γ/ml, 10γ/mlの割合に添加せるものに、SM感性菌(竹尾株)を接種し、37°Cで3日間培養せる後、増殖して来た菌について各々菌浮游液を調製してSM含有培地に接種してSM耐性を測定すると第5表に示す如く、NAR 1,000γ/ml含有培地では、1代でSM 100第5表 SM耐性鳥型結核菌(竹尾)の核酸含有ソートン培地に継代培養せるSM感性菌(竹尾)

継代	SM (γ/ml)	核酸 (γ/ml)							
		0	0.1	0.5	1	5	10	100	
0	0	卍 卍	+	0	0	0	0	0	0
1	1000	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
1	100	卍 卍	卍 卍	+	+	+	+	+	+
2	100	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
1	10	卍 卍	+	+	15	12	0	0	0
2	10	卍 卍	+	+	18	10	0	0	0
3	10	卍 卍	+	+	+	44	15	15	19
4	10	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
5	10	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍

γ/mlの培地に、SMを含有せざる培地と同程度の発育を示している。すなわち1代培養で100γ/mlのSM耐性を獲得している。NAR 100γ/ml含有培地に接種された菌は、1代培養でSM 100γ/ml培地にSMを含有せざる培地の1/2以下の増殖度を示し、2代継代培養でS

M100γ/ml培地にSMを含有せざる培地と同程度に増殖できるようになる。NAR10γ/ml含有培地に増殖した菌は数代継代培養を繰返しても極めて軽度しかSM耐性を示していない。以上の成績より私の抽出したNARは、大略100γ/ml附近の濃度で、SM感性菌のSM耐性を引き起こすことができるように考えられるのである。

2) SM耐性化有効物質の決定

上記の実験によりNARはSM感性菌をして、一応SM耐性化せしめる能力を有するものであることを認めただのであるが、この有効物質を追究すべく更に次のような実験を行った。すなわち前述の如き方法で、このNARにDNA-ase, RNA-aseの各々を作用させて精製したRNA及びDNAを各々別々にSauton培地に加え、これにSM感性菌(竹尾株)をそれぞれ接種して増殖して来た菌について各々SM耐性を検すると第6表に示す如く、NARをRNA-aseで処理したもの、すなわちDNA含有培地に増殖した菌は明らかにSM 100γ/mlに増殖することができたが、一方NARをDNA-aseで処理したもの、すなわちRNA含有培地に増殖した菌はSM含有培地に接種しても増殖を認めず、SM耐性化は不可能であつた。この事実より、このSM耐性化を惹起せしめる有効物質はNARの中のDNAに他ならぬことが決定された。

第6表 SM耐性鳥型結核菌(竹尾)より抽出せる核酸にRNA-ase及びDNA-aseの各々を作用させた場合SM感性菌(竹尾)に対する核酸の影響

核 酸	SM(γ/ml)							
	0	0.1	0.5	1	5	10	100	
対 照	卍 卍	卍~+	0	0	0	0	0	
R N A 核酸+DNA-ase	卍 卍	卍 卍	0	0	0	0	0	
D N A 核酸+RNA-ase	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	

3) SM感性菌の静止菌に対するNARの影響

Sauton-agar培地に発育せるSM感性鳥型結核菌(獣調株)を集菌し、24時間氷室に保存した後、10mg/mlの生理食塩水菌浮游液を調製し、これを1ml宛滅菌スピッツに分注し、更にこれにNAR(獣調株)の10mg/mlの生理食塩水溶液を1ml宛注加し、氷室に保存し、6時間、12時間、24時間、48時間の各時間毎に各1本宛取出し、遠沈により滅菌生理食塩水にて数回菌体の洗滌を繰返して核酸を除去した後、滅菌生理食塩水にて全量を2mlとし、0.1ml宛SM含有Sauton培地に接種してSM耐性を測定したが、SM耐性の上昇は認められなかつた。更にこの0°Cで核酸と接触させた菌

を1代普通の Sauton 培地に接種し増殖させた後、該菌について SM 耐性を検したが同様 SM 耐性化は認められなかつた。すなわち、0°C で NAR と SM 感性菌と接触させても SM 耐性という遺伝的 Trait は移譲され得ない。又 0°C で NAR と接触させた菌を1代 Sauton 培地に培養して増殖させた菌も、矢張り SM 耐性なる性格を持つに至らなかつた(第7表及び第8表)。い

第7表 0°C において核酸と接触させた SM 感性菌

接触時間	SM( $\gamma/ml$ )							
	0	0.1	0.5	1	5	10	100	
0	## ##	+	0	0	0	0	0	
6	## ##	+	+	0	0	0	0	
12	## ##	+	+	0	0	0	0	
24	## ##	+	+	0	0	0	0	
48	## ##	+	+	+	0	0	0	
				19	0	0	0	

