

## 乳牛およびブロイラー鶏から分離される大腸菌・腸球菌の 薬剤耐性とRプラスミド

田 川 清

### DRUG RESISTANCE AND R PLASMIDS AMONG *ESCHERICHIA COLI* AND *STREPTOCOCCUS FAECALIS* ISOLATED FROM DAIRY COWS AND BROILER CHICKENS

Kiyoshi TAGAWA

Six hundred and three strains of *E. coli* and 425 strains of *S. faecalis* were isolated from dairy cows and 184 strains of *E. coli* and 208 strains of *S. faecalis* were from broiler chickens, and these were studied for drug resistance and prevalence of R plasmids.

Strains resistant to commonly used antimicrobial drugs were more frequently observed in isolates from chickens than those of cows: i.e., 100% of *E. coli* and 97.6% of *S. faecalis* isolates from chickens were resistant to one or more drugs, whereas 16.3% of *E. coli* and 22.1% of *S. faecalis* isolates from cows were resistant to at least one drug.

In *E. coli* isolates from chickens, resistance to TC and SU was most frequently observed, followed by resistance to SM, KM, NM, FT, CM, APC, CER and TM in that order. On the other hand, resistance to TC, LM, EM, SM and NM was commonly observed in chicken *S. faecalis* and followed by resistance to CER, FT, GM, APC, Rif and CM in that order.

In isolates from cows, resistance to TC was most frequently encountered in both genera of bacteria, followed by resistance to SM, KM, APC, FT, NM, SU, CM, CER and GM in *E. coli* strains and by resistance to SM, NM, LM, EM, APC, CER, Rif, FT and GM in *S. faecalis* strains in that order, respectively.

It was found that 78.8% of *E. coli* strains and 77.0% of *S. faecalis* ones tested, both of which were chicken origin, carried R plasmids and 32.7% of the former and 46.7% of the later, those were cow origin, carried them.

In examining molecular nature of R plasmids, it is revealed that covalently-closed-circular DNAs were separated from *E. coli* and *S. faecalis* strains harbouring drug resistant plasmids.

乳牛から603菌株の大腸菌と425菌株の腸球菌を、そして、ブロイラー鶏から184菌株の大腸菌と208菌株の腸球菌を分離し、それらの菌の薬剤耐性とRプラスミドについて検討した。

通常用いられている抗菌性薬剤に対する耐性菌の出現率は鶏分離菌の方が牛分離菌より高かった。すなわち、鶏分離菌では大腸菌の全ての株および腸球菌の97.6%の株が薬剤もしくは多剤に耐性であったのに対し、牛分離菌では大腸菌の16.3%および腸球菌の22.1%の株が薬剤に耐性であった。

鶏分離菌のうち、大腸菌ではTCとSU耐性のものが最も多く、ついでSM, KM, NM, FT, CM, APC, CER, TM耐性の順であった。一方、腸球菌ではTC, LM, EM, SM, NM耐性のものが多く、ついでCER, FT, GM, APC, Rif, CM耐性の順であった。

牛分離菌では、大腸菌、腸球菌ともにTC耐性のものが最も多く、ついで大腸菌ではSM, KM, APC, FT, NM, SU, CM, CER, GM耐性の順であり、腸球菌ではSM, NM, LM, EM, APC, CER, Rif, FT, GM耐性の順であった。

鶏分離菌のうち大腸菌の78.8%の株と被験腸球菌の77.0%の株がRプラスミドを持ち、牛分離菌のうち大腸菌の32.7%と被験腸球菌の46.7%の株がRプラスミドを持つことが認められた。

Rプラスミド分子の性状を検討したところ、薬剤耐性プラスミド保有大腸菌および腸球菌から環状構造DNA分子

が分離された。

### 結 言

著者はさきに市販鶏肉から分離されるサルモネラ菌および大腸菌が抗生物質を主とする各種抗菌剤（以下薬剤と略）に対し高率に耐性であることを報告した<sup>(1,2)</sup>。このことは鶏飼育の段階で飼料等に添加される薬剤に起因するとみられることから、養鶏場の鶏から分離されるこれらの菌種について薬剤耐性菌の出現頻度を調べたところ市販鶏肉の場合とほぼ同様の結果を得た<sup>(3)</sup>。さらに、飼料等への薬剤添加を規制する法改正<sup>(4)</sup>が1975年に行われ、その効果について検討した結果、規制後ある種の薬剤に対する耐性菌の出現率が減少したものの、全般的には規制前と余り大きな変化はみられないことについても報告した<sup>(3)</sup>。

