

# 鳥型結核菌の SM 耐性獲得に及ぼすピリドキサミンの 抑制に関する知見補遺 第 1 報

近 田 嘉 人

名古屋大学医学部山田内科教室 (主任 山田弘三教授)

受 付 昭 和 34 年 6 月 5 日

## (I) SM 耐性鳥型結核菌より抽出せる核酸 による SM 耐性誘導に及ぼすピリド キサミン (PAM) の影響

### 序 言

結核菌の SM 耐性の発現機序に関しては、今までに多くの研究報告がなされているが、耐性菌のもっている遺伝学的特性についてもかなり検討されている。結核菌の SM 耐性と核酸に関しては、勝沼ら<sup>1) 2)</sup> は SM 耐性鳥型結核菌から抽出した核蛋白加培地で感性結核菌の SM 耐性化に成功したと報告し、核蛋白の活性が DNA-ase によつて失われることから、活性の主体が DNA にあることを実証した。杉山ら<sup>3) 4)</sup> も時を同じくして SM 耐性菌に含まれる特異的な核酸について観察している。最近佐々木<sup>5)</sup> は鳥型結核感性菌および SM 耐性菌よりの抽出核酸について、遺伝学的生化学的に検討している。教室山田・松永ら<sup>6)~10)</sup> は鳥型結核菌の SM 耐性出現に対し、PAM は著明な抑制作用を示し、この抑制機序は、PAM が SM のもつ遺伝子変異効果に強く拮抗する点、および PAM が化学構造上 4 位の側鎖にアミノ基をもっていることに重要な意義があることを強調した。そこで私は、PAM の抑制機序を遺伝学的に解明することにより、SM 耐性菌の発現機序の手懸りを得るのではないかと考え、SM 耐性鳥型結核菌より抽出した核酸によつて、SM 感性菌が耐性誘導される過程の PAM の影響について検討するために、次の試験管内実験を行なつた。

### 実験材料ならびに実験方法

#### A. 核酸抽出法

使用菌株は鳥型結核菌竹尾株の SM 1,000  $\gamma$ /cc 以上耐性菌で、これは SM 感性菌を SM 含有 Sauton 寒天培地に継代培養して 1,000  $\gamma$ /cc 以上の耐性菌を調製し、その後 SM を含有しない培地に数代継代培養し、SM 1,000  $\gamma$ /cc 以上に耐性であることを確認したもの

である。核酸抽出法は表 1 のごとくで Chargaff Saidal 法<sup>11)</sup> を多少改良した。

表 1 核酸抽出法

鳥型結核菌ソートン培地 6 日間培養後水洗
10 倍氷冷アセトン投入後菌体をヌッチェで濾別
20 倍氷冷エーテルで 24 時間脱脂
乾燥菌体 5 g
0.01M Citrate-Na 添加 Borate Buffer (pH 7.6) を加え 0°C で 4 倍重量硝子粉と磨砕約 1 時間
同上 Buffer 100cc 0°C 中 24 時間抽出振盪
3,000 r.p.m. 30 分遠沈
ついで上清を 12,000 r.p.m. 10 分遠沈
上清濾液 80cc 透明蛍光黄色液
1% Desoxycholate 80cc を加え 24 時間振盪 (pH 7.6)
Sevage 除蛋白
2 倍容アルコールを加え 3,000 r.p.m. 30 分遠沈
核酸沈澱
35cc 蒸溜水にとかし流水透析 24 時間 0°C
蒸溜水透析 24 時間 0°C
凍結乾燥

抽出核酸の主たる生化学的特性は、総磷測定法は Fiske & Subbarow 法<sup>12)</sup> により、DNA 測定法は Diphenylamine 反応<sup>13)</sup> を用い、RNA 測定法は Meibaum 法<sup>14)</sup> を使用した。紫外線吸収波長の測定は Beckman Spectrophotometer を用いて測定した。

