

ストレプトマイシン耐性赤痢菌の生理学的研究

第 1 編

ストレプトマイシン耐性赤痢菌駒込 BIII の糖代謝

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

川 井 潔

〔昭和 34 年 12 月 25 日受稿〕

緒 論

微生物が薬剤に接触するとやがてそれに対する抵抗が上昇してくる事は既に古く Ehrlich の時代から知られている事実である。近年 Flemming による Penicillin の発見以来急速に発展した抗生物質療法に随伴して微生物の抗生物質耐性化の問題が大きく浮かび上つてきた。此の問題を解決する為には先ず微生物の耐性獲得が如何なる機序によつて起るものであるかを明らかにすることが重要な課題となろう。而してこの耐性の問題については従来より幾多の報告がみられるが大別して二つの基礎的研究面がある。即ち第一は微生物の耐性獲得の機序を遺伝生化学的に究明せんとするものであり、Demerec¹⁾によつて代表される「自然突然変異と選択説」、Dean & Hinshelwood³⁾、秋葉⁴⁾、日比野⁷⁾による「適応乃至誘導変異説」があり、又 Lederberg⁸⁾は接合による耐性獲得を認めている。第二は薬剤との接触による菌の各種形態学、生化学的变化—菌の酵素作用の変化乃至は拮抗物質や解毒的酵素作用の発現代謝系の変動等の現象—に関するもので逆に云えば菌の如何なる生化学的活性が変化し、耐性になったかを究明せんとするものであり、極めて多くの報告¹³⁾があるが必ずしも一定した成績は得られていない。勿論 Gene に変化が起るのならばその帰結として種々代謝系にも変動が起つてよく、これは耐性菌の酵素系変動と遺伝子の関連様式の問題として又極めて重要な領域である。Streptomycin（以下 SM）耐性についても種々の方向からの研究が可能なのであるが、茲では結果として表現された耐性細胞の酵素系の変化その中でも耐性を表現することと直接関係をもっている性状の研究を主眼とした。そうした過去の報告としては Rosanoff & Sevag¹⁶⁾が SM

耐性菌では焦性ブドウ酸の好氣的分解が阻害され代謝は多分に酵素的になると云い、Umbreit et. al.¹²⁾は E. coli について SM 耐性化すると主としてその終末呼吸系に代謝変換が起ると報告している。その他生物学的性状としては、SM 耐性の場合変化が起ると云う報告は余りみられず、僅か Klimek, Cavallito & Biology⁶⁾、神原⁹⁾、桑原等¹¹⁾の寺島 209 P 株の SM 人工耐性株についてそれぞれ幾らか異なつた糖分解能の変化を認めているが、逆に石井¹⁰⁾、内藤¹⁴⁾は何れも SM 耐性大腸菌について形態を含む生物学的性状の変化は認められなかつたと報告している。

又従要素要求については黄色葡萄球菌について SM 耐性化にプロリン、アスパラギン酸及びフェニルアラニン等のアミノ酸、葡萄糖が必須要素であると²⁵⁾ Mc. Coy & English は葡萄球菌のビオチン要求が SM 耐性と関連ある事を報告している。又 O. Wyss, and G. E. Schaiberger⁵⁾は SM 耐性大腸菌はパントテン酸合成酵素の活性が増加していると報じている。何れの場合にしても、耐性化と云う事に伴つて起つた代謝変異であると思われるが、この耐性と云う現象を表現する機構は色々考えられ、堀の分類に従つて記載すれば

- 1) 細胞の薬剤作用を受ける要素にまで薬剤が到達しない。
- 2) その要素が薬物の影響を受けなくなる。
- 3) 細胞が薬剤を無作用物質化する。
- 4) 薬剤の作用に拮抗する物質を産生もしくは増産するようになる。
- 5) 薬剤の作用を受ける代謝系に代つてその薬剤作用を受けない別の系路が構成されるか活性化される。

以上の 5 項目で大部分の耐性化の原因が説明可能

とされている。

翻つて SM が嫌気性菌よりも好気性菌に対してより強く阻止作用を表わすことはよく知られている事実である。又 SM は第一義的に細菌の呼吸系に障害を与えるとも云われて居り Umbreit 一派の終末呼吸系阻害説⁽²³⁾⁽²⁴⁾は有力である。

而して Glucose 代謝はエネルギー代謝の上でも合成面でも一般的代謝過程の基本的骨格をなすものであると考えられ、SM 耐性変異は当然この Glucose 代謝系にも何等かの変化を起すであろう事は充分想像される。そこで筆者は酵素化学的観点から上記の第5項目の代謝系の変異と云う面に焦点をしばつて、教室保存の赤痢菌駒込 B111 を使用し in vitro で増量的継代法により、SM 高度耐性 (10,000 γ /cc) を獲得せしめ、感受性株を対照として生理学的に種々比較検討したので以下その結果について報告する。

実験材料及び実験方法

供試細菌 教室保存の赤痢菌駒込 B111 (SM 感受性株) を in vitro で SM 増量的継代法により SM (10,000 γ /cc) 耐性を獲得せしめたものを SM 耐性株として使用した。

培養方法： 特殊の場合以外は SM (硫酸 Dihydrostreptomycin) を 5,000 γ /cc の割に普通寒天に加えて混和 (この際温度 50°C 以下) し、平板となし 37°C に 16—18 時間培養したものを用いた。

半合成培地としては下記の組成のものを用い、之にも同じく 5000 γ /cc の SM を混和し、平板となしたものに 16—18 時間或いは所定の時間培養したものを使用した。耐性、感受性株の培養は総て厳密に同一の条件で同時に同一時間行なうように努めた。

