

3. この変異株において宿主染色体、R因子のいずれにも変異は生じていないと考えられた。したがってKM耐性安定化の原因は、R因子の宿主菌内での存在様式の変化と推測された。
4. 安定化し、同時に伝達性を失なったKM耐性をR₁₀₀⁰の介在によって伝達されることにより、(1) CM. TC. SM. SA. KM. (2) CM. SM. SA. KM. (3) SM. SA. KM. (4) KMの4種の伝達株が得られた。それらの検討から(1)はR₁₀₀とRts 1の共存株、(2)はR₁₀₀にRts 1のKM耐性の組み込まれた Recombinant Rをもつ株、(3)はRts 1にR₁₀₀のSM. SA耐性の組み込まれた Recombinant Rをもつ株、(4)はRts 1をもつ株であると考えられた。

引用文献

- (1) Terawaki, Y., H. Takayasu, and T. Akiba. 1967. Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. *J. Bacteriol.* 94 : 687-690.
- (2) Yokota, T., Y. Kanamaru, R. Mori, and T. Akiba. 1969. Recombination between a thermosensitive kanamycin resistance factor and a nonthermosensitive multiple-drug resistance factor. *J. Bacteriol.* 98 : 863-873.
- (3) Terawaki, Y., Y. Kakizawa, H. Takatsu, and Y. Yoshikawa. 1968. Temperature sensitivity of cell growth in *Escherichia coli* associated with temperature sensitive R (KM) factor. *Nature* 219 : 284-285.
- (4) 春日徳彦, 金子通治, 横田 健. 1970. 温度感受性R因子の脱落について 日本細菌学雑誌 25 (印刷中)。

3) コレラ菌内におけるR因子の増殖と脱落

金子通治, 春日徳彦, 横田 健

研究目的

1959年, 秋葉⁽¹⁾, 落合ら⁽²⁾により発見された細菌の薬剤耐性を支配する細胞質性遺伝因子, R因子はその後の研究で腸内細菌科のすべての種に伝達するのみならず, 桑原ら⁽³⁾によってコレラ菌へも伝達可能であることが報告された。しかし, コレラ菌内ではR因子は不安定であることも明らかにされた。一方1967年, 寺脇ら⁽⁴⁾によって報告された温度感受性カナマイシン(KM)一剤耐性R因子, すなわちRts 1は, 横田⁽⁵⁾によって大腸菌からコレラ菌へ伝達されることが報告されたが, この場合, 大腸菌内におけると同様低温においてこのR因子はコレラ菌内でも安定性を保った。

今回, コレラ菌内での耐性脱落のKineticsをとることによりR因子の不安定性を量的に表現することを目的にし, また, コレラ菌から大腸菌へのR因子の逆伝達を行なうことによって耐性の解離が起こるかどうか, コレラ菌内でR因子の修飾が起こるか否かを知ることを目的にして実験を行なったので, その結果を報告する。

材料および方法

使用菌株 : DonorとしてRts 1をもつ *V. cholerae* El Tor type, strain E1. Recipientとしては, *E. coli*

58-161および, それにNalidixic acid耐性をmutationによって付与した株, 58-161 NA^rを使用した。R₁₀₀の伝達には, Donorとして, *E. coli* W 3630/R₁₀₀, Recipientとして *V. cholerae* E1-NA^rを用いた。

使用培地 : 液体培地として Penassay broth (Difco) を使用し, *V. cholerae* を RecipientとしたRの伝達には, TCBS 寒天培地 (pH 8.0に修正) (栄研) を使用し, コレラ菌から大腸菌へのR因子の伝達には, Mac-Conkey 寒天培地 (栄研) を使用した。

使用薬剤 : Kanamycin (硫酸塩, 武田薬品工業K.K.)
Streptomycin (硫酸塩, 武田薬品工業K.K.)
Chloramphenicol (山之内製薬K.K.)
Tetracycline (Aureo. powder ; 日本レダリーK.K.)
Nalidixic acid (第一製薬K.K.)
Sulfonamide (ナトリウム塩, 大日本製薬K.K.)

