

ブロイラー飼料に添加した抗菌性物質の定量と耐性菌

金子通治 Martha Elena Yamasaki

金丸佳郎 春日徳彦

抗菌性物質はヒトの疾病の治療に使用される重要な薬剤である。畜産関係では家畜や家禽類の疾病の治療のほか、発育の促進を目的としてその飼料に種々の抗菌性物質が添加されている。その結果生ずる食品への抗菌性物質の移行が食品衛生上問題となり、飼料に添加される抗菌性物質の使用は、昭和51年7月の農林省令第35号によって規制されている。また食品衛生法においても、食品中に抗生物質を含有してはならないことが厚生省告示第37号で規定されている。

抗菌性物質の使用により、ヒトの臨床材料から分離される薬剤耐性菌の増加はもちろんのこと、家畜や家禽類からも数多くの薬剤耐性菌が分離される結果となる。これら耐性菌から薬剤耐性因子（Rプラスミド）が検出されることも数多く報告されている^{1,2)}。

前回、われわれは農林水産省が実施したブロイラー飼料に添加した抗菌性物質の定量試験調査に参加した。そして、その飼料で飼育されたニワトリの腸管内容物より大腸菌を分離し、その薬剤耐性を調べた³⁾。そこでは、とくに大腸菌のテトラサイクリンに対する耐性化を検討したものである。

われわれは、今回も同様な機会を得たので飼料中の抗菌性物質の定量と、ニワトリの腸管内容物より大腸菌を分離し薬剤感受性を調査した。また、薬剤耐性菌の代表株についてRプラスミドの保有状況を検討したので報告する。

材料および方法

1. 飼料と腸管より分離した大腸菌

供試された飼料は、コリスチン添加の飼料6検体、バシトラシン添加5検体、モネンシン添加3検体とサリノマイシン添加の飼料3検体の計17検体である。腸管は、前後期（各1ヶ月）ともコリスチン添加の飼料で飼育され、1週間の休薬期間を経過したニワトリの腸管である。コリスチン添加飼料製造業者が3製造業者（A, B, Cとする）あり、その飼料によって養鶏業者が飼育したニワトリの腸管で、1製造業者飼料で飼育されたニワトリ3羽3腸管で計9羽9腸管である。Aの飼料で養鶏された腸管をAとし、同様にB, Cと区別した。それらの腸管より各50個を目標に大腸菌を選択した。A147株(A

-1:48, A-2:49, A-3:50)、B88株(B-1:50, B-2:15, B-3:23)とC110株(C-1:31, C-2:31, C-3:48)の計345株の大腸菌が得られ、これを検査材料とした。

2. 飼料中の抗菌性物質の定量

抗菌性物質の定量は、昭和53年農林水産省告示第212号による特定添加物指定基準によってバイオアッセイした。指示菌としてコリスチンの定量に*B. bronchiseptica* ATCC 4617, バシトラシン, サリノマイシンの定量に*M. flavus* ATCC 10240, モネンシンの定量には*B. subtilis* ATCC 6633を用いた。

3. 大腸菌の薬剤感受性試験

使用した薬剤は、サルファ剤(SA)、ストレプトマイシン(SM)、クロルテトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)およびアミノペンジルペニシリン(AB-PC)である。薬剤濃度は、SM, TC, CP, KMは1.6~200 µg/ml、AB-PCは25~1,600 µg/ml、SAは12.5~1,600 µg/mlである。日本化学療法学会の規定による平板希釈法によって薬剤感受性ディスク用培地を用い、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

4. 伝達性Rプラスミドの検出

SM, TC, CP, KMはMICが50 µg/ml以上、AB-PCは100 µg/ml以上、SAは200 µg/ml以上を薬剤耐性菌と判定し、Rプラスミドの検出は、ナリジキシン酸(NA)耐性を付与した*E. coli* 58-161を用い、37°C, 18時間の混合培養法によった。Donorの菌数は 5×10^8 個/mlに調整した。

