原 著

金属耐性赤痢菌の金属取込みについて

坂 口 武 洋*, 坂 口 早 苗*

UPTAKE OF METALS INTO THE CADMIUM, ZINC RESISTANT
SHIGELLA FLEXNERI

Takehiro SAKAGUCHI* and Sanae SAKAGUCHI*

To clarify the effects of heavy metals on living organisms, the authors made experiments on the uptake of various metals (Cd, Zn, Mg, Mn) into bacterial cells using an original strain (*Sh. flexneri* 3a 76-8) and a resistant variant (*Sh. flexneri* 3a 76-8 R(Cd, Zn)). The minimal inhibitory concentration of the former strain against Cd and Zn were 12.5 µg/ml, 50 µg/ml respectively and those of the latter strain were 100 µg/ml, 400 µg/ml respectively. The results obtained in these studies are as follows:

1) The growth of the original strain was inhibited by 20% in the broth with 0.5 µg/ml of Cd, 50% with 1 µg/ml of Cd and 40% with 20 µg/ml of Zn, as compared with those in the normal broth (control broth) after 10 hr cultivation at 37°C. On the other hand, the resistant strain showed the same growth curve cultured in the broth added up to 10 µg/ml of Cd or 50 µg/ml of Zn as that of the control culture. And the growth was inhibited by 10% in the broth with 20 µg/ml of Cd, and 50% with 100 µg/ml of Zn.

2) Measurement of metals in the original strain and the resistant one was carried out after the cultivation in broth containing various concentrations of Cd or Zn. Cd uptake of the resistant strain was markedly inhibited as compared with that of the original strain. There could hardly be found any difference regarding Zn uptake between the original and the resistant strains. Both metals uptaken in the cells of these strains, when they were kept in control broth, were released in almost the same proportion into the medium.

3) The original strain decreased significantly the uptake of Cd in the broth with co-existence of 1 µg/ml of Cd and 10 µg/ml of Zn as compared with the existence of Cd alone, but the resistant strain did not. In these cultivations, Zn uptake of the original and the resistant strains was markedly accelerated by the addition of Cd in the medium.

4) The resistant strain uptook Mg more than the original strain did, being cultured in the broth with Mg, but there was no difference on the uptake of Mn between both strains.

I. 緒 言

重金属の生体におよぼす影響を知るために、著者らは、より単純化された生体として、微生物や培養細胞を用い、細胞レベルについて、検討を行ってきた。前報においては、最も一般的な細菌である大腸菌を用いて、カドミウムと亜鉛混在下における金属取込みについて報告した¹⁾。その後、腸内細菌のなかで、*Shigella flexneri*

3a は、カドミウムイオンに最も感受性の高い菌株の一つであることを発見した。

近年、薬剤耐性因子の解明が進むにつれて、金属耐性因子の存在も明らかになった²⁾。この *Shigella flexneri* 3a を用いて、カドミウムイオン耐性大腸菌を donor とし、この赤痢菌を recipient として、カドミウムイオン耐性因子を伝達させ、カドミウムイオン耐性赤痢菌の作出に成功した^{3,4)}。この耐性赤痢菌の生化学的および免疫学的性状は、赤痢菌原株とまったく同一であり、かつ、モルモット結角膜炎起炎性試験、ウサギ腸管結紮起炎性試験、および、培養細胞感染試験等の病原性にも差は認められなかった。しかしながら、カドミウムイオン耐性赤痢菌は、他の金属に対する抵抗性には差がなかった

* 聖マリアンナ医科大学衛生学教室
昭和56年7月23日受付

* Department of Hygiene, St. Marianna University
School of Medicine

Received for publication, July 23, 1981

が、亜鉛イオン耐性を同時に獲得していた。

今回は、このカドミウムイオン耐性赤痢菌およびその赤痢菌原株を用いて、いくつかの金属の菌体内取込みについて実験を行った。すなわち、カドミウムイオン、亜鉛イオン、マグネシウムイオン、マンガンイオンなどの取込み量を測定し、カドミウムイオン耐性獲得による影響について検討し、若干の知見を得たので、ここに報告する。

