

アルコールの R 因子除去作用について

桶 谷 修 三

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 Alcohol

Shūzō OKETANI

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Niigata University

Michinori TERAO

Public Health Laboratory, Niigata Prefecture

要 旨

脂肪族化合物である一価の alcohol が R 因子除去作用を有するか否かを炭素数 1 の methyl alcohol から炭素数 12 の n-dodecyl alcohol について *Escherichia coli* K12 W3630 (R100-1) に対する作用を検討した。

その結果炭素数 1 より 5 までの低級 alcohol にはその作用は認められず、炭素数 6 以上の高級 alcohol に除去作用が認められ、炭素数の増加と共に除去率も高くなる傾向を示した。特に n-decyl alcohol および n-dodecyl alcohol では可成の除去効果を示すことを認めた。また n-dodecyl alcohol では R 因子の解離現象も認められた。

緒 言

吾々は先報¹⁾においてアルキル硫酸エステル塩である Lithium dodecyl sulfate (以下 LDS) および Sodium dodecyl sulfate (以下 SDS) の大腸菌 R 因子除去作用について述べた。ところで硫酸エステル化しない、alcohol の型では R 因子

除去作用を有するか否かは興味のあるところである。

今回は鎖式一価の alcohol について炭素数 1 の methyl alcohol から炭素数 12 の dodecyl alcohol を用い、同じく大腸菌の R 因子に対する作用を検討し、炭素数 6 以上の高級 alcohol において除去作用を認めたので報告する。

実験材料ならびに方法

供試菌株並びに R 因子

Escherichia coli K12 W3630 F⁻ (R100-1) (TC, CP, SM, SA) および *E. coli* K12 W3630 F⁻ (R100) (TC, CP, SM, SA) で主に R100-1 について実験を行った。菌株は何れも群馬大学医学部微生物教室より分与されたものである。

培地 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。

薬剤 Chloramphenicol (以下 CP) (三共), Tetracycline hydrochloride (以下 TC) (Lederle) Streptomycin sulfate (以下 SM) (明治), Sulfisoxazol (以下 SA) (山之内) を用い

た。

Alcohol 鎖式 alcohol は次の通りである。

C 1	methyl alcohol	CH ₃ OH
C 2	ethyl alcohol	C ₂ H ₅ OH
C 3	n-propyl alcohol	C ₃ H ₇ OH
C 4	n-butyl alcohol	C ₄ H ₉ OH
C 5	n-amyl alcohol	C ₅ H ₁₁ OH
C 6	n-hexyl alcohol	CH ₃ (CH ₂) ₅ OH
C 8	n-octyl alcohol	CH ₃ (CH ₂) ₇ OH
C 9	n-nonyl alcohol	CH ₃ (CH ₂) ₈ OH
C10	n-decyl alcohol	CH ₃ (CH ₂) ₉ OH
C12	n-dodecyl alcohol	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OH

芳香族 alcohol として β -phenethyl alcohol C₆H₅ (CH₂)₂ OH (何れも和光純薬) を用いた。

脂肪酸 n-capric acid CH₃(CH₂)₈ COOH (和光純薬)。

Alcohol による R 因子の除去

methyl, ethyl, n-propyl alcohol は水溶性のため直接培地に添加した。炭素数 4 以上の alcohol および β -phenethyl alcohol は水に不溶性のため溶解剤を使用した。すなわち、各種界面活性剤について検討した結果、Tween 80 (sorbitan monooleate) (和光純薬) 1% 溶液が alcohol 溶解作用もあり、またそれ自身 R 因子の除去作用を示さないので使用した。まず Tween 80, 1% 加 PEB で alcohol を 10% および 1% の溶液とし、これを更に Tween 80, 1% 加 PEB に所要量 (最高発育許容濃度迄) 添加した。次に PEB に増殖した対数増殖期の菌を同培地で 10⁴ 倍に希釈

し、その 0.1 ml を前記 alcohol 添加 PEB 培地に接種後、37°C の恒温槽に静置培養した。所定培養時間 (24, 72, 120, 168, 240 時間) 毎に菌の発育した培地より菌液をとり、適宜希釈して HI 寒天平板にまき、37°C, 18~24 時間培養後、各平板毎に 50 ないし 200 ケの発育コロニーをとり、HI 寒天平板および TC, CP, SM を 20 μ g/ml, SA を 200 μ g/ml 含有する HI 寒天平板に接種し、化学療法剤を含まない寒天平板に発育し、化学療法剤含有平板に発育しないコロニーを耐性の脱落、すなわち R 因子の除去されたものと見なした。