第8表 0°C において核酸と接触後ソートン培地に1代増殖させた SM 感性菌

接触時間	SM $\gamma/ml$							
	0	0.1	0.5	1	5	10	100	
0	## ##	+	0	0	0	0	0	
6	## ##	##	+	+	0	0	0	
12	## ##	##	+	+	0	0	0	
24	## ##	##	##	##	+	11	0	
48	## ##	##	##	##	+	3	0	
					0	0	0	

い換えれば Resting cell では NAR は SM 感性菌に SM 耐性という遺伝的 Trait を移譲できない。表に見られる成績において、SM 低濃度に僅かにコロニーの発育を認めるが、これは生理食塩水溶液として接触させた核酸を洗い去る際完全に除去することができず、一部菌体に附着していたために生じたものか、Resting cell 製法の不備によるものと考えられる。

次にこの 0°C で行つた実験と同様の方法で 37°C で NAR と SM 感性菌を接触させた場合について実験すると、すなわち 37°C で NAR と SM 感性菌を接触させたのみでは SM 感性菌の SM 耐性化は認められなかつた。しかしながらこの 37°C で NAR と接触させた菌を洗菌し、一度 Sauton-agar 培地に接種し、増殖させた菌については明らかに NAR と6時間以上接触させた菌は SM 100  $\gamma/ml$  迄の培地に SM を含有せざる培地と同程度の発育を認め、SM 耐性化せることを認めた

のである(第9表及び第10表)。この場合にも NAR と 37°C において接触させたのみの菌において僅かに SM 耐性の上昇が認められるも、洗菌の際 NAR を完全に除去し得なかつたために生じたものであろう。

第9表 37°C において核酸と接触させた SM 感性菌

接触時間	SM ( $\gamma/ml$ )						
	0	0.1	0.5	1	5	10	100
0	## ##	+	0	0	0	0	0
6	## ##	##	+	+	0	0	0
12	## ##	##	##	##	+	0	0
24	## ##	##	##	##	##	0	0
48	## ##	##	##	##	##	0	0

第10表 37°C において核酸と接触後ソートン培地に1代増殖させた SM 感性菌

接触時間	SM ( $\gamma/ml$ )						
	0	0.1	0.5	1	5	10	100
0	## ##	+	0	0	0	0	0
6	## ##	##	##	##	##	##	##
12	## ##	##	##	##	##	##	##
24	## ##	##	##	##	##	##	##
48	## ##	##	##	##	##	##	##

#### 4) NAR による SM 感性菌の SM 耐性化に対する代謝阻害剤の影響

前述の如く、NAR が SM 感性菌に、SM 耐性なる遺伝的 Trait を賦与するには細胞分裂を必要とすることを認めたが、さらにこれが菌体内の如何なる代謝過程と連関抱合して、かかる事実が起るかを究明するために、数種の次のような代謝阻害剤 (metabolic inhibitor) すなわち、Arsenite (M/1,000); NaF (M/300);  $CH_2$  JCOOH (M/1,500); 2,4 Dinitrophenol (M/1, 200); Nitrogenmustard-N-Oxide (M/1,200); KCN (M/1,500) (括弧内は各毒物の終末濃度) 等を用いて次の如き実験を行つた。第11表に示すような反応系により、すなわちこれらの阻害剤の各々と Sauton 培地、NAR (獸調株) 及び SM 感性菌 (獸調株) とを一緒に加え、一方はさらにこれに ATP を添加し、他方は ATP を添加せざるものとの二群に分けて、各々 37°C 48 時間作用させた後、それぞれ遠沈、滅菌生理食塩水にて数回洗菌を反覆した後、5 mg/ml の菌浮游液としその各々を SM 含有培地に接種して、SM 耐性獲得の状態を観察した。成績は第12表に示す如く、一般に ATP を同時に

第11表 核酸による SM 感性菌の SM 耐性化に及ぼす各種阻害剤及び ATP の影響

- A) 阻害剤 0.5 ml
- 1) 亜硫酸 (M/1,000)
  - 2) 弗化ソーダ ((M/300)
  - 3) モノヨード醋酸 (M/1,500)
  - 4) デニトロフェノール (M/1,200)
  - 5) ナイトロジエンマスタード-N-オキシド (M/1,200)
  - 6) 青酸加里 (M/1,500)
- B) ソートン培地 0.5 ml
- C) ATP 15.0 mg
- D) SM 感性鳥型結核菌々液 (5 mg/ml) 1.0 ml
- E) SM 耐性鳥型結核菌核酸 (10 mg/ml) 1.0 ml
- 総量 3.0 ml  
37°C 48 時間接触

第 12 表

阻害剤	A T P	SM (γ/ml)						
		0	0.1	0.5	1	5	10	100
Na <sub>3</sub> AsO <sub>2</sub>	(-)	##	##	+	+	0	0	0
	(+)	##	##	##	+	20	20	0
NaF	(-)	##	##	+	+	3	0	0
	(+)	##	##	##	##	##	20	20
CH <sub>2</sub> JCOOH	(-)	##	##	##	+	0	0	0
	(+)	##	##	##	+	20	0	0
DNP	(-)	##	##	##	+	100	0	0
	(+)	##	##	##	+	+	+	+
NM-N-Oxide	(-)	##	##	##	+	0	0	0
	(+)	##	##	##	##	0	30	0
KCN	(-)	##	##	##	##	##	+	0
	(+)	##	##	##	##	##	##	20