II. 実験材料および方法

1. 使用菌株

赤痢菌原株 *Shigella flexneri* 3a 76-8 およびこの菌をカドミウムイオンと亜鉛イオンに耐性の *Escherichia coli* W 3630 R(Hg) と混合培養して得られた変異菌 *Shigella flexneri* 3a 76-8 R (Cd, Zn) を使用した。この赤痢菌原株の最小発育阻止濃度は、カドミウムイオン (以下 Cd^{2+} と略す) が $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、亜鉛イオン (以下 Zn^{2+} と略す) が $50 \mu\text{g/ml}$ であり、変異菌ではそれぞれ $100, 400 \mu\text{g/ml}$ であった。ゆえに原株を Cd^{2+}, Zn^{2+} 感受性菌とよび、変異株を金属耐性菌と称した。

2. 金属化合物

培養液に添加した金属化合物は、以下のとおりである。塩化カドミウム (和光純薬, 試薬特級, $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$)、塩化亜鉛 (和光純薬, 試薬特級, $ZnCl_2$)、塩化マグネシウム (和光純薬, 試薬特級, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)、塩化マンガン (和光純薬, 試薬特級, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$)。

3. 菌体内金属分析

(1) 培養条件

金属添加 Heart Infusion Broth [H.I. Broth (Difco)] で 37°C 、24 時間振盪培養した菌について、菌体の金属取込み量を測定した。 Cd^{2+} と Zn^{2+} については、この金属取込み操作をうけた菌を、さらに以下の条件下に処理した場合も測定を行った。

a) $Cd^{2+} 1 \mu\text{g/ml}$ または $Zn^{2+} 10 \mu\text{g/ml}$ 含有培養液で 24 時間振盪培養 (金属取込み操作) した菌を、無菌的に遠心洗浄後、新鮮な金属無添加培養液に移し、24 時間振盪した場合 (金属無添加培養液浮遊操作)

b) 金属取込み操作後、それぞれの金属添加培養液 (Cd^{2+} 取込み操作 $\rightarrow C_d^{2+} 1 \mu\text{g/ml}$, Zn^{2+} 取込み操作後 $\rightarrow Zn^{2+} 10 \mu\text{g/ml}$ 含有培養液) に移し、24 時間振盪した場合 (金属添加培養液浮遊操作)

c) 金属無添加培養液で 18 時間振盪培養 (増殖操作) した菌を、 $Cd^{2+} 10 \mu\text{g/ml}$ および $Zn^{2+} 50 \mu\text{g/ml}$ 含有培養液にそれぞれ 24 時間振盪した場合 (高濃度金属添

加培養液浮遊操作)

(2) 菌浮遊液の調製法

前述の条件で培養した菌を、 $3,500 g$ で 10 分間遠心後、生理食塩液で 2 回洗浄した。この沈査を一定量の蒸留水で均一に浮遊させた。

(3) 菌体乾燥重量の測定法

菌浮遊液 2.0 ml を秤量瓶にとり、 105°C 、4 時間乾燥後、30 分デシケーター中で放冷させ、重量を測定した。この操作で、乾燥重量は恒量であった。

(4) 菌体内金属の定量法

菌浮遊液 2.0 ml を硝酸-硫酸による湿式分解後、 Cd^{2+}, Zn^{2+} およびマンガンイオン (以下 Mn^{2+} と略す) については、DDTC-MIBK 法、マグネシウムイオン (以下 Mg^{2+} と略す) については、直接法により、原子吸光分光光度計 (Jarrel Ash AA-IMK II 型) を用いて測定した。なお、菌体の金属取込み量は、菌乾燥重量 1 mg あたりの金属 μg で表示した。

4. 菌浮遊液の濁度測定法

L 字管に 10 ml の各濃度の金属を含む H.I. Broth を入れ、 1 mg/ml の菌液 0.05 ml を加えて、 37°C 、24 時間振盪培養した。分光光度計で 590 nm における培養液の濁度 (optical density (O.D.)) を経時的に測定し、発育曲線を求めた。

