

VII-18

梅田川より分離した薬剤耐性大腸菌の性質に関する研究

東北工業大学 学生員 ○大羽 美香  
東北工業大学 正 員 伊崎 和夫

1. はじめに

これまで多数の抗生物質が、医薬品として使用され、主として感染症やガンの治療に大きな効果を発揮してきた。しかし、一方この抗生物質の乱用が薬剤耐性菌の増加を導き、特にR-プラスミドなどによる多剤耐性菌が出現し、現在医療上で大きな問題になりつつある。

本研究では、仙台市内を流れる梅田川より分離した薬剤耐性大腸菌の各種抗生物質に対する耐性及び耐性因子について調べた。

2. 実験方法

平成7年に梅田川より採水したものを試料として大腸菌の分離を行った。まずはじめに、マッコンキー寒天培地の培養により生じた赤色コロニーを釣菌し、肉汁寒天培地で純化した。さらに、クエン酸資化能、アセチルメチルカルビノール生成能がともに陰性、メチルレッド反応が陽性となった菌株を大腸菌として使用し、さらに腸内細菌検索用キット、エンテロチューブ、及び、アピ20を使用して大腸菌であることを確認した。

次に、TC (Tetracycline)、SM (Streptomycin)、CM (Chloramphenicol)、及びAP (Ampicillin) は最終濃度20 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、NA (Nalidixic Acid) は最終濃度30 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) になるようにそれぞれを肉汁寒天培地に添加した。これらの培地に液体肉汁培地で37℃、24h静置前培養した分離大腸菌菌株を接種し、37℃、24h培養し、生育した菌株を薬剤耐性大腸菌とした。

3. 実験結果及び考察

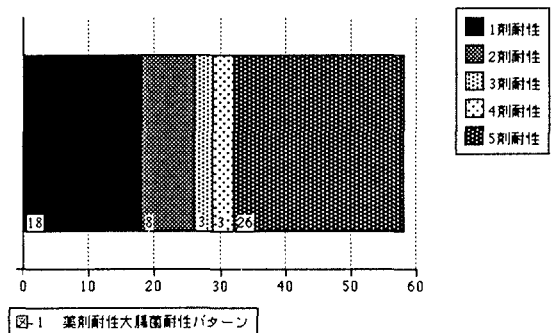
3-1 梅田川より分離した薬剤耐性大腸菌の薬剤耐性パターン

梅田川より分離された大腸菌のうち約20%の58菌株が薬剤耐性菌であった。その薬剤耐性は表-1、図-1に示した通りで、このうち5剤全てに耐性である菌株数が最も多く、次いで1剤耐性（全てTCのみに耐性）の菌株数が多かった。また、2剤耐性はTC及びCMに耐性、3剤耐性はTC、SM、及びCMに耐性、そして4剤耐性はNA以外の4剤に耐性であった。

薬剤別耐性菌株数を示した図-2より、分離された菌株全ての58菌株はTCに耐性であった。

表-1 分離大腸菌の薬剤耐性パターン

|    | TC | SM | CM | AP | NA | TC | SM | CM | AP | NA | TC                                                                                                       | SM | CM | AP | NA |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|
| 1  | +  | -  | -  | -  | -  | 21 | +  | +  | +  | +  | 41                                                                                                       | +  | +  | +  | +  |
| 2  | +  | -  | +  | -  | -  | 22 | +  | +  | +  | +  | 44                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 3  | +  | -  | +  | -  | -  | 23 | +  | +  | +  | +  | 45                                                                                                       | +  | +  | +  | +  |
| 4  | +  | -  | +  | -  | -  | 24 | +  | +  | +  | +  | 46                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 5  | +  | -  | +  | -  | -  | 25 | +  | +  | +  | +  | 47                                                                                                       | +  | +  | +  | +  |
| 6  | +  | -  | +  | -  | -  | 26 | +  | +  | +  | +  | 48                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 7  | +  | -  | +  | -  | -  | 27 | +  | +  | +  | +  | 49                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 8  | +  | -  | +  | -  | -  | 28 | +  | +  | +  | +  | 50                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 9  | +  | -  | +  | -  | -  | 29 | +  | +  | +  | +  | 51                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 10 | +  | -  | -  | -  | -  | 30 | +  | +  | +  | +  | 52                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 11 | +  | -  | -  | -  | -  | 31 | +  | +  | +  | +  | 53                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 12 | +  | -  | -  | -  | -  | 32 | +  | +  | +  | +  | 54                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 13 | +  | -  | -  | -  | -  | 33 | +  | +  | +  | +  | 55                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 14 | +  | -  | -  | -  | -  | 34 | +  | +  | +  | +  | 56                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 15 | +  | -  | -  | -  | -  | 35 | +  | +  | +  | +  | 57                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 16 | +  | -  | -  | -  | -  | 36 | +  | +  | +  | +  | 58                                                                                                       | +  | +  | +  | -  |
| 17 | +  | -  | -  | -  | -  | 37 | +  | +  | +  | +  | 59                                                                                                       | +  | -  | -  | -  |
| 18 | +  | -  | -  | -  | -  | 38 | +  | +  | +  | +  | 60                                                                                                       | +  | +  | +  | +  |
| 19 | +  | +  | +  | +  | +  | 39 | +  | +  | +  | +  | TC : Tetracycline<br>SM : Streptomycin<br>CM : Chloramphenicol<br>AP : Ampicillin<br>NA : Nalidixic Acid |    |    |    |    |
| 20 | +  | +  | +  | +  | +  | 40 | +  | +  | +  | +  |                                                                                                          |    |    |    |    |