添加せる場合の方が、ATP を添加せざる場合に比較して NAR による耐性化が著明に認められた。すなわち、殊に 2・4 Dinitrophenol や Nitrogenmustard-N-Oxide の被毒現象の ATP による無力化が顕著である。磷酸の関与する酵素系に阻害毒となる Arsenite, NaF, Halogenalkyl の一種と考えられる CH<sub>2</sub>JCOOH, 主として重金属と醋酸化合物を形成して、低濃度で呼吸を阻害する

KCN 等の場合も、NAR による SM 感性菌の耐性化が阻止されるが、同時に ATP を共存させた場合にはこれ等の阻害剤の被毒現象が取除かれ、NAR の力が復元して耐性化が起つている。

以上の実験結果より NAR による SM 感性菌の耐性化は、この ATP の高エネルギー-磷酸結合をエネルギー源として惹起するという事を認めたのである。

5) NAR による SM 耐性化の特異性に就いて

鳥型結核菌竹尾株及び獣調株の NAR を 1,000 γ/ml の割合に各々 Sauton 培地に添加し、竹尾株の NAR を含有する培地に SM 感性鳥型菌獣調株を接種し、獣調株の NAR を含有する培地には竹尾株感性菌を接種し、各々 37°C で 3 日間培養後、増殖せる菌について 5 mg/ml の生理食塩水菌浮遊液を調製して、その 0.1 ml 宛を SM 含有 Sauton 培地に接種して SM 耐性を測定したが、両者共に、SM 100 γ/ml 迄の SM 含有培地に、SM を含有せざる培地と同様の発育を認めた(第13表及び第14表)。すなわち鳥型結核菌竹尾株の NAR は、同じ鳥型菌獣調株の SM 感性菌をして耐性化せしめることができ、又逆に獣調株の NAR は、同菌竹尾株の感性菌をして、SM 耐性化せしめ得た。よつて NAR による SM 感性菌の SM 耐性化には菌株特異性は存在しないことが認められる。

第13表 SM 耐性鳥型結核菌竹尾株の核酸含有ソートン培地に発育せる SM 感性鳥型結核菌獣調株

対照	SM (γ/ml)						
	0	0.1	0.5	1	5	10	100
対照	##	##	0	0	0	0	0
竹尾株核酸	##	##	##	##	##	##	##

第14表 SM 耐性鳥型結核菌獣調株の核酸含有ソートン培地に発育せる SM 感性鳥型結核菌竹尾株

対照	SM (γ/ml)						
	0	0.1	0.5	1	5	10	100
対照	##	##	0	0	0	0	0
獣調株核酸	##	##	##	##	##	##	##

しかしながら同様な実験を、すなわち竹尾株の NAR を 1,000 γ/ml の割合に加えた 3% グリセリンブイオン培地に、SM 感性 BCG を接種し、37°C で 3 日間培養後増殖してきた菌について、SM を含有するグリセリンブイオン寒天培地に接種して SM 耐性を検したが、この場合には SM 耐性の獲得を認めなかつた(第15表)。すなわち、鳥型結核菌の NAR は BCG の SM 感性菌をして耐性化せしめることは不可能であつて、NAR による SM 感性菌の SM 耐性化には菌種特異性が激然

と存在していることを認めたのである。

第15表 SM 耐性鳥型結核菌(竹尾)の核酸含有グリセリンブイヨン培地に発育せる SM 感性 BCG

SM ( $\gamma/ml$ )	0	0.1	0.5	1	5	10	100
BCG							
対 照	+++ +++	+++ +++	+	0 0	0 0	0 0	0 0
竹 尾 株 核 酸	+++ +++	+++ +++	+	0 2	0 0	0 0	0 0

### 第3章 NAR によつて SM 耐性化した菌と、SM によつて耐性化した菌との比較

#### 第1節 実験材料

##### 1) NAR によつて SM 耐性化した菌

SM 感性鳥型結核菌竹尾株を、竹尾株の NAR を 1,000  $\gamma/ml$  の割合に添加せる Sauton 培地に2代累代培養して、SM 100  $\gamma/ml$  以上耐性化したと思われる成績を示した菌を使用した。

