

抗生物質耐性菌の生理学的研究

第 1 編

ストレプトマイシン依存性大腸菌の生理学的研究

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上栄教授）

林 生

〔昭和33年9月16日受稿〕

緒 言

細菌に対して化学療法剤を作用させると、菌は早かれ晩かれ、多少ともその薬剤に対して耐性を獲得して来る。そしてこの薬剤耐性ということは化学療法に於て最も重要かつ煩わしい問題の一つである。そしてこの問題に関しては従来耐性獲得の機作、耐性の持続、交叉耐性、耐性菌の毒力、耐性獲得の防止等の諸点から追究されて来ている。又耐性菌の生理という課題は単に細菌学的興味を引くのみでなく、耐性菌の毒力、交叉耐性の機作、耐性獲得の防止から更により耐性を生じ難い化学療法剤の追究乃至製造につながる極めて重要な問題である。

一般的にいつて、諸種化学療法剤中ストレプトマイシン（以下 SM）に対しては菌は最も耐性を獲得し易く、ついでサルファ剤（以下 SF）、ペニシリン（以下 P）、クロロマイセチン（以下 CM）に対して耐性となり易く、テトラサイクリン系抗生物質に対しては比較的耐性となり難いことが報告されている¹⁾。これら薬剤に対する耐性獲得の機作に関しても、Demerec 等²⁾ のいう “Spontaneous mutation and selection” に対し、秋葉等は少くとも SM だけは Mutagenic effect をもつとし、このことが SM が最も耐性を生じ易い由縁であるとしている¹⁾。そして SM に対しては菌は耐性を獲得し易いというだけでなく、更に SM をその発育に必要とする所謂依存性菌の存在も報告されている³⁾。

一方 SM 耐性菌の生理学的研究はかなり詳細に行われており、その SM に対して耐性であるという生理的機構の一端も究明されている⁴⁾。然し SM 依存性菌の生理的機構に関する研究は余りみられず⁴⁾、又 SM 依存性菌に対する SM の生理的役割に関しても、SM が栄養源として利用されると考え

られて来たが^{5,6,7)}、近時 Iverson 等⁸⁾、Sevag 等⁹⁾、西沢¹⁰⁾ 等はこの点を疑問視している。

著者は従来余り研究されていない SM 依存性菌の生理面を SM 感受性菌との比較に於て研究し、その生理及びそれに対する SM の役割に関して多少の知見を得た。以下それらについて記述する。

実験材料及び方法

供試菌：教室保存の大腸菌 *Escherichia coli*.

ストレプトマイシン：硫酸ジヒドロストレプトマイシン（明治）（国家検定済）（略号 SM）。

ストレプトマイシン含有寒天培地：SM 水溶液を凝固直前まで冷却した融解寒天培地に 1000 γ /ml に終濃度になるように注加攪拌し平板とした。

その他の培地：実験結果の項に記述。

菌増殖度：固形培地の場合には集落形成状態により、又液体培地の場合には肉眼的に混濁度を比較することにより測定した。

静止菌調製：供試 *E. coli* を合成培地寒天平板（実験結果の項に記述）上に 37°C、20時間培養後採取し、0.02M 磷酸緩衝液（pH 7.0）で2回洗滌し、同一緩衝液に浮遊させた。なお菌量は島津光電比濁計を用いて比濁することにより調製した。

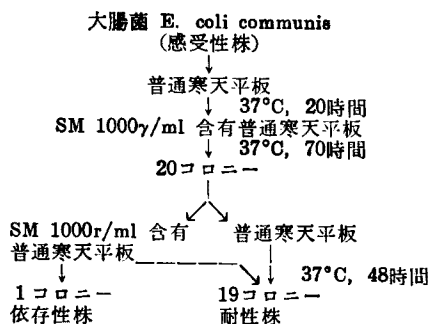
ストレプトマイシン依存性株の分離：実験結果の項に記述。

呼吸活性測定：ワールブルグ検圧計を使用し、常法に従つて行つた¹¹⁾。なお SM は最初から菌と一緒に主室に入れ、15分間空振りをして温度平衡の後、側室より基質を注加し測定を行つた。