本報告においては鶏とそれ以外の家畜における薬剤耐性菌の保有状況を比較する目的で調査研究を行った。

家畜家禽に対する薬剤の使用については、1975年改正の「飼料の安全性確保と品質改善に関する法律」に基づく「動物用医薬品の使用に関する省令<sup>(5)</sup>」によって規制されている。現在動物用医薬品として許可使用されているものは大部分が抗生物質であり、その年間使用量は1982年の資料<sup>(6)</sup>では920,922kg（純末換算量）となっている。これらの抗生物質の使用内容を見ると、飼料への添加が752,568kg（82.2%）と圧倒的に多く、経口投与、注射、挿入等による使われ方は少ない。

従って、前述したように、薬剤耐性菌の出現はこれら薬剤の飼料中の濃度に関係するとみられることから、動物種別飼料への薬剤添加の許可基準<sup>(7)</sup>をみると表1のようである。

この表から明らかなように、最も多くの種類と量の薬剤を投与されているのはブロイラー鶏であり、逆に最も少な

表1. 飼料中の添加薬剤と濃度（許可基準）

薬 剤 名	濃 度 (トン当り)	鶏用(ブロイ ラーを除く) 幼および中 さう用	ブロイラー用		豚 用		牛 用	
			前期用	後期用	ほ乳期用	子豚期用	ほ乳期用	幼令期用
亜鉛バシトラシン	万単位	16.8-168	16.8-168	16.8-168	42-420	16.8-168	42-420	16.8-168
アルキルトリメチルアン モニウムカルシウムオキ シテトラサイクリン	g力価	5-55	5-55		5-100		5-50	5-50
クロルテトラサイクリン	g力価	10-55	10-55		10-100		10-50	10-50
エンボン酸 スピラマイシン	g力価	5-20	5-20		5-100			
エンラマイシン	g力価	1-10	1-10	1-10	2.5-20	2.5-20		
キササマイシン	g力価	5.6-11.1	5.6-11.1		5.6-100			
チオペプチン	g力価	0.6-10	0.6-10	0.6-10	1-20	1-20		
デストマイシンA	g力価	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10		
ハイグロマイシンB	万単位	660-1320	660-1320	660-1320	660-1320	660-1320		
バージニアマイシン	g力価	2-5	2-5	2-5	10-20	10-20		
ピコザマイシン	g力価	5-20	5-20	5-20	5-20	5-20		
フラボフォスフォリ ポール	g力価	0.5-5	0.5-5	0.5-5	5-20	1-10		
ポリステレンスルホン酸 オレアンドマイシン	g力価	1-5	1-5		0.8-40			
マカルボマイシン	g力価	2-30	2-30	2-30	2-30	2-30		
マンガンバシトラシン	万単位	16.8-168	16.8-168	16.8-168	42-420	16.8-168	42-420	16.8-168
硫酸コリスチン	g力価	2-20	2-20	2-20	2-40	2-20	5-40	
硫酸フラジオマイシン	g力価	10-35	10-35		10-100		10-100	10-70
リン酸タイロシン	g力価	4.4-22	4.4-22		22-88			

(註) 添加薬剤のうち抗コクシジウム剤を除いた。また、飼育業者が飼料に添加しうる薬剤についても省いた。

い投与を受けているのは乳牛とみられる。故に本研究ではブロイラー鶏と乳牛を対象にすることとした。

また、これまでの研究においては、大腸菌の他にサルモネラ菌を対象としていたが、家畜家禽のサルモネラ菌の保有率は低く、薬剤耐性菌の流布状況を知る上においては適当ではない。従って、家畜家禽の腸内に常在し、しかもグラム陽性の腸球菌 (*Streptococcus faecalis*) を大腸菌と共に対象とすることとした。

## 実験方法

細菌の分離方法：養鶏場および乳牛飼育場から新鮮な糞便約 5g を試験管内に無菌的に採取し、実験室に持ち帰り直ちに菌の分離に供した。

試料からの大腸菌の分離ならびに同定法は前報<sup>(3)</sup>と同様である。

腸球菌の分離は試料約 1g を Azide citrate 培地<sup>(8)</sup> 20ml に加え、37°C で 48 hr 培養して増菌した後、増菌液の少量を再び Azide citrate 培地に接種し 45°C で 24 hr 培養を行い、生育した培養菌を TATAC 寒天平板培地<sup>(9)</sup> に塗抹し 37°C、20 hr 培養した。出現したコロニーのうち腸球菌の特徴をもつもの 5ヶを選び、それぞれを滅菌生理食塩水 0.5ml に懸濁し、同一平板に画線培養して純化を行った。

同定は顕微鏡観察による菌の形状、6.5% NaCl 加ブドウ糖ブイオン、ならびに pH 9.0 ブドウ糖ブイオン培地における生育、およびカタラーゼ試験によった。

薬剤耐性試験：大腸菌の薬剤耐性試験方法は前法<sup>(3)</sup>と同様である。ただし、耐性非耐性を判別する各薬剤の最小発育阻止濃度（以下 MIC 値と略）は以下の基準を採用した。