KH ₂ PO ₄	0.35 gr	Na ₂ HPO ₄	2.5
MgSO ₄	0.001	NaCl	11.0
Peptone	10.0	glucose	2.0
常 水	1,000 ml.	pH	7.2

細菌浮游液： 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2) にて 2 回遠沈洗滌後、再び同組成の緩衝液に浮游せしめ、菌量はプルフリッヒの比色計を用いて比濁法により決定した。

呼吸量測定： ワールブルグの検圧計を用い 37.5°C にて常法に従つて測定した。脱炭酸の測定はワールブルグの間接法に依つた。実験は全て duplicate に行なつた。

基質及び阻害剤： 基質は終濃度が M/100 となるように再蒸溜水に溶解し、pH 7.2 となるように

酸及びアルカリにて修正して用いた。阻害剤も再蒸溜水にて終濃度が所定の濃度となるように溶解し、同じく pH を 7.2 に修正して使用し、尚主室に添加して 15 分間振盪する事により菌体内への浸透を充分ならしめるようにした。

Glucose の定量： 3.5-dinitrosalicylic acid による比色法⁽⁷⁾で測定

Pyruvate の定量： Friedmann and Haugen の方法⁽⁸⁾に倣つた。

Lactate の定量： P-hydroxybiphenyl acid による比色法⁽⁹⁾によつた。

acetate の定量： 試料液を H₂SO₄ にて酸性にした後、水蒸気蒸溜し、その溜出液を M/100 NaOH にて滴定して定量した。

実験成績

第1節 各種基質呼吸の比較

耐性、感受性株の代謝上の差異が何れにあるかを究明する端緒として、表 1 の如き各種基質について検圧計により酸素消費を測定して比較した。菌体は普通寒天培養 16 時間菌を使用し、耐性株としては常に 5,000 γ /cc の割に SM を加えた培地に培養する事によつて極力厳密に SM 高度耐性のものを選択するように努めた。

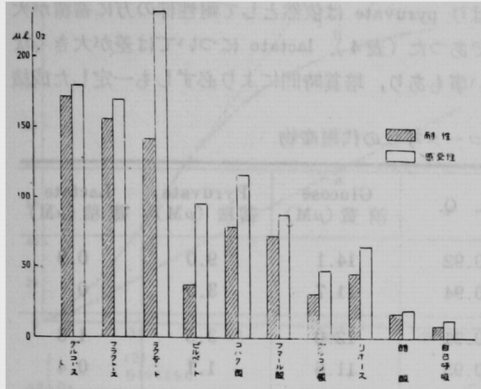
第 1 表 普通寒天培養菌の基質酸化能

基質	株の種類	
	耐 性	感 受 性
Glucose	130 μ l	140
fructose	149	160
Lactose	6	7
Mannit	60	55
α -glycerophosphate	195	200
gluconate	29	31
ribose	45	60
pyruvate	64	127
acetate	13	15
α -ketoglutarate	63	76
succinate	266	313
fumarate	158	203
malate	250	310
alanine	153	194
glutamate	90	113
aspartate	259	270
glycine	33	42
Endog. Resp.	7	8

菌液 (湿菌量 10 mg) 2.0 cc, 基質 (10⁻²M, 終濃度) 0.3cc, 全量 3.0cc, pH 7.2, 37.5°C, 1hr.

又 glucose を 0.2% の割に加えた半合成培地 (G-P 培地と略す) 培養の菌体についても各種基質呼吸を比較測定した (図 1)。各種基質の中糖類

第 1 図 G-P 培地培養菌の基質酸化能



菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質 M/100 (終濃度), 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 1 hr.

として glucose, mannite, fructose の酸素消費は耐性, 感受性共に余り差はなく, 一般に糖代謝中間物に差異が同われ, pyruvate に於いて最も目立ち, 常に耐性株に於いてその酸素消費が低く, 感受性株の約半分の値しか示さなかつた。

lactate, alanine も耐性株に於いて低い。TCA intermediates についても一般に耐性株の方が低い値を示したが, succinate, fumarate, malate, glutamate は時に感受性株と殆んど同じか或いは逆にやや高い値を示す事があつた。lactose は両株共酸素吸収がみられなかつた。G-P 培養のものは pyruvate 以下の代謝が不円滑になつていて, この実験でも pyruvate 及び TCA intermediates の呼吸は普通寒天培養のものより割合が低くなつてゐる。

以上の事が種々異なつた培養時間の菌体について云えるかどうかを明らかにする為に表 2 の如くに 12, 14, 18, 22 の各時間培養菌について主な基質の酸素消費を測定した所, やはり 16 時間培養菌と同じ傾向

第 2 表 培養時間別による基質酸化能 (G-P 培地培養菌)

基 質	培養時間		12 時 間 菌		14 時 間 菌		18 時 間 菌		22 時 間 菌	
	株の種類		耐 性	感受性	耐 性	感受性	耐 性	感受性	耐 性	感受性
Glucose			221 μ l	263	149	157	104	163	59	160
Lactate			143	283	123	206	50	173	27	170
pyruvate			44	96	32	80	30	77	20	70
succinate			52	107	46	98	32	85	28	77
fumarate			46	98	38	75	35	61	19	68
Endog. Resp			11	10	8	10	11	12	10	15

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質 $10^{-2}M$ (終濃度) 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 1 hr.