Rの伝達 : 大腸菌からコレラ菌への伝達は, 横田⁽⁵⁾の方法によった。また, コレラ菌から大腸菌への伝達方法は, donor および recipient を独立に penassay broth 中で, 25 °C, 18時間静置培養後, donor 3 ml, recipient 3 ml, および新鮮 penassay broth 4 ml の割合で混合し, 25 °C 3時間振盪培養したもの, 24時間培養のものを各々の選択培地に塗抹した。伝達したと

思われる選択培地のコロニーを釣菌して Mac Conkey 寒天培地に画線培養 (37 °C, 18 時間) して生じたコロニーの resistance pattern は replica 法によって調べた。

Rts 1 の場合の選択培地は Mac Conkey 寒天培地に KM (100 mcg/ml), NA (25 mcg/ml) を含んだものを使用した。

R₁₀₀ の伝達を見る場合には, 37 °C で 3 時間振盪混合培養したもの, 18 時間混合培養したもののそれぞれ 0.1 ml と, および 混合培養液 5 ml を遠沈 (2,500 r.p.m., 20 min) して集めた菌体を選択培地に塗抹して検討した。選択培地としては, Mac Conkey 寒天培地に CM (5 mcg/ml), TC (5 mcg/ml), 又は, SM (25 mcg/ml) と NA (25 mcg/ml) を加えたものである。R₁₀₀ をうけとったと思われるコロニーは Rts 1 の場合と同様に selective marker 別にして replica 法によって調べた。

耐性の脱落: *V. cholerae* E1/Rts 1 の 25 °C, 42 °C における増殖と Rts 1 の脱落は, 25 °C において penassay broth 中で 18 時間前培養液を適当に希釈して TCBS 寒天培地に塗抹し, これと KM (400 mcg/ml) を含む TCBS 寒天培地に塗抹したものの上に生じた集落数

を比較することにより Rts 1 の脱落を調べた。

V. cholerae E1/R₁₀₀ の脱落は 42 °C, 37 °C について行なった。菌数計算法で TCBS 寒天培地に現われた集落を CM (5 mcg/ml) 加 TCBS 平板に replica して調べた。

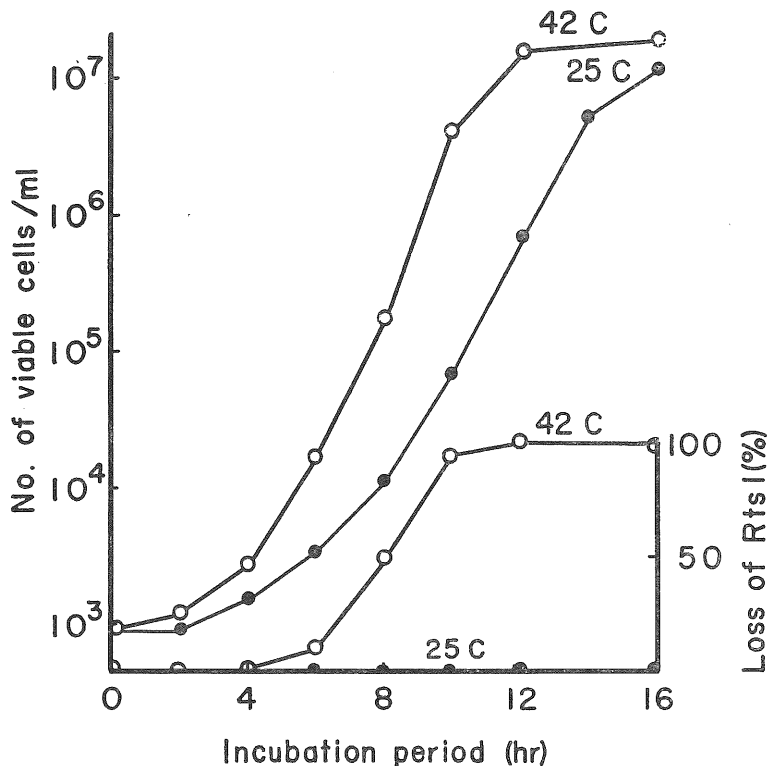
結果と考察

V. cholerae E1/Rts 1 における KM 耐性の脱落は, 既に横田⁽⁶⁾によって報告されているが, それは 18 時間後にみた結果であったので, 今回は 25 °C, 42 °C の増殖と KM 耐性の脱落の経時的变化を追跡した。(図 1)

42 °C における脱落の状態は *E. coli* W3630/Rts 1 におけるそれ⁽⁶⁾と同様であり, また, 25 °C では KM 耐性の脱落はなかった。

