薬剤耐性菌を用いる残留抗生物質の微生物学的簡易分別同定法

(平成6年4月13日受理)

吉田 健一* 近藤 房生*

Simplified Classification Method for Residual Antibiotics by Microbiological Assay Using Drug-Resistant Bacteria

Kenichi YOSHIDA and Fusao KONDO

(Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, Miyazaki University: Kibanadai-Nishi, Gakuen, Miyazaki 889-21, Japan)

We prepared oxytetracycline (OTC)-resistant *Bacillus cereus* (50 µg/ml), tylosin (TS)-resistant *B. subtilis* (12.5 µg/ml) and streptomycin (SM)-resistant *B. subtilis* (100 µg/ml) and used the sensitive organisms for microbiological assay to detect residual antibiotics. The development of drug-resistant strains to OTC, TS and SM was carried out by the broth dilution method and the obtained drug-resistant bacteria were investigated for cross resistance to about 19 antibiotics. Each drug-resistant bacterium showed almost the same cross resistance within the same groups of antibiotics.

The results suggested that the application of these three drug-resistant strains and the sensitive organisms will make it possible to classify residues into tetracyclines, macrolides and aminoglycoside antibiotics, especially streptomycin.

(Received April 13, 1994)

Key words: 残留抗生物質 residual antibiotics; バイオアッセイ microbiological assay; 薬剤耐性菌 drug-resistant bacteria; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis*; オキシテトラサイクリン耐性 OTC-resistant; タイロシン耐性 TS-resistant; ストレプトマイシン耐性 SM-resistant; 系統別検査法 classification method

緒 言

畜水産物中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法は、第一次のスクリーニング検査として極めて重要であり、その検出感度を向上させる目的で、試験菌の選択、測定培地あるいは測定条件¹⁾の改良などの努力が重ねられ、その結果として、米国では STOP (Swab test on premises) 法²⁾が、欧州諸国では German Hemmstoff 法や Four-Plate 法³⁾等によって実施されているのが現状である。

しかしながら、微生物学的検査に関しては、測定培地上において阻止円形成が認められ残留陽性と判定されたとしても、それがいかなる系統の薬剤であるかを分別同定することはほとんど不可能である。現状では、不活化酵素ペニシリナーゼを用いたペニシリン系薬剤の分別同定⁴⁾、あるいはトリメトプリム (TMP) による協力作用⁵⁾

及びパラアミノ安息香酸 (PABA) による拮抗作用^{6), 7)}の確認によるサルファ剤の分別同定のみである。

ところで、耐性菌を用いた微生物学的簡易検査法による分別同定法も検討^{8)~10)}されているが、いずれの報告も試験菌としてグラム陰性菌の感受性株及びその耐性菌の併用によるもので、従って検出感度が悪く、高濃度の残留でない限り検出は不可能であり実用性に問題がある。

そこで、著者らは主要な抗菌性物質群であるテトラサイクリン系、マクロライド系及びアミノグリコシド系抗生物質の微生物学的検査時における実用的な分別同定法を開発すべく、現行のスクリーニング試験において常用されているグラム陽性菌の *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC-11778 (*B. cereus*) 及び *Bacillus subtilis* ATCC-6633 (*B. subtilis*) を用いて、試験管内で耐性獲得試験を行った。得られたオキシテトラサイクリン耐性 *B. cereus* 株、タイロシン並びにストレプトマイシン耐性 *B. subtilis* 株の各々耐性株と感受性株 (親株) を併用す

