

# Mycobacterium avium の R 型変異と薬剤耐性と の関係についての細菌遺伝学的考察

東 村 道 雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 32 年 2 月 19 日

著者は前報で *Mycobacterium avium* 獣調株 (*M. avium*) から分離した Sulfathiazole (S T) 高耐性株が R 型の形態を示す点で S 型である原株と相違することを述べた<sup>1)</sup>。本報では薬剤耐性特に S T 耐性と R 型変異との関係について観察した結果を報告し、その意義について考察した。なお R 型および S 型の定義の実際については前報<sup>1)</sup>に記載した。

## 実験材料および方法

材料については文献<sup>1)</sup>に記した。実験方法は実験成績の各項に述べる。

## 実験成績

### (1) R 型変異と S T 耐性の関係

*M. avium* の原株をガラス玉とともに振盪した後、生食水で浮游液とし、滅菌濾紙でこすか軽く遠心した後、適当に稀釈し、Sauton 寒天平板 (Sauton 培地は asparagine を同量の sodium glutamate で変えた。寒天は 3%) 上に単個菌集落を形成させても、おおよそ  $10^4$  程度の集落の中には、R 型集落を見出すことはできず、すべて S 型集落のみである。しかし Sauton 培地 (200cc Erlenmeyer flask に 50cc ずつ分注) に ST 0.1~0.5 $\gamma$ /cc または 8-azaguanine-natrium 10 $\gamma$ /cc を含有させたものに、湿菌量 1mg (Sauton 培地 5 日培養菌) を接種し、37°C 5 日培養後に前述と同様にして集落を検すると、 $10^4$  中に少なくとも数個の R 型集落を見出しうる。すなわち ST 0.1~0.5 $\gamma$ /cc または 8-azaguanine 10 $\gamma$ /cc の添加により R 型変異が増加したわけである。

通常 mutagenic effect という定義は、細菌が増殖しない状態で作用させて、後に増殖させて検査すると mutants の出現が増加している場合に用いられているようである。しかし今の場合、S T または 8-azaguanine の存在で増殖が行われているので、上述の場合と異なっている。しかし、この S T または 8-azaguanine の存在で R 型変異が select されるわけではないのに、R 型変異が増加するのであるから、やはり mutagenic effect と考えて差支えないと思われる。すなわち S T および 8-azaguanine が mutagenic effect をもつことが見出された。

こうしてえられた R 型集落を分離してさらにもう一回平板にまいて集落を検すると、すべて R 型集落が認められる。この R 型集落を再び Sauton 寒天斜面にとり、これを R 型株として保存した。この R 型株と原株 (S 型) の S T にたいする感受性を、倍数稀釈法により、ほぼ同数の生菌単位を接種する条件で比較すると、R 型株の S T にたいする感受性は原株に等しいことが解つた。

原株を S T を含有する培地に継代して、順次 S T の濃度を高めて selection を繰返してゆくと、はじめは S 型の S T 低耐性株が得られるが、数 10 代の selection を繰返すと、R 型の高耐性株がえられることは既報のとおりである<sup>1)</sup>。(注. one step で S T 耐性株をうることはできない。)しかし逆に R 型株を select しても、それは必ずしも S T 耐性株でないわけである。すなわち R 型変異そのものは S T 耐性と不可分のものではないから、R 型変異の genes と S T 耐性の genes とは別のものであるべきである。

(注. ただし、ここに示した R 型株の形態は S T 耐性株のそれと同一ではなく、S T 耐性株の方が R 型の度が強い)。

### (2) S T 耐性株の R 型の安定性

S T 耐性株は遺伝的に安定で、現在まで S T を含有しない Sauton 寒天斜面に 30 代以上継代しているが、S T 耐性の度も R 型も変化を起さない。(注. 原株の S T 耐性度は Sauton 培地中で約 1 $\gamma$  であるが、S T 耐性株のそれは 80 $\gamma$  である。S T 耐性株は一過性にはもつと高濃度の S T 中で生育したが、S T を含有しない培地に接種すると若干耐性度が低下し、結局 80 $\gamma$  耐性程度のものが安定なものとして残つた。なお原株の individual cells は Sauton 寒天平板上では 0.5 $\gamma$  の S T によつて阻止されるが、S T 耐性株の individual cells は S T 10 $\gamma$  培地では 100% 生育し、S T 20 $\gamma$  培地では、その 90% 以上が生育する)。