実験結果

第1節 SM 依存性株の分離 図1に示した如く、普通寒天平板上に 37°C、20時間培養した

図1 SM 依存性株の分離



E. coli を SM 1000 γ/ml 含有普通寒天平板上に大量に塗抹し、37°C、48時間培養後、20ケのコロニーを得た。これらの20ケのコロニーを SM 1000 γ/ml 含有普通寒天平板及び SM 不含有普通寒天平板上に接種し、37°C、48時間培養後これらの両培地上に於ける増殖状態をしらべた。その結果、SM 含有培地には極めてよく増殖するが、SM 不含有培地には殆んど全く増殖しない菌株1株を得た。これを SM 1000 γ/ml 含有普通寒天平板及び不含有普通寒天に8代接種し、それが所謂 SM 依存性株といえるものである事を確めた。但し極めて厳密に言えば、寧ろ SM 増強性株というのが妥当であろう。然し本研究では以下一応依存性株と称える。

この SM 依存性株 (以下 D 株) は SM 500~1000 γ/ml 含有普通寒天培地で最もよく増殖し、この濃度に SM を含む普通寒天平板上に於ける菌の増殖は親株 (以下 S 株) の普通寒天平板上に於ける増殖と同程度であつた。又コロニーの状態は S 型を示し、その他の性状も親株とはほぼ同様であつた。更に SM 1000 γ/ml 含有普通寒天平板上に発育した D 株の菌形は親株に比しやや太く短くなつていたが、染色性には格別の変化は認められないようであつた。

更に、図2に示した基礎培地 M に 0.5% の割合にグルコース、3% の割合に寒天を加え (以下これをグルコース寒天培地と称える)、これに更に 1000γ/ml

図2 基礎培地 M

NaCl	2.5 g
MgSO ₄	0.1 g
NH ₄ Cl	1.0 g
M/5 磷酸緩衝液*	167 ml
蒸溜水	333 ml

* 磷酸緩衝液の pH は寒天培地に使用したものはすべて pH 7.0 に、液体培地の儘使用したものは pH 7.0 及び 6.3 に調製した。

の割合に SM を加えたもの及び SM を加えないものを調製し、これらに D 株及び S 株を2代以上継代した後、以後の実験に供した。

なお SM 1000 γ/ml 含有グルコース寒天培地上に S 株を大量に塗抹し D 株を分離しようと試みたが、総べて失敗に終つた。

第2節 SM 依存性株の復元変異

この D 株は SM 500~1000 γ/ml 含有グルコース寒天培地に最もよく増殖し、10 γ/ml より下の培地では増殖は極めて不良であつた。今この D 株を SM 1000 γ/ml 含有及び不含有寒天培地に 37°C、70時間培養後、SM 不含有のものの上に5ケのコロニーを得た (表1)。このコロニーを再び SM 含有及び不含有グルコース寒天培地に接種、培養した。表1に示した如く、24時間培養ではこれらの菌は総べて SM 感受性というべき状態であつた。然し、48~72

表1 SM 依存性株よりの分離株の性質

		SM 依存性株				
		寒天平板 M + G + SM ↓ ... 37°C, 70時間 無数	寒天平板 M + G ↓ ... 37°C, 70時間 5コロニー			
培養時間 (時間)	寒天平板培地	1	2	3	4	5
24	M + G	+	+	+	+	-
	M + G + SM	-	-	-	-	-
48	M + G	+	+	+	+	+
	M + G + SM	-	1コロニー	-	2コロニー	-
72	M + G	+	+	+	+	+
	M + G + SM	-	1コロニー	-	2コロニー	-
		1'	2'	3'		
24	M + G	-	-	-		
	M + G + SM	+	+	+		
48	M + G	-	-	-		
	M + G + SM	+	+	+		

M—基礎培地 M, G—グルコース (終濃度 0.5%)
SM—ストレプトマイシン (終濃度 1000γ/ml)

時間培養後3ケの新しいコロニーを見た。この新しい3ケのコロニーを更に前記同様に培養した結果、これらは総べてSM依存性であることが判明した。以上の実験に際し、コロニーを新しい培地に接種するに当つて、元の菌と一緒に接種しないように充分注意したことは勿論である。従つて著者の実験では、例数の少い誤れはあるが、依存性株よりの復元変異株は感受性株であり、更にその感受性株よりの再復元変異株は依存性株であつた。そしてこの間に耐性株は認められなかつた。