* 宮崎大学農学部: 〒889-21 宮崎市学園木花台西 1-1

る残留抗生物質の微生物学的検査における簡易分別同定法について基礎的検討を行った。

実験方法

1. 抗菌性物質

供試薬剤として、テトラサイクリン系抗生物質5剤[オキシテトラサイクリン(OTC, (株)台糖Pfizer), クロルテトラサイクリン(CTC, Sigma社), テトラサイクリン(TC, Sigma社), メタサイクリン(MTC, (株)台糖Pfizer), ドキシサイクリン(DOXY, Sigma社)], アミノグリコシド系抗生物質5剤[ストレプトマイシン(SM, 明治製薬(株)), ジヒドロストレプトマイシン(DSM, Sigma社), カナマイシン(KM, Sigma社), ゲンタマイシン(GM, 和光純薬工業(株)), フラジオマイシン(FRM, 日本化薬(株))], マクロライド系抗生物質5剤[タイロシン(TS, Sigma社), エリスロマイシン(EM, Sigma社), オレアンドマイシン(OL, Sigma社), スピラマイシン(SPM, Sigma社), ジョサマイシン(JM, 和光純薬工業(株))], ペニシリン系抗生物質2剤[ペニシリン-G(PCG, Sigma社), アンピシリン(ABPC, 藤沢製薬(株))], リンコマイシン(LCM, Sigma社)及びクロラムフェニコール(CP, 三共(株))の, 合計19種類を使用した。

これらの薬剤は滅菌蒸留水や10%エタノールで完全に溶解後, Mueller-Hinton broth(MHB, Difco社)に加え, 目的とする薬剤濃度に調製した。

2. 供試菌株

現在, 畜産物中残留抗菌性物質のスクリーニング試験に広く使用されている *B. subtilis* 及び *B. cereus* を用いた。

3. 耐性獲得試験

テトラサイクリン系, アミノグリコシド系及びマクロライド系の代表薬剤として各々OTC, SM, TSを用い, これらを段階的に増量して調製した各MHBに, *B. subtilis* 及び *B. cereus* を累代継代培養する方法¹¹⁾で, 耐性獲得試験を実施した。

すなわち, 各抗生物質をMHBで適当の濃度より2倍又は10倍の段階希釈系列を小試験管に作り, これに1昼夜培養した試験菌をMHB 2mlに対して0.1ml接種し, 24時間培養後に対照の抗生物質無添加MHBと同程度に増殖した濃度をもって, 一継代株が獲得した耐性値とみなした。

本実験で得られた耐性獲得の *B. subtilis* 及び *B. cereus* 株は, 薬剤フリーのMHBで5代にわたり継代を繰り返した後も, その耐性値が安定していることを確認した。

4. 交差耐性試験

上記の耐性獲得試験で得られた3種類の抗生物質に対する *B. subtilis* 及び *B. cereus* の4つの耐性株及び両者の親株(感受性株)を用いて, 各グループの主要な抗

Fig. 1. Development of drug resistance to OTC

Fig. 2. Development of drug resistance to TS and SM

生物質に対する, 薬剤感受性試験(日本化学療法学会標準法¹²⁾による最小発育阻止濃度(MIC)の測定)を実施し, 他の薬剤間との交差耐性を調べた。

供試薬剤の100~0.0125 μg/mlの2倍階段希釈溶液について, 測定培地として Mueller-Hinton agar(MHA, Difco社)を, また耐性獲得株及び感受性株の10⁶ cells/mlの1白金耳量(0.005 ml)を, マイクロプランターを用いて寒天平板上に塗抹した後, 37°で18時間培養した。

5. 感受性及び耐性株を用いた微生物学的簡易試験法

B. subtilis 及び *B. cereus* の感受性株と, 耐性獲得試験で得られた OTC 耐性 *B. cereus* 及び TS, SM 耐性 *B. subtilis* について芽胞浮遊液を作製した。すなわち, 各々の耐性株をルー瓶内の Nutrient agar (Difco 社)の平板上で, 37°で1週間培養後, 寒天表面の菌苔をかき取り適当量の滅菌生理食塩水に浮遊させ, 65°で30分

間加熱した。これを 3,000 rpm, 20 分間遠心して得られた芽胞沈渣を更に適当量の滅菌生理食塩水に浮遊させて芽胞浮遊液 (10^8 /ml) とした。

更に、このようにして調製した芽胞浮遊液が、微生物学的簡易試験用の試験菌として、安定的に使用が可能かどうか(薬剤耐性から感受性への復帰の有無)について検討した。従来法に従って測定培地 MHA に芽胞が 10^6 /ml になるように接種し、平板としたあと、ディスク拡散法により行った。判定は、各試験菌接種平板上のペーパーディスク(直径 10 mm, 厚手, 東洋濾紙(株)製)周辺の阻止円直径(mm)の測定と検出限界値(μ g/ml)により行った。なお、阻止円直径は 12 mm 以上のものを陽性とみなした。