III. 実験結果

1. $CdCl_2$ 添加時の発育曲線と Cd^{2+} 取込み

Fig.1 は、各濃度の Cd^{2+} を H.I. Broth に添加したときの原株と金属耐性菌の発育曲線を示したものである。値は、両菌液を金属無添加 H.I. Broth (対照) で、それぞれ 24 時間培養したときの濁度 (O.D.) を 100% として表示した。この図に見られるように、原株は、培養 24 時間後に、 $Cd^{2+} 0.5 \mu\text{g/ml}$ でも幾分発育阻止が現われ、 $Cd^{2+} 5 \mu\text{g/ml}$ では、対照の 50% 以下であった。耐性菌は、 $Cd^{2+} 10 \mu\text{g/ml}$ までは発育阻止がみられなかったが、 $20 \mu\text{g/ml}$ より幾らか阻止が起こり、 $50 \mu\text{g/ml}$ では約 50% の阻止がみられた。

Fig.2 には、 $Cd^{2+} 0.5, 1 \mu\text{g/ml}$ 含有 H.I. Broth で 24 時間振盪培養した両菌の Cd^{2+} 取込み量および $20 \mu\text{g/ml}$ 含有時の金属耐性菌の Cd^{2+} 取込み量を示した。原株の Cd^{2+} に対する感受性は高く、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ から発育抑制がみられ、24 時間培養後の Cd^{2+} 取込み量は $0.17 \mu\text{g/mg}$ であった。金属耐性菌の取込み量は $0.05 \mu\text{g/mg}$ であり、後者は前者と比較して Cd^{2+} 取込み量が少なかった ($p < 0.01$)。同様に、 $Cd^{2+} 1 \mu\text{g/ml}$ 含有 H.I. Broth で培養したときの取込み量も、原株と比較して、

Fig.1. Growth curves of *Shigella* in H.I. Broth containing CdCl_2 .

金属耐性菌のほうが少ないことが認められた ($p < 0.01$).

Cd^{2+} 20 $\mu\text{g/ml}$ を含有した H.I. Broth に両菌を加え培養すると、原株は発育できないが、金属耐性菌は多少の抑制を受けるものの発育可能であった。この培養液で 24 時間培養したときの金属耐性菌の Cd^{2+} 取込み量は 0.55 $\mu\text{g/mg}$ であり、 Cd^{2+} 1 $\mu\text{g/ml}$ 含有時の取込み量 (0.39 $\mu\text{g/mg}$) の 1/2 しか増加せず、しかも、1 $\mu\text{g/ml}$ 培養液における原株の取込み量 (0.62 $\mu\text{g/mg}$) と比較しても少なかった。

この傾向は、Fig.3 に示した条件下でも観察された。すなわち、 Cd^{2+} 取込み操作を行った菌を、さらに、金属無添加培養液に振盪させる (金属無添加浮遊操作) と、両菌株ともに 60% の Cd^{2+} を培養液中に放出した。一度取り込んだ Cd^{2+} の放出の割合には、両者間に差はみられないが、 Cd^{2+} を多量に菌体内へ取り込んだ分だけ、原株内に多く存在した。

また、金属取込み操作後、 Cd^{2+} 添加培養液浮遊操作を行うと、両菌株とも著明に多くの Cd^{2+} を取り込むことがわかった。しかし、原株の取込み量は 1.14 $\mu\text{g/mg}$ 、金属耐性菌のそれは 0.89 $\mu\text{g/mg}$ であり、後者は前者の

Fig.2. Uptake of cadmium into bacterial cells.