##### 2) Niacin

和光製薬会社の製品を使用した。

##### 3) Warburg 検圧計

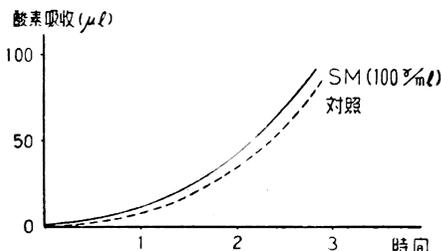
#### 第2節 実験方法及び実験成績

##### 1) NAR により SM 耐性化した菌による Niacin の分解

鳥型結核菌竹尾株は Niacin を単独窒素源として増殖し、Niacin を分解利用する。該菌の通常の Sauton 培地に発育した、いわゆる Niacin 非適応菌は、Niacin を 60~90 分の適応誘導期の後に酸化分解し、SM はこの適応を完全に阻止すること及び SM 耐性菌においては SM はその適応酸化分解に全く影響を示さないことを教室の石下等<sup>32,33)</sup>は報告している。私は前述の NAR により SM 耐性化したと思われる鳥型結核菌竹尾株を大量 Sauton 培地に培養し、4日間、37°C で培養後集菌し、蒸溜水にて数回遠沈洗菌を繰返して培地成分を除去した後、菌容量の 20 倍量の蒸溜水を加えて、均等な菌液を調製した。この菌液を用いて次のような反応系で、すなわち菌液 1 ml, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 0.5 ml, M/10 Niacin 0.2 ml を加え、蒸溜水を加えて全量を 2 ml とし、更にこれに 100  $\gamma/ml$  の割合に SM を加えたものと、加えないものとの両者について 37°C において Warburg の Microrespirometer<sup>34)</sup> により酸素吸収量を測定し、Niacin の酸化分解を比較した。成績は第2図に示す如く、SM 添加した場合も、添加しない場合も同様に 60~90 分の適応誘導期の後に、Niacin を酸化分解することを認めた。すなわち、NAR によつて SM 耐性化したと認められる菌は Niacin を適応的に酸化分解し、その際 SM が添加されていても、この適応は阻

止されないのであつて、SM 耐性菌の Niacin 非適応菌と同様又 SM 耐性菌と同様の性格を示している。

第2図 核酸による耐性菌のナイアシン酸化と SM の影響

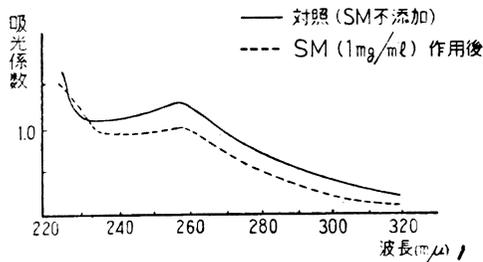


##### 2) NAR により SM 耐性化した菌の Bound Nucleotide

SM 感性菌には存在しないが耐性菌には特有な物質 Bound Nucleotide の常在することが、教室田中等<sup>33,35)</sup>により発見され、このものはメタ磷酸をもつ Olygonucleo-polypeptide と考えられ、その易水解磷の測定や、2,600 Å の吸収から容易に計測することができる。すなわち SM 感性結核菌には全く存在しないが、これに SM を試験管内で作用させると、この菌体内に冷トリクロール醋酸 (TCA) や冷過塩素酸 (HClO<sub>4</sub>) で抽出できる。いわゆる酸溶性劃分において 2,600 Å の紫外部に強い吸収帯を示し、pH 4~5 で不溶性 Ba 塩を形成する物質が出現してくることを発見した。これに対して SM 耐性菌においては、SM を作用させるとさせないに関せず常時これと同一物と想像される物質が存在することを発見した。この見地より私は、NAR によつて SM 耐性化したと思われる菌を Sauton 培地に3日間培養後、集菌して数回蒸溜水にて菌体を洗滌後、湿重量 50g の菌に約 20 ml の蒸溜水を加えて均等な菌浮游液とし、この菌液を2等分して、一方はそのまま、他方は SM を 1,000  $\gamma/ml$  の割合に加えて3時間作用させた後、10%冷トリクロール醋酸で2回抽出を行い遠沈せる上清を取り、更にこの沈渣を5~10%冷トリクロール醋酸で抽出を行った後遠沈して得た上清を先の上清と一緒にし、10%醋酸バリウムを約 5 ml 加えてメチルオレンジにて pH 4~5 に修正後、遠沈し沈澱 (Bound Nucleotide) をとる。この沈澱を、I NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> にて溶解し遠沈を3回繰返して Ba を除いた上清について Beckmann Spectrophotometer により紫外部の吸収スペクトルを測定した。結果は第3図の如く、SM を作用させる前より、2,600 Å に吸収帯のあることが判明した。

又同様な方法で得た酸不溶性バリウム塩 (Bound Nucleotide) を pH 4.5 Acetate Buffer にて洗滌し IN HCl で7分間 100°C で加熱後、Fiske Subbarow<sup>29)</sup>

第3図 核酸による耐性菌の Bound Nucleotide



の方法で発色させた後、660  $m\mu$  で Beckmann Spectrophotometer により7分水解燐を測定した結果第16表に示す如く、SM を作用させる前から 45  $\gamma/g$  の7分水解燐を有していることを認めた。

第16表 核酸による耐性菌の Bound Nucleotide に含まれる7分水解燐 ( $\gamma/g$ )

1. 対 照	45
2. SM (1 mg/ml) 3h.作用後	58

すなわち、Bound Nucleotide の存在するという点において、NAR で SM 耐性化せしめた菌は、SM による耐性菌と同一の性格を有することを認めたのである。