結 果

1. 耐性獲得試験成績

薬剤増量の累代継代培養法による耐性獲得試験の結果、*B. cereus* は OTC に対して $0.031 \mu\text{g/ml}$ から $50 \mu\text{g/ml}$ までの約 1660 倍に耐性を獲得した。一方、*B. subtilis* では、OTC に対して、 $0.10 \mu\text{g/ml}$ から $1.56 \mu\text{g/ml}$ の 15.6 倍に(Fig. 1), TS に対しては $0.78 \mu\text{g/ml}$ から $12.5 \mu\text{g/ml}$ の 16 倍に、SM に対しては $3.13 \mu\text{g/ml}$ から $100 \mu\text{g/ml}$ の 31.9 倍に、各々耐性の獲得が認められた(Fig. 2)。

2. 交差耐性試験成績

OTC 耐性 *B. cereus* を用いた交差耐性試験の結果は、テトラサイクリン系薬剤(OTC, CTC, TC, MTC, DOXY)に対してのみ、 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度において交差耐性を示した(Table 1)。また、OTC 耐性 *B. subtilis* 株も、テトラサイクリン系薬剤(OTC, CTC, TC, MTC, DOXY)に対してのみ、 $3.13 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ の交差耐性を示した。更に、TS 耐性 *B. subtilis* も、マクロライド系薬剤(TS, EM, OL, SPM, JM)に対してのみ、 $12.5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の交差耐性を示した。一方、SM 耐性 *B. subtilis* は、アミノグリコシド系薬剤の SM, DSM の両剤に対しては、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の強い交差耐性を示したが、それ以外の KM, GM 及び FRM に対して、中程度($0.39 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$)の耐性に留まった(Table 2)。

ところで、OTC 耐性 *B. cereus* 株、及び OTC, SM, TS 耐性 *B. subtilis* の各株は、ペニシリン系(PCG, ABPC), LCM 及び CP に対しては、全く交差耐性を示さず、各々の親株(感受性株)と同等の MIC 値であった(Table 1, 2)。

3. 感受性及び耐性株を用いた微生物学的簡易試験法の結果

OTC 耐性 *B. cereus* 及び TS 耐性 *B. subtilis* 株について芽胞浮遊液を作製し、それを試験菌としたディスク拡散法において、各々テトラサイクリン系及びマクロライ

Table 1. Comparison of MIC Values for 19 Antibiotics Using Sensitive and OTC-Resistant Strains

Drug		<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC-11778	OTC ($50 \mu\text{g/ml}$)-resistant strain
TCs	OTC	0.78	>100
	CTC	0.78	>100
	TC	0.78	>100
	MTC	0.39	>100
	DOXY	0.39	100
MLs	TS	0.78	0.78
	EM	0.20	0.20
	OL	0.39	0.39
	SPM	3.13	6.25
	JM	0.39	0.78
AGs	SM	3.13	1.56
	DSM	1.56	1.56
	KM	3.13	3.13
	GM	1.56	0.78
	FRM	1.56	0.78
PCs	PCG	6.25	3.13
	ABPC	6.25	1.56
Others	ICM	12.5	12.5
	CP	3.13	3.13

Assay medium: Mueller-Hinton agar (Difco)

Inoculum size: 10^6 cells/ml

Incubation temperature and time: 37°C for 18 hr

Table 2. Comparison of MIC Values for 19 antibiotics Using Sensitive and TS-, SM-Resistant Strains

