

6. cyclic AMP 添加による大腸菌の薬剤感受性変化

(3) テトラサイクリンの蓄積

金子 通治 岩間まつ子 春日 徳彦

著者らは大腸菌のある変異株 (Gp1/R₁₀₀ rev-1) に adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) を添加した場合, テトラサイクリン (TC) に対して約 64 倍感受性が増加したことを報告した⁽¹⁾。また, R 因子による TC 耐性は誘導される⁽²⁾ ことがすでに知られており, 我々も TC 5 mcg/ml で 1.5 時間前処理した場合にこの株においても TC 耐性誘導の効果がみられたことを報告した⁽²⁾。

このような事実から cyclic AMP 添加による TC 感受性の増加は, cyclic AMP が細胞内への TC の透過を増加させることによると考えられる。それを明らかにするために本報では, E. coli Gp1/R₁₀₀ rev-1 株における TC の細胞内蓄積量を検討したので報告する。

材料と方法

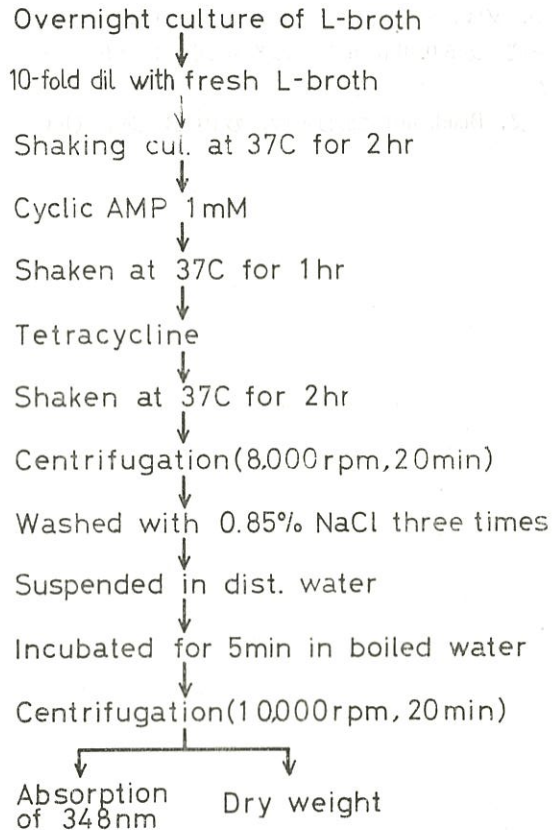
使用菌株は E. coli Gp1/R₁₀₀ rev-1 であり, 必要に応じて E. coli W 3630/R₁₀₀, E. coli Gp1/R₁₀₀ も使用した。使用薬品として cyclic AMP は第一化学薬品 K. K. テトラサイクリンは日本レダリー K. K. のクロルテトラサイクリン, 窒化ナトリウムは和光純薬工業 K. K. 製のものをそれぞれ使用した。培養液は L-broth を用い, TC 耐性の誘導は 5 mcg/ml の TC で 1.5 時間前処理する方法によった。TC 蓄積量は図 1 に示した通りの方法により測定し, 蓄積量はすべて mcg/mg dry weight で表現した。

結 果

cyclic AMP 1mM を添加し, 1 時間振盪後に TC 200 mcg/ml を加えて 30, 60, 120 分の各時間毎に sample を 100 ml とり各々の TC 蓄積量を測定し, 無添加の対照と比較した。TC 50, 12.5 mcg/ml を加えた場合も同じ操作により, TC 蓄積量を求めた (図 2)。図に示したように, cyclic AMP 添加による影響を 120 分後の TC 蓄積量によってみると, TC 50 mcg/ml では対照とほとんどその差は認められないが, 200 mcg/ml では cyclic AMP を添加した時に 94.4 mcg, 添加しない時は 30.5 mcg であり 3 倍以上もの差となった。TC の蓄積量は低濃度の TC 前処理によって減少することが

図 1

Experimental procedure



知られている⁽⁴⁾。そこで TC 5 mcg/ml で 1.5 時間前処理した後に cyclic AMP 1mM を添加し, TC 耐性の誘導が TC 蓄積量に及ぼす影響をみた。

