

Mycobacterium avium にたいする Streptomycin の Mutagenic Effect とそれに対する Sulfathiazole の拮抗

東村道雄・三浦幸二・橋本 正

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

(昭和 32 年 2 月 22 日受付)

吾々は前に nonselective な濃度の streptomycin (SM) と部分阻止濃度の sulfathiazole (ST) とを共存させた培地に生育した *M. avium* の培養中の生菌数当りの SM 耐性菌数は、同濃度の SM のみを含む培地に生育した培養中のそれより小であることを観察した¹⁾。本報はこの現象の機作を研究する目的で、(1) nonselective な濃度の SM, (2) 微量の ST, (3) nonselective な濃度の SM と微量の ST の共存の 3 つの場合について SM 耐性菌出現率に及ぼす影響を観察した。

実験材料及び実験方法

Mycobacterium avium 獣調株を使用した。この *M. avium* の SAUTON 培地 5 日培養からガラス玉振盪 10 分によつて、1 mg/cc の菌液を作り、これを SAUTON 培地 (asparagine の代りに sodium glutamate を使用し、終末 pH 7.0 とし、200 cc Erlenmeyer flask に 50 cc 宛分注した) に 2 mg (2 cc) 宛接種した。

培地は次の 4 種を調製した。

- (1) SAUTON 培地のみ (対照)
- (2) SAUTON 培地 + SM 0.02 mcg/cc
- (3) SAUTON 培地 + SM 0.02 mcg/cc + ST 1 mcg/cc
- (4) SAUTON 培地 + ST 1 mcg/cc

これらの培地を 37°C に培養し、5 日後と 11 日後に、生菌単位当りの SM 10 mcg 耐性菌出現率を算定した。

Table 1. The action of streptomycin on *Mycobacterium avium*, strain Jucho, in SAUTON medium (50 ml in Erlenmeyer flask).

Concentration of streptomycin	Optical density	Concentration of streptomycin	Optical density
5 mcg/ml	0.033	0.16 mcg/ml	0.903
2.5	0.025	0.08	0.868
1.25	0.034	0.04	1.009
0.63	0.061	0.02	1.131
0.32	0.081	0.00	1.194

The medium was inoculated by 2 mg of cells in wet weight and incubated at 37°C for three days. The culture was thoroughly mixed until to homogeneity by pumping and measured by Leitz's Rouy-Photometer, 610 m μ .

The concentration of streptomycin in 0.02 mcg per ml was considered as nonselective.

その方法は培養を振盪混合して菌を集め、その一部をとり、ガラス玉と 10 分間振盪して約 20~30 mg/cc の菌液をつくり、更にそれから 10 倍稀釈列をつくる。10⁻⁹ 稀釈液の各 0.1 cc 宛を薬剤を含みぬ SAUTON 寒天平板 5 枚に接種し、三角線で均等にひろげる。また原液の各 0.1 cc 宛を SM 10 mcg 含有の SAUTON 寒天平板 10 枚に接種し、37°C 4 日後に生育集落数を数えて、生菌単位当りの SM 10 mcg 耐性菌出現率を算定した。SAUTON 寒天は、寒天 3% を含むものを用い、直径 9 cm の Petri dish に 20 cc 宛分注した。

添加した SM が nonselective であることは上述と同様の条件で予め確めた (Table 1 参照)。SM は dihydrostreptomycin sulfate 協和を、sulfathiazole は武田製を使用した。

実験成績及び考察

(1) Control, (2) SM 0.02 mcg/cc 添加, (3) SM 0.02 mcg/cc 及び ST 1 mcg/cc 添加, (4) ST 1 mcg/cc 添加の 4 つの場合について培養 5 日後に測定した湿菌量 mg/cc は Table 2 に示すとおりである。測定方法は Table 1 と同様で、optical density を予め作製した標準曲線と比較して湿菌量の mg/cc を算出した。その結果は Table 2 に示すように、(2) の SM 0.02 mcg/cc 添加も、(4) の ST 1 mcg/cc 添加も発育に影響を与えていないが、(3) の SM 0.02 mcg/cc と ST 1 mcg/cc 併用の場合には、synergism が現われて生育菌量が減少している。

Table 2. The amount of cells grown in various media. (SAUTON medium 50 ml in 200 ml Erlenmeyer flask, pH 7.0, was inoculated with 2 mg of 5 days culture and incubated at 37°C for 5 days.)

