

## 市販鶏肉から分離されるサルモネラ菌の 薬剤耐性と R 因子の出現頻度

田 川 清

### INCIDENCE OF DRUG RESISTANCE AND R FACTOR AMONG SALMONELLAE ISOLATED FROM RETAILED CHICKENS

Kiyoshi TAGAWA

From April 1972 to March 1975, *Salmonellae* were isolated from samples of retailed chickens, and their drug resistance and distribution of R factors were investigated. In 83 samples (49.4%), 16 various *Salmonella* serotypes were discovered and *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. thompson* were most frequently isolated.

Of the total 83 isolates, 40 (48.2%) were resistant to one or more drugs tested. None of the *Salmonella* isolates were resistant to chloramphenicol or nalidixic acid and few isolates were resistant to kanamycin. Resistance to sulfanilamide was most common among the resistant isolates, followed by resistance to streptomycin, ampicillin or tetracyclin, in a decreasing order.

R factors transmissible to a recipient strain of *Escherichia coli* ML 1410 ( $F^-$ ,  $met^-$ ,  $NA^+$ ) were demonstrated in 40.0% of the resistant isolates.

The findings of this and other similar studies warrant strict control of the indiscriminate use of drugs such as antibiotics.

1972年4月から1975年3月にかけて、市販鶏肉試料からサルモネラ菌の分離を行ない、それらの菌の薬剤耐性とR因子の分布状況を検討した。

試料83点(49.4%)から16の異なる血清型に属するサルモネラ菌が分離され、そのうち *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. thompson* が最も頻りに見出される菌株であった。

分離83菌株のうち、40菌株(48.2%)が供試薬剤の一つまたはそれ以上に耐性であった。クロランフェニコールまたはナリジキシン酸に耐性のものは全くなく、カナマイシンに耐性のものも僅かであった。耐性菌株のうちスルファニールアミド耐性のものは最も多く、次いでストレプトマイシン耐性、アンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性の順であった。

受容菌として *Escherichia coli* ML 1410 ( $F^-$ ,  $met^-$ ,  $NA^+$ ) を用いた耐性伝達試験では、耐性サルモネラ菌の40.0%にR因子をもつことが示された。

これらの結果ならびに同種研究等から抗生物質を始めとする薬剤の無秩序な使用は厳格に規制される必要がある。

#### 結 言

わが国において抗生物質をはじめとする化学療法剤(以下薬剤と略)が家畜家禽の成長促進、疾病治療ないし予防の目的で飼料へ添加等により使われ始めてから20数年が経過した。その間畜産の合理化と集約化がなされ、多頭羽飼育に

よる畜・鶏舎の団地化が進み、それに伴って薬剤の使用はその数・量ともに飛躍的に増加してきた。そして近年の畜産関係で使用される薬剤の量はヒトの病気治療その他へ使用される量を遙かに凌いでいる<sup>(1)</sup>。

このことは薬剤の乳・肉・卵への残留，耐性菌の増加という食品衛生上憂慮すべき事態を招いた。1975年7月，飼料への薬剤使用を制限し，畜産品の安全性を確保する法改正<sup>(2)</sup>がなされ，1976年7月から施行されるに至った。

著者は家畜家禽への薬剤の使用と，畜肉から分離される細菌の薬剤耐性の関連を明らかにし，耐性菌の増加を抑える方策を考究する目的で研究を進めている。本報告は1972年度から1974年度の3カ年に鶏肉から分離したサルモネラ菌の薬剤耐性頻度ならびに耐性伝達因子（R因子）について検討した結果を纏めたものである。

