

ラウリル硫酸リチウムの R 因子除去作用について

桶谷修三 浦田 治*

新潟大学歯学部口腔細菌学教室

寺尾 通 徳

新潟県衛生研究所

(昭和 59 年 5 月 14 日受付)

Elimination of Drug Resistance (R) Factor in *Escherichia coli* by
Treatment with Lithium Dodecyl Sulfate

Shūzō OKETANI and Osamu URATA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Niigata University

Michinori TERAO

Public Health Laboratory, Niigata Prefecture

要 旨

大腸菌、赤痢菌等の R 因子は自然に脱落することもあるが、各種の理化学的影響により脱落することが認められている。友枝等は陰イオン性界面活性剤である Sodium dodecyl sulfate (以下 SDS) が大腸菌の R 因子および F 因子などのプラスミドを高率に除去することを報告した。吾々は先に塩化リチウムにも R 因子を除去する作用を認めたので、SDS のナトリウムをリチウムに置換した化合物が SDS よりも有効に作用するのではないかと考え Lithium dodecyl sulfate (以下 LDS) を合成し R 因子に対する除去作用を SDS と比較検討した結果、LDS が SDS よりも優れた除去効果を示すことを認めた。また LDS の作用を受けた R 因子保有大腸菌の形態を電子顕微鏡により観察した。

は実地医学上、また社会的に大きな問題となっている。反面、腸内細菌の薬剤耐性因子（以下 R 因子）の研究は医学細菌学のみならず、微生物遺伝学や分子生物学の分野においても興味ある研究課題を提供して来た。このような R 因子による耐性菌の増加の問題に対し、実地医学上各種の試みがなされてきた。すなわち、1. R 因子の伝達阻害剤の研究。2. 耐性化した菌を感受性化する薬剤の研究。3. R 因子保有菌に選択的殺菌作用を示す薬剤の研究。4. R 因子による耐性化機構に抵抗する誘導体の研究等である。我々は上記 2 および 3 について関心を持ち実験を行ってきたが、R 因子の除去剤として知られる SDS¹⁾ のナトリウムをリチウムに置換した型の新しい化合物を合成し、その作用を検討した結果、より優れた除去効果を認めたので報告する。

実験材料ならびに方法

緒 言

近年各種抗生物質に対する耐性菌の増加、蔓延

供試菌株（表 1）に示すごとく *Escherichia coli* K12 W3630 F⁻ 株、R 因子は R100-1 (TC, CP,

*現在新潟大学歯学部口腔解剖学第 1 教室

Table 1 Bacterial strain

Bacterial strain of Escherichia coli K12	Plasmid	Resistance makers	Compatibility group	Type of sex pili
W3630	—	—	—	—
W3630	R100	TC CP SM SA	F II	F-like
W3630	R100-1 (drd)	TC CP SM SA	F II	F-like

TC: Tetracycline

CP: Chloramphenicol

SM: Streptomycin

SA: Sulfadrug

SM, SA) および R100 (TC, CP, SM, SA) で何れも群馬大学医学部微生物学教室より分与されたものである。培地は pH 7.6 の Antibiotic medium No. 3 (Penassay broth 以下 PEB) (Difco) と Heart infusion (以下 HI) 寒天培地 (栄研) を用いた。

抗生物質は Chloramphenicol (以下 CP) (三共)

Tetracycline hydrochloride (以下 TC) (Lederle), Streptomycin sulfate (以下 SM) (明治) を使用した。

アルキル硫酸塩は SDS は Eastman 社を用い LDS の合成は岸田化学に依頼した。

アルキル硫酸塩による R 因子の除去 SDS および LDS は蒸留水で 10% 溶液とし、これをミリポアフィルター (マイレクス SLGS, 025 OS pore size 0.22 μ m) で濾過滅菌し、これを PEB で所要量に希釈した。