結果は図 3 にみられるように, 120 分後の TC 蓄積量は cyclic AMP を添加した場合 僅か 9.9 mcg であり, 図 2 に示した TC 前処理しない時の 94.4 mcg に比較し約 1/10 であった。また, cyclic AMP の添加, 無添加にかかわらず TC 蓄積量の差はなかった。TC 前処理することにより耐性の誘導効果が起こり, cyclic AMP を添加しても TC の蓄積量には差がなかったと考えられ

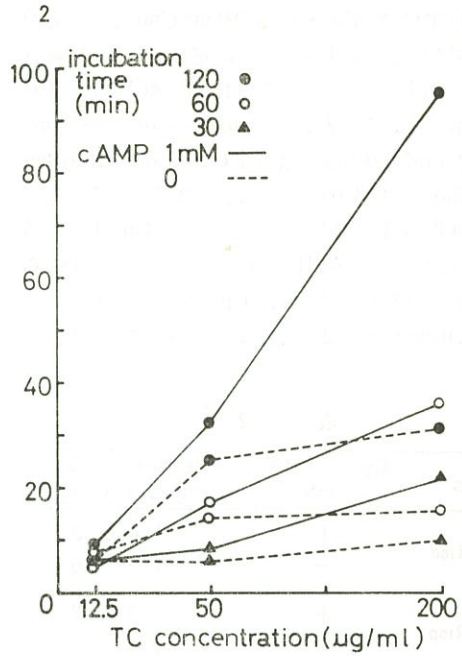
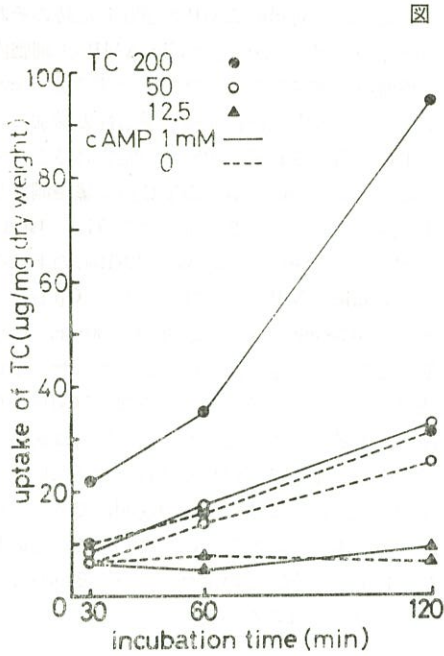
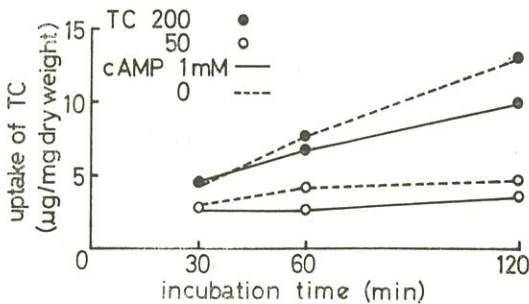
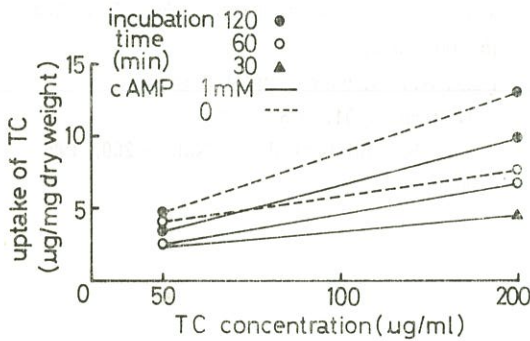


図 3
TC Resistance Induced



る。先に報告したように、TC 50mcg/ml, cyclic AMP 1mM という条件下で E. coli Gp1/R₁₀₀ rev-1 が 10 時後にも増殖がみられず耐性の発現が行なわれず、同じ条件下で TC 5mcg/ml で前処理した場合は、前処理効