約 3/4 であった。

次に、感受性菌が発育できない高濃度の金属下の取込み量を調べるために、 Cd^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有培養液浮遊操作を行った。金属無添加培養液で、18 時間増殖させた菌を Cd^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有培養液に入れ、24 時間振盪した。両菌株ともに非常によく取り込むのが観察された。しかしながら、原株では、1.49 $\mu\text{g/mg}$ 、金属耐性菌では、1.13 $\mu\text{g/mg}$ であり、なお、原株のほうが、金属耐性菌よりも、取込み量が多かった。このように、種々の条件で Cd^{2+} を取り込ませても、原株と比べて、金属耐性菌の Cd^{2+} 取込み抑制が観察された。

2. ZnCl_2 添加時の発育曲線と Zn^{2+} 取込み量

Fig.4 は、各濃度の Zn^{2+} を H.I. Broth に添加したときの両菌株の発育曲線を示したものである。原株は、 Zn^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$ まで、対照と同様な発育を示し、20 $\mu\text{g/ml}$ で培養 10 時間後に対照の 40% の発育抑制が認められ、40 $\mu\text{g/ml}$ では発育しなかった。一方、金属耐性菌は、 Zn^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ まで、対照と同様な発育を示し、100 $\mu\text{g/ml}$ で 50% の発育が阻害された。

以上の Zn^{2+} に対する発育能をもつ両菌の Zn^{2+} 取込み量を Fig.5 に示した。 Zn^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ では、原株は発育不能であるので、金属耐性菌についてのみの測定を行った。10 $\mu\text{g/ml}$ と 20 $\mu\text{g/ml}$ の Zn^{2+} 含有時の両菌株間の Zn^{2+} 取込み量には、まったく差が認められなかった。

Zn^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ 含有培養液で培養したときの金属耐性菌の Zn^{2+} 取込み量は、1.11 $\mu\text{g/mg}$ であり、縦軸に菌体 Zn^{2+} 量 (Y)、横軸に培養液の Zn^{2+} 濃度 (X) をとり、一回帰方程式を求めると、 $Y = 0.021X + 0.085$

Fig. 3. Uptake of cadmium into bacterial cells.
(1) Shaking culture of the organism for 24 hr or 18 hr*. (2) Second shaking culture of the organism obtained by (1) for 24 hr.

($r=0.98$) となった。したがって、培養液の Zn^{2+} 濃度が増すと、菌体内の Zn^{2+} 量が増加することがわかった。

Fig. 6 は、 Zn^{2+} 取込み操作を行った菌を、さらに、金属無添加培養液浮遊操作を、ならびに、 Zn^{2+} 添加培養液浮遊操作を行ったときの菌の Zn^{2+} 取込み量を示したものである。一度取り込んだ Zn^{2+} の放出の割合にも、両者間に差はみられず、 Cd^{2+} 同様、金属無添加培養液浮遊操作を行ったときは、両菌株とも取込み量の約 60% の Zn^{2+} の放出がみられた。 Zn^{2+} 添加培養液浮遊操作を行ったときは、両菌株ともによく取り込み、原株では、 $0.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、金属耐性菌では、 $0.42 \mu\text{g}/\text{mg}$ で両者間に差がなかった。

Zn^{2+} $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培養液浮遊操作の結果は、両菌株ともに非常に多くの Zn^{2+} を取り込み、ともに、 $1.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ であった。このように、いずれの条件においても、両菌株の Zn^{2+} 取込み量には差がみられなかった。

3. $CdCl_2$, $ZnCl_2$ 混在下の Cd^{2+} および Zn^{2+} 取込み

Cd^{2+} $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と Zn^{2+} $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の両金属を含む H.I. Broth 中で 24 時間振盪培養したときの金属取込み量は、Table 1 に示したとおりである。 Cd^{2+} の取込み量は、原株にかぎり、 Zn^{2+} 添加時に有意に減少した ($p < 0.01$)。一方、 Zn^{2+} の取込み量は、両菌株ともに Cd^{2+} 存在下で有意に増加し、約 2 倍の取込み量であった ($p < 0.05$)。

Fig. 4. Growth curves of *Shigella* in H.I. Broth containing $ZnCl_2$.

Fig. 5. Uptake of zinc into bacterial cells.