テトラサイクリン (TC と略、以下同様) 3.1, ストレプトマイシン (ST) 50, スルフィソキサゾール (SU) 200, トリメトピリン (TM) 1.6, クロラムフェニコール (CM) 25, カナマイシン (KM) 25, ネオマイシン (NM) 50, ゲンタマイシン (GM) 12.5, アンピシリン (APC) 12.5, セファロジン (CER) 12.5, ポリミキシン (PB) 1.6, リファンピシン (Rif) 50, エリスロマイシン (EM) 200, フラトリジン (FT) 1.6, ナリジキシ酸 (NA) 12.5 (単位は全て  $\mu\text{g/ml}$  である)。

また、腸球菌の場合は、前培養方法、接種方法は全く大腸菌のときと同様であるが、測定培地として Mueller-Hinton 寒天培地 (日水製) を用いた点が異なる。この培地に TC 3.1, SM 200, CM 50, NM 200, GM 50, APC 3.1, CER 12.5, Rif 12.5, EM 12.5, FT 12.5, リンコマイシン (LM) 25 (単位は上と同じ) をそれぞれ加え、菌液を一白金耳接種した後 37°C、24 hr 培養後増殖の見られたものを耐性と判定した。

薬剤耐性プラスミドの伝達試験：大腸菌の耐性伝達試験は *E. coli* 4902 ( $\text{rest}^-$ ,  $\text{NA}^r$ ) を受容菌として用い前報<sup>(3)</sup>と同様に行った。

腸球菌の場合は受容菌として *S. faecalis* JH 2-2 (Rif<sup>r</sup>) および *E. coli* 4902 を用い、フィルターメイテング法<sup>(10)</sup>によって行った。すなわち、被験菌および受容菌をそれぞれブレインハートインヒュージョン培地 (BHI と略、Difco 製) にて 37°C 一夜培養後、それぞれの培養液 5ml づつをメンブランフィルター (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, Sartorius 製) で濾過した。フィルター上の菌体を 37°C に加温した BHI 培地 5ml で洗ってから、同温度に保った BHI 寒天平板上にフィルターと共に乗せ 37°C にて 3~5 hr 培養を行う。菌体をフィルターと共に取り出し、3ml の BHI 培地に懸濁し、その 0.1ml を Rif 50  $\mu\text{g}$  (受容菌が *E. coli* 4902 の場合 NA 25  $\mu\text{g}$ ) と被験菌が耐性である薬剤を含有する Mueller-Hinton 寒天培地にコンラージ棒で塗抹し 37°C、24 hr 培養した。出現したコロニーを少量の生理食塩水に懸濁し、再び同一平板に画線培養し接合受容菌の純化を行った。

R プラスミド DNA の調製：耐性伝達が見られた菌 (R プラスミド保有菌) からのプラスミド DNA の調製は Birnboim と Doly の方法<sup>(11)</sup>を幾分変えて行った。

一夜前培養した R プラスミド保有菌を LB 培地<sup>(12)</sup> または BHI 培地 500ml に対し 2ml 接種し 37°C、5 hr 培養する。培養液を 0°C に冷却後遠心集菌し、0°C の TES 緩衝液 (0.01 M トリスアミノメタン, 0.005 M EDTA, 0.01 M 塩化ナトリウム, pH 8.1) で菌体を洗滌後 5mg/ml の濃度にリゾチームを溶かした 50mM のグルコースを含む TES 緩衝液 10ml に懸濁し、室温で 5min 放置する。20ml の 0.2N NaOH と 1% SDS からなる溶菌液を加え静かに攪拌混合してから 10min 0°C に保つ。15ml の 0°C に保った 5M  $\text{KCH}_3\text{CO}_2$  (pH 4.8) を加え中和してから日立超遠心機で 20,000rpm 20min 遠心分離する。透明上清をとり、1mg/ml の濃度に 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した RNase (Sigma 製, 予め 90°C、10min 処理して DNase を失活させる) を 1ml 加え 37°C、