Medium	Amount of cells in mcg of wet weight per ml of medium
Control	6.7 mg/ml
Streptomycin 0.02mcg	7.1
{Streptomycin 0.02mcg +sulfathiazole 1mcg	4.4
Sulfathiazole 1mcg	6.7

ST 1 mcg/cc は通常部分阻止の濃度であるが、この実験では比較的大量の菌接種を行つたため、対照と同様の発育を得た。ST の作用が菌量によつて大きな影響を受けることは既報した²⁾。(注。ST の作用が菌量によつて大きな影響を受ける機作が population を構成する cells の耐性が不均一であるためではないことは別報する。)この場合 ST は SM 耐性菌の selection を行うことはないので、たとえ部分阻止的な濃度であつても、実験目的に差支えないと思われる。しかし SM 耐性菌出現率は培養の growth phase によつて著しく異なるので³⁾、可及的同一 growth phase の培養について実験を行うために、接種菌量をふやして growth phase を対照にそろえた。

これら4種の培地で5日後及び11日後の培養中の生菌単位当りの SM 10 mcg 耐性菌出現率は Table 3 に示した。その結果は表に示すように、(2)の SM 0.02 mcg/cc 含有培地では、(1)の対照に比較して SM 耐性菌出現率の増加が著明である。ただし例の1つに示すように出現率が必ずしも増加しないこともある。

この SM 耐性菌出現率の増加の原因は、添加した SM 量が nonselective な濃度であるので SM の mutagenic effect によるものと考えてよいと思われる。

SM が mutagenic effect をもつことは多くの研究

Table 3. The appearance rate of streptomycin (10 mcg/ml)-resistant mutants per 10⁸ viable units in various media.

A	B	C	D	E
1	5	269.6	69.6	258
2	5	329.4	155.0	456
3	5	679.0	32.8	48.4
4	5	342.6	62.0	181
1	5	59.7	1.6	26.7
2	5	35.0	74.2	2,120
3	5	142.4	46.3	463
4	5	171.2	163.2	952
1	5	208.4	1.6	77
2	5	192.4	74.2	3,860
3	5	477.7	46.3	970
4	5	455.2	163.2	3,580
1	11	514.2	0.6	1.16
2	11	145.8	16.6	114.2
3	11	100.6	0.8	8.0
4	11	311.6	0.2	0.64

- A: Medium.
 B: Age of culture in days.
 C: Number of total viable units in each 0.1 ml of 10 suspension (average of 5 plates).
 D: Average of streptomycin-resistant mutants in each 0.1 ml of 10 suspension (average of 10 plates).
 E: Ratio of streptomycin-resistant mutants per 10⁸ viable units.