#### 第4章 総括及び考按

以上の実験により、NAR により SM 感性菌を SM の存在下にも発育できるようにすることができ、この NAR により一応 SM 耐性化されたと思われる菌は、SM によつて生じた所の耐性菌と私の実験範囲内においては同一物であると考えられる結果を得たのである。

まず本実験を行うには多量の高分子核酸を必要とする。よつて SM 耐性菌より核酸を抽出する条件について種種検討を加えた結果、Chargaff 等<sup>21)</sup>の原法では核酸殊に DNA を好収量に得ることは容易でないため、数種の条件による抽出法を比較し、菌体を硝子粉と共に Sod. desoxycholate を加えて硼酸緩衝液で湿しつつ精力的に磨砕を行つた場合に最も核酸の収量の多いことを認めた。従つて前述の如く Chargaff 等の変法を考案し核酸の抽出を行つた。この方法により乾燥菌量 100 g の菌体より抽出し得た核酸量は大概 0.4~0.45 g 程度であつた。

次に抽出した NAR を種々の濃度で培地中に添加し、これに SM 感性菌を接種し、継代培養により SM 感性菌の耐性化を見た成績においては、私の抽出した NAR では 10  $\gamma/ml$  の割合に培地中に NAR を添加した場合には感性菌の SM 耐性化の能力は極めて微弱であるが、100  $\gamma/ml$  の割合に添加した場合にはかなり顕著に感性菌をして SM 耐性化せしめることができた。更に NAR の SM 感性菌をして SM 耐性化せしめる有効物質は

NAR 中の DNA 劃分であることを決定したのであるが、この二つの結果より私の抽出した NAR では培地中に 100  $\gamma/ml$  程度即ち DNA としては第4表のジフェニールアミンの反応の値より測定して約 10~18  $\gamma/ml$  程度培地中に存在すれば SM 感性菌をして耐性化せしめる能力を充分發揮することができるものと考えられるのである。この NAR 中の DNA の有効量に関しては、Hatte E. Alexander, M.D. and Grace Leidy<sup>36)</sup>等の Hemophilus influenzae を用いての実験において、SM 耐性菌より抽出した DNA が感性菌をして SM 耐性化せしめる量として培地中に 0.55  $\gamma/ml$  (ジフェニールアミン反応) を有効量として用いているが、私の実験した結核菌の場合には、これよりやや多量を必要とするようである。

なおこの場合地中の NAR が菌の発育に影響を及ぼさないことは窒素量の測定による菌発育曲線により既に観察している<sup>15)</sup>。又 NAR によつて SM 耐性化した菌は SM を含有せざる培地に継代培養するも SM 耐性の低下を認めなかつた。兎も角 SM 耐性という云わば遺伝的 Trait が、SM なくして SM 耐性菌の核酸により移譲され得ることが分つたが、この事実は SM 耐性菌が生じる際には、NAR でまず菌体内の DNA の改変が起つて耐性化されることを想像させるのである。そして NAR のようないわゆる Transforming Substance とも稱すべき物質は、菌体内で酵素、蛋白質等の合成を規制して生体内の反応を制御するいわゆる Gene そのものなのか、或いは Gene 生成を統律する物質であると考えられるであろう。

更に進んで、この NAR がその能力を發揮するには、菌体内のどのような条件下において始めて可能であるかという問題の一部を研究した。即ちまず NAR による SM 耐性化が起るには菌体と活性物質である NAR がどのような条件で接触して起るか、又細菌が発育している状態を必要とするや否やに関する問題であるが、私の行つた NAR と SM 感性菌を 0°C で接触させた実験成績では SM 耐性なる遺伝的 Trait を感性菌に移譲することは不可能であつた。然し 37°C で NAR と感性菌を接触させた場合には、ただ接触のみでは感性菌を SM 耐性化することは不可能であつたが、NAR と接触させた菌を一代培地に接種して増殖させたものにおいては、明らかに NAR と6時間以上接触させた菌において SM 耐性の獲得を認めており、NAR による SM 感性菌の耐性化には Resting cell の状態では起らないのであつて菌体内の或る一定の代謝と共転していること及び細胞分裂を必要とするように考えられるのである。この結果は、勝沼(信)等の報告<sup>13)</sup>と軌を一にするものであり、他にこれとは異つた場合で菌の型転換に関する実験において、Mc Carty 等<sup>37)</sup>は肺炎菌における型転換の実験

では、その活性物質である DNA と共に培地で発育させると 4 時間以内に型転換が起ると云い、又同じく肺炎菌の型転換の実験で、Alexander & Leidy<sup>6)</sup> は活性物質と菌と 15 分間接触させることによつて、菌の発育停止状態においても型転換が起ると報告している。

更に進んで、NAR が感性菌をして SM 耐性化させるには如何なる代謝過程と連関抱合して耐性化が起るものであろうか。最近蛋白質の合成、種々の解毒機転、運動、神経興奮等に関する生物学的仕事の直接の力源として、高エネルギー磷酸化合物が関与していることが考えられている。そして脂質、糖質、蛋白質等の分解により放出されるエネルギーは一旦この高エネルギー磷酸化合物に集約転換されて然る後生物学的な仕事に利用されて行くと考えられている<sup>38)</sup>。