20 min 処理し, 更に 5 mg/ml の濃度に TES 緩衝液に溶かしたプロナーゼ E (科研化学製, 予め 37°C, 2 hr 保ち自己消化させる) 2 ml を加え, 37°C, 30 min 処理する。酵素処理後プラスミド溶液量の 0.6 に相当する量のイソプロパノールを加えよく振盪混和させ, 10°C にて 10,000rpm 30 min 遠心分離する。上澄液を捨て去り沈殿区分に 70% エタノールを加えて洗い, 真空乾燥機中で乾燥させる。乾燥沈殿を 9 ml の TES 緩衝液に溶解し, 全量を CN 遠心チューブ (日立工機製) に移し, 9 g の粉末 CsCl および 10 mg/ml 濃度の臭化エチジウム溶液 1 ml を加えよく混和させる。屈折率が 1.386 になるように飽和 CsCl 溶液で調整した後, 液面に流動パラフィン を 1~2 滴のせ, 20°C で 35,000rpm, 48 hr 遠心する。長波長 UV 光線下で下部のバンド区分を集め, この区分に CsCl で飽和したイソアミールアルコールを加えて臭化エチジウム色素を除く, 赤色がなくなったプラスミド溶液は, 殺菌したセロファンチューブに入れ TES 緩衝液に対して, 4°C, 48 hr 透析を行う。

この方法により調製したプラスミド試料に少量のクロロホルム液を加えて 4°C に保存した。

R プラスミドによる形質転換: プラスミド試料による形質転換試験は Cohen らによる CaCl<sub>2</sub> 法<sup>(13)</sup> によった。受容菌としては *E. coli* 4902 (rest<sup>-</sup>, NA<sup>-</sup>) または *S. faecalis* JH 2-2 (Rif<sup>r</sup>) を用いた。方法を概略すると, 受容菌を LB 培地で 37°C, 3 hr 振盪培養後集菌し, 0°C で 50 mM の CaCl<sub>2</sub> で処理する。この菌液にプラスミド液を加え, 42°C にて 2 min 加温した後, 新鮮な LB 培地を加え 37°C で 30 min~1 hr 培養し, プラスミドに標識された薬剤および NA (*S. faecalis* の場合 Rif) を含む選択培地平板に 1 平板当たり培養液 0.1~0.2 ml を塗り 37°C, 24 hr 培養する。出現したコロニーを同一選択培地平板上で純化し, 形質転換菌株とした。

R プラスミドの電子顕微鏡撮影: R プラスミドの性状, 大きさは電子顕微鏡下で観察することによった。

プラスミド DNA の炭素膜メッシュへの載せ方は微量拡散法<sup>(14)</sup> により行い, シェドウイングは白金パラジウムを直角方向から蒸着する方法<sup>(15)</sup> によった。観察および写真撮影は日立 HU-12A 型電子顕微鏡 (日立製作所製) で行った。プラスミドの分子量は電子顕微鏡写真から DNA の長さを測定し, 1 μm は 2.07 × 10<sup>6</sup> の分子量をもつ<sup>(16)</sup> ものとして計算した。

## 結 果

### 分離菌の薬剤耐性

1980年5月~1981年3月の期間に香川県下の25ヶ所の乳牛飼育場から採取した125点の試料から大腸菌603株, 腸球菌425株を分離した。また, 1981年5月から1981年11月の期間に5ヶ所のブロイラー養鶏場から合計45の試料を採取し大腸菌184株と腸球菌208株を分離した。これら分離菌株の薬剤耐性を試験した結果は表2および表3に示すようである。

大腸菌についてはブロイラーからの分離株の全てが供試薬剤のいずれかに耐性であった。

これに対し乳牛からの分離株については耐性であるものが少なく16.3%の株が耐性であるに過ぎなかった。

この傾向は腸球菌についてもみられ, ブロイラー分離株の97.6%のものは供試薬剤のいずれかに耐性であるのに対し, 乳牛分離株では22.1%の株が耐性であった。

個々の薬剤に対する耐性株の分離頻度についてみるとブロイラーからの分離大腸菌では TC, SU 耐性のものが高頻度であり分離株の約90%はこれらに耐性であった。次いで SM, KM, NM, FT, CM の順であり, APC, CER, TM 耐性の株の分離頻度は低かった。GM, PB, Rif, EM, NA 耐性のものは見られなかった。

乳牛からの分離株についても各薬剤に対する耐性株の分離される傾向はブロイラー分離株とほぼ同様であった (相関係数0.67)。しかし, SU 耐性に関してはブロイラー分離株の場合より低い割合であった。

腸球菌の場合, ブロイラー分離株では TC, SM, EM, LM に対する耐性のものが多く全分離菌株のほぼ90%がこれらに耐性であった。次いで NM, CER, FT, GM の順であり, CM, APC, Rif 耐性のものの分離頻度は極めて低く数%であった。乳牛分離株の場合もほぼ同様の各薬剤に対する耐性傾向がみられた (相関係数0.80)。

表2および表3から類推されるように, ブロイラーからの分離大腸菌では殆んどのものが多剤耐性であり, 5剤耐性47株 (25.5%), 3剤耐性39株 (21.2%), 4剤耐性31株 (16.8%), 2剤耐性20株 (10.9%), 6剤耐性15株 (8.2%) の順であり7剤耐性以上のものは少なかったが, 9剤耐性のものが12株ありこれらは全て同一耐性パターンを示した。高頻度に見いだされる耐性パターンを表4に示す。