菌接種方法は PEB に培養した対数増殖期の *Escherichia coli* を同培地で 10^4 倍に希釈し、その 0.1 ml を 10 ml のアルキル硫酸塩含有 PEB に接種し、37°C の恒温槽に静置培養した。次に所定の培養時間 (24, 48, 72, 120 時間) 毎に前記培養の各希釈を HI 寒天平板にまき、生じたコロニーから各平板につき 50~200 ケを選び HI 寒天および 20 μ g/ml の CP 加 HI 寒天平板に接種し、HI 寒天で発育し CP 加培地で発育の見られないコロニーにつき更に TC, SM それぞれ 20 μ g/ml 含有培地で発育の有無を調べ、発育の認められないコロニーを耐性の脱落したもの、すなわち R 因子

の除去されたものと見なした。

増殖曲線のための生菌数測定 PEB (対照) および LDS 0.1% 含有 PEB 10 ml 各数本に対数増殖期の菌を 10^4 倍希釈し、その 0.1 ml を接種、所定の培養時間 (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間) 毎に対照および LDS 含有培地より 1 ml 宛採取し、これを PEB で 10^3 ないし 10^5 倍に希釈しその 1 ml をペトリーシャーレにとり混釈培養を行い、37°C 24 時間培養後生じたコロニー数より原培養液中の菌数を計算した。なお R 因子 (—) 菌の計測には混釈培養の際 CP を 20 μ g/ml になるよう添加した培地の発育菌数を CP 不添加培地に発育した菌数より差引いた数をもって R 因子 (—) 菌数とした。

走査型電子顕微鏡による観察

試料は PEB および 0.1% LDS 加 PEB 培養菌を生理的食塩水で 2 回遠心洗滌 (8,000 r. p. m. 10 分) して集菌し、0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) で緩衝した 1% glutaraldehyde と 1% paraformaldehyde 混合液中に分散浮游させて 12 時間 4°C にて前固定した。次いで 0.25 M sucrose を含む同緩衝液で 2 時間洗滌後、1% OsO₄ で 24 時間 4°C で後固定、アセトン系列により脱水し、臨界点乾燥 (日立 HCP-1 型) 後、カーボンおよび金パラジウム合金蒸着を行って日立 SSM-2 型走査電顕にて観察した。

実験成績

1. Lithium dodecyl sulfate (LDS) によ

Table 2 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with various concentrations of Lithium dodecyl sulfate (LDS)

Inoculum size (cells/ml)	LDS concn (%)	Time of incubation (hr)	No. of colonies showing drug susceptibility /no. of colonies tested	Frequency of drug-susceptible colonies (%)
3×10 ³	0	24	0/200	0
		48	0/200	0
		72	0/200	0
		120	0/200	0
	0.05	24	0/100	0
		48	3/100	3
		72	5/ 80	6.3
		120	52/ 80	65.0
	0.1	24	0/100	0
		48	2/100	2
		72	7/ 90	7.8
		120	70/ 90	77.8
	0.2	24	0/100	0
		48	1/100	1
		72	7/100	7
		120	65/ 90	72.2
	0.3	24	0/100	0
		48	0/100	0
		72	2/100	2
		120	20/ 95	21.1
	0.5	24	0/100	0
		48	0/100	0
		72	2/100	2
		120	5/100	5

る R 因子 (R100-1) の除去

1) LDS 含有 pH 7.6 PEB に *Escherichia coli* K12 W3630 (100-1) を接種し R 因子の除去効果を検討した結果, (表 2) に示すごとく R 因子の脱落は 48 時間後より現れ, 120 時間で著明となり, その際 LDS の濃度 0.05 ないし 0.2% の間において最も除去率が高いことを認めた。

2) 次に LDS の濃度を 0.1% とし培地 pH の R 因子除去効果に及ぼす影響を調べたところ (表 3), pH 7.6 ないし 8.0 で最も除去率の高いことが判った。一方 pH 6.0 においては除去効果が認められなかったもので, 更に同 pH において LDS

の濃度を変えて検討したところ (表 4), 比較的濃度の高い 0.5% 以上で作用を示し, 酸性側では LDS の R 因子除去効果が低下することが判明した。

2. LDS 加培地における菌の増殖曲線

LDS 添加培地に R 因子 (R100-1) (+) 菌を培養した場合の生菌数および R 因子 (−) 菌の消長を, 培養時間を追って調べたところ, (図 1) に示すように LDS 0.1% 加培養では対照に比べ, 発育最高菌数が少く, また菌数が最高に達すると溶菌し始めそれと同時に R 因子 (−) 菌が増加し, 時間の経過と共に R 因子 (−) 菌の占める比率が増