### 実験方法

試料：香川県下の精肉店から1店につき50gの鶏肉を購入し，サルモネラ菌分離の試料とした。

菌の分離方法：試料50gに滅菌生理塩水250mlを加え，20°Cにて120r.p.m. 1hr振盪浸出した。浸出液10mlをセレンナイト増菌培地（日水）90mlに加え，37°C 24hr培養した（以下特別に記さない限り培養温度は37°Cである）。菌の分離にはブリアントグリーン培地を使用し，増菌培養液1～2滴を寒天平板上にコンラージ棒で塗抹して培養を行なった（なお，増菌液にプロテウス菌があるとコロニーの分離がうまくゆかないので，そのような場合は分離培地に0.05%になるよう抱水クロラールを加えてプロテウス菌の拡がりを抑えた）。培養24hrおよび48hr後出現したコロニーのうちサルモネラ菌と思われる性状のものを採り，滅菌生理塩水0.5mlに懸濁希釈してから再び同様の分離平板に画線塗抹し，24hr培養を行ない単一コロニーとして分離されるまで繰返し純化を行なった。平板上のコロニーをTSI寒天斜面に培養し，生理学的ならびに血清学的検査を行ないサルモネラ菌を同定した。すなわち，運動性がありグルコース利用能陽性，ラクトースおよびシュクロース利用能陰性，H<sub>2</sub>S産生能陽性，インドール生成能陰性，ウレアーゼ産生能陰性，マロン酸利用能陰性であり，しかもサルモネラO多価血清（北里研）により強く凝集するものをサルモネラ菌と同定し，更にO血清，H血清（北里研）により型別した。

薬剤耐性試験：分離菌の薬剤耐性の測定は日本化学療法学会改定法<sup>(3)</sup>に準じて行なった。使用した薬剤の種類および濃度はTable 1に示した通りである。被検菌をトリプトソヤブイオン（日水）で1夜培養し，同様の培地で10<sup>-2</sup>に

Table 1. Drugs and their concentrations used for susceptibility test

Drug	Abbreviation	Concentration
Chloramphenicol (Sankyo seiyaku Co.)	CM	12.5 μg/ml
Tetracycline (Sigma Co.)	TC	12.5 "
Dihydrostreptomycin (Meiji seika Co.)	SM	25.0 "
Sulfisoxazol (Yamanouchi seiyaku Co.)	SA	25.0 "
Kanamycin sulfate (Meiji seika Co.)	KM	6.25 "
Sodium ampicillin (Banyu seiyaku Co.)	APC	12.5 "
Nalidixic acid (Daiichi seiyaku Co.)	NA	12.5 "

希釈し，その1白金耳量を薬剤加寒天平板（SAの場合は半合成培地A<sup>(4)</sup>を，その他の薬剤の場合はブレインハートインヒュジョン（BHI）培地を使用）にスポットした。培養18～20hr後観察し菌の増殖がみられたものを耐性と判定した。

耐性伝達試験：耐性伝達の受容菌としては*Escherichia coli* ML 1410 (F<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>, NA<sup>r</sup>) 株を使用した。被検菌および受容菌をそれぞれトリプトソヤブイオンに1夜培養し，被検菌培養液0.1mlと受容菌培養液0.4mlを混合し15hr培養する。混合培養液の1白金耳量を採り，NA 12.5 μg/mlを含む各薬剤平板（前記と同様）に画線塗抹し20hr培養する。現われたコロニーを滅菌生理塩水に懸濁希釈し，同様の薬剤平板に画線培養して純化を行なった。ここに得られた耐性獲得*E. coli* ML 1410菌をブイオン寒天平板上に約7mmの長さに画線する（1平板に48菌を画線），1夜培養した後これをマスタープレートとして，NA加各薬剤平板にレプリカすることにより耐性伝達因子（R因子）の耐性パターンを決定した。

## 結 果

1972年度～1974年度の間に試験した鶏肉試料数、サルモネラ菌検出率および菌の血清型を Table 2 に示す。各年度

Table 2. Frequency of isolation of *Salmonellae* from retailed chickens

Year	No. of samples	No. positive for <i>Salmonella</i> (%)	Serotype
1972	64	31 (48.4)	<i>S. thompson</i> 6, <i>S. typhimurium</i> 5 <i>S. enteritidis</i> 4, others 16.
1973	32	14 (43.8)	<i>S. enteritidis</i> 3, <i>S. typhimurium</i> 2, <i>S. java</i> 2, others 7.
1974	72	38 (52.8)	<i>S. typhimurium</i> 6, <i>S. enteritidis</i> 4, <i>S. give</i> 3, <i>thompson</i> 2, others 23.