第3節 SM 依存性株及び感受性株の増殖と栄養源

D株に於てSMは栄養源として利用されるのか或は作用物質又はそれに類似の何等かのものとして働くのかを調べるため、表2に示した培地、即ち(a)グルコース(炭素源)、NH₄Cl(窒素源)、(b)グルコース、NH₄Cl、SM、(c)グルコース、SM、(d)NH₄Cl、SMを夫々含有する4種の培地(pH7.0及び6.3)を調製し、そこに於けるD株及びS株の増殖を調べた。これに示したようにD株はグルコース、

表 2 SM 利 用 試 験

		a		b		c		d	
培地物質	NaCl	0.5 g		0.5 g		0.5 g		0.5 g	
	MgSO ₄	0.02 "		0.02 "		0.02 "		0.02 "	
	NH ₄ Cl	0.2 "		0.2 "				0.2 "	
	グルコース	0.5 "		0.5 "		0.5 "			
	ストレプトマイシン			0.5 "		0.5 "		0.5 "	
	M/5 磷酸緩衝液	33 ml		33 ml		33 ml		33 ml	
		蒸溜水	77 "	77 "		77 "		77 "	
pH		pH 7.0		pH 6.3		pH 7.0		pH 6.3	
培養時間	菌株								
20 時間	D	—	—	++	++	—	—	—	—
	S	++	++	—	—	—	—	—	—
44 時間	D	—	—	+++	+++	—	—	—	—
	S	+++	+++	—	—	—	—	—	—

NH₄Cl及びSMの3つを含む場合には増殖したがSMとグルコース或はNH₄Cl、又はグルコースとNH₄Clの2つしか含まない場合には増殖しなかつた。勿論S株はグルコースとNH₄Clの2つを含むもの以外の何れにも増殖しなかつた。従つてD株の増殖にはS株に必要なグルコース、NH₄Clの他に必ずSMの存在を必要とするが、その際SMが炭素源或は窒素源として利用されるということは一応否定される。

更にD株のSMに対する要求性に、増殖に利用する基質の違いによる差異が存在するか否かをみるために、次の如き実験を行つた。即ち表3及び表4に示した如く、SM含有及び不含有基礎培地に諸種脂肪酸及びアミノ酸を加え、これにD株及びS株を夫々接種し37°C、20~44時間培養観察した。

クエン酸回路に存在し、又はこれと直接的関連を有する脂肪酸を基質とした場合についてみると(表3)、 α -ケトグルタル酸はS株の方がD株よりややよく利用し、コハク酸、フマル酸及びリンゴ酸は

D株の方がS株よりもややよく利用した。そしてクエン酸は何れの株も利用しなかつた。但しその發育に利用する基質の種類に関しては両株の間に際立つた差異は認められなかつた。然しこれらの脂肪酸を基質とした増殖には、D株に於ては明かにSMを必要とし、S株では逆にその増殖はSMにより阻害され、その関係はSMに関してはほぼ対称的であつた。

次に各種アミノ酸を基質とした場合のD株及びS株の増殖を表4に示した。即ち両株ともアラニン、グルタミン酸及びアスパラギン酸をよく利用した(アラニンはS株の方がD株よりもややよく利用したが、他の2つについては同程度であつた)が、それ以外のものは何れも利用されなかつた。この場合にもD株の増殖はSMにより促進され、S株の増殖は逆にSMにより阻止された。然しこれらのアミノ酸を基質とした場合、D株のSMに対する要求性は前記の脂肪酸を基質とした場合よりもやや低いようであつた。

表3 感受性株及び依存性株の増殖と脂肪酸

培養時間	培養地	菌株	培地	培地の添加基質	脂肪酸							
					クエン酸	α-ケトグルタル酸	コハク酸	リンゴ酸	乳酸	焦性ブドウ酸	酢酸	
20時間	7.0	D	M + SM		-	+	+	+	+	-	±	-
		M			-	-	-	-	-	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			±	+	-	+	-	-	-	-
6.3	D	M + SM			-	+	+	+	+	+	-	-
		M			-	-	-	±	±	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	+	+	+	+	-	-
44時間	7.0	D	M + SM		-	+	+	+	+	+	±	-
		M			-	-	-	-	-	-	-	-
	S	M + SM			-	+	+	+	+	+	±	-
		M			±	+	+	+	+	+	-	-
6.3	D	M + SM			-	+	+	+	+	+	±	-
		M			-	±	±	±	±	±	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	+	+	+	+	±	-

M—基礎培地, SM—ストレプトマイシン (終濃度 1000 γ /ml), 各基質の終濃度— 3.3×10^{-2} M.