を示し, 特に pyruvate の酸素消費が耐性株で低い値を示した。

第 2 節 Glucose 呼吸と代謝産物

次に更に耐性変異を代謝変異の観点から追究する為に好氣的及び嫌氣的 glucose 代謝に於ける代謝終

産物の分析を行なつた。前述の如く glucose を加えた特別の半合成培地を作り之に両株を各々培養したものを型の如く静止菌浮游液となし, 先ず好氣的代謝としてワールブルグ検圧計で呼吸を測定しつつ 180 分後にその代謝産物を分析した。その結果表 3

第 3 表 グルコース呼吸と代謝産物

培 地	測定対称株の種類	O ₂ 消費 (μ M)	CO ₂ 発生 (μ M)	R. Q.	Glucose 消費 (μ M)	Pyruvate 蓄積 (μ M)	Lactate 蓄積 (μ M)	acetate 蓄積 (μ M)
G-P 培 地	耐 性	21.0	19.1	0.91	15.3	21.0	1.8	1.5
	感 受 性	24.0	22.6	0.94	13.5	2.4	0.9	0.8
普通寒天培地	耐 性	21.0	19.9	0.95	7.8	0.8	0.6	0.7
	感 受 性	23.5	22.8	0.97	8.4	0.4	0.4	0.4

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質 $\frac{M}{100}$ (終濃度) 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 3 hr 値

の如く耐性、感受性株共に pyruvate, lactate, acetate の蓄積を見出す事が出来たが、特に耐性株に於いては pyruvate の蓄積が著明に見られた。lactate, acetate は僅かに耐性株の方が大であつた。基質 glucose の消費量は両株共大差がなく殆んど等しいか時に培養条件（菌体の播種の仕方等）により耐性株の方が多少多い傾向がみられる事があつた。

勿論 glucose 1 mol 当りの酸素消費は耐性株の方が少ないことになる。16時間培養菌ではそうであるが他の培養時間ではどうかを検討する為に12, 14, 18, 22時間各培養について分析を行なつた所やはり pyruvate は依然として耐性株の方に蓄積が大であつた（表4）。lactate については差が大きくない事もあり、培養時間により必ずしも一定した成績

第4表 培養時間別グルコース呼吸の代謝産物

培 地	測定対象 株の種類	O ₂ 消費 (μ M)	CO ₂ 発生 (μ M)	R. Q.	Glucose 消費 (μ M)	Pyruvate 蓄積 (μ M)	Lactate 蓄積 (μ M)
G—P 培地 12 時間	耐 性	19.5	17.9	0.92	14.1	9.0	0.9
	感 受 性	23.0	21.6	0.94	11.7	3.0	0
G—P 培地 14 時間	耐 性	18.6	16.9	0.91	12.0	3.5	1.3
	感 受 性	20.8	19.3	0.93	11.6	1.1	0.4
G—P 培地 18 時間	耐 性	13.0	11.8	0.91	10.8	9.4	1.3
	感 受 性	15.5	14.6	0.94	10.8	1.3	0.2
G—P 培地 22 時間	耐 性	5.3	4.7	0.89	10.3	6.6	0.7
	感 受 性	14.2	12.8	0.90	11.8	0.69	3.9

菌液2.0 cc (湿菌量10 mg), 基質 $\frac{M}{100}$ (終濃度) 0.3 cc, 全量3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 3 hr 値

が得られなかつた。R. Q. からは特別の差異は解析出来なかつた。

嫌気的実験として Thunberg Tube を用いロータリーポンプにて 10 mmHg 迄減圧した後、37°C のフラン器に3時間保つた。反応終了後分析した結果は表5の如く（16時間培養菌）耐性、感受性共に

第5表 嫌気的グルコース代謝

株の種類	測定対象	基質消費 (μ M)	Pyruvate 蓄 積 (μ M)	Lactate 蓄 積 (μ M)
I	耐 性	18.6	0.81	3.9
	感 受 性	16.2	0.81	2.4
II	耐 性	22.8	1.24	4.3
	感 受 性	18.0	0.54	1.6

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質 $\frac{M}{100}$ (終濃度) 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 3 hr 値

pyruvate と lactate の多量の蓄積が起つたが、両株の間に有意の差はみられなかつた。

Glucose 加半合成培地培養菌で両株間に著明な差を見出し得たので、普通寒天培養菌体についてはどうかを厳密に検討してみた。

表3の如く普通寒天16時間培養菌で矢張りその glucose の呼吸に於いて pyruvate の蓄積を来し—G—P 培地培養のものより少なかつたが一耐性株の方に大なる蓄積がみられた。lactate, acetate, も少量ではあるが蓄積があり、共に耐性株の方が蓄積量が大きであつた。

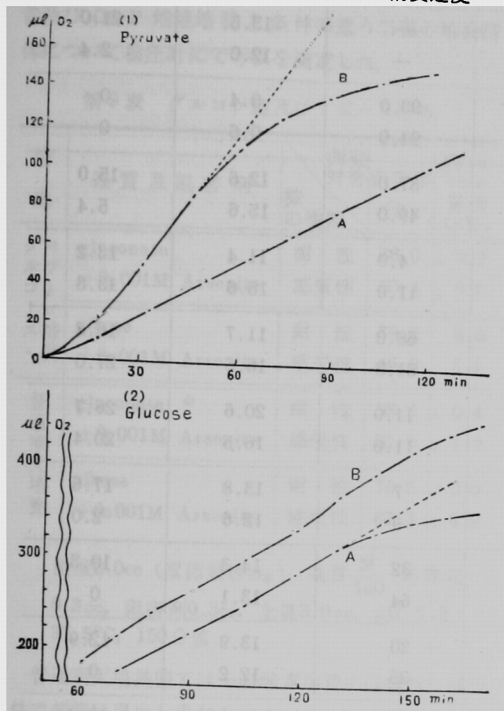
第3節 Glucose 及び Pyruvate の消費速度

以上 glucose の aerobic な代謝に於いて耐性株はその中間代謝物たる pyruvate の代謝が阻まれて蓄積する事を知つたので、この点を更に検討する為に、G—P 培地16時間培養菌を集菌し、型の如く菌量を厳密に測定して静止菌浮游液を作り、pyruvate ($\frac{M}{100}$) を基質として呼吸を行なわせ、その酸素消費曲線を描いた。そして基質が全消失する時間を耐性、感受性株について比較した所図2にみられるように、耐性株の pyruvate 呼吸は低く、基質の全量消費も120分迄に招来しなかつたが、感受性株では既に60分で呼吸が低下し始め、120分の後には殆んど消失してしまうのが伺われた。