次に原株から分離した遺伝的に安定な INAH 耐性株 (Sauton 培地中での INAH 耐性度は 80~160 $\gamma$ 、原株のそれは 0.5 $\gamma$ 、INAH を含有しない培地に 20 代継代しても不変) は、原株と同じく S 型であるが、Sauton 培地中で S T による selection を 10 日目毎に 10 代繰返すと、INAH 80 $\gamma$  耐性、S T 80 $\gamma$  耐性の 2 重耐性株が得られた。この

INAH-ST-2 重耐性株の形態も R 型で、S T 耐性株と同一であつた。そして薬剤を含有しない培地に 20 代継代しても、2 重耐性の性質も R 型の性質も不変であつた。このように、原株から S T 耐性株を選んで、INAH 耐性株から S T 耐性株を選んで、R 型形態を示す株が選ばれたことは (S T による S T 耐性株の selection を行つたので、R 型形態を select したわけでないのに自動的に R 型形態を示す株が選ばれたことは)、S T 耐性への mutation と R 型への mutation とが密接な関係をもつことを示していると思われる。

次に streptomycin (SM) 耐性株 (SM 50,000 $r$  以上に耐性で、SM を含有しない培地に 100 代以上継代して不変) は原株と同じく S 型であるが、この株を S T 含有培地に継代して SM-ST-2 重耐性株をえようとしたが、S T 耐性度をあげることが困難であつたので、途中で実験を中止した。

次に S T 耐性株を INAH 含有培地に継代して ST-INAH-2 重耐性株をえた。また S T 耐性株を SM 含有培地に継代して ST-SM-2 重耐性株をえた。これら 2 つの 2 重耐性株はともに、S T 耐性株がはじめにもつていた R 型形態を示し、薬剤を含まぬ培地に 10 代継代しても 2 重耐性の性質も R 型の性質も不変であつた。この ST-SM-2 重耐性株を INAH 含有培地に継代すると、ST-SM-INAH-3 重耐性株がえられた。この 3 重耐性株は R 型の性質を減じて、R 型と S 型の中間型の形態を示したことは注目される。

### (3) R 型変異と INAH 耐性および SM 耐性との関係

S T 0.1 $r$  に接触しながら生育する菌の中には R 型変異が多く起ることは前述した。しかし S T 0.1 $r$  を含む Sauton 培地に生育した菌を 10 日毎に 10 代継代しても、株としての形態は S 型のままである。R 型への変異率が増加している状態を継続しても、その中から R 型を select しなければ、R 型をうることができぬのは当然である。

しかし、S T 0.1 $r$  を Sauton 培地中に含有させながら、INAH の濃度を増加させて、原株から INAH 160 $r$  耐性株を分離すると、R 型の INAH 耐性株がえられる。この R 型の INAH 耐性株の S T にたいする感受性は原株と変わらない。この株を INAH を含有しない培地に 10 代以上継代しても、INAH 耐性も R 型形態も不変であつて、遺伝的に安定した性質であると思われた。

一方 S T 0.1 $r$  を含有する Sauton 培地で、SM の濃度を高めつつ原株を継代して、SM 10,000 $r$  耐性株を select しても、R 型の SM 耐性株は分離できず、S 型の SM 耐性株がえられる。

R 型変異を増加させる条件で SM 耐性株を select しても原株と同じ S 型の SM 耐性株が分離されるのに、同条件で INAH 耐性株を select すると R 型の INAH 耐性株が分離される。このことは、S T 耐性菌の selection

が R 型変異菌の selection を併起した現象と似ている。原株から INAH 耐性菌の selection を行つただけでは R 型変異菌の selection を併起しないが、R 型変異を増加する条件を添加してやると、これが起る。R 型変異と S T 耐性とは密接な関係があるが、INAH 耐性と R 型変異も、S T 耐性ほどではないが、相当密接な関係がある。しかし SM 耐性と R 型変異とは関係が薄いといえる。