Table 3 Effect of pH on the elimination of R-plasmid (R100-1) by the LDS treatment (1)

pH	LDS concn (%)	Time of incubation (hr)	No. of colonies drug susceptibility /no. of colonies tested	Frequency of drug-susceptible colonies (%)
7.0	0	72	0/100	0
		120	0/100	0
6.0	0.1	72	0/100	0
		120	0/100	0
7.0	0.1	72	9/100	9
		120	46/100	46
7.6	0.1	72	5/100	5
		120	60/100	60
8.0	0.1	72	4/100	4
		120	60/100	60

Table 4 Effect of pH on the elimination of R-plasmid (R100-1) by the LDS treatment (2)

pH	LDS concn (%)	Time of incubation (hr)	No. of colonies showing drug susceptibility /no. of colonies tested	Frequency of drug-susceptible colonies (%)
6.0	0	72	0/100	0
		120	0/100	0
		168	0/100	0
	0.1	72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.2	72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.3	72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.4	72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.5	72	0/100	0
		120	0/100	0
		168	9/100	9
	0.6	72	3/100	3
		120	6/100	6
		168	56/ 60	93.3
	0.7	72	0/100	0
		120	0/100	0
		168	20/100	20

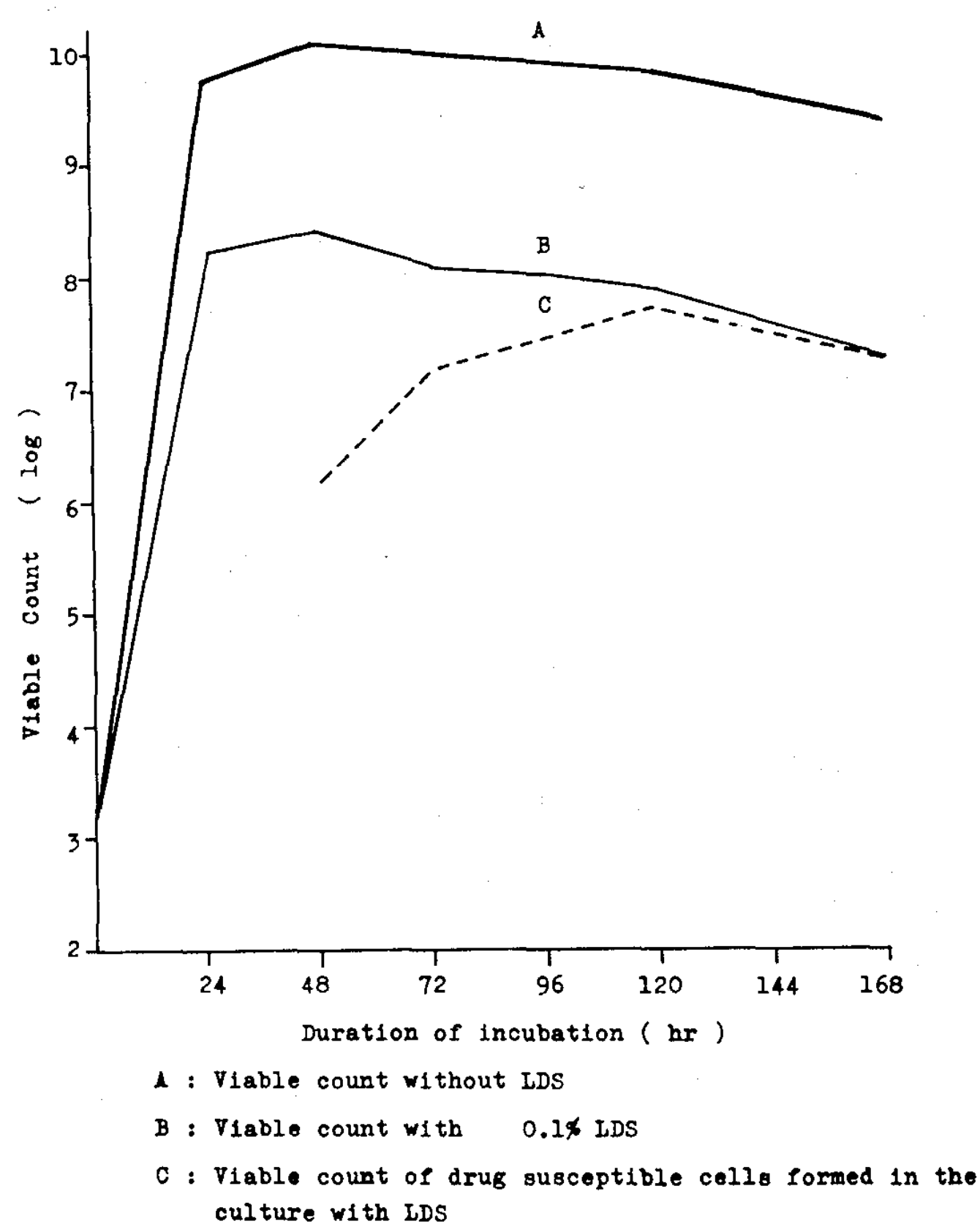


Fig. 1 Kinetics of the LDS treatment of *Escherichia coli* K12 W3630 R100-1