#### B. 抽出核酸と菌体との培地外感作実験

供試菌株は鳥型結核菌竹尾株の SM 感性菌で、SM 0.5  $\gamma$ /cc にて発育を阻止されるものを使用した。この感性菌を秤量後硬質硝子コルベンに入れ硝子玉手振り法により 5 mg/cc の均等な生理食塩水菌浮遊液を調製した。反応系は菌液 1 cc に抽出核酸 1,000  $\gamma$ /cc 1 cc, PAM 100  $\gamma$ /cc 1 cc を混和して 37°C 24 時間感作し

た。対照にはこの反応系より PAM を除いた。感作後菌液を緩衝液で数回洗滌して核酸を除去したのち、よく振盪して PAM 100 および 10  $\gamma$ /cc 含有の Sauton 寒天培地に、0.1 cc 宛接種し 5 日目ごとに 3 代継代培養した。耐性獲得状態は、継代ごとに菌を生理食塩水にて  $10^{-1}$ ~ $10^{-7}$  に稀釈し、各濃度の SM を含む系列 (各組試験管数は 10 本) に単個集落を得るように接種して SM 耐性菌の population<sup>15)~17)</sup> を算定した。対照は普通 Sauton 寒天培地に同様継代培養して耐性誘導の状態を調べた。

C. 抽出核酸と菌体との培地内感作実験

供試菌株は前実験と同様に鳥型結核菌竹尾株の SM 感性菌で、これより調製した菌液 (前述のごとく) 0.1 cc 宛を抽出核酸 1,000  $\gamma$ /cc および PAM 100  $\gamma$ /cc の割合に含有する Sauton 寒天培地に接種し 4 日間増殖感作した。感作後この発育菌を PAM 100  $\gamma$ /cc, 10  $\gamma$ /cc 含有の Sauton 寒天培地に接種して、5 日目ごとに継代培養し SM 耐性獲得の状態を観察した。対照にはいずれも PAM を除いた。耐性菌の population は前実験と同様に算定した。

D. 抽出核酸による SM 耐性誘導の耐性復帰実験

供試菌株は抽出核酸の培地外、培地内感作によつて得られた SM 耐性誘導菌および誘導阻害菌で、Sauton 寒天培地に 15 代継代培養してそれぞれの SM 耐性度の復帰および獲得の状態を観察した。PAM 添加による SM 耐性誘導阻害実験の菌継代には、使用培地に PAM 100, 10  $\gamma$ /cc をそれぞれ添加した。

E. 窒素源としての核酸の活用実験

抽出核酸が鳥型菌の発育にさいし窒素源として利用されるや否や、もし利用されるとすれば、発育してきた菌の耐性度は如何?を知るために次の実験を行なつた。Sauton 培地の培地内成分のうち、Asparagin の代りに抽出核酸を 200  $\gamma$ /cc の割合に加え、この培地に SM 感性菌および SM 耐性菌を接種し、7 日後の培地混濁度、菌膜形成の状態および SM 耐性度を検討した。対照として核酸未添加培地を使用した。

実験成績

A. 抽出核酸の主たる生化学的的特性は表 2 に示すごとくである。

B. 抽出核酸と菌体との培地外感作実験

供試菌株の第 3 継代における PAM 100 および 10  $\gamma$ /cc 添加培地に発育した菌株、および PAM を含まぬ培地 (対照) に発育した菌株についての生菌数当りの耐性菌の population 構成は表 3 のごとくである。PAM 添加例では SM 0.1  $\gamma$ /cc 耐性は膜状発育、1  $\gamma$ /cc 耐性は  $0.3 \times 10^3$  Colonie を算えたが、対照すなわち SM 耐性誘導例は 0.1  $\gamma$ /cc および 1  $\gamma$ /cc に膜状発育

表 2 抽出核酸の主なる生化学的的特性

	耐性菌から抽出した核酸	文献値 <sup>5)</sup>	文献値 <sup>11)</sup>
収率 %	0.78	0.79	2.7~0.4
総磷 %	8.8	7.5~7.6	6.3
DNA %	7.2	6.3~6.25	
RNA %	1.6	2.5	
吸収波長 $\lambda_{max}$ m $\mu$	258	258	258
吸収波長 $\lambda_{min}$ m $\mu$	235	235	235

