

7. cyclic AMP 添加による大腸菌の薬剤感受性変化

(4) テトラサイクリン耐性の発現

金子 通 治
金丸 佳 郎

岩 間 まつ子
春 日 徳 彦

大腸菌 Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株に cyclic AMP を添加した場合にテトラサイクリン (TC) に対して感受性が増加する現象⁽¹⁾は, cyclic AMP が細胞内への透過性を増加させるためであると考えられた。すなわち, 菌が多量の TC をとり込んだ場合に耐性誘導による耐性の発現をおこす前に菌が増殖を抑制され, 感受性が増加したとみることができる。クロラムフェニコール (CM), ストレプトマイシン (SM) に対して耐性度の変化がみられなかった⁽¹⁾のは R 因子による CM, SM の耐性機構が薬剤不活化酵素の産生によるものである^(2, 3)ためと考えられる。前報⁽⁴⁾に示した通り TC 感受性の増加の現象が cyclic AMP 添加によって菌の透過性が増加したことによると考えて, cyclic AMP 添加, 無添加の場合の細胞内の TC 蓄積量を測定したことにより理解できた。R 因子による TC 耐性は誘導されることが知られている⁽⁵⁾が, Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株を TC 前処理による耐性の誘導はその後 cyclic AMP を添加してもその効果は認められ, TC 蓄積量にも差がなかった。これらの現象から, cyclic AMP が細胞内への TC の透過を増加させるならば, cyclic AMP 存在下で低濃度の TC 前処理によっても誘導効果が起こることが考えられる。これらのことから TC 耐性の発現に関し, TC 耐性の誘導という観点より検討したので報告する。

材 料 と 方 法

使用菌株は E. coli Gp 1/R₁₀₀ rev-1 であり, 培養液はすべての実験を通して L-broth である。使用薬剤はクロルテトラサイクリン (日本レダリー-K.K.), cyclic AMP は第一化学薬品 K. K. 製のものを使用した。TC 耐性の誘導は低濃度 (必要に応じて 5~0.001 mcg/ml) の TC により 1.5 時間前処理する方法をとり, TC 蓄積量は前報⁽⁴⁾の方法によった。菌の増殖は波長 630 nm による吸収によって測定した (Shimazu spectronic 20)。

結 果

cyclic AMP が細胞内への TC の透過を増加させるな

らば, 低濃度の TC 前処理効果も認められると考えて菌の増殖と TC 蓄積量を測定した。L 字管による振盪培養 (37 °C) で菌を 2 時間増殖させ, cyclic AMP を 1 時間作用させた。その後, 0.05~5 mcg/ml の TC 濃度で 1.5 時間処理を行なった。前処理後の菌を TC 50 mcg/ml 含んだ新鮮な L-broth 中に 100 倍希釈となるように接種し, 時間毎に O. D. (optical density) を求めて増殖曲線とした (図 1)。

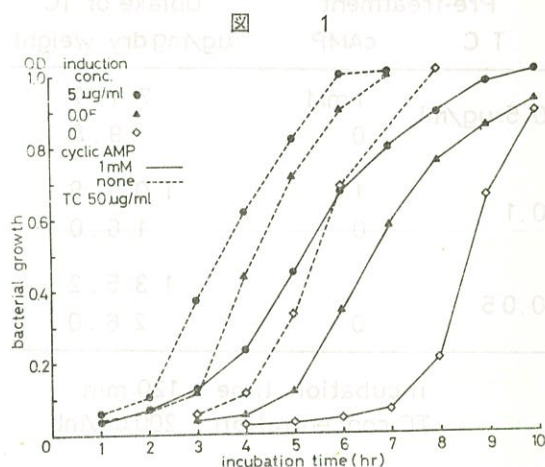


図 1 中で 1, 0.5, 0.1 mcg/ml の TC 前処理の曲線が画かれてないのは, 5 mcg/ml と 0.05 mcg/ml で前処理した増殖曲線の間にはいるので省略した。cyclic AMP が存在しない時, TC 前処理の効果は 1~2 時間の差で早く現われるが, cyclic AMP 処理し, TC 前処理しないものは 7 時間目から増殖が急激に起こり, 徐々に耐性の発現が行なわれた結果であると考えられる。図 1 の増殖曲線を cyclic AMP 添加の場合 (+) を, 無添加の場合 (-) の O. D. 値で割り補正して % で表現したのが図 2 である。前処理しない時は 7 時間まではその値が低いが, 前処理したものは 3, 4 時間目を境に値が上昇するとともに濃度に依存していたことが認められ, これは TC 耐性の獲得が予想される。cyclic AMP が存在しても低濃度の TC 前処理効果がみられたことにより, TC 前

図 2

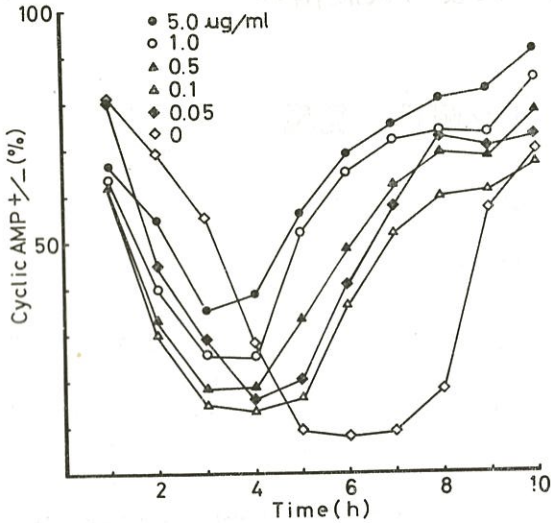


表 1

Pre-treatment TC	cAMP	Uptake of TC ug/mg dry weight
0.5 ug/ml	1 mM	7 1.7
	0	9.8
0.1	1	10 5.9
	0	16.0
0.05	1	13 5.2
	0	26.0