加して行くことを示している。

3. Sodium dodecyl sulfate (SDS) による R 因子 (R100-1) の除去

次に R100-1 について SDS の R 因子除去効果

を検討したが (表 5) に示す通り, 0.2~1.0% の濃度において明らかな除去作用を示したが, その除去率を LDS のそれと比較すると, より低く, R 因子の除去効果は LDS の方が優れていることが判明した。

4. LDS による R 因子 (R100) の除去

次に LDS の *Escherichia coli* K12 W3630 (R100) に対する除去効果を調べた。R100 は性線毛形成が抑制され R100-1 よりも性線毛形成の少ない R 因子である。実験の結果 R 因子の除去率は (表 6) の通り R100-1 に比べ最高 11% と低く, 除去効果は性線毛の形成の多少と関係のあることが判った。

5. 電子顕微鏡所見

次に形態学的に LDS の作用を受けた R100-1 保有 *Escherichia coli* W3630 株の所見を走査型電顕像により観察した。それによると 0.1% LDS の作用を受けた菌は 72 時間で膨大の像が認められ, また 120 ないし 168 時間で著明な溶菌と不規則形の出現が認められた (図 2)。

考 察

細菌細胞内のプラスミドである F 因子や R 因子等は培養ないし保存中自然に脱落することもある

Table 5 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with various concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS)

Inoculum size (cells/ml)	SDS concn (%)	Time of incubation (hr)	No. of colonies showing drug susceptibility /no. of colonies tested	Frequency of drug-susceptible colonies (%)
5×10^3	0	72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.2	72	2/100	2
		120	14/ 75	18.7
	0.5	72	3/ 60	5
		120	18/ 70	25.7
	1.0	72	1/100	1
		120	15/100	15
	2.0	72	1/100	1
		120	10/130	7.7