乳牛分離大腸菌では単剤耐性のものが最も多く48株 (49.0%) あり, そのうち TC 耐性のものが32株, FT 耐性の

表 2. 大腸菌の薬剤耐性株分離頻度

分離源	分離菌株数	耐性菌株数													非耐性菌株数		
		TC	SM	SU	TM	CM	KM	NM	GM	APC	CER	PB	Rif	EM		FT	NA
アロイラー鶏	184	166 (90.2)	108 (58.7)	162 (88.0)	15 (8.2)	56 (30.4)	90 (48.9)	90 (48.9)	0 (0)	31 (16.8)	18 (9.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	57 (31.0)	0 (0)	0 (0)
乳牛	603	70 (11.6)	41 (6.8)	10 (1.7)	0 (0)	10 (1.7)	29 (4.8)	11 (1.8)	2 (0.3)	24 (4.0)	5 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (2.5)	0 (0)	505 (83.7)

註 ( ) 内は分離頻度(%)を示す。

表 3. 腸球菌の薬剤耐性株分離頻度

分離源	分離菌株数	耐性菌株数													非耐性菌株数
		TC	SM	CM	NM	GM	APC	CER	Rif	EM	LM	FT	FT		
アロイラー鶏	208	197 (94.7)	182 (87.5)	3 (1.4)	157 (75.5)	23 (11.1)	10 (4.8)	73 (35.1)	7 (3.4)	183 (88.0)	186 (89.4)	53 (25.5)	5 (2.4)		
乳牛	425	44 (10.4)	23 (5.4)	0 (0)	22 (5.2)	3 (0.7)	11 (2.6)	11 (2.6)	4 (0.9)	14 (3.3)	18 (4.2)	4 (0.9)	331 (77.9)		

註 ( ) 内は分離頻度(%)を示す。

表4. 大腸菌に高頻度で見いだされる耐性パターン

分離源別	薬剤耐性パターンと分離菌株数	
	薬剤耐性パターン	分離菌株数
アロイラー鶏分離菌	TC-SM-SU-KM-NM	31 (16.8)
	TC-SM-SU-FT	14 (7.6)
	TC-SU	12 (6.5)
	SU	9 (5.0)
乳牛分離菌	TC	32 (32.7)
	TC-SM	9 (9.2)
	SM-KM-NM-APC	6 (6.1)
	TC-SM-CM-KM-APC	9 (9.2)
	FT	9 (9.2)
	TC-KM	6 (6.1)

註 ( ) 内数値は頻度(%)を示す.

表5. 腸球菌に高頻度で見いだされる耐性パターン

分離源別	薬剤耐性パターンと分離菌株数	
	薬剤耐性パターン	分離菌株数
アロイラー鶏分離菌	TC-SM-NM-EM-LM-FT	38 (18.7)
	TC-SM-NM-EM-LM	35 (17.2)
	TC-SM-NM-GM-CER-EM-LM	13 (6.4)
乳牛分離菌	TC	26 (27.7)
	LM	7 (7.4)
	APC-CER	5 (5.3)
	EM	5 (5.3)
	SM-NM	8 (8.5)
	NM-APC (または CER)	6 (6.4)
	SM	5 (5.3)
	TC-SM-NM-CER-EM-LM	37 (18.2)
	TC-SM-EM-LM	14 (6.9)
	TC-EM-LM	9 (4.4)

註 ( ) 内数値は頻度(%)を示す.

表 6. 大腸菌の薬剤耐性因子の伝達頻度

被験菌の耐性薬剤名	TC	SM	SU	TM	CM	KM	NM	GM	APC	CER	FT
ブロイラー分離菌	120/166	87/108	29/162	0/15	42/56	80/90	80/90	0	20/31	16/18	3/57
伝達頻度 (%)	(72.3)	(80.6)	(17.9)	(0)	(75.0)	(88.9)	(88.9)	(64.5)	(88.9)	(5.3)	
乳牛分離菌	21/70	10/41	0/10	0	5/10	11/29	2/11	0/2	12/24	3/5	2/15
伝達頻度 (%)	(30.0)	(24.4)	(0)	(0)	(50.0)	(37.9)	(18.2)	(0)	(50.0)	(60.0)	(13.3)

表 7. 腸球菌の薬剤耐性因子の伝達頻度

被験菌の耐性薬剤名	TC	SM	CM	GM	APC	CER	EM	LM	FT
ブロイラー分離菌	76/197	141/182	0/3	16/23	4/10	32/73	119/183	126/186	4/53
伝達頻度 (%)	(38.6)	(77.5)	(0)	(69.6)	(40.0)	(43.8)	(65.0)	(67.7)	(7.5)
乳牛分離菌	15/44	16/23	0	2/3	8/11	8/11	7/14	8/18	0/4
伝達頻度 (%)	(34.1)	(69.6)	(0)	(66.7)	(72.7)	(72.7)	(50.0)	(44.4)	(0)