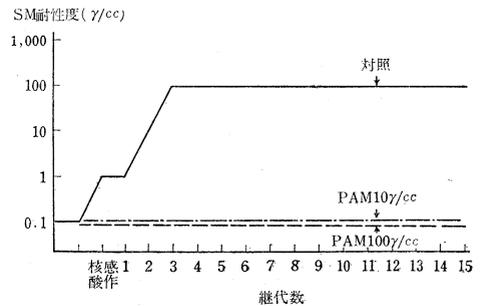
し、10  $\gamma$ /cc では  $1.1 \times 10^6$  Colonie を算えた。100  $\gamma$ /cc には 1 コも発育をみながつた。これを Graessle 法<sup>18)</sup> により SM 耐性上昇曲線を作ると図 1 のごとくになり、3 代継代後には対照は見掛け上では SM 100  $\gamma$ /cc 耐性に上昇していた。

表 3 培地外感作継代第 3 代培地に発育した集落の population 構成

菌株	生菌数	SM 濃度 ( $\gamma$ /cc)			
		0.1	1	10	100
PAM 添加	$7.4 \times 10^7$	m	$0.3 \times 10^3$	0.0	0.0
対照	$9.5 \times 10^7$	m	m	$1.1 \times 10^6$	0.0

m は膜状発育

図 1 抽出核酸と菌体との培地外感作実験および耐性復帰実験



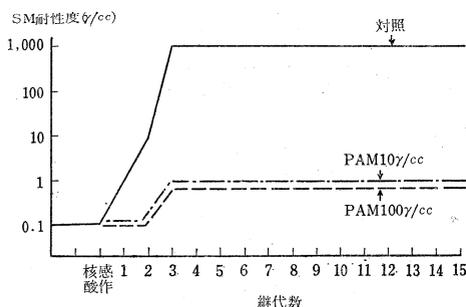
C. 抽出核酸と菌体との培地内感作実験

同様に第 3 継代後の population 構成は表 4 のごとくで、PAM 添加例では、SM 0.1  $\gamma$ /cc 耐性に  $2.1 \times 10^7$  Colonie を算え、それ以上には発育をみず、対照は 0.1  $\gamma$ /cc, 1  $\gamma$ /cc, 10  $\gamma$ /cc に膜状発育し、100  $\gamma$ /cc に  $2.6 \times 10^7$  Colonie を算え、培地外感作法に比べやや強い耐性誘導を示した。また耐性上昇曲線 (図 2) を作ると、対照は見掛け上では SM 1,000  $\gamma$ /cc 耐性を示した。この結果は、耐性菌からの抽出核酸による SM 耐性誘導が、PAM により明らかに阻害されることを示している。

表4 培地内感作継代第3代培地に発育した集落の population 構成

菌株	生菌数	SM 濃度 (γ/cc)			
		0.1	1	10	100
PAM添加	3.6×10 <sup>7</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	0.0	0.0	0.0
対 照	12.2×10 <sup>7</sup>	m	m	m	2.6×10 <sup>7</sup>

図2 抽出核酸と菌体との培地内感作実験および耐性復帰実験



D. 耐性復帰実験

それぞれ培地内、培地外核酸感作により SM 耐性誘導された菌株を、薬剤を含ませ Sauton 寒天培地に 15 代継代後も、図 1, 2 に示すごとくそれぞれの SM 耐性を保持していた。一方、PAM 添加による SM 耐性誘導阻害菌は、SM 1 γ/cc には Survive するが 10 γ/cc 以上には Survive しなかつた。

E. 窒素源としての核酸の活用実験

表 5 に示すごとく、核酸は窒素源としてある程度は利用されるかと思われるが、接種菌株の発育はきわめて悪く、7 日後によく薄い膜状発育をみたにすぎず、培養日数を延長してもほとんどそれ以上には増殖をみなかつた。また発育菌株の耐性は原株と変化なかつた。