glucose については終濃度 $\frac{M}{400}$ で呼吸を試み、耐性株は呼吸率が感受性株より低いに拘らず既に

140分の近くで低下し始めて、基質消費量が感受性株を上廻る傾向がみられた。

第2図 ビルビン酸及びグルコース消費速度



菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質: Pyruvate M/100 (終濃度), Glucose M/400 (終濃度) 0.3cc, pH 7.2, 全量 3.0 cc, 37.5°C
A: 耐性株 B: 感受性株

第4節 SM 非含有培地継代と Glucose 代謝の関係

glucose 呼吸に於いて、耐性株の pyruvate 代謝不全と云う性質が SM 非含有培地に幾代も継代した後も尚保有されているかどうかを検討した。SM 非含有 G-P 培地並びに SM 非含有普通寒天培地に2代、7代、30代継代した耐性株各々の静止

菌浮游液についてその酸素消費及び代謝産物を分析した所、矢張り耐性株に於いて pyruvate 蓄積量が大きであつた。表6は30代継代のものについての成績を示す。lactate も若干の蓄積がみられた。而して耐性度を検討した結果は、充分もとの 10,000 γ/cc 耐性を保持していた。

以上より SM 非含有培地に継代しても耐性化と共に起つた代謝上の変異が尚維持されている事が分つた。

第5節 Glucose 呼吸に対する阻害剤及び金属イオンの影響

glucose の代謝を更に追究する為に、G-P 培地培養の静止菌に数種阻害剤及び金属イオンを添加して代謝中間物としての pyruvate 蓄積の変動を調べた。即ち、表7の如く CH_3COOH は 10^{-3}M で強い阻害を示し、従つて中間産物としての pyruvate は全く蓄積しなかつた。KCN も 10^{-3}M で相当の呼吸阻害を示したが、pyruvate 蓄積には著しい動きはなかつた。 NaN_3 は 10^{-2}M で呼吸は両株共に促進されたが、pyruvate 蓄積は感受性株で大になり、耐性株では殆んど変りはなかつた。2, 4-DNP も 10^{-3}M で呼吸促進的に働いたが、代謝中間物たる pyruvate の蓄積は耐性、感受性共に却つて増大した。

Arsenite は 10^{-3}M で両株共に呼吸阻害を示し、pyruvate の蓄積は増大した。Arsenite は pyruvic oxidase の阻害剤と見做されているが、この実験でも pyruvate 以下が全く阻害されている事が推定され、耐性、感受性共に glucose 1 mol 当り 1 mol 以上の pyruvate の蓄積が起つた。

次に金属イオンであるが、二価金属イオンとしては Mg^{++} には MgSO_4 、 Fe^{++} には FeSO_4 を使用した。 Mg^{++} は 10^{-3}M で glucose 呼吸を促進した。即ち耐性株は35%促進され、感受性株は64%の促進を受けて促進率は感受性株の方が大であつ

第6表 SM 非含有培地継代 (30代) 株のグルコース呼吸と代謝産物

	測定対象株の種類	O ₂ 消費 (μM)	CO ₂ 発生 (μM)	R. Q.	Glucose 消費 (μM)	Pyruvate 蓄積 (μM)	Lactate 蓄積 (μM)
G-P 培地 16 時間	耐性	20.0	18.0	0.90	15.0	14.0	2.0
	感受性	21.2	19.5	0.92	14.0	1.8	0.8
普通寒天培地 16 時間	耐性	18.0	16.9	0.94	7.5	0.9	0.8
	感受性	18.5	17.9	0.97	8.0	0.1	0.3

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg), 基質 $\frac{\text{M}}{100}$ (終濃度), 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 3 hr 値

第 7 表 グルコース呼吸に対する阻害剤及び金属イオンの影響

基 質 及 阻 害 剤	測定対称	O ₂ -uptake (μM)	阻 害 率 (%)	基 質 消 費 (μM)	Pyruvate蓄積 (μM)
	株の種類				
Glucose	耐 性	20.5	—	13.5	21.0
	感 受 性	23.5	—	12.0	2.4
+ CH ₂ ICOCH 10 ⁻³ M	耐 性	0.7	93.0	0.4	0
	感 受 性	0.8	94.0	0.6	0
+ KCN 10 ⁻³ M	耐 性	13.0	37.0	12.6	15.0
	感 受 性	12.0	49.0	15.6	5.4
+ NaN ₃ 10 ⁻² M	耐 性	21.5	+ 4.0	11.4	13.2
	感 受 性	26.0	+ 11.0	15.6	13.8
+ Arsenite 10 ⁻³ M	耐 性	9.0	58.0	11.7	16.8
	感 受 性	12.5	51.0	16.6	27.0
+ 2,4-DNP 10 ⁻³ M	耐 性	22.6	+ 11.0	20.6	26.7
	感 受 性	26.8	+ 11.0	16.5	20.4
+ SM 10 ⁻³ M	耐 性	21.9	+ 7	13.8	17.6
	感 受 性	25.6	+ 9	12.6	2.0
+ Mg ⁺⁺ 10 ⁻³ M	耐 性	26.7	+ 32	14.3	10.3
	感 受 性	38.5	+ 64	13.1	0
+ Fe ⁺⁺ 10 ⁻³ M	耐 性	23.1	+ 20	13.9	12.9
	感 受 性	31.8	+ 35	12.2	0
+ パントテン酸 Ca. 1mg/cc	耐 性	20.5	0	14.0	18.4
	感 受 性	29.5	+ 25.0	12.5	0