大腸菌からコレラ菌への R₁₀₀ の伝達頻度は非常に低く, 長時間の混合培養が必要であるとされている。この方法によると, R の伝達に際して渡辺⁽⁷⁾のいう HFRT の状態を経過すると考えられ, 結果として正確な伝達頻度が求められないと考えられる。そこで短時間の donor と recipient の接触後, 多量の菌を選択平板に塗抹することで伝達頻度を求めようとした。その目的のために recipient に NA 耐性の E1 を用い, 2 種の薬剤で選択し

図 1



た。結果は、表 1 に示されたように混合培養の時間を長くしたために、極端に伝達頻度が上昇することはないと考えられた。

E 1/R₁₀₀ における耐性脱落の経時的变化は、脱落があまりにも急激であるため、E 1/R₁₀₀ と同じようには追跡することができない。そこで、SM 50 mcg/ml を含む penassay broth 中で E 1/R₁₀₀ を培養することで分裂ごとの脱落率を求めようとした。SM 50 mcg/ml は対照の

E 1/R⁻ 株が、SM の殺菌作用によって菌数の低下する濃度である。即ち E 1/R₁₀₀ を SM 100 mcg/ml 中で培養することによって、培養中に R₁₀₀ の脱落した菌は、存在する SM によって殺される。その状態で菌液を TCBS に塗抹すると生じて来る菌は、R₁₀₀ を持つものと、R₁₀₀ を比較的新しい細胞分裂で脱落したばかりで、まだ SM の殺菌効果を受けていない R⁻ 菌とでであると考えられる。その平板を薬剤平板にレプリカすることで脱落率

表 1 Transfer of Rfactors from *E. coli* to *V. comma*

donor	recipient	mixed. Cult (time)	Selection	No. of colonies obtained
<i>E. coli</i> R ₁₀₀	V. comma E 1	18	CM	18
	V. comma E 1 · NA ^r	3	CM · NA	4
			TC · NA	1
			SM · NA	0
	V. comma E 1 · NA ^r	18	CM · NA	0
			TC · NA	2
SM · NA			0	