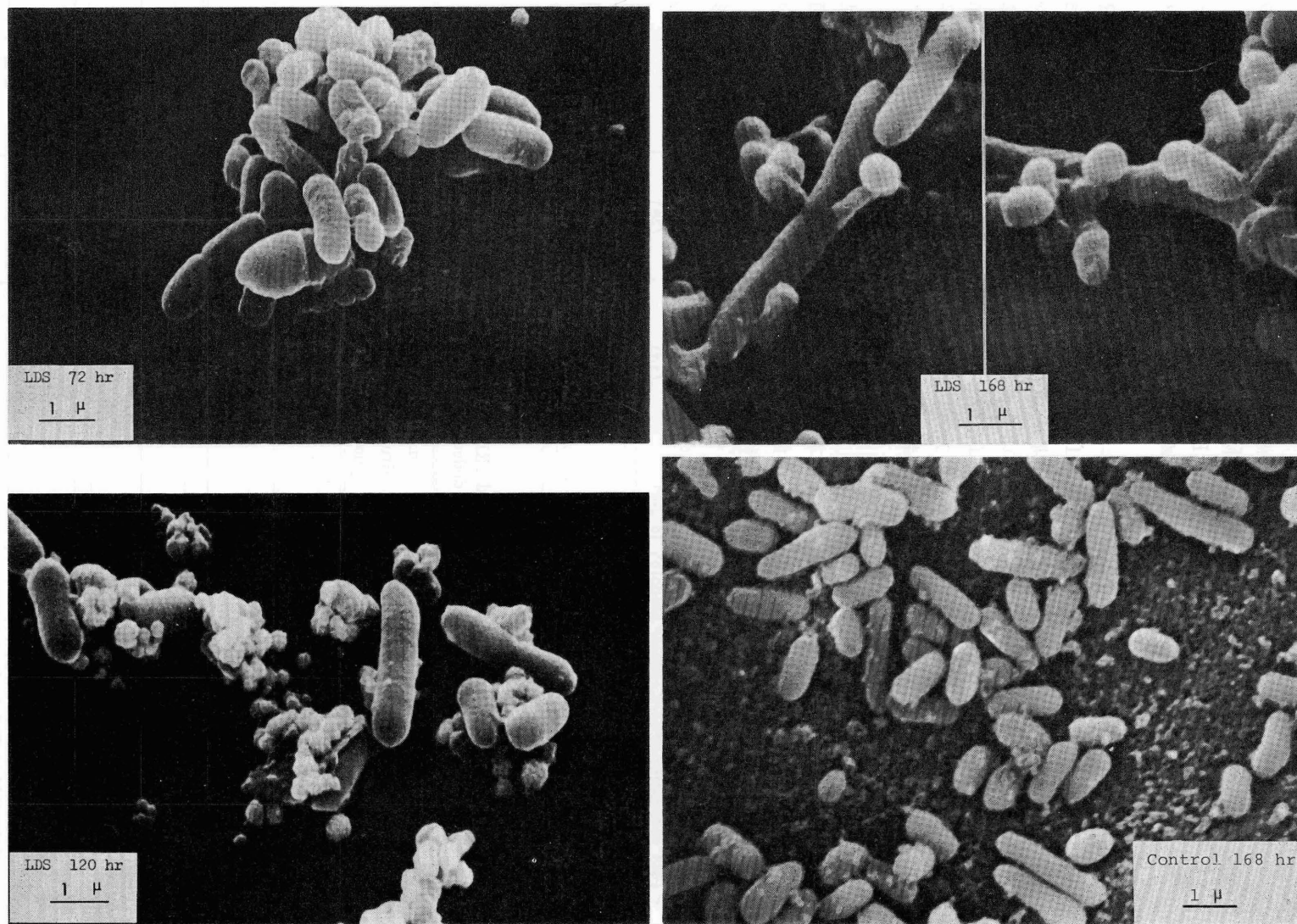


Fig. 2 Scanning electron micrograph of *Escherichia coli* K12 W3630 (R100-1)

Table 6 Elimination of R-plasmid (R100) by treatment with various concentration of LDS

Inoculum size (cells/ml)	LDS concn (%)	Time of incubation (hr)	No. of colonies showing drug susceptibility /no. of colonies tested	Frequency of drug-susceptible colonies (%)
3×10^3	0	24	0/100	0
		48	0/100	0
		72	0/100	0
		120	0/100	0
	0.05	24	0/100	0
		48	0/100	0
		72	2/100	2
		120	11/100	11
	0.1	24	0/100	0
		48	1/100	1
		72	4/100	4
		120	8/100	8
	0.3	24	0/100	0
		48	0/100	0
		72	1/100	1
		120	1/100	1
	0.5	24	1/100	1
		48	0/100	0
		72	0/100	0
		120	1/100	1