結 果

飼料中の抗菌性物質の定量試験の結果は表1に示した。コリスチンの表示含有量2gカ価/tとバシトラシンAの前期126万単位/tの場合を除き、すべてが表示含有量以下であった。モネンシンとサリノマイシンの結果は表示含有量に対して66%から87%の含有量であった。腸管から分離した大腸菌345株の薬剤感受性試験の結果をA, B, C毎に図1に示し、図2にはA, B, Cをまと

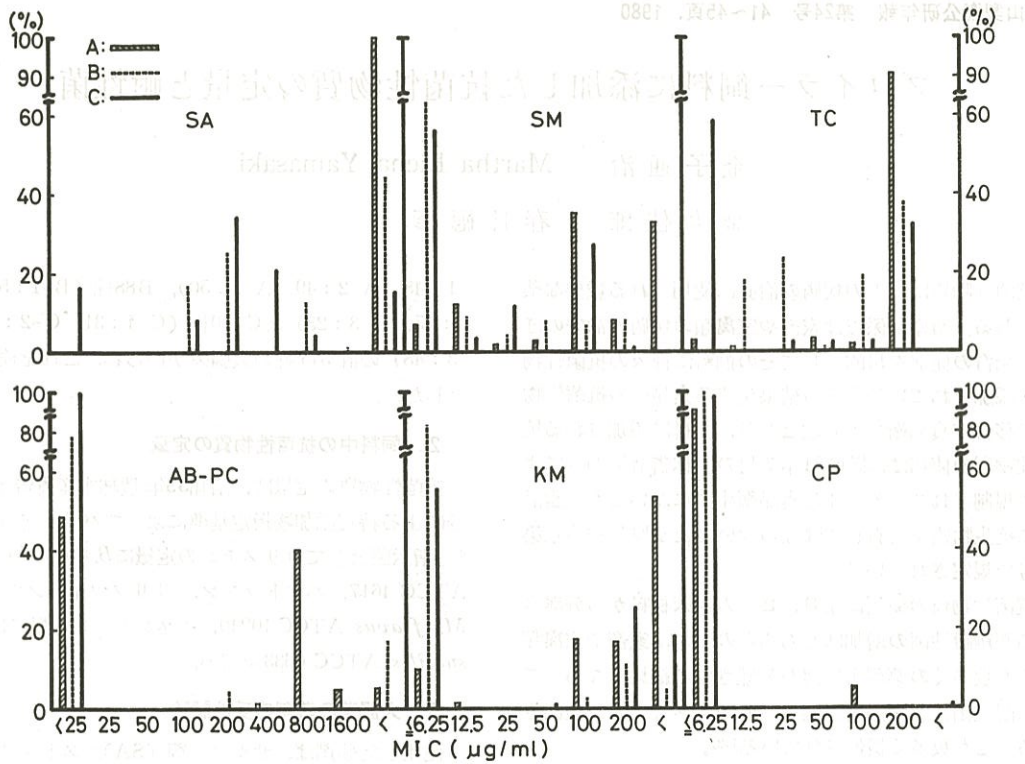


図1 各グループ毎の大腸菌の薬剤感受性分布

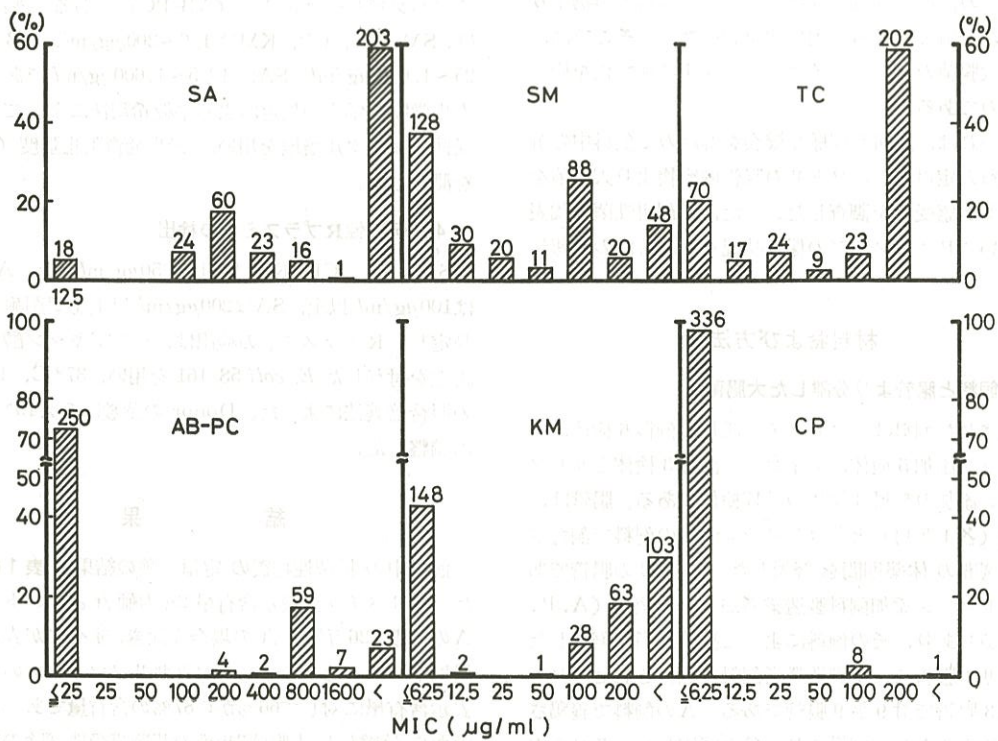


図2 大腸菌の薬剤感受性分布

表1 飼料添加抗菌性物質の含有量

飼料添加物名	製造業者	前・後期	表示含有量	検査結果
硫酸コリスチン	A	前後	5 g 力価/t 3	2.4 $\mu\text{g/g}$ 1.8
	B	前後	4 2	2.2 2.4
	C	前後	5 5	2.6 3.8
バシトランシ	A	前後	126万単位/t 126	1.4 u/g 0.7
	B	前後	168 168	1.1 1.4
	D	後	168	1.3
モネンシン			80 g力価/t	52.5 $\mu\text{g/g}$
			80	57.5
			80	65.0
サリノマイシン			50 g力価/t	43.3 $\mu\text{g/g}$
			50	36.7
			50	40.0