4. Mg^{2+} の取込み

Fig. 7 に、原株と金属耐性菌の Mg^{2+} 取込み量を示した。 Zn^{2+} 取込みと同様、一回帰方程式を求めると、

Table 1. Uptake of cadmium and zinc into bacterial cells which were cultured in Cd and/or Zn broth.

Strain used	Uptake of Cd		Uptake of Zn	
	Cd (1 $\mu\text{g/ml}$)	Cd+Zn	Zn (10 $\mu\text{g/ml}$)	Cd+Zn
<i>Sh. flexneri</i> 3a 76-8	0.63	0.49**	0.23	0.40*
<i>Sh. flexneri</i> 3a 76-8 R (Cd, Zn)	0.39	0.49	0.23	0.37*

Cd+Zn : Cd (1 $\mu\text{g/ml}$) + Zn (10 $\mu\text{g/ml}$)** $p < 0.01$ between Cd uptake of the original *Shigella* strain cultured in H.I. Broth containing Cd alone and Cd+Zn* $p < 0.05$ between Cd uptake of the original or the resistant *Shigella* strain cultured in H.I. Broth containing Cd alone and Cd+Zn

Fig. 6. Uptake of zinc into bacterial cells. (1) Shaking culture of the organism for 24 hr or 18 hr*. (2) Second shaking culture of the organism obtained by (1) for 24 hr.

原株では $Y = 0.001X + 1.556$ ($r = 0.68$), 金属耐性菌では $Y = 0.001X + 1.646$ ($r = 0.71$) となった。後者は、前者に比べて、有意に Mg^{2+} 量を多く取り込んだ ($p < 0.05$)。 Cd^{2+} 1 $\mu\text{g/ml}$ 混在下の Mg^{2+} と Cd^{2+} の菌体内取込み量は、それぞれ単独の金属を含む H.I. Broth で培養した場合と同様であった (表略)。

5. Mn^{2+} の取込み

同様に、 Mn^{2+} の取込み量を Fig. 8 に示した。一次回帰方程式は、原株 $Y = 0.01X + 0.32$ ($r = 0.86$), 金属耐性菌 $Y = 0.01X + 0.33$ ($r = 0.95$) であった。両菌の Mn^{2+} 取込み量には差が認められず、また、 Cd^{2+} 1 $\mu\text{g/ml}$ 混在下による両金属取込み量の変化もみられなかった (表略)。

Fig. 7. Uptake of magnesium into bacterial cells.

IV. 考 察

水銀耐性因子を有する *Escherichia coli* W₃₆₃₀ R(Hg) は、同時にカドミウムイオン耐性因子を有していた。この菌から、カドミウムイオン耐性因子だけを赤痢菌原株へ伝達させた³⁾。recipientとして用いた赤痢菌は、1953年に赤痢菌感染者から分離されたもので、種々の抗生物質や金属に対して、感受性が強く、recipientとして適していた。伝達したカドミウムイオン耐性因子は、アクリフラビンやエチジウム・ブロマイドでは脱落しない、安定した因子であった⁴⁾。この赤痢菌を用い、カドミウムイオン、亜鉛イオン耐性獲得によるカドミウムイオン、亜鉛イオン菌体内取込み量の変化の有無を調べた。

Cd^{2+} 取込み量は、原株よりも、金属耐性菌のほうが有意に減少した ($p < 0.01$) (Fig. 2)。また、Fig. 3にみられるように、なるべく世代交代の少ない状態でカド

Fig. 8. Uptake of manganese into bacterial cells.