るが、種々の理化学的因子により、より効率的に脱落することが知られている。プラスミドの除去作用を示す因子としてこれまで報告の見られるものは、Acridine 系色素 (Acriflavine 等)²⁾³⁾⁴⁾, Phenanthridine 系色素 (Ethidium bromide)⁵⁾ などの色素類, 化学療法剤として Nitrofurantoin 剤⁶⁾⁷⁾, Macarbomycin⁸⁾, Flavomycin⁹⁾, Rifampicin¹⁰⁾, Novobiocin¹¹⁾ その他 Mitomycin C 等の制癌剤¹²⁾。界面活性剤として SDS¹⁾。その他, 或種の脂肪酸¹³⁾, β -phenethyl alcohol¹⁴⁾ などがあり, また物理学的な方法として高温処理¹⁵⁾¹⁶⁾, 紫外線照射法³⁾ なども報告されている。これらのうち Acriflavine, Ethidium bromide ならびに諸種制癌剤などはプラスミド DNA の合成を阻害する type であり, SDS, Macarbomycin, Fla-

vomycin 等は細菌の表層に作用し R 因子を持つ菌に選択的に作用する type のものである。後者に属する SDS は細胞膜の溶解等に利用される界面活性剤であるが, 本剤について友枝¹⁾¹⁷⁾ は細菌の雄菌が雌菌よりラウリル硫酸塩である SDS に対し高い感受性を示すため, SDS が雄菌に選択毒性を示すと述べている。すなわち R 因子 (+) 菌は F 様ないし I (アイ) 様線毛など性線毛を形成し, 遺伝子伝達能を具え, 雄菌としての性状を示すことが知られている。これらの性線毛がラウリル硫酸塩によりまず変化を受け, サブユニットに解離を起こし, ついで細胞質膜にも変化が及び溶菌を起こすとしている。つまりラウリル硫酸塩は性線毛形成 R 因子 (+) 菌に選択的に殺菌作用を示すため, R 因子 (+) 菌を SDS 加培地に培養

した場合、菌の増殖中に生じた R 因子 (—) 菌が増殖し優位となる現象が起り、このことが R 因子除去の主な理由であると述べている。吾々の実験においてもラウリル硫酸塩により R100-1 で R100 よりも高い除去効果が認められたが、R100 は性線毛形成を抑制する状態の R 因子であるのに対し、R100-1 は抑制の除かれた derepressed type (drd) の R 因子であって性線毛形成の多いことが知られており、上述の理由により R 因子の除去が高率に起こるものと考えられ LDS の作用機序も主に性線毛を通じて発現されることを示唆している。併し SDS には R 因子の伝達障害作用もあり、また染色体に組み込まれた Hfr の F 因子も除去する作用があるので¹⁸⁾、ラウリル硫酸塩の作用機序は単に選択的殺菌作用とのみ簡単には説明し切れない点もある。

次にリチウム塩も細菌細胞の表層に作用する物質に属し、Pitzurra¹⁹⁾等は塩化リチウムが大腸菌をスフェロプラスト化することを明らかにしたが、落合等²⁰⁾は塩化リチウムが大腸菌、赤痢菌等をスフェロプラスト化する作用を示し、同時に数種の薬剤に対する感受性を高めることを報告し、また桶谷²¹⁾はリチウム塩に R 因子の脱落を促進させる作用のあることを認め報告した。

以上の理由から吾々は SDS のナトリウムをリチウムに置換した場合、ラウリル硫酸塩の R 因子に対する作用が増強されるのではないかと考え、ラウリル硫酸リチウムを合成し R100-1 について、SDS とその作用を比較したところ、リチウムのアルキル硫酸塩は、より低濃度でしかもより高率に R 因子の除去作用を示すことを認めた。但し弱酸性側 (pH 6.0) においては作用効果が低下する。また LDS の作用を受けた (R100-1)⁺ 大腸菌は電子顕微鏡上、菌体の膨大、溶菌その他不規則な形態を示すことが認められ、特に R 因子除去の著明となる 120 時間以降において溶菌が著しい。この際当然リチウム自身もまた細胞表層に作用し、ラウリル硫酸イオンの作用と相俟って増強効果を示すことが考えられるが、ラウリル硫酸基の溶菌作用が強いため、リチウムイオン自身の増強作用を明らかにすることは困難であった。この点に関

し、今後溶菌作用の弱いアルキル硫酸塩を選び比較検討する予定である。

結 論

以上の実験成績を要約すれば

1. LDS は *Escherichia coli* K12 W3630 (R100-1) に対し R 因子除去作用を示し、その作用は培養 120 時間以降著明であり、0.1~0.2% の濃度で最も除去率が高かった。
2. LDS の R 因子除去作用は pH 7.6~8.0 で著しく、酸性側 (pH 6.0) では作用は減弱する。
3. LDS は SDS よりも、より低濃度で、より高率に R 因子を除去する。
4. LDS の作用を受けた *Escherichia coli* K12 W3630 (R100-1) は電顕的に膨大、溶菌および不規則変形等の形態変化を示した。