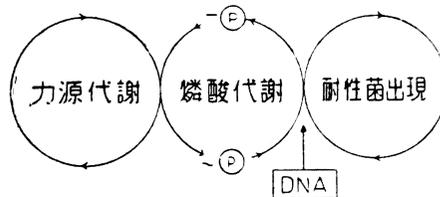
NAR による耐性化機転の阻害剤の影響に関する実験において、特に 2・4 Dinitrophenol はこの Phosphorylation mechanism を阻害すると考えられているが<sup>39)40)</sup>、この 2・4 Dinitrophenol は私の行つた実験では M/1,200 の濃度で、NAR による SM 感性菌への SM 耐性なる遺伝的 Trait の移譲過程を完全に阻害している。すなわち Phosphorylation mechanism の廻転が、NAR の能力発揮には必要であることが認識される。この場合筋肉収縮や、蛋白合成の力源に転換され得る高エネルギー磷酸化合物の代表物たる ATP を添加せる場合には 2・4 Dinitrophenol の阻害現象が全く現れないことが確認された。

又 Nitrogenmustard-N-Oxide の実験は NAR がその作用効果を發揮するのに -SH 基の枢要なるを思はしめる成績であるが、ATP で Nitrogenmustard-N-Oxide の毒力が中和されるのは、ATP の Adenine の 6 位の -NH<sub>2</sub> に alkylate してその有効濃度を減ずるためか、或いは添加している NAR や菌体内 -SH 基の Nitrogenmustard-N-Oxide による荒唐現象が ATP 添加で metabolic repair をうけるものと推し得られるであろう。すなわち NAR による SM 感性菌の耐性化は、この ATP の高エネルギー磷酸結合を直接のエネルギー源として惹起するということが分つたのである。

ATP は Fiske, Subbarow 及び Lohmann により筋肉中に発見されてより Energy transforming system に枢要なる役割を演ずることが筋肉、網膜その他多くの臓器及び酵素系により明確にされたのであるが<sup>41)42)43)</sup>、結核菌においても、ATP のような Nucleotide が色々な Metabolic process において、エネルギー転換の共軌軸としての役割を演じていることは興味深い事実であつて、このような実験事実を簡潔に模式化すると第 4 図の如くなる。

次に NAR の Mutagenic effect の特異性の限界に関する問題に言及する。遺伝原性の烙印の捺されてい

第 4 図 耐性菌出現の模式図



る場所は染色体であり、染色体は DNA-protein を主要成分としている。多くの遺伝子の特異性が DNA に宿されているとすれば、DNA は蛋白質の構成員子たる約 30 のアミノ酸の場合よりもはるかに微妙な Configuration でその性格を発現するものと云わねばならない。何となれば、DNA の場合は Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, 2-desoxyribose, 磷酸の組合せ、配列で沢山の Specificity を保有することになるからである。核酸を可及的温和な条件で抽出せられるべきであることも、この点より考えれば当然のことと云わなければなるまい。私は SM 耐性という遺伝的 Trait を荷う核酸は、菌株、菌種によりどの程度の特異性を有しているかを検討した。すなわち同じ鳥型結核菌である竹尾株と獣調株の間には特異性は存在せず、菌株特異性は存在しないことを認めている。然るに牛型菌である BCG は鳥型菌の NAR により耐性化され得ない。斯かる結果より菌種特異性が存在する事実を認めた。このような手段により、逆に菌の類縁近縁関係を類推することができると想像されるのである。

かくの如く私は SM 無くして、すなわち NAR のみで、SM 感性菌から SM 耐性菌ができる事実を多方面より観察してきた。然らば SM 無くして生じた耐性菌が、果して SM によつて耐性化せしめられた菌と同一物であるや否や、すなわち NAR によつて感性菌をして耐性菌そのものに化成せしめ得るや否やは遺伝学上極めて重要な命題である。私が今迄実施して来た実験は、SM 存在下に増殖できるや否やを観察してきたのであるが、耐性菌の有する二、三の特性を利用してこの問題の若干の検索を行つた。

まず適応酵素産生の問題、すなわち SM が適応酵素の形成を阻害すること、これを一般化して表現するならば蛋白質の合成、転換の阻止を招来することは多方面の学者により認証され、周知の事実である。この適応酵素産生の問題を一つの指標として、NAR によつて耐性化せしめ得たと考えられる菌の性格を検討した。既述の如く通常の Sauton 培地に発育した鳥型結核菌竹尾株のいわゆる Niacin 非適応菌は、Niacin を適応的に酸化分解し、SM は感性菌の適応を阻止するが、耐性菌のそれには全く影響しないことを Warburg 検圧計で観察さ