表5 核酸を窒素源とした場合の菌の発育

培地	発育度	菌膜形成	混濁度
対 照	±	±	±
核酸 200 γ/cc 添加	±	±	±
ソートン培地	±	±	±

考 察

A. 私の抽出した核酸は表 2 に示すごとく文献値<sup>5) 11)</sup> とほぼ同様であつた。

B. C. について考察するに、岩崎<sup>19)</sup> は鳥型結核菌の SM 耐性獲得の問題を、DNA および RNA の観点より論じ、カドミウムイオンが強い耐性獲得阻止力をもつことを報告している。私は教室山田・松永の PAM による SM 耐性獲得抑制作用の報告にもとづき、SM 耐

性菌より抽出した核酸を培地外および培地内感作法により菌体と感作させ、これにより SM 耐性菌を誘導し、この過程に PAM を添加したところ、SM 耐性誘導が PAM により強く阻害されることを認めた。東村<sup>17)</sup> のいうごとく、耐性菌とは耐性遺伝子型をもつ Mutants と定義すれば、耐性菌から抽出された核酸が SM 感性菌の遺伝子型変異を起こさせる場合に、PAM がなんらかの形で阻害的に働くものと想像される。この事実をさらに明確に把握するために、私は実験で得られた SM 耐性誘導菌、誘導阻害菌および SM 感性菌を数代継代培養して、任意の集落をとり、その population 構成を比較したところ、明らかに 3 株の間に差を認め、PAM による抑制が遺伝的面にまで及んでいることが推論される。

D. 耐性復帰に関しては、一度薬剤に耐性を獲得した菌は、薬剤の影響がなくなつても長く耐性を維持する場合と、次第に耐性が失われる場合とがある。小酒井<sup>20)</sup> によれば、一般に SM 耐性菌は他の薬剤耐性菌に比較して耐性が復帰されにくく安定であるという。しかしながら Mitchison、渡辺らにより不安定な場合も報告されている。杉山・田中<sup>4)</sup> は SM 耐性誘導結核菌より抽出した核酸による SM 耐性誘導菌は、継代を繰返したのちも耐性の低下をみなかつたと報告している。私の実験においても、培地外および培地内核酸感作実験により得た SM 耐性誘導菌および SM 耐性誘導阻害菌は、いずれもおのおの SM 耐性を 15 代継代後も保持し安定していた。

E. 実験成績で述べたごとく、抽出核酸は窒素源としてはほとんど問題とならなかつたが、その発育菌株の耐性度についてはきわめて興味深い。もし核酸が実際に感性菌個体に摂取、利用され、発育に関与するとすれば、当然感性菌の遺伝子型に変化をもたらずのではないかと想像された。結果は、耐性度に変化がなく、前述の核酸による培地内感作も効いていないわけで、菌の発育条件が耐性獲得に影響を及ぼしていることが分かる。

小 括

- 1) 鳥型結核菌竹尾株の SM 耐性菌より抽出した核酸により、SM 感性菌を耐性化する過程にピリドキサミンを添加すると、その耐性化は完全に阻害される。
- 2) この抽出核酸により感作誘導された SM 耐性菌、および同時にピリドキサミン添加による SM 耐性誘導阻害菌は、第 15 継代後もおのおの耐性を保持した。

(II) 鳥型結核菌の SM 耐性獲得に及ぼす PAM-磷酸の影響

序 言

私は前章 (A) 実験において、PAM の SM 耐性

獲得抑制機序を遺伝学的な面より追求したが、PAMが菌の代謝面に及ぼす影響についても当然考えられねばならない。教室松永<sup>10)</sup>はPAMによるSM耐性獲得抑制菌を、そのアミノ酸要求性および適応酵素産生の阻害度より検討し、感性菌および耐性菌との間にかんがりの差を認めた。しかしながら、これらとPAMそのものとの関連については明らかにしていない。PAMが占める菌の代謝面での役割からいえば、発育の面よりむしろ酵素的役割のほうが重要であろう。PAMは生体内においては、ピリドキサルと同様に付磷されてPAM-磷酸としてB<sub>6</sub>酵素系の補酵素たる働きをもっている。そこで次の実験において、PAMの代りにPAM-磷酸を添加して、これによるSM耐性獲得抑制態度について検討し、PAMの場合のそれと比較検討を行なった。