めた全体の薬剤感受性分布を示した。大腸菌 345株に対する MIC 値の占める割合を%で表現した。図中の数値は株数の実数である。図1にみられるように、CPを除いてはA, B, Cとも差がみられ、KMではMIC100 $\mu\text{g/ml}$ 以上がAは88.4%を占めるが、Bは18.2%, Cは44.5%であった。AB-PCでは25 $\mu\text{g/ml}$ 以下がA48.3% B78.4%, C100%とグループによってMICも異なることがわかる。とくに、TCではグループによる差が大きく、MIC 200 $\mu\text{g/ml}$ でみるとAが90.5%を占めるのに対し、B, Cでは37.5%, 32.7%と約3倍のひらきがあった。図2は大腸菌 345株のMIC分布であり、CPは6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下が336株で97.4%を占め、耐性株はわずか9株2.6%であった。AB-PCは25 $\mu\text{g/ml}$ 以下が250株72.5%で、耐性株は800 $\mu\text{g/ml}$ を中心に95株27.5%であった。KMは6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の感受性株(148株)より、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性株(195株)の方が多くみられた。SMは6.25~200 $\mu\text{g/ml}$ 以上すべてに分布され、感受性株と耐性株は約50%の割合であった。TCについて前回報告した成績³⁾と比較してみると、前回は65%が感受性であったのに比し、今回はMICが12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では87株25.2%であり約35%の差がみられた。