## 考 察

実験(1)に示した R 型株の性質は、継代によつて不変であるので遺伝的性質であると認められる。一方 S T 耐性株の S T 耐性と R 型とは、ともに遺伝的に安定したものであることは前報<sup>1)</sup>の通りで現在まで 30 代以上継代しても不変である。したがつて R 型株の R 型も、S T 耐性株の S T 耐性および R 型も gene mutation によるものとみなされる。そして実験(1)で R 型株の S T 感受性が原株と同じであることが示されているので、S T 耐性に関与する genes と R 型に関与する genes とが別個のものであることが考えられる。

次に R 型の selection は S T 耐性の selection を伴わないのに、S T 耐性の selection は R 型の selection を伴うことは、どのように説明するか問題となる。

S T の存在は R 型変異への mutation を増加させるが、この R 型変異への mutation を増加させる条件で継代を繰返しても、S T 耐性の selection を行わなければ R 型をうることはできない。R 型変異への変異率が増加した条件で S T 耐性の selection を繰返して、はじめに R 型をうることができる。ただし実験 4 に示すように、この際加えられる selection は必ずしも S T 耐性の方向でなくてよく、INAH 耐性の方向でもよい。しかし SM 耐性の selection では R 型はえられない。これから考えて、ともかく R 型変異の genes と薬剤耐性への genes とは別個のものであるが、同一細胞に S 型から R 型への mutation と薬剤耐性への mutation が起る確率は、S T 耐性菌に最も屢度が高く、INAH 耐性菌に次いで屢度が高く、SM 耐性菌に最も低いと考えられる。

もし今われわれが *M. avium* の genes が線上配列をなして、しかも 2 つの mutations が同一細胞に起る屢度は、これらの mutations に関与する genes が互に接近して位置している時に高いと仮定すれば、R 型変異の genes は S T 耐性の genes に最も近く、次に INAH 耐性の genes に近く、SM 耐性の genes に遠く位置しているという仮設ができる。もちろんこのような考え方は仮設にすぎないので、将来研究の進歩とともに変更されるべきものかもしれないが、しかし mycobacteria の genes 配列についてはいままで全く解つていないし、今のところこの種の研究に genetic recombination を利用することができないので<sup>2,3)</sup>、一応このような作業仮

設を提出してみることにした。

また一方、われわれは *M. avium* の ST 耐性株の SM 耐性への mutation rate が原株より低下していることを観察したが<sup>4)</sup>、この現象の説明には、ST 耐性菌の中には SM 耐性への mutation を起さないものが存在しているために、株としての mutation rate が低くなっていることが考えられる。すなわち ST 耐性菌には 2 種あつて、SM 耐性への mutation を起すものと起さないものとが存在する可能性が考えられる。もし、この可能性が存在すれば、ST 耐性への mutation に際して ST 耐性の genes 以外の genes の mutations も同時に起つたことになる。この SM 耐性に影響を与える mutations が、他の薬剤耐性への mutations に際しても常に起るのであれば問題はないが、事実は ST 耐性以外への mutations では起らない<sup>5,6,7)</sup>。そうすると ST 耐性の genes の mutation が特殊な関係で SM 耐性の genes に影響をあたえたことになるので、ここに次のような可能性と ST 耐性の genes と SM 耐性の genes とが互に隣接しているという可能性が想像される。すなわち、mutation が単一の genes の at random な変化としておこるのみならず、数個の相並ぶ genes の同時的变化という形でも起る可能性が考えられる。したがつて、ST 耐性への genes の変化が、相隣接する他の genes の変化とともに起るという可能性の想像で、この現象を説明するわけである。

このように ST 耐性の genes と SM 耐性の genes とが互に隣接していることを仮想すると、前の所見と合せて次のような genes の配列の仮説も考えられうる。