図 2

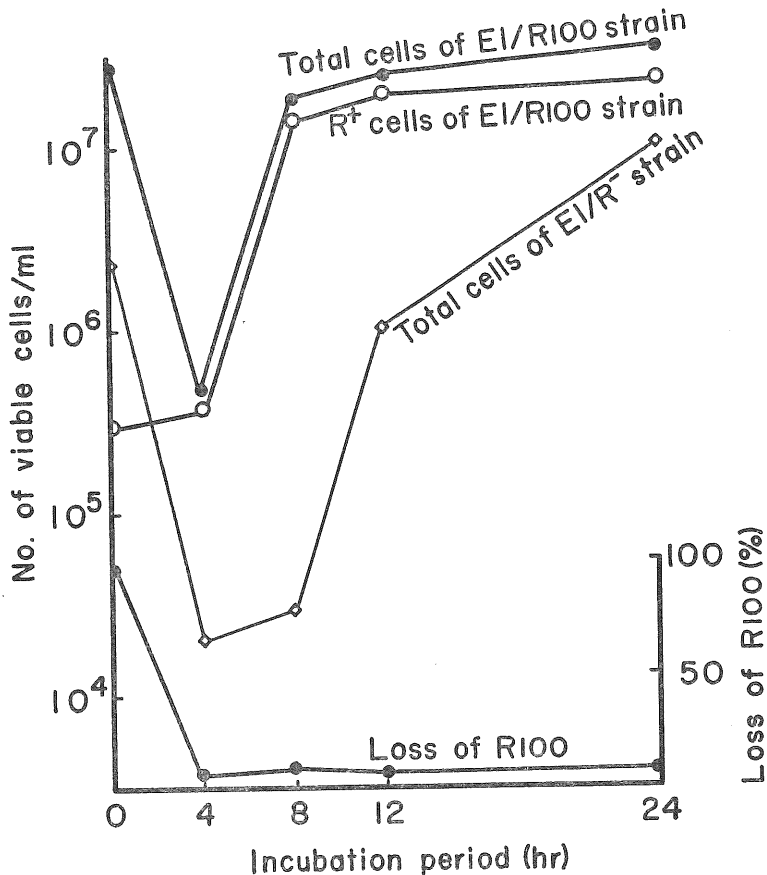


表 2 Transfer of R factors from *V. comma* to *E. coli*

donor	recipient	temp.	selection	transfer freq.	resist. pattern
<i>V. comma</i> Rts 1	<i>E. coli</i> 58-161 NA ^r	25	MacConkey KM • NA	1.6×10^{-5}	KM • NA
<i>V. comma</i> R ₁₀₀	<i>E. coli</i> 58-161 NA ^r	37	Mac. CM • NA	$10^{-9} >$	CM • TC • SM SA • NA
			Mac. TC • NA	4×10^{-8}	
			Mac. SM • NA	$10^{-9} >$	

を求めることができる筈である。

CM平板上に生じたコロニーをかきとり、SM 100mcg/mlを含む penassay broth に浮遊させた菌液から出発して上記の実験を行なった結果を図2に示した。

CM平板上に生じていたコロニーでも、その中には僅か1/100しかR₁₀₀を有する菌がないこと。即ち、CM平板上でのコロニー形成過程でも高率のRの脱落があることが示された。それを反映して、E 1/R₁₀₀でも急激な菌数の低下と99%ものR⁻菌の存在が示された。4時間以後の耐性の脱落は一樣に8~10%であった。このことから、1分裂ごとのRの脱落率はほぼ8%と推測された。

コレラ菌から大腸菌へのR因子の再伝達を行なった。Rts 1は比較的高い伝達頻度で伝達がおこなわれたが、R₁₀₀の伝達頻度は非常に低く 4×10^{-8} であり、しかもTC選択でしか伝達株は得られなかった。これはdonorの中でのRの安定性によるものであろう。得られた伝達株において耐性の解離はなく、またR因子が変化していることもなかった。(表2)

論 議

既に横田の指摘したように⁽⁵⁾大腸菌内で安定なR₁₀₀はコレラ菌内で極めて不安定であり、Rts 1はコレラ菌内でも大腸菌内と同様の態度を示すことを確認した。Rts 1は他のR因子と比較して大腸菌内でも高温において不安定であるが、その性質がコレラ菌内でも変わらないため、低温においてはコレラ菌内でも大腸菌の場合と同様安定なR因子となっていることは興味深い。R因子の安定性は、そのR因子のプラスミドとしての独自の性質と、宿主菌との相互作用によって決定されると考えられる。これまでコレラ菌で安定なR因子の存在は報告されていないが、少なくともRts 1は25°Cでは安定であること、また他の多剤耐性との間でrecombinationが可能であることから、横田⁽⁵⁾の指摘するようにコレラ菌が

R因子によって耐性化する可能性があると考えられる。また以上から、コレラ菌内での安定性をみることによって、R因子分類の一つの手段が提供されることになるであろうと考えられる。

要 約

1. Rts 1のコレラ菌内での脱落の経時的变化を追跡した。安定性は大腸菌内におけると同様であった。
2. R₁₀₀のコレラ菌内での脱落率は、1分裂当たりほぼ8%と推定された。
3. コレラ菌から大腸菌へのR因子の再伝達に成功した。再伝達において、耐性の解離はなく、また、R因子の変更も認められなかった。
4. コレラ菌内でのR因子の安定性をみることは、R因子分類の一つの手段となり得ることが示唆された。

参 考 文 献

- (1) Akiba, T., K. Koyama, Y. Isshiki, S. Kimura, and T. Fukushima. 1960. On the mechanism of the development of multiple drug resistant clones of *Shigella*. *Japan. J. Bacteriol.* 4 : 219-227. (in Japanese)
- (2) Ochiai, K., T. Yamanaka, K. Kimura, and O. Sawada. 1959. Studies on the genetics of drug-resistance among *Shigella* strains and between *Shigella* and *E. coli*. *Japan. Med. News* 1861 : 12. (in Japanese)
- (3) Kuwahara, S., T. Akiba, K. Koyama, and T. Arai. 1963. Transmission of multiple drug resistance from *Shigella flexneri* to *Vibrio comma* through conjugation. *Japan. J. Microbiol.* 7 : 61-68.
- (4) Terawaki, Y., H. Takayasu, and T. Akiba. 1967. Thermosensitive replication of a kanamycin

- resistance factor. J. Bacteriol. **94** : 687-690.
- (5) Yokota, T., 1968. Thermosensitive and nonthermosensitive R factors in *Enterobacteriaceae* and *Vibrio comma*. Ann. Rep. of Yamana-shi Pref. Inst. of Public Health **12** : 68-77.
- (6) Kasuga, T., M. Kaneko, and T. Yokota. 1970. Loss of thermosensitive R factor, Rts 1.