のサルモネラ検出率 (=汚染率) にはあまり差はなく、試料鶏肉の約半数からサルモネラ菌が分離された。

分離サルモネラ菌 83 株は 16 の血清型に属し、そのうち *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. thompson* の 3 種が多く、分離菌の約 40% を占めていた。その他の菌型の中には菌名を決定し難いものがかかり含まれていた。なお同一試料から複数の菌を分離したのであるが、それらは全て同一菌型を示したので 1 試料 1 菌株をもって以後の実験に供した。

分離菌の個々の薬剤に対する耐性菌株の分離頻度を示したのが Table 3 である。1972年度の耐性菌分離頻度は

Table 3. Distribution of individual drug resistance among *Salmonella* strains isolated from retailed chickens

Year	No. of strains isolated	No. of resistant strains							No. of susceptible strains
		CM	TC	SM	SA	KM	APC	NA	
1972	31	0	6	5	16	0	4	0	14
1973	14	0	3	6	8	1	2	0	5
1974	38	0	1	4	8	1	5	0	24
Total	83	0	10	15	32	2	11	0	43

54.8%, 1973年度のそれは64.3%, 1974年度は36.8%とかなりの変動があるが、試料数が少ないのでそのまま各年度における耐性菌の割合と見做すわけにはゆかない。

しかし総合してみると分離されるサルモネラ菌株の約50%が供試7薬剤の1つまたはそれ以上に耐性であり、それらの耐性菌株のうちSA耐性をもつものが最も多く80.0%, 次いでSM耐性であるもの37.5%, APC耐性であるもの27.5%, TC耐性であるもの25.0%, KM耐性であるもの5.0%の順であった。CMおよびNA耐性のもは全くなかった。

耐性40菌株のうち22菌株が単剤耐性であり、残りの18菌株は2剤以上の多剤耐性であった。多剤耐性のものうち9菌株が2剤耐性、6菌株が3剤耐性、3菌株が4剤耐性であった。各耐性パターンとそのパターンをもつ菌株数ならびにR因子保有菌株数を Table 4 に示す。

SA単剤耐性のもは最も多く、耐性全菌株の42.5%を占めていた。しかしその耐性の多くは非伝達性であり、R因子によると認められたものは僅かに2菌株、11.8%, であった。

SM耐性であるものはかなり多く存在したにも拘わらずSM単剤耐性のもはなかった。多剤耐性のもものではTC・SM・SA、またはTC・SM・SA・APCのパターンのものが多く、22.5%, R因子をもつもの比率も高い。

R因子保有菌株の全耐性菌株に対する割合は40.0%であり、個々の薬剤耐性の伝達率は Table 5 のようである。SA

Table 4. Incidence and transferability of drug resistance patterns of isolates

Drug resistance pattern	No. of strains harboured the pattern	Incidence (%)	No. of strains transferring all or part of pattern
TC•SM•SA•APC	3	7.5	3
TC•SM•SA	6	15.0	4
SM•SA	4	10.0	2
SM•KM	1	2.5	1
SM•APC	1	2.5	0
SA•APC	2	5.0	1
KM•APC	1	2.5	1
TC	1	2.5	0
SA	17	42.5	2
APC	4	10.0	2

Table 5. Transferability of individual drug resistance

Resistant to	No. of strains tested	No. of strains transferred the resistance <sup>a)</sup>	transferability (%)
TC	10	6	60.0
SM	15	8	53.3
SA	32	7	21.9
KM	2	2	100.0
APC	11	5	45.5

a) The majority of multiple resistant strains were found to carry more than two types of R factors in a cell. Therefore, if some of R factors, transferred from the same donor cell, were encoded a certain resistance of the donor and the others were not, the resistance was regarded to be transferable.

