

cyclic AMP 添加による大腸菌の薬剤感受性変化

(5) テトラサイクリン耐性の誘導

金子 通治 春日 徳彦

大腸菌の *cya* 変異株 Gp1 に 4 剤耐性 (スルホンアミド, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコール) R 因子, R_{100} を伝達させた Gp1/ R_{100} より spontaneous mutation で得た変異株 Gp1/ R_{100} rev-1 は, cyclic AMP (adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate) を添加しなくても糖を利用できるようになった株である。この *E. coli* Gp 1/ R_{100} rev-1 は, cyclic AMP を添加することにより, テトラサイクリン (TC) に感受性が 64 倍増加する¹⁾。この感受性増加の現象は, cyclic AMP が菌の膜に何らかの障害を与え, 透過性に変化をもたらせた結果であると考えた。事実, cyclic AMP 添加, 無添加での Gp 1/ R_{100} rev-1 の細胞内 TC 蓄積量を測定した実験で, cyclic AMP を添加した場合は無添加の場合より 3 倍ほど蓄積量が多いことが観察された²⁾。R 因子による TC 耐性は誘導されることが知られている³⁾。この Gp 1/ R_{100} rev-1 株でも TC 前処理によって TC 耐性の誘導が起こり⁴⁾, cyclic AMP 存在下で induction に必要な TC 濃度は 0.001mcg/ml 以上であることをすでに報告した⁵⁾。しかし, その実験系ではクロルテトラサイクリン (chlor-TC) を induction と selection に使用したので, selection の間に induction が同時にかかってしまうために, 時間毎にその誘導効果を見ることができなかった。そこで, TC 耐性の誘導に関して 誘導能のみを有する GS 2333 を inducer とし, 誘導後の selection には誘導能が低くて抗菌力を有する Minocycline を使用して, cyclic AMP 存在下での TC 耐性の誘導を検討したので報告する。

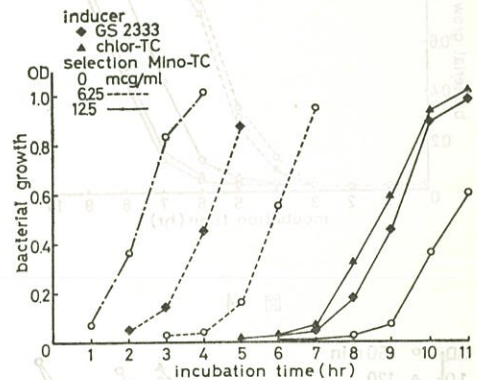
材料と方法

使用菌株は, *E. coli* Gp 1/ R_{100} rev-1 である。培養液は L-broth を, 誘導のかかった割合をみるための平板には L-agar をそれぞれ用いた。使用薬剤はクロルテトラサイクリン (日本レダリー-K.K.), Minocycline, GS 2333 (群馬大学医学部微生物学教室より分与を受けた), cyclic AMP (第一化学薬品K.K.) である。菌の増殖は波長630nmによる吸収 (Shimazu spectronic 20) によって測定した。TC 耐性の誘導は図に示した濃度, 時間で行なった。

結果

Gp 1/ R_{100} rev-1 の増殖に及ぼす Minocycline の濃度を検討したところ, 12.5mcg/ml が 8 時間培養しても菌の増殖がみられない濃度であることが認められた。従って Minocycline の使用濃度としては 12.5, 6.25 mcg/ml で実験を行なった。inducer として使用した GS 2333 と chlor-TC の誘導効果を, Minocycline で selection しての菌の増殖曲線から検討したのが図 1 である。

図 1



GS 2333, chlor-TC の濃度は, それぞれ 10, 5 mcg/ml である。図の一番右側 (○印実線) の増殖曲線は誘導をかけず, Minocycline 12.5mcg/ml で selection したものであり, 左側 (○印破線) の増殖曲線は Minocycline 0 mcg/ml の対照曲線である。6.25mcg/ml の Minocycline で selection した場合, GS 2333 (◆印) と chlor-TC の誘導効果は全く同じで ◆印と重なり, induction かけない右側の増殖曲線 (○印点線) より 2 時間の差で増殖が速いことがみられた。12.5mcg/ml の Minocycline で selection した場合も, GS 2333, chlor-TC 両者の induction 効果は殆んど同じで, 対照 (○印実線) に比して 2 時間の差があることが観察された。図 1 より, GS 2333 と chlor-TC の inducer としての効果は殆んど同じであることが認められた。L-broth に cyclic AMP 1mM 添加したもの, 無添加のものに Minocycline を 0 ~ 6.25mcg/ml 含有した条件下で, Gp 1/ R_{100} rev-1 の増殖をみたのが図 2 である。この図より cyclic AMP 存在下, 6.25mcg/ml の