ミウムイオン取込みを継続させた場合においても、金属耐性菌のカドミウムイオン取込み量は、原株のそれと比し、抑制された。この傾向は、原株の増殖できないカドミウムイオン 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有 H.I. Broth でのカドミウムイオンの取込み量にも観察された。

カドミウムイオン耐性菌のカドミウムイオン取込みについては、内田ら⁵⁾、Mitra ら⁶⁾、Chopra⁷⁾、Kondo ら²⁾によって多く研究がなされている。内田らは、カドミウムイオン耐性菌がカドミウム存在下の培養で、多量のカドミウムイオンを蓄積すること、Mitra らは、高濃度のカドミウムイオン含有培養液に適応した *E. coli* が高濃度までカドミウムイオンを蓄積することを報告している。これに対して、Chopra や Kondo らは、penicillinase plasmid を所有するカドミウムイオン耐性 *Staphylococcus aureus* は、カドミウムイオン取込みを抑制することを述べている。前者らが実験に用いている菌は、高濃度のカドミウムイオンに適応したものである。著者らの作出した耐性菌は、カドミウムイオン耐性因子伝達によって得られたものである。したがって、カドミウムイオンに適応して得られた耐性菌は、カドミウムイオンを多く取り込み、伝達因子等によってカドミウムイオン耐性を獲得した菌では、カドミウムの取込み抑制が生じるものと思われる。

カドミウムイオン耐性菌を作出すると、亜鉛耐性をも必ず獲得しており、カドミウムイオン、亜鉛イオン単独に耐性がある菌株はまだ見いだされていない。カドミウ

ムイオンは、亜鉛イオンの精製の際に必ず共存するものであり、両者はよく類似した金属である。この両金属に対する抵抗性を支配する遺伝子がほぼ同じ位置に存在していることは興味深い^{2,3)}。

亜鉛イオンの菌体内取込みは、Fig. 5, 6 に示してあるとおり、いずれの条件で培養および振盪しても、原株と金属耐性菌の亜鉛イオン取込み量には差異がなかった。よって、カドミウムイオンに対する耐性の機構と亜鉛イオンに対する耐性の機構は異なっていることが示唆された。

堀津ら⁸⁾は、カドミウムイオンの菌体への取込みが、生育増殖期間のみならず、すでに、生育した菌体にも取り込まれることを報告している。著者ら¹⁾も、大腸菌を使用した実験で、汚染環境が継続すると、細菌細胞内で金属の濃縮がおこる可能性があることを報告した。この点に関しては、カドミウムイオンだけでなく、亜鉛イオンにおいても同様であった。両菌株ともに、増殖期間のみならず、世代交代を抑制したときにも多くのカドミウムイオンと亜鉛イオンを取り込むことがわかった。

Table 1 は、カドミウムイオンと亜鉛イオン混在下の菌体内取込み量を示したものである。*E. coli* 0-10 を用いた場合には、亜鉛イオン混在下によって、カドミウムイオン取込み量が著しく増加した¹⁾。しかし、*Sh. flexneri* 3a を用いた本実験では、亜鉛イオン混在下によるカドミウムイオン取込み量は増加せず、原株においては、むしろ減少した。

カドミウムイオンの毒性に対する亜鉛イオンの減弱効果は、睾丸壊死⁹⁾、高血圧症¹⁰⁾、催奇形成作用¹¹⁾等をはじめとしてよく知られている。この現象は、亜鉛イオンが体内に存在するとカドミウムイオンの取込みが抑制され、亜鉛イオンによるカドミウムイオン毒性の低下をきたす原因の一つとも考えられよう。

カドミウムイオン混在下による亜鉛イオン取込み量の変動には、大腸菌と赤痢菌に違いはなく、3者とも約2倍に増加した。

E. coli 0-10 と *Sh. flexneri* 3a では、べん毛やO抗原の有無をはじめ、多くの違いがある。取り込まれたカドミウムイオンは、大部分が細胞膜に存在すること^{1,3)}や、カドミウムイオン取込みの抑制が細胞膜で行われること⁷⁾などから、カドミウムイオン取込み量は細菌細胞膜の構造によって、異なることが考えられる。

また、大腸菌と赤痢菌とでは、亜鉛イオンに対する挙動が多少異なる。一般に、大腸菌の亜鉛イオンに対する最小発育阻止濃度は、赤痢菌と比較して高く、かつ、大腸菌の亜鉛イオン取込み量も多いことが観察されてい