Drug		<i>B. subtilis</i> ATCC-6633	TS (12.5 µg/ml)- resistant strain	SM (100 µg/ml)- resistant strain
TCs	OTC	0.78	0.78	0.39
	CTC	0.78	0.78	0.39
	TC	0.78	0.78	0.78
	MTC	0.78	0.78	0.78
	DOXY	0.39	0.39	0.39
MLs	TS	0.20	25	0.20
	EM	0.10	12.5	0.10
	OL	0.78	25	0.78
	SPM	1.56	50	1.56
	JM	0.39	12.5	0.39
AGs	SM	0.78	0.78	>100
	DSM	0.78	0.78	>100
	KM	0.39	0.39	3.13
	GM	0.10	0.10	0.39
	FRM	0.20	0.20	0.78
PCs	PCG	<0.0125	<0.0125	<0.0125
	ABPC	<0.0125	<0.0125	<0.0125
Others	LCM	12.5	12.5	12.5
	CP	3.13	3.13	3.13

Assay medium: Mueller-Hinton agar (Difco)

Inoculum size: 10⁶ cells/ml

Incubation temperature and time: 37°C for 18 hr

Table 3. Comparison of Clear Inhibition Zone Sizes (mm) for Major Antibiotics Using Disc Diffusion Method

Drug	Organism	Drug concentration (µg/ml)						
		100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
SM	<i>B. subtilis</i>	24.55	21.20	18.20	16.40	14.05	12.05	
	SM-resistant	16.50	14.40	12.60				
KM	<i>B. subtilis</i>	29.00	26.80	24.10	22.05	18.15	14.80	12.05
	SM-resistant	23.40	21.50	19.15	17.70	15.20	12.60	
TS	<i>B. subtilis</i>	24.55	22.05	19.60	17.15	14.65	12.25	
	TS-resistant	12.10						
OL	<i>B. subtilis</i>	22.00	20.00	18.30	16.40	14.05		
	TS-resistant	16.10	12.05					
OTC	<i>B. cereus</i>	24.10	21.75	19.15	17.60	16.20	14.30	12.10
	OTC-resistant	—						
CTC	<i>B. cereus</i>	24.50	22.90	20.35	18.10	16.60	14.80	12.30
	OTC-resistant	13.25						

Assay medium: Mueller-Hinton agar (Difco)

Condition of test organisms: spore suspension

Incubation temperature and time: 37°C for 18 hr

ド系各薬剤の阻止円は、低～中濃度においては全く形成せず、100 ないし 50 µg/ml の高濃度において若干形成されたのみであった。また、自身の属する系統以外の薬剤による阻止円形成は、*B. cereus* 及び *B. subtilis* の感受性株とほとんど同等であった。

なお、SM 耐性 *B. subtilis* を試験菌とした場合、SM、DSM では阻止円形成がかなり減弱されたものの、KM、GM 及び FRM においては若干の減弱に留まった (Table 3)。

考 察

抗菌性物質の微生物学的簡易検査法として、これまで多くの方法が報告されているが、未だ満足すべき検査法が存在しないのが現状である。

現在、残留抗生物質の分別推定法として、神保ら¹³⁾が開発した、残留陽性の検体を除タンパク後、性質の異なるミニカラムを用いて分別抽出した抗生物質を微生物学的に推定するという簡易系統別検査法が報告されている。しかしながら、本法はカラムによる抽出・精製過程があるため、それらの経費と、試験成績が判明するまでに時間を要するという欠点がある。

そこで、著者らは第一次のスクリーニング試験として、微生物学的検査に使用されている感受性菌（特にグラム陽性菌）を用いて、特定の薬剤に対して、作出した耐性獲得株と感受性株を併用する残留抗菌性物質の簡易分別同定法について検討した。

現在、行われている微生物学的試験においては、ペニシリン不活化酵素であるペニシリナーゼを用いたペニシリン系薬剤の分別同定、あるいはPABAによる拮抗及びTMPによる協合作用によるサルファ剤の分別同定が行われているのみで、その他の薬剤については阻止円が認められてもどの系統に属する薬剤であるか推定することは不可能である。また、薬剤不活化酵素を用いたアミノグリコシド系抗生物質の識別についての報告¹⁴⁾がなされているものの、実際の微生物学的試験には応用されていないのが現状である。