菌液 (湿菌量10 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度10⁻²M), 0.3 ml, pH 7.2, 37.5°C (3時間値)

た。

Fe⁺⁺ も大体同様の傾向がみられた。ついで、パントテン酸の影響も調べてみたが、感受性株の呼吸は25%促進を受け、耐性株は殆んど影響を受けなかった。そして耐性株の pyruvate 量も殆んど対照と変りがなかった。

glucose 呼吸に対しては SM を添加した実験では SM がその呼吸にも代謝産物にも殆んど影響を与えない事を知つたので、glucose (M/100) に glutamate (M/100) を添加して之を基質とし、之に SM 200 γ /cc の割合に加え、ワールブルグ検圧計にて呼吸を測定し、且150分後に容器内容について pyruvate を分析定量した。その結果は耐性株には矢張り pyruvate の蓄積が著しかつたが SM の添加によつて pyruvate 蓄積量は増大せず寧ろ SM を添加しないものより pyruvate 消費が進んでいる傾向がみられた。感受性株でも SM 添加に拘らず、pyruvate 蓄積量は殆んど変らず、之も寧ろ少ない

傾向がみられ、呼吸も全く阻害されなかつた (表 8)。

第 8 表 グルコース呼吸に対するグルタミン酸の影響

株の種類	測定対称	O ₂ -uptake (μ M)	glucose消費 (μ M)	Pyruvate蓄積 (μ M)
	基質及阻害剤			
耐性	Glucose	19.4	15.9	9.6
	Glucose + glutamate	27.4	15.9	8.4
	Glucose + glutamate + SM	26.1	16.0	6.9
感受性	Glucose	22.5	16.2	0.87
	Glucose + glutamate	32.2	16.8	0.54
	Glucose + glutamate + SM	32.3	16.2	0.60

菌液 (湿菌量 10 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 10⁻²M) 0.3 ml, 全量 3.0 ml, pH 7.2, 37.5°C, 150分値

第6節 Gluconate 及び ribose 呼吸

gluconate 及び ribose 酸化について両株間に差がないかどうかを調べる為、表9の如く普通寒天培養及び G—P 培地培養と条件の違う二種の培養菌体について検圧計にて呼吸を測定した。

第9表 グルコン酸及びリボース呼吸

培地	基質及阻害剤	測定 対称	阻害率 (%)	Pyruvate 蓄積 (μ M)
		株の種類		
グ ル ブ コ ン ス 培 養	gluconate +0.001M Arsenite	耐性	56.0	0.9
		感受性	50.4	0.6
	ribose +0.001M Arsenite	耐性	39.0	5.0
		感受性	46.0	6.8
普 通 寒 天 培 養	gluconate +0.001M Arsenite	耐性	58.0	0.4
		感受性	51.0	1.2
	ribose +0.001M Arsenite	耐性	75.6	3.9
		感受性	57.3	6.9

菌液2.0cc (湿菌量10mg), 基質 $\frac{M}{100}$ (終濃度)
0.3cc, 阻害剤0.3cc, 全量3.0cc, pH 7.2,
37.5°C, 150分値

普通寒天培養菌ではその酸素消費には耐性, 感受性で差異は見出し得なかつた, G—P 培養菌でも矢張り両株間に差はみられなかつた。そこで更に pyruvic oxidase の阻害剤である Arsenite を添加して呼吸を行なわせ, その代謝産物として, pyruvate が表われるか否かを分析してみた所, 両株共に表9の如く代謝産物として pyruvate を検出する事が出来, gluconate, ribose が via pyruvate に代謝される事は確実となつたが, pyruvate 蓄積量は両株共大差なく, その呼吸値も共に値が低くて同程度のものではあつた。

第7節 培養条件と発育との関係

耐性, 感受性株の glucose 代謝が異なる事がこれ迄の実験で推定されたので, それを更に端的に確かめる為に両株の発育実験を行なつた。

即ち振盪培養と静置培養で発育量を時間的に追跡し, 尚 glucose を種々濃度に添加する事により, その発育が如何に影響を受けるかを光電比色計で測定した。先ず普通寒天平板培養20時間の菌体を無菌的に集菌後遠沈洗滌したものを表10の如く種々濃度に

第10表 振盪培養 (150分値)

株の種類 初濃度	耐性 (-log T)	感受性 (-log T)
グルコース	0.11	0.11
0.0 mg%	0.31	0.68
0.1	0.39	0.87
0.5	0.41	0.94
1.0	0.49	1.02

glucose を加えた pepton 水に浮游した。この培養液は振盪培養で充分空気と接触出来るように 50 cc コルベンに 10 cc の割で入れ, 菌体は比濁計にて 0.11 (-log T) の濁度に浮游せしめた。そして毎分 120回の振盪にて2.5時間培養した後, その濁度を比色計にて測定した。その結果は表10に示す如くで glucose (—) の peptone 水で明らかに感受性株の発育は著しく, glucose 添加でその発育量は著明に増大した。耐性株はそれに比べ振盪培養では感受性株よりずっと発育量が低く, glucose を加えても感受性株より全て発育が悪かつた。次に静置培養にて実験を試みたのであるが, 之は同じく試験管に所定の培養液を 6 cc づつ注加し, 20時間普通寒天斜面培養1白金耳を 10 cc 生理的食塩水に浮游させ, その1白金耳を接種して 37°C フラン器に収めた。培養液は前実験同様に 0.1, 0.5, 1.0mg% の割に glucose を添加した pepton 水である。菌の発育は光電比色計にて透過率で測定した。その結果は表11に示す如くであり, glucose (—) の pepton 水培養では矢張り耐性株の発育が悪くて 4, 7, 9.5, 15, 22 の各時間に亘り全て発育は感受性株より遅れている。然し glucose を添加した場合は, 9.5時間目で逆に耐性株