実験成績

1. 鎖式 Alcohol による R100-1 の除去

methyl, ethyl, n-propyl alcohol では R 因子の除去は認められなかった (表 1)。n-butyl および n-amyl alcohol も殆んど除去は認められない (表 2)。炭素数 6 の n-hexyl alcohol では (表 3) 168 時間以降軽度の除去が認められ、また R 因子の解離すなわち TC 耐性が脱落せず CP, SM, SA 耐性の脱落したものが認められた。また n-octyl alcohol では (表 3) 72 時間以降 R 因子の除去が認められ 240 時間で 11~12% に達した。n-nonyl alcohol では (表 4) 72 時間以降除去が認められ、240 時間では 37% に達した。n-decyl alcohol では (表 5) 120 時間以降著明な除去効果が認められ、240 時間では最高 99.5% に達した。n-dodecyl alcohol では培地と充分混和しないため最高発育許濃度も高くなったが (表 6)

Table 1 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with various alcohols

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)									
	methanol concn (%)				ethanol concn (%)			n-propanol concn (%)		
	0	1	2	3	1	2	3	0.5	1	2
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
240	1	0	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0

Medium: Penassay Broth

Table 2 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with various alcohols

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)						
	n-butyl alcohol concn (%)				n-amyl alcohol concn (%)		
	0	0.2	0.4	0.6	0.05	0.1	0.2
24	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	1(2)*
168	0	0	0	(0.5)*	1	2(1)**	0
240	(1)**	0	0	0	1	1	0

()* : Percent of colonies showing TC^s CP^r SM^r SA^r()** : Percent of colonies showing TC^r CP^s SM^s SA^s

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

Table 3 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with various alcohols

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)								
	n-hexyl alcohol concn (%)						n-octyl alcohol concn (%)		
	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.02	0.04	0.05
24	0	0	0	0	1	0	0	1	0
72	0	0	1	0	2	0	0	2	5
120	0	0	1	0	3	0	0	2	8
168	0	0	1	0	9	0	0	2	5
240	1	1	4	1	6(9)**	2	8	12	11

()** : Percent of colonies showing TC^r CP^s SM^s SA^s

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

Table 4 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with n-nonyl alcohol

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)				
	n-nonyl alcohol concn (%)				
	0	0.02	0.04	0.06	0.08
24	0	0	0	0	0
72	0	0	0	5	0
120	0	0	0	4	2
168	0	0	0	6	10
240	1	0	0	14	37

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

72時間以降除去が認められ、240時間で最高79%に達した。240時間で見るとTC, CP, SM, SA耐性の脱落しているものの他CP, SM, SA耐性の脱落しているもの、TC耐性のみ脱落している

ものなどR因子の解離現象が著明に現れていた。

2. 鎖式 Alcohol による R100 の除去について
R100-1 に対し著しい除去作用を示した n-decyl alcohol を用い R100 に対する除去効果を検討し

Table 5 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with n-decyl alcohol

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)				
	n-decyl alcohol concn (%)				
	0	0.02	0.04	0.06	0.08
24	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0
120	0	1	7	20	30
168	0	2	20	26	90
240	1	4	25	78	99.5

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

Table 6 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with n-dodecyl alcohol

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)				
	n-dodecyl alcohol concn (%)				
	0	0.1	0.3	0.5	0.7
24	0	0	0	0	0
72	0	2	1	1	6
120	0	35	2	0	6
168	0	71	7	0	14
240	1	15(33)**	41(7)**	34(1)**	3(5)* (71)**

()* : Percent of colonies showing TC^s CP^r SM^r SA^r

()** : Percent of colonies showing TC^r CP^s SM^s SA^s

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

Table 7 Elimination of R-plasmid (R100) by treatment with n-decyl alcohol

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)				
	n-decyl alcohol concn (%)				
	0	0.02	0.04	0.06	0.08
24	0	0	0	0	0
72	0	2	0	0	0
120	0	1	0	1	2
168	0	1	0	1	3
240	0.5	0	3	3	3

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

たが (表7) 線毛形成の少ない R100 では除去率は低かった。この現象はラウリル硫酸塩に見られた現象と同じであった。

3. 脂肪酸による R100-1 の除去について

n-decyl alcohol に相当する脂肪酸として n-capric acid を用い、同じく Tween 80, 1% 加培地で検討したが (表8) 除去率は低かった。すなわち、脂肪酸の型では alcohol よりも除去効果

Table 8 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with n-capric acid

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)					
	n-capric acid concn (%)					
	0	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2
24	0	0	0	0	0.5	0
72	0	0	0	0	0.5	0
120	0	0	0	0	3	0
168	0	0	0	1	0	0
240	1	0	0	6	0	0

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

Table 9 Elimination of R-plasmid (R100-1) by treatment with β -phenethyl alcohol

Time of incubation (hr)	Frequency of drug susceptible colonies (%)					
	β -phenethyl alcohol concn (%)					
	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
24	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	1	0	4
160	0	1	0	1	3	11
240	1	1	0	2	5	20

Medium: Penassay Broth containing 1% Tween 80

が低いことが示された。

4. β -phenethyl alcohol による R100-1 の除去について

β -phenethyl alcohol を用い同じく Tween 80, 1% 加培地で R100-1 に対する R 因子の除去作用を検討した結果 (表 9) 120 時間以降除去作用が認められ 240 時間で最高 20% に達した。