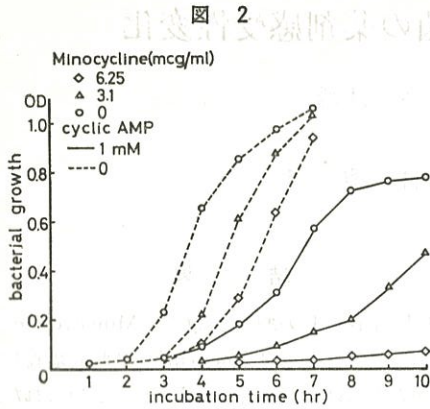


図 2

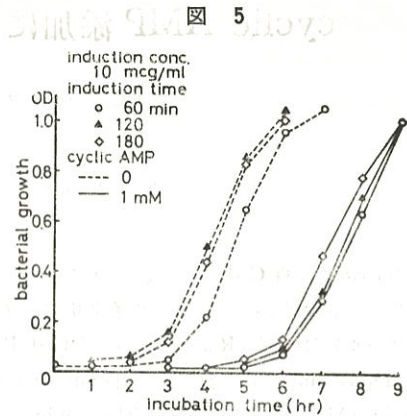


図 5

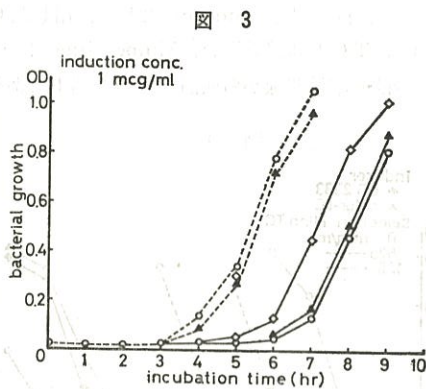


図 3

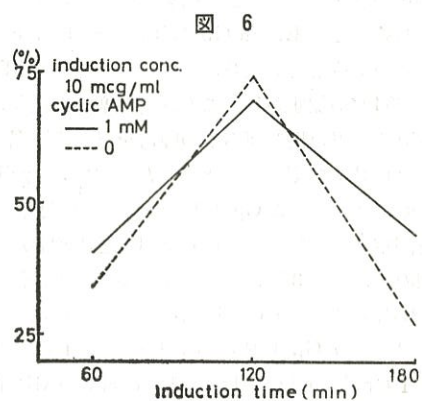


図 6

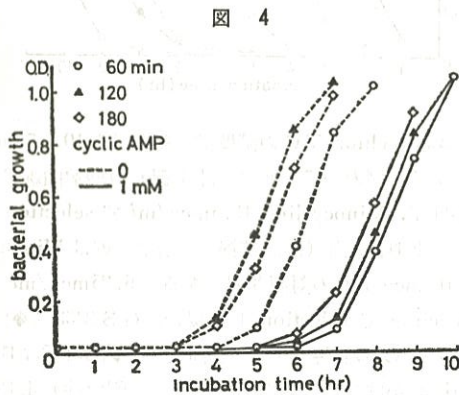


図 4

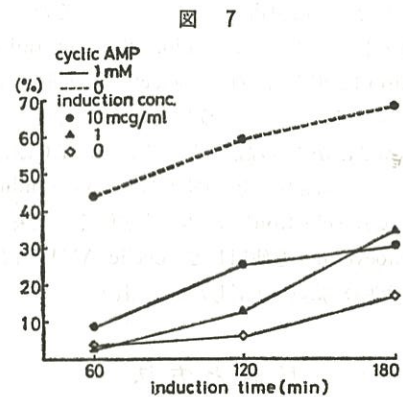


図 7

Minocycline が増殖を抑制する濃度であることがわかる。これら図 1, 2 より G S 2333, Minocycline の濃度条件が決まったことから, cyclic AMP 存在下, inducer である G S 2333 の誘導濃度と, 誘導効果を時間毎に検討する実験を試みた (図 3, 4, 5)。図 3 は cyclic AMP 添加, 無添加の場合に, G S 2333 1 mcg/ml で induction を 60, 120, 180 分間かけた後, Minocycline 6.25 mcg/ml で selection した時の増殖曲線である。図 4 は induction をかけない場合であり, 図 3 の増殖曲線