第11表 静置培養 (per cent light transmittance)

培養時間 株の種類	4 時間		7 時間		9.5 時間		15 時間		22 時間	
	耐性	感受性	耐性	感受性	耐性	感受性	耐性	感受性	耐性	感受性
0.0mg%	103.0	89.0	82.0	60.0	57.0	52.5	48.0	41.0	41.0	35.0
0.1	100.0	88.0	53.0	36.0	27.0	30.5	/	/	/	/
0.5	97.0	90.0	45.0	34.0	26.5	30.5	/	/	/	/
1.0	100.0	90.0	44.0	34.0	27.5	32.5	/	/	/	/

の発育が良くなって感受性株を凌駕しているのがみられた。又 glucose を添加すると、両株共その発育は極めて良くなった。

総 括 及 び 考 案

前述の如く赤痢菌駒込 BIII の SM 耐性変異を glucose 代謝の面より追究したが、先ずその端緒として耐性、感受性株の基質酸化能の一般を伺う為に、glucose 及び fructose、その中間代謝産物を基質として、普通寒天培養16時間菌及び G—P 培地培養16時間菌の静止菌浮游液についてその酸素消費を測定比較した所、glucose 及びその TCA intermediates については、耐性株がやや低い傾向がみられた程度であるが、glucose 中間代謝の主要な分岐点と云うべき pyruvate の酸素消費は、耐性株に於いて低いのが目立っていた。これ等の事は12, 14, 18, 22時間各培養の菌体についても同様の事が云えた。

Umbreit et al.¹²⁾によると、TCA intermediates の基質呼吸でその oxidation rate は耐性株が感受性株よりも著しく低く、感受性株の1/4~1/5の値を示しているが、これは 35,000 γ/cc (SM) に高度耐性化した *E. coli* の Murray strain と 20,000 γ/cc 耐性の Gratia strain に関するもので、筆者の場合と異なつた成績であるが、これ迄の報告にもみられるように、このような耐性化に伴う代謝変異が、菌種並びに菌株特異的である事を思えばこの事のみからは何も論じる事は出来ないと思う。然し一方藤井²⁰⁾は *E. coli* についての実験で特に pyruvate 基質の場合、耐性株の O₂ 消費が低い事を報告して居り、筆者の場合と同じ成績を得ている。そこでこれ等は耐性化によつて少なく共、何等かの代謝変異が起つていであろう事を暗示する。それ故更に glucose 代謝について詳細に追究した。

即ち耐性、感受性株の glucose 呼吸に於ける代謝産物を分析した所、G—P 培養菌では両株共 glucose 基質で明らかに pyruvate の蓄積を認め、耐性株にその量が大であり、単位時間内の基質 glucose 消費量は殆んど同じか或いはやや耐性株の方が大であつたが、酸素消費は耐性株がやや少なかつた。殊に pyruvate 蓄積量は耐性株がずっと感受性株より大であつた。lactate, acetate もその量は少なかつたが検出され、矢張り耐性株の方の蓄積量が大であつた。然し内藤¹⁴⁾、中塚¹⁵⁾等の報告にも見られるように、一般に抗生物質耐性株は発育が感受性株よりずっと遅れる事が考えられるので、他の培養時間の

菌体についても云う事が出来るかどうかを検討したが、培養時間による変動はなくて16時間培養菌と同じ傾向にある事を知つた。

Sevag & Rosanoff¹⁶⁾も矢張り *E. coli* について glucose と pyruvate の代謝を相互の関聯に於いて研究し、glucose 基質の場合 pyruvate 蓄積量が耐性株に大であり、lactate の蓄積も著明で、glucose 分解が嫌氣的に行なわれ殆んど lactate の方に行つてしまい、且耐性株の glucose 消費が抑制されて代謝は多分に酵酵的になつてしていると報じているが、筆者の場合は pyruvate については同じような結果であるが、lactate はそれ程蓄積が大でなく、消費 glucose の殆んどが lactate になつていゝとは考え難かつた。glucose の消費量も両株について、それ程大きな差はみられなかつた。これ等の事を更に確める為に、glucose, pyruvate 基質での酸素消費と基質全消失の時間を測定してみた所、耐性株の pyruvate 消失速度は勿論遅かつたが、glucose 消失速度は、寧ろ耐性株の方が高く表われた。然し耐性株のグルコース 1mol 当りの酸素消費量は感受性株より低く矢張り赤痢菌駒込 BIII の耐性株は glucose 代謝が多分に好氣的性格を欠いている事が推定される。普通寒天培養菌についても詳細によく検討してみると、G—P 培養菌体程 pyruvate の蓄積は多くなかつた—TCA cycle がよく発達している為であろう—が矢張り耐性株の方が感受性株より蓄積が大であつた。次に glucose 代謝を嫌氣的条件下で検討してみたが、この場合は両株間に有意の差は発見出来ず、その代謝変異が好氣的代謝と密接な関連のある事を想像させる。即ち赤痢菌駒込 BIII の場合、glucose の aerobic な代謝では、感受性株の pyruvate 分解は活発であるが、耐性株では glucose の中間代謝物たる pyruvate 以後の代謝が悪い為に殆んどそのまま蓄積し、pyruvate→lactate の嫌氣的径路も振盪培養下では充分作用出来なくて、pyruvate の代謝が遅滞したものと考えられる。かくて筆者の場合、赤痢菌駒込 BIII が SM 耐性化する事によつて、その代謝変異が起る事が愈々確実になつて来た。