第4節 SM 依存性株と感受性株の呼吸及びそれに対するSMの作用

前節に於て述べた如く, その増殖に利用する基質の種類乃至その利用程度に関してはD株とS株との間に際立つた差異は認められなかつたが, そのSMに対する態度に関してはD, S両株は全く対称的であつた。本節では菌の発育乃至増殖と密接な関係にある呼吸に対するSMの作用について, S, D両株を比較検討した。

先ずクエン酸回路上の及びこれに直接的に関与した脂肪酸を基質とした場合 (この場合には窒素源を欠くため菌自体の増殖は一応無視し得る), 図3にみるようにS株の呼吸は試みられた何れのを基質とした場合にもSMにより可成りの程度に阻害され, 殊にコハク酸, フマル酸及びリンゴ酸の場合やや著明であつた。そしてこの阻害は最初30分間は余り著明でなかつたが, 実験時間の延長とともに高度

表4 感受性株及び依存性株の増殖とアミノ酸

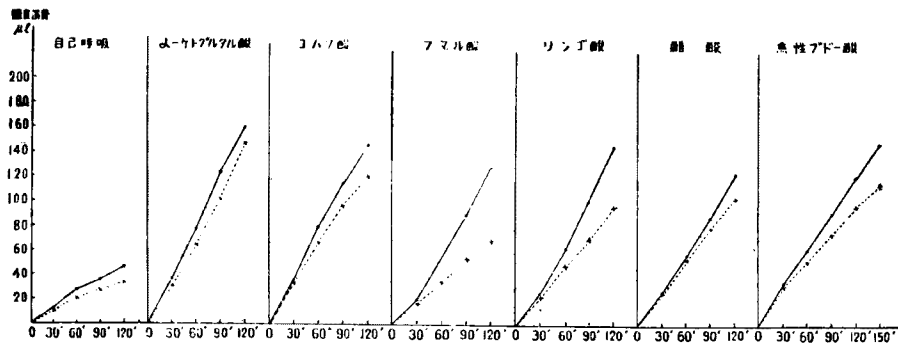
培養時間	培養地	菌株	培地	培地の添加基質	アミノ酸							
					グリシン	アラニン	グルタミン酸	アスパラギン酸	ヒスチジン	メチオニン	フェニルアラニン	トリプトファン
20時間	7.0	D	M + SM		-	±	±	+	-	-	-	-
		M			-	-	±	±	-	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	±	+	-	-	-	-
6.3	D	M + SM			-	+	±	+	-	-	-	-
		M			-	-	±	±	-	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	±	+	-	-	-	-
44時間	7.0	D	M + SM		-	+	+	+	+	-	-	-
		M			-	±	±	+	-	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	+	+	+	-	-	-
6.3	D	M + SM			-	+	+	+	+	-	-	-
		M			-	±	±	+	-	-	-	-
	S	M + SM			-	-	-	-	-	-	-	-
		M			-	+	+	+	-	-	-	-

M—基礎培地, SM—ストレプトマイシン (終濃度 1000 γ /ml), 各基質の終濃度— 3.3×10^{-2} M.

となつていつた。一方前述の如くD株の増殖はSMにより著明に促進されたが, 増殖とは異つてその呼吸はSMにより全く促進されず, コハク酸及びフマル酸を基質とした場合極く軽度ではあるが阻害されるようにさえ思われた (図4)。

次に増殖実験に於てよく利用されたグルタミン酸, アスパラギン酸及びアラニンを呼吸基質として使用した (この場合アミノ酸は炭素源及び窒素源の両者として利用し得るので, 菌の増殖を考慮する必要がある)。図5に示したように, グルタミン酸及びアスパラギン酸, 殊にアスパラギン酸を基質とした場合, S株の呼吸はSMの存在下では自己呼吸と殆んど差がない。又30~60分まではSMの存否に拘わらず, その呼吸は自己呼吸のものとはほぼ同程度であつた。然しSMのない場合その呼吸は90~120分以後には著しく促進された。他方D株に於てもグルタミン酸又はアスパラギン酸, 殊にアスパラギン酸を基質とした場合, 30~60分まではSMの存在の如何に