文 献

- 1) Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N. and Nakamura, S.: Effective elimination of drug resistance and sex factor in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol., **95**: 1078-1089, 1968.
- 2) Hirota, Y. and Iijima, T.: Acriflavine as an effective agent for eliminating F factor in *Escherichia coli*. Nature, **180**: 655-656, 1957.
- 3) Watanabe, T. and Fukasawa, T.: Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. II Elimination of resistance factor with acridine dyes. J. Bacteriol., **81**: 679-683, 1961.
- 4) 亀田三男, 原田賢治, 鈴木ミツエ, 三橋 進: 腸内細菌の薬剤耐性に関する研究. 第 14 報: 薬剤耐性因子のアクリフラビン処理による人工的除去について. 日細菌誌, **17**: 171-175, 1962.
- 5) Bouanchaud, D. H., Scavizzi, M. R. and Chabbert, Y. A.: Elimination of ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. J. Gen. Microbiol., **54**: 417-425, 1969.
- 6) 桶谷修三, 宮村定男, 滝沢 元, 川合敏男, 野

- 崎初美: Nitrofurantoin 剤の耐性除去作用について. 日細菌誌, **23**: 224, 1968.
- 7) 桶谷修三, 佐藤みち子, 佐藤尚美, 近藤 亘, 川合敏男: Nitrofurantoin 剤の耐性菌に対する作用. 日細菌誌, **24**: 74, 1969.
- 8) Mitsuhashi, S., Iyobe, S., Hashimoto, H. and Umezawa, H.: Preferential inhibition of the growth of *Escherichia coli* strains carrying episomes. J. Antibiot., **23**: 319-323, 1970.
- 9) 渡辺 力, 緒方康子, 菅原花登美, 小田和世, Flavomycin と R 因子. 日細菌誌, **26**: 579-580, 1971.
- 10) Riva, S., Fietta, A., Berti, M., Silvestri, L. G. and Romero, E.: Relationships between curing of the F episome by rifampicin and by acridine orange in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents. Chemother., **3**: 456-462, 1973.
- 11) McHugh, G. L. and Swartz, M. N.: Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. Antimicrob. Agents. Chemother., **12**: 423-426, 1977.
- 12) 久保田たみ子, 伊予部志津子, 井上松久, 三橋 進: 細菌におけるプラスミド性薬剤耐性因子の抗癌剤による除去. Chemotherapy, **24**: 1348-1349, 1976.
- 13) Nakamura, H.: Plasmid-instability in *acr* A mutants of *Escherichia coli* K12. J. Gen. Microbiol., **84**: 85-93, 1974.
- 14) Wada, C. and Yura, T.: Phenethyl alcohol resistance in *Escherichia coli*. II Replication of F factor in the resistant strain C600. Genetics, **69**: 275-287, 1971.
- 15) Terawaki, Y., Takayasu, H. and Akiba, T.: Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. J. Bacteriol., **94**: 687-690, 1967.
- 16) Terawaki, Y. and Rownd, R.: Replication of the R factor Rts1 in *Proteus mirabilis*. J. Bacteriol., **109**: 492-498, 1972.
- 17) 友枝宗光: 細菌性線毛の構造と機能 (II). 蛋・核・素, **18**: 1211-1222, 1973.
- 18) Inuzuka, N., Nakamura, S., Inuzuka, M. and Tomoeda, M.: Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains. J. Bacteriol., **100**: 827-835, 1969.
- 19) Pitzurra, M., and Szybalski, W.: Formation and multiplication of spheroplasts of *Escherichia coli* in the presence of lithium chloride. J. Bacteriol., **77**: 614-620, 1959.
- 20) 落合 宏, 宮村定男: 抗生物質の抗菌作用におよぼす塩化リチウムの影響について. 日細菌誌, **27**: 236, 1972.
- 21) 桶谷修三: リチウム塩の R 因子除去作用について. 日細菌誌, **32**: 410-411, 1977.