次にこの性質は SM (—) の培地に耐性菌を継代しても尚保有されているかどうかを調べた。多くの薬剤耐性菌 (有機 As 剤等)の中には薬剤非含有培地に継代する事により、直ちにその耐性が消失する所謂適応耐性と云うべきものがあるが、SM の場合は30代継代後も耐性は元のように維持されて居り、その代謝上の特徴 (前述) もそのまま保有されてい

た、即ちその代謝上の変異は SM 耐性化によつて起きた比較的安定した変化であると考えられる。

次にこの glucose 代謝に対する阻害剤及び金属イオンの影響をみたのであるが、 CH_3COCH は最も強く阻害があり、両株共に pyruvate の蓄積はみられず、窒化ソーダと 2,4-Dinitrophenol は促進的に作用して何れも pyruvate の蓄積を増大した。窒化ソーダと 2,4-Dinitrophenol の作用機序については現在迄に多数の報告があり、前者はチクローム系も阻害する、或いは酸化的磷酸化を阻害すると云われ、後者は酸化的磷酸化の阻害剤であると云われているが、耐性、感受性株共酸化的磷酸化—oxidative assimilation—の抑制を受けて、glucose の消費が促進され且 pyruvate 以下の代謝が阻害されて、pyruvate 蓄積が増大したものと思われる。Arsenite は pyruvic oxidase の阻害剤と見做され、本実験に於いても pyruvate の蓄積が増大し呼吸も著しく抑制された。そして耐性、感受性株共に glucose 消費 1 mol に対して pyruvate 1 mol 以上の蓄積を来している事より両株共、Embden-Myerhof 径路による glucose 分解が行なわれる事が推定される。又 SM 添加では共に glucose 呼吸は阻害されないばかりか寧ろ促進され、pyruvate 蓄積量にも殆んど変動がなかつた。而して阻害実験からは耐性、感受性株間に特別の差異を解析する事は出来なかつた。

二価金属イオンとして Mg^{++} では感受性株が 64% 促進されているが、耐性株では 30% 促進で促進率が低い。然し基質 (glucose) 消費は殆んど変化がない所からみると、この促進は少しでも完全酸化に近づけた為の呼吸値の増加であろうと考えられる。 Fe^{++} でも矢張り促進がみられたが耐性株で低い事は、 Mg^{++} の場合と共に興味ある事実と考えられ、又、パントテン酸によつて感受性株の促進は著明であつたが、耐性株では少なかつた。これ等の事については更に次後の実験に俟ちたい。

glucose 呼吸に対するグルタミン酸の影響はその代謝に著しい変動を与えず、SM もこの二種組合せ基質での呼吸に何等阻害効果を表わさず、耐性、感受性株間に差異は見出し得なかつた。

従来の研究報告より glucose と pyruvate 間の分解径路として、Embden-Myerhof 径路、glucose dehydrogenase 系の三つが主として考えられるのであるが、前述のように耐性、感受性株共 glucose 分解が Embden-Myerhof 径路によつて行われる可

能性が強い。而して gluconate 及び ribose を比較的良好に酸化出来る故に同時適応の原理²¹⁾²²⁾より推しても、Warburg-Dickens 径路の存在が益々予想される。この点を更に確める為に、gluconate、及び ribose を基質にしてこれに Arsenite を添加し 2 時間後分析した所、両株共に pyruvate を検出する事が出来た。従つて gluconate、及び ribose が pyruvate 経由で分解される事が確実化し、尚両者の呼吸値も同程度であるので、耐性、感受性株共に同程度に、Warburg-Dickens 径路の関与がある事が想像される。

次に glucose を種々濃度に添加した pepton 水中に於ける耐性、感受性株の発育の比較であるが、先ず振盪培養に於いて明らかに耐性株の発育度は悪く、glucose を添加したものでも尚発育は悪い。glucose 添加による発育量の増大も、感受性株の方が著明である。即ち耐性株では好氣的な代謝系が感受性株よりも衰えている事が推定出来る。37°C に於ける静置培養の比較でも耐性株の発育は悪く pepton 水では 22 時間を通じて発育率が悪い。然し glucose 添加のものでは 10 時間前後より逆に耐性株の発育がよくなつており、之は好氣的振盪培養下では抑えられた glucose の嫌氣的利用が、静置培養では一酸素の供給が悪い故一却つて活発化して glucose が利用された為にその発育が良好になつて来たものと思われる。かくて耐性株の代謝は多分に酵素的であることが考えられる。

Umbreit et al¹²⁾ の報告でも振盪培養並びに静置培養で、E. coli の耐性株の発育が悪く、殊に振盪培養での発育率は耐性株が非常に低い事を報告して居り、筆者の場合と同じような結果を得ている。即ち駒込 B_{III} SM 耐性株は pyruvate 以下の好氣的代謝が悪く、その発育のエネルギーも pyruvate 以前の代謝に頼っている為に、エネルギー獲得の効率が悪く発育が遅延して来るものと考えられる。

以上が赤痢菌駒込 B_{III} SM 耐性株の glucose 代謝について得られた結果についての総括及び考案であるが、pyruvate 以下の代謝についての詳細は更に今後の実験に期したいと考える。

結 論

筆者は教室保存の赤痢菌駒込 B_{III} を用い、in vitro で SM に高度耐性化し、耐性株と感受性株間の glucose 代謝性状の差異を生理学的に比較検討して以下の如き結果を得た。