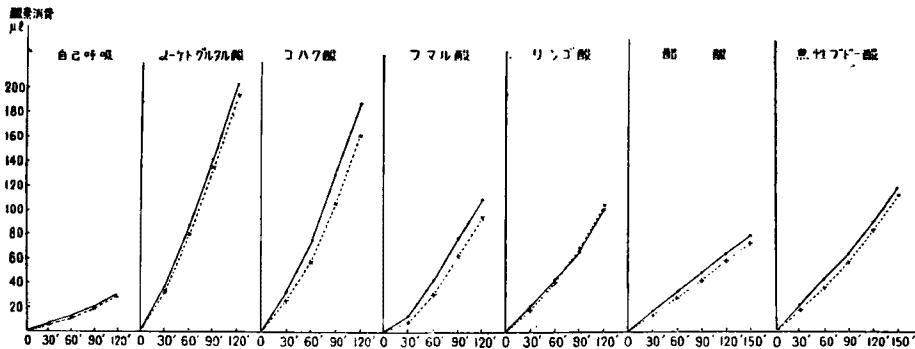
図 3 SM 感受性株の呼吸と SM



菌液 1 ml (湿菌量 20 mg), 各基質 (10⁻¹M) 0.3 ml, 0.2M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml, SM (10⁻⁴g/ml) 0.3 ml, 水を加えて全量を 3 ml とする。気相は空気, 37.5°C.

—, SM なし, ×……× SM 添加.

図 4 SM 依存性株の呼吸と SM



実験方法: 図 3 と同じ。

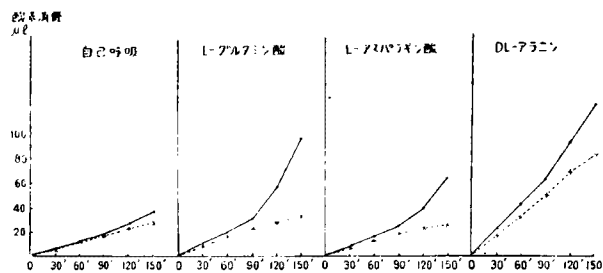
拘らずその呼吸は自己呼吸のものと大差がないが, 60~120分以後には SM により著しく促進された(図 6).

又アラニンを経質とした場合 D, S 両株ともその呼吸は最初から著明に促進されたが, その SM との関係はグルタミン酸或はアスパラギン酸を経質とした場合と同様であつた。従つてグルタミン酸及びアスパラギン酸は呼吸よりも寧ろ主として原形質合成に (勿論多少は呼吸にも利用されるであろう), 又アラニンは呼吸と原形質合成の両面によく利用されることが考えられる。

第5節 SM の作用とその化学構造との関係

SM はその化学構造の中にイノシトールの誘導体

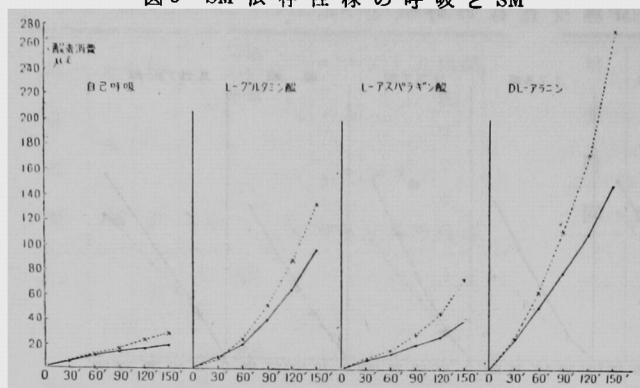
図 5 SM 感受性株の呼吸と SM



菌液 1 ml (湿菌量 20 mg), 各基質 (10⁻¹M, 但し DL-アラニンのみは 2 × 10⁻¹M) 0.3 ml, 0.2M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml, SM (10⁻⁴g/ml) 0.3 ml, 水を加えて全量を 3 ml とする。気相は空気, 37.5°C. —, SM なし, ×……× SM 添加.