考 察

脂肪族化合物に属する脂肪酸²⁾ およびアルキル硫酸エステル塩であるラウリル硫酸塩について R 因子除去作用の報告が見られ, 特に LDS¹⁾ および SDS³⁾ のプラスミド除去作用は強力である。

吾々は硫酸エステル化しない状態の鎖式 alcohol に R 因子除去作用の有無を確かめるため炭素数 1 の methyl alcohol から炭素数 12 の n-dodecyl alcohol について検討した結果, 炭素数 1 ないし 5 の低級 alcohol には認められず, 炭素

数 6 の n-hexyl alcohol およびそれより炭素数の多い高級 alcohol に除去作用が認められ, その際炭素数の増加と共に除去率も高くなり, 炭素数 10, 12 の n-decyl および n-dodecyl alcohol では高い除去率を認めた。また n-dodecyl alcohol では R 因子の解離現象が著明であった。n-dodecyl alcohol より炭素数の多い alcohol は Tween 80, 1% 加 PEB で溶解性が悪く, 之等については今回検討しなかった。

alcohol の R 因子除去作用は, 72 ないし 120 時間以降に現れ, 240 時間で著明となるなどアルキル硫酸エステル塩に比べると除去効果の発現が遅く, また細胞に溶解が起こらないことなどが異なる点である。

また脂肪酸についても除去作用が報告されているが, 吾々は n-capric acid とそれに相当する alcohol である n-decyl alcohol を用い, 脂肪酸と alcohol の除去効果を比較した結果, alcohol

の型の方が遙かに有効であることが判明した。

alcohol の R 因子除去作用の機序については、その除去作用が R100-1 に高率に現れ、R100 で低率であることは先の¹⁾のアルキル硫酸エステル塩の場合と同様であり、性線毛形成能の高い R 因子に高率に脱落が認められるところから、alcohol の作用もまた性線毛を介して細胞質膜に影響を及ぼし、R 因子の複製を阻害するか、または R 因子 (+) 菌に選択的に殺菌作用を示すことが考えられる。

一方芳香族 alcohol である β -phenethyl alcohol について R100-1 に対する作用を調べたところ、0.1% の濃度で R 因子の除去作用を示すことを認めた。 β -phenethyl alcohol については Wada⁴⁾らが *Escherichia coli* C600 で F 因子の除去を認め、一方 Nunn⁵⁾らは同 alcohol が *E. coli* の phospholipid 合成を障害し、その結果膜の DNA 複製開始を阻害する可能性を示唆し、また Masker⁶⁾らは DNA 複製開始の阻害を述べている。

翻って、鎖式 alcohol においては、R 因子の除去作用は alkyl 基の炭素数 6 以上の高級 alcohol で認められ炭素数の増加と共にその除去作用も強くなる。このことから鎖式 alcohol の場合、膜の障害ないしは膜の DNA 合成系に影響を与えるのは alkyl 基の炭素数 (または alkyl の鎖長) が関係していることは明らかであり、炭素数 10 または 12 でその影響も最大に発揮され R 因子の複製阻害ないしは解離が起こることなどが考えられる。

鎖式 alcohol の R 因子除去作用については、なお興味ある問題を含んでいるので、今後更に検討する予定である。

結 論

以上の実験成績を要約すれば炭素数 1 から 12 の鎖式一価 alcohol について *Escherichia coli* K12 W3630 (R100-1) に対する R 因子除去作用を検

討した結果次の結論を得た。

1. 炭素数 1 ないし 5 の低級 alcohol には除去作用は認められない。
2. 炭素数 6 より 12 の高級 alcohol は R 因子除去作用を示し、炭素数の増加と共にその作用は強まり、特に炭素数 10 の n-decyl, 12 の n-dodecyl alcohol で高率に除去作用が認められた。
3. n-dodecyl alcohol では R 因子の解離現象が著明であった。
4. alcohol と脂肪酸の R 因子除去作用を比較した場合、alcohol の型の方が作用が著明である。

文 献

- 1) 桶谷修三, 浦田 治, 寺尾通徳: ラウリル硫酸リチウムの R 因子除去作用について. 新潟歯学会誌, **14**: 37-45, 1984.
- 2) Nakamura, H.: Plasmid-instability in *acr* A mutants of *Escherichia coli* K12. J. Gen. Microbiol., **84**: 85-93, 1974.
- 3) Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N. and Nakamura, S.: Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol., **95**: 1078-1089, 1968.
- 4) 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.
- 5) Nunn, W. and Tropp, B.: Effect of phenethyl alcohol on phospholipid metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **109**: 162-168, 1972.
- 6) Masker, W. E. and Eberle, H.: Effect of phenethyl alcohol on deoxyribonucleic acid-membrane association in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **109**: 1170-1174, 1972.