れているが<sup>32,33</sup>),  $NAR$  により耐性化せしめ得たと考えられる菌は、この点で  $SM$  により耐性化せしめ得た菌と全く同様、 $SM$  により Niacin に対する適応は阻止されなかつた。すなわち適応酵素産生の点では  $NAR$  により耐性化したと考えられる菌は、実際  $SM$  によつて耐性化したいわゆる  $SM$  耐性菌と全く同様の性格を有していることが認められたのであるが、さらに進んで  $SM$  を使用せずして耐性、感性両菌を鑑別することが遺伝生化学上重要な問題である。

先に述べた如く私共共同研究者等により見出された感性菌には全く存在しないが、耐性菌に常在する一新核酸関係物質を "Bound Nucleotide"<sup>33,35</sup>) と仮称して記載したが、これは  $SM$  感性菌、耐性菌両者を区別するのに現在の所最も顕著な且つ有力な手段であると私共は考えているのである。 $SM$  耐性菌は絶対  $SM$  がなければできないものかもしれない。 $NAR$  でできた菌は未だ耐性菌にはなっていない菌で  $SM$  を作用させると直ちに耐性菌となりうる前段階のものであるものかもしれない。この点  $SM$  を使用しないで耐性、感性の両菌を分別出来る手段として Bound Nucleotide を利用したことは問題の展開に極めて有利なことと云わざるを得ない。この観点より、 $NAR$  により耐性化したと思われる菌を使用し、 $2,600 \text{ \AA}$  の紫外部吸収スペクトル及び7分水解磷の両者より耐性菌特有の一新核酸関係物質 "Bound Nucleotide" が、 $SM$  を作用させるとさせないとかわらなく存在することが判明した。以上の如く " $NAR$  を作用せしめてできる耐性菌" は、適応酵素産生が  $SM$  によつて阻止されないこと及び耐性菌特有の Bound Nucleotide を有する点において、" $SM$  によつてできる耐性菌" と生物学的に同様な性格を有するものと考えられ、この  $NAR$  によつて耐性化した菌は、 $SM$  によつて生じた耐性菌と軌を一にするものであることが私の実験範囲内では云い得るのである。

これ等の実験結果より一応次のような考えが成立するのであろう。すなわち  $SM$  耐性菌は  $SM$  でまずその DNA の改変を受け然る後生じるものである。又耐性菌の DNA を感性菌に接触させると  $SM$  なくして恐らくは  $SM$  耐性菌そのものに化成させることができる。

近年昆虫や Neurospora を材料とする研究で、遺伝原性の宿されている場たる遺伝子は細胞内の酵素の生成を統律して<sup>44)-53</sup>), 細胞内の化学反応、物質代謝を支配していることが具体的に明示された。一つの遺伝子が一つの Enzyme の生成を支配しているという、いわゆる One gene One enzyme theory が生れた。然しながら現今の酵素化学においては、One enzyme One function<sup>54</sup>) という捉すら疑われる事実が知られるに至つており、又遺伝生化学の諸研究によつても、一つの Enzyme の生成に多くの遺伝子が関与していると考えら

る事実や、一つの遺伝子が幾つもの酵素の生成に関与しているという事実も知られている。要するに、One gene One enzyme theory といい、One enzyme One function theory といい、所詮蛋白質その物の実態の究明或いは更に進んで蛋白質の生合成等の命題に直面するのである。

以上私は  $SM$  耐性菌出現に関する問題を究明する一手段として、生化学的に  $NAR$  により感性菌をして耐性菌に化せしめ得る現象を多方面より解析してきたのであるが、結核菌が生体内で耐性化する様相は真に複雑多岐な問題であつて、究極は生体内で蛋白質が遺伝子の支配下に生合成される様相の具体的解明に到達せざれば明確な解答は与えられないであらう。

#### 第5章 結 論

1) 鳥型結核菌より、自然のままの高重合核酸を分離調製する手技を検討吟味した。

2)  $SM$   $1,000 \gamma/ml$  以上耐性鳥型結核菌より分離した核酸 ( $NAR$ ) は、 $SM$  感性菌をして、 $SM$  存在下にも発育できるようにすることができる。すなわち言わば耐性菌化せしめ得られるように思われる。

3) この  $NAR$  によつて  $SM$  なしに耐性化せしめたと考えられる菌は、 $SM$  によつて生じたいわゆる耐性菌とは、適応酵素産生や、Bound Nucleotide 保有等の私の研究範囲内では同一物と考えられる。

4) この  $NAR$  は遺伝学的に Gene 乃至は Gene の形成を統律する物質であると思考される。そして  $NAR$  の本態は DNA であることが決定された。

5) この  $NAR$  には菌種特異性がある。

6)  $NAR$  による耐性化は Resting cell では起らない。細胞分裂を必要とする。

7) 又  $NAR$  による耐性化は、力源代謝と共転して生成する高エネルギー磷酸化合物を直接の力源として引き起されるものと思考される。

8)  $SM$  耐性化する現象は、 $SM$  がまず菌の DNA の改変を行い、それにより耐性菌ができると考えられる。

#### 文 献

- 1) Mirsky, A.E. et A.W. Pollister: J. Gen. Physiol, 30, 117, 1946.
- 2) Stedtman, E. et E.: Nature.152, 267, 1943.
- 3) Avery, O.T., C.H. McLeod, et M. McCarty: J. Exp. Med. 79, 137, 1944.
- 4) Bovin, A.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 7, 1947.
- 5) Weil, A.J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64, 349, 1947.
- 6) Alexander H.E. Leidy G.: J. Exp. Med. 93, 345, 1951.
- 7) Wyss, O.: Annals N.Y. Acad. Sc., 53 Art.