耐性の伝達率が21.9%と低いのはSA単剤耐性の伝達率の低いことによるもので、そのことを除くと各薬剤耐性ともかなりの伝達率であることが認められた。

#### 考 察

従来の報告<sup>(5-10)</sup>では、食肉のうち鶏肉のサルモネラ菌汚染率が最も高い。本研究における市販鶏肉の汚染率は約50%であり、著者ら<sup>(11,12)</sup>の1976, 1977年度に行なった同種研究の結果ならびに東京都衛研<sup>(8)</sup>が1966~1968年に行なった調査における鶏肉の汚染率20%前後の数値からするとかなり高い値である。一方熊<sup>(9)</sup>は1972年の調査で鶏肉の汚染率は87.5%であると報告している。これらの汚染率の違いは試料の採集地域、時期等にもよるであろうが、最も大きく影響しているとみられるのは鶏処理過程での二次的な汚染であろう。著者ら<sup>(13)</sup>は養鶏場の鶏を調べサルモネラ菌保有率は10%以下であることを認めている。渡辺<sup>(10)</sup>、高塚ら<sup>(14)</sup>の報告においてもほぼ同様の菌保有率であり、彼等は鶏処理過程の取扱い如何によっては、鶏肉のサルモネラ菌汚染率はかなり高くなることを示した。本研究において、生鶏から屢々分離されている *S. enteritidis* や *S. typhimurium* が高率に検出されたことは、処理場での保菌鶏から鶏肉への菌の拡散が考えられる。

分離菌のうちなんらかの耐性をもつものは48.2%であり、既報<sup>(15-19)</sup>のサルモネラ菌の耐性菌の比率と比較して高い数値であるとは言えない。しかし、耐性菌の比率は供試薬剤の数ならびにその種類によって変わりうるものでもあり、また菌の分離原によっても左右される。田中ら<sup>(19)</sup>はヒトから分離されたサルモネラ菌の約80%のものはTC, CM, SM, SAのいずれか1つまたはそれ以上に耐性であったと報告している。また著者ら<sup>(18)</sup>はプロイラー養鶏場の鶏から分離されるサルモネラ菌の殆んど全てのものが本研究で使用した薬剤のほか、ゲンタマイシン、セファロリジン、フラトリジンを加えた10薬剤のいずれかに耐性であることを認めている。一般に家畜家禽またはヒトから耐性菌が分離され

る頻度は高いのに比し、食品とか環境から分離される率は低い<sup>(20,21)</sup>。そして個々の薬剤に対する耐性菌の分離頻度は、分離される試料への薬剤の使用頻度または使用量と密接に関係している<sup>(22,23)</sup>。

本研究においてみられた各薬剤に対する耐性菌の比率は鶏への薬剤使用の様相を反映しているものと考えられる。またSA耐性のものが圧倒的に多いのに較べ、サルモネラ菌以外の腸内細菌においてかなりの割合でみつけれられるCM耐性のものが見当らなかつたのは、田中ら<sup>(19)</sup>の知見と符合しサルモネラ菌の特質とも考えられる。

SA単剤耐性のものが多いにも拘わらずその耐性の伝達率の低いことに関しては、三橋ら<sup>(24)</sup>はSA単剤耐性は比較的低分子量のプラスミドによることを報告している。それがどのように他の菌に移されるかは明らかでないが、恐らく菌の死滅溶解に伴うプラスミドの放出と、それへの直接接触による取込み (transformation)、または感染フェージによる導入 (transduction) が考えられる。一方SAは殆んど全ての市販飼料に含まれており、それによるSA耐菌性の選択的増殖も、耐性の伝達率が低くても高率にSA耐性菌が検出される原因と考えられる。