る¹⁾。これらのことより、亜鉛イオンが混在することによっても、カドミウムイオンの取込み量は、種々に変化することが推察される。

金属耐性を獲得することによって、他の金属の取込みに影響を与えることが知られている。すなわち、Park ら¹²⁾は、コバルトイオンとマンガンイオンに耐性である *Escherichia coli* を多量のマグネシウムイオンを含む培養液で増殖させた場合には、耐性機構が不活化されることや、この菌にマグネシウムイオン感受性因子を伝達させた場合には、マグネシウムイオンの取込みが抑制されることを報告している。また、Okamoto ら¹³⁾は、銅イオン、亜鉛イオン、マンガンイオン、鉛イオン、カドミウムイオンに対して耐性な *Penicillium ochro-chloron* では、鉛イオンと亜鉛イオンが、マグネシウムイオンとカリウムイオンの取込みをおさえることを述べている。そこで、本実験に使用した両赤痢菌のマグネシウムイオン取込み量を測定した。

金属耐性菌のマグネシウムイオン取込み量は、赤痢菌原株のそれに比し、有意に多く取り込むのが観察された (Fig. 7)。この現象は、カドミウムイオン混在の有無にかかわらずみられたので、カドミウムイオン、亜鉛イオン耐性を獲得することによって、マグネシウムイオン輸送系に何らかの変化が生じたものと思われる。

マグネシウムイオンは、おもにマグネシウムイオン-ATP として膜の内側に存在する。カドミウム、コバルト、水銀、鉛等の2価の金属イオンは、肺マクロファージのマグネシウムイオン依存 ATPase の活性を阻害するという報告¹⁴⁾やコバルトイオンの毒性は、カドミウムイオンやニッケルイオンと同様にマグネシウムイオン輸送系の置換や放出によるという報告¹⁵⁾がある。このマグネシウムイオンとカドミウムイオンが置換してマグネシウムイオンが外部に放出されると思われるが、金属耐性菌は、カドミウムイオン耐性獲得の機構の一つにマグネシウムイオンを多く取り込み、カドミウムイオン毒性に抵抗するものとする。さらに、マグネシウム-ATPase や他の金属等が関与する ATPase 等との関係については、今後の検討が必要であろう。

V. 結 論

重金属の生体に及ぼす影響についての研究の一環として、微生物のカドミウムに対する耐性獲得という現象に着目した。カドミウムイオンに最も感受性の高い腸内細菌の一つである赤痢菌から、カドミウムイオン、亜鉛イオン耐性菌を分離した。この耐性獲得が、カドミウムイオン、亜鉛イオン、マグネシウムイオン、マンガンイオ

ン等の菌体内取り込みにどのような影響を与えるか検査し、次の結果を得た。

1) 原株は、培養 10 時間後で比較すると、カドミウムイオン 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で対照の 20%、カドミウムイオン 1 $\mu\text{g/ml}$ で 50%、亜鉛イオン 20 $\mu\text{g/ml}$ で 40% の増殖阻害がみられた。一方、金属耐性菌は、カドミウムイオン 10 $\mu\text{g/ml}$ および亜鉛イオン 50 $\mu\text{g/ml}$ まで対照と同様な増殖を示し、カドミウムイオン 20 $\mu\text{g/ml}$ で 10%、カドミウムイオン 50 $\mu\text{g/ml}$ 、亜鉛イオン 100 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 50% の増殖が阻害された。

2) 両菌をカドミウムイオンまたは亜鉛イオンを含む培養液中で種々の方法で振盪すると、亜鉛イオンの菌体内取込み量には差がみられなかったが、カドミウムイオンの取込み量では、金属耐性菌において明らかに少なく、取込みの抑制が認められた。しかし、いったん、取り込まれたこれらの金属の放出の割合には、両菌間にはほとんど差がなかった。

3) カドミウムイオン 1 $\mu\text{g/ml}$ と亜鉛イオン 10 $\mu\text{g/ml}$ の混在下での、カドミウムイオン取込み量は、原株のみが、亜鉛イオン混在によって、有意に減少した ($p < 0.01$)。亜鉛イオン取込み量は、両菌株ともに、カドミウムイオン存在下で約 2 倍に増加した ($p < 0.05$)。