表2 分離した大腸菌の薬剤耐性パターン

耐性パターン	A			B			C			計
	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3	
SA・SM・TC・KM	46	2	5			1			9	63
SA・SM・TC	2	9				7		1		19
SA・SM・TC・CP・KM・AB-PC		8								8
SA・SM・TC・KM・AB-PC		27	9	5		1				42
SA・TC・KM・AB-PC		1	21	1						23
SA・SM・KM・AB-PC		1	3							4
SA・SM・TC・AB-PC		1	1							2
SA・TC・KM			7	2		5	5			19
SA・SM・AB-PC			2							2
SA・TC・AB-PC			2	11						13
SA・TC				2	2	6	7	6		23
SA・SM				1	6		1	4	1	13
SA				22			17	15	5	59
SA・KM								3	16	19
SA・AB-PC						1				1
SA・SM・TC・CP								1		1
TC					6	2				9
SM・TC・KM									12	12
TC・KM									1	1
KM									1	1
Sensitive				6	1		1	1	2	11
合計	48	49	50	50	15	23	31	31	48	345

大腸菌 345株の薬剤耐性パターンを表2にグループ毎に示した。前回の報告³⁾ではSA・TC・KM耐性とTC1剤耐性だけのパターンであったが、今回はさまざまなパターンが認められ、前回とは異なっていた。耐性パターンは20型にもおよび、SA1剤耐性を除くと275株が5剤のうちいずれかの薬剤に耐性であり約80%を占めた。耐性パターンは、グループによって大きな偏りがみられ、例えばA-1は48株のうち46株がSA・SM・TC・KM耐

性であり、A-2は49株のうち27株がCPを除く5剤に耐性を示し、A-3では50株のうち21株がSA・TC・KM・AB-PCに耐性であった。B、Cグループと比較し、Aグループはすべてが3剤以上に耐性で、感受性菌はみられなかった。6薬剤すべてに耐性であったのはA-2の8株であった。B-1、C-1、C-2は約50%がSA1剤のみ耐性であった。以上のように耐性パターンはグループ内でも差があることが認められた。

表3 代表的な薬剤耐性パターンのRプラスミドの伝達

Resistance pattern	Selection	No. of transconjugants	Drug susceptibility				
			SM	TC	CP	KM	AB-PC
SA・SM・TC・KM (A-1)	SM・NA	ca. 10 ⁶	R	S	—	R	—
	TC・NA	10 ³	S	R	—	R	—
	KM・NA	ca. 10 ⁶	R	S	—	R	—
SA・SM・TC (A-1)	SM・NA	0					
	TC・NA	0					
SA・SM・TC・CP・KM・ AB-PC (A-2)	SM・NA	ca. 10 ⁶	R	R	R	R	R
	TC・NA	10 ³	R	R	S	S	R
	CP・NA	10	R	S	R	R	R
	KM・NA	ca. 10 ⁶	R	R	R	R	R
	AB-PC・NA	ca. 10 ⁶	R	R	R	R	R
SA・SM・TC・KM・ AB-PC (A-2)	SM・NA	ca. 10 ⁴	R	S	—	R	R
	TC・NA	ca. 10 ⁶	R	R	—	R	R
	KM・NA	ca. 10 ⁶	R	R	—	R	R
	AB-PC・NA	ca. 10 ⁶	R	S	—	S	R
SA・TC・KM・AB-PC (B-1)	TC・NA	ca. 10 ⁴	—	R	—	R	S
	KM・NA	10 ²	—	R	—	R	S
	AB-PC・NA	0					
SA・SM・KM・AB-PC (A-3)	SM・NA	ca. 10 ⁶	R	—	—	R	S
	KM・NA	ca. 10 ⁶	R	—	—	R	S
	AB-PC・NA	ca. 10 ⁴	S	—	—	R	R
SA・SM・TC・AB-PC (A-3)	SM・NA	10 ²	R	S	—	—	S
	TC・NA	0					
	AB-PC・NA	10 ³	S	S	—	—	R