者によつて既に報告されている。NEWCOMBE and MC GREGOR⁴⁾は *E. coli* で unspecific な効果を認め、秋葉及び横田⁵⁾は *Staphyl. aureus* で、君野及び都築⁶⁾は *M. avium* で、田中⁷⁾は *Salmonella* で、東村⁸⁾は *M. tuberculosis var. hominis* で、夫々 SM の mutagenic effect を認めた。しかし一方、牛場⁹⁾は *M. 607* を用いて実験し SM の mutagenic effect の存在について否定的な見解を表明している。Mutagenic effect の有無は、通常所謂 resting cells に薬剤を作用させた後の mutants の増加の有無によつて検査されている¹⁰⁾。しかし SM の場合には、たとえ resting cells を用いても一定濃度以上の SM を作用させれば SM 耐性菌の selection が起ると思われるので、selective な濃度の SM を作用させる実験は、SM 耐性菌を指標とする場合には意味がない。従つて nonselective な濃度の SM を用いる必要があり、上述の報告の大部分も nonselective な濃度の SM を用いている。ところが、吾々の *M. avium* の実験では、nonselective な濃度の SM を所謂 resting cells に添加して 37°C に保つただけでは、SM の mutagenic effect を認めることはできなかつた(実験成績省略)。SM の mutagenic effect は、nonselective な濃度の SM 中で、増菌させた時のみに認められた。なお SAUTON 培地の代りに SAUTON 寒天培地(寒天 3%)を用いて同様な実験を行う時は(使用薬剤量同濃度)、SM 添加により SM 耐性菌出現率は殆んど影響を受けなかつた(実験成績省略)。

次に(4)の ST 1 mcg/cc 含有培地でも稍不定ではあるが、SM 耐性菌出現率の増加を認めた。ここには例を省略するが、ST 1 mcg/cc 添加による SM 耐性菌出現率は、SAUTON 培地への接種菌量を減ずると著明になる。しかしこの際、培地の発育菌量は対照より少くなるので、SM 耐性菌出現率の増加が、ST の mutagenic effect によるものか、growth phase が遅れて培養が相対的に若いためによるものか確定できない。なぜなら、前に行つた吾々の実験では growth phase の若い時には SM 耐性菌出現率が増加しているからである³⁾。しかし、ここに示す実験例は、前述のように ST 1 mcg の添加によつても発育菌量が不変である条件で実験しているので、SM 耐性菌出現率は ST の mutagenic effect によるものと認めてよいと思われる。

なお ST の場合も、洗滌菌液と ST とを 37°C に 0~5 時間接触させた後に、洗滌して ST を除き、SAUTON 培地に接種して、7日間培養し、生菌単位当りの SM 10 mcg 耐性菌出現率を測定したが、ST との接触の影響を全く認めることができなかった。すなわち、ST の mutagenic effect は、ST を含有する培地中で増菌を

行われた場合のみに認められる。ST の効果が増菌させた場合のみに認められても、ST が SM 耐性菌を select することはないので、mutagenic effect による SM 耐性菌出現率の増加と考えてよいと思われる。なお種々の mutagenic effect をもつ化学物質が報告されているが¹⁰⁾、ST についてはこれまで報告がない。

しかし、これらの実験を通じて最も判然とした結果は、(2) 培地 (SM 0.02 mcg/cc 含有) に比較して、(3) 培地 (SM 0.02 mcg/cc 及び ST 1 mcg/cc 共存) に生育した培養における SM 耐性菌出現率の著明な減少である。この SM 耐性菌出現率の減少、すなわち mutations の頻度の相対的減少は、SM 添加によつて SM 耐性菌出現率の増加が著明な時に、特に著しい。この (3) 培地では Table 2 に示すように発育菌量が少く、growth phase は相対的に若いと考えられるので、むしろ SM 耐性菌出現率の増加が期待されるのに、逆に率が減少している。前述のように SM 添加培養による SM 耐性菌出現率の増加は、SM の mutagenic effect によると考えられるので、ST の存在が SM の mutagenic effect を相殺し、また ST の mutagenic effect も SM によつて相殺されているものと考えられる。