Incubation time : 120 min
TC concentration : 200 ug/ml

処理濃度が低くても TC 蓄積量に差はないと考え、TC 蓄積量を求めたのが表 1 である。表 1 に見られるようにいずれの前処理濃度においても cyclic AMP 存在、非存在下で蓄積量には 5~7 倍の差があったが、前処理濃度に TC 蓄積量が並行していたことが認められた。図 1 に観察された通り TC 前処理濃度が低くてもその効果が認められたが、TC 耐性の誘導にどの程度の前処理濃度までその効果が認められるかを検討した (図 3)。増殖曲線は図 1 を求めた時と同様の操作により求めた。TC 前処理濃度は 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 及び 0.001 mcg/ml と対照として前処理しないものをとった。cyclic AMP 1 mM で処理した場合、前処理濃度が 1, 0.1, 0.05, 0.01 mcg/ml の増殖曲線は 0.5 と 0.001 mcg/ml の増殖曲線の間にはいるので省略した。図 3 にみられるように、0.001 mcg/ml の TC 濃度が菌に影響

図 3

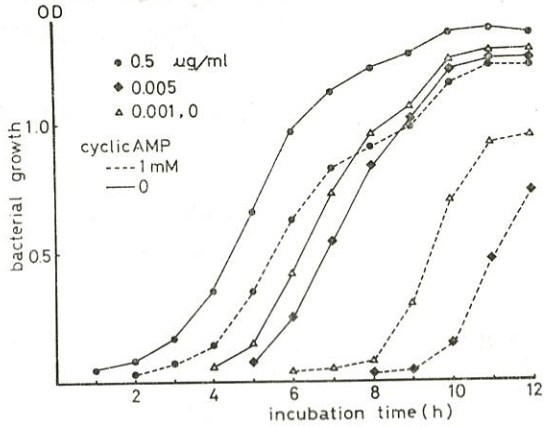
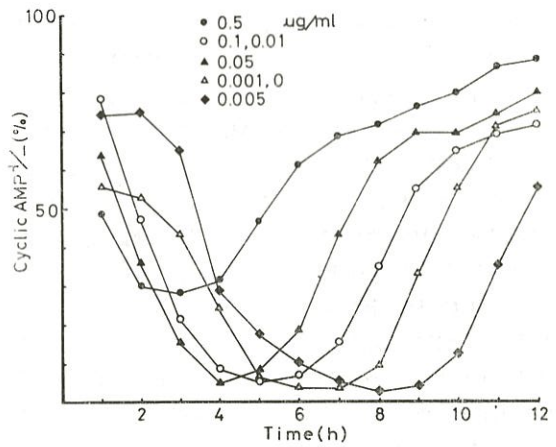


図 4



を与えず前処理効果がない濃度であると考えられる。cyclic AMP の存在にかかわらず 0.001 mcg と 0.005 mcg/ml の濃度で増殖曲線が逆転していることが観察された他は、誘導の程度は前処理する TC 濃度に依存する傾向がみられた。図 3 の増殖曲線を図 2 を求めた時と同じように cyclic AMP の効果を補正し、% で表現したのが図 4 である。図 4 においても図 2 にみられた時と同じパターンを示し、TC 前処理濃度に依存していた。

論 議

E. coli Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株において cyclic AMP 存在下に TC 感受性が増加することは、cyclic AMP が菌の透過性を増加させた結果であると考えた。この株の耐性の誘導の効果があつたことから低濃度の TC でも cyclic AMP 存在下に耐性の誘導が起こることが予想され、事実 cyclic AMP 存在下においても耐性の誘導がみられた。その結果、0.001 mcg/ml 以上の TC 濃度が前効果を示す濃度であることがみられた。が、0.005 mcg/ml

と 0.001 mcg/ml の TC 濃度で前処理効果が逆転していた。前処理する TC 濃度に依存して連続的な増殖曲線であったことから、前処理濃度が低い場合には、TC 耐性の発現に時間が長くなるのではないかと考えられる。今回の実験系では TC を誘導と選択に用いるため、前処理濃度とその誘導効果を時間毎に検討できなかった。そこで cyclic AMP 存在下、TC 耐性の誘導に関して抗菌力が低く誘導能を有するものを inducer とし、誘導後の selection には誘導能が低く抗菌力を有する Minocycline を使用することで理解できるのではないかと考え、現在実験検討中である。

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) Okamoto, S. and D. Mizuno: J. Gen. Microbiol., **35**, 125 (1964)
- 3) Okamoto, S. and Y. Suzuki: Nature **208**, 1301 (1965)
- 4) 金子通治, 岩間まつ子, 春日徳彦: 山梨県立衛生研究所年報 **16**, 44 (1972)
- 5) Izaki, K., K. Kiuchi and K. Arima: J. Bacteriol. **91**, 628 (1966)