今回、著者らは一般に知られているような抗生物質間の交差耐性が、化学構造及び作用機序が類似した同系列の薬剤間において、顕著に見られるという性質を利用することを企図し、薬剤増量の累代継代培養法により、耐性獲得試験及び交差耐性試験等を実施した。その試験結果から、OTC耐性 *B. cereus* 及び TS耐性 *B. subtilis* の芽胞浮遊液を用いることによって、各々テトラサイクリン系、マクロライド系においては微生物学的検査時に識別が可能であり、また SM耐性 *B. subtilis* もアミノグリコシド系薬剤、とりわけ SM, DSM に対して特異的にその阻止円を減弱させた。更に、KM あるいは GM の高度耐性菌を作製することによってアミノグリコシド系薬剤の一括した識別も可能であると思われた。

以上、耐性株及び同菌の感受性株を用いる微生物学的分別同定試験の結果から、残留抗生物質の系統が判明すれば、その系統の抗生物質に対して最適な抽出・精製法の選択・特定が容易となり、更にその後の高速液体クロマトグラフィーによる分析条件の特定並びに個々の薬剤の同定といった、一連の検査過程の短縮・効率化を図る

上でも極めて有用であると思われた。

要 約

残留抗生物質の微生物学的検査において常用されている *B. cereus* 及び *B. subtilis* について、薬剤増量の累代継代培養法により、前者ではオキシテトラサイクリン (OTC) 耐性 (50 µg/ml)、後者ではタイロシン (TS) 耐性 (12.5 µg/ml) 及びストレプトマイシン (SM) 耐性 (100 µg/ml) 株を作出した。耐性獲得株を用いて 19 種類の抗生物質に対する交差耐性試験を行った結果、各耐性株は各々が属する系統の薬剤にのみ交差耐性を示した。更に、芽胞浮遊液を作製してディスク拡散法を行った結果、OTC 耐性 *B. cereus* 及び TS 耐性 *B. subtilis* は、各々が属する系統の薬剤にのみ阻止円の形成を抑制し、他系統の薬剤では感受性菌と同等の阻止円を形成した。また、SM 耐性 *B. subtilis* では SM, DSM にのみ阻止円形成を抑制し、他のアミノグリコシド系においては阻止円の縮小が認められた。すなわち、本耐性菌 3 株と感受性菌の使用によって微生物学的に、テトラサイクリン系、マクロライド系及びアミノグリコシド系、特にストレプトマイシン類の分別同定が可能であった。

文 献

- 1) Brady, M. S., Katz, S. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 202~205 (1990).
- 2) Korsrud, G. O., Macneil, J. D.: J. Food Prot. **51**, 43~46 (1988).
- 3) Nouws, J. F. M.: Archiv Für Lebensmittelhygiene **32**, 103~110 (1981).
- 4) Messer, J. W., Leslie, J. E., Houghtby, G. A., Peeler, J. T., Barnett, J. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **65**, 1,208~1,214 (1982).
- 5) Hitching, G. H.: Postgrad. Med. J. **45**, 7~10 (1969).
- 6) Gudding, R.: Acta Vet. Scand. **15**, 366~380 (1974).
- 7) Gudding, R.: *ibid.* **17**, 458~464 (1976).
- 8) 常盤 寛, 古賀洋一: 医学と生物 **85**, 17~21 (1972).
- 9) 齊田 清, 栗原 貯, 信沢敏夫, 中嶋 隆, 渋沢幸一: 日獣会誌. **32**, 382~386 (1979).
- 10) Lund, M. E., Blaevicx, D. J., Matsen, J. M.: Antimicrob. Agents Chemother. **4**, 569~573 (1973).
- 11) 西野武志, 田中真由美, 監物英男, 谷野輝雄: Chemotherapy **33**, 39~63 (1985).
- 12) 五島瑳智子, 徐 慶一郎, 河喜多龍祥, 小西井 望, 三橋進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋: *ibid.* **29**, 76~79 (1981).
- 13) 神保勝彦, 門間千枝, 丸山 務, 松本昌雄: 食衛誌. **32**, 86~92 (1991).
- 14) 花岡正季, 長谷 篤: 同上 **29**, 175~179 (1988).