の対照となる。図 3, 4 の比較からわかるように, cyclic AMP 存在下では 180 分間 induction をかけた場合のみ僅かに, induction の効果のみをみる事ができる。G S 2333 の induction 濃度を 10 mcg/ml にし, 同じ条件下で増殖をみたのが図 5 である。図 4 の induction をかけない時に比較し, cyclic AMP 存在下では誘導時間によって約 1 時間の差で増殖が速いことがみられる。また, cyclic AMP が存在しない時も同様であることがわかる。

Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株の時間毎に誘導のかかる割合をみるために、cyclic AMP 存在下、非存在下で G S 2333 10mcg/ml で induction を 60, 120, 180 分間かけ、Minocycline 25mcg/ml を含有する L-agar 上に適当数コロニー(A)を出現させ、その A より induction をかけない時の Minocycline 25mcg/ml selection でのコロニー数(B)を引き、A で割って % で $(A-B/A \times 100)$ 表現したのが図 6 である。従って、縦軸は $A-B/A \times 100$ 式より算出される誘導のかかった率であり、横軸は誘導時間を示したものである。cyclic AMP が存在する場合も、存在しない場合も誘導時間が 120 分の時にその率が高い。すなわち、120 分の時に誘導が多くかかっていることになる。また、cyclic AMP 存在下、非存在下で殆んど同じパターンをとっていることもみられ、60 分間と 180 分間 induction をかけた時のその割合は同じである。次に同様に、G S 2333 の induction 濃度を 10, 1, 0 mcg/ml とし、誘導のかかった率を検討した (図 7)。cyclic AMP が存在している場合は、induction 濃度の高い順にその率も高くなっていることがみられる。図 6, 7 の実験では Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株の誘導のかかった率を算出したが、いずれの場合でも誘導時間が 120 分の時に誘導のかかる割合が多いことが観察された。

考 察

cyclic AMP を添加したことによる E. coli Gp 1/R₁₀₀ rev-1 の TC 感受性増加の原因は、cyclic AMP が菌の透過性に変化をもたらした結果であると考えた。cyclic AMP 添加によって透過性が増加するならば、TC 耐性の誘導に必要な TC 濃度も低いことが考えられ、事実 0.001mcg/ml 以上であった⁵⁾が、今回の G S 2333, Minocycline を使用しての誘導効果の実験により、TC

耐性の誘導に必要な TC 濃度は、やはり一定の濃度が必要ではないかと考えられる。それは、図 3, 5 のように G S 2333 1, 10 mcg/ml で induction をかけた時、図 4 の induction かけない時の対照に比較し、1mcg/ml で induction をかけた時は殆んどその誘導効果がみられなかったこと、および 10mcg/ml の場合には 1 時間の増殖速度の差がみられたことによる。誘導のかかった割合を時間毎に求めた (図 7) が、ここでは induction をかけない時に比較し、G S 2333 1mcg/ml で induction をかければ 120, 180 分のときに差が認められることより誘導効果が認められる。しかし、実験方法が異なることより TC 耐性の誘導を論ずるにはさらに多くの実験成績が必要であると思われる。いずれにしても、今回の実験系からは、TC 耐性の誘導には一定濃度以上の TC が必要であり、cyclic AMP が存在しても、その濃度が低くなることはないと考えられる。

おわりに、G S 2333, Minocycline を分与していただいた群馬大学医学部微生物学教室の方々へ深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 春日徳彦, 金子通治, 金丸佳郎: 山梨県立衛生研究所年報, 15, 55 (1971)
- 2) 金子通治, 岩間まつ子, 春日徳彦: 同上, 16, 44 (1972)
- 3) Izaki, K., K. Kiuchi and K. Arima: J. Bacteriol., 91, 628 (1966)
- 4) 金子通治, 春日徳彦: 山梨県立衛生研究所年報, 15, 60 (1971)
- 5) 金子通治, 岩間まつ子, 金丸佳郎, 春日徳彦: 同上, 16, 47 (1972)