ものが9株で他の単剤耐性のものは少なかった。2剤耐性のものは17株(17.3%)であり、その大部分が TC-SM、または TC-KM のパターンであった。3剤耐性10株(10.2%)、4, 5剤耐性各11株(11.2%)、6剤耐性は1株(1.0%)であった。

腸球菌については、ブロイラー分離株では6剤耐性のものが最も多く87株(42.9%)あり、そのうち TC-SM-NM-EM-LM-FT、または TC-SM-NM-CER-EM-LM 耐性パターンのものが大部分であった。次いで多いのが5剤耐性のもの44株(21.7%)、4剤耐性25株(12.3%)、7剤耐性18株(8.9%)、3剤耐性15株(7.4%)の順であり、その他8剤耐性5株、単剤および2剤耐性各4株、9剤耐性1株であった。

乳牛分離株では単剤および2剤耐性のものが大部分でそれぞれ57株(60.6%)、22株(23.4%)であった。その他3剤耐性10株(10.6%)、4剤耐性2株(2.1%)、5剤耐性3株(3.2%)であった。

腸球菌のうちで高頻度に見いだされた耐性パターンを表5に示した。

#### 薬剤耐性の伝達

薬剤耐性の伝達についてブロイラーからの分離大腸菌の全184株、乳牛からの分離大腸菌98株について試験した。ブロイラー分離株の145株(78.8%)、乳牛分離株の32株(32.7%)が受容菌である *E. coli* 4902 に薬剤耐性を伝達した。個々の薬剤耐性因子の伝達頻度は表6に示すようである。ブロイラー分離株では SU, TM, FT を除く他の薬剤耐性因子は高い頻度で伝達されたが、乳牛分離株では、高頻度に伝達されるものは見られなかった。

腸球菌については受容菌として用いた *S. faecalis* JH 2-2 が Rif 耐性であると同時に NM に対して高い MIC 値を示したので、その他の薬剤耐性のみについて伝達試験を行った。ブロイラー分離株196株のうち151株(77.0%)、乳牛分離株90株のうち42株(46.7%)がそれらが持つ薬剤耐性因子の全部または一部を伝達し得た。個々の薬剤耐性の伝達頻度を表7に示す。ブロイラー分離株、乳牛分離株ともに FT の伝達頻度が低いことを除いては他の薬剤耐性因子の伝達はかなりの頻度であることが認められた。ただし、CM 耐性の伝達頻度についてはこの薬剤に対する耐性菌数が少なかったため明確でなかった。なお、受容菌として *E. coli* 4902 (rest<sup>-</sup>, NA<sup>+</sup>) を用いて、Rif および NM 耐性菌の全てについて耐性伝達試験を行ったが、伝達し得るものはなかった。

#### 大腸菌および腸球菌の R プラスミドの性状

大腸菌と腸球菌の R プラスミドの形状大きさを比較すると共に、大腸菌から腸球菌へ逆に腸球菌から大腸菌へそれぞれのプラスミドが取り込まれ、形質転換しうるか否かについて検討した。

両菌種の多剤耐性 R プラスミド保有菌数株づつを選び、プラスミドの抽出分離を種々検討した。菌の培養時における CM 添加の効果は供試菌のいずれにもみられなかった。また、pH 8.0 における SDS 溶菌法<sup>(17)</sup>、または、アルカリ煮沸法による溶菌法<sup>(18)</sup> によっても CsCl 密度勾配遠心により明確なプラスミドバンドを得ることができなかった。