### 3-2 O-157に関する検査

平成8年の夏、わが国において病原性大腸菌O-157株による集団食中毒が相次いで発生した。ここでは分離した薬剤耐性大腸菌58菌株を実験するにあたって、その安全性を確認する上でO-157株に関する培養検査を行った。その結果、O-157株の性状である、ソルビトールからの酸生成陰性、 $\beta$ -グルクロニダーゼ陰性を示す菌株は分離されなかった。

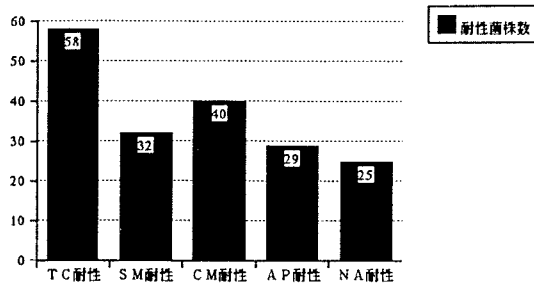


図-2 薬剤別耐性菌株数

### 3-3 CMの不活性化

CM耐性の細菌の多くはアセチル化によりCMを不活性化し耐性を示すことが知られている。ここでは、CMに耐性であった分離菌株No.32とCMに感受性である菌株E.coli K-12のCM不活性化の経時変化をペーパーディスク法により調べた。その結果を図-3に示した。感受性である菌株E.coli K-12はCMの不活性を示さないが、CM耐性菌No.32は反応開始3時間後にCMを完全に失活させる活性を有していた。他のCM耐性菌も同様CM不活性化を示した。

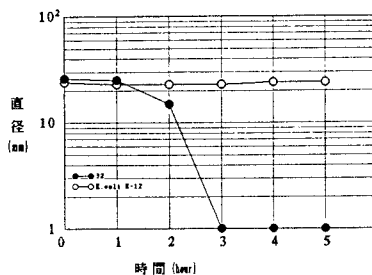


図-3 クロラムフェニコール不活性化の経時変化

### 3-4 R因子の接合による伝達

今回、仙台市の河川より分離した薬剤耐性菌には多剤耐性菌が存在することがわかったが、多剤耐性菌の出現の原因としてはR因子による耐性伝達と発現が考えられる。そこで分離した大腸菌の薬剤耐性が他の細菌に伝達されるか否かを調べた。方法は、最終濃度20 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のCMを添加したBTB乳糖培地にCM耐性でNAに感受性である分離大腸菌株とE.coli JM109 (NAのみに耐性)を重ねて接種し37℃、24 h混合培養した。生育した菌株を最終濃度20 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のCMと最終濃度30 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のNAを添加した肉汁寒天培地に接種し、生育したものをR因子が分離菌株よりE.coli JM109へ伝達されたものとした。その結果は表-2に示した通りである。全ての菌株についてCM耐性の伝達を確認することができた。これより、梅田川より分離した薬剤耐性大腸菌のうち、少なくともCM耐性を有する薬剤耐性大腸菌についてはその薬剤耐性がR因子に由来していることが推定された。

### 4. おわりに

梅田川より分離した薬剤耐性大腸菌のうちいわゆる多剤耐性大腸菌が7割にも及んでいた。このことは多数の多剤耐性細菌が環境中に存在することを示す。

今後、他の河川、湖沼、海洋や下水等の水環境中より薬剤耐性菌を分離し、その性質を調べる必要があり、さらに薬剤耐性菌への新たな対策を考える必要がある。

最後に梅田川からの大腸菌の分離を主として行って戴いた平成7年度研修生の奥昌伸君、小林信之君に深く感謝する。

表-2 混合培養によるR因子の耐性

| 単独培養  | CM | 混合培養     | CM | NA+CM |
|-------|----|----------|----|-------|
| 2     | +  | 2+JM109  | +  | +     |
| 3     | +  | 3+JM109  | +  | +     |
| 4     | +  | 4+JM109  | +  | +     |
| 5     | +  | 5+JM109  | +  | +     |
| 6     | +  | 6+JM109  | +  | +     |
| 7     | +  | 7+JM109  | +  | +     |
| 8     | +  | 8+JM109  | +  | +     |
| 9     | +  | 9+JM109  | +  | +     |
| 46    | +  | 46+JM109 | +  | +     |
| 48    | +  | 48+JM109 | +  | +     |
| 49    | +  | 49+JM109 | +  | +     |
| 52    | +  | 52+JM109 | +  | +     |
| 58    | +  | 58+JM109 | +  | +     |
| 60    | +  | 60+JM109 | +  | +     |
| JM109 | -  |          |    |       |