INAH 耐性—R 型変異—Sulfathiazole (ST) 耐性—SM 耐性。

なんとすれば前述したように、R 型変異は ST 耐性、次いで INAH 耐性と関係が深い<sup>4)</sup>が、SM 耐性とは関係が浅く、また SM 耐性と ST 耐性とは関係が深い<sup>4)</sup>が、SM 耐性と INAH 耐性は関係が浅いからである<sup>5)6)</sup>。

なお *M. tuberculosis* では、われわれは SM 耐性—P A S 耐性—INAH 耐性の genes 配列の仮説を提出している<sup>8)9)</sup>。

## 結 論

(1) *Mycobacterium avium* (獣調株) の原株は S 型であるが sulfathiazole (ST) 高耐性株は R 型である。しかし R 型株を select して ST にたいする感受性を検査してみても、原株と同じであつた。

(2) SM 耐性株および INAH 耐性株は原株と同じく S 型である(\*)。

(3) 培地に微量の ST を加えておくと、R 型変異菌の出現率が增加する。この条件で、INAH 耐性株を select すると R 型の INAH 耐性株がえられる。しかし同条件で

SM 耐性株を select しても S 型の SM 耐性株しかえられない。

(4) INAH 耐性株を ST で select して得た INAH—ST 2 重耐性株の形態も R 型であつた。ST 耐性株を SM または INAH で select して得た ST—SM 2 重耐性株および ST—INAH 2 重耐性株は、ST 耐性株のもつ R 型を維持していた。ST—SM 2 重耐性株を INAH で select して得た 3 重耐性株は、R 型の性質を減じて R 型と S 型の中間型となつた。

(5) ST 耐性の genes と R 型の genes とは別個のもので考えられる。

R 型変異は ST 耐性菌に起る率が最も高く、次いで INAH 耐性菌に起る率が高く、SM 耐性菌における率が最も低いと考えられる。

これらの関係と、別報した SM 耐性と ST 耐性との間の特殊な関係および SM 耐性と INAH 耐性との間に特別の関係のないことから、この *M. avium* の genes 配列の仮説として次の順序の配列を考えてみた。

INAH 耐性—R 型—ST 耐性—SM 耐性。

(6) Sauton 培地に ST 0.1~0.5 $\gamma$ /cc または 8-azaguanine—natrium 10 $\gamma$ /cc を添加して培養すると R 型変異が増加する。したがつて ST および 8-azaguanine が mutagenic effect を有することが考えられる。

御指導および御校閲を受けた勝沼六郎君ならびに名大第一内科日比野進教授に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 東村道雄: *Mycobacterium avium* から分離した Sulfathiazole 耐性株の形態的特徴について、*医学と生物学*, 35 (4): 123~125, 1955.
- 2) 三浦幸二・東村道雄: *Mycobacterium avium* における genetic recombination の存否について、*医学と生物学*, 38 (1): 27~29, 1956.
- 3) 三浦幸二・安保 孝・東村道雄: 人型結核菌における genetic recombination の存否について *医学と生物学*, 41 (2): 61~63, 1956.
- 4) 東村道雄: Nonselective mechanism による SM 耐性の阻止、*医学と生物学*, 43 (2): 64~67, 1957.
- 5) 東村道雄・三浦幸二・橋本 正: The mutation rate to streptomycin resistance in an original sensitive strain and in its isoniazid-resistant mutant of *Mycobacterium avium*. *J. Antibiotics*, A, 9 (1): 19~21, 1956.
- 6) 橋本 正: *Mycobacterium avium* の原株及び耐性株における薬剤耐性への mutation rate について、未掲載。

- 7) 東村道雄・三浦幸二・野田用: Studies on the drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, *J. Antibiotics*, A, 9 (5): 182~185, 1956.
- 8) 東村道雄・三浦幸二: PAS耐性結核菌におけるSM耐性及びINH耐性への mutation について, *医学と生物学*, 39 (1): 31~35, 1956.
- 9) 東村道雄・三浦幸二・野田用: On the mutation

to streptomycin resistance and isoniazid resistance in PAS-resistant *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, *J. Antibiotics*, A, 9 (6): 210~217, 1956.

- \*) ただし, INAH耐性株は原株と同じS型ではなく, 若干R型の傾向をおびたS型とでも言うべき集落形態を示す。