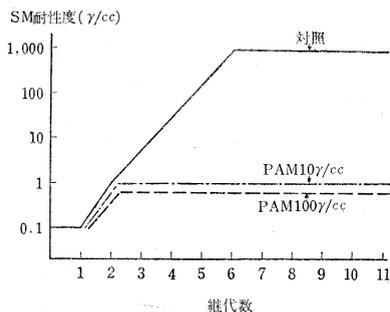
#### 実験材料ならびに実験方法

供試菌株は鳥型結核菌竹尾株のSM感性菌、培地はSauton寒天培地を用いた。培地内薬剤含有濃度はSMが0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000  $\gamma/cc$ とし、PAM-磷酸が8, 10, 16, 100  $\gamma/cc$ となるようにした。対照にはPAM-磷酸を除いた。この培地にSM感性菌を接種し、37°C, 5日目ごとに増量的に継代培養して耐性獲得の状態を観察した。

#### 実験成績

図3に示すごとく、PAM-磷酸添加では第10継代にいたるもSM 1  $\gamma/cc$ 以上には耐性上昇せず、SM耐性獲得に強い抑制態度を示したが、対照は階段状に耐性の上昇を示し、第6継代にてSM 1,000  $\gamma/cc$ 以上耐性を獲得した。

図3 PAM-磷酸添加によるSM耐性抑制実験



#### 考 察

私の実験結果によれば、PAM-磷酸添加により明ら

かにSM耐性獲得は抑制され、表現的にはPAM単独の場合と同様な強い抑制を示した。SMと菌体とのinteractionが耐性菌発現の主なる機構と考え、これを菌体内の酵素面のみに限定すれば、PAMの活性は、PAM単独の形よりPAM-磷酸の形のほうが強力なはずである。したがって、PAM-磷酸による抑制が継代数、あるいは抑制菌株のpopulation構成にPAM単独の場合とは異なつた結果を示すのではないかと予想されたが、明らかな差を認めることはできなかった。

#### 小 括

鳥型結核菌竹尾株におけるSM耐性菌の出現は、ピリドキサミン磷酸によつても強く抑制される。しかしながら、ピリドキサミンのSM耐性獲得抑制の本態が、ピリドキサミンの附磷化によつてより強力なものとなるか否かはなお検討を必要とする。

#### 文 献

- 1) 勝沼信彦・中里博昭：名古屋医学, 67: 144, 昭28.
- 2) 勝沼信彦・中里博昭：結核, 29: 19, 昭29.
- 3) 杉山正雄・磯江謙一郎：結核, 第28回日本結核病学会特別号, 昭28.
- 4) 杉山正雄・田中伸一：結核, 29: 445, 昭29.
- 5) 佐々木富子：結核, 32: 505, 昭32.
- 6) 山田弘三・松永俊明・川口幸平：ビタミン, 10: 187, 昭31.
- 7) K. Yamada, T. Matsunaga & K. Kawaguchi: J. Vitaminology, 2: 193, 1956.
- 8) 松永俊明：呼吸器診療, 13: 256, 昭33.
- 9) 松永俊明：呼吸器診療, 13: 617, 昭33.
- 10) 松永俊明：呼吸器診療, 13: 685, 昭33.
- 11) Chargaff, E. & Sidal, H.F.: J. Biol. Chem., 177: 417, 1949.
- 12) C.H. Fiske, Y. Subbarow: J. Biol. Chem., 66: 375, 1925.
- 13) Dische, Z.: Mikrochemie, 2: 26, 1930.
- 14) Meibaum: Z. Physiol. Chem., 258: 117, 1939.
- 15) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 70: 922, 1954.
- 16) 東村道雄：Chemotherapy, 227: 232, 1956.
- 17) 東村道雄：結核, 33: 815, 昭33.
- 18) Grassle, O.E. & Pietrowski, T.J.: J. Bact., 57: 459, 1949.
- 19) 岩崎旺太郎：広島医学, 8: 1141, 昭30.
- 20) 小酒井望：細菌の薬剤耐性: 67, 昭30.