であるところのストレプトチジン (Streptidine), 非天然型グルコサミンの Nメチル-L-グルコサミン及び五炭糖に属するストレプトース (Streptose) を

図6 SM 依存性株の呼吸とSM



実験方法：図5と同様。

もっている。グルコサミン及び五炭糖の生物の代謝に於ける重要性はいうまでもないが¹²⁾、イノシトール同族体も酵母等の生長因子として知られている¹³⁾。従つて前述のようにS株に対して抑制的に、そしてD株に対して促進的に働くのはSM全体としてか或はその何れか特別の部分が働くのかを知るために、

次の実験を行つた。

即ちSMを稀硫酸性にしておき、5分及び15分間沸騰水中につけたものとアウトクラフにかけたものを、夫々のSMの濃度に換算して終濃度が1000 γ /mlになるようにグルコース寒天培地に加えたもの及びイノシトール、D-グルコサミン及びこの両者を夫々終濃度1000 γ /mlになるように加えたものを調製して、これらにD及びS株を夫々接種し、37°C、20~44時間培養し観察した。

表5に示したように、SMを5~15分間水解したものは元のSMとはほぼ同様の作用をD及びS株に対して示したが、アウトクラフにかけたもの及びイノシトール、D-グルコサミン、この両者を同時に添加したものは何れもSMの如き作用を全く示さなかつた。

表5 SM 水解物及び類似構造物質の作用

培養 37°C	菌株	培地							
		GM	GM + SM	GM + SM 5' 水解	GM + SM 15' 水解	GM + SM 高压滅菌	GM + イノシトール	GM + D- グルコサミン	GM + イノシトール、 D-グルコサミン
20時間	D	—	+++	+++	+++	—	—	—	—
	S	+++	—	—	—	+++	+++	+++	+++
44時間	D	±	+++	+++	+++	±	±	±	±
	S	+++	—	—	—	+++	+++	+++	+++

GM—グルコース（終濃度0.5%）寒天培地

SM 及び類似構造物質—終濃度1000 γ /ml

総括及び考按

従来なされているD株に関する諸報告との比較の下に、前項に於て記述した諸結果についての総括及び考按を試みる。

1947年 Miller 等³⁾はSM含有寒天培地に髄膜炎菌を大量接種し、そこから始めてSM依存性の髄膜炎菌を分離した。然しこのD株の増殖に要求される物質がSM自体であるか、或は何等かの不純物であるかは不明であると報告した。その後このSM依存性菌の問題に関しては可成り多数の報告がなされているが、その変異の様式のみに関して諸説¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾があり、未だ一致した結論は得られてい

ない。

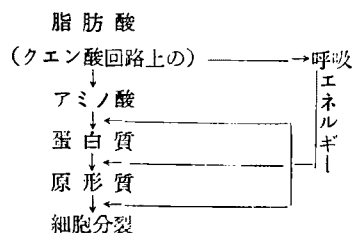
著者は前述の如くして、SM感受性大腸菌株よりSM依存性株を分離したが、このD株よりの復元変異株はすべてS株だけであり、更に、この復元変異株よりの再復元変異株はD株のみであつた。この結果は従来諸報告と可成り異なるところである。又他方S株をSM1000 γ /ml含有培地に大量接種してD株を分離しようと試みたが、これは培地として普通寒天を使用した時にのみ成功し、グルコース寒天培地（それに於ける菌の発育は普通寒天に比し可成り不良）を使用した時には全く不成功に終つた。秋葉等¹⁾はSMのMutagenic effectを主張しているが、著者のこの結果より、SM感受性より依存性

への変異には菌の發育乃至増殖ということが同時に要求されるものと考えられる。然し著者の本研究における目的がD株の生理面を主眼としたため、この変異の問題に関しては実験も少く、現在充分な考察を加えられない。なお Paine 等¹⁶⁾は諸種細菌の SM 感受性株から夫々の SM 耐性及び依存性株を分離し、そのD株が SM を發育至適濃度に含有する培地に増殖したときには、その集落の性状及び菌形態、染色性等に関して認むべき S 株との差異は存在しなかつたと報告している。著者が分離した D 株に於てもこれとはほぼ同様の結果が得られた。