実験方法において記載した方法により得られた大腸菌および腸球菌プラスミドの1例を写真1および写真2に示す。

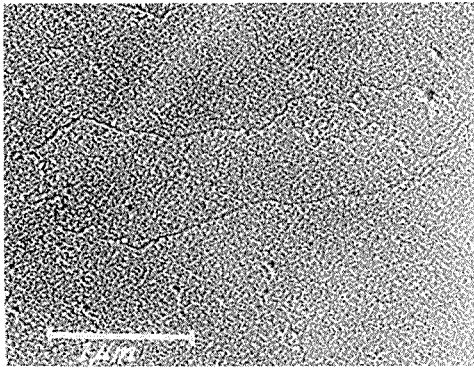


写真1. 大腸菌の薬剤耐性 R プラスミドの電子顕微鏡写真

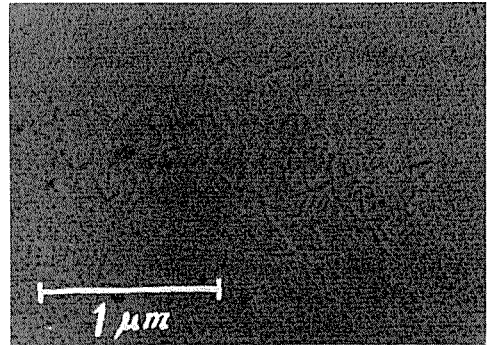


写真2. 腸球菌の薬剤耐性 R プラスミドの電子顕微鏡写真

これらのプラスミドは分離直後の電子顕微鏡観察では Supertwist しており、環状構造のものは少ない。試料を  $4^{\circ}\text{C}$  で1週間程度保った<sup>(19)</sup> ものでは殆んどのものが環状として観察された。

大腸菌から抽出されたプラスミドには約 36 M dalton と 22 M dalton (写真1) の分子量をもつものが観察され、腸球菌では約 27 M dalton と 50 M dalton 程度 (写真2) のものが観察された。

形質転換試験を行った結果大腸菌のプラスミド試料による *E. coli* 4902 への形質転換は全て行われた。しかし、*S. faecalis* JH 2-2 への形質転換はみられなかった。腸球菌プラスミドでは *S. faecalis* JH 2-2 へは元の菌株が持つ薬剤耐性マーカーの一部が表現形質として認められる転換株が得られたが、全部の耐性薬剤に耐性を示す転換株は得られなかった。また *E. coli* 4902 受容菌への形質転換は認められなかった。

## 考 察

ブロイラー鶏分離菌のうち薬剤耐性であるものの割合と乳牛分離菌のそれとを比較すると前者が非常に高い割合を示した。このことはこれらの動物に対する飼料中への添加薬剤の種類および濃度、さらには給飼期間に密接に関係しているものと考えられる。一般に家畜家禽の幼令期には多種類の薬剤が比較的高濃度に投与されるのに対し、成長が進むにつれて使用薬剤の種類・量ともに減少している (表1参照)。特に乳牛においては搾乳期に入ると薬剤添加飼料は与えられていない。一方ブロイラー鶏では成長の全期間を通じて薬剤が加わった飼料で飼育されている。

高橋<sup>(20)</sup> は1970年～74年の調査で鶏から分離されサルモネラ菌の薬剤耐性株の検出率は牛から分離されるそれよりも低かったと報告している。本研究結果との差異は対象とした細菌の種類が異なること、動物の飼育場所が地域的に異なること、調査時期が異なること等に起因するものと考えられる。先づ菌種による薬剤耐性化の違いについては、サルモネラ菌は大腸菌に比し耐性化率は幾分低いものの、同一試料から分離されるサルモネラ菌と大腸菌の耐性株分離頻度は同じような傾向があり<sup>(3)</sup> 対象菌種による違いは認め難い。細菌の分離試料の地域の違いについては著者は佐藤ら<sup>(2)</sup> と共に香川県下と新潟県下において鶏肉から分離される大腸菌の薬剤耐性率および耐性薬剤のパターンは両地域ともほぼ同様であり、このことから鶏飼育に使用される飼料は規格化され全国いずれの地域においても同じような添加物組成の飼料が使われ、且つ同じような飼育形体がとられていることを推定した。同様なことが他の家畜についても考えられるので、高橋が調査した地域と本研究における地域との鶏と牛の耐性菌保有率に大きな差があるとは考えられない。

それ故調査時期による違いが考えられる。高橋の調査と本研究の間にはほぼ10年間の隔りがあり、この間動物医薬の規制が種々なされているものの、実際に使用された薬剤の量は年々増加している。農林水産局の資料 (私信) によると動物用抗生物質の使用量は1965年に65吨であったものが、1970年には234吨に、1975年には414吨に、そして1980年には938吨に増加している。即ち、高橋が調査を始めた1970年から本研究を開始した10年間に抗生物質の使用量は約4倍に増加したことになる。



一方家畜家禽の飼育頭羽数<sup>(21,22)</sup>はこの10年間に於いて、牛が361.5万頭から438.5万頭に、豚が690.4万頭から1,006.5万頭に、そして鶏が23,534万羽から28,628万羽に増加し、増加割合は1.2乃至1.5倍に過ぎない。従って単純に見積もっても一頭または一羽当りの抗生物質投与量は2.5乃至3倍に増加したことになる。更に、乳・肉・卵への抗生物質残留を厳しく規制する方向がとられているので、乳牛や採卵鶏への薬剤使用は減少しているのに対し、肥育過程にある動物に対しては一層増加させられる傾向にある（肉類への抗生物質残留抑制のため、屠殺前一定期間薬剤の使用は禁止されている<sup>(5)</sup>）。