- Japan. J. Bacteriol. **25** : (in press).
(in Japanese)
- (7) Watanabe, T., 1963. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. VI. High-frequency resistance transfer system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **85** : 788-794.

4) Col 因子と R 因子の相互関係について

金丸佳郎, 春日徳彦, 横田 健

はじめに

Plasmid 間の干渉現象は, その Plasmid のマーカー部分以外の Plasmid の本体, つまり増殖, 伝達能などに関与する部分の相互関係を知るのに重要な手がかりを与える。同種 Plasmid 間の相互関係については, R 因子で原田ら⁽¹⁾, 渡辺ら⁽²⁾の多くの報告があり, 又コリシン因子については, Stocker ら, 岡田ら⁽³⁾の報告がある。異種 Plasmid 間の相互関係については, 渡辺らによれば R 因子と Col 因子との間に近縁性が示唆されるが, 重感染免疫については特異的な関係は認められないという⁽⁴⁾。一方芦田らの報告によると fi^- 型 R 因子と Col Ib との重感染において伝達の阻害はみられないか, 両者は共存せず, fi^- 型 R 因子は Col Ib によって排除されるという⁽⁵⁾。この様に, 異種 Plasmid 間の相互関係は極めて興味ある事実を与えるが, これを広く総合的に研究する事は, 自然界に存在する多くの Plasmid の類縁関係を明らかにし, Plasmid 本体の分類に有用であると考えられる。

ところで, 自然界より分離される赤痢ソネ菌のコリシン型は14型がもっとも多く, しかもそのほとんどが, CM, SM, TC, SA, の4剤耐性であり, その持っている R 因子は fi^+ 型である。このコリシン型と耐性型の関係については, 大阪公衛研の興味ある報告がある。それは赤痢の集発例におき初発がコリシン13A型, 耐性型 CM, SM, SA, であったものが, 中途からコリシン14型, 耐性型 TC, CM, SM, SA, に変わったものである。コリシン型13Aと14は Col E. が共通であり, 前者は, その他に Col Ia, 後者は Col Ib を持っている。従って耐性型と Col 因子が関係あるとすれば, それは R 因子と Col Ia 及び Ib との関係においてみる事が出来る可能性がある。この観点から我々は, R 因子と Col 因子の相互関係を検討したので, その一部を報告する。

材料及び方法

1) 材 料

① 使用菌株

- E. Coli W3110 (F^- , gal⁺)
E. Coli W3110 (F^- , Mal⁺)
E. Coli CSH2 (F^- , Lac⁺, Met⁻)
E. Coli W3110 : Ib
E. Coli W3110 : E₁
E. Coli W3110 : Ib + E₁
E. Coli W3630 : R₁₀₀ (CM, SM, TC, SA) ; fi^+
E. Coli W3630 : R₁₀₀₋₁ (CM, SM, TC, SA) ; fi^-
E. Coli W3630 : NR 73 (SM, TC, SA) ; fi^-
E. Coli W3630 : Rts 1 (KM)^t ; fi^-
A 法 Typestrain 100049 (Sh. sonnei)
A 法 Typestrain 100051 (Sh. sonnei)
E. coli K 12-Row
E. Coli K 12-Row/I
E. Coli K 12-Row/E.

② Col 及び R 因子

Col 因子として, Col Ib, Col E, は B. Coli W 3110 に A 法 Type strain. 100049, 100051 の Col 因子を, E. Coli CSH 2 を通じ移して用いた。又, R 因子として, それぞれ性質の異なると思われる fi^- R 因子の NR73, R₁₀₀由来の fi^- mutant の R₁₀₀₋₁ 及び温度感受性 KM 耐性因子 Rts 1, fi^+ の R₁₀₀ を E. Coli W3630 に入れて使用した。

③ 使用培地

- Leder berg の EMS 寒天培地
Mac Conkey 寒天培地 (糖ぬき, 栄研化学 K.K.)
普通寒天培地 (栄研化学 K.K.)
Penassay broth (Difco)