一方 D 株の生理学的乃至生化学的反応に関しては、Paine 等¹⁶⁾は供試諸細菌中 *Klebsiella pneumoniae* 以外のものに於ては、炭水化物の醗酵、インドール産生等の従来の所謂微生物学的諸反応については S、R (耐性) 及び D 株の間に著明な差異は認められなかつたと報告している。又柳原⁷⁾は *Staphylococcus aureus* (Terashima) はその發育に B. M. [$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2 HPO_4$, KH_2PO_4 , NaCl] と glucose, l-tryptophane, l-cystine, tyrosine, V. B₁ 等を必要とするが、その依存性変異菌は B. M. と SM のみで發育可能となり、SM を分解して栄養源として利用すると報告している。然し、他方 Iverson & Waksman⁸⁾は SM 依存性大腸菌株 (*E. coli*) を培養しても SM の破壊はおこらず、又 D 株を SM を含みぬ培地に移植すると菌は長くなるが細胞分裂を起さないという2つの事実より、SM は D 株に対して基質或は栄養源としてよりも寧ろ細胞分裂に対して欠くべからざる發育要素として作用するに思われると報告している。更に Sevag 等⁹⁾も SM が D 株に対して基質乃至栄養源として働くことを疑問視し、SM 依存性 *E. coli* の發育に対して SM に代る Factor を SM 感受性或は耐性 *E. coli* から抽出したと報告している。又西沢¹⁰⁾も培養実験の結果より SM 依存性 *E. coli* は SM を栄養源として利用するとは考えられないと報告している。

著者の分離した D 株も炭素源又は窒素源を夫々 SM のみに制限した純合成培地には増殖し得ず、S 株の發育に必要な炭素源及び窒素源の上に更に SM を添加した場合にのみ増殖した。従つて著者の研究に於ても Iverson, Sevag 等の如く、SM は栄養源として利用されるのではなくて、寧ろ菌の發育乃至増殖に必要な何等かの過程に対して作用物質として働くことが考えられる。

この SM の作用部位を明かにするために前述の諸結果を次の図に従つて考察してみる。



クエン酸回路に關与した脂肪酸及びアミノ酸を栄養源とした場合、その發育乃至増殖に利用する物質の種類及び利用程度に關しては D 株と S 株との間に著明な差異は認められなかつた。然し D 株の SM に対する要求性はアミノ酸を栄養源とした場合よりも脂肪酸を栄養源とした場合に於てより強いことが認められた。従つて脂肪酸→アミノ酸の過程が SM により促進されることが一応推定される。然しアミノ酸を栄養源とした場合にもなお D 株の増殖は SM により著明に促進されたことより、SM は脂肪酸→アミノ酸の過程より他の過程にも促進的に働くことが考えられる。一方エネルギー発生乃至供給源として最も重要な呼吸についてみると、脂肪酸を基質とした S 株の呼吸は、殊にコハク酸、フマル酸、リンゴ酸及びピルヴィン酸を基質とした場合には或程度 SM により抑制された。これは、SM の呼吸阻害はオキサロ酢酸とピルヴィン酸の縮合を抑制するにあるという Oginsky 等¹⁷⁾の報告からもよく理解されることである。又グルタミン酸、アスパラギン酸及びアラニン等を基質とした場合の S 株の呼吸は SM により著明に (殊に長時間観察した場合) 抑制された。これは S 株は SM のない場合には増殖し (又基質に対する適応も考えねばならないが) 呼吸が極めて大となり、SM がある場合には増殖しないと同時に前述の如く呼吸自体も或程度抑制される (又適応的酵素形成も阻害されるであろう¹⁸⁾) ためと考えられる。他方 D 株に於ては SM は脂肪酸を基質とした呼吸に対して認むべき抑制作用を示さなかつたが、又促進作用も示さなかつた。即ち SM は D 株の呼吸自体に対しては何等の作用をも及ぼさないことが判つた。従つて、グルタミン酸、アスパラギン酸及びアラニン等を基質とした D 株の呼吸は脂肪酸の場合と異り SM により促進された (殊に長時間観察した場合に著明に) が、30~60 分の結果では SM の促進効果はみられなかつたことから考えて、これ

は呼吸自体に対する促進作用というよりも寧ろD株がSMの添加により發育増殖したためであると考えられる。

以上よりD株の呼吸はSMにより何等の作用も受けないにも拘わらず、その發育乃至増殖はSMにより著明に促進されるということが結論づけられる。従つてSMは、D株に於て残る第三の部位即ちアミノ酸→蛋白質乃至原形質合成から更に細胞分裂の過程の何れか又は全部に対して促進的に働くことが考えられる。