これらのことから本研究にみられるように薬剤耐性株の検出率がブロイラー鶏で高く乳牛で低く現われたものと考えられる。

そして、ブロイラー鶏から分離される大腸菌の薬剤耐性株の検出率は1974年<sup>(3)</sup>から殆んど変わっていない。個々の薬剤に対する耐性菌株の分離頻度についてもFTを除いて殆んど差はなかった。FT耐性株の分離頻度は1974年度の調査では93.8%であったが、1978年度では77.3%になり<sup>(3)</sup>、さらに今回の調査では31.0%に減少していた。このことはニトロフランに発癌性が認められ<sup>(23)</sup>、1975年の飼料添加剤に対する法改正とともにFTをはじめとする全ニトロフラン系合成抗菌剤の鶏への使用が禁止された<sup>(5)</sup>為と考えられる。

次に、動物腸管内で薬剤耐性プラスミドが大腸菌から腸球菌へ、または逆に腸球菌から大腸菌へ相互に移り得るか否かについては、両菌株間の各薬剤に対する感受性の違いがあり（大腸菌では本来EM, LMに耐性であり、腸球菌ではSU, KM等に耐性である）推定することはできなかった。しかし、耐性腸球菌をメンブランフィルター法で大腸菌受容菌と接合させその薬剤耐性プラスミドを伝達させることを試みたが実験した限りにおいては伝達はみられなかった。また、大腸菌および腸球菌のプラスミドDNA標品による相互の形質転換を試みたが、大腸菌プラスミドによる腸球菌形質転換株または腸球菌プラスミドによる大腸菌形質転換株を得ることはできなかった。

このことは用いた受容菌側に問題がある（制限酵素の存在または輸入プラスミドの不安定性等）のか、プラスミドそのものに問題があるのか今のところ明らかでない。腸球菌プラスミドは極く限られた近縁の菌種にしか入り得ないとの報告<sup>(24)</sup>もあり、今後追究すべき問題と考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うに当り有益なご助言を賜りました群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設の三橋進教授に深甚の謝意を表します。

また、有用な菌株を分譲下さいました同施設の井上松久助教授、ならびに、Royal Postgraduate Medical SchoolのAlan E. JACOB教授に心から感謝いたします。

そして、本研究に協力された小池雅弘君、美山正人君、佐藤智美嬢、星野康二君、ならびに、電子顕微鏡操作にご協力いただいた徳田孝技官に感謝いたします。

## 引用文献

- (1) 田川 清：香川大農学報，30, 107 (1978).
- (2) SAITO, A., TAGAWA, K., IKE, Y. and MITSUHASHI, S.: Japan J. Med. Sci. Biol., 33, 185 (1980).
- (3) TAGAWA, K.: J. Food Hyg. Soc., 22, 1 (1981).
- (4) 衆・参議院法制局編，現行法規総覧，56, 5533頁，第一法規出版，東京。
- (5) 同上，56, 5581, 5583頁。
- (6) 中村政幸：日畜会報，55, 291 (1984).
- (7) 吉田 稔：畜産の研究，38, 229 (1984).
- (8) 堀江，佐藤，宮鍋：食衛誌，12, 198 (1971).
- (9) 光岡知足：腸内細菌の世界，326頁，叢文社，東京 (1980).
- (10) BURDETT, V.: Antimicrob. Agents Chemother., 18, 753 (1980).
- (11) BIRNBOIM, H. C. and DOLY, J.: Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979).
- (12) MANIALIS, T., FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J.: Molecular Cloning, p. 68 Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
- (13) COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. and HSU, L.: Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 2110 (1973).
- (14) エーゲル・ミタニ充子：蛋核酵，19, 388 (1974).
- (15) 福家基宏：核酸実験法下，235頁，共立出版，東京 (1973).
- (16) LANG, D.: J. Mol. Biol., 54, 557 (1970).
- (17) GUERRY, P., LEBLANC, D. J. and FALKOW, S.: J. Bacteriol., 116, 1066 (1973).
- (18) HOLMES, D. S. and QUIGLEY, M.: Anal. Bio-

- chem., **114**, 193 (1981).
- (19) CLEWELL, D.B. and FRANKE, A.E.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**, 534 (1974).
- (20) 高橋 勇: *モダンメディア*, **22**, 248 (1976).
- (21) 農林水産省農林経済局統計情報部編: 第47次農林水産統計表, 118頁, 農林統計協会, 東京 (1971).
- (22) 同上: 第58次 農林水産統計表, 138頁, 農林統計協会, 東京 (1983).
- (23) KADA, T.: *Japan J. Genet.*, **48**, 301 (1973).
- (24) HORODNICEANU, T., BUU-HOIE, A., BOUGUENEC, C. L. and BIETH, G.: *Plasmid*, **8**, 199 (1982).

(1984年5月31日 受理)