- 1, 183, 1950.
- 8) Hotchkiss, R.D. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 457, 1951.
- 9) RoLand, F. & Stuart, C.A. : Antibiot. Chemotherap. 1, 523, 1951.
- 10) Ephrussi, H., Taylor : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 445, 1951.
- 11) 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.
- 12) 勝沼六郎・勝沼信彦 : 結核, 第28回日本結核病学会総会特別号, 1953.
- 13) 勝沼信彦・中里博昭 : 結核, 29, 19, 1954.
- 14) 磯江駿一郎・杉山正雄 : 第4回日本結核病学会東海地方会演説, 1952.
- 15) 杉山正雄・磯江駿一郎 : 結核, 第28回日本結核病学会総会特別号, 1953.
- 16) Voureka : Lancet. 1, 63, 1948.
- 17) Beadle, G.W. : Ann. Rev. Biochem. 17, 727, 1948.
- 18) Horowitz, N. H., H. K. Mitchell : Ibid. 20, 465, 1951.
- 19) 秋葉・石井・田村 : 医学と生物学, 24, 1952.
- 20) 渡辺格・鈴木學之 : 核酸及核蛋白質 (上卷) 165, 1951.
- 21) Chargaff, E. et al : J. Biol. Chem. 177, 417, 429, 1949.
- 22) Potter, V.R., et Elvehjem C. C. : J. Biol. Chem. 114, 495, 1936.
- 23) Schneider, W.C. : J. Biol. Chem. 161, 293, 1945.
- 24) Schmidt, et Thannhauser : J. Biol. Chem. 161, 83, 1945.
- 25) Mc Donald, M.R. : J. Gen. Physiol. 32, 39, 1948.
- 26) Kunitz, M. : J. Gen. Physiol. 32, 349, 363, 1950.
- 27) Caspersson, T., Scand. Arch. Physiol. 73, Supp. 8, 1936.
- 28) Köhler, A., Z. Wiss. Mikroskop. 21, 129, 175, 1904.
- 29) Fiske & Subbarow : J. Biol. Chem. 66, 375, 1925.
- 30) 小金井 : 生化学的微量定量法, 298, 1942.
- 31) Dounée, Rothstein, Aser, Beyer, Thannhauser, Meier, Rebecca, Freer and Richard : J. Biol. Chem. 174, 361, 1948.
- 32) 石下泰堂他 : 第29回日本結核病学会総会演説, 1954.
- 33) 日比野進 : 第29回日本結核病学会総会特別講演, 1954.
- 34) Umbreit, W.W. et al : Manometric technique, (mineapolis) 1949.
- 35) 田中伸一他 : 第29回日本結核病学会総会演説, 1954.
- 36) Alexander, H.E. and Leidy, G. : J. Exp. Med. 97, 1, 1953.
- 37) Mc Carty, M. : Bacteriological Review 10 : 63-71, 1946.
- 38) Lipmann, F., N.O. Kaplan : Ann. Rev. Biochem. 18, 267, 1949.
- 39) S. Spiegelman, Kamen, et Sussman : Arch. Biochem. 18, 409, 1948.
- 40) Frantz, I.D., Zamecnik, Peese, Slephenson : J. Biol. Chem. 174, 773, 1948.
- 41) Fiske, C.H., Subbarow, Y. : Science, 70, 382, 1929.
- 42) Lohmann, K. : Naturwiss, 17, 624, 1929.
- 43) Lipmann, F. : Adv. Enzymol. 6, 231, 1946.
- 44) Beadle, G.W. et E.J. Tatum : Proc. Nat. Acad. Sc. Wash. 27, 499, 1941.
- 45) 吉川秀男 : 遺伝学雑誌, 18, 87, 1942.
- 46) 吉川秀男 : 科学(岩波書店), 17, 76, 1947.
- 47) 柴谷篤弘 : 核酸及び核蛋白質 (共立出版) 下巻, 1951.
- 48) Gale, E.F. : The chemical activities of bacteria, 1951.
- 49) Spiegelman : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 256, 1946.
- 50) Horowitz, N.H. : Adv. in Genetics. III, 33, 71, 1950.
- 51) ibid : Cold Spring Harbor Quant. Biol. 16, 65~74, 1951.
- 52) ibid : Genetics, 35, 612~613, 1948.
- 53) Lederberg, J. : Genetics, 35, 119, 1950.
- 54) Dubuisson, M. : Ann. Rev. Biochem. 21, 387, 1952.