これと類似の現象は *M. tuberculosis* にたいする SM の mutagenic effect と PAS の間にも認められているが⁹⁾、その機作については全く不明である。SM または ST の mutagenic effect についても、その機作はまだ speculation の域を出ないが、ただこれらの薬剤の効果が増菌条件を必要とすることは次のことを想像させる。これらの薬剤が起す菌細胞への影響が、DNA の新形成の際になんらかのまちがいを起す確率をますかもしれない。SM が核酸とくに RNA と関係が深いことが報告されており^{12,13,14)}、また RNA と DNA の間に turn over も認められているので、RNA と結合した SM が、DNA の新形成の際に何らかのまちがいを起す確率を増す可能性も想像される。また一方、ST もその作用機作が purine 体形成阻害を通じて核酸と関係があるし¹⁵⁾、ST の存在によつておこる代謝のみだれが DNA の新形成に際して何らかのまちがいを起す確率を増すことも想像される。しかし、SM と ST の両者が共存する時に、何故 SM の mutagenic effect が滅殺されるのであろうか。ST 高耐性菌には SM 耐性菌出現率が低下していることを吾々は見出しているが¹¹⁾、本報で使用した ST の濃度は ST 耐性菌を select し得る濃度ではない。しかし SM と ST の間には、この報告にも一部示したように著明な synergism があるので、SM と ST の作用点の間の何らかの interaction が、この機作に関係しているかもしれない。

総 括

Mycobacterium avium (獣調株) の SAUTON 培地の培養に、nonselective な濃度の streptomycin (0.02 mcg/cc) または発育に殆んど影響を与えない程度の sulfathiazole (1 mcg/cc) を添加するか、またはこれらの両者を同時に添加して、生菌単位当りの streptomycin (10 mcg) 耐性菌出現率を測定して次の結果を得た。

(1) 生菌単位当りの streptomycin 耐性菌出現率を指標としてみると、nonselective な濃度の streptomycin の添加は出現率を増加させた。ただしこの際 streptomycin の存在で増菌することが必要であつたが、streptomycin の添加濃度は nonselective な濃度であるので、streptomycin は mutagenic effect を有すると思われる。

(2) 生菌単位当りの streptomycin 耐性菌出現率を指標としてみると、微量 (1 mcg/cc) の sulfathiazole の培地への添加は出現率を増加させた。この際も sulfathiazole の存在で増菌させることが必要であつたが、sulfathiazole が streptomycin 耐性菌を select することはないので、sulfathiazole が mutagenic effect を有するものと考えられる。

(3) Streptomycin の mutagenic effect は sulfathiazole の添加によつて減退した。すなわち streptomycin と sulfathiazole が共存する場合には、両者の mutagenic effect は互に相殺されて、拮抗的現象が認められた。

御指導並に御校閲を受けた勝沼六郎荘長と日比野進教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 東村道雄, 鈴木鏑三郎, 君野徹三 J. Antibiotics, B, 8: 409~414, 1955.
- 2) 東村道雄, 君野徹三, 橋本正, 鈴木鏑三郎 Chemotherapy, 3: 183~186, 1955.
- 3) 東村道雄, 三浦幸二: Chemotherapy, 4: 103~106, 1956.
- 4) NEWCOMBE, H. B., and MCGREGOR, J. J. Bact. 62: 539~544, 1951.
- 5) 秋葉朝一郎, 横田健: 医学と生物学, 24: 218~221, 1952.
- 6) 君野徹三, 都築敏男: J. Antibiotics, B, 7: 62~65, 89~92, 1954.
- 7) 田中寛治: J. Antibiotics, B, 8: 101~103, 1955.
- 8) 東村道雄 J. Antibiotics, A, 8: 196~200, 1955.
- 9) 牛場大蔵, 後藤敏夫, 清水邦彦, 渡口精吉, 坂本光弘: 結核, 30: 648~653, 1955.
- 10) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 16, Genes and Mutations, 1951.
- 11) 東村道雄: 医学と生物学 掲載予定.
- 12) COHEN, S. S.: J. Biol. Chem., 168: 511~526, 1947.
- 13) SMOLENS, J., and VOGT, A. B. J. Bact., 66: 140~146, 1953.
- 14) 黒沢武正, 住田元旦, 山本正彦, 田中伸一: 結核, 31: 370~374, 418~423, 1956.
- 15) 東村道雄: Chemotherapy, 3: 189~191, 1955.