1. SM 耐性株は主な TCA intermediates の中特に pyruvate の呼吸が感受性株よりも低い。

2. glucose を基質とする好氣的代謝に於いて、耐性、感受性株共に pyruvate, lactate, acetate の蓄積が認められるが、耐性株は感受性株より pyruvate 蓄積が大である。lactate, acetate の蓄積量は共に少ないが、矢張り耐性株の方がやや大なる傾向がある。基質 glucose 消費量は著差がない。

3. glucose の嫌氣的代謝に於いては、耐性、感受性株間に有意の差はない。

4. SM 非含有培地に継代した耐性株についても上記の性質は尚保持されている。勿論 SM 耐性も充分持続している。

5. 基質呼吸及び阻害実験より、耐性、感受性株共 glucose-pyruvate 間は主として Embden-Myerhof 経路による事及び僅かであるが、Hexose monophosphate pathway 関与も存在する事が推定

される。

6. 振盪培養に於いて感受性株の発育が耐性株の発育よりも著しく良好である。

7. 以上より SM 耐性株の glucose 代謝は多分に酵酵的であり、その pyruvate 以前の分解経路は感受性株と大差がなくて、寧ろ pyruvate 以下の aerobic な代謝に主要な差異がある事が考えられる。

本論文の要旨は1958年11月第11回日本細菌学会中国四国地方支部総会に於いて発表

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて種々御協力下さった教室員各位に感謝する次第であります。

参 考 文 献

- 1) Demerec, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 31, 16, 1945.
- 2) Demerec, M.: J. Bact., 56, 63, 1948.
- 3) Dean, A.C.R. and Hinschelwood, C.: Adaptation in micro-organisms. 21, Cambridge, 1953.
- 4) 秋葉朝一郎: 医学のあゆみ, 13, 200, 1952.
- 5) O. Wyss, and G.E. Schaiberger, : J. Bact., 66, 49, 1953.
- 6) Klimek, J.W., Cavallito, C.J. & Bailey, J.H.: J. Bact., 55, 139, 1948.
- 7) 日比野: 結核, 29, 増刊号, 28, 1945.
- 8) Lederberg, J.: J. Bact., 59, 211, 1950.
- 9) 榊原: 医学と生物学, 18, 336, 1951.
- 10) 石井: 阪市医大誌, 2, 214, 1953.
- 11) 桑原他: 衛生試験所報告, 71, 97, 1953.
- 12) Patricia H. Smith, Evelyn L. Oginsky, and Wayne W. Umbreit, . J. Bact., 58, 761, 1949.
- 13) 桑原章吾: 医学のあゆみ, 24, 338, 1957.
- 14) 内藤・J. Antibiotics, 6, 251, 1953.
- 15) 中塚, 荒谷・J. Antibiot., 4, 141, 1950.
- 16) Rosanoff, E.I. & Sevag, M.G.: Antibiot. Chemoth. 3, 495, 1953.
- 17) 標準生化学実験: 18, 1953.
- 18) 標準生化学実験: 36, 1953.
- 19) 標準生化学実験: 35, 1953.
- 20) 藤井: 鹿児島大学医学雑誌, 7, 527, 1955.
- 21) 須田等: 酵素化学シンポジウム, 1, 73.
- 22) R. Y. Stanier: J. Bact. 54, 339, 1947.
- 23) Umbreit, W.W., J. Biol. Chem., 177, 703, 1949.
- 24) Oginsky, E.L., Smith, P.H., and Umbreit, W.W., J. Bact., 58, 747, 1949.
- 25) Sevag, M.G., & Rosanoff, E.I.: J. Bact., 63 (2), 243, 1952.
- 26) English, A.R., & McCoy, E.: J. Bact., 67, 19, 1951.

Physiological Studies on the Metabolic Activities of Streptomycin-Resistant *B. Dysenteriae*.

1. The Carbohydrate Metabolism of Streptomycin-Resistant *Sh. flexneri* 2 a

By

Kiyoshi Kawai

Department of Microbiology Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

The resistance to streptomycin should be demonstrated by some differences in metabolic reactions detectable by comparisons made between resistant and susceptible bacteria. This paper is concerned with the examination of the glucose metabolism of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant strains of *Sh. flexneri* 2 a.

The resistant strains were obtained by serial transfers in progressive levels of streptomycin. This resistant variant could withstand at least 10,000 γ per ml of streptomycin.

1) The oxidative abilities of the resistant strains is considerably less on pyruvate among the components of the citric acid cycle than is that of the susceptible strain.

2) Pyruvic acid, lactic acid, and acetic acid accumulates during the oxidation of glucose by resistant and susceptible strains. The amount of pyruvic acid produced from glucose by resistant strain is more than that by susceptible strain. In the rate of consumptions of glucose between resistant and susceptible strains there is much less difference.

3) No significant difference between both strains is detected in anaerobic metabolism of glucose.

4) Resistant strains which have grown on continued subculture by serial transfer in the medium not containing streptomycin possess still these properties. This culture was also found to be resistant to at least 10,000 γ per ml of streptomycin.

5) It is suggested that streptomycin-resistant and susceptible strains dissimilate glucose mainly by way of Embden-Myerhof pathway, and also have Warburg-Dickens pathway as an alternate pathway.

6) Streptomycin-susceptible strain grows more rapidly than streptomycin-resistant strain in shaking culture.

7) These results suggest that streptomycin-resistant strain is more fermentative in the metabolism of glucose than streptomycin-susceptible strain, and a significant difference between streptomycin-resistant and streptomycin-susceptible strains exists in pyruvate metabolism and its terminal respiration system.