又それではSMの如何なる構造乃至部分がS株に於てはその増殖を抑制し、D株に於てはそれを促進するかということは著者の現在の実験からは不明である。この点及び前記したSMのD株に対する生理的作用部位に関する更に詳細な解明はなお今後の研究に俟たねばならないところである。

結 論

1. ストレプトマイシン感受性大腸菌 *E. coli* *communis* を、ストレプトマイシン 1000 γ /ml 含有普通寒天培地に移植する事により、ストレプトマ

イシン依存株（極めて厳密には増強性株）を分離し得た。

2. この依存性株よりの復元変異株及び再復元変異株は夫々感受性株及び依存性株であり、その間に耐性株は得られなかつた。

3. この依存性株はストレプトマイシンのみを炭素源或は窒素源としては、増殖しなかつた。

4. この依存性株のストレプトマイシンに対する要求性は、クエン酸サイクルに關与した脂肪酸を増殖の栄養素とした場合に於て、アミノ酸を栄養素とした場合よりも強かつた。

5. ストレプトマイシンはこの依存性株の呼吸自体に対しては著しい作用を示さなかつた。

尚本論文の要旨は第11回日本細菌学会中国四国地方支部総会に於て報告した。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授に深甚なる謝意を表し、又実験面で御協力下さつた教室矢部氏に心から感謝致します。

献

- 1) 秋葉・医学のあゆみ, 13, 250, 1952.
- 2) Demerec, M. : J. Bact., 56, 63, 1948.
- 3) Miller, C. P., and Bohnhoff, M. : J. Bact., 54, 467, 1947.
- 4) Smith, P. H., Oginsky, E. L., and Umbreit, W. W. : J. Bact., 58, 761, 1949.
- 5) Yegian, D. and Vanderlinde, R. J. : Am. Rev. Tbc., 61, 483, 1950.
- 6) Owen, C. R. : Am. Rev. Tbc., 61, 705, 1950.
- 7) 神原 : 医学と生物学 : 18, 336, 1951.
- 8) Iverson, W. P., and Waksman, S. A. : Science, 108, 382, 1948.
- 9) Sevag, M. G., and Rosanoff, E. I. : Arch. Biochem. Biophysics, 45, 233, 1953.
- 10) 西沢 : J. Antib., 8, 223, 1955.
- 11) 藤田 : 検正法と其応用, 岩波書店, 1949.
- 12) Fruton, J. S., and Simmonds, S. : 生化学, 丸善 K. K., 324, 1956.
- 13) Bersin, P. T. : Kurzes Lehrbuch d. Enzymologie, 86, 1954.
- 14) Yegian, D., and Budd, V. : J. Bact., 55, 459, 1948.
- 15) Yegian, D., Budd, V., and Vanderlinde, R. J. : J. Bact., 58, 257, 1949.
- 16) Paine, J. F., Jr., and Finland, M. : J. Bact., 56, 207, 1948.
- 17) Oginsky, E. L., Smith, P. H., and Umbreit, W. W. : J. Bact., 58, 747, 1949.
- 18) 江上, 石本, 丸尾, 三浦, 関根, 須田, 田宮 : 標準生化学実験, 文光堂, 434, 1953.

Physiological Studies on Drug-Resistant Bacteria

1. Physiological Study on Streptomycin-Dependent *Escherichia coli*

By

Sei HAYASHI

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

Drug-resistance of bacteria is one of the most important and also most troublesome problem in the chemotherapy of diseases. The author studied on some physiological aspects of streptomycin-dependent strain of *Escherichia coli* in comparison with streptomycin sensitive strain. The results are summarized as follows:

1) By inoculation of a great amount of streptomycin-sensitive *E. coli* on plain broth agar plates containing 1.000 γ /cc of streptomycin, one streptomycin-dependent strain was isolated.

2) The reverse mutant from this dependent strain was a streptomycin-sensitive strain, the re-reverse mutant from this reverse mutant was a dependent strain, and no resistant strain could be obtained.

3) This dependent stain could not multiply using streptomycin as the sole carbon or nitrogen source.

4) This dependent strain showed a higher requirement to streptomycin in the media containing the fatty acids related to the citric acid cycle than in those containing amino acids as its growth substrates.

5) Streptomycin showed no noticeable action on the respiration of this dependent strain.

From these results, it is inferred that streptomycin works not as a nutriment but as some working factor for the growth or multiplication of the streptomycin-dependent *E. coli*.