4) 原株と金属耐性菌のマンガンイオン取込み量はほぼ同じであったが、マグネシウムイオン取込み量は、前者よりも後者のほうが多かった。

稿を終えるに臨み、ご指導とご校閲を賜りました、聖マリアンナ医科大学、衛生学教室、鏡光長教授、北里大学衛生学部、安斎博教授、松井清治教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Sakaguchi, T. and Sakaguchi, S.: Interaction between Cd and Zn uptaken into *Escherichia coli*, Kitasato Arch. Exp. Med., 54(1-2): 25-34, 1981.
- 2) Kondo, I., Ishihara, T. and Nakahara, H.: Mercury and cadmium resistances mediated by the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., 117: 1-7, 1974.
- 3) 坂口早苗: 金属耐性赤痢菌の分離と実験赤痢感染症に対する応用 (第1報) 耐性赤痢菌の分離とその性状, 感染症誌, 54: 130-138, 1980.
- 4) 坂口早苗, 坂口武洋: 金属耐性赤痢菌の分離と実験赤痢感染症に対する応用 (第2報) 金属 (Cd, Zn) 耐性赤痢菌と薬剤 (TC) 耐性赤痢菌の生化学的および血清学的性状の比較, 感染症誌, 54: 264-269, 1980.
- 5) 内田 泰, 斎藤明信, 梶原秀夫, 榎本則行: カドミウム耐性菌に関する研究 (第1報) カドミウム耐性菌の分離と菌体によるカドミウムの吸収, 佐大農彙, 35: 15-24, 1973.
- 6) Mitra, R. S., Gray, R. H., Chin, B. and Bern-

- stein, I. A. : Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd^{2+} , *J. Bacteriol.*, 121 : 1180-1188, 1975.
- 7) Chopra, I. : Decreased uptake of cadmium by a resistant strain of *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Microbiol.*, 63 : 265-267, 1971.
- 8) 堀津浩章, 前田達儀, 友枝幹夫 : カドミウム耐性菌の分離とその菌体への取り込みについて, *醸工*, 52 : 14-19, 1974.
- 9) Parizek, J. : The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc, *J. Endocrinol.*, 15 : 56-63, 1957.
- 10) Perry, H. M. and Erlanger, M. : Hypertension and tissue metal levels after intraperitoneal cadmium, mercury and zinc, *Am. J. Physiol.*, 220 : 808-811, 1971.
- 11) Ferm, V. H. and Carpenter, S. J. : Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc, *Nature*, 216 : 1123, 1967.
- 12) Park, M. H., Wong, B. B. and Lusk, J. E. : Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: Genetics and physiology., *J. Bacteriol.*, 126 : 1096-1103, 1976.
- 13) Okamoto, K., Suzuki, M., Fukami, M., Toda, S. and Fuwa, K. : Uptake of heavy metals by copper-tolerant *Fungus, Penicillium ochro-chloron*, *Agric. Biol. Chem.*, 41 : 17-22, 1977.
- 14) Mustafa, M. G., Cross, C. E., Munn, R. J. and Hardie, J. A. : Effects of divalent metal ions on alveolar macrophage membrane adenosine triphosphatase activity, *J. Lab. Clin. Med.*, 77 : 563-571, 1971.
- 15) Fujiwara, K., Iwamoto, M., Toda, S. and Fuwa, K. : Characteristics of *Escherichia coli* B resistant to cobaltous ion, *Agric. Biol. Chem.*, 41 : 313-322, 1977.

著者への通信先 : 坂口武洋, 〒 213 川崎市高津区菅生 2095 聖マリアンナ医科大学衛生学教室
Reprint requests to Department of Hygiene, St. Marianna University School of Medicine,
2095 Sugao, Takatsu-ku, Kawasaki, 213 Japan (T. Sakaguchi)