家畜・家禽への薬剤の使用と耐性菌の出現、およびそれに伴うヒトの健康に与える有害な影響については屢々指摘されているところである<sup>(25-27)</sup>。1976年7月から“飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>(2)</sup>”により、飼料添加薬剤等は新に設定された枠内での使用に限られることになった。しかし、著者らの現在継続中の研究によると、家畜・家禽から分離される薬剤耐性菌の出現頻度は法施行前と殆んど差が認められていない。従って今後薬剤使用に対するより厳格な規制と適切な指導が望まれる。

#### 謝 辞

本研究を纏めるに当たり、有益なご助言と、耐性受容菌を分譲頂きました群馬大学医学部三橋進教授ならびに田中徳満氏に深く感謝申し上げます。また、サルモネラ菌の分離等にご協力下さいました山中康子 (現姓 磯部)、岡崎勝一郎、宮田永子の各氏に感謝致します。

#### 引 用 文 献

- (1) 編集部：飼料と飼料工業，16, (No. 182), 38—41 (1976).
- (2) 法律第68号：官報 No. 14568 (1975).
- (3) 大越正秋：Chemotherapy, 22, 1126—1128 (1974).
- (4) NAGAI, Y. and S. MITSUHASHI: *J. Bacteriol.*, 109, 1—7 (1972).
- (5) EDWARDS, P. R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 70, 593—613 (1958).
- (6) ASERKOFF, B., S. A. SCHROEDER and P. S. BRACHMAN: *Amer. J. Epidemiol.*, 91, 13—24 (1970).
- (7) ERSKINE, V. S. and A. D. MARGO: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 15, 1015—1019 (1974).
- (8) 坂井千三：メデヤ・サークル，14, 315—320 (1969).
- (9) 熊 正昭：公衆衛誌，20 (No. 10), 355 (1973).
- (10) 渡辺昭宣：畜産の研究，28, 175—182 (1974).
- (11) 田川 清，藤井銀造，高崎静子：食品衛生学会第33回講演会要旨集，p. 36 (1977).
- (12) 田川 清，山口順一，宮岡克：食品衛生学会第35回講演会要旨集，p. 13 (1978).
- (13) 田川 清，高橋慶子，中野憲子：食品衛生学会第31回講演会要旨集，p. 49 (1976).
- (14) 高塚 暹，佐藤良一：食品衛生研究，25, 841—847 (1975).
- (15) VOOGD, C. E., P. A. M. GUINÉE, A. MANTEN and J. J. VOLKENDURG: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 36, 297—304 (1970).
- (16) LACHMAJER, M.: *Med. Dosm. Mikrobiol.*, 22, 27—34 (1970).
- (17) SOJKA, W. J. and E. B. HUDSON: *Br. Vet. J.*, 132, 95—104 (1976).
- (18) POCURULL, D. W., S. A. GAINES and H. D. MERCER: *Appl. Microbiol.*, 21, 358—362 (1971).
- (19) TANAKA, T., K. IKEMURA, M. TSUNODA, I. SASAGAWA and S. MITSUHASHI: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9, 61—64 (1976).
- (20) HAROLD, C. N., E. C. CHARLES, D. L. ELAINE and F. BARBARA: *J. Infect. Dis.*, 132, 617—622 (1975).
- (21) JANINA, L.: *Med. Dosm. Mikrobiol.*, 27,

- 215—222 (1975).
- (22) SMITH, H. W. and W. E. CRABB: *Vet. Rec.*, 69, 24 (1957).
- (23) DZIERZANOWSKA, D., M. WILCZYNSKI and H. LINDA: *Med. Weter.*, 30, 651—653 (1974).
- (24) MITSUHASHI, S., K. INOUE and M. INOUE: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 418—422 (1977).
- (25) SWANN, M. M.: *Report of Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine.* Her Majesty's Stationery Office, London (1969).
- (26) 渡辺 力: *科学*, 39, 554—559 (1969).
- (27) FINLAND, M.: *J. Animal Sci.*, 40, 1222—1240 (1975).

(1978年5月31日 受理)