果が現われて増殖が僅かではあるがみられたことから cyclic AMP が存在しても TC 前処理によって耐性が誘導されたことになる。このことは、上記の図 2, 図 3 の TC 蓄積量の結果で一応理解できる。

代謝阻害剤である窒化ナトリウムが TC の蓄積を阻害することがすでに知られている⁽⁴⁾。そこで Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株における窒化ナトリウムの TC 蓄積量に及ぼす阻害効果をみた (表 1)。

表 1

Cyclic AMP 1 mM	Sodium azide 10 mM	Uptake of TC ug/mg dry weight
+	+	87.3
+	-	151.4
-	+	48.6
-	-	96.2

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

cyclic AMP 添加 37 °C, 1 時間振盪後に TC 200 mcg/ml と窒化ナトリウム 10 mM を同時に添加し、阻害効果をみた。表 1 に示したように cyclic AMP 1mM の添加にかかわらず、窒化ナトリウムを加えることにより TC 蓄積量は約 1/2 になっている。

Gp 1/R₁₀₀ rev-1 株以外の Gp 1/R₁₀₀, W 3630/R₁₀₀ 株

においての TC 蓄積量を TC 200 mcg/ml 添加という条件下で図 1 に示した方法により測定した。この両株は、cyclic AMP の存否に影響されずほぼ同じ量の TC 蓄積量を示している (表 2)。Gp1/R₁₀₀ rev-1 株は cyclic AMP 1 mM の添加による TC 蓄積量が 116.6 mcg であって無添加の 58.0 mcg に比して 2 倍である。しかし、上記 3 株の TC 蓄積量に注目すると Gp1/R₁₀₀, W 3630/R₁₀₀ 株の cyclic AMP 無添加ではそれぞれ 151.6, 147.4 mcg であるのに対して、Gp1/R₁₀₀ rev-1 株でのそれは 58.0 mcg で前 2 株の約 1/3 であることが観察された。

表 2

Strains	Cyclic AMP 1 mM	Uptake of TC μ g/ mg dry weight
Gp1/R ₁₀₀	+	946.3
	-	151.6
w3630/R ₁₀₀	+	134.7
	-	147.4
Gp1/R ₁₀₀ rev 1	+	116.6
	-	58.0

Incubation time: 120 min
TC concentration: 200 μ g/ml

論 議

E. coli Gp1/R₁₀₀ rev-1 株に cyclic AMP を添加することによって TC に対する感受性が増加する現象は、cyclic AMP 存在下経時的に TC を添加した時、TC 存

在下経時的に cyclic AMP を添加した時のそれぞれの増殖曲線の結果⁽²⁾からも cyclic AMP が細胞内への TC の透過を増加させるためであると考えた。cyclic AMP が予め培養液中に存在すると透過性の増加によって多量の TC が蓄積され菌の増殖が抑制されると考えられる。このことは今回の細胞内の TC 蓄積量を測定したことにより理解できた。表 2 に示したように、Gp1/R₁₀₀ rev-1 と他の 2 株 Gp1/R₁₀₀, W 3630/R₁₀₀ の TC 蓄積量の比較で cyclic AMP を添加しない時に Gp1/R₁₀₀ rev-1 の蓄積量が 58 mcg と耐性度が同じ 200 mcg である⁽¹⁾の他に他の 2 株の約 1/3 の蓄積量しかなかった。TC の耐性が透過性の低下によるものであるならば菌体からの TC の漏れがあることも考えられ、この場合は図 1 に示した実験途中での TC を測定しなければならない。また、蓄積量の変化だけでは TC 耐性の説明ができず、他にも要因があるとも考えられる。いずれにしてもこの Gp1/R₁₀₀ rev-1 株の変異がどのような性質の変異株であるのか検討しなければならないと考える。

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) 金子通治, 春日徳彦: 山梨県立衛生研究所年報 15, 60 (1971)
- 3) Izaki, K., K. Kiuchi and K. Arima: J. Bacteriol., 91, 628 (1966)
- 4) Arima, K. and K. Izaki: Nature 200, 192 (1963)