R ; Resistance

S ; Sensitive

薬剤耐性である代表株54株についてRプラスミドを保有しているかどうかをRecipientに *E. coli* 58-161 NA^r を用い、混合培養法によって検討した。表3にそのおもな結果を示した。前回と同様な耐性パターンであるTC1剤耐性とSA・TC・KM耐性株のRプラスミドの伝達の結果は表4に示した。TC1剤耐性は3株、SA・TC・KM耐性は5株について検討したものである。TC1剤耐性株は3株ともTC耐性が伝達し、SA・TC・KM耐性株は5株のうち4株が伝達した。また伝達株はKM・NA選択した場合、TransconjugantにTCの解離がみられた。検討した54株のうち耐性の伝達のみられ、プラスミドを保有していた株は40株74.1%であった。

表4 TC1 剤耐性と SA・TC・KM 耐性のRプラスミドの伝達

Resistance pattern	Selection	No. of trans-conjugants	Drug susceptibility		
			TC	SA	KM
TC					
(B-2)	TC・NA	10 ³	R	—	—
(B-3)	TC・NA	10 ²	R	—	—
(C-3)	TC・NA	10 ³	R	—	—
SA・TC・KM					
(A-3)	TC・NA	10 ³	R	R	R
	KM・NA	10 ³	R	R	R
(B-1)	TC・NA	10 ²	R	R	R
	KM・NA	10 ³	R	R	R
(B-3)	TC・NA	10	R	R	R
	KM・NA	ca. 10 ⁶	S	R	R
(B-3)	TC・NA	20	R	R	R
	KM・NA	10 ²	S	R	R
(C-1)	TC・NA	0			
	KM・NA	0			

R : Resistance S : Sensitive

考 察

飼料に添加した抗菌性物質の定量試験の結果、含有量は表示含有量と大きな差は認められず、17飼料中、15飼料が表示含有量以下であった。また、製造業者による差も認められず、適正な表示であったことが推定される。しかし、飼料中の抗菌性物質の定量だけでなく、食品衛

生上の見地からも食肉等の抗菌性物質の検出を幅広く行なうことも重要である。薬剤治療を受けたと疑われたウシ、ブタでの抗菌性物質の残留調査で、ウシから33%、ブタでは16%の抗菌性物質が検出されたという三宅らの報告⁴⁾もあり、今後ともに注視しなければならないだろう。

腸管から分離した大腸菌の薬剤感受性については、前後期ともにコリスチン添加の飼料で飼育したニワトリの腸管であるのにもかかわらず、前回の報告³⁾とは大きく異なった。前回とは大腸菌の分離株数にも大きな差はあるが、A、B、Cのグループはともに耐性パターンが10~11型におよんだ。それも各グループの3つの腸管から分離した大腸菌はそれぞれ互いに異なった耐性パターンを示した。Aグループにあってはすべてが耐性株であり、3剤以上に耐性を示す株であった。B、CグループではSA1剤耐性株と感受性株の計がそれぞれ88株中29株33.0%、110株中41株37.3%と他の耐性パターンよりは多くみられた。しかし、多剤耐性株もみられ、これらは環境面をも含めた養鶏条件等によるものと考えられる。AグループA-1では48株中46株がSA・SM・TC・KM耐性を示すことでも環境汚染等が推定される。

また、種々の耐性パターンを示す代表株54株についてRプラスミドの検出を試みたが、耐性の伝達のみられたのは40株あり74.1%にも達する。耐性の伝達のみられなかったのはSA・SM・TC、SA・SM、SA・TC、SA・AB-PCとSAの耐性パターンを示す株であった。これらは伝達条件を変えて再度実施しなければならない。今回のこれらの結果から、耐性菌の出現は単に抗菌性物質の使用によるとは考えにくく、すでに環境中に存在するRプラスミドによるものと考えられる。従って、耐性菌の由来を示す実験は、その実験設定に全くRプラスミドが存在しないという厳しい条件を付与しない限り、困難ではないだろうか。

文 献

- 1) 寺門誠致ら：第40回日本細菌学会関東支部総会講演抄録，35 (1978)
- 2) Kiyoshi Tagawa : J. Food Hyg. Soc. 22, 1~7 (1981)
- 3) 金丸佳郎，金子通治，春日徳彦：本誌 23, 30~32 (1979)
- 4) 三宅 勉ら：食品衛生研究 29, 363~372 (1979)